

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Humanes NLRP1 ist ein Sensor für Doppelstrang-RNA

Stefan Bauernfried

aus

Melk, Österreich

2021

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Veit Hornung betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 20.09.2021

Stefan Bauernfried

Dissertation eingereicht am:

23.09.2021

1. Gutachter:

Prof. Dr. Veit Hornung

2. Gutachter:

Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Mündliche Prüfung am:

16.11.2021

Auszüge der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgender Publikation veröffentlicht worden und wurden teilweise wörtlich aus dem Englischen übersetzt:

Bauernfried, S., Scherr, M. J., Pichlmair, A., Duderstadt, K. E. & Hornung, V. *Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA*. *Science* 371, doi:10.1126/science.abd0811 (2021).

Nicht selbstständig durchgeführte, aber in dieser Arbeit angeführte, Experimente:

- Expression von NLRP1 Δ CARD in Insektenzellen: Durchgeführt von Judith Scholz/Sabine Suppmann (Max-Planck-Institut (MPI) für Biochemie, *Core Facility*)
- *High performance liquid chromatography* (HPLC)-Messung von Nukleotiden: Durchgeführt von Stephan Uebel (MPI für Biochemie, *Core Facility*)
- Analyse der Propidiumiodid-Färbung sowie ASC-*speck*-Bildung: Durchgeführt von Matthias Scherr (MPI für Biochemie, Arbeitsgemeinschaft Duderstadt)
- Reinigung von NLRP1 Δ CARD aus Insektenzellen: Durchgeführt von Matthias Scherr (MPI für Biochemie, Arbeitsgemeinschaft Duderstadt)
- Reinigung von LRR(k) und LRR(l) aus *E. coli*: Durchgeführt von Matthias Scherr (MPI für Biochemie, Arbeitsgemeinschaft Duderstadt)
- Untersuchung und Analyse der Nukleinsäurebindung mittels Fluoreszenzanisotropie und *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA): Durchgeführt von Matthias Scherr (MPI für Biochemie, Arbeitsgemeinschaft Duderstadt)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	4
1.2	<i>Pattern recognition receptors</i>	5
1.2.1	<i>Toll-like receptors</i>	6
1.2.2	<i>C-type lectin receptors</i>	7
1.2.3	<i>AIM-like receptors</i>	7
1.2.4	<i>RIG-I-like receptors</i>	8
1.2.5	Zytosolische DNA-Erkennung	9
1.2.6	Zytosolische RNA-Erkennung	9
1.2.7	NLRs	10
1.3	Effektormechanismen der angeborenen Immunantwort	12
1.3.1	Zelltod	12
1.3.2	Zytokinfreisetzung	13
1.4	Wirt-Pathogen-Interaktionen	15
1.5	Das Inflammasom	16
1.5.1	NLRP3	17
1.5.2	NLRC4	19
1.5.3	Pyrin	19
1.5.4	AIM2	20
1.6	FIIND-enhaltende Inflammasom-Sensoren	20
1.6.1	Mäuse NLRP1B	22
1.6.2	Humanes NLRP1	25
1.6.3	Humanes CARD8	28
2	Zielsetzung	30
3	Material und Methoden	31
3.1	Material	31
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.2	Antikörper	31
3.1.3	Bakterienstämme	31
3.1.4	Chemikalien und Reagenzien	31
3.1.5	Enzyme	33
3.1.6	Oligonukleotide	34
3.1.7	Plasmide	34
3.1.8	Rekombinante Proteine	36
3.1.9	Medien und Puffer	36
3.1.10	Antibiotika	38
3.1.11	Geräte und Ausstattung	38
3.1.12	Software und Algorithmen	39
3.2	Molekularbiologie	39
3.2.1	Herstellung von chemokompetenten <i>E. coli</i>	39
3.2.2	PCR	39
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	39
3.2.4	Gelaufreinigung	39
3.2.5	Klonierungen	39
3.2.6	Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.2.7	Plasmid Isolation aus <i>E. coli</i>	40
3.2.8	Sanger Sequenzierung	40
3.2.9	Herstellung von kurzen dsRNA und dsDNA Fragmenten	40
3.2.10	Herstellung von IVT4	41

3.2.11	In-vitro-Transkription	41
3.2.12	RNA Präzipitation	43
3.3	Zellkultur.....	43
3.3.1	Viren.....	43
3.3.2	Zelllinien	43
3.3.3	Kultivierung	44
3.3.4	Isolation von primären Monozyten.....	44
3.4	Zellbiologische Methoden	44
3.4.1	<i>Knockout</i> -Generierung mittels Ribonukleoprotein	44
3.4.2	Herstellung transgener Zellen	45
3.4.3	Stimulation von Zellen.....	46
3.4.4	<i>Time-lapse microscopy</i>	46
3.4.5	<i>ASC-speck</i> -Visualisierung.....	46
3.4.6	Bildanalyse	47
3.4.7	Immunofluoreszenzfärbung	47
3.4.8	ELISA.....	47
3.4.9	Immunopräzipitation mit rekombinantem Protein.....	47
3.4.10	Immunopräzipitation aus 293T-Zelllysat	48
3.4.11	Western Blot	48
3.4.12	DSS-Kreuzvernetzung	48
3.5	Biochemie.....	48
3.5.1	Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen.....	48
3.5.2	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien	49
3.5.3	Reinigung von NLRP1 Δ CARD	49
3.5.4	Reinigung der NLRP1-Trunkationen und des Mäuse-NLRP1B Proteins.....	50
3.5.5	Coomassie-Färbung.....	51
3.5.6	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	51
3.5.7	<i>ADP-Glo assay</i>	51
3.5.8	HPLC-Messung von Nukleotiden	51
3.5.9	MANT-ATP Bindungsstudien	52
3.5.10	Fluoreszenzanisotropie	52
3.5.11	Modellierung von Proteinen	52
3.6	Quantifizierung und statistische Analyse	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Die N/TERT-1-Keratinocyten-Zelllinie eignet sich zur Untersuchung des humanen NLRP1-Inflammasoms	54
4.2	Semliki Forest Virus aktiviert das NLRP1-Inflammasom	55
4.2.1	Die NLRP1-Inflammasomaktivierung durch SFV ist abhängig von einer Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase.....	56
4.3	NLRP1 wird durch lange dsRNA aktiviert.....	57
4.3.1	Die Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA führt zu einer klassischen Pyroptose	58
4.3.2	Die Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA ist abhängig von der Länge der dsRNA	61
4.4	Zellen epidermalen Ursprungs zeigen eine NLRP1-abhängige Inflammasomaktivierung nach dsRNA Stimulation	62
4.5	Die Aktivierung durch dsRNA ist speziesspezifisch.....	63
4.5.1	Myeloische Zellen können mit einem dsRNA-detektierendem NLRP1-Inflammasom rekonstituiert werden	64
4.5.2	Die Aktivierung durch dsRNA ist unabhängig von einem Me-Bs-sensitiven <i>N-end-rule</i> -Signalweg	65
4.6	Bekannte dsRNA-Sensoren spielen keine Rolle bei der Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA	66
4.6.1	Die Aktivierungsschwelle von NLRP1 durch dsRNA verschiedener Größen wird durch die PYD reguliert.....	67
4.6.2	Die Autoproteolyse von NLRP1 ist notwendig für die Aktivierung durch dsRNA	68

4.7	Humanes NLRP1 ist ein direkter Sensor für dsRNA.....	68
4.7.1	Humanes NLRP1 bindet an Nukleinsäuren	69
4.7.2	Humanes NLRP1 zeigt eine starke elektrostatische Ladung	70
4.7.3	Die dsRNA- sowie dsDNA-Bindung von NLRP1 sind ähnlich stark.....	71
4.7.4	Die Isoform 6 von NLRP1 wird nicht durch dsRNA aktiviert	72
4.8	Die dsRNA-Bindung triggert eine NLRP1-abhängige ATP-Hydrolyse	72
4.8.1	Die NACHT-LRR-Domänen von NLRP1 sind das minimale Motiv für eine ATP-Hydrolyse	73
4.8.2	Walker A- und Walker B-Mutanten von NLRP1 reagieren nicht mehr auf dsRNA.....	74
5	Diskussion	76
5.1	N/TERT-1-Zellen als leicht genetisch veränderbares Werkzeug zur Untersuchung des NLRP1-Inflammasoms	76
5.2	NLRP1 erkennt die Infektion mit einem (+)ssRNA-Virus	77
5.3	NLRP1 ist ein PRR für das PAMP dsRNA	77
5.4	NLRP1 ist der Inflammasom-Sensor im Epithel.....	79
5.5	Die dsRNA-vermittelte Inflammasomaktivierung ist unabhängig von einer Blockade der DPP-Aktivität	79
5.6	NLRP1 erkennt dsRNA direkt.....	79
5.7	Hinweise für einen einheitlichen und ähnlichen nachgeschalteten Signalisierungsprozess der NLRP1-Aktivierung	80
5.8	Unterschiede der VbP-vermittelten NLRP1-Inflammasomaktivierung sowie Aktivierung durch funktionelle Degradation in Bezug zur Aktivierung durch dsRNA.....	81
5.9	NLRP1s ATPase-Aktivität wird durch dsRNA ausgelöst	81
5.10	Von Mäusen und Menschen	82
5.11	NLRP1 als zusätzlicher Trumpf in einem evolutionären Wettrüsten	83
5.12	NLRP1-Aktivierung im Zusammenhang mit anderen aktuellen Veröffentlichungen	84
6	Zusammenfassung.....	85
7	Literaturverzeichnis.....	86
8	Abkürzungsverzeichnis	107
9	Tabellenverzeichnis	112
10	Danksagung.....	113

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Unser Immunsystem schützt uns ständig vor Bedrohungen. Diese können sowohl exogener als auch endogener Natur sein. Zu den exogenen Gefahren zählen Viren, Bakterien, Pilze sowie Parasiten, zu den endogenen die Veränderung und Entartung von körpereigenen Zellen zu Krebszellen. Die Aufgabe des Immunsystems ist es derartige Gefahren zu erkennen und zu beseitigen. Dabei greift es auf zwei sich ergänzende Komponenten zurück: das angeborene und das adaptive Immunsystem¹.

Das angeborene Immunsystem ist der evolutionär ältere Bestandteil des Immunsystems und kann in bestimmten Ausprägungen sogar in einfachen Zellsystemen (zum Beispiel Bakterien) gefunden werden. Eine Aktivierung findet innerhalb von Minuten bis Stunden statt, da es auf keimbahnkodierten *pattern recognition receptors* (PRRs) basiert. Durch diese Rezeptoren werden sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), auch *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs) genannt, erkannt. Dies sind körperfremde Strukturen, welche spezifisch für Mikroben sind. Sie sind durch ihre Notwendigkeit im Überleben des Pathogens nicht abänderbar, was dazu führt, dass sie trotz eines Selektionsdrucks konserviert bleiben. Ein klassisches PAMP ist zum Beispiel das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), welches in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorzufinden ist und das Rezeptormolekül *toll-like-receptor* (TLR) 4 aktiviert. Als erste Verteidigungslinie erfüllt die angeborene Immunantwort zumeist ihren Zweck in der Beseitigung der Gefahren. Falls nicht, kommt in Vertebraten noch die adaptive Immunantwort ins Spiel. Diese wirkt mit der angeborenen in einer synergistischen Weise, da sie durch diese stimuliert wird¹.

Das adaptive Immunsystem wird innerhalb von Stunden bis Tagen aktiv und beruht auf speziellen Effektorzellen sowie deren Antigenrezeptoren. Letztere werden durch somatische Rekombination generiert und klonal auf die jeweiligen Lymphozyten verteilt. Es ergibt sich dadurch eine schiere Menge von Rezeptoren, welche spezifische Antigene und somit Pathogene erkennen können. Diese Antigenrezeptoren werden von bestimmten Zellen des adaptiven Immunsystems getragen, den B- und T-Zellen. Die Rezeptoren sind membranständig und werden durch Binden der jeweiligen spezifischen Antigene aktiviert. Beiden Zelltypen gemeinsam ist die klonale Expansion der Zellen nach Aktivierung ihres Antigenrezeptors. Während bei B-Zellen eine Differenzierung zu Plasmazellen folgt, welche die Antigenrezeptoren nun als lösliche Immunglobuline, auch Antikörper genannt, sezernieren und so zur humoralen Immunantwort beitragen, so bleibt der Antigenrezeptor von T-Zellen membranständig und wird verwendet um mittels des *major histocompatibility complex* (MHC) Antigene zu erkennen. So können über eine zellbasierte Immunantwort veränderte oder entartete Zellen erkannt und beseitigt werden. Der Vorteil der adaptiven Immunantwort ist die Reifung und Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches vor einer Reinfektion schützt¹.

Das Immunsystem und dessen Mechanismen unterliegen einer strikten Regulation. Ausufernde Entzündungsreaktionen können zu einer gestörten Gewebe-Homöostase führen und sich so zu autoinflammatorischen Krankheiten oder Autoimmunerkrankungen entwickeln. Erstere werden durch eine Dysregulation der angeborenen, zweite durch Dysregulation der adaptiven Immunantwort ausgelöst.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem wird oft auch als „unspezifische“ Abwehr bezeichnet. Es weist gewisse Ähnlichkeiten mit dem uralten genetisch-kodierten Immunsystem von Bakterien auf, bei welchem sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen, welche genetisch kodiert sind, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) von eindringenden Phagen erkennen und zu schneiden vermögen, und dadurch das Pathogen inaktivieren^{2,3}. Hier wird zwischen endogener und exogener DNA unterschieden: Bakterien machen sich hierbei die fehlende Methylierung von Adenin-Nukleotiden

an viraler DNA zu Nutze, da sonst auch endogene DNA mit auftretender Erkennungssequenz geschnitten werden würde. Durch ein einfaches Muster, das jedoch auch endogen vorkommt und daher streng reguliert sein muss, wird so zwischen Eigen und Fremd unterschieden. Mit der Funktionsweise des humanen angeborenen Immunsystems verhält es sich ähnlich: Einerseits werden, wie von Janeway 1989 postuliert, durch keimbahnkodierte PRRs spezifische PAMPs erkannt. PAMPs sind essenziell für das Überleben eines Pathogens und können daher nicht mutieren⁴. Des Weiteren sind PAMPs spezifisch für mikrobielle Pathogene und kommen im Wirt nicht vor. Jedoch konnten hiermit nicht Autoimmunerkrankungen und Antworten auf Selbstantigene, wie DNA, erklärt werden. 1994 postulierte daher Polly Matzinger, dass es auch *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) gibt, welche eine Immunantwort auslösen können⁵. DAMPs können zum Beispiel durch Gewebsschaden entstehen, da hierdurch endogene intrazelluläre Elemente, welche sonst nicht immunstimulatorisch sind, durch eine fehlerhafte Lokalisation ein Gefahrensignal darstellen und eine Immunantwort auslösen. Ferner können DAMPs Zeichen einer Infektion, zellulären Stresses oder einer Transformation sein. Erst kürzlich wurden auch *homeostasis-altering molecular processes* (HAMPs) postuliert⁶. Diese sind analog zu der normalerweise in Pflanzen vorkommenden indirekten Erkennung, welche auch als *guard theory* oder *guard model* bekannt ist⁷: Hierbei wird durch Pathogene oder sterbende Zellen eine veränderte Homöostase verursacht, die einen HAMP-Sensor aktivieren kann. Dies kann zum Beispiel die proteasomale Aktivität eines bakteriellen Virulenzfaktors sein, was zur Aktivierung einer Signalkaskade führt. Die Aktivierung von PRRs kann diverse zelluläre Prozesse aktivieren, zum Beispiel Sekretion bestimmter Warnmoleküle oder auch Zelltod.

Als erste Linie der angeborenen Immunabwehr können die elementaren mechanischen, chemischen und mikrobiologischen Barriereigenschaften der Haut gezählt werden, welche gegen eindringende Pathogene schützen. Das Epithel der äußeren Körperflächen schützt durch Ausbildung der Epidermis, einer abgestorbenen und verhornten Zellschicht, vor allem vor viralen Infektionen. Ferner schützt es durch Ausbildung von *tight junctions* vor einem direkten Kontakt mit Pathogenen, beziehungsweise behindert es deren Eindringen in den Organismus. Auch ist die Oberfläche der Haut für viele Pathogene unwirtlich und nur bestimmte kommensale Bakterien sind vorhanden; dies wirkt einer Besiedelung durch unerwünschte Pathogene entgegen. Die inneren Körperflächen werden durch weitere Mechanismen geschützt. So zum Beispiel bildet sich in der Lunge ein Mucus aus, der antimikrobiell wirkt und in weiterer Folge durch Bewegungen der Wimpernzellen abtransportiert wird. Im Darm dahingegen herrscht ein niedriger pH-Wert vor, welcher vor einer Besiedelung durch Pathogene schützt. Ebenfalls beteiligt sind hierbei antimikrobielle Proteine, sogenannte AMPs, und Proteasen, welche als natürliche Antibiotika wirken und Mikroorganismen schnell abtöten⁸. Meistens handelt es sich hierbei um einen enzymatischen Angriff auf bakterielle Zellwandstrukturen: Zum Beispiel hydrolysiert das Protein Lysozym glykosidische Bindungen zwischen dem N-Acetylglucosamin und der N-Acetylmuraminsäure von Zellwandpeptidoglycanen und das Protein Phospholipase A2 hydrolysiert bakterielle Membranphospholipide.

Falls ein Überwinden dieser ersten Hürde stattgefunden hat und Pathogene doch in den Körper eingedrungen sind, kommt der humorale Teil der angeborenen Immunantwort ins Spiel. Den humoralen Anteil machen vor allem antimikrobielle Peptide, sowie Proteine aus. Zu den Peptiden mit antimikrobieller Wirkung gehört unter anderem die Familie der Defensine. Es wird davon ausgegangen, dass Defensine sich aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften nicht nur in mikrobielle Membranen einlagern, sondern auch zelluläre Funktionen verändern und damit Bakterien abtöten können⁹. Zu den löslichen antimikrobiellen Proteinen gehören das Komplementsystem sowie die Familie der Pentraxine, welche eine Rolle in der Aktivierung des Komplementsystems spielen¹⁰. Komplementproteine können sich spezifisch an der Oberfläche von Bakterien anlagern, welches entweder zu einer Opsonisierung und Phagozytose des Pathogens oder zur Aktivierung der Komplementkaskade führt. Bei einer Aktivierung der Komplementkaskade bildet sich der so genannte Membran-Angriffs-Komplex, welcher die Zellmembran des Pathogens zerstört und so eine Lyse bewirkt. In weiterer Folge führt dies zu einer Rekrutierung von

Immunzellen, welche zum zellulären Teil der angeborenen Immunantwort gehören, wobei hier eine Berührungsstelle mit dem adaptiven Immunsystem vorhanden ist.

Zum zellulären Teil der angeborenen Immunantwort gehören, im klassischen Sinne, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen und Granulozyten, zu denen Neutrophile, Basophile und Eosinophile gehören. Makrophagen sind, wie ihr altgriechischer Name aussagt, Fresszellen, welche eindringende Pathogene mittels extrazellulärer PRRs erkennen, einschließen und anschließend zerstören können¹¹. Dies geschieht durch Verschmelzung der bakterienhaltigen Endosomen mit Lysosomen, was zur Generierung eines unwirtlichen Milieus führt. Dies wird bewerkstelligt durch einen niedrigen pH-Wert in Endolysosomen, sowie der Anwesenheit von antimikrobiellen Proteinen, zum Beispiel Lysozym und Hydrolasen. Des Weiteren führt die Aktivität von NADPH-Oxidasen in Phagozyten zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zusätzlich Mikroorganismen abtötet¹². Ein weiterer Zweck der Phagozytose ist die effiziente Beseitigung apoptotischer Zellen, ein Prozess, welcher Grundlage für eine normale Gewebemöostase ist¹³. Bakterien und Viren können eine Verinnerlichung durch Phagozyten aber auch zu ihren Gunsten nutzen: So sind Bakterien, falls sie sich innerhalb von Endosomen vermehren, vor zirkulierenden Antikörpern und komplementinduzierter Zerstörung geschützt. Viren wiederum nutzen die Reduzierung des pH-Wertes als Aktivierungsmarker, dass sie sich im Inneren einer Zelle befinden und es Zeit für ein Eindringen in das Zytosol ist; so zum Beispiel werden die Hämagglutinin-Proteine von Influenzaviren pH-abhängig aktiviert. Neben ihrer Rolle als Phagozyten spielen Makrophagen außerdem durch eine Zytokinausschüttung nach Begegnung mit einem Pathogen eine Rolle. Des Weiteren sind Neutrophile ein wichtiger Bestandteil in der zellulären angeborenen Immunantwort¹⁴. Neutrophile können Pathogene nicht nur phagozytieren, um diese anschließend abzutöten, sie vermögen auch Proteasen und ROS in den extrazellulären Raum freizusetzen und dadurch eine mikrobizide Umgebung zu schaffen. Vor allem aber sind Neutrophile für ihren gerichteten Zelltod der NETose bekannt, wobei sie sogenannte *neutrophil extracellular traps* (NETs) ausbilden können. Dies sind extrazelluläre Freisetzungen aus dem Inneren der Zelle, welche hauptsächlich aus Chromatin und sekretorischen Mediatoren von Neutrophilen bestehen. NETs binden Pathogene, töten diese ab und verhindern überdies auch eine weitere Ausbreitung derer. Natürliche Killerzellen dahingegen erkennen ein Fehlen des MHC-Klasse-I-Moleküls an der Oberfläche von körpereigenen Zellen¹⁵. Dies geschieht unter anderem nach zellulärer Transformation sowie durch eine Virusinfektion. Das MHC-Klasse-I-Molekül übt für gewöhnlich eine inhibitorische Aktivität auf NK-Zellen aus, ein Fehlen, genannt *missing self*, führt zu einer Abtötung der Zielzellen durch NK-Zellen. Dendritische Zellen können nach erfolgreicher Phagozytose eines Pathogen deren Proteine aufspalten und die dabei entstehenden Peptide/Antigene auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren¹⁶. Nach Migration in das lymphatische Gewebe sind sie in der Lage über das präsentierte Antigen T-Zellen zu aktivieren und damit eine Brücke zur adaptiven Immunantwort zu schlagen.

Neben einer direkten Beseitigung von Pathogenen, wie zum Beispiel durch Phagozytose oder AMPs, können Zellen nach Aktivierung ihrer PRRs auch Zytokine zur Alarmierung anderer Zellen produzieren, welche sich in weiterer Folge transkriptionell gegen eine Ausbreitung der Infektion wappnen können. Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine welche an spezifische Rezeptoren binden und dadurch Signalkaskaden aktivieren. Sie können auf autokrine Weise (auf die signalgebende Zelle selbst), parakrine Weise (auf nahe gelegene Zellen) oder endokrine Weise (auf den gesamten Organismus) wirken. Die Art der Signalisierungsneigung ist dadurch gegeben, ob ein Zytokin einem gerichteten, aktiven Transport in einem Flüssigkeitsstrom oder einem diffusen Transport unterworfen ist¹⁷. Ferner ist sie abhängig von der Halbwertszeit der Zytokine, welche durch die Stabilität des Proteins reguliert ist. Zytokine können entweder entzündliche oder entzündungshemmende Eigenschaften haben¹⁸. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Immunregulation, Pathogenese und der Kontrolle der Aktivität von Effektorzellen. Klassischerweise werden Zytokine aufgrund ihrer Struktur in Familien eingeteilt. Die größten Gruppen bilden die Interferone, Interleukine (IL) und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF). Aber nicht

nur Zytokine können eine Signalfunktion haben, auch die pathologische Freisetzung von Lipid-Entzündungsmediatoren ist nachweislich an einer Entzündungsreaktion beteiligt¹⁹.

Als weiter zellintrinsischer Mechanismus gegen virale Infektionen gelten Restriktionsfaktoren. Dies sind intrazelluläre Moleküle, die auf verschiedene Schritte des Lebenszyklus eines Virus einwirken können, wie zum Beispiel den viralen Eintritt oder die Genomreplikation. TRIM21 (*Tripartite motif containing-21*) erkennt Viren, die mit Immunglobulinen bedeckt sind, und wirkt als intrazellulärer Antikörperrezeptor. Es dirigiert die Virionen zum Abbau durch Rekrutierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems²⁰. SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) wiederum weist eine dNTPase-Funktion auf²¹. Durch die Hydrolyse von Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) reduziert es den *pool* an intrazellulären dNTPs und inhibiert dadurch die Reverse Transkription und Synthese der viralen komplementären DNA (cDNA). Ein weiterer Restriktionsfaktor, APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA (messenger ribonucleic acid) editing enzyme catalytic subunit 3C*), katalysiert die Desaminierung von Cytidin zu Uridin im einzelsträngigen DNA-Substrat des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Diese G-zu-A-Hypermuationen an der proviralen DNA führt zu einer Zerstörung der Kodierungs- und Replikationskapazität des Virus und so schlussendlich zu dessen Inaktivierung²². Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Wirtsproteine SERINC3 und SERINC5 in neu gebildete HI-Virionen inkorporiert werden und dadurch deren Fähigkeit, mit weiteren Zielzellen zu fusionieren, beeinträchtigen²³. Das HI-Virus wehrt sich aber gegenüber diesen Mechanismen mit verschiedenen akzessorischen Proteinen: So zum Beispiel inhibiert das Protein Nef (*negative factor*) SERINC5, SAMHD1 wird durch Vpx (*viral protein X*) und APOBEC3 durch Vif (*viral infectivity factor*) inhibiert²⁴. Als letzter Ausweg der angeborenen Immunantwort kann ein altruistischer Zelltod induziert werden, der zu einer Beseitigung der Replikationsnische sowie auch Freisetzung von Zytokinen und DAMPs führt. Dieser Zelltod kann selbstvermittelt – etwa durch eine intrazellulär vermittelte Lyse – oder, wie im Falle der NK-Zellen, fremdvermittelt sein. Die Aktivierung von PRRs und anschließende Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen sowie die Induktion von Zelltod instruieren Antworten des adaptiven Immunsystems.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird nach einer erstmaligen Exposition gegenüber einem Antigen und einer gewissen Latenzzeit aktiv. Hier lässt sich eine Analogie zu einem bakteriellen Immunsystem, und zwar CRISPR/Cas9, sehen. Dieses erkennt, nach einer zuvor schon stattgefundenen Begegnung und Adaption, invasive fremde Nukleinsäuren wieder aufgrund einer für den Phagen spezifischen DNA-Basenabfolge²⁵. Das adaptive Immunsystem des Menschen erkennt ebenso bestimmte Muster wieder, die Erkennung basiert dahingegen jedoch vorwiegend auf einer Protein-Protein-Interaktion. Das Vorhandensein eines solchen Systems wurde schon 1890 von Emil von Behring und Kitasato Shibasaburō postuliert²⁶. Sie konnten zeigen, dass nach einer Infektion mit *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) Anti-Toxine gegen ebendieses gebildet werden. Eine Verabreichung eines Anti-Toxin-beinhaltenen Serums, nicht aber eines Kontrollserums, immunisierte Tiere gegen eine erstmalige Infektion mit *C. diphtheriae*.

Wie in der Einleitung erwähnt stützt sich das adaptive Immunsystem auf B- und T-Zellen¹. Beide Zelltypen werden nach Aktivierung ihres membranständigen Rezeptors durch Antigene aktiviert und erfahren danach eine klonale Expansion. B-Zellen sind hierbei für die humorale Immunantwort verantwortlich. Ihre Rezeptoren, die Antikörper, werden ausgeschüttet und können Pathogene auf drei Arten bekämpfen: Sie können Toxine neutralisieren oder Bakterien opsonisieren, was zu deren intrazellulärem Abbau nach Phagozytose führt, oder sie können das Komplementsystem aktivieren, was zur Lyse von Pathogenen führt. T-Zellen behalten nach Aktivierung ihren membrangebundenen Rezeptor und nutzen diesen zur erneuten Erkennung des Pathogens, was zu einer schnellen Beseitigung desselben genutzt werden kann¹. CD8-T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen über den MHC-Klasse-I-Komplex virale Peptide, die auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden. Auf diese Weise können sie infizierte Zellen abtöten, bevor sich ein Virus vollständig vermehrt und freigesetzt werden kann. CD4-T-Zellen, auch T-Helferzellen

genannt, erkennen Peptide, die über den MHC-Klasse-II-Komplex auf antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen, präsentiert werden. Diese Antigene stammen zumeist von einer Phagozytose aus der extrazellulären Umgebung und sind nicht auf eine Infektion der präsentierenden Zelle zurückzuführen. Diese T-Helferzellen können so zum Beispiel Interferon (IFN)- γ sezernieren, welches mit intrazellulären Bakterien infizierte Makrophagen aktiviert. Dies kann beim Verdauen und Abtöten der intrazellulären Bakterien helfen, indem Makrophagen durch die vorangegangene Aktivierung freie Radikale aus Stickoxid produzieren¹.

1.2 Pattern recognition receptors

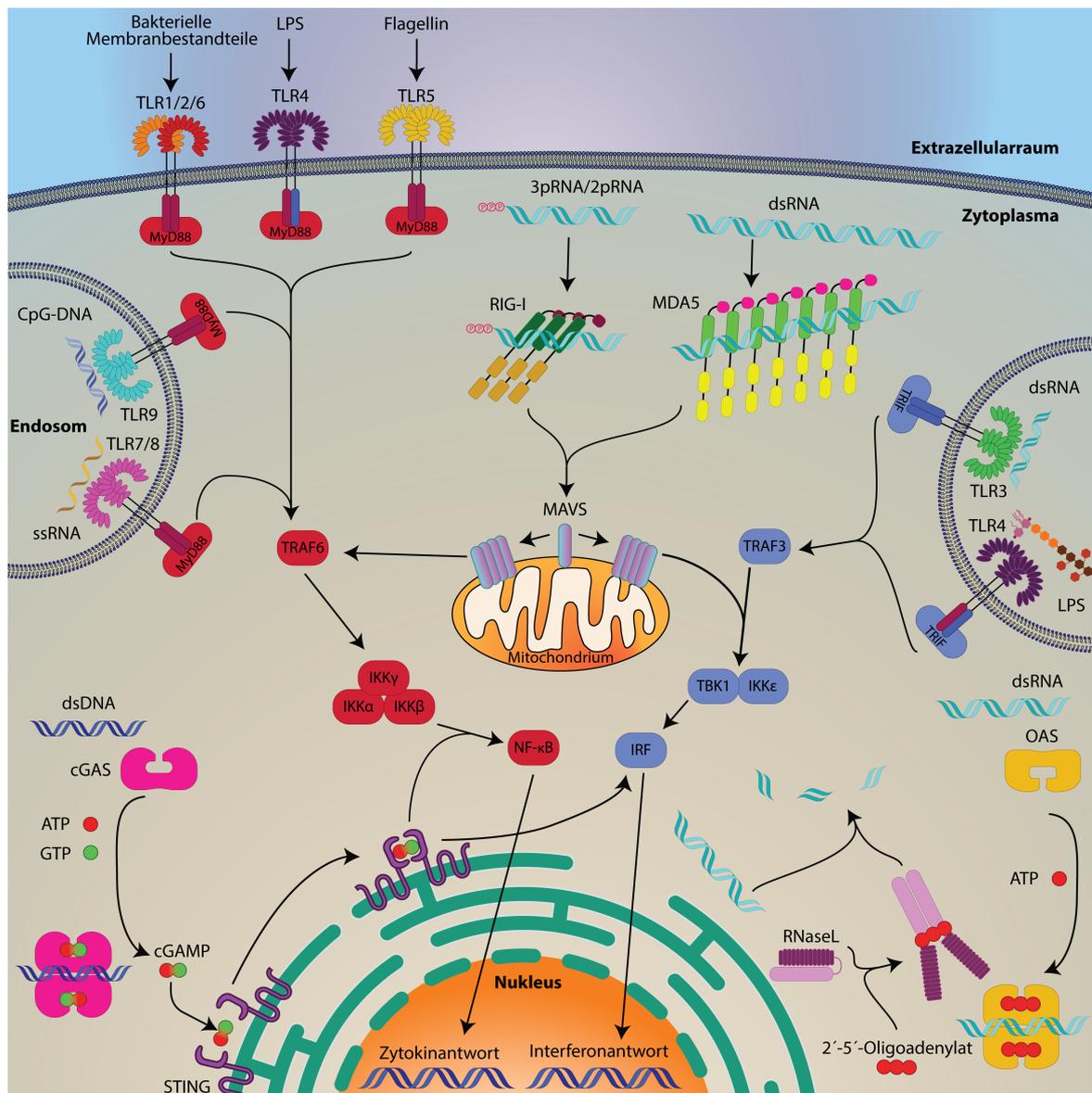


Abbildung 1: Erkennung viraler und bakterieller PAMPs durch PRRs. PRRs sind keimbahnkodierte Proteine, welche Pathogene aufgrund diverser Muster erkennen können und dadurch Signalkaskaden aktivieren. Sie sind entweder auf der Zelloberfläche, im Zytosol oder in Endosomen lokalisiert. Zu den PRRs gehören die TLRs, welche Bestandteile bakterieller Herkunft, aber auch eine Reihe von Nucleinsäuren erkennen können. Des Weiteren werden Nucleinsäuren noch durch RLRs, cGAS, sowie OAS-Proteine detektiert. Eine Aktivierung von PRRs führt, abhängig von ihren nachgeschalteten Signalpartnern, zu einer Zytokin- oder Interferonantwort.

PRRs lassen sich aufgrund ihrer Lokalisation in zwei einfache Hauptklassen unterteilen: Membrangebundene sowie endolysosomale Rezeptoren wie TLRs und *C-type lectin receptors* (CLRs) oder intrazelluläre Rezeptoren, wie *absent-in-melanoma* (AIM)-like receptors (ALRs), *RIG-I-like receptors* (RLRs), und *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), *leucine-rich repeat*

(LRR)-containing proteins (NLRs)²⁷. Diese Rezeptoren erkennen und binden direkt konservierte Bestandteile von Pathogenen, wie PAMPs, können aber auch DAMPs erkennen (siehe Abbildung 1)²⁷. PRRs lassen sich sowohl in Immunzellen wie Makrophagen, aber auch Nicht-Immunzellen, wie zum Beispiel Epithelzellen oder Fibroblasten, finden. Eine Aktivierung von PRRs führt zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden und kann schlussendlich zur transkriptionellen Expression von Entzündungsmediatoren, so etwa Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, TNF- α , oder Interferonen. Dies orchestriert die Eliminierung von Pathogenen und infizierten Zellen. Die Aktivierung der NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*)- und AP-1 (*activator protein 1*)-Transkriptionsfaktoren führt zu einer Zytokin- und Chemokinantwort, die Aktivierung der *interferon-regulatory factor* (IRF)-Transkriptionsfaktoren zu einer antiviralen Interferonantwort. PRRs spielen daher eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Immunität gegenüber Infektionen, können aber auch, bei unangemessener Aktivierung und überschießender Reaktion, zu akuten und chronischen Entzündungen beitragen²⁸.

1.2.1 Toll-like receptors

In den 1990er Jahren wurde mit dem Protein Toll aus *Drosophila melanogaster* der erste PRR gefunden. Es wurde entdeckt, dass das Protein, von dem bisher nur bekannt war, dass es an der Musterung der dorsoventralen Achse beteiligt ist, eine Rolle in der Immunabwehr gegen Pilze und grampositive Bakterien spielt²⁹. So wurde gezeigt, dass Toll bei der Aktivierung einer transkriptionellen Expression von Drosomycin, einem antifungalen Peptid von *Drosophila*, essenziell ist und Mutationen in Toll – oder Proteinen der damit verbundenen Signalkaskade – zu einer erhöhten Sterblichkeit in *Drosophila* nach Pilzinfektionen führen. Interessanterweise fungiert Toll hier nicht klassisch als direkter Rezeptor, da es nicht direkt ein mikrobielles Produkt bindet, sondern indirekt über das Protein Spätzle fungiert. Letzteres wird nämlich nach Pathogenerkennung durch andere PRRs proteolytisch geschnitten, kann dadurch Toll binden und dieses aktivieren³⁰. In weiterer Folge wurden Homologe von Toll, welche *Toll-like receptors* genannt werden, in anderen Lebewesen, so auch Säugetieren, gefunden und eine ähnliche Rolle der Pathogenerkennung festgestellt³¹. Dort können sie eine Fülle von unterschiedlichen molekularen Mustern erkennen, von verschiedenen Nukleinsäurearten bis hin zu mikrobiellen Fragmenten. Im Gegensatz zu Toll konnte für Säugetier-TLRs jedoch durch Strukturstudien eine direkte Interaktion mit deren Liganden festgestellt werden^{32,33}.

Die Familie der TLRs umfasst 10 TLRs im Menschen (TLR1-TLR10) und 12 in der Maus (TLR1-TLR9 und TLR11-TLR13). Man kann TLRs aufgrund ihrer Lokalisierung unterscheiden, so gibt es Zelloberflächen-TLRs, die an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind und das extrazelluläre Milieu auf PAMPs untersuchen, sowie endosomale TLRs, welche das Endosom auf mikrobielle Abbauprodukte hin untersuchen²⁷. Allen TLRs gleich ist, dass sie Typ-1-Transmembranproteine (*single-pass*-Transmembranproteine) sind. Die N-terminale Ligandenbindungsdomäne besteht aus 18-25 Einheiten von LRRs, welche selbst aus jeweils 20-25 Aminosäuren bestehen. Diese LRRs nehmen eine Hufeisenform an und Liganden können sowohl mittels der inneren als auch mittels der äußeren Oberfläche detektiert werden. Eine Ligandenbindung führt entweder zu einer Dimerisierung der TLRs oder zu einer Konformationsänderung von vorgeformten TLR-Dimeren. Dies führt weiter zur Aktivierung von Signalkaskaden, was durch die zytosolische C-terminale TIR-Domäne (*Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain*) vermittelt wird³⁴.

Zelloberflächen-TLRs, wie TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6, erkennen vor allem bakterielle Membranbestandteile^{32,35-37}. TLR2, als Heterodimer mit TLR1 oder mit TLR6, erkennt bakterielle Diacyl- und Triacyllipoproteine, TLR4 zusammen mit *myeloid differentiation factor 2* (MD-2) und *cluster of differentiation 14* (CD14) erkennt LPS, ein weiterer Bestandteil mikrobieller Strukturen, und TLR5 erkennt bakterielles Flagellin, welches Hauptbestandteil des bakteriellen Flagellums, des Motorproteins der Bakterien, ist.

Endosomale TLRs dahingegen erkennen vor allem Nukleinsäuren, welche üblicherweise so nicht in Zellen vorkommen, aber nach einer bakteriellen oder viralen Infektion vorzufinden sind. Dies ist

zum Beispiel lange doppelsträngige RNA (dsRNA) oder unmodifizierte RNA. TLR3 erkennt dsRNA, welche zumindest eine Länge von 45 Basenpaaren (bp) für eine Aktivierung aufweisen muss^{33,38}. Als klassischer Aktivator wird oft der Homopolymer von Inosin und Cytidin *polyinosinic:polycytidylic acid* (poly(I:C)) in der Größe von 1.5 Kilobasen (kb) bis 8 kb, verwendet³⁹. dsRNA ist ein Intermediat im Replikationszyklus von vielen Viren und kommt daher nicht nur bei Viren mit einem RNA-Genom vor. TLR7 sowie TLR8 erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA), welche üblicherweise nur im Nukleus und im Zytoplasma, aber nicht in Endosomen anzutreffen ist; TLR9 erkennt umethylierte CpG-Oligonukleotide⁴⁰⁻⁴². Oftmals werden diese PAMPs für eine TLR-Erkennung aber erst durch eine Prozessierung erzeugt. So zum Beispiel liefert RNase T2 Substrate für die TLR8- und Desoxyribonuklease (DNase) II Substrate für die TLR9-abhängige Erkennung^{42,43}. Da TLR10 in Mäusen nur als Pseudogen vorliegt, ist es schlecht untersucht und ein Ligand dafür nicht bekannt.

Nach Aktivierung der TLRs kommt es zu einer Dimerisierung der zytosolischen TIR-Domänen und in weiterer Folge zu homotypischen TIR-TIR-Domänen-Interaktionen mit zytosolischen TLR-Adapterproteinen. Bisher wurden 4 TIR-haltige TLR-Adapterproteine entdeckt: MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing interferon-β*), Mal/TIRAP (*MyD88 adapter-like/Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein*) und TRAM (*Trif-related adaptor molecule*). Ein Binden der Adapterproteine führt zu der Bildung von Komplexen höherer Ordnung und schlussendlich zur Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, des Interferon-Signalwegs oder des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalwegs über die NF-κB-, IRF- sowie AP-1-Transkriptionsfaktoren. Eine MyD88-Bindung führt zur Bildung eines Myddosomes, welches den NF-κB-Signalweg und den MAPK-Signalweg aktiviert. Alle TLRs bis auf TLR3 können ein Myddosome ausbilden. Der NF-κB-Signalweg läuft über die IRAK-TRAF6-IKKα/IKKβ/IKKγ-NF-κB-Signalkaskade. Eine TRIF-Bindung führt zu einem Trifosome, welches über die TRAF3-TBK1-IKKε-IRF-Signalkaskade den Transkriptionsfaktor IRF3 und den Interferon-Signalweg aktiviert^{44,45}. Für eine Bildung des Trifosomes sind TLR3 und TLR4 kompetent. Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führt dann entweder zu antibakteriellen oder antiviralen Änderungen in zellulären Abläufen, zum Beispiel transkriptioneller Hochregulierung von proinflammatorischen Genen, die für Zytokine oder Chemokine kodieren, aber führt auch zu Änderungen in Prozessen wie der Autophagie oder der Glykolyse.

1.2.2 C-type lectin receptors

Zur Gruppe der CLRs gehören sowohl lösliche Proteine als auch Transmembranproteine mit einer extrazellulären Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne⁴⁶. Man unterscheidet zwischen Ca²⁺-abhängigen CLRs und Ca²⁺-unabhängigen *C-type lectin-like receptors* (CTLRs). Bekannte Beispiele sind Dectin-1 und Dectin-2, welche an dendritischen Zellen gefunden werden, sowie MINCLE (*macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor*), welcher an Makrophagen vorgefunden wird. Nach dem Antreffen von bakteriellen, fungalen sowie auch endogenen Liganden, wie zum Beispiel β-1,3-verknüpften und β-1,6-verknüpften Glucanen, kommt es zu einer Aktivierung des NF-κB-Signalweges^{47,48}.

1.2.3 AIM-like receptors

ALRs sind eine Familie von zytosolischen Interferon-induzierbaren DNA-Sensoren. Sie weisen eine N-terminale PYD (*pyrin domain*)- und C-terminale HIN (*hematopoietic expression, interferon-inducible nature, and nuclear localization*)-Domäne auf, letztere ist für die DNA-Erkennung notwendig⁴⁹. Das Mitglied IFI16 (*Gamma-interferon-inducible protein 16*) spielt eine Rolle in der Restriktion von HIV-1 und AIM2 (*absent in melanoma 2*) aktiviert das Inflammasom, wobei hierauf in Kapitel 1.5.4 genauer eingegangen wird⁵⁰.

1.2.4 RIG-I-like receptors

Zu den RLRs gehören zytosolische RNA-Sensoren, welche virale Nukleinsäuren sequenzspezifisch erkennen. Dazu zählen RIG-I (*retinoic-acid inducible gene 1*), auch bekannt als DDX58, MDA5 (*melanoma differentiation-associated 5*), auch bekannt als IFIH1, und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*), auch bekannt als DHX58. RLRs sind allesamt Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige DExD/H-Box-RNA-Helikasen und zeichnen sich durch eine zentrale Helikase-Domäne und eine C-terminale *carboxy-terminal domain* (CTD) aus⁵¹. Des Weiteren besitzen MDA5 und RIG-I N-terminale CARD (*caspase activation and recruitment domain*)-Domänen. Eine Aktivierung der RLRs führt zur Auslösung des NF- κ B- und Interferon-Signalwegs^{52,53}.

RIG-I detektiert kurze doppelsträngige 5'-Triphosphat-RNA (3pRNA), aber auch 5'-Diphosphat-RNA (2pRNA), mit einer minimalen Länge von 19 bp und spielt eine Rolle in der Erkennung von RNA-Viren wie Paramyxoviridae oder Orthomyxoviridae⁵⁴⁻⁵⁶. Da in Eukaryoten während der posttranskriptionalen RNA-Prozessierung eine 5'-Cap-Struktur angefügt wird ist 3pRNA ein Merkmal viraler RNA, weshalb RIG-I nicht durch endogene RNA aktiviert wird. MDA5 dahingegen erkennt dsRNA in einer Längenabhängigkeit, wobei eine Mindestlänge von 2 kb notwendig ist, um eine MDA5-abhängige Interferonantwort auszulösen^{57,58}. MDA5 spielt eine Rolle in der Erkennung von RNA Viren wie Picornaviridae. Endogene dsRNA wird durch eine Adenosin-zu-Inosin-Editierung durch ADAR1 (*adenosine deaminase acting on RNA 1*) unerkennbar für MDA5 gemacht⁵⁹. Im Falle eines PNPT1- oder SUV3-Mangels kann jedoch mitochondriale dsRNA akkumulieren und in das Zytoplasma freigesetzt werden, wo sie eine MDA5-getriebene Typ-I-Interferonantwort auslöst⁶⁰. Nach Aktivierung bilden RIG-I und MDA5 Homo-Oligomere an ihrem Liganden, wobei es bei MDA5 zur Ausbildung von langen Filamenten an der dsRNA kommt⁶¹. Nach erfolgter Homo-Oligomerisierung kommt es durch die N-terminalen CARD-Domänen von MDA5 oder RIG-I zu Interaktionen mit den CARD-Domänen des nachgeschalteten Adapterproteins MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*)⁶². Dies führt wiederum zur Bildung von MAVS-Filamenten an Mitochondrien und aktiviert schlussendlich die TRAF6-IKK α /IKK β /IKK γ -NF- κ B- sowie die TRAF3-TBK1-IKK ϵ -IRF-Signalkaskade⁶³. LGP2 kann aufgrund der fehlenden CARD-Domäne keine Interaktion mit MAVS eingehen. Es wird aber davon ausgegangen, dass das RNA-bindende LGP2 bei einer Assemblierung von MDA5 an dsRNA unterstützend fungiert⁶⁴.

Weiterhin zeigen RLRs eine ligandenabhängige ATPase-Aktivität^{65,66}. Nach Interaktion mit dsRNA bildet sich – durch Verschiebungen helikaler Arme und sterischer Annäherung der beiden Helikase-Domänen – eine aktive ATPase-Seite⁶⁷. Eine ATP-Hydrolyse führt hierbei zu einer Dissoziation von MDA5/RIG-I von der dsRNA, da eine MDA5/RIG-I-gebundene und dadurch geschützte dsRNA nach ATP-Zugabe nicht mehr vor einem RNase-Verdau bewahrt ist^{65,68}. Ferner führt eine ATP-Bindung bei RIG-I zu einer Auflösung einer intramolekularen, autoinhibitorischen Interaktion und zur anschließenden Freilegung der CARD-Domänen⁶⁹. Die ATPase-Aktivität dient aber wohl zwei Zwecken: Einerseits konnte für RIG-I eine höhere hydrolytische Aktivität nach Antreffen des ungünstigen, *non*-PAMP, 5'-OH-RNA über den Liganden 5'-3p-RNA ausgemacht werden⁷⁰. Daher bildet sich ein stabilerer Komplex mit einer stärkeren Bindung nur nach Antreffen eines wirklichen Liganden aus. Andererseits dient die hydrolytische Aktivität einer Translokation, wobei sich durch einen *translocation-throttling*-Mechanismus mehrere RIG-I-Oligomere auf der dsRNA aufbauen können^{70,71}. Die Wahrscheinlichkeit, dass dies über mehrere Male für einen *non*-PAMP stattfindet, ist verschwindend gering und macht so eine Differenzierung zwischen PAMP und *non*-PAMP möglich. Interessanterweise treten im Zusammenhang mit der Autoimmunerkrankung Singleton-Merten-Syndrom Punktmutationen in RIG-I auf, welche eine ATP-Hydrolyse verhindern⁷¹. Dadurch kommt es zur Bindung und Oligomer-Ausbildung an kurzen endogenen dsRNA-Molekülen, da keine Hydrolyse und Dissoziation stattfinden kann, und in weiterer Folge zu einer überschießenden Immunantwort.

1.2.5 Zytosolische DNA-Erkennung

Nach Entdeckung der TLR9-vermittelten Erkennung von unmethylierter CpG-DNA wurde Mitte der 2000er auch eine TLR9-unabhängige Erkennung von dsDNA entdeckt und daher die Suche nach einem (zytosolischen) DNA-Sensor gestartet⁷². Zuerst wurde ZBP1 (*Z-DNA-binding protein 1*), auch als DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*) bezeichnet, als dieser vermeintliche Faktor identifiziert⁷³⁻⁷⁵. In weiterer Folge stellte sich seine Rolle als DNA-Sensor jedoch als redundant beziehungsweise entbehrlich heraus und es kristallisierte sich eine Rolle für ZBP1 als Initiator des Zelltods Nekroptose heraus^{76,77}. Die Suche nach dem dsDNA-Sensor ging also weiter und in diesem Rahmen wurde entdeckt, dass eine Stimulation mit AT-reicher DNA zu einer Aktivierung von RIG-I führt. Hier konnte gezeigt werden, dass AT-reiche DNA als Template für RNA Polymerase III erkannt und so RIG-I-aktivierende 3pRNA generiert wird^{78,79}. Ende der 2000er konnte dem Protein STING (*stimulator of interferon genes*) eine Funktion in der DNA-vermittelten Interferonantwort nachgewiesen werden^{80,81}. STING weist jedoch keine offensichtliche DNA-Bindungsdomäne auf, daher musste noch ein zusätzlicher Faktor stromaufwärts von STING wirken. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass STING durch zyklische Dinukleotide, wie dem bakteriellen *second messenger* zyklisches Diguanylat, aktiviert werden kann⁸². Diese Eigenschaft der Erkennung von bakteriellen zyklischen Dinukleotiden durch humanes STING ist essenziell für die Immunerkennung von intrazellulären Pathogenen wie *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Schlussendlich wurde cGAS (*cGAMP synthase*) als der gesuchte Sensor für dsDNA identifiziert⁸³⁻⁸⁵. Nach Bindung von dsDNA mit einer Mindestlänge von 45 bp, katalysiert cGAS aus ATP und Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches GMP-AMP (cGAMP), welches in weiterer Folge an STING bindet und dieses aktiviert⁸⁶. Weiter stromabwärts werden über IKK/TBK1 der NF- κ B- und der Interferon-Signalweg aktiviert. So spielt cGAS eine wichtige Rolle in der Erkennung von DNA-Viren wie HSV-1. Eine pathophysiologische Rolle für die dsDNA-Erkennung durch cGAS konnte unter anderem für das Aicardi-Goutières Syndrom identifiziert werden^{87,88}. So führt eine Insuffizienz der DNA-Exonuklease TREX1 (*3' repair exonuclease 1*) zu einer cGAS-STING abhängigen Typ-I-Interferonantwort.

1.2.6 Zytosolische RNA-Erkennung

Zytosolische RNA wird neben RIG-I und MDA5, welche beide den NF- κ B- und Interferon-Signalweg aktivieren, auch noch durch PKR (*protein kinase RNA-activated*), auch bekannt als EIF2AK2 (*eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*), und den OAS (*2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein*)-Signalweg erkannt. Die Aktivierung dieser Signalwege hat direktere Auswirkungen auf die Zellhomöostase und Translation.

PKR bindet und dimerisiert an dsRNA, was zu einer Aktivierung und Autophosphorylierung des Proteins führt⁸⁹. Aktives PKR phosphoryliert den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor eIF2 α , was zu einer kompletten Inhibition der zellulären Translation führt und die Zellen proapoptotisch macht. Dadurch wird neben der zellulären mRNA-Translation auch die virale Proteinsynthese inhibiert und die Propagation neuer Viren verhindert.

Die humane OAS-Familie besteht aus den Proteinen OAS1, OAS2, OAS3, sowie dem enzymatisch inaktiven *OAS-like protein* (OASL)⁹⁰. OAS1-3 werden durch dsRNA aktiviert und generieren, ähnlich wie cGAS, nach Aktivierung den *second messenger* 2'-5'-Oligoadenylylat^{91,92}. 2'-5'-Oligoadenylylat wiederum bindet an RNase L (*Ribonuclease L*) und dies führt zu einer dimerisierungsinduzierten Aktivierung des Proteins. Aktivierte RNase L gewinnt eine ribonukleolytische Aktivität und baut die gesamte intrazelluläre RNA ab. Dadurch wird nicht nur die Proteinsynthese inhibiert und virale RNA abgebaut, sondern auch Apoptose ausgelöst. In weiterer Folge stimulieren Degradationsprodukte von RNase L auch RIG-I⁹³.

1.2.7 NLRs

Die Familie der NLRs, auch bekannt als *nucleotide-binding domain (NBD)*, *LRR-containing proteins*, bildet die größte Gruppe unter den intrazellulären PRRs und besteht aus 22 Proteinen im Menschen und zumindest 34 in der Maus^{94,95}. NLRs zeichnen sich durch eine zumeist konservierte dreiteilige Domänenstruktur aus: Am N-Terminus findet sich eine Signalisierungsdomäne gefolgt von einer zentralen NACHT (*domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP-1*)-Domäne, welche auch NOD genannt wird und am C-Terminus findet sich eine LRR-Domäne. Des Weiteren kann die NACHT-Domäne in eine NBD, zwei helikale Domänen (HD) und eine WHD (*winged helix domain*) unterteilt werden und gehört zur STAND (*signal transduction ATPases with numerous domains*)-Subfamilie der AAA+ ATPasen (*ATPases associated with various cellular activities*)^{96,97}.

NLRs können aufgrund ihrer N-terminalen Effektor-domäne in Subfamilien klassifiziert werden: So gibt es NLRAs (*NLR family acidic transactivation domain containing proteins*), NLRBs (*NLR family BIR domain containing proteins*), NLRCs (*NLR family CARD containing proteins*) und NLRPs (*NLR family PYD containing proteins*)⁹⁵. Zu den NLRAs gehört CIITA (*class II, major histocompatibility complex, transactivator*), welches eine N-terminale CARD- und AD (*acidic transactivation*)-Domäne aufweist. NLRBs weisen eine N-terminale BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*)-Domäne auf und werden auch als NAIPs (*neuronal apoptosis inhibitory proteins*) bezeichnet. Die NLRCs, wozu NLRC1 (auch NOD1 genannt), NLRC2 (auch NOD2 genannt), NLRC3 (auch NOD3 genannt), NLRC4, NLRC5 und NLRX1 gehören, besitzen zumeist eine N-terminale CARD. Zu den NLRPs zählen 14 Proteine (NLRP1-NLRP14), die sich durch eine N-terminale PYD charakterisieren.

Den LRRs von NLRs wird eine potentielle Rolle in der Ligandenerkennung zugeschrieben, ähnlich den LRRs der TLRs⁹⁸. Gemein ist den NLRs ihre Neigung zur Oligomerisierung nach Ligandenbindung und Aktivierung. So konnte zum Beispiel mittels *Native-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)* indirekt eine Oligomerisierung von humanem NLRP1 (*NLR family PYD containing protein 1*) nach Aktivierung gezeigt werden⁹⁹. Eine direkte Visualisierung eines Oligomers dahingegen wurde durch Cryo-EM Studien des NAIP2/NLRC4-Inflammasoms erbracht (siehe Abbildung 2)^{100,101}. Nach erfolgreicher Oligomerisierung vermögen diese Komplexe mittels ihrer N-terminalen Effektor-domäne eine Signalkaskade auszulösen. Dies geschieht vor allem durch homotypische Protein-Protein-Interaktionen mit weiteren Proteinen, welche an der Signalkaskade beteiligt sind. So finden vor allem CARD-CARD- sowie PYD-PYD-Interaktionen statt.

Als bekanntes Beispiel sei an dieser Stelle das NODosome erwähnt: NOD2 interagiert mittels seiner LRRs mit bakteriellem Muramyl-Dipeptid (MDP), welches im Peptidoglycan von sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterien vorkommt, und formiert sich zu einem NODosome¹⁰². In weiterer Folge interagiert NOD2 mittels seiner N-terminalen CARD mit dem CARD-aufweisendem Protein RIPK2 (*receptor-interacting serine-threonine kinase 2*), was schlussendlich zu einer NF- κ B-Aktivierung führt. Eine wichtige Rolle für NOD2 konnte im Darmepithel festgestellt werden¹⁰³: Hier ist eine Funktionsverlust-Mutation mit einem erhöhten Risiko eines Morbus Crohn assoziiert. Ein weiteres Beispiel ist die Ausbildung des hochmolekularen Inflammasom-Komplexes, welches zu einer Reifung von proinflammatorischen Zytokinen, deren Freisetzung, sowie einem Zelltod, Pyroptose genannt, führt¹⁰⁴. Auf diese Inflammasombildende NLRs wird in Kapitel 1.5 noch im Detail eingegangen. Interessanterweise besitzen auch Pflanzen NLRs, diese haben jedoch meistens eine *coiled-coil* oder TIR-Domäne am C-Terminus. Pflanzen NLRs können durch Pathogen-abgeleitete Effektoren zum Oligomerisieren gebracht werden und dadurch Zelltod vermitteln. In der Folge spielen sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern^{105,106}. In Pflanzen agieren NLRs zumeist als klassische *guards* und detektieren eine Veränderung der Homöostase^{107,108}.

Ein wichtiger Bestandteil der AAA+ ATPasen sind das Walker A- sowie Walker B-Motiv. Das Walker A-Motiv ist für eine Bindung von ATP, das Walker B-Motiv für eine Hydrolyse dessen notwendig¹⁰⁹. AAA+ ATPasen generieren durch eine ATP-Hydrolyse chemische Energie und nutzen diese als mechanische Energie für eine Konformationsänderung¹¹⁰. Ein ATP-gebundener Zustand wird oft in Zusammenhang mit einer Aktivierung des Proteins gebracht, ein ADP-gebundener Zustand

dahingegen mit der Inaktivierung des Proteins. So zum Beispiel wird das bakterielle DnaA-Protein durch eine ATP-Hydrolyse inaktiviert¹¹¹. Allerdings kann eine ATP-Hydrolyse auch mit einer Aktivierung in Verbindung gebracht werden: So ist für ein *origin licensing* und die Bildung eines Hexamers des MCM (*minichromosome maintenance*)-Proteins eine ATP-Hydrolyse notwendig¹¹². An dieser Stelle sei auch der spezifische *small molecule* Inhibitor von NLRP3, MCC950, erwähnt¹¹³. MCC950 interagiert mit dem Walker B-Motiv innerhalb der NACHT-Domäne von NLRP3. Dies führt zur Inhibition der ATP-Hydrolyse, was so den Sensor in einer geschlossenen Konformation behält und das NLRP3-Inflammasom inhibiert^{114,115}. Interessanterweise konnte hier in *surface plasmon resonance* (SPR)-Experimenten eine stabile Interaktion von ATP mit rekombinantem NLRP3 in Anwesenheit von MCC950 festgestellt werden, was einer Aktivierung von NLRs durch alleinige Bindung von ATP widerspricht. Dass eine Inhibition der ATP-Hydrolyse zur Inaktivierung von NLRP3 führt, lässt aber sehr wohl Rückschlüsse auf eine generelle Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse zur Konformationsänderung und zur anschließenden Oligomerisierung des Proteins zu.

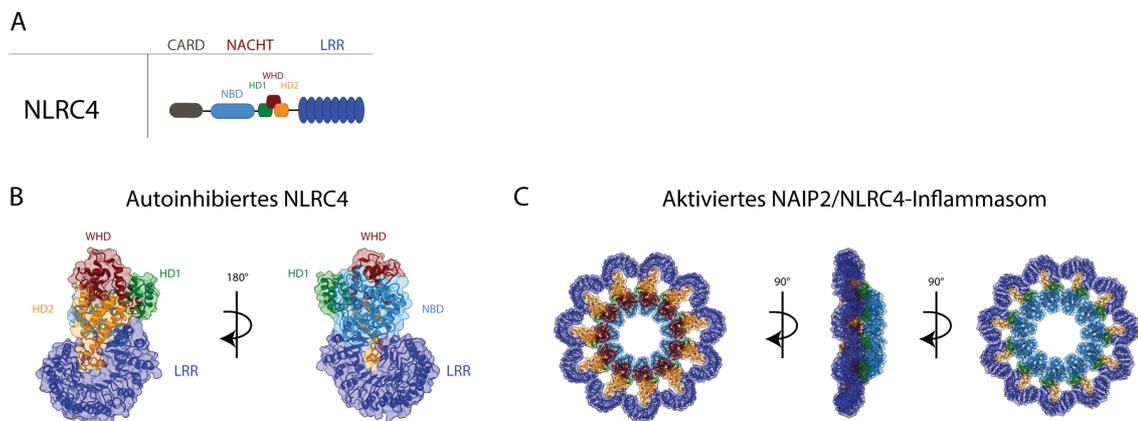


Abbildung 2: Bildung eines hochmolekularen Komplexes eines NLRs am Beispiel von NLRC4. (A) Domänenstruktur des NLRC4 Proteins. (B) Struktur des autoinhibierten NLRC4-Proteins in einer geschlossenen Konformation mit intramolekularen Interaktionen der NACHT- und LRR-Domäne (PDB: 4KXF). (C) Struktur des aktivierten NAIP2/NLRC4-Inflammasom-Komplexes (PDB: 3JBL).

Dem derzeitigen Modell nach liegen NLR-Proteine durch intramolekulare Interaktionen zwischen der NACHT- und LRR-Domäne in einer auto-inhibierten, ADP-gebundenen und geschlossenen Domänenarchitektur als Monomere im Zytosol vor¹¹⁶. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass in Kristallstrukturen von autoinhibiertem NOD2 und NLRC4 gebundenes ADP, welches klassischerweise für ein inaktives Protein spricht, detektiert werden konnte^{116,117}. Generell ist die ATPase-Funktion von NLRs aber schlecht untersucht und es gibt widersprüchliche Daten. So wurde zum Beispiel anfänglich gezeigt, dass das der NLR-Domänenarchitektur ähnliche Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), welches sich zu der heptameren Apoptosom-Plattform formiert, unter *steady-state* als Monomer mit einem Desoxyadenosintriphosphat (dATP)-Molekül als Ko-Faktor besteht¹¹⁸. Nach Aktivierung durch den Liganden Cytochrom C kommt es zu einer Hydrolyse von dATP, was zur Konformationsänderung genutzt wird und dazu führt, dass das nun gebundene dADP durch neues dATP ersetzt wird. In weiterer Folge bildet sich dadurch das Apoptosom aus. Weitere Studien zeigten zwar eine schwache intrinsische hydrolytische Aktivität von Apaf-1, konnten jedoch die Assemblierung des Apoptosomes durch Cytochrom C ohne ATP-Hydrolyse und nur durch alleiniges Binden von ATP als Ko-Faktor feststellen¹¹⁹. Interessanterweise wurde vor kurzem eine Cryo-EM Struktur des Pflanzen NLR Resistosoms ZAR1 gelöst¹⁰⁵. Nach Aktivierung des Sensorproteins PBL (*PBS1-like kinase*) interagiert dieses mit ZAR1-RKS1 (*HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1 - resistance-related kinase 1*), was zu einer Konformationsänderung und folgenden Austausch von ADP zu dATP/ATP in der NBD von ZAR1 führt, wobei es hier zu keiner Hydrolyse von ATP kommt. Die dATP/ATP-Bindung wiederum jedoch führt zu einem weiteren Strukturumbau und

einem *fold-switch* in ZAR1 und in weiterer Folge zur Ausbildung eines pentameren ZAR1-Resistosoms.

Analog lässt sich die Aktivierung von NLRs sehen: Eine Ligandenbindung an die C-terminale LRR-Sensordomäne von NLRs führt zu einer Aktivierung des Proteins durch Konformationsänderung und in weiterer Folge zu einem Austausch von ADP gegen ATP. Auf welche Weise die ATP-Hydrolyse hier inaktivierend oder aktivierend wirkt, ist noch nicht erforscht. Auf jeden Fall erfährt das Protein eine Konformationsänderung bei der Nukleotidbindung und -hydrolyse, welche zur Inaktivierung oder zur weiteren Lizenzierung zur Vermittlung der Oligomerisierung des Proteins genutzt werden kann. Letztendlich ist die NACHT-Domäne für eine Oligomerisierung der NLRs zuständig, da diese eine weitere Konformationsänderung durchläuft. Jedoch konnte allerdings schon eine, wenn auch untergeordnete, Rolle der LRRs in der Oligomerisierung nachgewiesen werden^{101,120}. So zeigte LRR-deletiertes NLRC4 eine schwächere Oligomerisierung und es wurde eine *gain-of-function* Mutation der LRRs beschrieben, welche zu einer autoinflammatorischen Erkrankung beiträgt. Dass NLRs ATP binden und die ATPase-Aktivität eine Funktionalität aufzeigt wurde mittels *in vitro* Experimenten mit rekombinantem Protein für NLRP3 bewiesen¹²¹. Die genaue Rolle der ATP-Bindung und Hydrolyse ist jedoch nicht komplett geklärt, da es auch widersprüchliche Ergebnisse aus Zellkultur-Experimenten gibt. So gibt es in Bezug auf eine Mutation des Walker A-Motivs, welche das Binden von ATP unmöglich macht, einerseits Berichte über eine Hyperaktivität des NLRP1B-Proteins, aber ebenso Berichte über eine Inaktivierung des NLRP3 Proteins, sowie auch der NOD1 und NOD2 Proteine¹²¹⁻¹²⁴.

1.3 Effektormechanismen der angeborenen Immunantwort

1.3.1 Zelltod

Neben der Pyroptose gibt es noch andere Arten des Zelltods. So spielen zum Beispiel Apoptose und Nekroptose eine wichtige Rolle in der Gewebemöostase, der embryonalen Entwicklung sowie der immunologischen Abwehr gegen Pathogene. Lange Zeit dachte man sogar, dass die Apoptose der einzige programmierte Zelltodweg neben einem zufälligen Zelltod sei.

1.3.1.1 Apoptose

Täglich werden 10-100 Milliarden Zellen im menschlichen Körper neu gebildet und ebenso viele werden zur Aufrechterhaltung der Homöostase beseitigt¹²⁵. Hier und auch in der Embryonalentwicklung spielt eine immunologisch stille Beseitigung von Zellen, die Apoptose, welche schon in den frühen 1970iger Jahren beschrieben wurde, eine essenzielle Rolle¹²⁶. Apoptose ist an bestimmten zellulären Merkmalen zu erkennen: Schrumpfen der Zelle, Veränderungen in der Verteilung der Membranlipide, Plasmamembran-Blasenbildung sowie Chromatin-Kondensation, auf welche eine enzymatische Fragmentierung der chromosomalen DNA folgt¹. Unter *steady-state* sind in lebendigen Zellen Phosphatidylserin-Reste auf die Innenseite der Plasmamembran beschränkt. Nach Einleitung der Apoptose liegen die Phosphatidylserin-Reste jedoch an der Außenseite einer toten Zelle frei¹²⁷. Diese Veränderungen in der Verteilung der Membranlipide und die daraus resultierende Freilegung von Phosphatidylserin-Resten dienen als *eat-me*-Signal, das in der Verschlingung apoptotischer Zellen durch Makrophagen endet. Dieser Vorgang, welcher als *efferocytosis* bezeichnet wird, führt zu einer nicht-entzündlichen Form der Zellbeseitigung. Falls apoptotische Zellen jedoch nicht schnell beseitigt werden, können sie eine GSDME (Gasdermin E)-vermittelte sekundäre Nekrose erleiden, eine hochentzündliche Form des Zelltods begleitet von Freisetzung intrazellulärer DAMPs¹²⁸.

Der Prozess der Apoptose kann durch einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg initiiert werden¹²⁵. Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung von membrangebundenen Todesrezeptoren durch extrazelluläre Liganden, wie zum Beispiel TNF- α , ausgelöst. Auch das membranständige Protein Fas-Ligand, welches auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert ist, kann zur Einleitung der Apoptose in Zielzellen führen und so die Dissemination von Pathogenen

verhindern. Allerdings haben Pathogene, wie zum Beispiel Vaccinia Virus (VACV), Proteine entwickelt, welche die Apoptose, insbesondere den Schritt der Caspase-Aktivierung, hemmen können¹²⁹. Die Aktivierung des extrinsischen Weges führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase-8. Der intrinsische oder mitochondriale Weg wird als Reaktion auf noxische Stimuli, wie zum Beispiel Ultraviolett (UV)-Strahlung oder Mangel an überlebensnotwendigen Wachstumsfaktoren induziert. Des Weiteren führt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zur Aktivierung des Apaf-1 abhängigen Apoptosoms. Dieser Weg beruht auf der Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase-9. Schlussendlich konvergieren beide Wege in der Aktivierung der Exekutorcaspasen Caspase-3, -6, und -7. Aktive Caspase-1 kann jedoch auch Caspase-3 und Caspase-7 spalten und so zu deren Aktivierung und zur Induktion der Apoptose führen. Dieses Ereignis ist abhängig von der Aktivierung der Caspase-1 ohne Induktion der Pyroptose, wie zum Beispiel bei Abwesenheit von GSDMD (Gasdermin D), da die schnelle Pyroptose-Induktion der langsameren Apoptose sonst vorausgehen würde¹³⁰.

1.3.1.2 Nekroptose

Die Nekroptose ist im Gegensatz zur Apoptose eine hochinflammatorische Form des Zelltods und durch einen Verlust der Membranintegrität und den passiven Austritt von intrazellulärem Inhalt gekennzeichnet¹³¹. Nekroptose ist Caspase-unabhängig und wird stattdessen von den Kinasen RIPK1 und RIPK3 sowie dem Substrat MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*) ausgeführt¹. Aufgrund dieses Caspase-unabhängigen Phänotyps kann die Nekroptose ein zellulärer Abwehrmechanismus gegen Viren sein, welcher es der Zelle erlaubt, in Gegenwart von viralen Caspase-Inhibitoren einen altruistischen Zelltod zu begehen. So kommt es nach Aktivierung des TNF-Rezeptors zu der Bildung eines *death-inducing signaling complex* (DISC), welcher unter anderem aus RIPK1 und Caspase-8 besteht und den NF- κ B-Signalweg aktiviert. Durch *de-novo* Expression von c-FLIP (*cellular FADD-like IL-1 β -converting enzyme-inhibitory protein*), welches mit Caspase-8 interagiert, und einer katalytischen Aktivität von Caspase-8 kommt es zu einem Überleben der Zelle. Die katalytische Aktivität von Caspase-8 ist notwendig um RIPK1 zu schneiden und dadurch zu inaktivieren. Kommt es jedoch, zum Beispiel durch Inhibition des NF- κ B-Signalwegs, zu einem verringerten c-FLIP Pegel, wird Caspase-8-abhängige Apoptose induziert¹³². Falls jedoch die katalytische Aktivität von Caspase-8 inhibiert ist, kommt es zu einer Auto- und Transphosphorylierung von RIPK1 und RIPK3. Dies führt in weiterer Folge zur Ausbildung des Ripoptosoms, auch Nekrosom genannt. Schlussendlich wird das Substrat MLKL phosphoryliert, welches sich in weiterer Folge ebenso oligomerisiert, sich in die Plasmamembran inseriert und zu Zelltod führt. Aufgrund der Freisetzung von intrazellulärem Inhalt, den DAMPs, ist die Nekroptose ein hoch immunogener Zelltod. Zu den DAMPs zählen, unter anderem, Histone, HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*), sowie DNA¹³³. Ferner kann auch dsRNA über ZBP1- oder TLR3-Aktivierung zu einer Induktion der Nekroptose führen^{134,135}.

1.3.2 Zytokinfreisetzung

Wie bereits weiter oben beschrieben, kann das Aktivieren eines PRRs zur Produktion von Zytokinen führen, die eine entzündungsfördernde Signalwirkung haben. Die größten Gruppen bilden hierbei Interferone, Interleukine und Tumor-Nekrose-Faktoren. Die Bindung dieser Zytokine an ihre jeweiligen Rezeptoren induziert spezifische Effekte, die von Differenzierungssignalen bis hin zu entzündlichen oder anti-entzündlichen Signalen reichen. Chemotaktische Zytokine, auch Chemokine genannt, sind dahingegen für eine Rekrutierung von Immunzellen an den Infektionsort zuständig.

Die Familie der Interferone wurde in den späten 1950iger Jahren für ihre Eigenschaft entdeckt, eine Resistenz gegenüber viraler Replikation zu vermitteln¹³⁶. Nach dem Erkennen typischer viraler Liganden, wie zum Beispiel bestimmter nicht-endogener Nukleinsäuren, produzieren und sezernieren Zellen transient Interferone, um andere, noch nicht infizierte Zellen zu warnen¹³⁷.

Diese können dann, nach Aktivierung des JAK (*Janus kinases*)-STAT (*signal transducer and activator of transcription proteins*)-Signalwegs und Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3, ein antivirales Programm einleiten, indem sie die Expression von IFN-stimulierten Genen (ISGs) induzieren, wie dem Chemokin CXCL10 (*C-X-C motif chemokine ligand 10*), das auch IP-10 (*interferon gamma-induced protein 10*) genannt wird. ISGs sind Proteine, die eine spezialisierte Rolle bei der Einschränkung der viralen Replikation und Vermehrung aufweisen. Dazu gehören unter anderem Restriktionsfaktoren: Zum Beispiel katalysiert das ISG Viperin die Umwandlung von Cytidintriphosphat (CTP) zu 3'-Desoxy-3',4'-didehydro-CTP (ddhCTP) und hemmt so virale RNA-abhängige RNA-Polymerasen durch Kettenabbrüche¹³⁸. Weitere Charakteristika von Interferonen sind ihre Neigung eine verstärkte Präsentation mikrobieller Antigene auszulösen, indem sie eine Hochregulierung von MHCs auf Makrophagen induzieren und auch die Stimulation klassischer Immunzellen, wie zum Beispiel NK-Zellen¹³⁹. Im Allgemeinen können Interferone in drei Haupttypen eingeteilt werden, so gibt es Typ-I, Typ-II und Typ-III-Interferone. Diese Einteilung basiert auf den gewebespezifischen Zelloberflächenrezeptoren an welche sie binden können und durch welche sie signalisieren. Zu den Typ-I-Interferonen, welche vor allem auf dendritische Zellen Einfluss nehmen, gehören IFN- α , - β , - ω , - ϵ , - κ ¹³⁷. IFN- γ ist ein Typ-II-Interferon und stimuliert vor allem NK-Zellen, T- und B-Zellen sowie APCs. Typ-III-Interferone, darunter IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3, - λ 4 binden vor allem an Rezeptoren, welche auf Epithelzellen und Hepatozyten vorzufinden sind. Einige Wirkungen der IFN-Signalisierung, wie die Fähigkeit die Virusreplikation zu hemmen, ist den Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Interferonen gleich. Es gibt aber auch viele Effekte der Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Interferone die, vor allem *in vivo*, für einen bestimmten Interferon-Typ spezifisch sind. Dies ist auf die Fähigkeit der verschiedenen Interferon-Typen zurückzuführen, verschiedene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, um die Expression verschiedener Gruppen von ISGs zu induzieren¹⁴⁰.

Die IL-1-Familie besteht aus 11 Mitgliedern, welche eine wesentliche Rolle bei der Reaktion des Wirts auf Infektionen spielen¹⁴¹. Die beiden am meisten untersuchten und auch zuerst entdeckten Zytokine dieser Familie sind IL-1 α und IL-1 β . In den 1940iger Jahren wurde ein Fieber-induzierender Faktor, genannt Pyrexin, aus sterilen Exsudaten identifiziert, welcher bei intravenöser Injektion in Kaninchen Fieber auslöst¹⁴². In den 1980iger Jahren konnte IL-1 β als dieser Faktor identifiziert sowie kloniert werden und eine transkriptionelle Aktivierung und Sekretion von IL-1 β nach Stimulation von Makrophagen mit LPS, beziehungsweise Lipid A, gezeigt werden¹⁴³⁻¹⁴⁵. Die meisten Mitglieder der IL-1-Familie werden als Vorläuferprotein produziert, denen eine klassische Signalsequenz für den ER-Golgi-Sekretionsweg fehlt. Sie müssen eine proteolytische Spaltung durchlaufen, um signalfähig zu werden und werden dann erst aus der Zelle freigesetzt. Zu diesen Zytokinen gehören zum Beispiel IL-1 β und IL-18, welche unter anderem nach einer Inflammation durch die Cystein-Protease Caspase-1 proteolytisch gespalten und anschließend freigesetzt werden¹⁴⁶. Sie können aber auch durch Neutrophilen-abgeleitete Serinproteasen prozessiert und dadurch maturiert werden¹⁴⁷. Interessanterweise kann IL-1 β aber auch als klassisches *decoy* fungieren und von sezernierten bakteriellen Proteasen gespalten und damit immunstimulierend gemacht werden¹⁴⁸. Hier agiert IL-1 β direkt als Köder und kann als „Sensor“ für eine bakterielle Proteaseaktivität Inflammation-unabhängig gespalten werden. Nach der Spaltung des Zytokins erhöht sich seine Affinität für den IL-1-Rezeptor (IL-1R) und macht es damit signalfähig. IL-1 α dahingegen wird nach Zelllyse freigesetzt und kann als unverarbeitetes Vorläufer-Protein oder auch als durch die Cystein-Protease Calpain gespaltenes Protein an den IL-1R binden. Durch passive Freisetzung nach Zelllyse kann IL-1 α eine Rolle als Alarmin einnehmen. Im Vergleich zu DAMPs, welche zentrale und essenzielle Bestandteile einer jeden Zelle sind, wie zum Beispiel DNA, sind Alarmine zwar ebenso endogene, aber nicht universale, sondern induzierbar exprimierte Moleküle. Ähnlich zu den DAMPs üben Alarmine erst nach Schädigung der Zelle und anschließender Freisetzung eine immunstimulierende Funktion aus. Des Weiteren soll IL-1 α ein DNA-bindender Nuklearfaktor sein, der NF- κ B und AP-1 aktivieren kann¹⁴⁹. Nach Bindung der Zytokine an den IL-1R aktiviert dieser als heterodimerer Rezeptor und durch seine intrazelluläre

TIR-Domäne den NF- κ B-Signalweg. Interessant ist auch das Familienmitglied IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra), das ebenfalls an IL-1R binden kann, aber keine Signalkaskade auslöst. Im Gegenteil: IL-1Ra bindet fest an den Rezeptor und blockiert so eine durch IL-1 α - oder IL-1 β -Bindung ausgelöste Signaltransduktion. Daher wird ein rekombinantes IL-1Ra, genannt Anakinra, welches in Bakterien produziert wird, in der klinischen Anwendung zur Behandlung der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis und verschiedenen systemischen und lokalen Entzündungskrankheiten verwendet¹⁴¹.

Die TNF-Familie besteht aus 19 Zytokinen, wobei TNF- α das bekannteste Mitglied ist¹. TNF- α wurde 1975 als Serumfaktor entdeckt welcher Nekrose von Tumorzellen zu induzieren vermochte und dadurch anfänglich als vielversprechendes Ziel für die Krebstherapie gesehen wurde¹⁵⁰. Trimeres TNF- α findet sich als Transmembranprotein auf der Zelloberfläche von vor allem Makrophagen vor¹⁵¹. Es kann aber auch durch ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-17 Proteasen, auch TACE (*tumor necrosis factor- α -converting enzyme*) genannt, gespalten werden und wird dann als lösliches Trimer in den Überstand abgegeben¹⁵². Sowohl membrangebundenes als auch lösliches TNF- α , haben eine Signalwirkung und führen nach Bindung an ihre Rezeptoren zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs.

1.4 Wirt-Pathogen-Interaktionen

Die *red queen hypothesis* geht von einer ständigen Weiterentwicklung und Anpassung von Wirten und deren Pathogenen aus. Für ein Überleben beider muss ein ständiges Wettrüsten stattfinden, was zu einer Koevolution führt¹⁵³. Neben Bakterien sind Viren bedeutende Pathogene. Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und können keine eigene Replikation durchlaufen. Sie sind daher für eine erfolgreiche Propagation auf den Stoffwechsel von Wirtszellen angewiesen und kapern diesen. Ein Weiterleben des Wirtes und eine daraus resultierende erfolgreiche Propagation ist also im Sinne eines Virus. Im Interesse des Wirtes ist es jedoch, eine virale Replikation zu beschränken oder zu verhindern. Zum Erreichen einer ausgeglichenen Immunantwort muss das Immunsystem daher gut orchestriert agieren. Eine Infektion mit dem Wirts-angepassten Herpes Simplex Virus, beispielsweise, führt meistens nur zu, zwar unangenehmen, aber nicht tödlichen Fieberbläschen, da die Propagation des Virus eingedämmt werden kann. Einige Pandemien der letzten Zeit aber, so zum Beispiel HIV/AIDS, Ebola, aber auch die derzeitige SARS-CoV-2-Pandemie sind die Folge einer Zoonose, die Übertragung einer Infektionskrankheit von Tieren auf Menschen und *vice versa*^{154,155}. Hier sind die Folgen der viralen Infektion zumeist schwerwiegender. Dies lässt sich aus einer noch nicht vollständig durchgeführten Anpassung an den neuen Wirt und ein Fehlen von speziesspezifischen Restriktionsfaktoren erklären, was zu einer uneingeschränkten Replikation des Virus führt¹⁵⁶. Bei einem gut angepassten Virus führt eine Infektion normalerweise nicht zum Tod des Wirtes, sondern zu einer (beschränkten) Propagation des Virus. So zum Beispiel verläuft eine Infektion mit dem HIV-verwandten Simiane Immundefizienz-Virus (SIV) in afrikanischen nichtmenschlichen Primaten asymptomatisch oder kaum symptomatisch, wohingegen eine HIV-Infektion unbehandelt in Menschen zu AIDS führt^{157,158}. Dahingegen sind Viren, welche überhaupt nicht angepasst sind, leicht durch das Immunsystem zu erkennen, da sie noch nicht für Virulenzfaktoren kodieren. So lassen sich einfache PAMPs wie intrazelluläre Nukleinsäuren sofort erkennen und führen zu einer Aktivierung des Immunsystems, ohne dass eine Inhibition von Seiten des Pathogens stattfinden kann. Gut angepasste Viren, wie zum Beispiel Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV), setzen Techniken ein, um ihr Erbgut vor einer solchen Erkennung zu schützen¹⁵⁹. Eine Immunantwort muss daher gut koordiniert sein, um zwar die Replikation von Pathogenen zu beschränken aber eine unkontrollierte, überschießende Antwort zu verhindern. Als weiteres Beispiel lässt sich hier die normalerweise vorteilhafte Erkennung von LPS erwähnen: Während einer Erkennung von bakteriellen LPS üblicherweise zu einer moderaten Immunaktivierung führt, kann eine unkontrollierte systemische bakterielle Infektion und Überaktivierung der PRRs mit daraus resultierender übermäßiger Entzündungsreaktion zum Tod führen^{160,161}.

Da Nukleinsäuren das vorderste und offensichtlichste Muster sind, welches leicht als fremd erkannt werden kann, haben Pathogene verschiedene Gegenmechanismen entwickelt, um einer Nukleinsäurererkennung durch den Wirt zu entkommen. So zum Beispiel wird eine PKR-Aktivierung auf dem Level der RNA-Bindung durch das VACV-Protein E3L und eine PKR-Dimerisierung durch das Hepatitis C Virus-Protein NS5A inhibiert^{162,163}. Auch wird die OAS-Signalkaskade durch das Maus Hepatitis Virus-Protein NS2 inhibiert, da es 2'-5'-Oligoadenylat degradiert¹⁶⁴. Auch eine Spaltung von Proteinen wird angewandt, um diese zu inaktivieren: So schneidet zum Beispiel das Hepatitis C Virus NS3-Protein das Adapterprotein MAVS und führt dadurch zu einer reduzierten Interferonantwort¹⁶⁵. Daher gibt es zumeist einen *backup*-Plan und Zellen stützen sich auf mehrere Erkennungsrezeptoren und Signalwege. So zum Beispiel führt eine dsRNA Erkennung durch TLR3 nicht nur zu einer Interferonantwort, sondern kann auch zu einer Apoptose führen¹⁶⁶.

1.5 Das Inflammasom

Das Inflammasom wurde erstmals 2002 durch Martinon, Burns und Tschopp beschrieben¹⁶⁷. In einem zellfreien System konnte gezeigt werden, dass sich ein hochmolekularer Komplex ausbildet, welcher in der Lage ist, pro-IL-1 β zu IL-1 β zu maturieren. Inflammasom-Komplexe bestehen in der Regel aus einem modularen Sensor-Protein, dem Adapter-Protein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) (Genname *PYCARD*), sowie der ausführenden Cystein-Protease Caspase-1 (früher als ICE bezeichnet für *interleukin-1 converting enzyme*) (siehe Abbildung 3 für eine Auswahl an Inflammasom-Sensoren und deren Aktivatoren)^{168,169}.

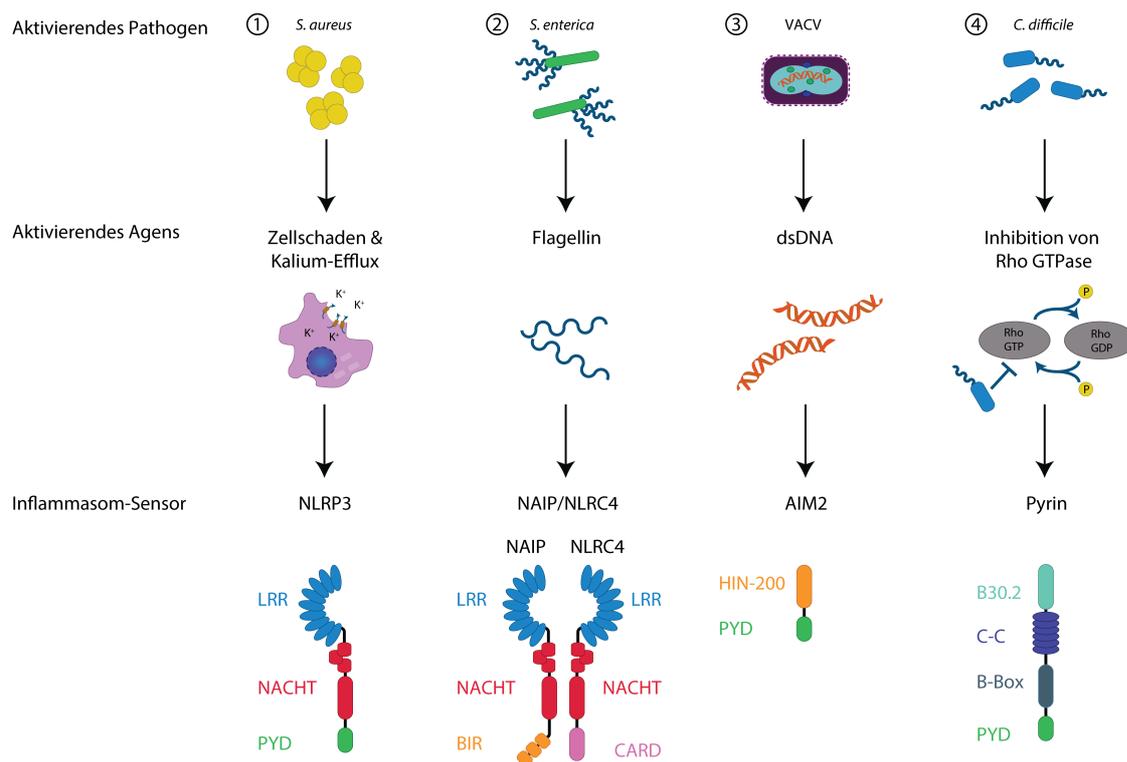


Abbildung 3: Auswahl an Inflammasom-Sensoren mit Darstellung der Proteindomänen sowie deren Aktivatoren. (1) Das NLRP3-Inflammasom wird durch ein Ausströmen von Kalium aktiviert. Dies kann zum Beispiel durch bakterielle porenbildende Proteine, wie α -Hämolyisin von *S. aureus*, verursacht werden. (2) Das NAIP/NLRC4 Inflammasom wird durch eine direkte Bindung von bakteriellem Flagellin an das NAIP-Protein aktiviert. (3) AIM2 wird durch direkte Bindung an dsDNA aktiviert. Diese kann bakterieller oder viraler Natur sein. (4) Eine Aktivierung des Pyrin-Inflammasoms findet durch einen indirekten Mechanismus statt: Eine Inhibition von Rho GTPasen führt zu einer Aktivierung dieses Inflammasoms.

Der Name Caspase für die Proteasefamilie rührt daher, dass diese Proteasen nach einem Asparaginsäure-Rest mit einem aktiven Cystein-Rest in ihrer katalytischen Triade spalten (*cysteine aspartyl proteases*). Nach erfolgreicher Aktivierung des zytosolischen Sensors vermag sich ein

Inflammasom-Komplex durch homotypische PYD-PYD oder CARD-CARD Protein-Interaktionen zu assemblieren¹⁷⁰. Der Prionen-ähnliche Vorgang der ASC-Assemblierung in Filamente dient einer Signalamplifikation und kann unter Zuhilfenahme Fluoreszenz-markierter Proteine mikroskopisch beobachtet werden¹⁷¹⁻¹⁷³. In einem weiteren Schritt wird das inaktive Zymogen Caspase-1 an ASC Filamenten durch eine *proximity*-induzierte Autoproteolyse aktiviert¹⁷⁴. Dieser Modus der Selbstspaltung und Aktivierung durch Spaltung ist eine inhärente Eigenschaft der Caspasen. Nach erfolgreicher Aktivierung kann Caspase-1 ihre Substrate schneiden, darunter die drei prominentesten: die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 sowie GSDMD^{146,175}. Die Prozessierung der Substrate durch Caspase-1 wird durch eine Sequenzspezifität, da nach einem Aspartat geschnitten wird, sowie durch die Struktur der Proteine definiert^{176,177}. Das Schneiden von GSDMD führt zu einer Auflösung der intramolekularen Autoinhibition, anschließender Bindung des N-terminalen Fragments an Membranlipide und zur Ausbildung von Poren in der Membran¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Durch den vorhandenen Ionenkonzentrationsgradienten kommt es zu einem osmotischen Druck und Einfließen von Wasser. In weiterer Folge kommt es zum typischen Aufblähen, Platzen und dadurch folgenden Tod der Zelle, welcher Pyroptose genannt wird¹⁸¹. Durch diesen Prozess wird nicht nur ein möglicher Lebensraum für intrazelluläre Pathogene zerstört, sondern es werden auch DAMPs freigesetzt¹⁸². Üblicherweise sind dies intrazelluläre Moleküle, wie zum Beispiel ATP und HMGB1, die durch ihre ungewöhnliche extrazelluläre Lokalisation als Warnsignal erkannt werden¹⁸³. Ferner werden die nun maturierten Zytokine IL-1 β und IL-18 freigesetzt, wobei es hier – durch einen noch unklaren Mechanismus – auch ohne Pyroptose der Zelle zu einer Freisetzung kommen kann¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Als Sekundäreffekt ist das N-terminale Fragment von GSDMD außerdem imstande die Zellwände von Bakterien zu zerstören und diese dadurch abzutöten¹⁸⁸. Durch den mit Pyroptose verbundenen Zelltod und der hochgradig immunstimulatorischen Aktivität nach Freisetzen der Zytokine sowie DAMPs kann eine Aktivierung des Inflammasoms als letztmögliche Verteidigungsstrategie betrachtet werden (siehe Abbildung 4 für eine Darstellung der Inflammasomaktivierung).

Die meisten der Inflammasom-Sensoren gehören zur Familie der NLRs⁹⁴. Inflammasom-bildende NLR-Proteine beherbergen drei charakteristische Domänen: Eine N-terminale *death-fold*-Domäne, welche entweder direkt oder indirekt an Caspase-1 bindet, eine zentrale Nukleotid-bindende oder NACHT-Domäne, und eine LRR-Domäne. Bei der *death-fold*-Domäne kann es sich um eine PYD oder CARD handeln. Aufgrund dieser N-terminalen Domänen wird zwischen NLRP-Proteinen mit einer PYD sowie NLRC-Proteinen mit einer CARD unterschieden. NLRP-Proteine vermögen mittels ihrer PYD homotypische Interaktionen mit der PYD von ASC einzugehen und diese PYD-PYD-Interaktionen führen zu einer Oligomerisierung von ASC. ASC kann weiter mit seiner CARD-Domäne mit der CARD-Domäne von Caspase-1 interagieren und diese somit zum Inflammasom rekrutieren, wo diese durch Autoproteolyse aktiviert wird. NLRC-Proteine können auch ein ASC-beinhaltendes Inflammasom bilden, aber ebenso mittels ihrer CARD-Domäne direkt mit Caspase-1 interagieren und diese ohne stattfindende Autoproteolyse aktivieren¹⁸⁹. Durch das Fehlen der Autoproteolyse formiert sich ein „*death-inflammasome*“: Es kommt zu einer Pyroptose aber zu nur unzureichender Prozessierung von Zytokinen¹⁸⁹. Der LRR-Domäne wird in der Inflammasomaktivierung eine potentielle Rolle in der Ligandenerkennung zugeschrieben⁹⁸. Die NACHT-Domäne dahingegen durchgeht nach Aktivierung des Sensors eine Konformationsänderung, was zu einer Oligomerisierung und Aktivierung des Sensors führt¹⁰⁴. Dieser hochmolekulare Komplex dient als Keim für das Pyroptosom.

1.5.1 NLRP3

Der wohl prominenteste und am besten untersuchte Inflammasom-Sensor ist NLRP3. Punktmutationen in NLRP3 sind ein Auslöser für das *cryopyrin-associated periodic syndrome* (CAPS), welches die autoinflammatorischen Krankheiten *familial cold autoinflammatory syndrome* (FCAS), *neonatal-onset multisystem inflammatory disease syndrome/chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome* (NOMID/CINCA) sowie *Muckle-Wells syndrome* (MWS)

umfasst^{190,191}. Dem CAPS liegen wiederkehrende Anfälle von systemischer Entzündung und Fieber zugrunde, welche IL-1 β -vermittelt sind¹⁹². Ferner gibt es Assoziationen zwischen einer abnormen Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Volkskrankheiten wie Alzheimer und Gicht^{193,194}. NLRP3 ist überwiegend in Makrophagen exprimiert und eine Hyperaktivität von NLRP3 durch MWS in Makrophagen konnte auch erstmals mittels aus MWS-Patienten-isolierten Makrophagen gezeigt werden¹⁹¹. Das NLRP3 Protein besteht aus einer N-terminalen PYD, einer zentralen NACHT-Domäne, und C-terminalen LRRs.

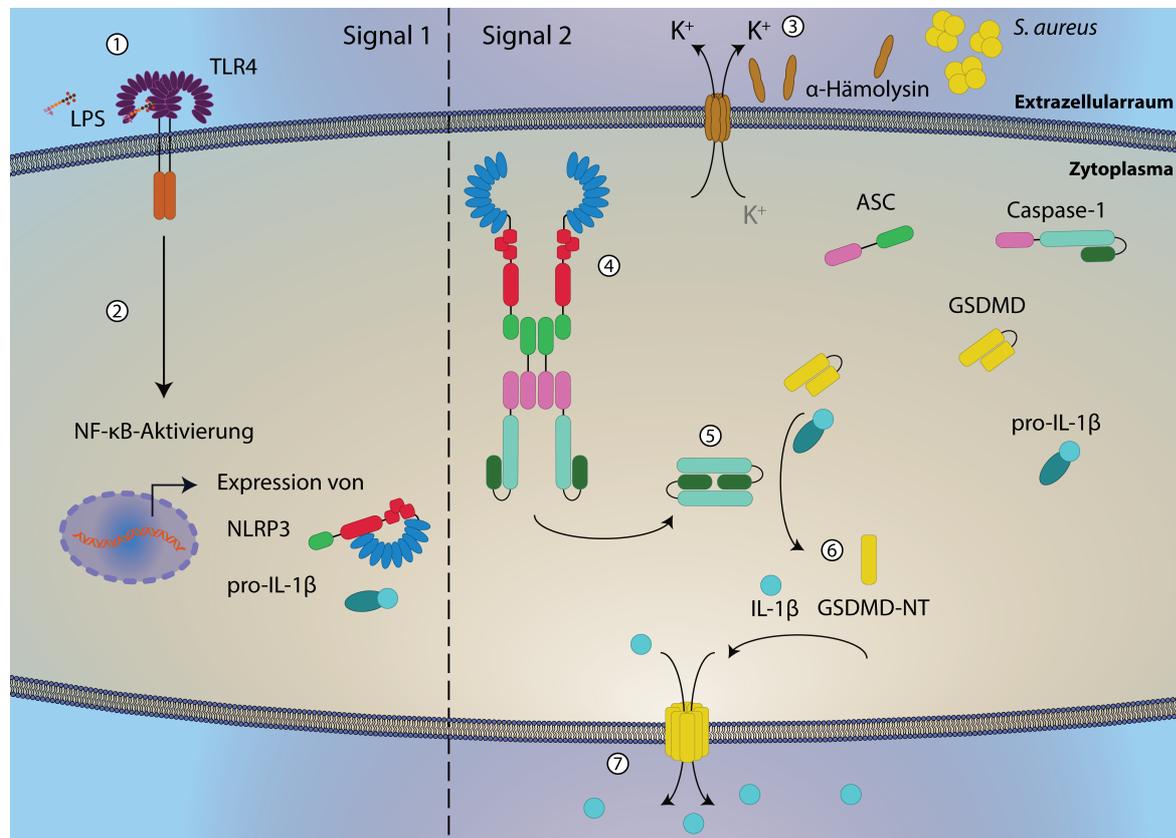


Abbildung 4: Aktivierungsmechanismus eines Inflammasoms anhand von NLRP3. (1 & 2) Durch transkriptionelle Aktivierung, zum Beispiel TLR4-Aktivierung, kommt es zu einer Hochregulation von NLRP3 und pro-IL-1 β . Dies wird allgemein als Signal 1 bezeichnet. (3) Durch Inserterung bakterieller Proteine, wie zum Beispiel α -Hämolyysin von *S. aureus*, in die Membran kommt es zu einem Kalium-Efflux, was als Signal 2 dient. (4) NLRP3 wird durch den Kalium-Efflux aktiviert und assembliert sich über homotypische Protein-Protein-Interaktionen in einen hochmolekularen Komplex mit dem Adapter ASC sowie Caspase-1. (5) Caspase-1 schneidet und aktiviert sich dadurch selbst. (6) In weiterer Folge schneidet aktivierte Caspase-1 die Substrate GSDMD und pro-IL-1 β . (7) Der freie N-Terminus von GSDMD kann sich in die Membran integrieren und führt so zu dem inflammatorischen Zelltod Pyroptose. Das maturierte IL-1 β wird ebenso freigesetzt.

Zur Aktivierung des kanonischen NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen bedarf es eines Signal 1- sowie Signal 2-Stimulus. Durch dieses „Vier-Augen-Prinzip“ unterliegt das NLRP3-Inflammasom einer stärkeren Regulation. Signal 1 kann zum Beispiel LPS sein, welches durch Bindung an TLR4 und anschließender NF- κ B-Signalwegaktivierung zu einer transkriptionellen Hochregulation der pro-IL-1 β - und NLRP3-Expression führt¹⁹⁵. Außerdem wird eine Lizenzierung der NLRP3-Aktivierung durch Signal 1 durchgeführt, welche auf einer oder mehreren posttranslationalen Modifikationen von NLRP3 beruht, so etwa einer Deubiquitinierung oder einer Phosphorylierung¹⁹⁶. Als Signal 2 und direktere Aktivatoren von NLRP3 haben sich diverse Stimuli herausgestellt: So aktivieren porenbildende Toxine von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sowie dsRNA, dsDNA, ATP, Harnsäurekristalle, das Ionophor Nigericin, Kohlenstoff-Nanoröhren und Asbest das NLRP3-Inflammasom¹⁹⁷⁻²⁰⁵. Diese Stimuli verursachen einen Efflux von Kalium nach Schädigung der Zellmembran, was als gemeinsamer Nenner und Aktivator des NLRP3-Inflammasoms identifiziert worden ist^{206,207}. Es wurden aber auch Kalium-unabhängige Aktivatoren von NLRP3 beschrieben,

so zum Beispiel das Molekül Imiquimod, welches üblicherweise als TLR7 Aktivator verwendet wird, hier aber durch mitochondriale ROS NLRP3 aktiviert²⁰⁸. Vor kurzem wurde außerdem eine Dispersion des Trans-Golgi-Netzwerks als gemeinsamer Nenner der NLRP3 Stimulation identifiziert²⁰⁹. Gemeinhin lässt sich NLRP3 also als Sensor für eine Stoffwechselgefahr oder zellulärer Perturbation einordnen²¹⁰.

Neben dieser kanonischen Inflammasomaktivierung von NLRP3 gibt es noch zwei andere Aktivierungswege. Einerseits die nicht-kanonische Inflammasomaktivierung: Hier bindet und erkennt Caspase-11 in Mäusen beziehungsweise die Caspasen 4/5 in Menschen direkt intrazelluläres LPS und eine Aktivierung dieser Caspasen führt zum Zelltod. Anschließender Kalium-Efflux führt zu einer sekundären NLRP3 Aktivierung^{161,211,212}. Andererseits gibt es auch die alternative Inflammasomaktivierung: Hier findet eine alternative NLRP3-abhängige Inflammasomaktivierung statt, welche unabhängig von Kalium-Efflux ist und ohne Zelltod, aber mit Freisetzung von IL-1 β einhergeht^{186,213}. Dies könnte zum Beispiel durch ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*)-abhängige Reparatur der GSDMD-Poren vonstattengehen²¹³.

1.5.2 NLRC4

NLRC4, früher als IPAF bezeichnet, unterscheidet sich von NLRP3 durch eine N-terminale CARD-Domäne. Wie zuvor für NLRC-Proteine beschrieben, kann eine NLRC4-Aktivierung daher auch ohne Beteiligung von ASC Zelltod vermitteln, für eine effiziente Zytokinprozessierung ist jedoch eine ASC-Involvierung notwendig^{182,214}. Das NLRC4-Protein besteht aus einer N-terminalen CARD, einer zentralen NACHT-Domäne, und C-terminalen LRRs. NLRC4 unterscheidet sich auch dahingehend von NLRP3, dass es kein Signal 1 für eine Hochregulation und Lizenzierung benötigt. Schon seit einiger Zeit wusste man aus *in vivo* Experimenten, dass Infektionen mit *Salmonella enterica* (*S. enterica*) sowie *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) zu einer Pyroptose führen können^{215,216}. So konnte gezeigt werden, dass nach einer *S. enterica* Infektion von Mäusen eine effiziente Wirtsabwehr nur in Anwesenheit von Caspase-1, IL-1 β sowie IL-18 stattfand. Interessanterweise aber war ein *S. enterica* induzierter Schock abhängig von IL-18. Später wurde NLRC4 als Inflammasom-Sensor für eine *Salmonella*-Infektion identifiziert und eine vorherrschende Rolle für das NLRC4 Inflammasom im Darmepithel aufgedeckt^{182,217,218}. Als bestimmte PAMPs für eine NLRC4-Aktivierung konnten in weiterer Folge das bakterielle PrgJ Protein (*Needle complex protein*), welches Teil des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) ist, sowie intrazelluläres bakterielles Flagellin ausfindig gemacht werden²¹⁹⁻²²¹. Diese Proteine werden jedoch nicht direkt durch NLRC4, sondern durch NAIP-Proteine erkannt. NAIPs bestehen aus einer N-terminalen BIR-Domäne, einer zentralen NACHT-Domäne, und C-terminalen LRRs und agieren als Keim für die Formierung des Inflammasoms. Nach Binden des Liganden werden NAIPs aus einem autoinhibitorischen Zustand freigesetzt und aktivieren das – hier als Adapter agierende – NLRC4-Protein, welches sich in ein NAIP-NLRC4-Inflammasom assembliert. Interessanterweise wird nicht die LRR-Domäne von NAIPs zur Diskriminierung bakterieller Liganden genutzt, sondern die NBD-assoziierten Domänen sind für die spezifische Ligandenerkennung zuständig²²². Es gibt 7 Maus-NAIPs, davon binden NAIP1/2 Komponenten des T3SS und NAIP5/6 binden Flagellin. Dahingegen gibt es nur ein humanes NAIP, welches Flagellin und T3SS-Komponenten bindet²²³.

1.5.3 Pyrin

Auch in Zusammenhang mit dem Inflammasom-Sensor Pyrin, der durch das *Mediterranean Fever* (*MEFV*) Gen kodiert wird, gibt es einige autoinflammatorische Krankheitsbilder: So stehen *familial mediterranean fever* (FMF) und *pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne* (PAPA) in Zusammenhang mit einer erhöhten Pyrin-Inflammasomaktivierung²²⁴⁻²²⁶. Ferner wurde ein Zusammenhang von *inflammatory bowel disease* (IBD) mit Mutationen in *MEFV* beschrieben²²⁷. Pyrin besitzt eine N-terminale PYD, eine zentrale *B-box* mit *coiled coils* sowie eine C-terminale B30.2/SPRY-Domäne. Als Aktivator von Pyrin konnten bisher ein Gallensäureanalogon mit

unklarem Aktivierungsmechanismus sowie Rho GTPasen-inaktivierende bakterielle Proteine auffindig gemacht werden^{228,229}. Unter *steady-state*-Bedingungen phosphorylieren Rho-aktivierte Serin-Threonin-Kinasen das Pyrin-Protein. Ein phosphoryliertes Pyrin wiederum rekrutiert 14-3-3-Proteine, die Pyrin autoinhibiert und inaktiv halten²³⁰. Werden diese Rho GTPasen selbst nun inhibiert, aktiviert sich das Pyrin-Inflammasom. Interessanterweise fungiert Pyrin in seiner Aktivierung so als ein klassischer *guard sensor*: Bakterielle Toxine von, zum Beispiel, *Clostridium difficile* (*C. difficile*) und *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*), welche üblicherweise Rho GTPasen inhibieren um so die Dynamik des Wirtszytoskeletts zu ihrem Zwecke zu hemmen oder zu kapern, aktivieren das Inflammasom.

1.5.4 AIM2

dsDNA wird nicht nur durch cGAS erkannt, sondern als klassisches PAMP und DAMP auch durch den Inflammasom-Sensor AIM2²³¹⁻²³⁴. AIM2 hat eine N-terminale PYD, welche es für homotypische Interaktionen mit ASC verwendet und eine C-terminale HIN-200-Domäne, wodurch es dsDNA sequenzspezifisch erkennt und bindet. AIM2 gehört zur sogenannten PYHIN (*pyrin and HIN domain*)-Familie. AIM2 agiert hierbei als *molecular ruler* für die Größe der angetroffenen dsDNA und benötigt eine Mindestlänge von 80 bp für eine effiziente Oligomerisierung an dsDNA und anschließender Aktivierung^{235,236}. AIM2 spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung von Pathogenen wie *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), VACV, und *L. monocytogenes*²³⁷. Ebenso konnte eine gewebespezifische Rolle von AIM2 in der Erkennung von endogenen DNA-Spezies in DNase II⁻ Mäusen festgestellt werden²³⁸.

1.6 FIIND-enthaltende Inflammasom-Sensoren

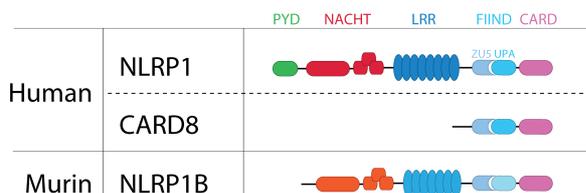


Abbildung 5: FIIND-enthaltende Inflammasom-Sensoren. Domänenstruktur des humanen NLRP1, humanen CARD8 und murinen NLRP1B.

Vor Beginn dieser Arbeit gab es Kenntnisse über die Aktivierung des Mäuse-NLRP1B-Proteins, aber nur ein beschränktes Verständnis des genauen Mechanismus seiner Aktivierung. Das Wissen über die Aktivierung des humanen Ortholog NLRP1 oder des humanen *caspase recruitment domain-containing protein 8* (CARD8) war nur sehr begrenzt (siehe Abbildung 5 für eine Darstellung der *function-to-find-domain* (FIIND)-aufweisenden Inflammasom-Proteine). In den letzten Jahren kam es aber zu einigen spannenden Entdeckungen zu diesen Proteinen sowohl in molekularer, biochemischer als auch in struktureller Hinsicht. Von den anderen Inflammasom-Sensoren unterscheiden sich murines NLRP1B, humanes NLRP1 und das humane CARD8, für welches kein murines Ortholog vorhanden ist, durch eine ungewöhnliche C-terminale FIIND, welche von einer CARD gefolgt wird. Durch *in silico* Strukturmodellierungsstudien konnte eine strukturelle Ähnlichkeit der NLRP1 FIIND- mit der ZU5 (*found in ZO-1 and UNC5 (uncoordinated protein 5)*)-UPA (*conserved in UNC5, PIDD and Ankirins*)-Domäne von UNC5b identifiziert werden²³⁹⁻²⁴¹. Daher kann die FIIND-Domäne in eine ZU5- und UPA-Subdomäne unterteilt werden, ähnlich zu denen von UNC5b. Vor kurzem wurde eine Kristallstruktur von Ratten NLRP1B-FIIND gelöst, diese ähnelt dem auto-inhibierten UNC5b²⁴². Das einzigartige an der FIIND ist, dass das entstandene Protein posttranslational und unter *steady-state* autoproteolytisch in zwei Polypeptidketten zwischen der ZU5 und UPA gespalten wird und die so entstandenen Fragmente nicht-kovalent assoziiert bleiben²⁴³. Diese Autoproteolyse ist eine inhärente Funktion der FIIND-Domäne und unabhängig von anderen Proteinen. In der oben erwähnten Kristallstruktur der FIIND konnte gezeigt werden,

dass der erste β -Strang der UPA-Subdomäne sich in den ZU5-*fold* hineinfaltet und so eine nicht-kovalente Interaktion stattfindet, welche inhibitorisch wirkt. Interessanterweise durchläuft UNC5b selbst keiner Autoproteolyse, das verwandte Protein PIDD (*p53-inducible protein with a death domain*) jedoch schon^{240,244}. Die Spaltung von NLRP1B, NLRP1 und CARD8 in der FIIND ist notwendig, damit diese Proteine inflammasomkompetent werden, es handelt sich dabei also um eine Art Lizenzierungsschritt²⁴⁵. Findet keine Autoproteolyse statt, so kann es bei einer anschließenden Aktivierung der Proteine nicht zur finalen Ausführung der Pyroptose kommen. Zu einer Aktivierung muss nämlich der derzeitigen Datenlage nach das C-terminale Fragment, bestehend aus UPA-CARD, befreit werden und sich anschließend zu einem Inflammasom-Keim formieren^{246,247}. Dabei wirkt die UPA fördernd, da sie den Schwellenwert für die Oligomerisierung herabsetzt^{248,249}. Daher werden innerhalb von Zellen die C-terminalen Fragmente von NLRP1B, NLRP1 und CARD8 durch die Dipeptidylpeptidase (DPP) 8 und DPP9 gebunden und so einer direkten und spontanen Inflammasomaktivierung entgegengewirkt^{99,250-252}. DPPs sind Proteasen, welche eine Post-Prolin Dipeptidylaminopeptidase-Aktivität aufweisen und daher nach NH₂-Xaa-Prolin Resten schneiden²⁵³. Die C-terminalen Fragmente von murinem NLRP1B und humanem NLRP1 weisen ein Prolin an P1 auf, humanes CARD8 aber ein Leucin an P1. Erst kürzlich wurden Cryo-EM Strukturen eines ternären DPP9-NLRP1^A-NLRP1^B-Komplexes veröffentlicht, welche einige interessante Erkenntnisse ans Licht brachten^{242,254} (siehe Abbildung 6B für die Cryo-EM Struktur). So bindet ein DPP9-Molekül ein in der FIIND autoproteolytisch-geschnittenes, jedoch vollständiges NLRP1^A-Molekül über ein erstes *interface (site I)* mittels der ZU5-Subdomäne. Die NLRP1^A ZU5-UPA-Interaktion ähnelt hierbei der Kristallstruktur von NLRP1B-FIIND. Bei einem weiteren NLRP1^B-Molekül ist jedoch nur die UPA-Subdomäne sichtbar und dessen N-Terminus ist über ein zweites *interface (site II)* im Substrattunnel von DPP9 sichtbar. Über ein drittes *interface (site III)* interagieren die UPA-Domänen von NLRP1^A und NLRP1^B. Die Interaktion von DPP9 und NLRP1^B an *site II* ähnelt einer substratgebundenen Struktur von DPP9, eine Spaltung nach P1 von NLRP1 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, was sich mit früheren Berichten deckt. NLRP1 wird demnach ähnlich wie ein Substrat erkannt und das C-terminale UPA-CARD-Fragment bindet über seinen N-Terminus an DPP9, wird jedoch aber nicht prozessiert. Umso interessanter ist es, dass sowohl eine Bindung als auch eine katalytische Aktivität von DPP9 erforderlich sind, um das NLRP1-Inflammasom in Schach zu halten. Ferner erklärt sich aus der Struktur, wieso auch DPP8, aber nicht DPP4 eine inhibitorische Funktion auf NLRP1-Aktivierung ausüben kann: Die mit NLRP1 interagierenden Reste von DPP9 sind auch in DPP8 konserviert, jedoch nicht in DPP4.

Im Moment gibt es keine Indizien für eine (patho)physiologische Korrelation von DPP8/9-Inhibition, es gibt jedoch *small molecules* die eine Inhibition von DPP8/9 vermögen und so zu einer Inflammasomaktivierung führen. So inhibieren der Pan-DPP-IV-Inhibitor Val-boro-Pro (VbP), auch Talabostat oder PT-100 genannt, und die DPP8/9-selektiven Inhibitoren 1G244 und 8j die Dipeptidylpeptidasen DPP8 und DPP9²⁵⁵. Inhibition von DPP8/9 führt zu einer nicht-redundanten und NLRP1-abhängigen Pyroptose in Mausmakrophagen und humanen Keratinozyten^{99,252}. Diese Aktivierung lässt sich durch eine direkte Verdrängung des NLRP1^B-Fragments aus dem DPP9-Substrattunnel, Auflösung des inhibitorischen Komplexes und Freisetzung des UPA-CARD-Fragments verstehen²⁵⁴. In einer NLRP1-DPP9-VbP Cryo-EM Struktur konnte NLRP1^B, bestehend aus UPA-CARD, nur schwach wahrgenommen werden, was darauf hindeutet, dass VbP NLRP1^B durch VbP-Bindung an DPP8/9 direkt aus dem Substrattunnel verdrängt (siehe Abbildung 6C für eine Darstellung der VbP-vermittelten NLRP1-Inflammasomaktivierung).

Eine DPP8/9-Inhibition in humanen Zellen myeloischen und lymphoiden Ursprungs dahingegen führt zu einer CARD8-abhängigen Pyroptose^{250,256,257}. Aufgrund der Cryo-EM Struktur eines, ebenso ternären, DPP9-CARD8^A-CARD8^B Komplexes wird hier von einem ähnlichen, aber doch etwas anderem, Aktivierungsmechanismus als bei NLRP1 ausgegangen²⁵⁸. So bindet das CARD8^B UPA-CARD-Fragment nicht im, aber in der Nähe des Substrattunnels. Daher führt eine DPP9-VbP-Bindung wohl nicht zu einer direkten Verdrängung von CARD8^B UPA-CARD. Dies ist für die Cryo-EM

Untersuchung *in vitro* der Fall, in Zellen dahingegen konnte eine VbP-Behandlung die Assoziation von CARD8 mit DPP9 reduzieren und dadurch zu einer Inflammasomaktivierung führen. Interessanterweise wurde VbP schon vor ungefähr 10 Jahren als immuno-onkologisches Agens in klinischen Studien getestet. Allgemein gesprochen führt eine Inhibition von DPPs zu einer Perturbation der Zellhomöostase. Im Sinne des *guard models* könnte man daher davon ausgehen, dass es einen (patho)physiologischen Zusammenhang mit einer *guard*-Funktion von DPPs und einer DPP8/9-Inhibition geben kann.

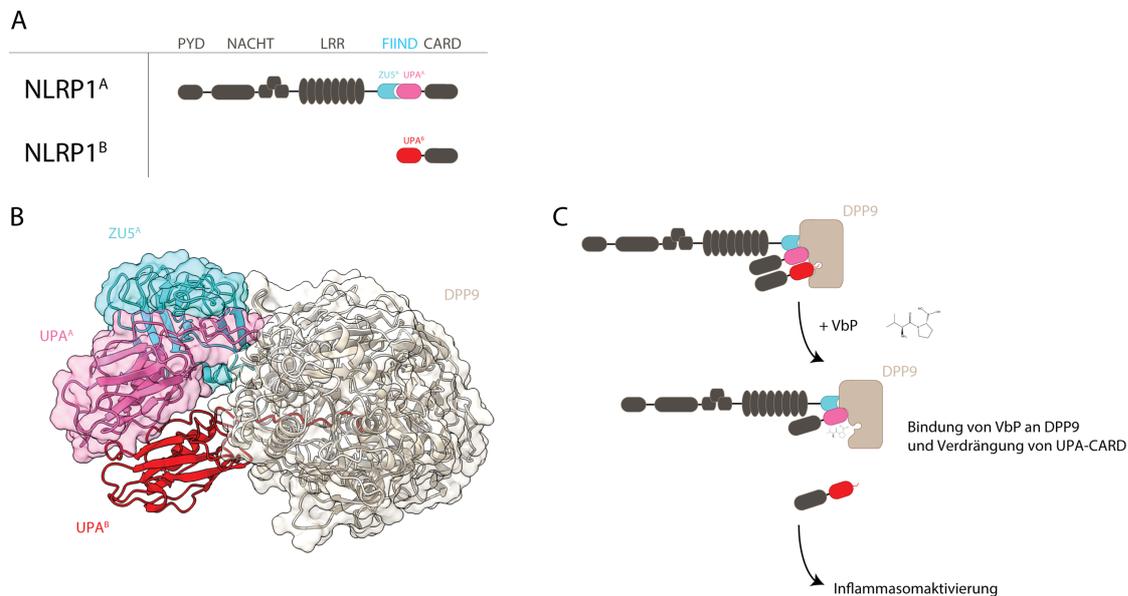


Abbildung 6: Inhibition von humanem NLRP1 durch DPP9 und Aktivierung durch VbP. (A) Domänenstruktur des humanen NLRP1-Proteins mit den Subdomänen der FIIND, welche im Cryo-EM gesehen wurden, farbig markiert. (B) Cryo-EM Struktur des ternären NLRP1-DPP9 Komplexes, welcher aus DPP9-NLRP1^A-NLRP1^B besteht (PDB: 6X6A). (C) Schematische Darstellung des ternären DPP9-NLRP1^A-NLRP1^B Komplexes. VbP führt zu einer Verdrängung des NLRP1^B-Moleküls, welches nun als Keim für die Inflammasomaktivierung agieren kann.

1.6.1 Mäuse NLRP1B

Das murine NLRP1B-Protein besitzt, als klassischer NLR, eine NACHT-Domäne, welche von LRRs, einer autoproteolytischen FIIND- und schließlich einer CARD-Domäne gefolgt wird. Die Forschung an dem Mäuse-*Nlrp1b* hat ihren Ursprung in den 1950igern an einem ursprünglichen Interesse an der Pathogenese von *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*). *B. anthracis* ist ein grampositives, sporenbildendes, aerobes, sowie fakultativ anaerobes Bakterium. Es ist Verursacher des Milzbrandes (auch Anthrax genannt), befällt vor allem Herbivoren, kann aber auch von Tieren auf Menschen übertragen werden. In den allgemeinen Fokus rückte *B. anthracis* nach den Anthrax-Anschlägen von 2001, bei denen Milzbrandsporen für Bioterrorismus verwendet worden waren. Mittels *in vivo* Studien konnten schon früh von *B. anthracis* gebildete und sezernierte Proteine als letales Agens ausfindig gemacht werden, welche für den Tod von Hausmeerschweinchen und Mäusen zuständig sind^{259,260}. Dazu wurde Plasma von *B. anthracis* infizierten und verendeten Hausmeerschweinchen auf seine Toxizität bei Mäusen und Hausmeerschweinchen getestet. Es konnte festgestellt werden, dass ein letaler Effekt durch vorhergehende Hitzebehandlung des Plasmas sowie auch durch gleichzeitige Gabe eines neutralisierenden Pferde-Plasmas aufgehoben werden konnte.

Als verantwortliches Agens konnten die über ein Plasmid kodierten Virulenzfaktoren und sekretierten Proteine Protektives Antigen (PA), Letalfaktor (LF), und *edema factor* (EF) ausfindig gemacht werden, welche gemeinhin als Anthraxtoxine bekannt sind²⁶¹. Prozessiertes PA assembliert sich entweder mit LF oder EF zu einem Komplex, welcher über den ANTXR-Rezeptor und anschließender Endozytose in Zellen aufgenommen wird²⁶². Der assemblierte Komplex aus PA

und LF wird als Letaltoxine (LT) und der assemblierte Komplex aus PA und EF als Edematogene Toxine (ET) bezeichnet. Die Verabreichung von ET führt zur Bildung von Ödemen. EF ist eine Adenylcyclase und konvertiert nach Translokation ins Zytosol 20-50% des ATPs der Wirtszelle zu dem *second messenger* cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und führt dadurch zu einer abgeschwächten Immunantwort²⁶³. So konnte gezeigt werden, dass eine ET-Behandlung von Neutrophilen zu einer Verringerung des *oxidative burst*, sowie auch zu einer reduzierten Phagozytose führt^{264,265}. Bei LPS-stimulierten Monozyten führt eine ET-Behandlung zu einer reduzierten TNF- α - aber einer erhöhten IL-6-Sekretion²⁶⁶. LF dahingegen ist eine Zink-Metalloproteinase, welche nach Translokation ins Zytosol intrazelluläre Wirtspoteine schneidet. Eine Verabreichung von LT ist für bestimmte Tiere, wie Mäuse, tödlich²⁶⁷. Es konnte gezeigt werden, dass MAPK Kinasen 1 und 2 (MKK 1 und 2) Substrate für LF sind und diese durch eine LF-vermittelte Proteolyse inaktiviert werden²⁶⁸. MAP-Kinasen spielen jedoch eine wichtige Rolle in der immunologischen Signalkaskade²⁶⁹. Eine Inaktivierung der MKKs durch das Pathogen scheint so also nützlich für diesen zu sein. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von MKK3 durch LF zu einer Reduktion von LPS/IFN- γ -induziertem TNF- α und Stickstoffoxid führt²⁶⁸. Die Toxizität von LT beruht jedoch auf einer Wirkung gegenüber Makrophagen. In Zellkultur-Systemen konnte eine zytotoxische und lytische Rolle von LT nach Stimulation von Maus-Peritoneal-Makrophagen festgestellt werden²⁷⁰. Weitergehend konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Makrophagen-abgereicherte Mäuse resistent gegen LT-induzierten Tod sind, dies aber durch Injektion von Makrophagen wiederhergestellt werden kann²⁷¹. Außerdem wurde hier gezeigt, dass Mäuse durch passive Immunisierung gegen IL-1 oder Gabe eines IL-1 Rezeptor Agonisten vor einer LT-*challenge* geschützt sind. Mittels Inzuchtmausstämmen konnte 1998 zuerst ein Locus am Chromosom 11 und 2006 das extrem polymorphe Gen *Nlrp1b* (früher als *Nalp1b* bezeichnet) als Anfälligkeitsfaktor für LT-induzierten Makrophagenzelltod identifiziert werden^{272,273}.

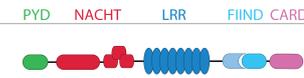
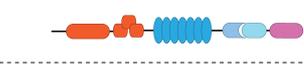
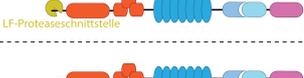
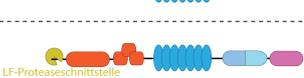
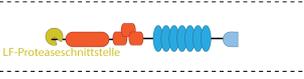
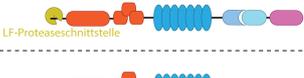
	PYD NACHT LRR FIIND CARD					Reaktionsfähigkeit auf	
						LF	VbP
NLRP1						✗	✓
NLRP1A						✗	✓
NLRP1B1						✓	✓
NLRP1B2						✗	✓
NLRP1B3						✗	✗
NLRP1B4						✗	✗
NLRP1B5						✓	✓
NLRP1C						✗	✗

Abbildung 7: NLRP1-Proteine kodiert durch Paraloge und Allele in der Maus. Dargestellt sind humanes NLRP1 und die Maus-NLRP1 Paralogproteine verschiedenster Allele sowie die Reaktionsfähigkeit auf Letalfaktor oder VbP.

Die genaue Aufklärung gestaltete sich als nicht trivial, da es zum Beispiel in C57BL/6-Mäusen drei *Nlrp1* Paraloge (*Nlrp1a*, *Nlrp1b* und *Nlrp1c*) gibt und diese in Tandem auf Chromosom 11 liegen (siehe Abbildung 7 für eine Übersicht der NLRP1-Proteine). Des Weiteren sind fünf hoch polymorphe Allele für *Nlrp1b* in gängigen Inzuchtmausstämmen beschrieben, von welchen *Nlrp1b1* und *Nlrp1b5* auf LT-Stimulation reagieren. Die anderen Allele haben Mutationen oder Aminosäuresubstitutionen, welche das Protein inaktiv machen. So zum Beispiel fehlt *Nlrp1b2* eine Erkennungssequenz am N-Terminus, die es resistent gegenüber LT macht und *Nlrp1b3*

durchläuft aufgrund eines einzelnen Nukleotidpolymorphismus keiner Autoproteolyse in der FIIND-Domäne^{245,274}. Dahingegen beinhaltet *Nlrp1b4* eine Rastermutation, welche zu einem frühzeitigen Stopcodon und so zu einem trunkierten NLRP1B-Protein führt, welchem die CARD fehlt. Dem *Nlrp1a* Paralog fehlt ebenso eine Erkennungssequenz am N-Terminus, die es resistent gegenüber LT macht und *Nlrp1c*, welches auch als Pseudogen beschrieben ist, fehlt die CARD²⁷⁵. Eine Sensitivität gegenüber LT zeigen die *Nlrp1b1* und *Nlrp1b5* Allele, eine Sensitivität gegenüber VbP zeigen *Nlrp1a*, *Nlrp1b1*, *Nlrp1b2*, sowie *Nlrp1b5*²⁷⁴. Diese besitzen allesamt eine NACHT-Domäne, LRRs, sowie eine FIIND, welche einer Autoproteolyse untergeht, und eine CARD für *downstream signaling*. Bei Ratten wurden fünf polymorphe *Nlrp1* Gene beschrieben²⁷⁶.

In einer anschließenden Studie konnte im Kontext einer Inflammasomaktivierung *in vivo* gezeigt werden, dass eine NLRP1B-Aktivierung zu einer IL-1 β -Antwort führt und dies ein protektives Ereignis darstellt²⁷⁷. Mäuse, welche ein LT-sensitives Allel tragen, waren in der Lage das bakterielle Wachstum und die Verbreitung von *B. anthracis* als Folge einer intravenösen oder subkutanen Sporenfektion zu kontrollieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese Antwort abhängig von Caspase-1 und einer IL-1 β -induzierten Neutrophilen-Rekrutierung ist. Letztlich wurde 2012 gezeigt, dass LF das NLRP1B-Protein von Ratten sowie Mäusen schneidet und dass dies zu einer Inflammasomaktivierung führt, wobei es jedoch nicht klar war, ob für die NLRP1B-Aktivierung noch andere Substrate von LF geschnitten werden müssen^{276,278,279}. Neben einem direkten Aktivierungsmodell durch LF-Spaltung von NLRP1B bestand noch die Möglichkeit, dass unbekannte Faktoren, welche NLRP1B inhibieren, geschnitten und dadurch inaktiviert werden. Als LF-Schnittstelle konnte bei Maus NLRP1B jedoch Lys44-Leu45 entdeckt werden. Dass ein alleiniges Schneiden des NLRP1B-Proteins zu einer Inflammasomaktivierung führen kann, wurde schlussendlich mittels eines künstlichen Systems bewiesen: Ein sonst nicht durch TEV schneidbares und aktivierbares NLRP1B-Protein wurde am N-Terminus mit einem GFP-Molekül und einer TEV-Spaltungsstelle versehen. Nach TEV Expression wurde dieses Protein geschnitten und tatsächlich aktiviert^{245,280}. Diese Studien lieferten den ersten molekularen Mechanismus dafür, wie eine von einem Pathogen kodierte Aktivität durch ein Inflammasom wahrgenommen werden kann. In diesem Sinne ist die Aktivierung ähnlich der Pathogenerkennung durch *integrated decoy*²⁸¹. So fungiert NLRP1 als eine Art „Stolperdraht“ und wird durch die, an und für sich für *B. anthracis* nützliche, da immunsuppressive, LF-Aktivität, aktiviert. Dies lässt sich als ein perfektes Beispiel eines Wettrüstens zwischen Wirt und Pathogen ansehen. Interessanterweise konnte eine Proteasom-Abhängigkeit sowie Involvierung des *N-end-rule*-Signalwegs für die Aktivierung nach LT-Stimulation aufgefunden gemacht werden, die genaue Rolle konnte aber bis vor kurzem nicht entschlüsselt werden²⁸²⁻²⁸⁵.

Bahnbrechende Studien, darunter ein genomischer *screen*, des Vance-, Bachovchin- sowie dem Shao-Labor, führten schließlich 2018 zu folgenden Entdeckungen: Durch die Spaltung von NLRP1B durch LT wird ein destabilisierender Neo-N-Terminus freigelegt, was zu einer funktionellen Degradation des N-terminalen Fragments von NLRP1B führt. Hierfür ist die Aktivität des Proteasoms, sowie des *N-end-rule*-Signalwegs notwendig^{246,247,286-288}. Durch den Bruch im NLRP1B-Molekül, welcher durch die Autoproteolyse in der FIIND entstanden ist, wird das C-terminale Fragment, bestehend aus UPA-CARD, nicht gemeinsam mit dem N-terminalen Fragment degradiert, sondern befreit sich und bildet einen Inflammasom-Keim aus (siehe Abbildung 8).

Des Weiteren unterstützend für die Hypothese der funktionellen Degradation konnte gezeigt werden, dass eine Ubiquitinierung des N-Terminus von NLRP1B durch die *S. flexneri* E3 Ubiquitin-Ligase IpaH7.8 ebenso zu einer Degradation des N-Terminus und Aktivierung des NLRP1B-Inflammasoms führt. Ferner sei hier noch einmal die Aktivierbarkeit des murinen NLRP1B-Inflammasoms durch DPP8/9-Inhibition erwähnt^{252,255}. Eine Freisetzung von IL-1 β und IL-18 nach NLRP1B-Aktivierung ist abhängig vom Adapterprotein ASC, ein Zelltod kann jedoch, wenn auch in abgeschwächter Form, ohne ASC-Involvierung stattfinden^{189,251}.

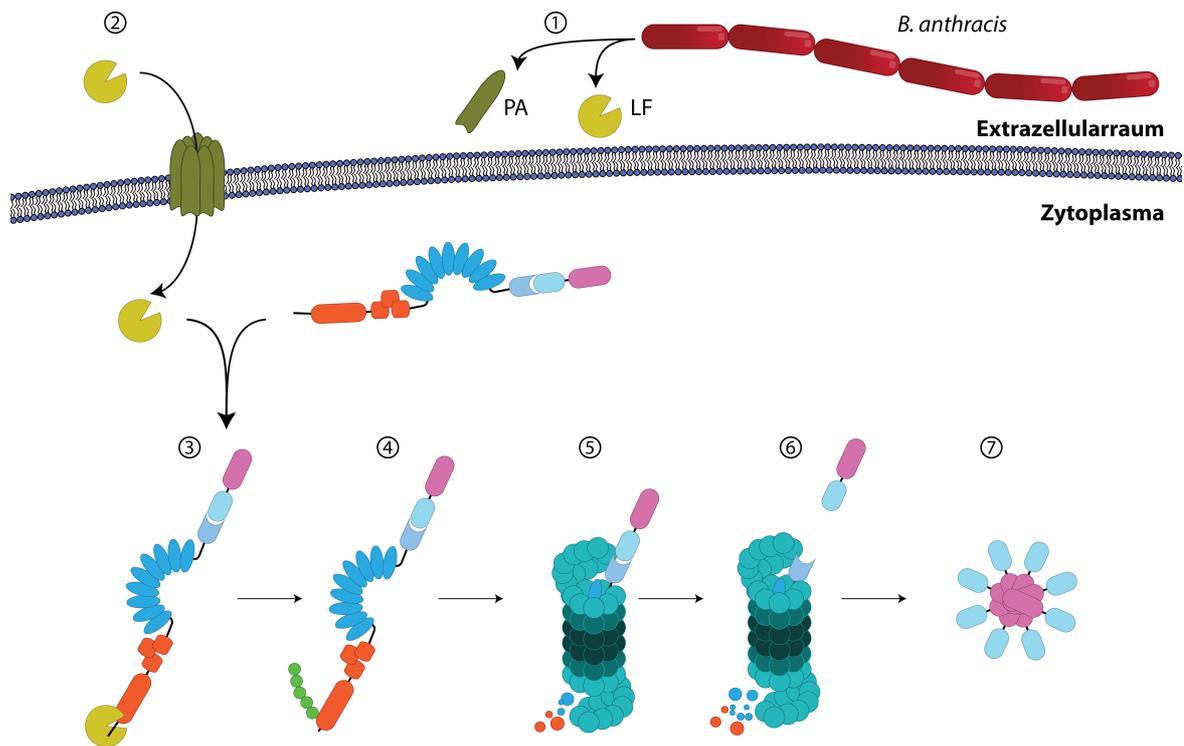


Abbildung 8: Aktivierung von NLRP1B durch funktionelle Degradation. (1) *B. anthracis* sekretiert PA und LF. (2) Diese assemblieren sich und LF kann in das Zytosol translokieren. (3) Dort schneidet LF am N-Terminus von NLRP1B. (4) NLRP1B wird dadurch ubiquitiniert und für die proteasomale Degradation markiert. (5) Das N-terminale Fragment von NLRP1B wird durch das Proteasom abgebaut. (6) Das C-terminale Fragment wird, durch vorangegangene Autoproteolyse in der FIIND-Domäne, von einer proteasomalen Degradation verschont und kann sich aus dem Komplex lösen. (7) Ein Inflammasom-Keim entsteht. Abbildung angelehnt an ²⁴⁷.

Der Vollständigkeit halber sind weiter noch Publikationen zu erwähnen, die von einer Aktivierung des Ratten- und des Mäuse-NLRP1B- sowie des humanen NLRP1-Inflammasoms durch *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) berichten²⁸⁹⁻²⁹¹. In murinen Makrophagen konnte bei einem *knockdown* von *Nlrp1* ein erhöhter Zelltod und eine erhöhte Parasitenreplikation festgestellt werden. Der zugrundeliegende Mechanismus der Aktivierung durch *T. gondii* ist jedoch nicht geklärt, es konnte keine Prozessierung des N-terminalen Fragments von NLRP1B festgestellt werden. Offene Fragen gibt es auch noch in Bezug auf die Beobachtung, dass eine ATP-Depletion in einer humanen Epithelzelllinie, welche transient mit NLRP1B, sowie Caspase-1 und pro-IL-1 β rekonstituiert wurde, zu einer Aktivierung des Inflammasoms führte¹²³.

1.6.2 Humanes NLRP1

Humanes NLRP1 war das erste Inflammasom-formende Protein, welches 2002 von Martinon, Burns und Tschopp beschrieben wurde und zeigt eine – auf den ersten Blick – ähnliche Domänenstruktur wie murines NLRP1B¹⁶⁷. Dennoch war es bis vor einigen Jahren eher stiefmütterlich untersucht worden und seine physiologische Rolle war nicht bekannt. Dies lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen: Erstens wird humanes NLRP1 in Epithelzellen und nicht in klassischen immunologisch „relevanten“ Zellen wie Makrophagen exprimiert²⁹². NLRP3, das am besten untersuchte Inflammasom, kann in klassischen immunologisch relevanten Zellen wie murinen Makrophagen ideal untersucht werden und ist ebenso in humanen Makrophagen aktiv²⁹³. Auch wird NLRP1B in Makrophagen murinen Ursprungs durch LT-Behandlung aktiviert. Daher konzentrierte sich eine Untersuchung des humanen NLRP1-Inflammasoms eher auf immunologische Zellen als auf Epithelzellen. Des Weiteren ist Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Makrophagen, wie *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) oder *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) leicht zugänglich und Zellen können aus dem Ausgangsmaterial relativ

einfach isoliert werden. Außerdem gibt es Zelllinien, wie die humane THP-1 oder murine J774 Zelllinie, welche, bis zu einem gewissen Grad, als verlässliches Model für primäre Makrophagen fungieren. Primäre humane sowie auch primäre murine epidermale Keratinozyten dahingegen sind aufwendiger zu isolieren. Einerseits ist humanes Ausgangsmaterial schwerer zu bekommen, andererseits erfordert die Isolation mehr Aufwand, da Keratinozyten aus einer Matrix mit potentiell verunreinigenden Fibroblasten isoliert werden müssen. Konventionelle humane Keratinozytenzelllinien, wie etwa HaCaT, dahingegen spiegeln primäre humane Keratinozyten nicht wider, da sie ein anderes Proteinexpressionsprofil als ihr primäres Pendant zeigen. Auch gab es lange keinen Aktivator von humanem NLRP1, welches eine kontrollierte Untersuchung des Inflammasoms möglich gemacht hätte. Humanes NLRP1 kodiert, im Gegensatz zum murinen Ortholog, für keine LF-Schnittstelle und ist daher nicht durch LT-Stimulation aktivierbar. Rekonstitution von humanen Zellen mit einem murinen NLRP1B vermag jedoch diese Zellen LT-sensitiv zu machen²⁹⁴. Ein Zusammenspiel der genannten Faktoren ließ NLRP1 lange rätselhaft erscheinen.

Das humane NLRP1 unterscheidet sich vom murinen NLRP1B durch eine N-terminale PYD und verlängerte LRRs (siehe Abbildung 5). Die N-terminale PYD fungiert hier – im Gegensatz zur PYD von NLRP3 – nicht als *downstream-signaling* Partner um den Adapter ASC durch homotypische PYD-PYD-Interaktionen zu rekrutieren. Stattdessen wurde der PYD eine autoinhibitorische Rolle zugeordnet, da eine Expression eines NLRP1 Δ PYD zu einer spontanen Aktivierung des Inflammasoms führte²⁹². Interessanterweise war es in Experimenten möglich, die PYD durch ein GFP-Molekül zu ersetzen und dieses GFP-Molekül konnte eine autoinhibitorische Rolle ähnlich der PYD vermitteln¹²⁴. Daraus könnte man Rückschlüsse ziehen, dass die N-terminale Domäne ein sterischer Inhibitor des Proteins ist und nicht, dass die PYD spezifische intramolekulare Wechselwirkungen vermittelt. Des Weiteren lässt sich so erklären, wieso murines NLRP1B ohne eine PYD auskommt, da die N-terminale Domäne auf das notwendigste Minimum getrimmt wurde um trotzdem noch inhibieren zu können. Anstelle der PYD wird bei humanem NLRP1, ähnlich zu NLRP1B, die C-terminale CARD für eine Rekrutierung und Aktivierung des ASC-Pyroptosoms verwendet. Hier sei aber angemerkt, dass – im Gegensatz zu NLRP1B – eine komplette ASC-Abhängigkeit des humanen NLRP1-Inflammasoms gegeben ist²⁹².

2007 wurde mit rekombinantem, gereinigtem NLRP1 in einem zellfreien System eine Aktivierung durch MDP vorgeschlagen²⁹⁵. Hier konnte durch Zugabe von MDP und ATP eine Oligomerisierung von NLRP1 und eine anschließende Aktivierung von Caspase-1 festgestellt werden. Es gibt jedoch einige Vorbehalte dieser Studie gegenüber: So fand zum Beispiel im verwendeten NLRP1-Protein keine Autoproteolyse in der FIIND statt, da das rekombinante Protein aus einem cDNA-Klon generiert wurde, welchem das hierzu notwendige Exon 14 fehlt. Eine Autoproteolyse ist jedoch, zumindest in Zellen, für eine *downstream* Aktivierung, welche ASC abhängig ist, notwendig. Des Weiteren wurde keine direkte Bindung zwischen NLRP1 und MDP nachgewiesen, sondern es wurde nur ein *shift* von NLRP1 in Native-PAGE nach MDP/ATP-Zugabe gezeigt. Vor allem aber handelte es sich hierbei um eine *in vitro* Studie ohne weitere Validierung der MDP-vermittelten NLRP1-Aktivierung in Zellen. In einer weiterführenden Studie derselben Gruppe wurde ein NLRP1-inhibierendes Protein (F1L) von VACV beschrieben, wobei keine direkte NLRP1-Aktivierung durch VACV beobachtet werden konnte²⁹⁶. Für eine Aktivierung wurden THP-1 mit MDP und ATP behandelt, was zu einer Inflammasomaktivierung und Caspase-1 Freisetzung führte. Eine Infektion mit Wildtyp (Wt) VACV führte zu einer Inhibition der Inflammasomaktivierung, diese Inhibition fand in Abwesenheit von F1L in einer Virusmutante jedoch nicht statt. Bei dieser Stimulation von THP-1 mit MDP und ATP handelte es sich aber wahrscheinlich um eine klassische NLRP3-Aktivierung mit einem typischen Signal 1 und Signal 2²⁹⁷. Erwähnt sei hier auch eine weitere Publikation dieser Gruppe, in der ein Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus-Protein identifiziert wurde, welches ebenso NLRP1 inhibieren soll²⁹⁸. Da die LRRs als Ligandenbindedomäne angesehen werden, wurde versucht eine Struktur der NLRP1-LRRs zusammen mit MDP zu lösen. Es konnte

jedoch nur die Apostruktur gelöst werden, welches zur Annahme führte, dass die MDP-Bindungsstelle zumindest nicht in den LRRs zu finden ist²⁹⁹.

Wegweisendere Studien kamen erst ab 2007 hinzu, als eine UVB-induzierte NLRP1/NLRP3-Aktivierung sowie eine Inflammasomaktivierung bei Kontaktüberempfindlichkeit in humanen Keratinozyten beschrieben wurde, welche auch abhängig von Caspase-1 ist³⁰⁰⁻³⁰³. In weiteren Untersuchungen konnte außerdem eine konstitutive Expression von pro-IL-1 β und anderen Inflammasom-Komponenten in humanen, aber nicht murinen Keratinozyten festgestellt werden, was im Widerspruch zu der klassischen Notwendigkeit eines *primings* für eine pro-IL-1 β Hochregulation steht^{304,305}. Jedoch ließen diese Daten darauf schließen, dass humanes NLRP1 eine wichtige Rolle im Epithel spielt, nicht aber im myeloischen Kompartiment. Des Weiteren sind Assoziationen von NLRP1 mit autoinflammatorischen Krankheiten, unter anderem Vitiligo (VAMAS1, *Vitiligo-associated multiple autoimmune disease 1*), intraepitheliale Hornhautdyskeratose, systemische Sklerose, Morbus Addison und Typ-1-Diabetes, bekannt³⁰⁶⁻³¹². Wie schon zuvor beschrieben gibt es bei Maus NLRP1 mehrere Paraloge und *Nlrp1b* selbst ist hoch polymorph mit mehreren Allelen. Bei der Untersuchung von Protein-kodierenden Genomsequenzen von diversen Primaten konnte eine positive, diversifizierende Selektion von NLRP1 anhand einer weit über dem Durchschnitt liegenden Anzahl an Aminosäuren-Substitutionen festgestellt werden³¹³. NLRP1 ist so unter den oberen 0.9 Prozent der Proteine, welche unter einer positiven Selektion stehen. Werden solche Beobachtungen in immunologisch relevanten Genen beobachtet, lässt dies auf ein Wettrennen zwischen Wirt und Pathogen schließen¹⁵³. In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass besonders der Interdomänenlinker zwischen der PYD- und NACHT-Domäne einer starken Selektion unterworfen ist. Dies ließ analog zu der Aktivierung von murinem NLRP1B durch LF die Hypothese aufkommen, dass sich humanes NLRP1 als ein Sensor für Protease-Aktivität evolviert hat¹²⁴. Zumindest in einem künstlichen System, in dem das humane NLRP1-Protein analog zu den Versuchen mit murinem NLRP1B mit einer N-terminalen TEV-Schnittstelle versehen wurde, konnte das NLRP1-Inflammasom ebenso durch eine Spaltung aktiviert werden. Interessanterweise wurde aber auch nach Ausschließen des Interdomänenlinkers und erneuter Analyse auf positive Selektion eine starke Selektion für NLRP1 festgestellt. So sind zum Beispiel auch die LRRs einer starken positiven Selektion unterworfen.

Richtungsweisende Studien wurden jedoch 2016 und 2018 von Zhong und Reversade veröffentlicht: 2016 wurden zuerst durch Ganzgenomsequenzierungen isolierter genomischer DNA von Patienten mit *multiple self-healing palmoplantar carcinoma* (MSPC) und *familial keratosis lichenoides chronica* (FKLC), welche sich durch eine Hautpathologie auszeichnen, *gain-of-function*-Mutationen in NLRP1 festgestellt²⁹². Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Punktmutationen in der PYD beziehungsweise eine Deletion in den LRRs von NLRP1 zu einer Autoaktivierung des NLRP1-Inflammasoms führen, was durch parakrines IL-1 β wiederum zu einer Hautkrebserkrankung führt. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass das NLRP1-Protein vorherrschend in der Haut exprimiert wird und die LRRs eine autoinhibitorische Rolle erfüllen. So führen eine Deletion in den LRRs, aber auch Mutationen in der PYD, zu einer Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms. Mutationen in der PYD führen zu einer Störung der PYD-Faltung, wodurch die autoinhibitorische Aktivität eingeschränkt wird. Interessanterweise wurde mit dieser Studie auch erstmals ein zelluläres Modell zur Charakterisierung des NLRP1-Inflammasoms in einer endogenen Konfiguration beschrieben: Die N/TERT-1-Zelllinie, eine immortalisierte, jedoch primärzellähnliche Keratinozyten-Zelllinie³¹⁴. In einer weiterführenden Studie und fast zeitgleich mit den Vance- und Bachovchin-Laboren, wurde eine inhibierende Interaktion von DPP9 mit NLRP1, und ebenso CARD8, beschrieben⁹⁹. Außerdem konnte so auch die Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms bei *autoinflammation with arthritis and dyskeratosis* (AIADK) erklärt werden: Eine Punktmutation in der Nähe des, durch die Autoproteolyse generierten, Neo-N-Terminus des UPA-CARD Fragments zerstört eine Interaktion von NLRP1 mit DPP9³¹⁵. In weiterer Folge konnten auch DPP9-assoziierte Mutationen identifiziert werden, welche eine Interaktion von NLRP1 mit DPP9 reduzieren und so zu einer NLRP1-Überaktivierung und Autoimmunerkrankung führen³¹⁶.

Mittlerweile konnten auch bei Patienten mit Asthma und *juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis* (JRRP) *gain-of-function*-Mutationen in NLRP1 ausfindig gemacht werden^{317,318}.

Des Weiteren sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit kein pathophysiologischer Aktivator des humanen NLRP1-Inflammasoms bekannt war. Bis zu Beginn dieser Arbeit konnte das endogene NLRP1-Inflammasom nur durch Inhibition von DPP8/9 aktiviert werden. Erst kürzlich jedoch wurde ein dem murinen NLRP1B ähnlicher Aktivierungsweg für humanes NLRP1 publiziert. Hier wurde gezeigt, dass die Spaltung von humanem NLRP1 am N-Terminus durch enterovirale 3C-Proteasen zu dessen Aktivierung durch funktionelle Degradation führt^{319,320}.

1.6.3 Humanes CARD8

Aufgrund der Homologie der CARD-Domäne von CARD8 (früher als Cardinal/TUCAN bezeichnet) mit der CARD-Domäne von Caspase-1 wurde das Protein schon früh im Jahr 2001 in einem immunologischen Kontext funktional untersucht und es wurde eine Rolle als Inhibitor des NF- κ B-Signalwegs festgestellt³²¹. Der C-terminale Teil von CARD8 dahingegen hat einen ähnlichen Aufbau zu humanem NLRP1 und murinem NLRP1B: Es besitzt eine FIIND-Domäne, welche von einer CARD gefolgt wird. Einzig der N-Terminus von CARD8 unterscheidet sich von den beiden NLRP1-Proteinen durch die Abwesenheit weiterer Domänen, stattdessen findet sich ein ungeordneter Bereich. Neben seiner anfänglichen Beschreibung als Inhibitor des NF- κ B-Signalwegs wurde auch eine Interaktion mit Caspase-1 beschrieben. In zwei unterschiedlichen Publikationen wurde dieser Interaktion eine entweder inhibierende oder aktivierende Rolle in der Prozessierung und dadurch Aktivierung von Caspase-1 durch CARD8 zugeschrieben^{191,322}. Etwas später wurde CARD8 auch eine inhibitorische Rolle in der NLRP3-Inflammasomaktivierung zugemessen^{323,324}. Eine richtungsweisende Studie in der Aufklärung der Funktion von CARD8 jedoch wurde erst 2018 publiziert: Hier konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von humanen akuten myeloischen Leukämie (AML)-Zelllinien, wie etwa der THP-1 Zelllinie, und primären AML-Zellen mit dem DPP8/9 Inhibitor VbP zu einer Inflammasomaktivierung führt²⁵⁰. Diese Aktivierung war jedoch, anders als bei murinen myeloischen Zellen oder humanen Keratinozyten unabhängig von NLRP1, sondern abhängig von CARD8. CARD8 wird ähnlich zu NLRP1 durch Interaktion mit DPP8/9 in Schach gehalten und eine Inhibition von DPP8/9 führt zu einer Freisetzung des C-terminalen UPA-CARD-Fragments und einer Inflammasomaktivierung, welche unabhängig von ASC ist^{325,326}. Durch strukturelle Studien konnte gezeigt werden, dass die CARD von CARD8 direkt mit Caspase-1 interagieren kann, während die CARD von NLRP1 nur mit der CARD von ASC interagiert und so das Adapter-Protein ASC für *downstream signaling* benötigt²⁴⁹. So kann die frühere Beobachtung, dass CARD8 direkt Caspase-1 aktivieren kann, erklärt werden. Eine weitere interessante Eigenschaft der CARD8-Aktivierung ist die Beobachtung, dass der ungeordnete Bereich am N-Terminus des Proteins eine wichtige Rolle in dessen Aktivierung spielt, denn ohne diesen Bereich führt eine VbP-Stimulation zu keiner CARD8-Inflammasomaktivierung³²⁷. Die genaue Funktionalität dessen ist aber noch nicht geklärt. Neben AML-Zellen kann das CARD8-Inflammasom auch noch in T-Zellen aktiviert werden und dort Pyroptose induzieren^{256,257}. Retrospektiv lassen sich so Beobachtungen verstehen, in denen ein Zelltod in Lymphozyten durch Inhibition von DPPs festgestellt werden konnte, der wiederum selbst durch Proteasominhibition inhibiert werden konnte³²⁸⁻³³⁰. Erst kürzlich wurde, analog zur Aktivierbarkeit von murinem NLRP1B durch Anthrax LF und der Aktivierbarkeit von humanem NLRP1 durch eine 3C-Protease, entdeckt, dass CARD8 durch eine HIV-Protease geschnitten und dadurch aktiviert werden kann³³¹. Interessant hierbei ist, dass die HIV-Protease normalerweise in Zellen nicht aktiv ist, sondern erst bei oder nach dem *budding* der viralen Partikel durch eine Dimerisierung aktiviert wird. Man kann die Protease jedoch schon vorzeitig durch nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) aktivieren, was zum Schneiden von intrazellulärem CARD8 und einer Pyroptose führt. Dieses Wissen könnte für therapeutische Zwecke verwendet werden, um mittels einer *shock-and-kill* Strategie, unter

Zuhilfenahme von NNRTIs, latente HIV-1 Reservoirre zu reduzieren und eine *viral clearance* zu erreichen.

2 Zielsetzung

Wie in der Einleitung beschrieben konzentrierte sich bis vor kurzem die meiste Erforschung des NLRP1-Inflammasoms auf das murine NLRP1B, da hierfür ein tatsächlicher Aktivator, Letalfaktor, schon früh entdeckt worden war. Aufgrund der Tatsache, dass NLRP1 unter einem enormen evolutionären Druck steht, ist das humane Ortholog aber sehr divergent und es ließen sich nur bedingt Schlussfolgerungen aus der Erforschung des murinen Proteins auf das humane Protein übertragen. Außerdem vollzog sich die Erforschung des murinen NLRP1B-Proteins vor allem in Zellen myeloischer Herkunft, da diese im Mittelpunkt der Inflammasomforschung stehen und NLRP1B in diesen Zellen aktiviert werden kann. Diesem Dogma entzieht sich jedoch das humane NLRP1, welches vorwiegend in Keratinozyten exprimiert wird und so bis kürzlich schwer unter endogenen Bedingungen zu studieren war. Daher war es Zielsetzung dieser Arbeit, die vor kurzem als Inflammasom-kompetent beschriebene immortalisierte, jedoch primärzellähnliche Keratinozyten-Zelllinie N/TERT-1 als passendes Modell für eine endogene Aktivierung des Inflammasom-Sensors humanes NLRP1 heranzuziehen. Darüber hinaus lieferten zwei weitere neue Entdeckungen die Bausteine für eine adäquate Erforschung des humanen NLRP1-Inflammasoms unter endogenen Bedingungen. Dies ist einerseits die Entdeckung, dass VbP ein spezifischer Aktivator von FIIND-aufweisenden Proteinen ist und somit das erste Mal das humane NLRP1-Protein in einem endogenen Rahmen überhaupt spezifisch aktiviert werden konnte. Andererseits ist es die Entwicklung des Genomeditierungsverfahren CRISPR/Cas9, welches verwendet werden kann um mittels Cas9/gRNA Ribonukleoproteinen (RNPs) eine einfache sowie effektive genetische Manipulation von primärzellähnlichen Zellen durchzuführen, um die Funktion von Proteinen zu studieren. Mit diesen Bedingungen war die Zielsetzung dieser Arbeit, einen (patho)physiologischen Aktivator des humanen NLRP1-Inflammasoms zu identifizieren und in weiterer Folge zu charakterisieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien steriler sowie unsteriler Natur waren von Corning, Eppendorf, Greiner, Sarstedt, Thermo Fisher Scientific oder TPP.

3.1.2 Antikörper

Antikörper	Verwendete Konzentration	Bezugsquelle	Produktnummer
α -SFV Helikase	1:1000	A. Merits	N/A
α -SFV Kapsid	1:1000	A. Merits	N/A
α -NLRP1	250 ng/ml	Biologend	9F9B12
α -ASC	500 ng/ml	Adipogen	AL177
α -Caspase-1	250 ng/ml	Adipogen	Bally-1
α -IL-1 β	100 ng/ml	R&D Systems	AF-201-NA
α -MAVS	100 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	sc-166583
α -PKR	180 ng/ml	Proteintech	20499
α -RIPK3	1:2000	Cell Signaling Technology	13526
α -RNase L	100 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	74405
α -mCherry	500 ng/ml	Novusbio	NBP2-25157
α -CARD8	500 ng/ml	Abcam	ab24186
α -GSDMD	1:2000	Novusbio	NBP2-33422
α -His-tag-HRP	1:2000	Milteny Biotec	130-092-785
Esel α -Ziegen-IgG-HRP	80 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020
Ziege α -Maus-IgG-HRP	80 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005
Ziege α -Kaninchen-IgG-HRP	80 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004
α - β -Aktin-HRP	80 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
α -dsRNA Antikörper (J2)	2.5 μ g/ml	SCICONS	10010200
Ziege α -Maus-IgG Alexa Fluor 488	4 μ g/ml	Thermo Fisher Scientific	A11001

Tabelle 1: Antikörper und Verwendung.

3.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Bezugsquelle
DH5 α	AG Hornung
BL21 pRIL	Agilent Technologies

Tabelle 2: Bakterienstämme.

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Bezugsquelle
5x Phusion GC Puffer	Thermo Fisher Scientific
Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten	Sigma-Aldrich
Agar	Carl Roth
Ampicillin	Carl Roth
ATP	Carl Roth

Bromophenolblau	Carl Roth
BSA	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Carl Roth
Chloroform	Sigma-Aldrich
DMSO	Carl Roth
DTT	Carl Roth
EDTA	VWR
Essigsäure	Carl Roth
EtOH	Sigma-Aldrich
GeneJuice	Merck
<i>GeneRuler</i> 1 kb Plus	Thermo Fisher Scientific
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth
H ₂ O (abgefüllt steril)	Braun
H ₂ O (DEPC-behandelt)	Thermo Fisher Scientific
H ₂ O (RNase-frei)	Thermo Fisher Scientific
H ₂ SO ₄	Carl Roth
HCl	VWR
Hefeextrakt	Thermo Fisher Scientific
HEPES	Carl Roth
HisTrap HP Säule	GE Healthcare
HiTrap Heparin HP Säule	GE Healthcare
Imidazol	Merck
IPTG	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
K ₂ HPO ₄	Merck
Kaliumacetat	VWR
Kanamycin	Carl Roth
KCl	VWR
KH ₂ PO ₄	Merck
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Carl Roth
MES	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	Merck
Milchpulver	Carl Roth
MnCl ₂	Carl Roth
MOPS	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄	Merck

NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaHCO ₃	Carl Roth
NaOH	VWR
Natriumacetat	Merck
NP40S	Sigma-Aldrich
Pierce ECL WB substrate	Thermo Fisher Scientific
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
RbCl	Carl Roth
RNaseA	Thermo Fisher Scientific
SD200 10/300 Säule	Thermo Fisher Scientific
SDS	Serva
TMB-Substrat-Reagenz für ELISA	BD Biosciences
Tris	Carl Roth
Triton X	Sigma-Aldrich
Trypton	Thermo Fisher Scientific
Tween-20	Carl Roth

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.

3.1.5 Enzyme

Für Restriktionsansätze wurde der *FastDigest Green Buffer (10x)* verwendet (Thermo Fisher Scientific #B72).

Enzym	Bezugsquelle	Produktnummer
NheI	Thermo Fisher Scientific	FD0974
BamHI	Thermo Fisher Scientific	FD0054
SspI	Thermo Fisher Scientific	FD0774
BclI	Thermo Fisher Scientific	FD0724
BglII	Thermo Fisher Scientific	FD0083
XbaI	Thermo Fisher Scientific	FD0684

Tabelle 4: Restriktionsenzyme.

3.1.6 Oligonukleotide

Klonierter Vektor	PCR Produkt	Orientierung	Oligonukleotid
pFUGW_hsNLRP1_Blast	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-TTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGCTGGCGGAGCCTGGGG-3'
		reverse	5'-GTGGTGGCGGCGATCAGGTCTCTGTGTTCCACCAAGGCTCCACACC-3'
	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-GACCTGATGCCCCCACCACCTGATCCCCCCCAGGATGCCGTACCTCCACTCTGGATGCC-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_FLAG_hsNLRP1_Blast	Erste PCR	forward	5'-CGAGCAGCTAGCATGGATTACAAGATGATGATGATAAAGCTGGCGGAGCTGG-3'
		reverse	5'-CTGCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
	Zweite PCR	forward	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGATTACAAG-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_mScarlet_hsNLRP1(ΔPYD)_Blast	mScarlet (Fragment)	forward	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAG-3'
		reverse	5'-TGTAGGGGAATGAGGAGATTGTACAGCTGCTCCATTCCG-3'
	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-GAGCTGTACAAATCTCCCTATTCCCTACAGCCA-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_hsNLRP1(S1213A)_Blast	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-TTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGCTGGCGGAGCCTGGGG-3'
		reverse	5'-GGACTCCCAAGGGGGCGAAGCTGG-3'
	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-CCAGCTTCGCCCTTGGGAGTCC-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_hsNLRP1(Δ1-734)_Blast	NLRP1	forward	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGCCATTTCGAAGAAATGGG-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_hsNLRP1(WA_mut)_Blast	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-TTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGCTGGCGGAGCCTGGGG-3'
		reverse	5'-CCAGTGTTCGAGCGCAATCCAGCAGCCCCCTCGAC-3'
	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-AGGGGGTCTGCTGAATTGGCTGCAACACTGGCA-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_hsNLRP1(WB_mut)_Blast	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-TTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGCTGGCGGAGCCTGGGG-3'
		reverse	5'-GCGGCTACACAGCGAGGATGAAGGACAGCCGCTC-3'
	hsNLRP1 (Fragment)	forward	5'-CCTCGCTGTGTAGCCGCTCCAGGATGGTCTTCAGGAGCC-3'
		reverse	5'-CTGCCTTGGAAAAGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTC-3'
pFUGW_mmNLRP1b_Blast	mmNLRP1B	forward	5'-GCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGAAGAATCCCAACCAAG-3'
		reverse	5'-GCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGGATCCCAAGAGACCCAC-3'
	mmNLRP1b_Blast	forward	5'-GCAGTAGCATGGATTACAAGATGATGATGATAAAGAAGATCCCAACCAAGCAGAA-3'
		reverse	5'-GCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGGATCCCAAGAGACCCAC-3'
pFUGW_FLAG_mmNLRP1b_Blast	Erste PCR	forward	5'-GCAGTAGCATGGATTACAAGATGATGATGATAAAGAAGATCCCAACCAAGCAGAA-3'
		reverse	5'-GCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGGATCCCAAGAGACCCAC-3'
	Zweite PCR	forward	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGCATGGATTACAAGATGATG-3'
		reverse	5'-GCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGGATCCCAAGAGACCCAC-3'
pFUGW_hsCARD8_Blast	hsCARD8	forward	5'-GCAGGTCGACTCTAGTTCGAGCAGTAGGAAAAAAGAGTGTCCAGAAAAAAGCTCA-3'
		reverse	5'-GCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGGATCCCAAGAGACCCAC-3'
pFUGW_mScarlet_Xbal-Bsh1I_mTurq2_Blast	mScarlet	forward	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGTTCGAG-3'
		reverse	5'-TCCACCGTTAAATTAATCTAGAGCCCCCTCCGCTTTGTACAGCTCGTCCATTCCG-3'
	mTurquoise2	forward	5'-GGGCTCTAGAATAATTAATCAACCGTGGAGGCGGGGCTCCGTGAGCAAGGGCAGGAGG-3'
		reverse	5'-AGGCGCAACCCCAACCCGGATCTCAGTGTACAGCTCGTCCATGCGG-3'
pFastBac_His6_MBP_TEV_Strep-tag_hsNLRP1(ISOFORM-5)_HA	hsNLRP1	forward	5'-TACTTCCAATCCAATGATGAGGACACCCCAAGTTCGAGAAGGCTGGCGGAGCCTGGGG-3'
		reverse	5'-TTATCCACTTCCAATGTTATCAGGCGTAGTCCGGCACGTCGTAGGGGTAGTATCTCTGCGCTCTCTGTGAC-3'
pET_His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT(230-790)	Erste PCR	forward	5'-AACCTGTACTTCCAATCCAATGATTATAAAGATGATGATGATAAAGGAGGCCCCATGG-3'
		reverse	5'-TCGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGACCCACCTGAACAGGACTACC-3'
	Zweite PCR	forward	5'-GATCGAGGAAAACCTGTACTTCCAATCCAATGATTATAAAGATGA-3'
		reverse	5'-TCGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGACCCACCTGAACAGGACTACC-3'
pET_His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT-LRR(230-994)	Erste PCR	forward	5'-AACCTGTACTTCCAATCCAATGATTATAAAGATGATGATGATAAAGGAGGCCCCATGG-3'
		reverse	5'-CGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGGGGTCATCACACTTGGTTTCC-3'
	Zweite PCR	forward	5'-GATCGAGGAAAACCTGTACTTCCAATCCAATGATTATAAAGATGA-3'
		reverse	5'-CGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGGGGTCATCACACTTGGTTTCC-3'
pET_His6-GST_TEV_hsNLRP1_LRR(791-994)	hsNLRP1	forward	5'-CGAGGAAAACCTGTACTTCCAATCCAATCAGTACAGATGCTATTGGC-3'
		reverse	5'-CGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGGGGTCATCACACTTGGTTTCC-3'
pET_His6-GST_TEV_hsNLRP1_LRR(722-1076)	hsNLRP1	forward	5'-CGAGGAAAACCTGTACTTCCAATCCAATTTGTACGAGACTCGGAACAAAACGT-3'
		reverse	5'-CGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGGGGTCATCACACTTGGTTTCC-3'
	Erste PCR	forward	5'-TCCAATCCAATGATTATAAAGATGATGATGATAAAGAAGATCCCAACCAAGCAGA-3'
		reverse	5'-GTCGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGGGGACCATCATGTGTGGCATCCA-3'
Zweite PCR	forward	5'-CGAGGAAAACCTGTACTTCCAATCCAATGATTATAAAGATGATGATGATAAAGAAGATC-3'	
	reverse	5'-GTCGACGGCGCTCGAATTCGGATCTCAGGGGACCATCATGTGTGGCATCCA-3'	

Tabelle 5: Oligonukleotide für Klonierungszwecke (alle von IDT).

3.1.7 Plasmide

Plasmide	Bezugsquelle	Verwendung
pFUGW_NB_Blast	AG Hornung	Leerer Vektor
pFUGW_mScarlet	AG Hornung	Kodierend für das Fluorophor mScarlet
pmTurquoise2-Mito	AG Bonhoeffer	Kodierend für das Fluorophor mTurquoise2
pNLRP1.Myc	AG Kufner	Kodierend für humanes NLRP1 (cDNA Klon MGC:57544, Isoform 5)

pFUGW_hsNLRP1_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes NLRP1 (ähnlich Isoform 1)
pFUGW_FLAG_hsNLRP1_Blast	Diese Studie	Kodierend für FLAG-markiertes humanes NLRP1 (ähnlich Isoform 1)
pFUGW_mScarlet_hsNLRP1(Δ PYD)_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes NLRP1 (ähnlich Isoform 1, aber ohne N-terminale PYD)
pFUGW_hsNLRP1(S1213A)_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes NLRP1 (ähnlich Isoform 1) mit S1213A Mutation
pFUGW_hsNLRP1(Δ 1-734)_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes NLRP1 (Isoform 6)
pFUGW_hsNLRP1(WA_mut)_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes NLRP1 (ähnlich Isoform 1) mit dreifach Alanin Mutante im Walker A-Motiv
pFUGW_hsNLRP1(WB_mut)_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes NLRP1 (ähnlich Isoform 1) mit dreifach Alanin Mutante im Walker B-Motiv
pFUGW_mmNLRP1b_Blast	Diese Studie	Kodierend für murines NLRP1B (<i>identifizier</i> : Q2LKW6)
pFUGW_FLAG_mmNLRP1b_Blast	Diese Studie	Kodierend für FLAG-markiertes murines NLRP1B (<i>identifizier</i> : Q2LKW6)
pFUGW_hsCARD8_Blast	Diese Studie	Kodierend für humanes CARD8 (Isoform T60, <i>identifizier</i> : Q9Y2G2-5)
pFUGW_mScarlet_XbaI-BshTI_mTurq2_Blast	Diese Studie	Kodierend für ein Fusionsprotein aus den Fluorophoren mScarlet und mTurquoise2
pRP_ASC_mCherry	AG Hornung	Kodierend für ein Fusionsprotein aus dem Adapter ASC und dem Fluorophor mCherry
pMDLg/pRRE	AG Hornung	Helferplasmid zur Generierung lentiviraler Partikel
pRSV-Rev	AG Hornung	Helferplasmid zur Generierung lentiviraler Partikel
pCMV-VSV-G	AG Hornung	Helferplasmid zur Generierung lentiviraler sowie retroviraler Partikel
pCMV-Gag-Pol	AG Hornung	Helferplasmid zur Generierung retroviraler Partikel
pFastBac_His6_MBP_N10_TEV_4C	AG Gradia	Leerer Vektor
pET_His6_MBP_TEV_1M	AG Gradia	Leerer Vektor
pET_His6_GST_TEV_1G	AG Gradia	Leerer Vektor
pFastBac_His6_MBP_TEV_Strep-tag_hsNLRP1(isoform-5)_HA	Diese Studie	Zur rekombinanten Produktion von His6_MBP_TEV_Strep-tag_hsNLRP1(Isoform-5)_HA in Insektenzellen
pET_His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT(230-790)	Diese Studie	Zur rekombinanten Produktion von His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT(230-790) in <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)
pET_His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT-LRR(230-994)	Diese Studie	Zur rekombinanten Produktion von His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT-LRR(230-994) in <i>E. coli</i>

pET_His6-GST_TEV_hsNLRP1_LRR(791-994)	Diese Studie	Zur rekombinanten Produktion von His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_LRR(791-994) in <i>E. coli</i>
pET_His6_GST_TEV_hsNLRP1_LRR(722-1076)	Diese Studie	Zur rekombinanten Produktion von His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_LRR(72-1076) in <i>E. coli</i>
pET_His6_MBP_TEV_FLAG_mmNLRP1b(Δ FIIND_ Δ CARD)	Diese Studie	Zur rekombinanten Produktion von His6_MBP_TEV_FLAG_mmNLRP1B(Δ FIIND_ Δ CARD)

Tabelle 6: Verwendete und generierte Plasmide.

3.1.8 Rekombinante Proteine

Protein	Bezugsquelle	Generiert mit Plasmid
NLRP1 Δ CARD (human)	Diese Studie	pFastBac_His6_MBP_TEV_Strep-tag_hsNLRP1(isoform-5)_HA
NACHT (human)	Diese Studie	pET_His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT(230-790)
NACHT-LRR (human)	Diese Studie	pET_His6_MBP_TEV_FLAG_hsNLRP1_NACHT-LRR(230-994)
LRR(s) (human)	Diese Studie	pET_His6-GST_TEV_hsNLRP1_LRR(791-994)
LRR(l) (human)	Diese Studie	pET_His6_GST_TEV_hsNLRP1_LRR(722-1076)
NACHT-LRR (murin)	Diese Studie	pET_His6_MBP_TEV_FLAG_mmNLRP1b(Δ FIIND_ Δ CARD)
MBP	MPI für Biochemie, <i>Core Facility</i>	N/A
T7 RNA Polymerase	Diese Studie	N/A

Tabelle 7: Verwendete und generierte rekombinante Proteine.

3.1.9 Medien und Puffer

Medium/Puffer	Herstellung
LB Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton 10 g NaCl auf 1 L mit H ₂ O auffüllen Autoklavieren
TB Medium	24 g Hefeextrakt 20 g Trypton 4 ml Glycerin auf 900 ml mit H ₂ O auffüllen Autoklavieren Vor Gebrauch werden 100 ml steriler Phosphat-Puffer (0.17 M KH ₂ PO ₄ , 0.72 M K ₂ HPO ₄) hinzugefügt.
LB Agar	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Agar auf 1 L mit H ₂ O auffüllen

	Autoklavieren
Mini-Prep Puffer P1	50 mM Tris pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Mini-Prep Puffer P2	200 mM NaOH 1% SDS
Mini-Prep Puffer N3	4.2 M Guanidinhydrochlorid 0.9 M Kaliumacetat pH 4.8
Mini-Prep Puffer PE	10 mM Tris pH 7.5 80% Ethanol
TAE Puffer	40 mM Tris pH 8.0 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
10x PBS	1.37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
PBS-T Puffer	1x PBS 0.5% Tween-20
TFBI	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 5.8 sterilfiltriert
TFBII	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 6.8 sterilfiltriert
2x Laemmli Proben-Puffer	150 mM Tris-HCl pH 6.8 200 mM DTT 20% Glycerin 4% SDS 0.01% Bromophenolblau
6x Laemmli Proben-Puffer	450 mM Tris-HCl pH 6.8 600 mM DTT 60% Glycerin 12% SDS 0.03% Bromophenolblau
MES Laufpuffer	50 mM MES 50 mM Tris Base 0.1% SDS 1 mM EDTA
Glycerinlösung zum Wegfrieren von Bakterien	50% Glycerin in H ₂ O sterilfiltriert
Coomassie Färbelösung	45% Ethanol

	10% Essigsäure 0.1% Coomassie R-250
Coomassie Entfärbelösung	20% Ethanol 10% Essigsäure
MACS Puffer	2 mM EDTA 2% FCS in PBS
PBST	1 L 10x PBS 9 L H ₂ O 5 ml Tween-20
Western Blot Transfer Puffer	200 ml 10x Tris-Glycin Puffer 400 ml Ethanol (EtOH) 1400 ml H ₂ O
10x Tris-Glycin Puffer	290 g Tris 1440 g Glycin auf 10 L mit H ₂ O auffüllen

Tabelle 8: Puffer und Zusammensetzungen.

3.1.10 Antibiotika

Antibiotikum	Lösung
Ampicillin	100 mg/ml in 50% EtOH
Kanamycin	30 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100% EtOH

Tabelle 9: Antibiotika und Konzentrationen.

3.1.11 Geräte und Ausstattung

Gerät/Ausstattung	Bezugsquelle
PCR Cycler	Bio-Rad
Agarosegelkammer	PeqLab
Power supplies	Bio-Rad
Thermoshaker	Eppendorf
NanoDrop	PeqLab
Biomek FX ^P Roboter	Beckman Coulter
Absorptions-Lesegerät	Epoch und Tecan
Durchflusszytometer FACS Melody	BD Biosciences
Mikroskop Observer Z1	Zeiss
Zentrifuge (5920R, 5424R, 5810R)	Eppendorf
Fusion Fx	Vilber
Chemidoc Imaging System	Bio-Rad
ÄKTA Purifier	ÄKTA
HiLoad 16/600 Superdex 200-pg Säule	GE Healthcare Life Sciences
HiTrap HP Säule	GE Healthcare Life Sciences
HiTrap Heparin HP Säule	GE Healthcare Life Sciences

Tabelle 10: Geräte.

3.1.12 Software und Algorithmen

Software	Bezugsquelle
Adobe Illustrator	Adobe Systems
SnapGene	GSL Biotech LLC
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.

Tabelle 11: Software.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Herstellung von chemokompetenten *E. coli*

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* (DH5 α oder BL21 pRIL) wurde wie 2013 von Rachel Green und Elizabeth J. Rogers beschrieben durchgeführt³³².

3.2.2 PCR

Zur Generierung von *inserts* für Klonierungen sowie zur Generierung von In-vitro-Transkriptionsvorlagen wurden PCRs nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Agarosegelelektrophorese wurde eine 0.8% Agarose Gewicht/Volumen (w/v) (Biozym #840004) Lösung in 1 x TAE aufgeschmolzen, nach kurzem Abkühlen wurde 0.001% Volumen/Volumen (v/v) *Serva DNA stain G* (Serva #39803) hinzugefügt und das Gel anschließend gegossen. Nach Erhärten des Gels wurden Proben mit Ladefarbstoff (Thermo Fisher Scientific #B72) versetzt, gemeinsam mit einer DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific #10787018) auf das Gel aufgetragen und bei 125V für 30-60 min laufen gelassen.

3.2.4 Gelaufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und geschnittenen Vektoren aus Agarosegelen wurden mittels eines Skalpells die gewünschten Fragmente herausgeschnitten. Diese wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen #28706) aufgereinigt und anschließend verwendet.

3.2.5 Klonierungen

Zum Linearisieren des Vektors wurden 10 μ g Plasmid-DNA in einem in Tabelle 12 beschriebenen Ansatz für 3 Stunden bei 37°C verdaut und anschließend die Restriktionsenzyme für 5 Minuten bei 80°C hitzeinaktiviert.

Menge	Komponente
10 μ g	Plasmid DNA (Vektor)
1 μ l	Enzym 1
1 μ l	Enzym 2
4 μ l	10x <i>Fast Digest Green Buffer</i>
40 μ l	Gesamt

Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Linearisierung eines Plasmids.

Anschließend wurden verdaute Vektoren und PCR-amplifizierte *inserts* über eine Agarosegelelektrophorese und Gelaufreinigung aufgereinigt und mittels *Gibson Assembly* kloniert. Dazu wurde der in Tabelle 13 beschriebene Reaktionsansatz bei 50°C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde eine Transformation durchgeführt. Zur Generierung von Mutanten, wurden

überlappende Fragmente mit den entsprechenden Mutationen generiert und mittels Gibson Klonierung assembliert.

Menge	Komponente
15 µl	Gibson Master Mix
50-100 ng	Vektor
1:2-1:3 Molares Verhältnis Vektor: <i>insert</i>	<i>insert</i> 1 (<i>insert</i> 2,...)
20 µl	Gesamt

Tabelle 13: Reaktionsansatz für eine *Gibson assembly*.

Bei Durchführung einer konventionellen Restriktionsklonierung, wurde das komplette Eluat des *inserts* nach der Gelaufreinigung mit Restriktionsenzymen verdaut (Ansatz gleich zum Verdau eines Vektors) und im Folgenden mittels eines *PCR Purification Kits* (Qiagen #28106) aufgereinigt. Anschließend wurde eine Ligation mittels T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific #EL0011) durchgeführt und für 15 min bei RT, 15 min 16 °C, 15 min bei RT und 15 min 16 °C inkubiert. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in Tabelle 14 beschrieben.

Menge	Komponente
50-100 ng	Vektor
1:3 Molares Verhältnis Vektor: <i>insert</i>	<i>insert</i>
2 µl	T4 DNA Ligase Puffer
1 µl	T4 DNA Ligase
20 µl	Gesamt

Tabelle 14: Reaktionsansatz für eine Ligation mit T4-Ligase.

3.2.6 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden *E. coli* DH5α oder BL21 pRIL auf Eis aufgetaut und danach 4 µl Gibsonreaktionsmix, Ligationsmix oder Plasmid-DNA zu den Bakterien hinzugefügt. Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 sec bei 42 °C hitzegeschockt. Nach 2 min Inkubationszeit auf Eis wurde 180 µl LB Medium hinzugefügt und die Bakterien für 30 – 60 min bei 37°C und 600 rpm geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert (Ampicillin: 100 µg/ml, Kanamycin: 30 µg/ml, Chloramphenicol: 30 µg/ml).

3.2.7 Plasmid Isolation aus *E. coli*

Zur Plasmid Isolation aus *E. coli* wurden für eine Miniprep selbstgemachte Puffer P1, P2, N3 und Mini Spin Säulen (Epoch Life Science) nach dem Protokoll des QIAprep Spin Miniprep Kits verwendet. Für Maxipreps wurde das Kit (Invitrogen #K210017) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.8 Sanger Sequenzierung

Sanger Sequenzierungen wurden nach dem Protokoll des Anbieters entweder bei Eurofins Genomics oder am Campus der LMU durchgeführt.

3.2.9 Herstellung von kurzen dsRNA und dsDNA Fragmenten

Zur Erzeugung von kurzen dsRNA- beziehungsweise dsDNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wurden komplementäre Oligonukleotide (IDT) in Nuklease-freiem Duplexpuffer (IDT #11-01-03-

01) bei 95°C für 4 min hybridisiert und anschließend auf RT mit einem Dekrement von -1°C/35 s abgekühlt. Die Sequenzen sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Produkt	Sequenz
40-mer dsDNA	5'-GGAGAACTTCATGCCCTTCGGATAAGGACTCGTATGTACC-3'
	5'-GGTACATACGAGTCCTTATCCGAAGGCATGAAGTTCTCC-3'
20-mer dsDNA	5'-GATAAGGACTCGTATGTACC-3'
	5'-GGTACATACGAGTCCTTATC-3'
40-mer dsRNA	5'- rGrGrArGrArArCrUrUrCrArUrGrCrCrCrUrUrCrGrArUrArArGrGrArCrUrCrGrUr ArUrGrUrArCrC-3'
	5'- rGrGrUrArCrArUrArCrGrArGrUrCrCrUrUrArUrCrCrGrArArGrGrCrArUrGrA rArGrUrUrCrUrCrC-3'
20-mer dsRNA	5'-rGrArUrArArGrGrArCrUrCrGrUrArUrGrUrArCrC-3'
	5'-rGrGrUrArCrArUrArCrGrArGrUrCrCrUrUrArUrC-3'
15-mer dsRNA	5'-rGrArUrArArGrGrArCrUrCrGrUrArU-3'
	5'-rArUrArCrGrArGrUrCrCrUrUrArUrC-3'
10-mer dsRNA	5'-rGrArUrArArGrGrArCrU-3'
	5'-rArGrUrCrCrUrUrArUrC-3'

Tabelle 15: Oligonukleotide zur Generierung kurzer dsDNA- und dsRNA-Fragmente.

3.2.10 Herstellung von IVT4

IVT4 wurde ähnlich wie zuvor beschrieben generiert³³³. Kurz gesagt wurden die Oligonukleotide (IDT) in nukleasefreiem Duplexpuffer bei 95°C für 3 min hybridisiert und anschließend auf RT mit einem Dekrement von -1°C/35 s abgekühlt. Die Sequenzen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Produkt	Sequenz
IVT4- Vorlage	5'-TTGTAATACGACTCACTATAGGGACGCTGACCCAGAAGATCTACTAGAAATAGTA GATCTTCTGGGTCAGCGTCCC-3'
	5'-GGACGCTGACCCAGAAGATCTACTATTTCTAGTAGATCTTCTGGGTCAGCGTCCC TATAGTGAGTCGTATTACAA-3'

Tabelle 16: Oligonukleotide zur Generierung eines *templates* für die IVT4-Generierung.

Die Transkriptionsreaktion erfolgte bei 37°C für 6 Stunden in Transkriptionspuffer (NEB #B9012), ergänzt mit je 2.5 mM NTPs (Jena Bioscience #NU-1014S), 1 U/µl RiboLock RNase-Inhibitor (Thermo Fisher Scientific #E00382), 4 mM DTT (Sigma-Aldrich #D0632), 25 mM MgCl₂, 3 µM DNA-Template und 500 nM T7 RNA-Polymerase (*in-house* gereinigt). Anschließend wurde die DNA mit 0.05 U/µl DNase I (Thermo Fisher Scientific #EN0525) verdaut und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Säulenaufreinigung (Sigma-Aldrich #11814427001).

3.2.11 In-vitro-Transkription

Zur Erzeugung von Transkripten unterschiedlicher Länge wurden PCR-Produkte durch Amplifikation von Cas9-Fragmenten aus dem lentiCas9-Blast-Plasmid (Addgene Plasmid #52962) mit GoTaq Polymerase (Promega #M3001) erzeugt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 18 beschrieben und die Zyklusbedingungen für die PCR sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Zur Generierung von ssRNA wurde ein T7-Promoter durch die PCR eingefügt (*universal_ssRNA_F*), zur Generierung von dsRNA wurden flankierende T7-Promotorstellen durch die PCR eingefügt (*universal_dsRNA_F*). Die ungefähre Länge der Transkripte wurde durch den reversen Primer definiert. Die dazu verwendeten Primer (IDT) sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Oligonukleotid	Sequenz
250bp_RNA_R	5'- CCACCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAAGGTTCTCTTCA GCCGGGTGG-3'
500bp_RNA_R	5'- CCACCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAAGGTCGGCCTTG TCGG-3'
1000bp_RNA_R	5'- CCACCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACCTTGGTGATC TCGGTGTTCATC-3'
2000bp_RNA_R	5'-CCACCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAA GCTGCTTCATCACTTTGTCGTCGA-3'
2500bp_RNA_R	5'-CCACCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAA CTGCAGGTAGTACAGGTACAGCTTC-3'
universal_dsRNA_F	5'- CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAAGACAAGAAGTACAGC ATCGGCCTGG-3'
universal_ssRNA_F	5'-GACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGG-3'

Tabelle 17: Oligonukleotide zur Generierung eines *templates* für IVTs.

Menge	Komponente
10 µl	5xGoTaq <i>reaction buffer</i>
1 µl	dNTPs (10 mM) (Genaxxon #M3015.4100)
2.5 µl	<i>forward primer</i> (10 µM)
2.5 µl	<i>reverse primer</i> (10 µM)
0.3 µl	GoTaq Polymerase
10 µl	<i>template</i> (1 ng/µl)
23.7 µl	Wasser
50 µl	Gesamt

Tabelle 18: Reaktionsansatz zur PCR.

Temperatur	Dauer	Wiederholungen
94°C	1 min	/
94°C	20 sec	x 30
60°C	20 sec	
72°C	1-3 min (1 min/1 kb)	/
72°C	3 min	

Tabelle 19: Zyklusbedingungen für die PCR.

Drei Mikroliter des PCR-Produkts (~600 ng) wurden direkt für die In-vitro-Transkription (IVT) in einem Reaktionsmix bestehend aus Transkriptionspuffer (NEB), ergänzt mit je 2.5 mM NTPs, 1 U/µl RiboLock RNase-Inhibitor, 4 mM DTT und 500 nM T7 RNA-Polymerase verwendet und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 20 beschrieben. Anschließend wurde die DNA mit 0.05 U/µl DNase I verdaut und das IVT-Produkt durch gleichzeitige Zugabe von 0.05 U/µl FastAP (Thermo Fisher Scientific #EF0651) dephosphoryliert, indem eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Die RNA wurde bei 95°C für 3 min hybridisiert, mit einer Dekrementierung von -1°C/35 s auf RT abgekühlt und anschließend präzipitiert.

Menge	Komponente
3 µl	PCR Produkt
2 µl	<i>transcription buffer</i> (NEB)
2 µl	NTP mix (25 mM jeweils)
0.5 µl	Ribolock (ThermoFisher Scientific #E00382)
0.8 µl	DTT (100 mM)
2 µl	T7 RNAP (<i>home-made</i>)
9.7 µl	RNase-freies Wasser (ThermoFisher Scientific #AM9915G)
20 µl	Gesamt

Tabelle 20: Reaktionsansatz zur IVT.

3.2.12 RNA Präzipitation

Zur Präzipitation der RNA wurden die Proben mit einem Volumen 5 M Ammoniumacetat (Thermo Fisher Scientific #AM9070G) und fünf Volumen reinem EtOH gemischt. Nach Inkubation der Proben bei -20°C über Nacht wurde die Nukleinsäure durch Zentrifugation bei 22.000 g für 30 min bei 4°C ausgefällt. Die Pellets wurden einmal mit eiskaltem 75%igem EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in Nuklease-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific #AM9915G) resuspendiert.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Viren

Virus	Bezugsquelle	Bezeichnung
Herpes Simplex Virus 1 Stamm F17+	A. Pichlmair	Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)
Modified Vaccinia Ankara, klonales Isolat F6	G. Sutter	Modified Vaccinia Ankara (MVA)
Semliki Forest Virus	A. Pichlmair	Semliki Forrest Virus (SFV)
Attenuierter Masernvirus vac2-GFP	K. Conzelmann	Masernvirus (MV)

Tabelle 21: Viren.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit Viren mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 5 infiziert.

3.3.2 Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Spezifikation
HEK293T (293T)	ATCC®CRL-3216	Entstanden aus Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen
N/TERT-1	J. Rheinwald	Entstanden durch Immortalisierung von humanen primären Keratinozyten durch Transduktion mit einem TERT Transgen sowie durch spontanen Verlust von p16 ^{INK4a} Expression
HBEC3-KT	Evercyte	Entstanden durch Immortalisierung von humanen primären Bronchial-Epithel Zellen durch Transduktion mit einem TERT sowie cdk-4 Transgen
Primäre normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)	PromoCell	Primäre normale, humane, epidermale Keratinozyten aus der Vorhaut eines juvenilen Einzelspenders
THP-1 <i>CARD8</i> ^{-/-}	Linder, et al. ²⁵⁶	Monozytäre Leukämie-Zelllinie

Tabelle 22: Zelllinien.

3.3.3 Kultivierung

HEK293T (293T) Zellen wurden in DMEM (hoher Glukosegehalt, Thermo Fisher Scientific #41965062) kultiviert, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Thermo Fisher Scientific #10270106), 1 mM Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific #11360088) und 1% Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific #15140163). N/TERT-1-Zellen wurden in einer 1:2-Mischung aus Ham's F12 (Thermo Fisher Scientific #11765054) und DMEM (hoher Glukosegehalt, kein Glutamin, kein Kalzium Thermo Fisher Scientific #21068028) kultiviert, ergänzt mit 1% nicht-essenziellen Aminosäuren (Thermo Fisher Scientific #11140050), 0.5% EpiLife *defined growth supplement* (Thermo Fisher Scientific #S0125), 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE) (Thermo Fisher Scientific #13028014), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (MPI für Biochemie, *Core Facility*, München), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich #H0887), 2 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific #35050061), 0.1 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich #C7902), und 1% Penicillin-Streptomycin. HBEC3-KT-Zellen (Evercyte) wurden in KSFM (Thermo Fisher Scientific #17005042) kultiviert, das mit 50 µg/ml BPE, 5 ng/ml EGF und 1% Penicillin-Streptomycin ergänzt wurde. Für Experimente wurden HBEC3-KT in dem oben beschriebenen N/TERT-1-Medium subkultiviert. NHEK (PromoCell #PC-NHEK-STARTER) wurden in Keratinozyten-Wachstumsmedium (PromoCell) kultiviert. THP-1-Zellen wurden in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific #21875091) kultiviert, das mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin ergänzt wurde. Für die Makrophagen-Differenzierung wurden THP-1-Zellen über Nacht (16 Stunden) mit 100 ng/ml PMA (Enzo Life Sciences #BML-PE160) behandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS (Thermo Fisher Scientific #14190169) gewaschen, mit PBS + 2 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific #15575020) abgelöst und 8×10⁴ Zellen pro *well* einer 96-*well*-Platte ausgesät. Die THP-1-Zellen wurden am folgenden Tag stimuliert. Alle Zelllinien wurden vor Beginn der Experimente auf Mykoplasma-Kontaminationen getestet. Alle Zelllinien wurden in FCS mit 10% DMSO weggefroren.

3.3.4 Isolation von primären Monozyten

Humane Monozyten wurden aus PBMCs von gesunden, einverstandenen und informierten Thrombozytenspendern unter Verwendung von CD14-Mikrobeads (Miltenyi Biotec #130-050-201) isoliert. Von allen Probanden wurde eine informierte Zustimmung gemäß der Deklaration von Helsinki und die Genehmigung der Ethikkommission (Genehmigungsnummer: 19-238) der Ludwig-Maximilians-Universität (München, Deutschland) eingeholt. Humane primäre Monozyten wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 2.5% Humanserum (Sigma-Aldrich #H5667), 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 200 ng/ml Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (MCSF) (MPI für Biochemie, *Core Facility*, München), 1 mM Natriumpyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 *Knockout*-Generierung mittels Ribonukleoprotein

CRISPR/Cas9-RNPs wurden durch Hybridisierung einer crRNA und einer tracrRNA (beide IDT, #1072533 für tracrRNA) für 5 min bei 95°C mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 30 bis 60 min assembliert. Für den Ansatz mit zwei *guides* pro Zielgen wurden zwei verschiedene crRNAs (je 100 pmol) mit 200 pmol tracrRNA hybridisiert. Der crRNA:tracrRNA-Duplex wurde mit 80 pmol rekombinantem Cas9-Protein (MPI für Biochemie, *Core Facility*, München) ergänzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden N/TERT-1-, NHEK- oder HBEC3-KT-Zellen trypsiniert und einmal mit PBS gewaschen. Eine Million Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl der P3 *Primary Cell Nucleofector Solution* mit zugesetztem Supplement 1 (Lonza #V4XP-3032) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit den vorbereiteten RNPs gemischt, mit dem DS-138 Programm einer 4D-Nucleofector X Unit (Lonza) elektroporiert und in frisches Medium überführt. Zelllysate wurden 7 Tage nach der Elektroporation hergestellt, um das polyklonale *editing* mittels WB zu überprüfen.

Zielgen	Sequenz
<i>NLRP1</i>	5'-GGAGTTAAGAGGGTGTCTGG-3'
	5'-ACGTTTCATCCAGAGGCCAT-3'
<i>CARD8</i>	5'-AGCGTTTGGTTCCCCACTGC-3'
	5'-TGACGATTGCGTTTGGTTCC-3'
<i>PYCARD</i>	5'-GCTGGAGAACCTGACCGCCG-3'
	5'-ATGGACAGCAGCGCGCCCCG-3'
<i>CASP1</i>	5'-TAATGAGAGCAAGACGTGTG-3'
	5'-CAATGCTGCTACAAAATCTG-3'
<i>IL1B</i>	5'-CATGGCCACAACAACACTGACG-3'
	5'-TGAAGCCCTTGCTGTAGTGG-3'
<i>MAVS</i>	5'-CTGGTAGCTCTGGTAGACAG-3'
	5'-GGGTATTGAAGAGATGCCAG-3'
<i>EIF2AK2</i>	5'-ATTATGAACAGTGTGCATCG-3'
	5'-CTTCAGAAGGATTATCCATG-3'
<i>RIPK3</i>	5'-TAGGAAGGCGATATCCAGGG-3'
	5'-GGTTATCGAGAAGGTGAACT-3'
<i>RNASEL</i>	5'-TTTGACCTTACCATACACAG-3'
	5'-TTTGAGGCGAAAGACAAAGG-3'
<i>TLR3</i>	5'-CCAGGTCAAGTACTTCTAGG-3'
	5'-TCAACGACTGATGCTCCGAA-3'

Tabelle 23: crRNAs (alle von IDT) und anvisierte Stellen.

3.4.2 Herstellung transgener Zellen

Zur Generierung von Lentiviren wurden 293T-Zellen mit einem für das Transgen kodierenden pFUGW_Blasticidin-Transferplasmid und den entsprechenden Helferplasmiden pMDLg/pRRE, pRSV-rev und pCMV-VSV-G unter Verwendung von PEI Max (Polysciences #24765) revers transfiziert. Dazu wurde ein PEI Mix, bestehend aus 31.8 µl PEI Max (1 mg/ml) und 600 µl Opti-MEM für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit einem DNA Mix, bestehend aus 3 µg Transferplasmid, 4.5 µg pMDLg/pRRE, 1.5 µg pRSV-rev, 3 µg VSV-G und 600 µl Opti-MEM, vermengt. Dieser Reaktionsmix wurde für 25 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit 3 ml Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) vermengt. Die Zellen wurden für 48 bis 72 Stunden in einer T-25 Flasche kultiviert, anschließend wurde der lentivirale Überstand für 10 min bei 1.000 g abzentrifugiert und durch einen 0.45 µm Filter filtriert. Nach Zugabe von 8 µg/ml Polybren wurden N/TERT-1 damit transduziert. Transduzierte N/TERT-1-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transduktion mit 5 µg/ml Blasticidin (Thermo Fisher Scientific #A1113903) enthaltendem Medium selektiert.

Der Vektor für die Rekonstitutionen wurde mittels NheI und BamHI linearisiert und die jeweiligen *inserts* wurden mit Phusion High Fidelity DNA Polymerase oder Platinum SuperFi DNA Polymerase (beide Thermo Fisher Scientific, #F530L beziehungsweise #12-351-010) mittels PCR amplifiziert. cDNA für humanes *CARD8* (Uniprot: Q9Y2G2-5) und *mScarlet* wurden von TwistBioscience synthetisiert. Murines *Nlrp1b* (Uniprot: Q2LKW6) wurde aus cDNA von J774-Zellen amplifiziert, und cDNA für *mTurquoise2* war ein Geschenk des Bonhoeffer-Labors. cDNA für die Generierung des in dieser Studie verwendeten humanen *NLRP1* wurde aus dem cDNA-Klon MGC:57544 (*NLRP1*-Isoform 5, Geschenk von T. Kufer) generiert. Für die Generierung eines *NLRP1* in voller Länge wurde der ORF der Isoform 5 ab den Aminosäurepositionen (aa) 1354-1473 modifiziert, um der *NLRP1*-Isoform 1 zu ähneln, die die CARD-Domäne enthält. cDNA für Isoform 6 von humanem *NLRP1* wurde mit M735 als Startcodon kloniert. cDNA für *mScarlet-NLRP1(ΔPYD)* wurde durch Fusion von mScarlet mit humanem *NLRP1* ab aa 93 erzeugt. cDNA für Walker A- und B-Mutanten von

humanem *NLRP1* wurde durch Mutation der Reste 339 bis 341 zu Alanin beziehungsweise Mutation der Reste 410, 413 und 414 zu Alanin erzeugt. cDNA für die autoproteolytisch-defiziente Mutante (*S1213A*) wurde durch Mutation von Serin 1213 (entsprechend der Isoform 1) zu Alanin erzeugt.

3.4.3 Stimulation von Zellen

Die Zellen wurden mit 5×10^4 Zellen/well, 5×10^5 Zellen/well, 1.5×10^6 Zellen/well für 96-well-, 12-well- beziehungsweise 6-well-Platten ausgesät. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen am Morgen ausgesät, dann abends mit Viren infiziert sowie mit VbP stimuliert und 22 Stunden später geerntet. Für die Transfektionen wurden am nächsten Morgen die Zellen mit Nukleinsäuren transfiziert und nach 10 Stunden zusammen mit den infizierten und VbP-behandelten Proben geerntet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Stimuli und Inhibitoren in folgenden Konzentrationen verwendet: 2 $\mu\text{g/ml}$ Pam₃CSK₄ (Invivogen #tlrl-pms), 6.5 μM Nigericin (Sigma-Aldrich #N7143); 2 μM VbP (ApexBio #B3941) für N/TERT-1 und NHEK, 4 μM VbP für HBEC3-KT und für humane primäre Monozyten; 25 ng/ml LFn-YscF (Anthrax-Letalfaktor als Fusionsprotein mit dem *Burkholderia T3SS needle protein* (YscF), in-house gereinigt) und 250 ng/ml Protektives Antigen (List Biological Labs #LL-171E) für *NeedleTox* (NT); und 1 $\mu\text{g/ml}$ Anthrax-Letalfaktor (List Biological Labs #LL-169B) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Protektives Antigen für Anthrax-Letalfaktor (LF); 5 μM MCC950 (Sigma-Aldrich #5381200001), 100 μM Ribavirin (Sigma-Aldrich #R9644), 1 μM Bortezomib (Selleck Chemicals #S1013), 10 μM Me-Bs (Santa Cruz Biotechnology #sc-221350) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (Sigma-Aldrich #C4859).

Für die Transfektionen wurden zweihundert Nanogramm IVT4, hochmolekulares poly(I:C) (Invivogen #tlrl-pic), Heringshoden-DNA (HT-DNA) (Sigma-Aldrich #D6898) oder IVT-Produkte mit Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific #11668019) pro well gemäß dem Protokoll des Herstellers komplexiert.

3.4.4 Time-lapse microscopy

N/TERT-1-Zellen wurden mit 3.2×10^4 Zellen pro well auf eine 96-well- μ -Platte (ibidi #89626) ausgesät. Vierundzwanzig Stunden später wurde das Medium gegen ein Medium ausgetauscht, das Propidiumiodid (PI) (1 $\mu\text{g/ml}$) (MP Biomedicals #0219545810) sowie die entsprechenden Stimuli enthielt. Die Platte wurde alle 5 Minuten mit einem Leica DMI8 Inversmikroskop, das mit einem HC PL FLUOTAR L 20X/0.40 DRY (Vergrößerungswechsler 1) Objektiv und einer ORCA-Flash4.0 LT+ Digital CMOS Kamera (Hamamatsu) ausgestattet war, abgebildet. Die Platte wurde 24 Stunden lang in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C abgebildet.

3.4.5 ASC-speck-Visualisierung

Zur Visualisierung der Pyroptosenbildung wurden Wildtyp- und NLRP1-defiziente N/TERT-1 wie zuvor beschrieben mit einem Retrovirus transduziert, das für ASC-mCherry kodiert. Kurz gesagt wurde das Retrovirus durch Transfektion von 293T-Zellen mit pRP_ASC_mCherry und den entsprechenden Helferplasmiden pCMV-Gag-Pol und pCMV-VSV-G unter Verwendung von PEI Max (Polysciences #24765-1) erzeugt. Zweiundsiebzig Stunden später wurden virale Überstände nach Standardverfahren hergestellt und Wildtyp- und NLRP1-defiziente N/TERT-1 transduziert. Transduzierte Zellen wurden 7 Tage später mit einem BD FACSMelody Zellsortierer (BD Biosciences) auf mCherry⁺/ASC-speck sortiert. Für das Mikroskopieren wurden die Zellen mit 3.2×10^4 Zellen pro well auf eine 96-well- μ -Platte (ibidi) plattiert. Vierundzwanzig Stunden später wurde das Medium gegen frisches Medium sowie die jeweiligen Stimuli ausgetauscht und die Platte zu den jeweiligen Zeitpunkten mit einem Leica DMI8 Inversmikroskop, ausgestattet mit einem HC PL FLUOTAR L 20X/0.40 DRY (Vergrößerungswechsler 1) Objektiv und einer ORCA-Flash4.0 LT+ Digital CMOS Kamera (Hamamatsu), abgebildet.

3.4.6 Bildanalyse

Alle Zellbilddaten wurden mit Fiji verarbeitet und analysiert. Kurz gesagt wurden einzelne Kanäle in binäre Bilder konvertiert, indem ein globaler Schwellenwert angewendet wurde, der mit dem Standard- (für Propidiumiodid und ASC-mCherry) oder Li-Algorithmus (für Hellfeld) bestimmt wurde. Hellfeld-Bilder wurden vor der Binärkonvertierung mit einem Gaußschen Unschärfekern korrigiert. Anschließend wurden alle Partikel mit einer minimalen Größe von 25 μm^2 (für Propidiumiodid und Hellfeld) oder mit einer Größe von 0.2-20 μm^2 (ASC-mCherry-Flecken) identifiziert und für jeden Zeitpunkt gezählt. Die analysierten Daten wurden mit Hilfe von benutzerdefinierten Python-Skripten weiterverarbeitet und geplottet. Die endgültigen Plots zeigen den Mittelwert \pm SEM eines gleitenden Durchschnitts innerhalb eines \sim 40-minütigen Zeitintervalls.

3.4.7 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenz wurden morgens 1×10^5 Zellen pro *well* auf eine achtwelligen μ -Slide (ibidi #80826) plattiert. Abends wurden die Zellen für 1 Stunde mit DMSO (Sigma-Aldrich #D8418), Cycloheximid oder Ribavirin behandelt und dann unbehandelt gelassen oder mit SFV bei einer MOI von 1 infiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 4% Formaldehyd (Thermo Fisher Scientific #28908) in PBS für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich #93443) in PBS für 10 min permeabilisiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 10% normalem Ziegen Serum (NGS) (Thermo Fisher Scientific #10000C) in PBS für 30 min blockiert. Für die dsRNA-Färbung wurden die Zellen mindestens 1 Stunde mit dem primären J2-Antikörper (SCICONS #10010200), verdünnt 1:400 in 10% NGS in PBS, inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit Anti-Maus-AF488 (Thermo Fisher Scientific #A11001), verdünnt 1:500 in 10% NGS in PBS mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 (Invitrogen #62249), mindestens 1 Stunde lang gefärbt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und direkt mit einem Leica DMI8 Inversmikroskop, ausgestattet mit einem HC PL FLUOTAR L 20X/0.40 DRY (Vergrößerungswechsler 1) oder HC PL FLUOTAR 10X/0.32 DRY (Vergrößerungswechsler 1) Objektiv und einer ORCA-Flash4.0 LT+ Digital CMOS Kamera (Hamamatsu), abgebildet. Die Bilder wurden mit der Leica Application Suite X und Fiji bearbeitet. Für die Zählung von Zellkernen und dsRNA-Signalen wurden mindestens 8×10^3 Zellen pro Bedingung und Replikat unter Verwendung des Molecule ARchive Suite (MARS) Plugins (frei verfügbar auf <https://github.com/duderstadt-lab>) analysiert.

3.4.8 ELISA

Humaner IL-1 β , IP-10 (BD Biosciences #557953 beziehungsweise #550926) und IFN- β (R&D Systems #DY814-05) *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.4.9 Immunopräzipitation mit rekombinantem Protein

Von den beiden in Tabelle 15 beschriebenen komplementären Oligonukleotiden (40-mer) wurde ein Oligonukleotid 5'-biotinyliert bestellt und wie zuvor beschrieben hybridisiert. Dynabeads M-280 (Thermo Fisher Scientific #11205D) wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers vorbereitet und acht Femtomol biotinylierte Nukleinsäure an die *beads* konjugiert oder die *beads* wurden unbehandelt gelassen. Anschließend wurde TEV-gespaltene NLRP1 Δ CARD zu den in *IP-assay*-Puffer (30 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0.05% (v/v) NP40S, 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) resuspendierten *beads* hinzugefügt. Die Proben wurden 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend wurden die *beads* viermal mit *IP-assay*-Puffer gewaschen, bevor sie in 1X Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und gekocht wurden. Die Proben wurden einer denaturierenden und reduzierenden Bis-Tris-SDS-PAGE unterzogen (Thermo Fisher Scientific # NP0343BOX).

Oligonukleotid	Sequenz
40-mer Biotin- dsDNA	5'-Biotin-GGAGAACTTCATGCCCTTCGGATAAAGGACTCGTATGTACC-3'
	5'-GGTACATACGAGTCCTTATCCGAAGGCATGAAGTTCTCC-3'
40-mer Biotin- dsRNA	5'-Biotin- rGrGrArGrArArCrUrUrCrArUrGrCrCrCrUrUrCrGrGrArUrArArGrGrArCrUrCrGrU rArUrGrUrArCrC-3'
	5'- rGrGrUrArCrArUrArCrGrArGrUrCrCrUrUrArUrCrCrGrArArGrGrCrArUrGrArA rGrUrUrCrUrCrC-3'

Tabelle 24: Verwendete biotinylierte Oligonukleotide.

3.4.10 Immunopräzipitation aus 293T-Zelllysat

293T-Zellen wurden mit 8×10^5 Zellen pro *well* auf eine 6-*well*-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit einem Plasmid, das für FLAG-NLRP1 oder FLAG-NLRP1B kodiert, mit GeneJuice (Sigma- Aldrich #70967-3) gemäß dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen in 30 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0.5% (v/v) NP40S, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1x cOmplete EDTA-freier Proteaseinhibitor (Sigma-Aldrich #11873580001) lysiert und auf einem rotierenden Rad bei 4°C für 30 min lysiert. Klares Lysat wurde durch Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit für 15 min hergestellt und für die Eingabe normalisiert. Die IP wurde, wie für die IP mit rekombinantem NLRP1ΔCARD beschrieben, durchgeführt und die Proben wurden einer denaturierenden und reduzierenden Bis-Tris-SDS-PAGE unterzogen.

3.4.11 Western Blot

Ganzzelllysate für den Western Blot (WB) wurden hergestellt, indem die Zellen direkt in Laemmli-Puffer lysiert und für 5 min bei 95°C gekocht wurden. Für Überstandsproben wurde eine Fällung mittels Methanol/Chloroform-Präzipitation durchgeführt und das Pellet in Laemmli-Puffer resuspendiert und gekocht. Die Proben wurden auf denaturierender und reduzierender Bis-Tris-SDS-PAGE (Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt, auf 0.2-μm-Nitrocellulose-Membranen (GE Healthcare #10600004) geblottet, in 5%iger Milch in PBST blockiert und mit den angegebenen primären und entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und die entsprechenden Bilder linear kontrastverstärkt.

3.4.12 DSS-Kreuzvernetzung

Die DSS (Dimethylsuccinylsuccinat)-Vernetzung wurde ähnlich wie zuvor beschrieben durchgeführt. Kurz gesagt wurden stimulierte Zellen trypsinisiert, einmal in PBS gewaschen und in PBS pH 8.0 resuspendiert. Die Proben wurden entweder unbehandelt gelassen (kein DSS) oder durch Zugabe von DSS (Thermo Fisher Scientific #A39267) zu 4.4 mM und Inkubation bei RT für 30 min vernetzt. Anschließend wurde Laemmli-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 1X zugegeben und die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht und einer denaturierenden und reduzierenden Bis-Tris-SDS-PAGE unterzogen.

3.5 Biochemie

3.5.1 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Humanes NLRP1ΔCARD (aa 2-1375) wurde aus dem cDNA-Klon MGC:57544 kloniert und mit einer StrepII- und HA-Markierung am N- beziehungsweise C-Terminus versehen. NLRP1ΔCARD wurde in den modifizierten pFastBac-Vektor 4C kloniert, was zu einer TEV-spaltbaren N-terminalen His6-

MBP-Fusion führte. Dieses Protein wird im Folgenden als NLRP1 Δ CARD bezeichnet. Das pFastBac-Plasmid wurde in DH10 Embacy transformiert, um ein Bacmid zu erzeugen und Sf9-Zellen wurden verwendet, um Baculovirus zu erzeugen. Für die Expression wurden 3 Liter H5-Zellen mit 30 ml des zuvor generierten Virus infiziert und die Zellen nach 3 Tagen Kultivierung bei 26 °C geerntet und anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.5.2 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Die humanen NLRP1-Trunkierungen NACHT (aa 230-790) und NACHT-LRR (aa 230-994) wurden aus dem cDNA-Klon MGC:57544 kloniert, die murine NLRP1B-Trunkierung NACHT-LRR (aa2-755) wurde aus J774-cDNA (Amplifikation von Q2LKW6) kloniert und mit einem N-terminalen FLAG-Markierung versehen und in pET_His6_MBP_TEV_1M kloniert, was zu einer TEV-spaltbaren N-terminalen His6-MBP-FLAG-Fusion führte. Die humanen NLRP1-Trunkierungen LRR(s) (aa 791-994) und LRR(l) (aa 722-1076) wurden aus dem cDNA-Klon MGC:57544 kloniert und in pET His6_GST_TEV_1G kloniert, was zu einer TEV-spaltbaren N-terminalen His6-GST-Fusion führte. Die Fusionen für die humanen NLRP1-Trunkierungen wurden ähnlich wie zuvor beschrieben kloniert. Die Plasmide wurden in BL21 pRIL (Agilent Technologies) transformiert und die Bakterien mit Kanamycin und Chloramphenicol selektiert. Zur Expression wurden 2-6 Liter TB-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und für 3 Stunden bei 37°C und 110 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min auf Eis geschockt, dann mit 0.1 mM IPTG induziert und für 20 Stunden über Nacht bei 18°C und 90 rpm inkubiert. Schlussendlich wurden die Bakterien für 20 min bei 5 000 g geerntet, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.5.3 Reinigung von NLRP1 Δ CARD

Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Puffer B (50 mM HEPES, pH 7.5, 10% (v/v) Glycerin, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) + 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P40 Substitute (NP40S), 10 mM Imidazol, ergänzt mit 2 μ M Pepstatin, 2 μ M Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin und 1 μ g/ml Aprotinin und anschließend durch Sonifizieren (Branson) lysiert. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation bei 235.000 g für 60 min geklärt. Das geklärte Lysat wurde mit 2 ml Bettvolumen (BV) Ni-NTA-Harz (Qiagen), das mit Puffer B + 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) NP40S, 10 mM Imidazol voräquilibriert wurde, für 2 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die *beads* wurden wie folgt gewaschen: 60 BV Puffer B + 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) NP40S, 10 mM Imidazol, 20 BV Puffer B + 500 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 10 mM Imidazol, 45 BV Puffer B + 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM Mg(OAc)₂, 0.01% (v/v) NP40S, 2 mM ATP und 60 BV Puffer B + 1 M NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 20 mM Imidazol. NLRP1 wurde schließlich mit 5 CV Puffer B + 100 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 300 mM Imidazol eluiert. NLRP1 wurde weiter auf einer HiTrap Heparin HP 5 ml (GE Healthcare) gereinigt, die in Puffer B + 100 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 0.5 mM EDTA äquilibriert wurde. Die Proteine wurden von der Säule mit einem 100-1000 mM NaCl-Gradienten in Puffer B + 0.01% (v/v) NP40S, 0.5 mM EDTA über 20 CV eluiert. NLRP1-haltige Fraktionen wurden gepoolt, mit einer MWCO 50000 Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheit (Merck) konzentriert und auf eine HiLoad 16/600 Superdex 200-pg-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) aufgetragen, die in Puffer C (30 mM HEPES, pH 7.5, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) + 300 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S äquilibriert wurde. Peakfraktionen, die monomeres NLRP1 (~200 kDa) gemäß Gelfiltrations-Proteinstandards entsprechen, wurden gepoolt, mit einer MWCO 50000 Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheit konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die endgültige NLRP1-Konzentration wurde mittels Bradford unter Verwendung von BSA als Standard bestimmt.

3.5.4 Reinigung der NLRP1-Trunkationen und des Mäuse-NLRP1B Proteins

His6-MBP-TEV-FLAG-NACHT, His6-MBP-TEV-FLAG-NACHT-LRR und His6-MBP-TEV-FLAG-murine NACHT-LRR wurden mit ihrem Tag gereinigt und werden im Folgenden als NACHT, NACHT-LRR beziehungsweise NACHT-LRR (Maus) bezeichnet, obwohl sie bei ihrer Verwendung noch eine MBP-Markierung tragen. His6-GST-TEV-LRR(s) und His6-GST-TEV-LRR(l) wurden während des Reinigungsprozesses TEV-gespalten und tragen bei Verwendung keine N-terminale GST-Markierung; die gereinigten Proteine werden als LRR(s) und LRR(l) bezeichnet.

Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Um NACHT-LRR, NACHT und NACHT-LRR (Maus) zu reinigen, wurden die Bakterien in Puffer B + 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) NP40S, 20 mM Imidazol, ergänzt mit 1x cOmplete EDTA-freier Proteaseinhibitor (Sigma-Aldrich) oder 2 µM Pepstatin, 2 µM Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin und 1 µg/ml Aprotinin resuspendiert und durch Sonifizieren lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 38.000 g für 15 min geklärt. Das geklärte Lysat wurde auf eine His-Trap-Säule (Cytiva) geladen, die mit Puffer B + 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) NP40S voräquilibriert war. Die Säule wurde gewaschen mit 20 CV Puffer B + 500 mM NaCl, 0.1% (v/v) NP40S, 5 CV 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 10% (v/v) Glycerin, 0.01% (v/v) NP40S, 10 mM MgCl₂, 20 mM Imidazol, 2 mM ATP, 1 mM DTT, 5 CV Puffer B + 1 M NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 20 mM Imidazol, 5 CV Puffer B + 100 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 20 mM Imidazol und schließlich entweder mit einem linearen Gradienten über 5 CV oder einem Stufengradienten mit Puffer B + 100 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 300 mM Imidazol eluiert. Alle Proteine außer NACHT wurden weiter gereinigt, indem die proteinhaltigen Fraktionen konzentriert und die Probe auf eine HiTrap Heparin HP (Cytiva) geladen wurde, die mit Puffer B + 100 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S äquilibriert wurde. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten über 15 CV mit Puffer B + 1 M NaCl, 0.01% (v/v) NP40S, 0.5 mM EGTA eluiert. Die Proteine, einschließlich des NACHT-Proteins, wurden weiter auf einer HiLoad 16/600 Superdex 200-pg-Gelfiltrationssäule gereinigt, die in Puffer C + 300 mM NaCl, 0.01% (v/v) NP40S äquilibriert wurde. Humanes NACHT-LRR wurde als Monomer gereinigt, NACHT und NACHT-LRR (Maus) wurden als Oligomere in Lösung gereinigt. Proteinhaltige Peakfraktionen wurden gepoolt, mit einer MWCO 30000/50000 Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheit (Merck) konzentriert, in flüssigem Stickstoff flashgefroren und bei -80°C gelagert. Alternativ wurde detergentienfreies NLRP1 mit nur 5% Glycerin und ohne NP40S-haltige Puffer nach His Trap gereinigt. Zur Aufreinigung von LRR(s) und LRR(l) wurden die Bakterien in 50 mM HEPES, pH 7.4, 500 mM NaCl, 1% (v/v) NP40S, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT, ergänzt mit 2 µM Pepstatin, 2 µM Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Aprotinin resuspendiert, durch Sonifizieren lysiert und wie zuvor beschrieben gereinigt. Das geklärte Lysat wurde auf einen HisTrap HP (5 ml) geladen, mit 20 CV 50 mM HEPES, pH 7.4, 500 mM NaCl, 1% (v/v) NP40S, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT, 5 CV 50 mM HEPES, pH 7.4, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM Mg(OAc)₂, 2 mM ATP, 1 mM DTT und 20 CV 50 mM HEPES, pH 7.4, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT. LRR wurde mit einem Gradienten von 20-500 mM Imidazol in 50 mM HEPES, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM DTT eluiert. Fraktionen, die LRR enthalten, wurden gepoolt und über Nacht gegen 50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT in Gegenwart von 1:20 (w/w) His6-markierter TEV-Protease dialysiert. LRR wurde von ungeschnittenem Protein, freiem His6-GST und His6-markierter TEV-Protease getrennt, indem die Probe erneut auf eine HisTrap HP (5 ml) aufgetragen wurde, die in 50 mM HEPES, pH 7.4, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT äquilibriert wurde. Der Durchfluss wurde gesammelt, mit einer MWCO 10000 Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheit (Merck) konzentriert und auf einer HiLoad 16/600 Superdex 75-pg-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare), die in 30 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM DTT äquilibriert wurde, weiter gereinigt. LRR(s) wurde als Monomer gereinigt, LRR(l) wurde als Oligomer in Lösung gereinigt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert, in flüssigem Stickstoff flashgefroren und bei -80°C gelagert. Die endgültigen Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford unter Verwendung von BSA als Standard bestimmt.

3.5.5 Coomassie-Färbung

Für die Coomassie-Gele wurde mit den Proben eine denaturierende und reduzierende Bis-Tris-SDS-PAGE ausgeführt und nach der Trennung mit 45% EtOH (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 0.1% Coomassie R-250 (Thermo Fischer Scientific #20278) gefärbt und mit 20% EtOH (v/v), 10% Essigsäure (v/v) entfärbt.

3.5.6 *Electrophoretic mobility shift assay*

NLRP1ΔCARD wurde in Puffer C + 1.5 U/ml RNase-Inhibitor (NEB #M0314S) verdünnt, um NaCl auf eine Endkonzentration von 100 mM einzustellen. TEV-Protease wurde mit NLRP1ΔCARD in einem Verhältnis von 1:20 (w/w) gemischt und bei RT für 1 Stunde inkubiert (die Spaltung wurde durch SDS-PAGE bestätigt). Anschließend wurden 0.1, 0.2, 0.4 und 0.8 μM TEV-verdautes NLRP1ΔCARD mit 0.1 μM dsRNA oder dsDNA in Puffer C + 100 mM NaCl + 1.5 U/ml RNase-Inhibitor in einem Gesamtvolumen von 10 μl gemischt und für 30 min bei 25°C inkubiert. MBP-TEV-Kontrollreaktionen wurden wie folgt angesetzt: MBP wurde mit TEV in Puffer C + 100 mM NaCl + 1.5 U/ml RNase-Inhibitor wie zuvor beschrieben inkubiert und mit dsRNA oder dsDNA in 0.8 μM gemischt, wobei TEV auf die Konzentration eingestellt wurde, die 0.8 μM verdaulichem NLRP1 entspricht. Die Reaktionen wurden mit Ficoll400 auf eine Endkonzentration von 2.5% ergänzt und auf einem 4-12%igen nativen Polyacrylamidgel (Thermo Fisher Scientific) in 0.5X TBE ausgeführt. Das Gel wurde mit SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific #S11494) gefärbt und mit einem Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) gescannt.

3.5.7 *ADP-Glo assay*

Der *assay* wurde mit dem *ADP-Glo Kinase Assay Kit* (Promega #V6930) in 384 Flat White ProxiPlates (PerkinElmer #6008280) durchgeführt. Das jeweilige rekombinante Protein und die Nukleinsäure wurden in *ADP-Glo assay*-Puffer mit folgenden Endkonzentrationen verdünnt: 30 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 0.01% (v/v) NP40S, 0.5 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 μM ATP. Wenn nicht anders angegeben, lagen die Proteinkonzentrationen bei 3 μM und die Nukleinsäurekonzentrationen bei 1.2 μM. Außerdem wurde ein Standard mit 100 μM ATP, 80 μM ATP und 20 μM ADP, 60 μM ATP und 40 μM ADP oder 100 μM ADP im gleichen Puffer hergestellt. Fünf Mikroliter der Probe wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von 5 μl *ADP-Glo*-Reagenz gestoppt und weiter für 40 min inkubiert. Nach Zugabe von 10 μl Kinase-Detektionspuffer wurden die Proben für weitere 40 min inkubiert und die Lumineszenz mit einem Spark 20M Mikroplatten-Reader (Tecan) mit einer Integrationszeit von 1 s pro *well* ausgelesen. Zur Berechnung der Einzelwerte wurde eine lineare Regression auf Basis des ADP-Standards berechnet. Zur Berechnung der ATP-Umsatzrate eines NACHT-LRR-Moleküls pro Minute nach dsRNA-Stimulation (Abb. S14B) wurde die Steigung der Reaktion in ihrer linearen Phase (0-15 min) verwendet.

3.5.8 HPLC-Messung von Nukleotiden

Detergenzienfrei-gereinigtes NACHT-LRR und entsprechende Nukleinsäure wurden in HPLC-kompatiblen Puffer mit folgenden Endkonzentrationen verdünnt: 30 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% (v/v) Glycerin, 0.5 mM EDTA, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 μM ATP. Die Endkonzentration von NACHT-LRR betrug 3 μM; die Endkonzentration der Nukleinsäure betrug 1.2 μM. Außerdem wurde ein Standard mit 33.3 μM ATP, 33.3 μM ADP und 33 μM AMP im gleichen Puffer hergestellt. 20 μl Probe wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit H₂O auf 400 μl aufgefüllt und 400 μl ROTI Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth #P3803) wurden hinzugefügt. Die Proben wurden auf dem Vortex geschüttelt, 5 min bei RT bei 22.000 g zentrifugiert und die wässrige obere Phase wurde dreimal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase eingefroren, lyophilisiert und in 13 μl H₂O resuspendiert.

Die HPLC der Proben wurde ähnlich wie in der zuvor beschriebenen Arbeit durchgeführt³³⁴. Kurz gesagt wurden die Proben in ein 1290 Infinity II HPLC-System (Agilent) injiziert, das mit einer Pinnacle DB Aqueous C18-Säule (Restek; 150x3.2 mm Größe, 3 µm Partikelgröße) ausgestattet war. Der Lauf war eine isokratische Elution in 7.5% Acetonitril in 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 6.5), die Proben wurden mit 230 µl/min gefahren und mit einem 1290 DAD-Detektor und einer G4212-60007 Max-Light-Kartuschenzelle (Detektion bei 258 nm, 6 nm Bandbreite) detektiert.

3.5.9 MANT-ATP Bindungsstudien

Bindungsstudien mit Mant-ATP wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt⁶⁶. Kurz gesagt wurden eine Standardverdünnung von Mant-ATP (Jena Bioscience #NU-202S) mit Endkonzentrationen von 312 nM bis 0.60 nM sowie eine Pufferkontrolle in FRET-Puffer mit folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 30 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0.01% (v/v) NP40S, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Mant-ATP-Proben wurden mit finalen 1.2 µM NACHT-LRR oder FRET-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 10 min bei RT in 384 Flat Black Platten (Nunc, Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden auf 290 nm beziehungsweise 448 nm (Bandbreite 10 nm) eingestellt und FRET in einem Spark 20M Mikroplatten-Reader (Tecan) mit zehn Blitzen und einer Verstärkung von 100 gemessen. Jeder Verdünnungspunkt wurde dreimal in unabhängigen Experimenten mit drei *reads* pro Messung gemessen. Die FRET-Werte wurden durch Subtraktion der Pufferwerte von den Probenwerten für jedes unabhängige Experiment berechnet.

3.5.10 Fluoreszenzanisotropie

Fluoreszenzanisotropie-Experimente wurden bei 25 °C mit einer 20-mer dsRNA oder dsDNA (IDT und Metabion) durchgeführt, die am 3'-Ende auf einem Strang mit Fluorescein markiert war:

Produkt	Sequenz
20-mer dsDNA (Fluorescein)	5'-GATAAGGACTCGTATGTACC-Fluorescein-3'
	5'-GGTACATACGAGTCCTTATC-3'
20-mer dsRNA (Fluorescein)	5'-rGrArUrArArGrGrArCrUrCrGrUrArUrGrUrArCrC-Fluorescein-3'
	5'-rGrGrUrArCrArUrArCrGrArGrUrCrCrUrUrArUrC-3'

Tabelle 25: Verwendete Fluorescein-markierte Oligonukleotide.

Experimente wurden mit einem Infinite M1000 Pro (Tecan) aufgezeichnet und der gerätespezifische G-Faktor (~0.98) wurde vor jedem Experiment bestimmt. Zehn nanomolar markierte dsRNA oder dsDNA wurde mit dem jeweiligen NLRP1-Protein oder MBP in den angegebenen Konzentrationen für 10 min in einem Gesamtvolumen von 20 µl Endpuffer inkubiert, der 30 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0.01% (v/v) NP40S, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 0.5 U/ml RNase-Inhibitor enthielt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden auf 470 nm beziehungsweise 535 nm (Bandbreite 5 nm) eingestellt. Jeder Titrationspunkt wurde dreimal mit 10 Reads gemessen. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und die Daten wurden, sofern zutreffend, durch Anpassung an ein einstellenspezifisches Bindungsmodell (GraphPad) analysiert.

3.5.11 Modellierung von Proteinen

Modelle von humanem NLRP1 und murinem NLRP1B wurden unter Verwendung der 3.80-Å aufgelösten Struktur von humanem NLRP3 (6NPY) als Vorlage und MODELLER, implementiert im HHpred Server, erstellt. PyMol wurde zur Visualisierung der Molekülmodelle verwendet. Das elektrostatische Potenzial wurde mit APBS in PyMol berechnet und ist farblich als -5.0 kT/e (rot) bis +5.0 kT/e (blau) kodiert. Modelle von NLRC4 (4KXF) und dem ternären DPP9-NLRP1^A-NLRP1^B Komplexes (6X6A) wurden mit Hilfe von UCSF ChimeraX modelliert³³⁵.

3.6 Quantifizierung und statistische Analyse

Die statistische Signifikanz wurde entweder durch ein- oder zweiseitige ANOVA mit einer Dunnett- oder Šidák-Korrektur für Mehrfachtests bestimmt. Die genaue Anzahl der Replikate (n) ist in den Abbildungslegenden angegeben. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 8 durchgeführt. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Die N/TERT-1-Keratinocyten-Zelllinie eignet sich zur Untersuchung des humanen NLRP1-Inflammasoms

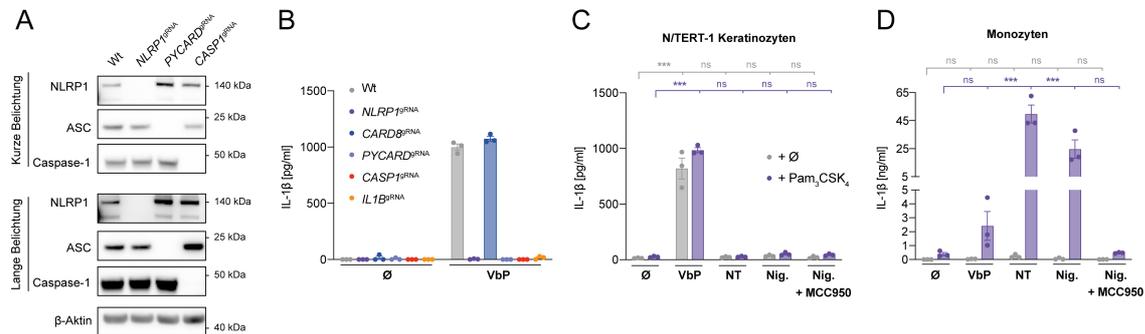


Abbildung 9: Effiziente genetische Perturbation von Inflammasom-Komponenten in humanen N/TERT-1-Keratinocyten und Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms. (A) WB von unmodifizierten sowie NLRP1-, ASC- oder Caspase-1-defizienten Keratinocyten. (B) Keratinocyten mit den angegebenen Genotypen wurden unbehandelt gelassen oder mit VbP stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung wurde nach 22 Stunden bestimmt. Für dieses und die folgenden Experimente wurde die Zytokinfreisetzung nach 22 Stunden bestimmt, wenn nicht anders angegeben. (C) N/TERT-1-Keratinocyten oder (D) primäre humane Monozyten von drei unabhängigen Spendern wurden unbehandelt gelassen oder mit Pam₃CSK₄ für 2 Stunden stimuliert, für 1 Stunde mit MCC950 inhibiert und dann mit VbP, *NeedleTox* (NT) oder Nigericin (Nig.) für 10 Stunden stimuliert und anschließend die IL-1 β -Freisetzung bestimmt. Die Daten sind dargestellt als ein repräsentatives Experiment von zwei (A), beziehungsweise als Mittelwert \pm SEM von biologischen Triplikaten eines repräsentativen Experiments von zwei (B), beziehungsweise als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (C und D). Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Zur Untersuchung des humanen NLRP1-Inflammasoms wurden N/TERT-1-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine primärzellähnliche, jedoch immortalisierte Keratinocyten-Zelllinie, welche von Zhong verwendet wurde um humanes NLRP1 zu untersuchen^{292,314}. Es wurde schon gezeigt, dass diese Zelllinie NLRP1 exprimiert und dass das Inflammasom in diesen Zellen durch Stimulation mit dem DPP8/9 Inhibitor VbP aktiviert werden kann. Um die Rolle einzelner Inflammasom-Komponenten in diesen Zellen zu untersuchen, etablierten wir ein Protokoll um mittels CRISPR/Cas9 RNP-Elektroporation *knockouts* in einem polyklonalen Ansatz zu generieren. Jedes zu untersuchende Gen wurde hierzu unter Zuhilfenahme von zwei *guide* RNAs genomisch editiert, um eine effiziente *knockout*-Generierung zu gewährleisten. Zuerst schalteten wir jeweils den Inflammasom-Sensor NLRP1, das Adapterprotein ASC, sowie die ausführende Protease Caspase-1 in diesen Zellen aus und konnten durch WB für die targetierten Proteine eine vollständige Aufhebung der Proteinexpression nachweisen (Abbildung 9A). Zur Untersuchung der IL-1 β -Freisetzung nach VbP-Stimulation schalteten wir zudem CARD8, welches ebenso durch DPP8/9-Inhibition aktiviert werden kann, sowie das proinflammatorische Zytokin IL-1 β in diesen Zellen aus. Diese Zelllinien wurden mit VbP behandelt und der Überstand auf IL-1 β untersucht (Abbildung 9B). Die IL-1 β -Freisetzung war abhängig von NLRP1, ASC, sowie Caspase-1 und IL-1 β , jedoch unabhängig von CARD8. Daraus konnten wir schließen, dass CARD8 in N/TERT-1 keine Aktivität nach VbP-Stimulation aufweist und VbP allein NLRP1 in dieser Zelllinie zu aktivieren vermag. Üblicherweise wird die Inflammasomaktivierung in Makrophagen untersucht, diese benötigen für die Expression von pro-IL-1 β ein zusätzliches Stimulations-Signal, auch *priming* oder Signal 1 genannt. Diese Stimulation wird zumeist durch ein vorhergehendes *priming* mit dem TLR4-Liganden LPS oder dem TLR1/TLR2 Liganden Pam₃CSK₄ bewerkstelligt. In Anbetracht der konstitutiven Expression von pro-IL-1 β in N/TERT-1 ist für diese Zellen kein zusätzliches *priming*-Signal erforderlich (Abbildung 9C). Eine Stimulation von N/TERT-1 mit Nigericin (Nig.) oder *NeedleTox* (NT), welche das NLRP3 beziehungsweise das NAIP/NLRC4-Inflammasom aktivieren, führte zu keinem IL-1 β -Signal (Abbildung 9C). Humane primäre Monozyten dagegen reagierten mit IL-1 β -Freisetzung auf diese Behandlungen (Abbildung 9D), wobei die Stimulation von NLRP3 durch den spezifischen Inhibitor MCC950 inhibiert werden konnte. Die N/TERT-1-Keratinocyten eignen

sich aufgrund dieser Tatsachen zur Untersuchung des NLRP1-Inflammasoms: Die Zellen reagieren durch endogenes NLRP1 auf VbP-Stimulation und es kommt hierbei zu keinerlei *crossstalk* mit anderen Inflammasomaktivierungen.

4.2 Semliki Forest Virus aktiviert das NLRP1-Inflammasom

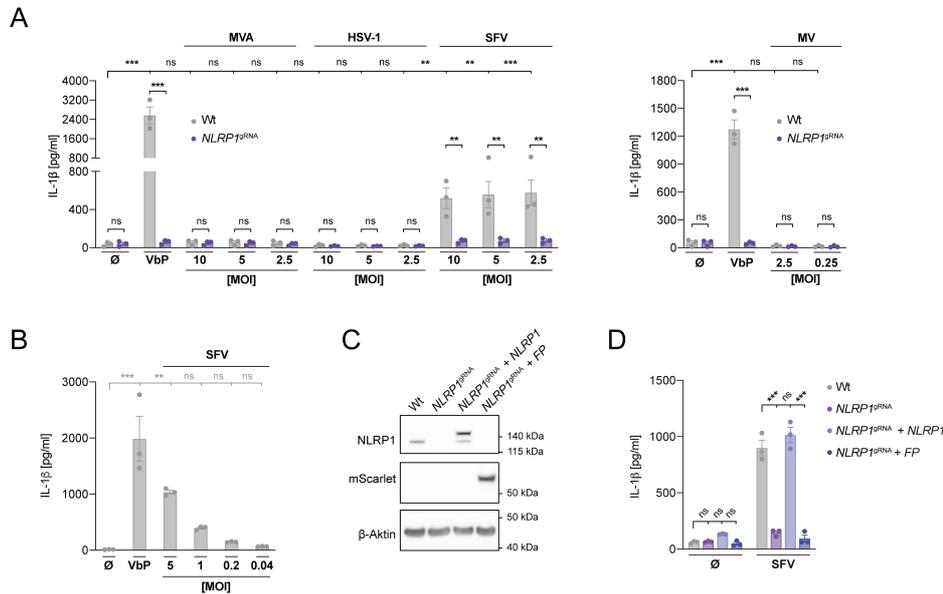


Abbildung 10: SFV triggert die IL-1 β -Freisetzung in einer NLRP1-abhängigen Weise. (A) Keratinozyten mit den angegebenen Genotypen wurden unbehandelt gelassen, mit VbP stimuliert oder mit verschiedenen Viren bei angegebenen MOIs für 22 Stunden (MVA, HSV-1 und SFV) oder 16 Stunden (MV) infiziert. (B) Unveränderte Keratinozyten wurden mit entsprechenden MOIs von SFV infiziert und die IL-1 β -Freisetzung wurde bestimmt. (C) WB von unmodifizierten oder NLRP1-defizienten Keratinozyten, die mit einem Transgen für entweder humanes *NLRP1* oder das fluoreszierende Protein *mScarlet/mTurquoise2* (FP) komplementiert wurden, wie im WB angegeben. (D) Zellen, die wie in (C) komplementiert worden waren, wurden neben unmodifizierten Zellen mit SFV infiziert und anschließend auf IL-1 β -Freisetzung untersucht. Für diese und die folgenden Experimente wurde SFV mit einer MOI von 5 verwendet und die Zytokinfreisetzung wurde, wenn nicht anders angegeben, nach 22 Stunden bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A, B und D), beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (C). Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA (A und D) beziehungsweise one-way ANOVA (B): *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Da Keratinozyten der Haut durch ihre Exposition als erste Verteidigungslinie gegen Pathogene fungieren, untersuchten wir verschiedene Viren auf ihre Fähigkeit, das NLRP1-Inflammasom in N/TERT-1 zu aktivieren. Wir testeten Viren mit unterschiedlichen Nukleinsäuregenomen und Replikationsstrategien, die in der Lage waren, menschliche Keratinozyten unter *in vitro* Bedingungen produktiv zu infizieren. Für doppelsträngige DNA-Viren untersuchten wir das replikationsinkompetente Pockenvirus MVA sowie HSV-1. Beide Viren sind für ihren Hauttropismus bekannt. Als *positive-sense* ssRNA-Virus untersuchten wir SFV, ein typisches Modellvirus aus der Gattung der Togaviridae; als *negative-sense* ssRNA-Virus verwendeten wir MV. MV und die beiden dsDNA-Viren infizierten Keratinozyten zwar effizient, wie anhand einer Expression von Markergenen oder ihrer zytopathischen Wirkung beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), induzierten aber nicht die Freisetzung von IL-1 β . Eine Infektion mit SFV jedoch führte zu einer robusten IL-1 β -Freisetzung, welche in Abwesenheit von NLRP1 reduziert war (Abbildung 10A). Titration der SFV MOI zeigte auch einen Dosis-abhängigen Effekt im IL-1 β -Signal nach SFV-Infektion (Abbildung 10B). Um die NLRP1-Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung nach SFV-Infektion zu untermauern, re-exprimierten wir NLRP1 mittels lentiviraler Transduktion in NLRP1-defizienten Keratinozyten. Dies stellte die IL-1 β -Freisetzung bei SFV-Infektion wieder vollständig her, eine Rekonstitution mit einem fluoreszierenden Protein (FP) jedoch nicht (Abbildung 10, C und D). Somit ist NLRP1 für die IL-1 β -Freisetzung bei Infektion mit einem Positivstrang-RNA-Virus erforderlich.

4.2.1 Die NLRP1-Inflammasomaktivierung durch SFV ist abhängig von einer Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase

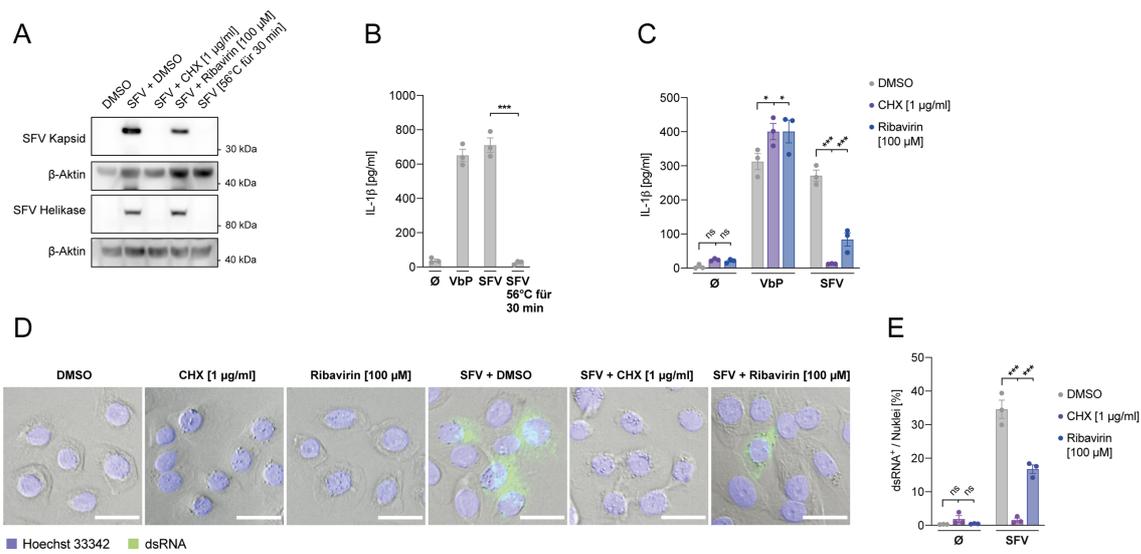


Abbildung 11: Die Aktivierung von NLRP1 durch SFV ist abhängig von viraler Proteintranslation und Genomreplikation. (A) Keratinozyten wurden mit DMSO behandelt oder mit dem Translations-Initiationsinhibitor CHX oder dem Nukleosidinhibitor Ribavirin für 1 Stunde behandelt und dann mit SFV oder mit hitzeinaktiviertem SFV für 16 Stunden infiziert. Die SFV-Kapsid- und Helikase-Proteinexpression wurde mittels WB bestimmt. (B) Keratinozyten wurden mit VbP stimuliert oder mit SFV oder hitzeinaktiviertem SFV infiziert und anschließend auf IL-1 β -Freisetzung untersucht. (C) Keratinozyten wurden mit DMSO, CHX oder Ribavirin für 1 Stunde behandelt und dann mit VbP stimuliert oder mit SFV bei einer MOI von 1 für 16 Stunden infiziert und anschließend auf IL-1 β -Freisetzung untersucht. (D und E) Keratinozyten, die wie in (C) behandelt worden waren, wurden fixiert und anschließend für dsRNA (grün) gefärbt, während die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt wurden. Maßstabsbalken: 25 μ m. Repräsentative Bilder von einem von drei Experimenten sind in (D) dargestellt, während die Daten von drei unabhängigen Experimenten in (E) zusammengefasst sind. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (B, C und E), als ein repräsentatives Experiment von drei (D) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (A). Die Statistik zeigt die Signifikanz durch one-way ANOVA (B) beziehungsweise two-way ANOVA (C und E): *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Um das NLRP1-aktivierende Agens ausfindig zu machen, führten wir eine Charakterisierung der Infektion mittels Hitze-inaktiviertem Virus sowie Inhibitoren durch. Hitzeinaktivierung hob, wie erwartet, die Fähigkeit von SFV auf, Keratinozyten produktiv zu infizieren und eine IL-1 β -Freisetzung auszulösen (Abbildung 11, A und B). Daher wird die Stimulation entweder durch ein Hitze-labiles Protein *per se*, virale Translation oder eine replikative Aktivität von SFV vermittelt. Daher behandelten wir Zellen mit dem Translations-Initiationsinhibitor Cycloheximid (CHX), um die virale *de-novo*-Protein-Translation zu verhindern. Mittels WB konnten wir eine Aufhebung der viralen Protein-Translation nachweisen, da weder das Kapsid noch die Helikase von SFV nach CHX-Behandlung im Zelllysate detektiert werden konnten (Abbildung 11A). Des Weiteren konnten wir keine IL-1 β -Antwort nach Vorbehandlung mit CHX und anschließender SFV-Infektion beobachten, obwohl die VbP-vermittelte Inflammasomaktivierung nicht gehemmt wurde (Abbildung 11C). Es schien also weder eintreffendes Protein noch das eintreffende SFV-Genom von NLRP1 direkt erkannt zu werden, sondern eine virale Translation oder Replikation war erforderlich, um NLRP1 zu aktivieren. Wie zuvor schon erwähnt ist SFV ein (+)ssRNA-Virus, welcher für eine erfolgreiche Replikation sein Genom in (-)ssRNA transkribieren muss, wodurch kurzzeitig dsRNA entsteht. Um also die Rolle der Replikation zu untersuchen, behandelten wir die Zellen mit Ribavirin, welches die RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*) des SFV blockiert³³⁶. Die Behandlung mit Ribavirin hatte keinen Einfluss auf die Expression viraler Proteine, jedoch führte sie zu einem deutlichen Rückgang der durch SFV-Infektion ausgelösten IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 11, A und C). Um den Einfluss der CHX- und Ribavirin-Behandlung in Bezug auf Generierung von dsRNA, welche im Verlauf der viralen Replikation entsteht, zu überprüfen, färbten wir SFV-infizierte Zellen mit einem Antikörper

(J2) an, der spezifisch dsRNA detektiert (Abbildung 11D). Wir konnten ein starkes Signal für dsRNA nach SFV-Infektion detektieren, wohingegen die Behandlung mit Cycloheximid die dsRNA-Bildung weitgehend unterband und die Behandlung mit Ribavirin zu einer Reduktion des Signals für dsRNA führte (Abbildung 11D). Zur Quantifizierung wurden dsRNA-positive Zellen gezählt und mittels Nukleusfärbung aller Zellen die Prozentzahl an dsRNA-positiven Zellen ermittelt (Abbildung 11E). Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass die Ausbildung von dsRNA ausschlaggebend für die Aktivierung von NLRP1 ist.

4.3 NLRP1 wird durch lange dsRNA aktiviert

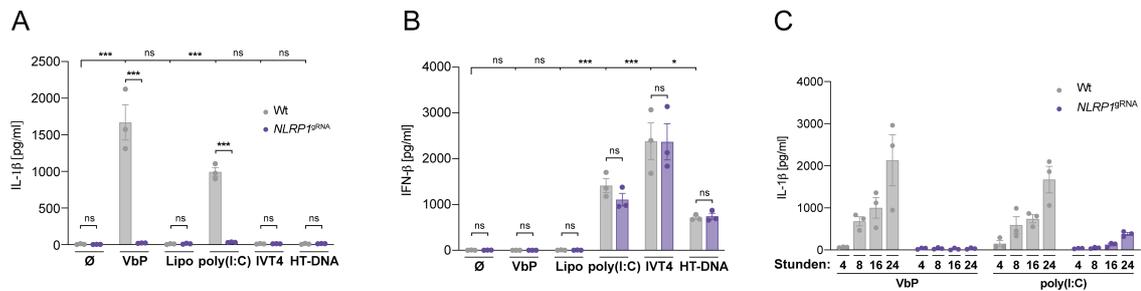


Abbildung 12: NLRP1 ist ein Sensor für lange dsRNA. (A und B) Unveränderte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden mit VbP stimuliert oder mit poly(I:C), IVT4 oder HT-DNA unter Verwendung von Lipofectamine (Lipo) transfiziert. Für diese und die folgenden Experimente wurden die Zellen 22 Stunden mit VbP und 10 Stunden für die Transfektion stimuliert. Die IL-1β- (A) oder IFN-β-Freisetzung (B) wurden bestimmt. (C) Unveränderte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden mit VbP stimuliert oder mit poly(I:C) transfiziert und die Proben nach 4 Stunden, 8 Stunden, 16 Stunden oder 24 Stunden geerntet und die IL-1β-Freisetzung wurde bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (A, B und C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA : *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Die vorangegangenen Ergebnisse legten nahe, dass eine dsRNA-Bildung für die NLRP1-Inflammasomaktivierung erforderlich sein könnte. Im Verlauf einer Positivstrang-RNA-Virusreplikation wird dsRNA als Intermediat bei der Genomreplikation generiert und eine Inhibition dieses Vorgangs durch Ribavirin-Behandlung der Zellen reduziert möglicherweise die NLRP1-abhängige Inflammasomaktivierung. Um diese Hypothese zu testen, transfizierten wir unmodifizierte und NLRP1-defiziente Keratinozyten mit poly(I:C), einem synthetischen dsRNA-Analogon mit einer Größe von 1.5 kb bis 8 kb. Ferner testeten wir eine kurze 5'-Triphosphat-Haarnadel-dsRNA (IVT4), von der bekannt ist, dass sie RIG-I aktiviert, sowie ein langes dsDNA-Molekül (HT-DNA), welches den DNA-Sensor cGAS aktiviert. Obwohl alle drei Stimuli zu einer beträchtlichen IFN-β-Antwort führten, welche unabhängig von NLRP1 war, führte nur eine Stimulation mit poly(I:C) zu einer NLRP1-abhängigen IL-1β-Freisetzung (Abbildung 12,A und B). Obwohl in NLRP1-defizienten Zellen nach mehr als 12 Stunden ein redundanter Zelltod stattfand, war die IL-1β-Freisetzung trotzdem auch zu späteren Zeitpunkten NLRP1-abhängig (Abbildung 12C). Lange dsRNA und nicht kurze dsRNA oder dsDNA vermag daher das NLRP1-Inflammasom zu aktivieren.

4.3.1 Die Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA führt zu einer klassischen Pyroptose

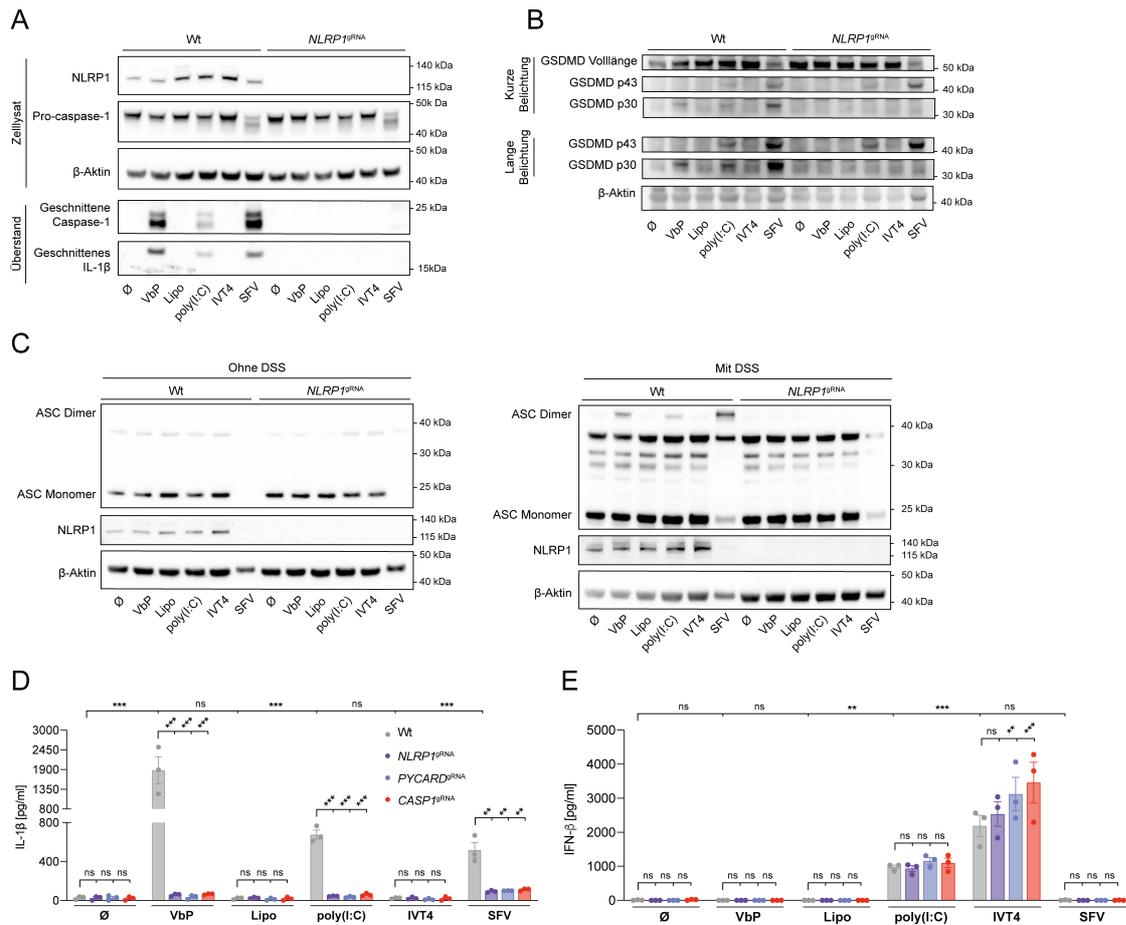


Abbildung 13: Lange dsRNA führt zu einer klassischen Pyroptose mit Prozessierung von Caspase-1, IL-1β und GSDMD, sowie ASC-Oligomerisierung und signalisiert durch eine NLRP1-ASC-Caspase-1-abhängige Signalkaskade in Keratinozyten. (A) Unmodifizierte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden wie angegeben stimuliert. Lysate oder Überstände wurden auf NLRP1, Caspase-1, IL-1β oder β-Aktin untersucht. (B) Unveränderte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden wie angegeben stimuliert und das Lysat auf GSDMD (Volllänge ~53 kDa, pyroptotisches Fragment p30 und apoptotisches Fragment p43) oder β-Aktin untersucht. (C) Unmodifizierte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden wie in (A) stimuliert und entweder unbehandelt gelassen oder mit DSS kreuzvernetzt. Der WB wurde auf NLRP1, ASC oder β-Aktin untersucht. (D und E) Unbehandelte, NLRP1-, ASC- oder Caspase-1-defiziente Keratinozyten wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1β- (D) oder IFN-β-Freisetzung (E) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (D und E), als ein repräsentatives Experiment von drei (B) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (A und C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, ns = nicht signifikant.

Zur weiteren Charakterisierung der poly(I:C)-abhängigen NLRP1-Aktivierung wurden zunächst Messwerte der NLRP1-Inflammasomaktivierung in Keratinozyten untersucht, die näher an der Rezeptoraktivierung liegen. Dies war einerseits eine Überprüfung auf Oligomerisierung des Adapterproteins ASC, welches mittels DSS-Kreuzvernetzung und anschließendem WB detektiert werden kann. Andererseits überprüften wir auch die Reifung von Caspase-1 und IL-1β mittels WB. Diese Untersuchungen zeigten typische Ergebnisse einer Inflammasomaktivierung nach VbP-Stimulation, sowie auch nach einer SFV-Infektion und poly(I:C)-Transfektion: So konnte mittels WB eine autoproteolytische Spaltung von Caspase-1 sowie Reifung von IL-1β festgestellt werden (Abbildung 13A). Ferner wurde eine pyroptotische GSDMD-Spaltung mittels WB festgestellt. In unmodifizierten N/TERT-1 führte die NLRP1-Aktivierung zur Ausbildung des typisch pyroptotischen Fragments p30, im NLRP1 KO dahingegen wurde das typisch apoptotische Fragment p43 detektiert (Abbildung 13B). Außerdem konnte ebenso mittels DSS-Kreuzvernetzung des Lysats und anschließendem WB eine ASC-Polymerisation in einer vollständig NLRP1-abhängigen Weise festgestellt werden (Abbildung 13C). Ferner war die NLRP1-vermittelte IL-1β-Freisetzung nach

Behandlung dieser Zellen mit den oben genannten Stimuli vollständig ASC- und Caspase-1-abhängig (Abbildung 13, D und E).

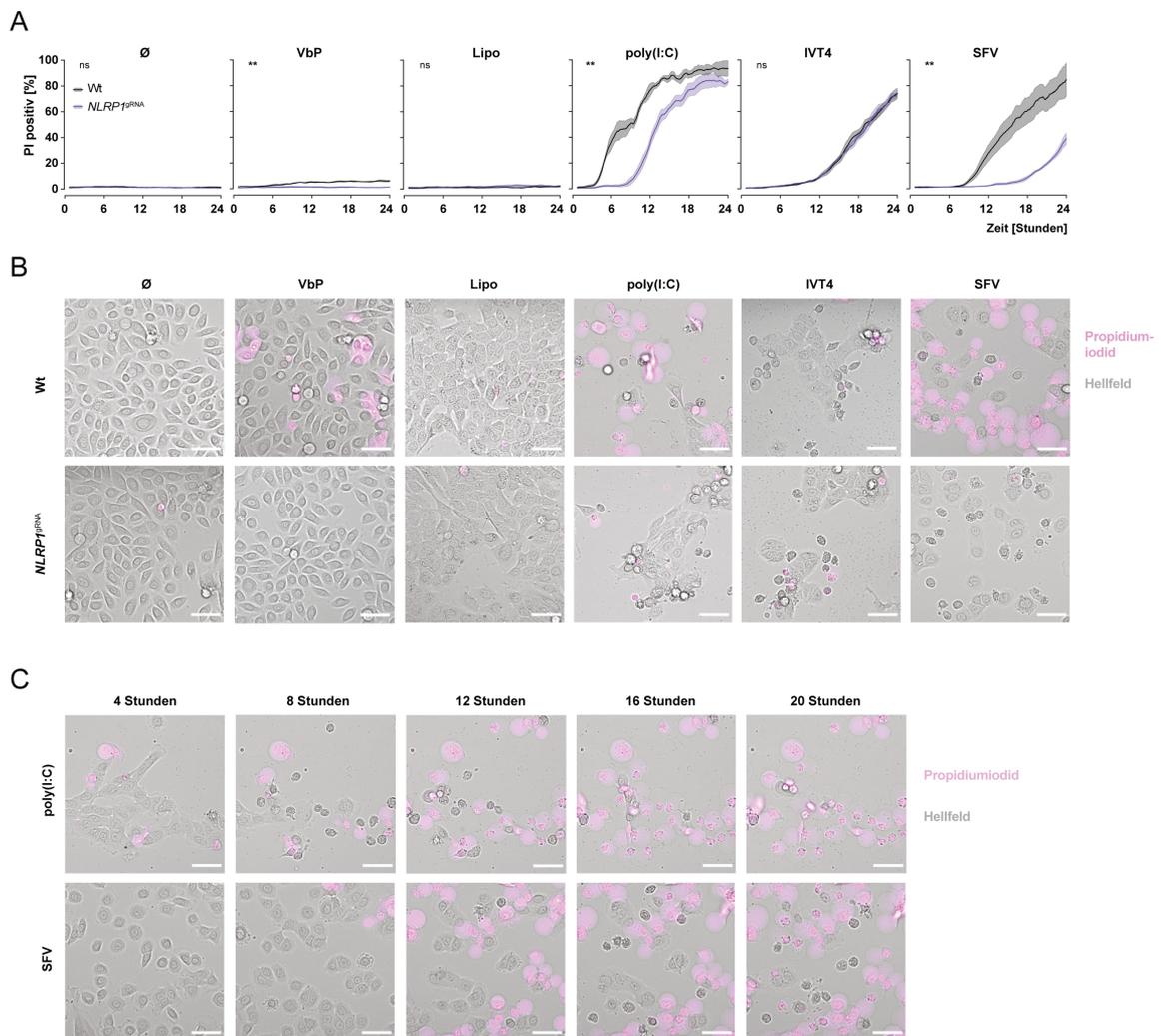


Abbildung 14: Sowohl poly(I:C)-Transfektion als auch eine SFV-Infektion führen zu einem klassischen pyroptotischen Phänotyp mit PI-Aufnahme. (A) Unmodifizierte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden wie angegeben stimuliert, mittels *time-lapse microscopy* auf PI-Positivität über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert und der Prozentsatz der PI-positiven Zellen ist dargestellt. **(B)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von (A) sind als eines von drei Experimenten dargestellt und zeigen 21 Stunden (Kontrolle und VbP-Stimulation), 14 Stunden (SFV-Infektion) oder 10 Stunden (Transfektionen) nach der Stimulation. Maßstabsbalken: 25 µm. **(C)** Keratinozyten wurden mit poly(I:C) transfiziert oder mit SFV infiziert und über einen Zeitraum von 4 Stunden, 8 Stunden, 12 Stunden, 16 Stunden und 20 Stunden in Gegenwart von Propidiumiodid abgebildet. Maßstabsbalken: 25 µm. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (A), beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von drei (B und C) dargestellt. Die Statistiken für die PI-Positivität wurden durch eine *repeated measures two-way ANOVA* analysiert und die Signifikanz des Spaltenfaktors wurde bestimmt: *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, ns=nicht signifikant.

Als nächstes wurden N/TERT-1-Zellen nach SFV-Infektion oder poly(I:C)-Transfektion mittels *time-lapse microscopy* phänotypisch untersucht. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit von Propidiumiodid (PI), einem nicht zellpermeablen Nukleinsäureinterkalator, stimuliert und in einem Zeitverlauf abgelichtet. Durch Inflammasomaktivierung und GSDMD-Spaltung kann so ein prototypisch ballonähnliches Aufblähen der Zellen sichtbar gemacht werden, welches, begleitet durch das Einströmen von Propidiumiodid, zu einer Violettfärbung der Zellen führt. So wurde gezeigt, dass die Inflammasomaktivierung durch eine virale Infektion sowie Transfektion mit dsRNA abhängig von NLRP1 ist (Abbildung 14B). Sowohl die SFV-Infektion als auch die poly(I:C)-Transfektion führten zu einem Verlust der Zellviabilität, der in der frühen Phase nach der Stimulation vollständig NLRP1-abhängig war (Abbildung 14A). In Abwesenheit des Sensorproteins

NLRP1 kam es dennoch zu späteren Zeitpunkten zu einem NLRP1-unabhängigen und redundanten Zelltod. Dieser ging jedoch mit dem Auftreten eines größeren C-terminalen GSDMD-Fragments einher, was mit der sekundären Aktivierung des apoptotischen Signalwegs im Einklang ist (Abbildung 13B). In Übereinstimmung mit früheren Berichten führte die Behandlung mit VbP in geringem Ausmaß zum Zelltod der Keratinozyten⁹⁹. Die mikroskopische Beurteilung des Phänotyps dieser Keratinozyten zeigte charakteristische Merkmale der Pyroptose. So zeigten unmodifizierte, aber nicht NLRP1-defiziente Zellen, nach SFV-Infektion oder poly(I:C)-Transfektion ein Aufblähen der Zellmembran in Verbindung mit einer Propidiumiodidfärbung (Abbildung 14C).

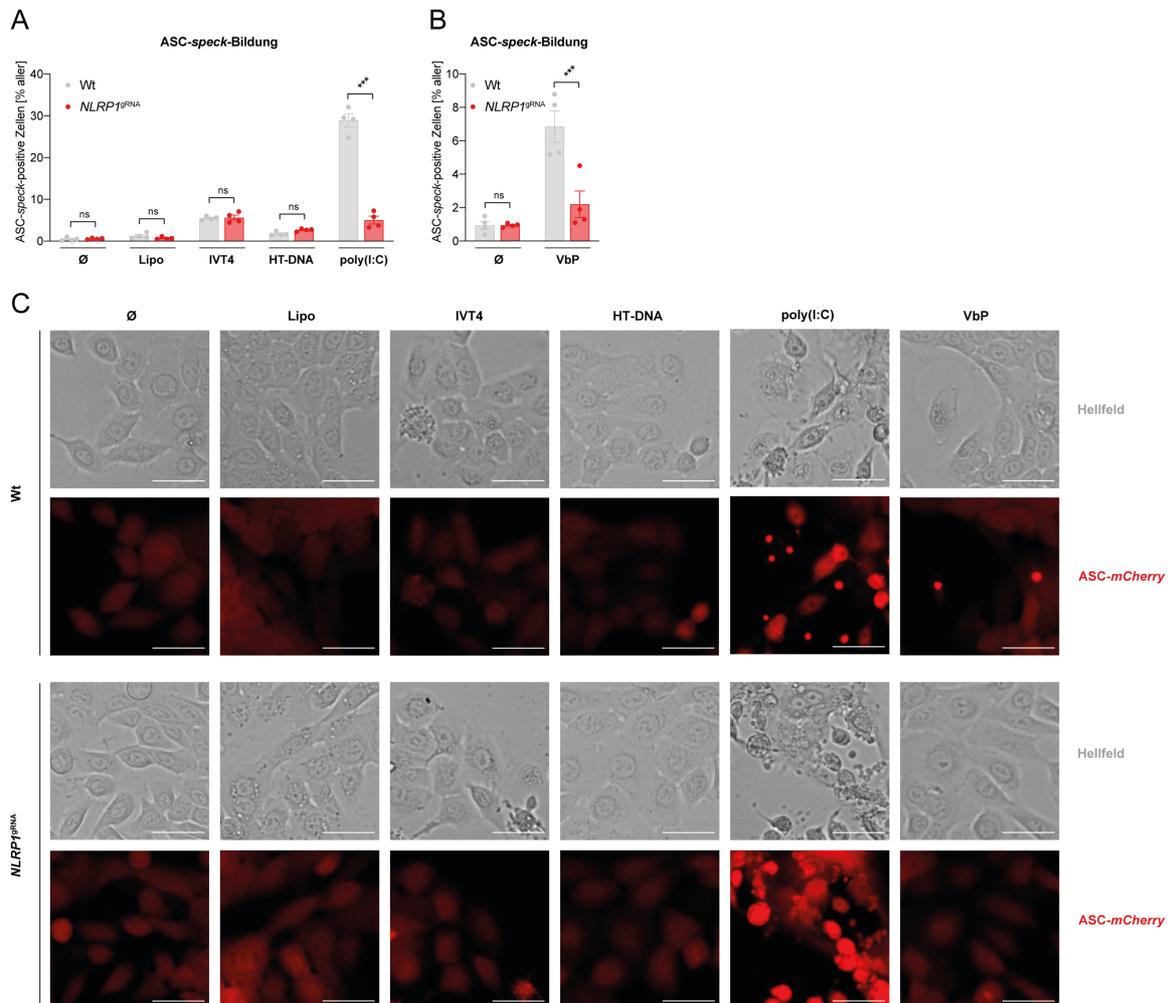


Abbildung 15: Lange dsRNA induziert einen klassischen pyroptotischen Phänotyp mit ASC-speck-Bildung. (A und B) Unveränderte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten, welche mit einem Transgen für *ASC-mCherry* komplementiert worden waren, wurden mit IVT4, HT-DNA oder poly(I:C) mittels Lipofectamine transfiziert oder mit VbP stimuliert. Die Zellen wurden 7 Stunden (A) oder 18.5 Stunden (B) nach der Stimulation auf die Bildung von ASC-specks untersucht und der Prozentsatz der ASC-speck-positiven Zellen ist dargestellt. (C) Mikroskopische Aufnahmen von (A) und (B) sind als ein repräsentatives Experiment von vier dargestellt. Maßstabsbalken: 25 µm. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von vier unabhängigen Experimenten (A und B) beziehungsweise als ein repräsentatives von vier Experimenten (C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, ns=nicht signifikant.

In weiterer Folge verwendeten wir bei der Untersuchung der dsRNA-abhängigen Inflammasomaktivierung einen Fluoreszenzreporter, den *ASC-mCherry* Reporter. Unter *steady-state*-Bedingungen liegt das Adapterprotein ASC als Monomer im Zytoplasma vor. Nach Aktivierung des Inflammasom-Sensors oligomerisiert ASC. Dies kann durch Fusion des ASC-Proteins mit einem Fluorophor visualisiert werden: Nach Aktivierung bilden sich *ASC-specks*, die durch übliche Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden können. Dazu transduzierten wir Wildtyp- und NLRP1-defiziente Keratinozyten mit einem *ASC-mCherry* Reporter zur Quantifizierung der Pyroptosomaktivierung. Hiermit konnten wir *ASC-specks* nach poly(I:C)-Stimulation in einer NLRP1-

abhängigen Weise nachweisen (Abbildung 15, A bis C). Obwohl ein redundanter Zelltod in NLRP1-defizienten Keratinozyten festgestellt werden konnte, sind die typischen Merkmale einer Inflammasomaktivierung NLRP1-abhängig. Anhand dieser Experimente konnten wir klassische Merkmale einer Pyroptose nach poly(I:C)-Transfektion und SFV-Infektion in einer NLRP1-abhängigen Art und Weise nachweisen.

4.3.2 Die Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA ist abhängig von der Länge der dsRNA

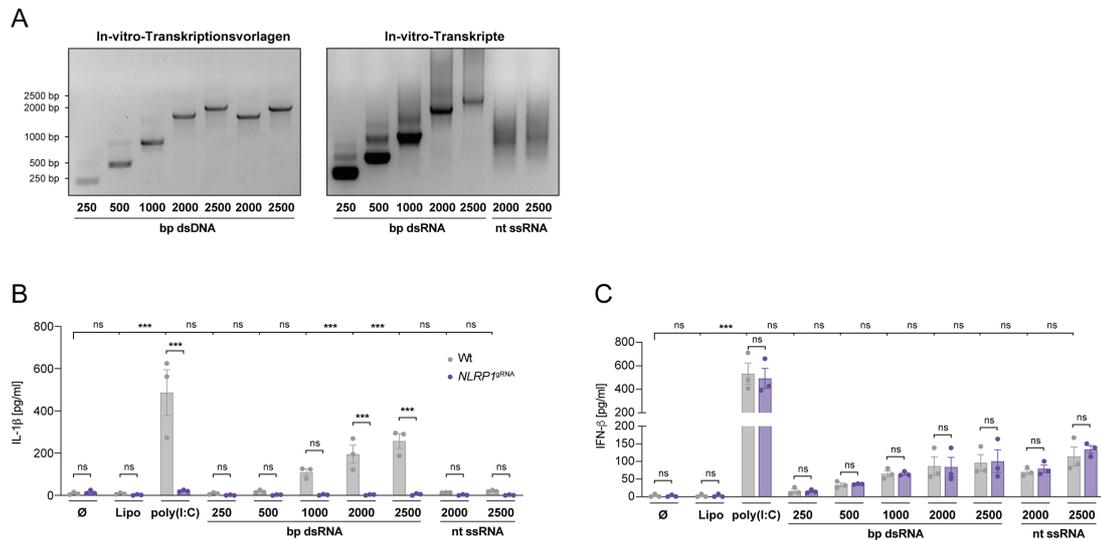


Abbildung 16: Die Aktivierung von NLRP1 ist abhängig von der Länge der dsRNA. (A) Dargestellt sind die DNA In-vitro-Transkriptionsvorlagen für die In-vitro-Transkription und die resultierenden In-vitro-Transkripte. (B und C) RNA-Moleküle, die wie in (A) gezeigt erzeugt worden waren, wurden in unmodifizierte oder NLRP1-defiziente Keratinozyten transfiziert, während poly(I:C) als Kontrolle verwendet wurde und die IL-1β- (B) oder IFN-β-Freisetzung (C) wurden bestimmt. Die Daten sind als ein repräsentatives Experiment von zwei (A) beziehungsweise als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (B und C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, ns=nicht signifikant.

Als nächstes fragten wir uns, inwiefern die Aktivierung von NLRP1 abhängig von der Länge der dsRNA ist. In vorangegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass poly(I:C), welches ein langes, nicht-physiologisches dsRNA-Homopolymer von undefinierter Länge ist, NLRP1 aktiviert. IVT4, eine kurze dsRNA, vermochte dies jedoch nicht. Bei dem dsRNA-Sensor MDA5 konnte schon eine Größenabhängigkeit bei der Aktivierung des Sensors gezeigt werden⁵⁸. Daher erzeugten wir mittels IVT verschiedene dsRNA-Moleküle im Bereich von ungefähr 250 bp bis ungefähr 2500 bp (Abbildung 16A). Zur Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms war eine dsRNA nötig, welche länger als 500 bp war und die Aktivierung nahm mit der Länge stetig zu (Abbildung 16B). Ein 2500-bp-dsRNA-Molekül übte etwa die Hälfte der Aktivität von poly(I:C) aus, wohingegen ssRNA-Transkripte dieser Länge *in vitro* keine NLRP1-Inflammasomaktivierung auslösten. Die IFN-β-Produktion, als Messwert für RLR-Signalisierung, zeigte ein anderes Reaktionsmuster, was darauf hindeutet, dass diese PRR-Systeme funktionell nicht miteinander verbunden sind (Abbildung 16C). Eine Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA ist daher abhängig von der Länge der Nukleinsäure.

4.4 Zellen epidermalen Ursprungs zeigen eine NLRP1-abhängige Inflammasomaktivierung nach dsRNA Stimulation

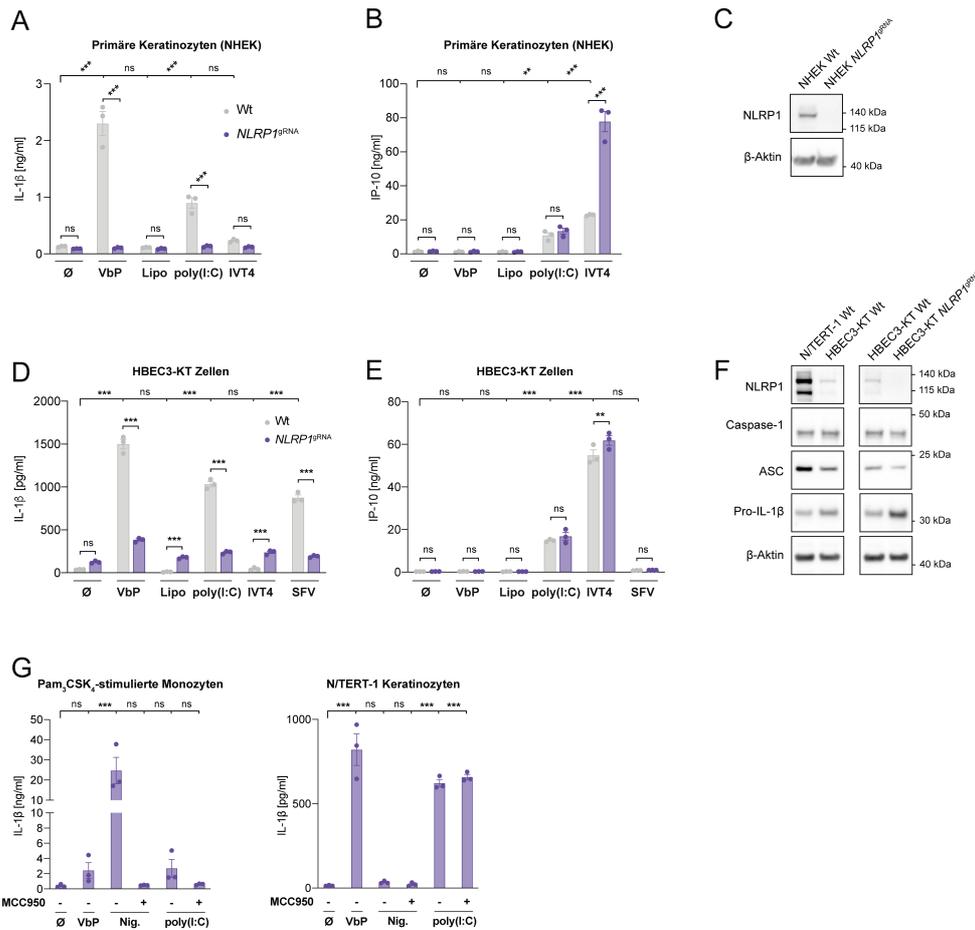


Abbildung 17: Lange dsRNA aktiviert das NLRP1-Inflammasom sowohl in primären humanen Keratinozyten als auch in immortalisierten humanen Bronchialepithelzellen. (A und B) Unveränderte oder NLRP1-defiziente primäre normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden mit VbP stimuliert oder mit poly(I:C) oder IVT4 mittels Lipofectamine transfiziert und die IL-1β- (A) oder IP-10-Freisetzung (B) wurden bestimmt. (C) Lysate von unmodifizierten oder NLRP1-defizienten NHEK wurden für NLRP1 oder β-Aktin geblottet. (D und E) Unveränderte oder NLRP1-defiziente Bronchialepithelzellen wurden mit VbP stimuliert, mit poly(I:C) oder IVT4 mittels Lipofectamine transfiziert oder mit SFV infiziert und die IL-1β- (D) oder IP-10-Freisetzung (E) wurden bestimmt. (F) Lysate von Keratinozyten, unveränderten oder NLRP1-defizienten Bronchialepithelzellen wurden für NLRP1, ASC, Caspase-1, IL-1β oder β-Aktin geblottet. (G) Keratinozyten und Pam₃CSK₄-vorbehandelte Monozyten von drei unabhängigen Spendern wurden ohne oder mit MCC950 behandelt, mit VbP oder Nigericin stimuliert oder mit poly(I:C) transfiziert und die IL-1β-Freisetzung wurde bestimmt (Datensatz stammt aus demselben Experiment wie in Abbildung 9, C und D). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (A, B, D, E und G) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (C und F) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, ns=nicht signifikant.

Um die Rolle der dsRNA-Stimulation in einem physiologischeren Modell zu untersuchen, wandten wir uns primären normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) zu. Hier konnten wir ebenso durch Einsatz von RNPs polyklonale *knockouts* mit einer hohen Effizienz generieren (Abbildung 17C). In NHEKs induzierten sowohl VbP als auch poly(I:C) die IL-1β-Freisetzung in einer NLRP1-abhängigen Weise, wobei die IFN-β-Produktion unabhängig von NLRP1 war (Abbildung 17, A und B). Aufgrund von RNA-Sequenzierungsdaten schlussfolgerten wir, dass NLRP1 nicht nur in der Haut, sondern auch in anderen Epithelzelltypen exprimiert wird. Daher untersuchten wir die immortalisierte humane Bronchialepithelzelllinie HBEC3-KT auf ihre dsRNA-Antwort. Auch hier konnten wir durch *knockout*-Generierung eine NLRP1-abhängige und nicht-redundante Rolle für NLRP1 in SFV- und dsRNA-Erkennung beobachten (Abbildung 17, D bis F). Um zu untersuchen, inwiefern die Rolle des NLRP1-Inflammasoms auf Epithelzellen beschränkt ist, befassten wir uns

mit humanen primären Monozyten, welche mit poly(I:C) stimuliert wurden. Hier konnten wir eine MCC950-abhängige Freisetzung von IL-1 β feststellen, was auf eine bekannte Aktivierung von NLRP3 schließen lässt (Abbildung 17G). Dies ist auf Membranpermeabilisierung und anschließendem Kalium-Efflux nach poly(I:C)-Transfektion zurückzuführen, was zu einer klassischen NLRP3-Aktivierung führt³³⁷. Die Aktivierung von NLRP1 ist daher in den von uns untersuchten Modellen spezifisch für Epithelzellen.

4.5 Die Aktivierung durch dsRNA ist speziesspezifisch

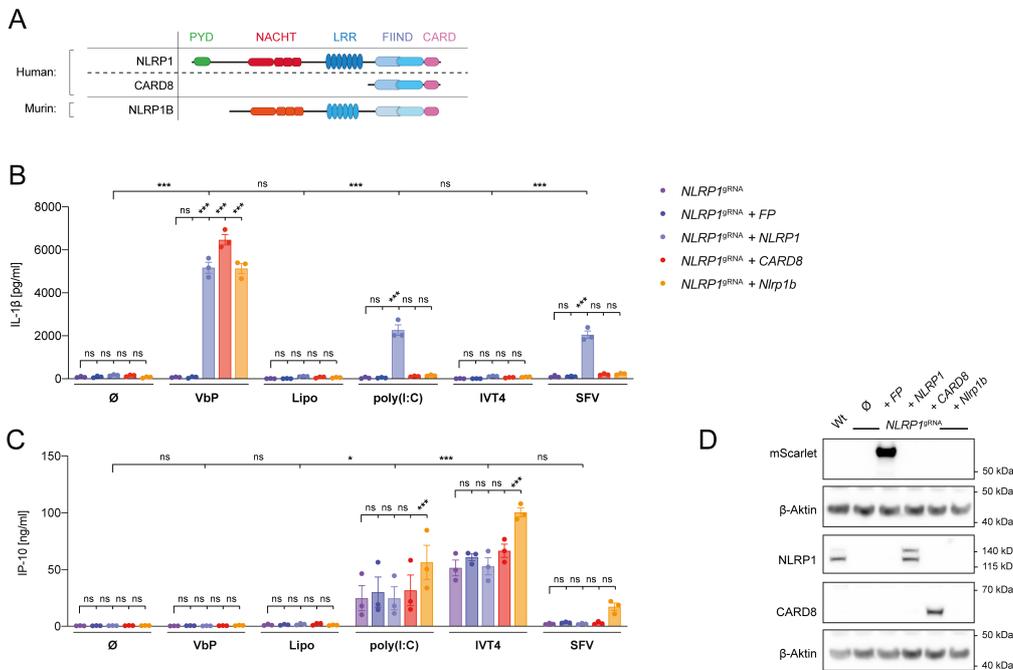


Abbildung 18: Speziesspezifische Detektion von dsRNA durch NLRP1. (A) Schematische Darstellung der Domänenarchitektur von humanem NLRP1, CARD8 und murinem NLRP1B. (B und C) NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden mit einem Transgen für entweder das fluoreszierende Protein *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1*, humanes *CARD8* oder murines *Nlrp1b* komplementiert. Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1 β (B) sowie IP-10-Freisetzung (C) wurden nach der Stimulation bestimmt. (D) WB von unmodifizierten und NLRP1-defizienten Keratinozyten sowie von NLRP1-defizienten Keratinozyten, die mit einem Transgen für entweder *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1*, humanes *CARD8* oder murines *Nlrp1b* komplementiert wurden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (B und C) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (D) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Bisher hatten sich unsere Untersuchungen auf das humane NLRP1 konzentriert. Während im menschlichen System ein *NLRP1*-Gen vorhanden ist, kodieren Mäuse dahingegen für mehrere *Nlrp1*-Paraloga. C57BL/6-Mäuse, zum Beispiel, kodieren für *Nlrp1a*, *Nlrp1b* und *Nlrp1c* und zusätzlich sind fünf hochpolymorphe Allele für *Nlrp1b* beschrieben worden. Die in verschiedenen Inzuchtmausstämmen beschriebenen *Nlrp1b1* und *Nlrp1b5* reagieren auf Anthrax-Letalfaktor sowie VbP. Letalfaktor schneidet am N-Terminus von murinem NLRP1B, aber nicht dem humanem Ortholog, und führt so zu einer Exposition eines Neo-N-Terminus und einer Aktivierung des Inflammasoms durch den *N-end-rule*-Signalweg. Um die Empfindlichkeit des murinen NLRP1B gegenüber einer dsRNA-Behandlung und Positivstrang-RNA-Virusinfektion zu testen, komplementierten wir NLRP1-defiziente Keratinozyten mit einem Transgen für murines *Nlrp1b* (Abbildung 18, A und D). Des Weiteren wurden Keratinozyten mit einem Transgen für humanes *CARD8* komplementiert, für das im murinen System kein Ortholog existiert. NLRP1-defiziente Keratinozyten, die auf diese Weise komplementiert worden waren, wurden in Hinsicht auf ihre Reaktion auf VbP, poly(I:C) oder SFV getestet. NLRP1-defiziente Keratinozyten reagierten nicht auf eine VbP-Behandlung, sezernierten aber IL-1 β , wenn sie mit humanem NLRP1 oder murinem NLRP1B komplementiert worden waren (Abbildung 18B). Zusätzlich reagierten NLRP1-defiziente,

aber mit *CARD8* komplementierte Keratinozyten nun auf VbP. Unsere früheren Untersuchungen hatten gezeigt, dass *CARD8* in Keratinozyten unter *steady-state*-Bedingungen exprimiert wurde, aber gegenüber einer VbP-Behandlung nicht funktionell war (Abbildung 9B). Dies lässt den Schluss zu, dass Keratinozyten entweder begrenzte Mengen von endogenem *CARD8* oder eine nicht-funktionelle Transkriptvariante exprimierten. Eine poly(I:C)-Transfektion und auch eine SFV-Infektion dahingegen stimulierten nur Zellen, die mit einem Transgen für humanes *NLRP1* komplementiert worden waren, nicht aber mit murinem *Nlrp1b* oder humanem *CARD8*. Die Produktion von IP-10, als Maß für die antivirale Genexpression, war von diesen Komplementierungen weitgehend unbeeinflusst (Abbildung 18C). Wir konnten aber durchwegs eine höhere IP-10-Freisetzung in Zellen beobachten, welche mit einem Transgen für murines *Nlrp1b* komplementiert worden waren. Daher ist eine Erkennung von langer dsRNA durch NLRP1 speziesspezifisch: Humanes NLRP1, aber nicht murines NLRP1B, spricht auf eine dsRNA-Stimulation an.

4.5.1 Myeloische Zellen können mit einem dsRNA-detektierendem NLRP1-Inflammasom rekonstituiert werden

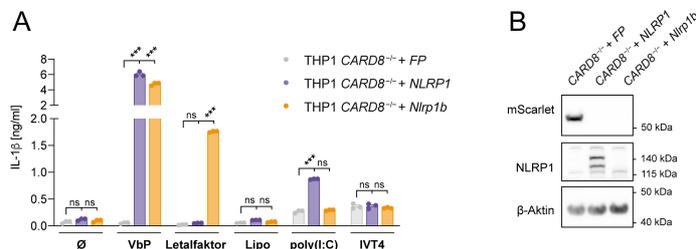


Abbildung 19: Rekonstitution eines dsRNA-aktivierbaren NLRP1-Inflammasoms in myeloischen Zellen. (A) *CARD8*^{-/-} THP-1 wurden mit einem Transgen für entweder das fluoreszierende Protein *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1* oder murines *Nlrp1b* komplementiert. Differenzierte THP-1 wurden für 1 Stunde mit Pam₃CSK₄ stimuliert, für 1 Stunde mit MCC950 inhibiert und dann mit VbP oder Letalfaktor stimuliert oder mit poly(I:C) oder IVT4 mittels Lipofectamine für 10 Stunden transfiziert und die IL-1β-Freisetzung bestimmt. (B) WB von *CARD8*^{-/-} THP-1, komplementiert mit einem Transgen für entweder *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1* oder murines *Nlrp1b*. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (A) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (B) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, ns=nicht signifikant.

In humanen myeloischen Zellen führt eine VbP-Stimulation zu einer vollständig *CARD8*-abhängigen Inflammasomaktivierung²⁵⁰. Des Weiteren hatten wir schon in vorangegangenen Experimenten eine *NLRP3*-abhängige Aktivierung des Inflammasoms nach dsRNA-Behandlung in primären Monozyten festgestellt (Abbildung 17G). Daher fragten wir uns, ob eine Komplementierung von humanem *NLRP1* in *CARD8*^{-/-} THP1-Zellen diese ansprechbar auf eine poly(I:C)-Transfektion machen würde. Deswegen komplementierten wir *CARD8*^{-/-} THP1 mit einem Transgen für humanes *NLRP1* oder murines *Nlrp1b* (Abbildung 19B). Wie erwartet stellte sowohl das humane *NLRP1*- als auch das murine *Nlrp1b*-Transgen eine Reaktivität auf die VbP-Behandlung wieder her (Abbildung 19A). Zusätzlich konnte nun in Zellen, die mit *Nlrp1b* komplementiert worden waren, mittels Letalfaktor, das *NLRP1B*-Inflammasom aktiviert werden. Die Komplementierung mit humanem *NLRP1* führte zu einer poly(I:C)-abhängigen IL-1β-Freisetzung, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als in Keratinozyten. Eine Komplementierung mit murinem *Nlrp1b* hingegen zeigte nur Hintergrundwerte für eine poly(I:C)-abhängige IL-1β-Freisetzung, wohingegen eine starke Reaktivität auf Letalfaktor beobachtet wurde. Die *NLRP1*-abhängige Inflammasomaktivierung kann dadurch in Zellen myeloischen Ursprungs rekapituliert werden.

4.5.2 Die Aktivierung durch dsRNA ist unabhängig von einem Me-Bs-sensitiven *N-end-rule*-Signalweg

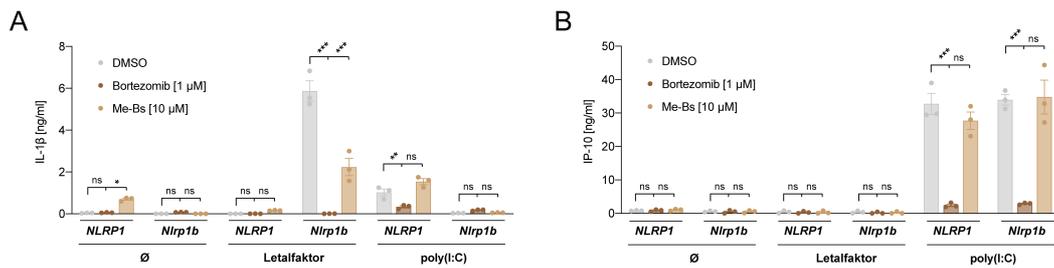


Abbildung 20: Die Aktivierung von humanem NLRP1 durch lange dsRNA ist unabhängig von einem Me-Bs-sensitiven *N-end-rule*-Signalweg. (A und B) NLRP1-defiziente Keratinozyten, die mit einem Transgen für humanes *NLRP1* oder murines *Nlrp1b* komplementiert worden waren, wurden 1 Stunde lang mit Bortezomib oder Me-Bs behandelt. Anschließend wurden sie mit Letalfaktor stimuliert oder mit Lipofectamine mit poly(I:C) transfiziert und die IL-1β- (A) sowie IP-10-Freisetzung (B) wurden nach der Stimulation bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A und B) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des murinen NLRP1B-Inflammasoms abhängig von dem *N-end-rule*-Signalweg sowie von proteasomaler Degradation ist. Daher untersuchten wir die dsRNA-abhängige NLRP1-Aktivierung im Zusammenhang mit dem Aminopeptidase-Inhibitor Bestatin-Methylester (Me-Bs), welcher eine Rolle im *N-end-rule*-Signalweg spielt, sowie Bortezomib, einem Proteasominhibitor^{247,338}. NLRP1-defiziente Keratinozyten, welche mit einem Transgen für *Nlrp1b* komplementiert worden waren, reagierten auf Letalfaktor-Behandlung mit IL-1β-Freisetzung. Dies konnte jedoch durch Vorbehandlung mit Bortezomib komplett unterbunden und durch Vorbehandlung mit Me-Bs reduziert werden (Abbildung 20, A und B). Die durch poly(I:C)-Transfektion ausgelöste IL-1β-Freisetzung von NLRP1-defizienten Keratinozyten, welche mit einem Transgen für humanes *NLRP1* komplementiert worden waren, wurde durch eine Vorbehandlung mit Bortezomib reduziert, blieb jedoch von einer Me-Bs-Behandlung unbeeinflusst. Die Proteasom-Inhibition vermag die dsRNA-abhängige Aktivierung von humanem NLRP1 zu reduzieren. Der Me-Bs-sensitive *N-end-rule*-Signalweg scheint jedoch keine Rolle bei der dsRNA-abhängigen humanen NLRP1-Aktivierung zu spielen. Es ist hier jedoch zu bedenken, dass eine Me-Bs-unabhängige Erkennung möglicher anderer N-terminaler Aminosäuren nicht ausgeschlossen wird.

4.6 Bekannte dsRNA-Sensoren spielen keine Rolle bei der Aktivierung von NLRP1 durch dsRNA

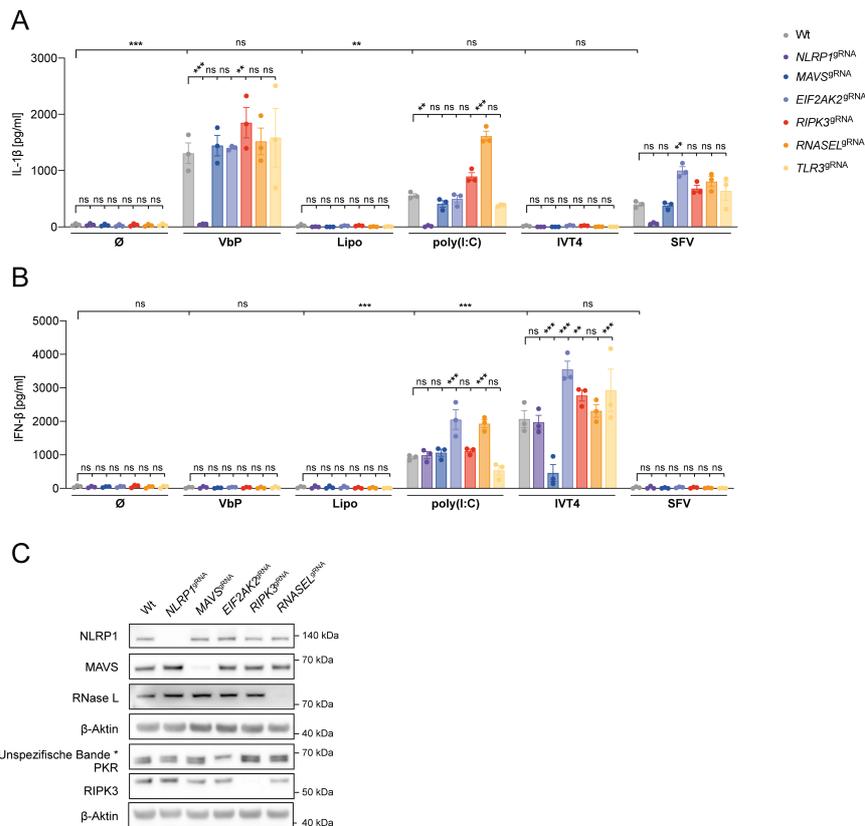


Abbildung 21: Charakterisierte dsRNA-PRRs sind für die poly(I:C) oder SFV-vermittelte NLRP1-Inflammasomaktivierung nicht erforderlich. (A und B) Unmodifizierte, NLRP1-, MAVS-, PKR-, RIPK3-, RNase L- oder TLR3-defiziente Keratinozyten wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1 β - (A) sowie IFN- β -Freisetzung (B) wurden nach der Stimulation bestimmt. (C) Lysate von unmodifizierten, NLRP1-, MAVS-, PKR-, RIPK3-, oder RNase L-defizienten Keratinozyten wurden auf NLRP1, MAVS, PKR, RIPK3, RNase L oder β -Aktin untersucht. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A und B) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Als nächstes fragten wir uns, ob die Aktivierung von zuvor charakterisierten dsRNA-PRRs indirekt zu einer NLRP1-Inflammasomaktivierung führen könnte. Dazu schalteten wir schon bekannte und charakterisierte dsRNA-Sensoren oder deren kritische Signalverknüpfungswege mit Hilfe von RNPs aus: Wir generierten *knockouts* von TLR3 und PKR (Genname *EIF2AK2*), welche bekannte Sensoren von dsRNA sind, sowie dem Adapter MAVS (Abbildung 21C). MAVS wird *downstream* von MDA5, einem Sensor von langer dsRNA, und RIG-I, einem Sensor von 5'-Triphosphat-RNA, aktiviert. Des Weiteren generierten wir *knockouts* von RIPK3, welches *downstream* von ZBP1 oder TLR3 signalisiert, und RNase L, welche durch OAS-Proteine aktiviert wird. Die dsRNA-Sensor- oder Signalverknüpfungsweg-defizienten Keratinozyten zeigten keinen Defekt in der IL-1 β -Freisetzung nach VbP-Stimulation (Abbildung 21, A und B). Ebenso konnten wir keine Reduktion in der IL-1 β -Freisetzung nach poly(I:C)-Stimulation oder SFV-Infektion feststellen, alleinig eine Depletion von NLRP1 verhinderte diese. Stattdessen konnten wir sogar eine Erhöhung der Inflammasomaktivierung nach Depletion bestimmter Sensoren, wie RNase L, feststellen. Für die Freisetzung von IFN- β konnten wir eine Reduktion nach poly(I:C)-Stimulation in TLR3-defizienten Keratinozyten beobachten, sowie eine Reduktion nach IVT4-Stimulation in MAVS-defizienten Keratinozyten. Daher ist die Aktivierung von humanem NLRP1 unabhängig von bekannten dsRNA-Sensoren.

4.6.1 Die Aktivierungsschwelle von NLRP1 durch dsRNA verschiedener Größen wird durch die PYD reguliert

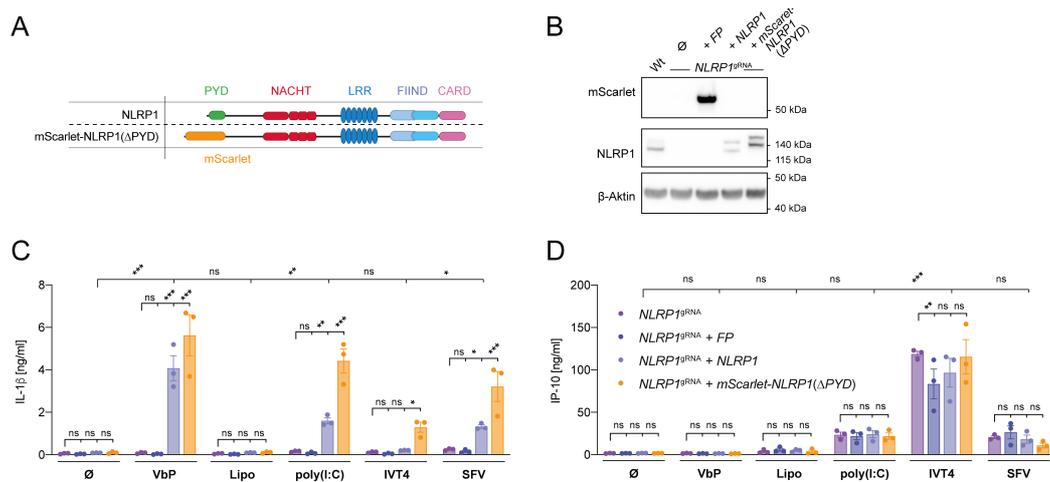


Abbildung 22: Die N-terminale PYD von humanem NLRP1 vermittelt eine autoinhibitorische Funktion und wirkt als Schwellenwertmodulator für die Aktivierung durch dsRNA. (A) Schematische Darstellung von humanem NLRP1 und mScarlet-NLRP1(ΔPYD), einer Variante, bei der die PYD gegen mScarlet ausgetauscht ist. (B) WB von unmodifizierten Keratinozyten, NLRP1-defizienten Keratinozyten oder NLRP1-defizienten Keratinozyten, die mit einem Transgen für entweder *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1* oder *mScarlet-NLRP1(ΔPYD)* komplementiert worden waren. (C und D) Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1β- (C) sowie IP-10-Freisetzung (D) wurden nach der Stimulation bestimmt. Die Daten sind als ein repräsentatives Experiment von zwei (B) beziehungsweise als Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (C und D) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Am N-Terminus von humanem NLRP1 findet sich eine PYD, welche zur Gruppe der *death-fold*-Domänen gehört. Üblicherweise ist die PYD von Inflammasom-Proteinen in der Signaltransduktionskaskade involviert. So findet, unter anderem nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, über Interaktionen der NLRP3-PYD und der ASC-PYD eine Signalamplifikation statt. In vorangegangenen Studien, in denen die Rolle der PYD von humanem NLRP1 charakterisiert worden war, wurde eine autoinhibitorische Funktion identifiziert²⁹². In einer weiteren Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die PYD durch ein GFP-Molekül ersetzt werden konnte und dadurch ein autoinhibierter Zustand – ähnlich zu einem Wildtyp-NLRP1 – hergestellt wurde. Daher klonierten auch wir eine verkürzte Variante von NLRP1, bei der die PYD durch ein monomeres fluoreszierendes Protein ersetzt wurde (Abbildung 22, A und B). NLRP1-defiziente Keratinozyten, welche mit einem Transgen für *mScarlet-NLRP1ΔPYD* komplementiert worden waren, reagierten mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber dsRNA und SFV-Infektion (Abbildung 22, C und D). Des Weiteren konnte nun auch IVT4, eine kurze dsRNA, agonistisch auf NLRP1 wirken, wenn auch in geringerem Maße als lange dsRNA. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die PYD eine negativ-regulatorische Rolle einnimmt und möglicherweise als Schwellenwertmodulator agiert, welcher es NLRP1 ermöglicht lange von kurzer dsRNA zu unterscheiden.

4.6.2 Die Autoproteolyse von NLRP1 ist notwendig für die Aktivierung durch dsRNA

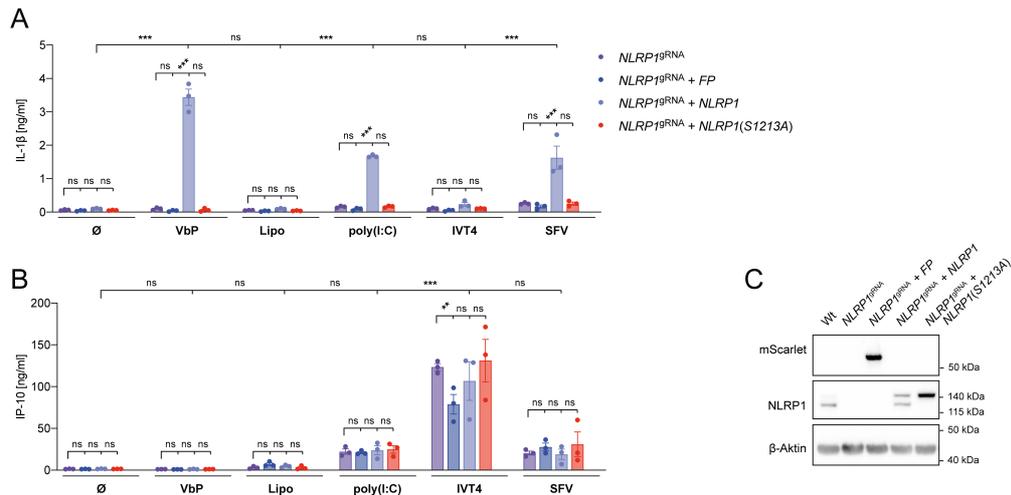


Abbildung 23: Die Aktivierung von humanem NLRP1 durch lange dsRNA ist abhängig von der Autoproteolyse in seiner FIIND-Domäne. (A und B) NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden mit einem Transgen für entweder *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1* oder dessen autoproteolytisch-inaktiver Mutante *NLRP1(S1213A)* komplementiert. Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1 β - (A) sowie IP-10-Freisetzung (B) wurden nach der Stimulation bestimmt. (C) WB von unmodifizierten und NLRP1-defizienten Keratinozyten sowie von NLRP1-defizienten Keratinozyten, welche mit einem Transgen für entweder *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1* oder humanes *NLRP1(S1213A)* komplementiert wurden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A und B) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Die Autoproteolyse von NLRP1 ist eine Grundvoraussetzung für die Aktivierung durch VbP. Das derzeitige Aktivierungsmodell von NLRP1 geht davon aus, dass der C-terminale Teil, bestehend aus UPA-CARD, sich befreit und sich zu einem NLRP1-Inflammasom-Keim assembliert. Um zu untersuchen, ob die dsRNA-vermittelte Aktivierung einem ähnlichen Mechanismus folgt und eine Autospaltung von NLRP1 für die dsRNA-abhängige Pyroptose erforderlich ist, komplementierten wir NLRP1-defiziente Keratinozyten mit einer autoproteolytisch-defizienten Mutante (S1213A) (Abbildung 23C). Hier konnten wir einen Defekt in der Inflammasomaktivierung nach VbP-Stimulation, poly(I:C)-Transfektion und SFV-Infektion nach einer Rekonstitution mit einer autoproteolytisch-inaktiven Mutante feststellen (Abbildung 23, A und B). Daher ist eine Autoproteolyse von NLRP1 für die Inflammasomaktivierung durch dsRNA notwendig.

4.7 Humanes NLRP1 ist ein direkter Sensor für dsRNA

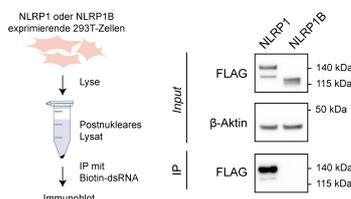


Abbildung 24: Humanes NLRP1, aber nicht murines NLRP1B, bindet dsRNA. 293T-Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, die für N-terminal FLAG-markiertes humanes NLRP1 oder murines NLRP1B kodieren. 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und postnukleare Lysate entweder mit dsRNA(40-mer)-beschichteten *beads* oder Kontrollbeads inkubiert. Nach vier aufeinanderfolgenden Waschvorgängen wurden die *beads* mittels WB auf FLAG analysiert. Zusätzlich wurde der *input* auf FLAG und β -Aktin untersucht. Die Daten sind als ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Da wir durch unsere vorangegangenen Experimente eine indirekte Aktivierung von NLRP1 ausgeschlossen hatten, fragten wir uns, ob NLRP1 als direkter Sensor für dsRNA dienen könnte. Um eine mögliche Interaktion von NLRP1 mit dsRNA zu untersuchen, führten wir eine *immunoprecipitation* (IP) durch. Dazu generierten wir Lysate von 293T-Zellen, welche entweder

humanes FLAG-NLRP1 oder murines FLAG-NLRP1B exprimierten, und führten eine IP mit einem synthetischen, biotinylierten 40-mer dsRNA-Molekül durch. Hierdurch konnten wir eine Interaktion von humanem NLRP1, aber nicht murinem NLRP1B, mit dsRNA feststellen (Abbildung 24).

4.7.1 Humanes NLRP1 bindet an Nukleinsäuren

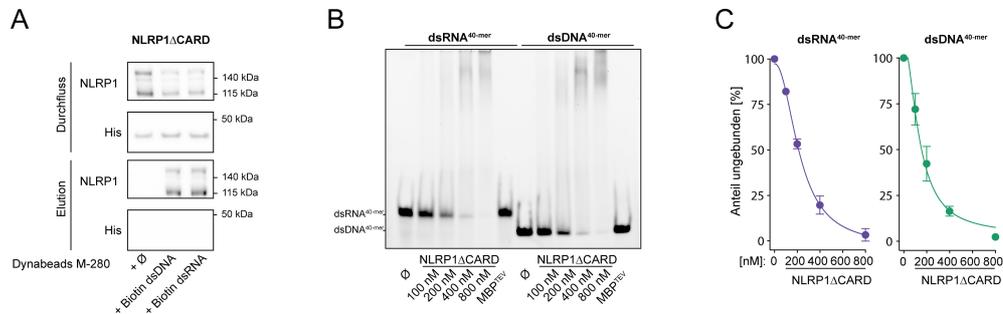


Abbildung 25: Humanes NLRP1 ist ein Nukleinsäure-bindendes Protein. (A) Rekombinantes, TEV-gespaltene humanes NLRP1ΔCARD wurde entweder mit dsDNA- oder dsRNA-beschichteten *beads* (40-mer) oder Kontrollbeads inkubiert. Nach vier aufeinanderfolgenden Waschvorgängen wurden die *beads* mittels WB auf NLRP1 analysiert. Zusätzlich wurde die ungebundene Fraktion auf NLRP1 und His (MBP-Markierung) untersucht. (B) dsRNA oder dsDNA wurden mit aufsteigenden Mengen von rekombinantem, TEV-gespaltene NLRP1ΔCARD für 30 min inkubiert und anschließend über PAGE aufgetrennt. (C) Die ungebundene Fraktion (%) sowohl für dsRNA als auch für dsDNA wurde mit Fiji quantifiziert. Die Daten sind als ein repräsentatives Experiment von drei (A), als ein repräsentatives Experiment von zwei (B) dargestellt beziehungsweise als Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten (C) dargestellt.

Um die Bindung von NLRP1 an dsRNA genauer untersuchen zu können, exprimierten wir rekombinant humanes NLRP1 in Insektenzellen und reinigten dieses auf (Abbildung 26, E und F). Das rekombinante NLRP1-Protein konstruierten wir nach Isoform 5 von humanem NLRP1, welchem die C-terminale CARD fehlt, um eine Oligomerisierung zu vermeiden. Mit diesem Protein wiederholten wir unsere IP-Experimente und konnten neben einer dsRNA- ebenso eine dsDNA-Bindung feststellen (Abbildung 25A). Um eine sensitivere und semi-quantitative Aussage über die Bindungen treffen zu können, führten wir einen EMSA durch. Hier ergaben sich analoge Ergebnisse: Sowohl dsRNA als auch dsDNA zeigten nach Zugabe von NLRP1 einen *shift*, während die Kontrollproteine MBP und TEV keinen *shift* der Nukleinsäuren verursachten (Abbildung 25, B und C).

4.7.2 Humanes NLRP1 zeigt eine starke elektrostatische Ladung

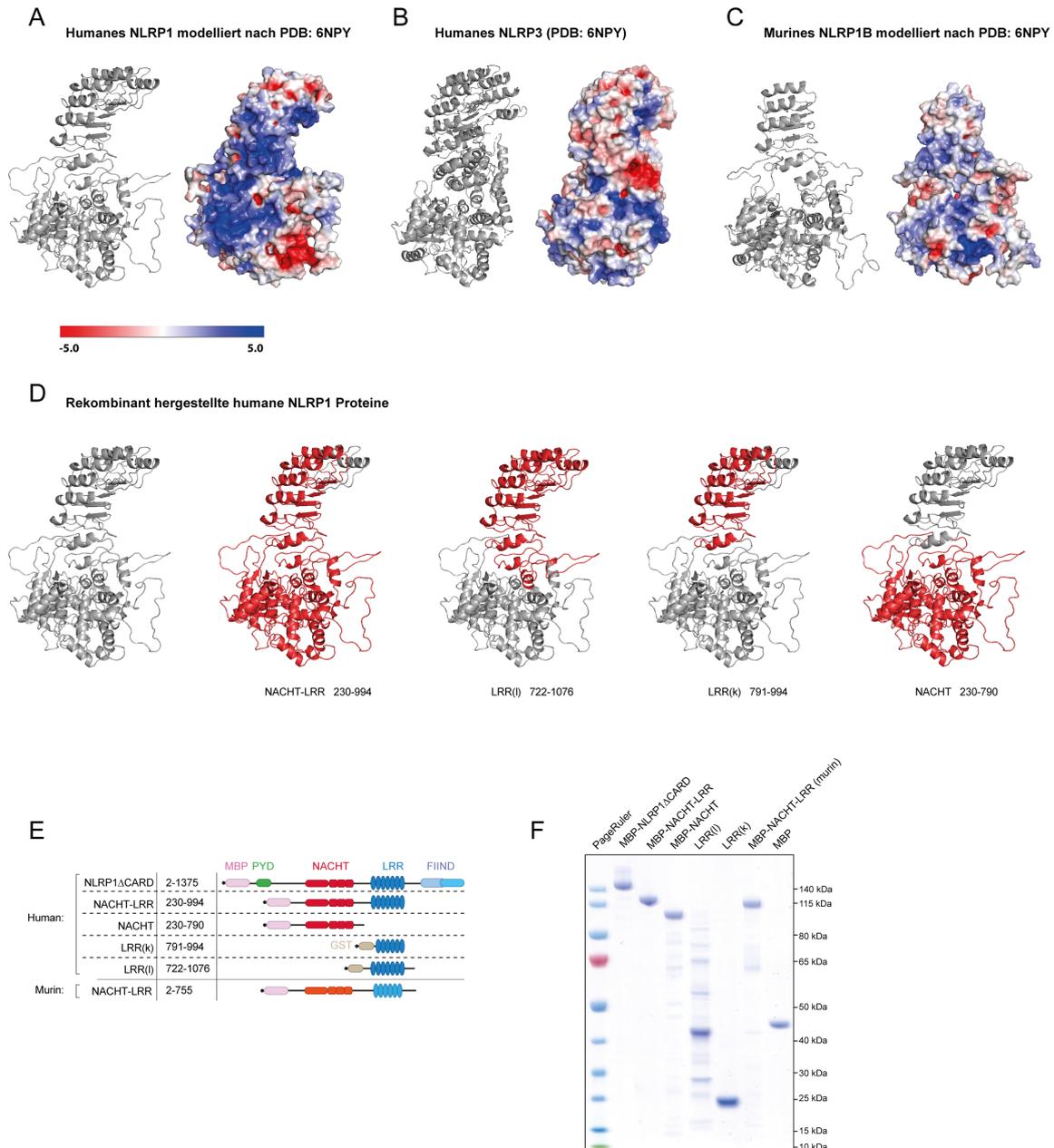


Abbildung 26. Humanes NLRP1 zeigt eine starke positive elektrostatische Oberflächenladung. (A, B und C) *Ribbon diagram* sowie elektrostatische Oberflächendarstellung von humanen NLRP1- (A), humanen NLRP3- (B) oder murinem NLRP1B- (C) NACT-LRR-Domänen. Humanes NLRP1 (aa 258-1050) und murines NLRP1B (aa 30-751) sind dem humanen NLRP3 (aa 134-1034, PDB: 6NPY) nachempfunden. Das elektrostatische Potential ist farbkodiert als -5.0 kT/e (rot) bis +5.0 kT/e (blau), was negative beziehungsweise positive Ladungen anzeigt. (D) *Ribbon diagram* von humanem NLRP1 mit verschiedenen farbkodierten Regionen sind dargestellt, wobei die rekombinant exprimierten Konstrukte dieser Studie auf das Modell projiziert wurden (in Rot dargestellt). (E) Schematische Darstellung der rekombinanten Proteine, die für biochemische assays verwendet wurden. (F) Coomassie-Färbung von gereinigtem und MBP-markiertem NLRP1 Δ CARD, NACT-LRR, NACT, GST-gespaltene LRR(l) und LRR(s) sowie MBP-markiertem NACT-LRR (Maus) und MBP allein. Die Daten sind als ein repräsentatives Experiment von zwei dargestellt (F).

Als nächstes wandten wir uns Modellierungsstudien und der Charakterisierung der Oberflächenladung von humanem NLRP1 zu. Dazu modellierten wir unter Verwendung des HHpred Servers und MODELLER eine Struktur von humanem NLRP1 und murinem NLRP1B anhand einer schon gelösten Struktur von humanem NLRP3 (6NPY) (Abbildung 26, A bis C). Resultierend daraus konnten wir eine große Anzahl von oberflächenexponierten und positiv geladenen Aminosäuren in der LRR- sowie innerhalb der NACT-Domäne von NLRP1 feststellen, welche in NLRP3 sowie NLRP1B nicht ersichtbar waren. Um zu untersuchen, welche Domänen für die dsRNA-Bindung

erforderlich sind, exprimierten und reinigten wir Proteine, dieses Mal aus *E. coli*. Die rekombinanten Proteine umfassten entweder nur die NACHT-Domäne, die NACHT- und LRR-Domäne, oder nur die LRR-Domäne. Für die LRR-Domäne wurden zwei Trunkationen untersucht: Ein längeres (LRR(lang) als LRR(l) bezeichnet) und ein kürzeres (LRR(kurz) als LRR(k) bezeichnet) Konstrukt (Abbildung 26D). Des Weiteren reinigten wir auch ein murines NLRP1B-Protein auf, welches die NACHT- und LRR-Domäne enthält (Abbildung 26, E und F).

4.7.3 Die dsRNA- sowie dsDNA-Bindung von NLRP1 sind ähnlich stark

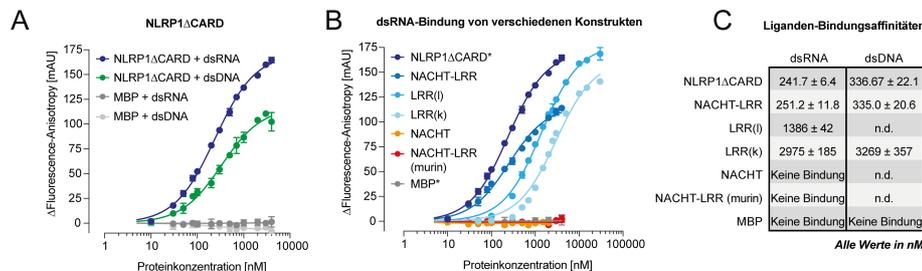


Abbildung 27: NACHT-LRR zeigt ähnliche Bindungsaffinitäten wie NLRP1 Δ CARD auf. (A) Fluoreszenzanisotropie-assays mit NLRP1 Δ CARD oder MBP als Kontrolle zur Untersuchung der Bindungsaffinitäten gegenüber dsRNA und dsDNA. Zehn nanomolar Fluorescein-markierte dsRNA oder dsDNA (20-mer) wurden mit den angegebenen Mengen an Protein inkubiert. (B) Die in Abbildung 26E beschriebenen Proteine wurden auf ihre Neigung zur Bindung an Fluorescein-markierte dsRNA (20-mer) untersucht. * stellt die gleichen Datenpunkte wie in (A) dar. (C) Berechnete Kd-Werte für NLRP1-Proteine (in nM). Die dsDNA-Bindungskurven für NACHT-LRR und die LRR(s) sind nicht abgebildet. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A und B) dargestellt.

Für eine Quantifizierung der Nukleinsäurebindung und Bestimmung der Dissoziationskonstante (Kd), führten wir Fluoreszenzanisotropie-assays mit fluoreszenz-markierten dsRNA- und dsDNA-Molekülen und rekombinatem Protein durch. Hier konnten wir zeigen, dass rekombinantes humanes NLRP1 Δ CARD einen Kd von 241.7 \pm 6.4 nM gegenüber dsRNA und einen Kd von 336.7 \pm 22.1 nM gegenüber dsDNA aufweist (Abbildung 27, A und C). Um die nukleinsäurebindende Domäne ausfindig zu machen, untersuchten wir weitere gereinigte und trunkierte NLRP1-Proteine (Abbildung 26E). So konnten wir für das NACHT-LRR-Protein ähnlich starke Bindungsaffinitäten gegenüber dsRNA (251.2 \pm 11.8 nM) und dsDNA (335.0 \pm 20.6 nM) wie für das NLRP1-Protein in voller Länge messen (Abbildung 27, B und C). Dies lässt den Rückschluss zu, dass entweder die NACHT- oder die LRR-Domäne oder eine Kombination beider für die Nukleinsäureerkennung erforderlich ist. LRR(k) zeigte eine Nukleinsäurebindung, wenn auch stark verringert im Vergleich zu NACHT-LRR. LRR(l) zeigte eine höhere Affinität für dsRNA und dsDNA, was für eine Rolle der N-terminalen Aminosäuren in der Nukleinsäurebindung spricht. Das NACHT-Protein selbst jedoch zeigte keine Affinität für dsRNA und dsDNA. Aber der Befund, dass LRR(l) und NACHT-LRR eine stärkere Bindung aufzeigten als LRR(k) lässt vermuten, dass die NACHT-Domäne zur Nukleinsäurebindung beiträgt. Ein ebenso getestetes murines NACHT-LRR-Protein zeigte weder Bindungsaffinitäten für dsRNA noch dsDNA. Dies bestätigte unsere IP-Experimente, bei denen keine Nukleinsäurebindung für murines NLRP1B beobachtet werden konnte. Daher bindet humanes NLRP1 aber nicht murines NLRP1B mit hoher Affinität an dsRNA und die Bindung wird hier vor allem durch die LRRs vermittelt.

4.7.4 Die Isoform 6 von NLRP1 wird nicht durch dsRNA aktiviert

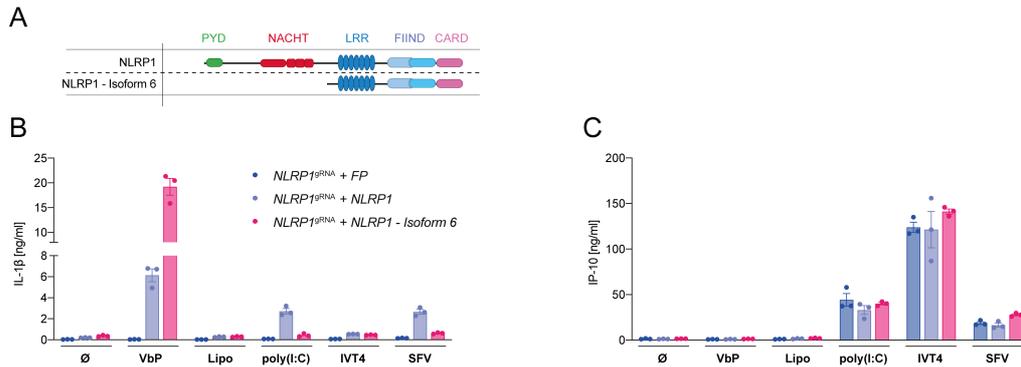


Abbildung 28: Isoform 6 von humanem NLRP1 wird durch VbP aktiviert, ist aber unempfindlich gegenüber dsRNA. (A) Darstellung von humanem NLRP1 - Isoform 6 im Vergleich zu humanem NLRP1 in voller Länge. Der Isoform 6 fehlt die N-terminale PYD- und NACHT-Domäne, sie entspricht aber ansonsten dem humanen NLRP1 in voller Länge. (B und C) Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1 β - (B) sowie IP-10-Freisetzung (C) wurden nach der Stimulation bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von biologischen Triplikaten eines repräsentativen Satzes aus drei unabhängigen Experimenten (B und C) dargestellt.

NLR-Proteine enthalten eine zentrale NACHT-Domäne, welche eine Funktion in der Trigger-induzierten Konformationsänderung und der anschließenden NLR-Oligomerisierung hat. Um die Rolle der NACHT-Domäne bei der Inflammasom-Assemblierung nach dsRNA-Stimulation zu untersuchen, testeten wir die annotierte Isoform 6 von NLRP1, welcher die PYD- und NACHT-Domäne fehlt, die aber noch ihre LRR-, FIIND- und CARD-Domäne besitzt (Abbildung 28A). NLRP1-defiziente Keratinozyten, welche mit einem Transgen für *NLRP1 - Isoform 6* komplementiert worden waren, reagierten zwar mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber VbP, wiesen jedoch keine Reaktionsfähigkeit auf dsRNA-Behandlung und SFV-Infektion auf (Abbildung 28, B und C). Daraus schlossen wir auf eine Rolle der NACHT-Domäne bei der Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms nach dsRNA-Stimulation.

4.8 Die dsRNA-Bindung triggert eine NLRP1-abhängige ATP-Hydrolyse

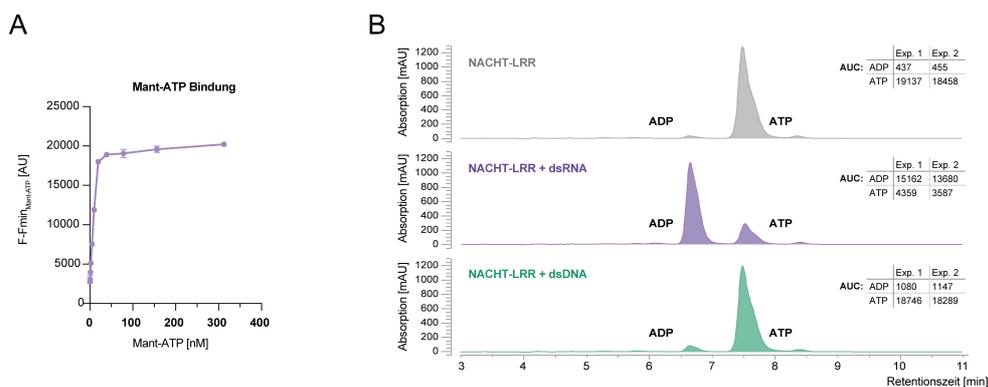


Abbildung 29: dsRNA aktiviert die ATPase-Funktion von humanem NLRP1. (A) 5 μ M rekombinantes NACHT-LRR wurde mit fluoreszierendem Mant-ATP verschiedener Konzentrationen (0.60 nM - 312 nM) inkubiert und FRET durch Anregung von Protein-Tryptophan-Resten und Messung der Mant-ATP-Emission gemessen. (B) Rekombinantes NACHT-LRR wurde entweder mit 20-mer dsRNA, 20-mer dsDNA oder allein in Gegenwart von 100 μ M ATP für 60 min inkubiert. Die Proben wurden dann aufgearbeitet und einer HPLC unterzogen. Die *area under the curve* (AUC)-Werte für ATP- und ADP-Messungen von zwei unabhängigen Experimenten sind als *inserts* dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A) beziehungsweise als eines von zwei biologischen Replikaten (B) eines repräsentativen Satzes aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Nukleinsäurebindung eines Proteins geht nicht notwendigerweise mit seiner Aktivierung einher. So zum Beispiel bindet der dsDNA-Sensor cGAS dsRNA, wird aber dadurch nicht aktiviert. Ebenso bindet der dsRNA-Sensor MDA5 dsDNA, kann aber durch die Bindung nicht aktiviert werden. Wir fragten uns daher, welche zusätzlichen Reaktionen die Bindung von Nukleinsäuren an

NLRP1 auslösen könnte. Da die NACHT-Domäne bestimmter NLRs ATP bindet und nach Aktivierung des Sensors eine ATP-Hydrolyse mit anschließender Oligomerisierung stattfindet, untersuchten wir NLRP1 auf ATP-hydrolytische Eigenschaften. Zuerst charakterisierten wir eine generelle ATP-Bindung des NACHT-LRR-Proteins mittels eines Tryptophan-Fluoreszenz-basiertem FRET-assays mit Mant-ATP. Hier konnten wir, wie schon berichtet, eine hochaffine ATP-Bindung des Proteins beobachten (Abbildung 29A)³³⁹. Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von NLRP1 inkubierten wir das NACHT-LRR-Protein mit ATP (100 μM) in Abwesenheit oder Anwesenheit von dsRNA oder dsDNA (beide 20-mer). Nach 60 min bestimmten wir die ATP- und ADP-Konzentrationen mittels HPLC. So konnten wir zeigen, dass bei einer dsRNA-, aber nicht einer dsDNA-Stimulation, etwa 80 % des ATPs durch NLRP1-abhängige ATP-Hydrolyse in ADP umgewandelt worden war (Abbildung 29B). Eine Interaktion von NLRP1 mit dsRNA führt daher zu Aktivierung der ATPase-Aktivität von NLRP1.

4.8.1 Die NACHT-LRR-Domänen von NLRP1 sind das minimale Motiv für eine ATP-Hydrolyse

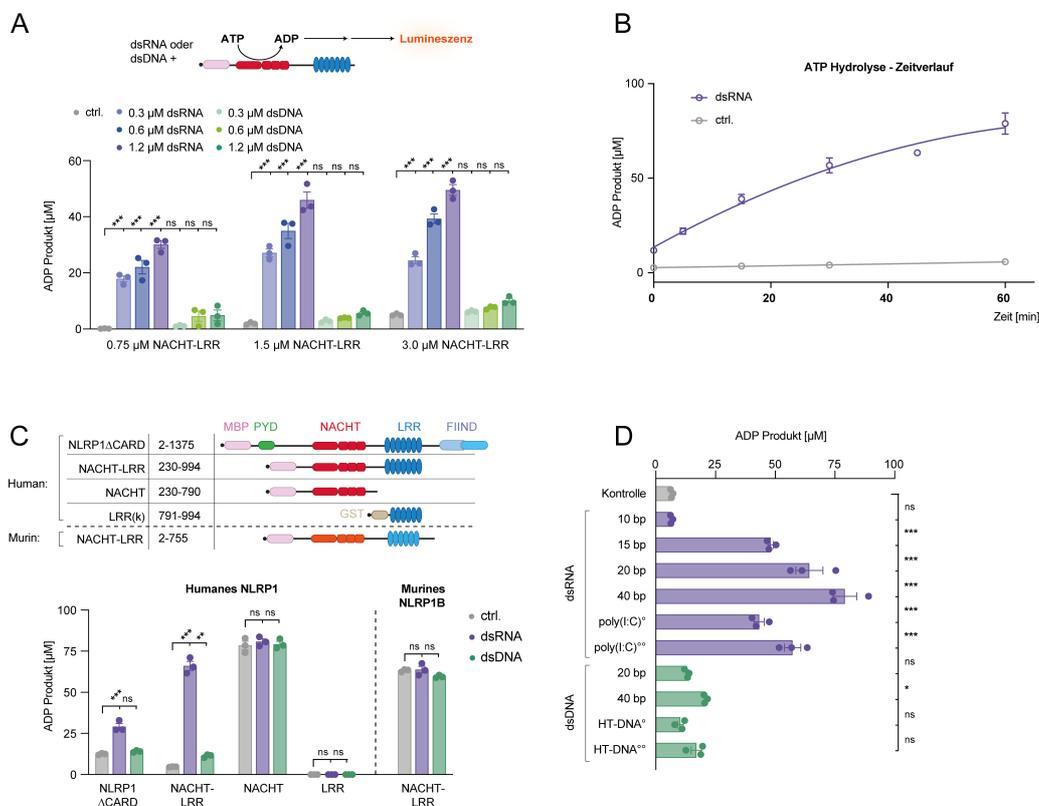


Abbildung 30: dsRNA aktiviert die ATPase-Funktion von humanem NLRP1. (A) Rekombinantes NACHT-LRR wurde in den angegebenen Konzentrationen entweder mit 20-mer dsRNA oder 20-mer dsDNA in den angegebenen Konzentrationen oder allein in Gegenwart von 100 μM ATP inkubiert. Nach 60 min wurde die ADP-Konzentration mit dem *ADP-Glo assay* bestimmt. (B) Rekombinantes NACHT-LRR wurde entweder mit 20-mer dsRNA oder allein in Gegenwart von 100 μM ATP für 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min oder 60 min (für dsRNA) oder 0 min, 15 min, 30 min oder 60 min (für die Kontrolle) inkubiert und die ADP-Konzentration wurde gleichzeitig für alle Proben mit dem *ADP-Glo assay* bestimmt. (C) Rekombinante humane NLRP1-Proteine oder murines NACHT-LRR-Protein wurden entweder mit 20-mer dsDNA, 20-mer dsRNA oder allein in Gegenwart von 100 μM ATP inkubiert. Nach 60 min wurde die ADP-Konzentration mit dem *ADP-Glo-assay* bestimmt. (D) Rekombinantes NACHT-LRR wurde entweder mit dsDNA oder dsRNA verschiedener Größen oder allein in Gegenwart von 100 μM ATP inkubiert. Nach 60 min wurde die ADP-Konzentration mit dem *ADP-Glo assay* bestimmt. ° zeigt 5 ng poly(I:C) oder HT-DNA pro Reaktion an, °° zeigt 10 ng poly(I:C) oder HT-DNA pro Reaktion an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von biologischen Triplikaten (A, B, C und D) eines repräsentativen Satzes aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA (A und C) oder one-way ANOVA (D): *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Zur Quantifizierung der ATPase-Aktivität in einem höheren Durchsatz nutzten wir als nächstes einen biolumineszenten Reporter-*assay*, bei welchem die Generierung von ADP indirekt gemessen wird. Zuerst testeten wir verschiedene Protein- und Ligandenkonzentrationen und konnten dabei eine stabile und spezifische Rolle für eine dsRNA-abhängige ATP-Hydrolyse beim NACHT-LRR-Protein beobachten (Abbildung 30A). Bei der Untersuchung der ATP-Hydrolyserate pro Minute konnten wir für die dsRNA-Stimulation einen Umsatz von 0.6 ATP-Molekülen pro NACHT-LRR-Molekül pro Minute identifizieren (Abbildung 30B). Als nächstes untersuchten wir die gereinigten und trunkierten NLRP1-Proteine auf ihre ATP-hydrolytischen Eigenschaften. Hier konnten wir eine niedrigere ATP-Hydrolyseaktivität für NLRP1 Δ CARD feststellen, was darauf hindeutet, dass die N-terminale PYD eine zusätzliche inhibitorische Rolle ausübt (Abbildung 30C). Für das NACHT-Protein konnten wir eine spontane ATP-Hydrolyse feststellen, welche durch Zugabe von Nukleinsäuren nicht verstärkt werden konnte. Dahingegen konnte für das LRR-Protein keine ATPase-Aktivität gemessen werden. Das murine NACHT-LRR-Protein zeigte, ebenso wie das humane NACHT, eine spontane ATPase-Aktivität. Zur genaueren Bestimmung der ATPase-Aktivität-stimulierenden Nukleinsäure, testeten wir dsDNA- und dsRNA-Konstrukte unterschiedlicher Länge. Hierbei zeigte sich, dass eine minimale Länge von 15 bp noch ausreichend war, um eine ATP-Hydrolyse auszulösen, wohingegen ein 10-bp-Molekül völlig unzureichend war (Abbildung 30D). Die ATPase-Aktivität von NLRP1 wird daher spezifisch durch dsRNA angeregt, welche mindestens 15 bp lang sein muss.

4.8.2 Walker A- und Walker B-Mutanten von NLRP1 reagieren nicht mehr auf dsRNA

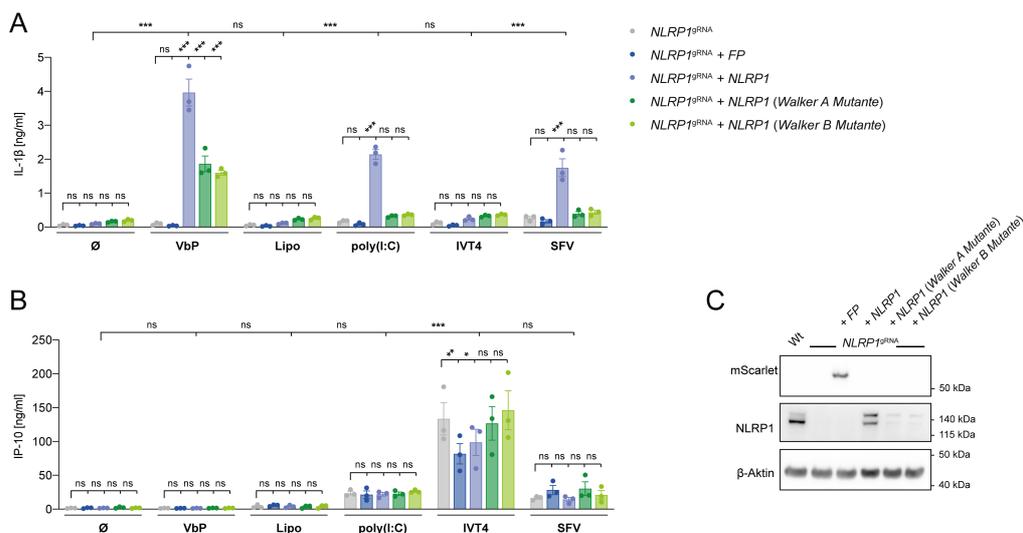


Abbildung 31: Walker A- und B-Mutationen machen humanes NLRP1 unempfindlich gegenüber langer dsRNA, obwohl es noch durch VbP aktiviert werden kann. (A und B) NLRP1-defiziente Keratinozyten wurden mit einem Transgen für entweder das fluoreszierende Protein *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1*, humanes *NLRP1* (Walker A-Mutante) oder humanes *NLRP1* (Walker B-Mutante) komplementiert. Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die IL-1 β - (A) sowie IP-10-Freisetzung (B) wurden nach der Stimulation bestimmt. (C) WB von unmodifizierten und NLRP1-defizienten Keratinozyten sowie von NLRP1-defizienten Keratinozyten, die mit einem Transgen für entweder das fluoreszierende Protein *mScarlet/mTurquoise2* (FP), humanes *NLRP1*, humanes *NLRP1* (Walker A-Mutante) oder humanes *NLRP1* (Walker B-Mutante) komplementiert wurden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (A und B) beziehungsweise als ein repräsentatives Experiment von zwei (C) dargestellt. Die Statistik zeigt die Signifikanz durch two-way ANOVA: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns=nicht signifikant.

Um die Rolle der ATP-bindenden und ATP-hydrolytischen Funktion von NLRP1 in Zellen untersuchen zu können, komplementierten wir NLRP1-defiziente Zellen mit einem NLRP1-Konstrukt kodierend für entweder ein mutiertes Walker A- oder ein mutiertes Walker B-Motiv. Hier konnten wir zuerst eine reduzierte NLRP1-Expression feststellen, welche wahrscheinlich auf spontane Autoaktivität zurückzuführen ist (Abbildung 31C). Dies deckt sich mit einer früheren

Beobachtung, dass ein Walker A-mutiertes NLRP1 eine starke Inflammasomaktivierung ohne zusätzliche Stimulation auslöst¹²⁴. Trotz der reduzierten NLRP1-Expression reagierten die Mutanten immer noch auf die VbP-Stimulation. Im Gegensatz dazu zeigte weder eine poly(I:C)-Transfektion noch eine SFV-Infektion eine IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 31, A und B). Die NACHT-Domäne von NLRP1 scheint daher nach Interaktion des NLRP1-Proteins mit dsRNA eine ATPase-Aktivität auszuüben, welche eine Rolle in der Inflammasomaktivierung spielt.

5 Diskussion

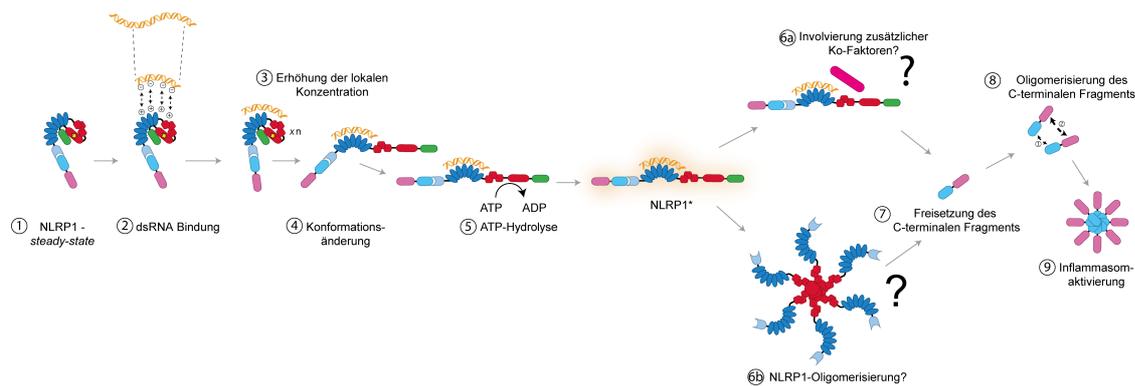


Abbildung 32: Überblick über die Aktivierung des humanen NLRP1-Inflammasoms durch dsRNA. (1) Unter *steady-state*-Bedingungen liegt NLRP1 in einem autoinhibierten Zustand vor. (2) NLRP1 bindet dsRNA aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen. (3) Die lokale Konzentration an NLRP1-Molekülen erhöht sich. (4) NLRP1 durchläuft eine Konformationsänderung aufgrund der dsRNA-Bindung. (5) NLRP1 erlangt eine ATP-hydrolytische Aktivität, welche zu einer weiteren Konformationsänderung (aktiviertes NLRP1*) genutzt werden kann. (6a und 6b) Entweder durch eine Oligomerisierung oder durch zusätzliche Faktoren aktiviert sich das NLRP1-Inflammasom. (7) Das C-terminale UPA-CARD-Fragment wird freigesetzt und (8) oligomerisiert. (9) Der Inflammasom-Keim wird gebildet und führt zur Aktivierung weiterer *downstream*-Signalkaskaden.

Das angeborene Immunsystem schützt uns ständig vor Bedrohungen, wie zum Beispiel vor viralen oder bakteriellen Infektionen. Es basiert dabei unter anderem auf PRRs, die bestimmte, fremde Muster erkennen können und so helfen, Eigen von Fremd zu unterscheiden. Zu den PRRs zählen NLR-Proteine, welche nach Erkennung von PAMPs, DAMPs oder HAMPs, unter anderem, das Inflammasom aktivieren können. Dies ist eine hochmolekulare Plattform zur Aktivierung von Caspase-1, welche wiederum zur Zytokinreifung führt, wie zum Beispiel der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18. Außerdem werden durch die Induktion des pyroptischen Zelltods weitere DAMP-Moleküle freigesetzt und ebenso Replikations-Nischen der Pathogene zerstört. NLRP3 ist der am besten untersuchte Inflammasom-Sensor und kann durch eine Fülle von Stimuli aktiviert werden. Es gibt aber auch eine Reihe anderer Inflammasom-Sensoren, die noch nicht umfassend untersucht wurden. Zu diesen gehört humanes NLRP1, obwohl es der erste entdeckte Inflammasom-bildende Sensor war. Trotzdem war die Wirkungsweise bis vor kurzem nicht vollständig verstanden. Im Gegensatz dazu ist das murine Ortholog NLRP1B besser untersucht worden, da die Maus ein leicht zugängliches Modellsystem ist. So wurde durch *in vivo* Studien die Aktivierung von NLRP1B durch eine *B. anthracis*-Protease entdeckt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von DPPs sowohl das humane NLRP1 als auch das murine NLRP1B aktiviert. Jedoch ist für diese DPP-Inhibition kein pathophysiologisches Pendant bekannt, sodass zu Beginn dieser Studie kein physiologischer Aktivator von NLRP1 vorhanden war. Wir zeigen hier, dass NLRP1 die Infektion mit dem (+)ssRNA-Virus SFV erkennt und das Inflammasom aktiviert. Bei der Untersuchung des Aktivierungsmodus fanden wir virale Nukleinsäure als Auslöser der Inflammasomaktivierung und untersuchten den Aktivierungsmodus weiter in Zellkultursystemen sowie auf molekularer und biochemischer Ebene mittels rekombinanter Proteine. Für einen Überblick über die dsRNA-abhängige NLRP1-Aktivierung siehe Abbildung 32.

5.1 N/TERT-1-Zellen als leicht genetisch veränderbares Werkzeug zur Untersuchung des NLRP1-Inflammasoms

Das Modellsystem, welches wir in unserer Studie verwendet haben, sind die bereits beschriebenen N/TERT-1-Zellen, welche immortalisierte Keratinozyten sind, die jedoch primären Zellen recht ähnlich sind²⁹². Da sich diese Zellen schwer als Einzelzellklone kultivieren lassen, wurden diese Zellen in bisherigen Studien durch lentivirale Transduktion mit einem Konstrukt für Cas9 sowie

Konstrukten für *guide* RNAs gegen das Zielgen genetisch manipuliert⁹⁹. Dieser Prozess ist einerseits zeitaufwendig und andererseits gewährleistet er keinen kompletten *knockout*. Ferner erfordert dieses Verfahren auch die Handhabung der Zellen unter S2-Bedingungen und das Freisetzen von Lentiviruspartikel, um sie dann wieder unter S1-Bedingungen weiter zu behandeln³⁴⁰. Außerdem gestalten sich Rekonstitutionsexperimente aufgrund der begrenzten Anzahl an verfügbaren Selektionsmarkern kompliziert. Wir haben uns daher für eine *knockout*-Generierung mittels RNPs entschieden, was den Prozess nicht nur vereinfacht und sicherer macht, sondern auch beschleunigt. Auf diese Weise können genetische Ablationsstudien innerhalb von einer Woche durchgeführt werden. Die Erzeugung von *knockouts* mittels RNPs wurde bereits für T-Zellen beschrieben, allerdings nur mit einer einzigen *guide*-RNA pro Zielgen und mit einer Effizienz von etwa 40 Prozent³⁴¹. Durch die Verwendung von zwei *guides* pro Zielgen konnten wir einen polyklonalen *pool* von Zellen generieren, welche mit RNPs behandelt worden waren und eine fast vollständige Depletion des targetierten Proteins aufwiesen (Abbildung 9A). Hierdurch konnten wir den Nachweis der IL-1 β -Freisetzung nach VbP-Stimulation in Zellen, die für NLRP1, ASC, Caspase-1 oder IL-1 β depletiert waren, vollständig aufheben (Abbildung 9B). Dies bietet die Möglichkeit, weitere Immunwege in diesem bisher nicht leicht genetisch zu untersuchendem Model zu studieren und weitere, für Epithelzellen spezifische Immunantworten, zu entdecken. In Zukunft könnten generierte *knockouts* auch für 3D-Hautmodelle verwendet werden. Des Weiteren zeigten wir, dass N/TERT-1-Zellen kein funktionales NLRP3- sowie NLRC4-Inflammasom besitzen, da eine Stimulation mit Nigericin oder NT zu keiner IL-1 β -Freisetzung führte (Abbildung 9C und D). Die N/TERT-1-Zellen eignen sich daher ideal zur weiteren Untersuchung des NLRP1-Inflammasoms, da keine Überlagerung durch andere Inflammasom-Sensoren stattfinden kann.

5.2 NLRP1 erkennt die Infektion mit einem (+)ssRNA-Virus

Durch die Verwendung von N/TERT-1-Keratinozyten und Untersuchung einer Reihe von Viren, von denen einige für ihre Hautpathologie bekannt sind, fanden wir, dass eine Infektion mit SFV, einem (+)ssRNA-Virus, das NLRP1-Inflammasom aktiviert (Abbildung 10A). Die Inflammasomaktivierung war komplett abhängig von der Expression von NLRP1 und Infektionen mit den anderen getesteten Viren MVA, HSV-1 und MV zeigten keine Inflammasomaktivierung. Bei weiteren Experimenten konnten wir klassische Anzeichen einer Inflammasomaktivierung nach SFV-Infektion sehen, wie zum Beispiel GSDMD- und IL-1 β -Spaltung, ASC-*speck*-Bildung sowie einen pyroptischen Phänotyp mit Propidiumiodid-Aufnahme (Abbildung 13A, B und C, Abbildung 14A, B und C, Abbildung 15A, B und C). Analog zu den Befunden von Zhong und Reversade in ihrer Publikation von 2016 konnten wir zeigen, dass die PYD für das *downstream-processing* entbehrlich ist, die *downstream*-Aktivierung des Inflammasoms aber ASC-abhängig ist (Abbildung 22C, Abbildung 13D und E)²⁹². Summa summarum konnten wir feststellen, dass neben einer NLRP3-Inflammasomaktivierung durch Influenzaviren sowie einer AIM2-Inflammasomaktivierung durch VACV auch NLRP1 als viraler Inflammasom-Sensor fungiert, welcher eine Infektion mit einem (+)ssRNA-Virus erkennt^{200,231}. Somit konnten wir einen physiologischen Aktivator des menschlichen NLRP1-Inflammasoms identifizieren und humanes NLRP1 als weiteren inflammasombildenden Sensor einer viralen Infektion charakterisieren. So aktivieren Viren neben einer Interferonantwort auch das NLRP1-Inflammasom in humanen Keratinozyten. Dadurch werden benachbarte Zellen nicht nur durch IFN-Freisetzung vor einer viralen Infektion gewarnt, sondern auch auf eine altruistische Art durch die Selbstzerstörung der infizierten Zelle und einer IL-1 β -Freisetzung.

5.3 NLRP1 ist ein PRR für das PAMP dsRNA

Durch den Einsatz von Inhibitoren konnten wir die Bildung von dsRNA als Aktivator für das NLRP1-Inflammasom identifizieren. (+)ssRNA Viren nutzen ihr Positiv-Genom direkt als mRNA zur Translation viraler Proteine. Zur Replikation des Virus aber wird durch die *de-novo* translatierte RdRP ein Negativ-Genom und dadurch dsRNA als Intermediat gebildet. Durch die Hemmung der

de-novo-Translation mittels CHX-Vorbehandlung hemmten wir die Produktion viraler Proteine, darunter auch die der RdRP, und die damit nachgeschaltete Generierung von dsRNA (Abbildung 11A, D und E). Auf der anderen Seite konnten wir durch direkte Hemmung der RdRP mittels Ribavirin-Vorbehandlung ebenso die Generierung von dsRNA direkt hemmen, ohne die *de-novo* Translation anderer viraler Proteine zu beeinflussen (Abbildung 11A, D und E). Beide Ansätze führten entweder zu einer reduzierten Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms oder zu einem kompletten Ausbleiben der Aktivierung (Abbildung 11C). Mittels spezifischer Inaktivierung der RdRP konnten wir die Synthese von dsRNA als Aktivator des NLRP1-Inflammasoms nachweisen. Daher untersuchten wir anschließend ein Reihe ausgewählter Nukleinsäuren auf ihre Fähigkeit, das humane NLRP1-Inflammasom zu aktivieren. Hier konnten wir lange dsRNA, in unserem Fall poly(I:C), als ausreichend für die NLRP1-Aktivierung identifizieren (Abbildung 12A). Obwohl wir nicht ausschließen können, dass zusätzliche Merkmale des viralen Lebenszyklus von NLRP1 detektiert werden, zeigen unsere Daten, dass dsRNA selbst ausreicht, um NLRP1 zu aktivieren. Interessanterweise benötigte es für eine Inflammasomaktivierung aber das lange dsRNA-Analogon poly(I:C), da das kurze Triphosphat-dsRNA-Molekül IVT4 nicht zu einer Inflammasomaktivierung führte (Abbildung 12A). Um diese Größenabhängigkeit für die Inflammasomaktivierung weiter aufzuklären, erzeugten wir dsRNA-Moleküle unterschiedlicher Größe durch In-vitro-Transkription. Diese Experimente zeigten, dass das NLRP1-Inflammasom durch eine dsRNA von mehr als 500 bp aktiviert wurde, während der RLR-Signalweg bereits durch eine dsRNA von 500 bp induziert wurde (Abbildung 16A, B und C). Weiterhin aktivierte eine ssRNA von 2000 nt das NLRP1-Inflammasom nicht, führte aber zu einer Freisetzung von IFN- β . Dies spricht für eine Abgrenzung des IFN- vom IL-1 β -Signalweg. Interessanterweise ist auch die Aktivierung des dsRNA-Sensors MDA5 größenabhängig und benötigt 2 kb lange dsRNA zur Aktivierung⁵⁸. Daher ist NLRP1 in der Lage, zwischen langen und kurzen dsRNA-Molekülen zu unterscheiden und das klassische PAMP lange dsRNA ist ein Aktivator des humanen NLRP1-Inflammasoms.

Von (+)ssRNA-Viren ist bekannt, dass sie große Mengen an dsRNA generieren, während (-)ssRNA-Viren keine nachweisbaren Mengen an dsRNA produzieren³⁴². Interessanterweise wurde aber in der eben genannten Studie von Weber et al. auch gezeigt, dass VACV und HSV ebenso dsRNA Intermediate ausbilden können, welche zumindest eine Länge von 30 bp aufweisen. In unserer Studie führte jedoch weder die Infektion mit VACV noch mit HSV-1 zu einer Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms. Dies könnte zwei Ursachen geschuldet sein: Zum einen könnte die generierte dsRNA zu kurz sein, um NLRP1 zu aktivieren. Der monoklonale Antikörper J2 kann zwar ein dsRNA-Intermediat mit 30 bp in VACV/HSV-infizierten Zellen feststellen, diese kurze dsRNA würde jedoch nicht NLRP1 aktivieren. Zum anderen ist auch allgemein bekannt, dass adaptierte Viren, zu denen wir VACV und HSV zählen können, einer Immunerkennung durch unterschiedliche Wege entgehen. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden: Es könnte zum Beispiel die Generierung der dsRNA in speziellen Kompartimenten stattfinden, wie es für SARS-CoV-2 nachgewiesen wurde^{343,344}. Hier konnte gezeigt werden, dass sogenannte Doppelmembran-Vesikel als spezielle Bereiche für die virale RNA-Replikation genutzt werden, was vor einer Erkennung durch PRRs schützt. Ferner könnten die Viren den Inflammasom-Signalweg spezifisch inhibieren: So wurde gezeigt, dass VACV für verschiedene Immun-Checkpoint-Inhibitoren und auch für einen Inhibitor von Caspase-1 kodiert, was zu einer *downstream*-Inhibition der Inflammasomaktivierung führen könnte¹²⁹. Das Fehlen eines prominenten Interferon-Signals bei der Infektion der Zellen mit SFV spricht zum Beispiel für eine Hemmung des IFN-induzierenden Nukleinsäure-Erkennungswegs durch SFV (siehe zum Beispiel Abbildung 13E). Dies könnte auf eine spezifische Inhibition des RLR- oder Interferon-Signalwegs hindeuten. Es sollte jedoch nicht auf einen dsRNA-fokussierten Mechanismus, wie zum Beispiel Abschirmung der dsRNA-Spezies, zurückzuführen sein, da NLRP1 durch generierte dsRNA-Moleküle noch aktiviert werden kann.

Obwohl auch der Inflammasom-Sensor NLRP3 durch dsRNA-Behandlung aktiviert werden kann, scheint sich NLRP1 in der Haut als spezifischer Sensor für dsRNA entwickelt zu haben. Diese Entwicklung könnte dadurch erklärt werden, dass das NLRP3-Inflammasom dazu neigt auch durch

zelluläre Schäden, wie im Rahmen einer sterilen Inflammation, aktiviert zu werden³⁴⁵. Ähnlich verhält es sich auch bei der Erkennung von dsRNA durch NLRP3. NLRP3 wird nicht direkt durch dsRNA aktiviert, sondern durch den nachgeschalteten Zelltod und Efflux von Kalium³³⁷. Die Rolle des NLRP1-Inflammasoms in der Haut, welches spezifisch dsRNA erkennt und nicht nur durch einen weitläufigen Sekundäreffekt aktiviert wird, scheint daher von Vorteil zu sein. Die Expression von NLRP3 in der Haut könnte sich als nachteilig erweisen, da das Epithel, als äußerstes Organ, sowohl leicht einen Signal 1- als auch Signal 2-Stimulus erhalten kann. Eine andauernde Inflammasomaktivierung kann, wie schon für NLRP1 *gain-of-function* Mutationen gezeigt wurde, zu einer Hautkrebsveranlagung führen²⁹². Eine Expression von NLRP3 im Epithel wäre daher gefährlich und erfordert ein spezifischeres Inflammasom in diesem Organ. Viren, die bei ihrer Replikation ein dsRNA-Zwischenprodukt erzeugen, aktivieren neben einer Interferonantwort auch das NLRP3- oder NLRP1-Inflammasom.

5.4 NLRP1 ist der Inflammasom-Sensor im Epithel

Nach unserer Entdeckung, dass NLRP1 durch dsRNA aktiviert wird, fragten wir uns, ob dies spezifisch für Keratinozyten ist oder ob dieser Phänotyp auch in Epithelzellen anderer Herkunft auftritt. Nach Überprüfung der Proteinexpressionsprofile im *Human Protein Atlas* entdeckten wir, dass NLRP1, ASC, Caspase-1 sowie IL-1 β in Epithelzellen der Lunge exprimiert werden. Daher wandten wir uns der HBEC3-KT-Zelllinie zu, die von menschlichen Bronchialepithelzellen abgeleitet ist und untersuchten in diesen die Aktivierung von NLRP1. Neben dem Nachweis, dass eine dsRNA-Transfektion zu einer NLRP1-Inflammasomaktivierung in diesen Zellen führt (Abbildung 17D) konnten wir auch eine Inflammasomaktivierung in primären Keratinozyten (Abbildung 17A) feststellen. Dies steht im Einklang mit Publikationen von Zhong, die zeigen, dass NLRP1 in Atemwegsepithelien die Aktivität von 3C-Proteasen von Enteroviren, wie zum Beispiel dem humanen Rhinovirus (HRV), wahrnimmt, oder Berichten über *gain-of-function*-Mutationen in NLRP1 von JRRP-Patienten mit rezidivierendem Wachstum von Papillomen in den oberen Atemwegen^{317,319}. Weiterhin bestätigt unsere Arbeit daher die Bedeutung der NLRP1-abhängigen Erkennung viraler Infektionen und einer NLRP1-Inflammasomaktivierung im humanen Epithel.

5.5 Die dsRNA-vermittelte Inflammasomaktivierung ist unabhängig von einer Blockade der DPP-Aktivität

Da bekannt war, dass der nicht-physiologische Stimulus VbP das humane NLRP1-Inflammasom durch Inhibition von DPP8/9 aktiviert, fragten wir uns, ob die dsRNA-vermittelte NLRP1-Aktivierung auch durch eine Inhibition von DPP8/9 vermittelt sein könnte. Doch obwohl VbP das Inflammasom in mit CARD8- und NLRP1B-rekonstituierten Zellen aktivierte, gelang dies nicht mit dsRNA-Stimulation (Abbildung 18B). Weiterhin konnten Zellen, die mit Isoform 6 des humanen NLRP1 rekonstituiert worden waren, durch DPP8/9-Inhibition und Freisetzung des C-terminalen Fragments aktiviert werden, nicht aber durch dsRNA-Stimulation (Abbildung 28A und B). Daher ist die Aktivierung von humanem NLRP1 durch dsRNA spezifisch für Volllänge-NLRP1 und wird nicht durch eine Hemmung der DPP8/9-Inhibition vermittelt, da diese auch CARD8, NLRP1B sowie NLRP1 - Isoform 6 aktivieren würde.

5.6 NLRP1 erkennt dsRNA direkt

In Monozyten hängt die dsRNA-vermittelte NLRP3-Inflammasomaktivierung von einer MAVS-abhängigen ROS-Produktion ab, welche Kalium-Efflux auslöst und damit NLRP3 aktiviert³³⁷. Um einen ebenso möglichen sekundären Effekt der NLRP1-Inflammasomaktivierung durch dsRNA auszuschließen, testeten wir N/TERT-1-Zellen, in denen wir bekannte Nukleinsäuresensoren ausgeschaltet hatten. Da die Depletion dieser Sensoren keine Reduktion der Inflammasomaktivierung zeigte, folgerten wir, dass die Aktivierung unabhängig von diesen

Faktoren ist und NLRP1 ein direkter Sensor für dsRNA sein könnte (Abbildung 21A). Durch Immunopräzipitationsstudien mit Zelllysate, sowie durch direkte biochemische Untersuchungen mit gereinigtem rekombinantem Protein, konnten wir zeigen, dass NLRP1 mit dsRNA interagiert (Abbildung 25A, B und C, Abbildung 27A, B und C). Die Affinität von NLRP1 zu einer 20-mer dsRNA liegt innerhalb eines gemessenen Dissoziationskonstantenbereichs von 251.2 ± 11.8 nM und spiegelt eine ähnliche Dissoziationskonstante wie MDA5 für 20-mer dsRNA (287 ± 13 nM, gemessen via EMSA) oder cGAS für 20-mer dsDNA (87.6 ± 22.5 nM, gemessen via Fluoreszenzanisotropie) wider^{65,346}. An längere 112 bp dsRNA zeigte MDA5 eine kooperative Bindung und eine Affinität von 22 nM (bestimmt durch EMSA)⁶⁸. Die Erkennung von dsRNA durch NLRP1 ist daher direkt vermittelt, da NLRP1 an dsRNA binden kann.

Interessanterweise, und unerwarteterweise, band NLRP1 jedoch auch an dsDNA mit einer ähnlich hohen Affinität von 335.0 ± 20.6 nM, obwohl eine Transfektion mit dsDNA zu keiner NLRP1-Inflammasomaktivierung geführt hatte. Bei der Überprüfung der Literatur konnten wir jedoch auch für den spezifischen dsRNA-Sensor MDA5 eine hohe Affinität von 33 nM für eine 112 bp dsDNA (bestimmt durch EMSA) finden, obwohl es durch dieses Molekül nicht aktiviert wird⁶⁸. Letztlich konnte in dieser Studie aber gezeigt werden, dass nur dsRNA, nicht aber dsDNA die MDA5-eigene ATP-hydrolytische Aktivität auslösen kann, welche ein *proxy* für die Aktivierung des Sensors ist. Ferner bindet auch cGAS an dsRNA, zeigt aber keine katalytische Aktivität nach dsRNA-Bindung³⁴⁷. Ähnliche Ergebnisse konnten wir bei der Durchführung von ATPase-Aktivitäts-assays mit rekombinantem NLRP1-Protein in Gegenwart von dsRNA oder dsDNA erzielen. Hier konnte nur dsRNA, aber nicht dsDNA, eine ATPase-Aktivität in NLRP1 hervorrufen (Abbildung 30A und D). Mittels rekombinant hergestellten und gereinigten Trunkationen von NLRP1 konnten wir die Nukleinsäurebindungsstellen auf die NACHT- und LRR-Domänen zurückführen (Abbildung 27A, B und C). Die LRR-Domäne allein zeigte jedoch eine geringere Affinität für dsRNA als ein Konstrukt, welches die NACHT-LRR beinhaltet, was auf eine entsprechende Rolle der NACHT-Domäne bei der Vermittlung der Nukleinsäurebindung hinweist.

Interessanterweise wurde für NAIP-Proteine eine zentrale Rolle der zentralen NBD-assoziierten Domäne als Ligandenspezifitätsdomäne vorgeschlagen²²². Weiterhin wurde aber proklamiert, dass die gesamte Oberfläche der NLRs für eine Evolution in Bezug auf die Ligandenerkennung zur Verfügung steht. Dies umfasst neben den LRRs auch die NBD-assoziierte Domänen. Letzteres stimmt mit unseren Befunden überein, da die NACHT-Domäne von NLRP1 in der Bindung von dsRNA eine Rolle spielt. Ferner konnten wir eine Autoaktivierung der gereinigten isolierten NACHT-Domäne nachweisen, und keine ATPase-Aktivität für die LRRs allein (Abbildung 30C). Dies deutet auf eine, unter *steady-state*-Bedingungen, inhibitorische Rolle der LRRs auf die NACHT-Domäne hin, was mit der aktuellen Literatur übereinstimmt⁹⁸. Nach Bindung des Liganden ist die autoinhibitorische Funktion der LRRs aber gestört und es kann eine Inflammasomaktivierung stattfinden. Bei dsRNA-Bindung, aber nicht bei dsDNA-Bindung, nehmen die LRRs eine ligandensensierende Funktion ein und die inhibitorische Funktion wird aufgehoben, sodass die NACHT von NLRP1 eine ATP-bindende sowie ATP-Hydrolyse-Aktivität ausüben kann.

5.7 Hinweise für einen einheitlichen und ähnlichen nachgeschalteten Signalisierungsprozess der NLRP1-Aktivierung

Dem NLR-Inflammasom-Signalweg gemein ist eine Oligomerisierung des Sensors und anschließende Interaktion mit dem Adapterprotein ASC oder direkt mit Caspase-1, was zur Inflammasomaktivierung führt. Der Nachweis dieser Oligomerisierung wurde zuvor sowohl auf biochemischem Wege (Gelfiltrationsstudien von Zelllysate, Native-PAGE) als auch durch Strukturstudien des NAIP/NLRC4-Inflammasoms erbracht^{101,167,292}. Für NLRP1, sowie NLRP1B und CARD8 wird angenommen, dass das C-terminale Fragment, bestehend aus der UPA- und CARD-Domäne, freigesetzt werden muss, um sich zu einem Inflammasom-Keim zu assemblieren^{248,249}. Dies geschieht entweder durch direkte kompetitive Bindung von VbP an DPP8/9 und damit Verdrängung von UPA-CARD aus DPP8/9 oder durch funktionelle Degradation des N-terminalen

Fragments des Sensors. Als Voraussetzung für diese Wege muss aber ein C-terminales Fragment der Inflammasom-Proteine durch vorhergehende Autoproteolyse in der FIIND erzeugt werden²³⁹. Es stellte sich die Frage, ob für die NLRP1-Aktivierung durch dsRNA ebenso der C-terminale Teil durch Autoproteolyse generiert werden müsste oder ob eine Oligomerisierung eines ungespaltenen NLRP1-Inflammasoms, ähnlich zu zum Beispiel NLRP3, ausreichen könnte. Durch die Untersuchung einer autoproteolytisch-inaktiven Mutante fanden wir heraus, dass eine Spaltung in ein N-terminales und C-terminalen Fragments für die Aktivierung durch dsRNA und anschließende Aktivierung der *downstream*-Signalkaskade wichtig ist (Abbildung 23A, B und C). Daher scheint eine Freisetzung des C-terminalen Fragments und die Assemblierung eines Inflammasoms, ähnlich wie bei der Aktivierung durch VbP oder der Aktivierung von NLRP1B durch LT, der Fall zu sein: Das C-terminale Fragment muss sich aus einem inhibitorischen Komplex lösen und einen Inflammasom-Keim bilden können. Inwiefern dies bei NLRP1 nach einer dsRNA-Stimulation passiert, ist Frage weiterer Untersuchungen.

5.8 Unterschiede der VbP-vermittelten NLRP1-Inflammasomaktivierung sowie Aktivierung durch funktionelle Degradation in Bezug zur Aktivierung durch dsRNA

Interessanterweise konnten wir durch Einführung von Punktmutationen in den Walker-Motiven von NLRP1 die dsRNA-, aber nicht die VbP-vermittelte Inflammasomaktivierung aufheben. Dies deutet auf eine Rolle der Oligomerisierung bei der dsRNA-vermittelten Aktivierung hin, welche bei der VbP-vermittelten Aktivierung keine Rolle spielt (Abbildung 31A, B und C). Zu erwähnen ist aber, dass das NLRP1-Protein in Zellen, die mit diesen Mutanten rekonstituiert worden waren, geringer exprimiert wurde. Nach Transduktion von N/TERT-1-Zellen mit Lentiviren für die Walker-Mutanten war ein erhöhter Zelltod sichtbar, was ein Anzeichen von autoaktivem NLRP1 nach Einführung der Punktmutationen ist (Daten nicht gezeigt). Die ATP-bindende beziehungsweise ATP-hydrolytische Eigenschaft von NLRP1 scheint daher eine Rolle im *steady-state* des Proteins und in der Aktivierung des Inflammasoms nach dsRNA-Stimulation zu spielen.

Des Weiteren ist die Freisetzung des C-terminalen Fragments nach dsRNA-Stimulation nicht auf eine funktionelle Degradation des N-terminalen Fragments zurückzuführen. Weder konnten wir in unseren WB nach dsRNA-Stimulation eine NLRP1-Proteindegradation beobachten, noch hemmte Me-Bs, welcher den *N-end-rule*-Signalweg moduliert, die dsRNA-vermittelte Aktivierung (Abbildung 20A und B). Hier wäre es interessant, die oligomeren Eigenschaften von NLRP1 nach dsRNA-Begegnung weiter zu studieren und intrinsische Eigenschaften seiner Aktivierung oder seine Abhängigkeit von weiteren unbekanntem Faktoren zu untersuchen.

Obwohl es also Unterschiede in der direkten Aktivierung von NLRP1 durch diverse Stimuli gibt, so ist jedoch eine Freisetzung des C-terminalen Fragments, welcher eine Autoproteolyse zuvorgehen muss, für die Aktivierung des Inflammasoms notwendig. In diesem Zusammenhang wird es interessant sein den Mechanismus zu identifizieren, durch den das C-terminale UPA-CARD-Fragment im Verlauf der dsRNA-abhängigen NLRP1-Aktivierung freigesetzt wird.

5.9 NLRP1s ATPase-Aktivität wird durch dsRNA ausgelöst

Interessanterweise konnten wir mittels HPLC-Studien zeigen, dass NLRP1 nach einer Begegnung mit dsRNA, aber nicht dsDNA, eine ATPase-Aktivität gewinnt (Abbildung 29B). In unseren *in vitro* assays konnte eine kurze dsRNA von 20 bp die ATP-Hydrolyse auslösen, wobei mindestens 15 bp für eine Aktivierung notwendig waren (Abbildung 30D). Auffällig ist jedoch, dass unsere zellulären Studien zeigen, dass lange, mindestens aber 1000 bp dsRNA, aber nicht kurze dsRNA erforderlich ist, um die NLRP1-Inflammasomaktivierung auszulösen (Abbildung 16B). Diese Modalität erinnert an MDA5, eine RNA-Helikase, die ebenfalls nur durch lange, mindestens 2 kb lange dsRNA in Zellen aktiviert wird⁵⁸. Die ATPase-Aktivität von MDA5 kann *in vitro* aber bemerkenswerterweise ebenso durch ein getestetes 15 bp dsRNA-Molekül ausgelöst werden kann, aber nicht durch dsDNA⁶⁸.

NLRP1s ATPase-Aktivität nach Antreffen der dsRNA ist daher ein guter *proxy* für die Aktivierung des Proteins, stimmt aber nicht mit der gewonnenen Inflammasomaktivierung in den Zellen überein. Dies deckt sich mit Erkenntnissen über andere Proteine und deren ATPase-Aktivität in *vitro* Studien.

Im Fall von MDA5 ist es eine rezeptorinhärente Funktionalität, die die Präferenz für lange dsRNA diktiert. MDA5 unterscheidet zwischen dsRNA und anderen Arten von Nukleinsäuren durch kooperative Filament-Stabilität an der Nukleinsäure, die durch ATP-Hydrolyse eng reguliert wird⁶⁸. ATP-Hydrolyse induziert Konformationsverschiebungen, die die Interaktion mit RNA, die Position entlang der RNA oder den oligomeren Zustand beeinflussen³⁴⁸. Die ATP-Hydrolyse bei MDA5 spielt dadurch eine Rolle in der Autoregulation des MDA5-Filaments, da eine Hydrolyse zu einer intrinsischen kinetischen Instabilität führt, aber auch eine Rolle beim Aufbau der Filamente an langer dsRNA. Bei einer längeren dsRNA besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit eines stabileren Filaments³⁴⁸.

Für Inflammasom-Proteine wird angenommen, dass die Bindung von ATP beziehungsweise die Hydrolyse von ATP mit einer Aktivierung einhergeht und strukturelle Umlagerungen, die für die Oligomerisierung erforderlich sind, antreibt. Studien zu den bakteriellen NOD-Protein MalT haben bereits gezeigt, dass eine Bindung an den Liganden DNA zu einer Öffnung der NBD und Nukleotidaustausch führen kann³⁴⁹. Während der Aktivierung von NLRP1 können wir davon ausgehen, dass die dsRNA-Bindung geringfügige Änderungen in der Struktur von NLRP1 induziert. Diese Veränderungen könnten jedoch auch die Öffnung der NBD induzieren und den Nukleotidaustausch von ADP zu ATP ermöglichen. Die durch die Hydrolyse von ATP erzeugte Energie könnte dann in kinetische Energie umgewandelt werden und eine weitere strukturelle Reorganisation in NLRP1 induzieren. Dies könnte zu einer oligomeren Assemblierung des NLRs und zur Aktivierung von nachgeschalteten Effektoren führen, aber ebenso zu einer Inaktivierung des Sensors. Dass NLRP1 bereits in zellfreien Systemen auf kurze dsRNA anspricht, aber nicht in Zellen, lässt die Hypothese zu, dass lange dsRNA in Zellen den Zweck erfüllt, mehrere NLRP1-Moleküle in unmittelbarer Nähe zu rekrutieren. Gleichzeitig ist es möglich, dass dsRNA zusätzliche Kofaktoren rekrutiert, die für die NLRP1-Aktivierung erforderlich sind. Um ein vollständiges mechanistisches Verständnis dieses Prozesses zu erhalten, sind jedoch weitere Studien erforderlich.

5.10 Von Mäusen und Menschen

Klassischerweise werden, beziehungsweise wurden, für immunologische Fragestellungen Mausmodelle verwendet und herangezogen. Dies lag an der „Leichtigkeit“ genetisch veränderte Mäuse zu erzeugen, verglichen mit der Herstellung von *knockouts* in humanen Zellen. Ferner auch an der Zugänglichkeit zu Studien mit primären Zellen, sowie natürlich ihrer Verwendung als *in vivo* Modelle. Im Allgemeinen können Mausmodelle das menschliche System widerspiegeln, da zum Beispiel die Aktivierung des NLRC4- oder NLRP3-Inflammasoms bei Menschen und Maus prinzipiell ähnlich ist. Allerdings gibt es gewisse Diskrepanzen in deren Aktivierung, die erst kürzlich beleuchtet wurden: So ist das alternative Inflammasom in humanen Makrophagen zu finden, nicht aber im murinen System¹⁸⁶. Des Weiteren ist die Aktivierung von STING durch das *small molecule* 10-Carboxymethyl-9-Acridanon (CMA) speziesspezifisch für das murine STING, vermag aber nicht das humane Ortholog zu aktivieren³⁵⁰. Eine alleinige Fokussierung auf murine Modelle kann daher dazu führen, dass humanspezifische Immunantworten übersehen werden.

Die Aktivierung von humanem NLRP1 ist ein weiteres klassisches Beispiel für einen Unterschied zwischen Mäusen und Menschen. Denn obwohl auch für humanes NLRP1 gezeigt wurde, dass es, ähnlich zu NLRP1B, durch ein Spaltungsereignis aktiviert werden kann, so ist die Aktivierung von humanem NLRP1 durch dsRNA nicht auf das murine NLRP1B übertragbar^{319,320}. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass humanes NLRP1 unter einem Selektionsdruck steht und eine hohe Mutationsrate aufweist, die sein Repertoire an Pathogensensierung diversifiziert hat¹²⁴. Neben dem Bereich des Interdomänenlinkers zwischen der PYD- und NACHT-Domäne zeigen nämlich auch die LRRs, welchen eine Rolle in der Ligandenbindung zugetragen wird, eine hohe Frequenz an

Mutationen. Interessanterweise scheint ein weiterer Unterschied zwischen NLRP1 und NLRP1B ihr oligomerer Zustand in Zellen zu sein. Während humanes NLRP1 in Zellen als Monomer oder Dimer aufzutreten scheint, wie Native-PAGE Experimente gezeigt haben, konnte durch Gelfiltrationsstudien gezeigt werden, dass murines NLRP1B aus unstimulierten Mausmakrophagen als ein großer Komplex von etwa 800 kDa auftritt^{292,351}. Auf diese Weise könnte man die Hypothese aufstellen, dass murines NLRP1B wie eine bereits „geladene Waffe“ agiert, wobei die NACHT-Domäne und ihre Oligomerisierungsfunktion eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung einer spezifischen und Liganden-vermittelten Oligomerisierung spielt. Man kann über eine Degenerierung der NACHT-Domäne des murinen NLRP1B spekulieren, um eine konstitutive Oligomerisierung zu vermitteln und um so als „Stolperdraht“ zu fungieren. Ein ähnlicher Mechanismus wurde schon für das Verschwinden der PYD im murinen NLRP1B vorgeschlagen, die auf ein Minimum getrimmt wurde und somit dazu führt, dass NLRP1B ohne N-terminale Domäne existiert. Bei humanem NLRP1 kann die NACHT-Domäne jedoch immer noch ihre ursprüngliche Rolle der Liganden-induzierten Oligomerisierung und anschließender Inflammasomaktivierung erfüllen.

Auch in Hinblick auf die jüngste Erkenntnis, dass das ebenfalls FIIND-aufweisende Protein CARD8 durch Spaltung einer HIV-Protease aktiviert wird, kann man spekulieren, dass das N-terminale Fragment von NLRP1 das Protein so funktionalisiert, dass es durch mehr als nur eine Spaltung aktiviert wird³³¹. Wenn NLRP1 lediglich durch eine proteolytische Spaltung aktiviert werden würde, warum hätten dann seine PYD-, NACHT-, sowie LRR-Domänen die Evolution überlebt, während bei CARD8 nur ein ungeordneter N-Terminus, der gespalten werden kann, und die FIIND-Domäne mit einer UPA-CARD-Anordnung für die Aktivierung des Inflammasoms ausreichend sind? Daher muss es eine evolutionäre Notwendigkeit geben, weiterhin für diese Domänen zu kodieren, und darüber hinaus muss es einen Zweck geben, dem sie dienen. Die FIIND-Domäne funktionalisiert die Proteine jedoch grundsätzlich so, dass sie durch Freisetzung des C-terminalen Fragments aktiviert werden. Weiterhin funktionalisiert die am C-Terminus aufgesetzte FIIND die Proteine auch, um durch Inhibition von DPP8/9 aktiviert zu werden. Eine Aktivierung von NLRP1B, NLRP1 und CARD8 durch verschiedene Stimuli ist ähnlich der Aktivierungsmodalität des NLRC4- sowie des NLRP3-Inflammasoms. Das humane NLRC4-Inflammasom kann sowohl durch *NeedleTox* als auch durch Flagellin aktiviert werden, was jedoch durch NAIP, welches als Adapter fungiert, vermittelt wird. NLRP3 wird ebenso durch verschiedene Stimuli aktiviert, wobei der genaue Mechanismus der Aktivierung unbekannt ist. Summa summarum scheint sich NLRP1 als ein Inflammasom aufzustellen, das ebenfalls durch diverse Stimuli aktiviert werden kann, wobei es hier Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen gibt.

5.11 NLRP1 als zusätzlicher Trumpf in einem evolutionären Wettrüsten

Wie bereits beschrieben, löst die Detektion einer viralen Infektion eine Interferonantwort aus, die über bekannte Nukleinsäuresensoren, wie zum Beispiel MDA5 oder cGAS, vermittelt wird. Diese Interferonantwort warnt benachbarte Zellen und macht sie widerstandsfähiger gegen eine virale Infektion und kann auch zum Zelltod der infizierten Zellen durch mitochondriale Apoptose führen³⁵². Warum ist NLRP1 dann entstanden, um eine virale Infektion zu erkennen, da doch eine Interferonantwort zur Bekämpfung des Pathogens ausreichen sollte? Vielleicht hat sich NLRP1 dadurch entwickelt, dass Viren den Interferon-Signalweg effizient hemmen und es dadurch einen weiteren „Reißleinenschalter“ benötigt hat: So könnte trotz einer ausbleibenden, da inhibierten, Interferonantwort eine IL-1 β -Antwort ausgelöst werden können und die infizierte Zelle einen Zelltod erleiden. Es wäre hier interessant im Rahmen einer Wirt-Pathogen-Interaktion weitere Viren zu testen, die weniger stark oder stärker an Menschen angepasst sind und deren Fähigkeit, das NLRP1-Inflammasom zu aktivieren, zu untersuchen. Außerdem stellt sich die Frage, wann NLRP1 zu einem dsRNA-Sensor wurde: NLRP1 steht bei Primaten unter einem hohen Selektionsdruck und es wäre interessant, diverse Primaten NLRP1-Proteine auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dsRNA zu untersuchen.

5.12 NLRP1-Aktivierung im Zusammenhang mit anderen aktuellen Veröffentlichungen

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde kürzlich ein Aktivierungsweg für humanes NLRP1 veröffentlicht, der dem für murinem NLRP1B beschriebenen funktionellen Degradationsweg ähnelt^{319,320}. Hier wird NLRP1 am N-Terminus gespalten und degradiert, was zur Freisetzung des C-terminalen Fragments führt. Auf diese Weise fungiert NLRP1 als „Stolperdraht“ für die Erkennung einer viralen Protease-Aktivität. Neben der Aktivierung durch VbP hat NLRP1 damit im letzten Jahr weitere Aktivierungsmechanismen hinzugewonnen: Die Aktivierung durch 3C-Protease-Spaltung und die Aktivierung durch dsRNA-Begegnung. Das erinnert an die historische Entwicklung von NLRP3: Auch hier wurde im Laufe der Zeit festgestellt, dass der Sensor eine Vielzahl von verschiedenen Aktivatoren wahrnimmt.

Es macht Sinn, dass NLRP1, ein Protein dieser Größe und mit einer komplexen Domänenstruktur, mehr als eine proteolytische Spaltung wahrnehmen und dadurch aktiviert werden kann. Andernfalls würde eine Minimierung des N-terminalen Fragments vor der FIIND-Domäne, wie sie für CARD8 zu sehen ist, für eine durch ein proteolytisches Spaltungsereignis vermittelte Aktivierung ausreichen. Es ist anzumerken, dass die Infektion von Zellen, die mit einer NLRP1-Mutante rekonstituiert worden waren, welche nicht durch die virale 3C-Protease gespalten werden kann, mit dem humanen Rhinovirus zu keiner Inflammasomaktivierung führte, obwohl HRV als (+)ssRNA-Virus in seinem Lebenszyklus ebenso dsRNA erzeugt. Dies könnte verschiedene Gründe haben, wie zum Beispiel die Zugänglichkeit und Menge der dsRNA in der Zelle. Zum Beispiel könnte, wie in der Einleitung für SARS-CoV-2 erwähnt, dsRNA in spezialisierten Kompartimenten generiert werden oder virale Proteine könnten generierte Nukleinsäuren vor einer zellulären Erkennung abschirmen^{343,353}. Weiterhin ist zu beachten, dass die Menge der generierten dsRNA eine Rolle bei der Auslösung einer NLRP1-Aktivierung spielen kann. In diesem Fall hat sich gezeigt, dass SFV eine hohe Menge an dsRNA generiert³⁵⁴.

Es wäre von großem Interesse HRV und SFV parallel mit weiteren Viren, wie zum Beispiel Sindbis Virus, zu untersuchen. Summa summarum wäre es interessant zu spekulieren, welche *sensing*-Modalität sich zuerst entwickelt hat, und man könnte sogar spekulieren, dass sich das Protease-*sensing* als „Stolperdraht“ entwickelt hat, falls ein Virus das dsRNA-*sensing* hemmt.

6 Zusammenfassung

Inflammasome fungieren als intrazelluläre Sensoren der Homöostase oder Pathogeninfektionen. Eine Aktivierung des Inflammasoms führt zu einem bestimmten Zelltod, der Pyroptose, sowie zur Maturierung inflammatorischer Zytokine. Obwohl humanes NLRP1 das erste beschriebene Inflammasom und sozusagen der Gründungsvater der Inflammasomforschung ist, war bis vor kurzem wenig über seine Aktivierbarkeit bekannt. Ein möglicher Faktor war die Vernachlässigung der Rolle von NLRP1 als Inflammasom-Sensor in der Haut. Kürzlich wurden humane primärzellähnliche, aber immortalisierte Keratinozyten beschrieben. Diese reagieren auf den NLRP1-Stimulus VbP, einem Inhibitor von DPP8/9, welcher ebenso erst kürzlich beschrieben wurde. In Anbetracht dieser jüngsten Erkenntnisse starteten wir unsere eigenen Studien auf der Suche nach einem (patho)physiologischen NLRP1-Aktivator.

Angesichts der hohen Abundanz von NLRP1 im Epithel untersuchten wir mittels genetischer Depletionsstudien diverse Viren auf eine Inflammasomaktivierung in Keratinozyten. Wir identifizierten dabei den (+)ssRNA-Virus SFV als Aktivator von NLRP1. Eine Replikation sowie stattfindende Bildung von dsRNA war erforderlich, um das NLRP1-Inflammasom zu aktivieren. Die Aktivierung war aber unabhängig von einer beschriebenen DPP8/9-Inhibition, da das murine Ortholog NLRP1B sowie humanes CARD8 nicht durch eine SFV-Infektion aktiviert wurden. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass eine Stimulation mit poly(I:C), einem unphysiologischen, langen dsRNA Polymer, ausreicht, um eine Aktivierung auszulösen. Mittels IVT konnten wir eine Größe von mindestens 1000 bp als notwendigen Aktivator von NLRP1 identifizieren, wobei hier ssRNA nicht aktivierend wirkte. Eine RLR-vermittelte Immunantwort dahingegen wurde auch durch ssRNA ausgelöst. Mittels biochemischer Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass NLRP1 dsRNA, aber auch dsDNA, vor allem über seine LRRs, aber auch mit Beteiligung seiner NACHT-Domäne, bindet. Dies ist in Übereinstimmung mit der positiven elektrostatischen Oberflächenladung, welche humanes NLRP1, aber weder murines NLRP1B noch humanes NLRP3 aufweisen. Des Weiteren konnten wir eine ATPase-Aktivität von rekombinantem NLRP1 nach dsRNA-, aber nicht dsDNA-Bindung feststellen. Es lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die LRRs unter *steady-state*-Bedingungen eine inhibitorische Rolle auf die NACHT-Domäne von NLRP1 ausüben. Bei Bindung von dsRNA an NLRP1 wird diese inhibitorische Funktion aufgehoben und dies führt zur Erlangung einer ATPase-Aktivität. Im Gegensatz zu den zellulären Experimenten reichte hier jedoch eine Länge von 15 bp dsRNA aus. Die Erlangung einer ATPase-Aktivität von NLRP1 durch Bindung an dsRNA kann, analog zu anderen NLRs, als *proxy* für eine Konformationsänderung und eine damit einhergehende Änderung des Aktivierungszustands des Proteins angesehen werden. Für ein vollständiges mechanistisches Verständnis der NLRP1-Aktivierung sind jedoch weitere Studien erforderlich. So zum Beispiel stellt sich die Frage, wieso eine lange dsRNA erforderlich ist, um in Zellen NLRP1 zu aktivieren. Es ist denkbar, dass lange dsRNA für eine lokal hohe Konzentration an NLRP1-Molekülen sorgt oder diese an der dsRNA oligomerisieren müssen. Auch gilt es den Mechanismus zu klären, durch den das C-terminale UPA-CARD-Fragment im Verlauf der dsRNA-abhängigen NLRP1-Aktivierung freigesetzt wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass humanes NLRP1 als direkter Sensor für dsRNA und damit für Virusinfektionen fungiert.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology, 9th Edition*. Garland Science. (2017).
- 2 Luria, S. E. & Human, M. L. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol* **64**, 557-569, doi:10.1128/JB.64.4.557-569.1952 (1952).
- 3 Arber, W. & Linn, S. DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* **38**, 467-500, doi:10.1146/annurev.bi.38.070169.002343 (1969).
- 4 Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13, doi:10.1101/sqb.1989.054.01.003 (1989).
- 5 Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045, doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015 (1994).
- 6 Liston, A. & Masters, S. L. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat Rev Immunol* **17**, 208-214, doi:10.1038/nri.2016.151 (2017).
- 7 van Wersch, S., Tian, L., Hoy, R. & Li, X. Plant NLRs: The Whistleblowers of Plant Immunity. *Plant Commun* **1**, 100016, doi:10.1016/j.xplc.2019.100016 (2020).
- 8 Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* **12**, 503-516, doi:10.1038/nri3228 (2012).
- 9 Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238-250, doi:10.1038/nrmicro1098 (2005).
- 10 Dunkelberger, J. R. & Song, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **20**, 34-50, doi:10.1038/cr.2009.139 (2010).
- 11 Cossart, P. & Helenius, A. Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a016972 (2014).
- 12 Babior, B. M. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* **93**, 1464-1476, doi:10.1182/blood.V93.5.1464 (1999).
- 13 Erwig, L. P. & Henson, P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **15**, 243-250, doi:10.1038/sj.cdd.4402184 (2008).
- 14 Ley, K. *et al.* Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol* **3**, doi:10.1126/sciimmunol.aat4579 (2018).
- 15 Sun, J. C., Beilke, J. N. & Lanier, L. L. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev* **236**, 83-94, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00900.x (2010).
- 16 Schraml, B. U. & Reis e Sousa, C. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **32**, 13-20, doi:10.1016/j.coi.2014.11.001 (2015).
- 17 Muller, P. & Schier, A. F. Extracellular movement of signaling molecules. *Dev Cell* **21**, 145-158, doi:10.1016/j.devcel.2011.06.001 (2011).
- 18 Silva, A. C. & Lobo, J. M. S. Cytokines and Growth Factors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **171**, 87-113, doi:10.1007/10_2019_105 (2020).
- 19 von Moltke, J. *et al.* Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature* **490**, 107-111, doi:10.1038/nature11351 (2012).
- 20 Mallery, D. L. *et al.* Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19985-19990, doi:10.1073/pnas.1014074107 (2010).
- 21 Laguette, N. *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654-657, doi:10.1038/nature10117 (2011).

- 22 Cullen, B. R. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* **80**, 1067-1076, doi:10.1128/JVI.80.3.1067-1076.2006 (2006).
- 23 Sood, C., Marin, M., Chande, A., Pizzato, M. & Melikyan, G. B. SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins. *J Biol Chem* **292**, 6014-6026, doi:10.1074/jbc.M117.777714 (2017).
- 24 Strebel, K. HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr Opin Virol* **3**, 692-699, doi:10.1016/j.coviro.2013.08.004 (2013).
- 25 Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821, doi:10.1126/science.1225829 (2012).
- 26 Kantha, S. S. A centennial review; the 1890 tetanus antitoxin paper of von Behring and Kitasato and the related developments. *Keio J Med* **40**, 35-39, doi:10.2302/kjm.40.35 (1991).
- 27 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 28 Arbour, N. C. *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* **25**, 187-191, doi:10.1038/76048 (2000).
- 29 Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983, doi:10.1016/s0092-8674(00)80172-5 (1996).
- 30 Jang, I. H. *et al.* A Spatzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Dev Cell* **10**, 45-55, doi:10.1016/j.devcel.2005.11.013 (2006).
- 31 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397, doi:10.1038/41131 (1997).
- 32 Kang, J. Y. *et al.* Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* **31**, 873-884, doi:10.1016/j.immuni.2009.09.018 (2009).
- 33 Liu, L. *et al.* Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* **320**, 379-381, doi:10.1126/science.1155406 (2008).
- 34 Bowie, A. & O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**, 508-514, doi:10.1002/jlb.67.4.508 (2000).
- 35 Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103, doi:10.1038/35074106 (2001).
- 36 Jin, M. S. *et al.* Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**, 1071-1082, doi:10.1016/j.cell.2007.09.008 (2007).
- 37 Kim, H. M. *et al.* Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* **130**, 906-917, doi:10.1016/j.cell.2007.08.002 (2007).
- 38 Leonard, J. N. *et al.* The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 258-263, doi:10.1073/pnas.0710779105 (2008).
- 39 Botos, I., Liu, L., Wang, Y., Segal, D. M. & Davies, D. R. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 667-674, doi:10.1016/j.bbagr.2009.06.005 (2009).

- 40 Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529, doi:10.1126/science.1093620 (2004).
- 41 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531, doi:10.1126/science.1093616 (2004).
- 42 Chan, M. P. *et al.* DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat Commun* **6**, 5853, doi:10.1038/ncomms6853 (2015).
- 43 Greulich, W. *et al.* TLR8 Is a Sensor of RNase T2 Degradation Products. *Cell* **179**, 1264-1275 e1213, doi:10.1016/j.cell.2019.11.001 (2019).
- 44 Gay, N. J. Role of self-organising myddosome oligomers in inflammatory signalling by Toll-like receptors. *BMC Biol* **17**, 15, doi:10.1186/s12915-019-0637-5 (2019).
- 45 Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M. & Bryant, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **14**, 546-558, doi:10.1038/nri3713 (2014).
- 46 Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 465-479, doi:10.1038/nri2569 (2009).
- 47 Robinson, M. J. *et al.* Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* **206**, 2037-2051, doi:10.1084/jem.20082818 (2009).
- 48 Yamasaki, S. *et al.* Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* **9**, 1179-1188, doi:10.1038/ni.1651 (2008).
- 49 Schattgen, S. A. & Fitzgerald, K. A. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunol Rev* **243**, 109-118, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01053.x (2011).
- 50 Bosso, M. *et al.* Nuclear PYHIN proteins target the host transcription factor Sp1 thereby restricting HIV-1 in human macrophages and CD4+ T cells. *PLoS Pathog* **16**, e1008752, doi:10.1371/journal.ppat.1008752 (2020).
- 51 Rehwinkel, J. & Gack, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* **20**, 537-551, doi:10.1038/s41577-020-0288-3 (2020).
- 52 Andrejeva, J. *et al.* The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-17269, doi:10.1073/pnas.0407639101 (2004).
- 53 Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737, doi:10.1038/ni1087 (2004).
- 54 Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997, doi:10.1126/science.1132505 (2006).
- 55 Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001, doi:10.1126/science.1132998 (2006).
- 56 Rehwinkel, J. *et al.* RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**, 397-408, doi:10.1016/j.cell.2010.01.020 (2010).
- 57 Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105, doi:10.1038/nature04734 (2006).
- 58 Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601-1610, doi:10.1084/jem.20080091 (2008).

- 59 Liddicoat, B. J. *et al.* RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science* **349**, 1115-1120, doi:10.1126/science.aac7049 (2015).
- 60 Dhir, A. *et al.* Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans. *Nature* **560**, 238-242, doi:10.1038/s41586-018-0363-0 (2018).
- 61 Yu, Q., Qu, K. & Modis, Y. Cryo-EM Structures of MDA5-dsRNA Filaments at Different Stages of ATP Hydrolysis. *Mol Cell* **72**, 999-1012 e1016, doi:10.1016/j.molcel.2018.10.012 (2018).
- 62 Wu, B. & Hur, S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr Opin Virol* **12**, 91-98, doi:10.1016/j.coviro.2015.04.004 (2015).
- 63 Hou, F. *et al.* MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**, 448-461, doi:10.1016/j.cell.2011.06.041 (2011).
- 64 Pippig, D. A. *et al.* The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res* **37**, 2014-2025, doi:10.1093/nar/gkp059 (2009).
- 65 Berke, I. C. & Modis, Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *EMBO J* **31**, 1714-1726, doi:10.1038/emboj.2012.19 (2012).
- 66 Rawling, D. C., Fitzgerald, M. E. & Pyle, A. M. Establishing the role of ATP for the function of the RIG-I innate immune sensor. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.09391 (2015).
- 67 Civril, F. *et al.* The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep* **12**, 1127-1134, doi:10.1038/embor.2011.190 (2011).
- 68 Peisley, A. *et al.* Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21010-21015, doi:10.1073/pnas.1113651108 (2011).
- 69 Zheng, J. *et al.* High-resolution HDX-MS reveals distinct mechanisms of RNA recognition and activation by RIG-I and MDA5. *Nucleic Acids Res* **43**, 1216-1230, doi:10.1093/nar/gku1329 (2015).
- 70 Devarkar, S. C., Schweibenz, B., Wang, C., Marcotrigiano, J. & Patel, S. S. RIG-I Uses an ATPase-Powered Translocation-Throttling Mechanism for Kinetic Proofreading of RNAs and Oligomerization. *Mol Cell* **72**, 355-368 e354, doi:10.1016/j.molcel.2018.08.021 (2018).
- 71 Lassig, C. *et al.* ATP hydrolysis by the viral RNA sensor RIG-I prevents unintentional recognition of self-RNA. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.10859 (2015).
- 72 Ishii, K. J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48, doi:10.1038/ni1282 (2006).
- 73 Ishii, K. J. *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**, 725-729, doi:10.1038/nature06537 (2008).
- 74 Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-505, doi:10.1038/nature06013 (2007).
- 75 Wang, Z. *et al.* Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5477-5482, doi:10.1073/pnas.0801295105 (2008).
- 76 Upton, J. W., Kaiser, W. J. & Mocarski, E. S. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine

- cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* **11**, 290-297, doi:10.1016/j.chom.2012.01.016 (2012).
- 77 Cavlar, T., Ablasser, A. & Hornung, V. Induction of type I IFNs by intracellular DNA-sensing pathways. *Immunol Cell Biol* **90**, 474-482, doi:10.1038/icb.2012.11 (2012).
- 78 Ablasser, A. *et al.* RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* **10**, 1065-1072, doi:10.1038/ni.1779 (2009).
- 79 Chiu, Y. H., Macmillan, J. B. & Chen, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576-591, doi:10.1016/j.cell.2009.06.015 (2009).
- 80 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008).
- 81 Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788-792, doi:10.1038/nature08476 (2009).
- 82 Burdette, D. L. *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515-518, doi:10.1038/nature10429 (2011).
- 83 Ablasser, A. *et al.* cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **498**, 380-384, doi:10.1038/nature12306 (2013).
- 84 Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**, 786-791, doi:10.1126/science.1232458 (2013).
- 85 Wu, J. *et al.* Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339**, 826-830, doi:10.1126/science.1229963 (2013).
- 86 Andreeva, L. *et al.* cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature* **549**, 394-398, doi:10.1038/nature23890 (2017).
- 87 Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T. & Medzhitov, R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* **134**, 587-598, doi:10.1016/j.cell.2008.06.032 (2008).
- 88 Ablasser, A. *et al.* TREX1 deficiency triggers cell-autonomous immunity in a cGAS-dependent manner. *J Immunol* **192**, 5993-5997, doi:10.4049/jimmunol.1400737 (2014).
- 89 Samuel, C. E. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7603-7606, doi:10.1016/s0021-9258(18)52994-x (1993).
- 90 Hornung, V., Hartmann, R., Ablasser, A. & Hopfner, K. P. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol* **14**, 521-528, doi:10.1038/nri3719 (2014).
- 91 Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 295-308, doi:10.1089/107999099313992 (1999).
- 92 Clemens, M. J. & Williams, B. R. Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell* **13**, 565-572, doi:10.1016/0092-8674(78)90329-x (1978).

- 93 Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr. & Silverman, R. H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816-819, doi:10.1038/nature06042 (2007).
- 94 Ting, J. P. *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* **28**, 285-287, doi:10.1016/j.immuni.2008.02.005 (2008).
- 95 Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nunez, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* **227**, 106-128, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x (2009).
- 96 Hu, Z. & Chai, J. Structural Mechanisms in NLR Inflammasome Assembly and Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **397**, 23-42, doi:10.1007/978-3-319-41171-2_2 (2016).
- 97 Hanson, P. I. & Whiteheart, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 519-529, doi:10.1038/nrm1684 (2005).
- 98 Hohmann, U., Lau, K. & Hothorn, M. The Structural Basis of Ligand Perception and Signal Activation by Receptor Kinases. *Annu Rev Plant Biol* **68**, 109-137, doi:10.1146/annurev-arplant-042916-040957 (2017).
- 99 Zhong, F. L. *et al.* Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *J Biol Chem* **293**, 18864-18878, doi:10.1074/jbc.RA118.004350 (2018).
- 100 Li, Y. *et al.* Cryo-EM structures of ASC and NLRC4 CARD filaments reveal a unified mechanism of nucleation and activation of caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 10845-10852, doi:10.1073/pnas.1810524115 (2018).
- 101 Zhang, L. *et al.* Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science* **350**, 404-409, doi:10.1126/science.aac5789 (2015).
- 102 Barnich, N., Aguirre, J. E., Reinecker, H. C., Xavier, R. & Podolsky, D. K. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* **170**, 21-26, doi:10.1083/jcb.200502153 (2005).
- 103 Kobayashi, K. S. *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731-734, doi:10.1126/science.1104911 (2005).
- 104 Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* **16**, 407-420, doi:10.1038/nri.2016.58 (2016).
- 105 Wang, J. *et al.* Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* **364**, doi:10.1126/science.aav5870 (2019).
- 106 Wang, J. *et al.* Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* **364**, doi:10.1126/science.aav5868 (2019).
- 107 Bhattacharjee, S., Halane, M. K., Kim, S. H. & Gassmann, W. Pathogen effectors target Arabidopsis EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science* **334**, 1405-1408, doi:10.1126/science.1211592 (2011).
- 108 Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**, 539-548, doi:10.1038/nrg2812 (2010).
- 109 Wendler, P., Ciniawsky, S., Kock, M. & Kube, S. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 2-14, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.014 (2012).
- 110 Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V. & Aravind, L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**, 11-31, doi:10.1016/j.jsb.2003.10.010 (2004).

- 111 Kaguni, J. M. DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. *Annu Rev Microbiol* **60**, 351-375, doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142111 (2006).
- 112 Coster, G., Frigola, J., Beuron, F., Morris, E. P. & Diffley, J. F. Origin licensing requires ATP binding and hydrolysis by the MCM replicative helicase. *Mol Cell* **55**, 666-677, doi:10.1016/j.molcel.2014.06.034 (2014).
- 113 Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* **21**, 248-255, doi:10.1038/nm.3806 (2015).
- 114 Coll, R. C. *et al.* MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol* **15**, 556-559, doi:10.1038/s41589-019-0277-7 (2019).
- 115 Tapia-Abellan, A. *et al.* MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nat Chem Biol* **15**, 560-564, doi:10.1038/s41589-019-0278-6 (2019).
- 116 Hu, Z. *et al.* Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science* **341**, 172-175, doi:10.1126/science.1236381 (2013).
- 117 Maekawa, S., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K. & Shimizu, T. Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. *Nat Commun* **7**, 11813, doi:10.1038/ncomms11813 (2016).
- 118 Kim, H. E., Du, F., Fang, M. & Wang, X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17545-17550, doi:10.1073/pnas.0507900102 (2005).
- 119 Reubold, T. F., Wohlgemuth, S. & Eschenburg, S. A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating apoptosome. *J Biol Chem* **284**, 32717-32724, doi:10.1074/jbc.M109.014027 (2009).
- 120 Moghaddas, F. *et al.* Autoinflammatory mutation in NLRC4 reveals a leucine-rich repeat (LRR)-LRR oligomerization interface. *J Allergy Clin Immunol* **142**, 1956-1967 e1956, doi:10.1016/j.jaci.2018.04.033 (2018).
- 121 Duncan, J. A. *et al.* Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8041-8046, doi:10.1073/pnas.0611496104 (2007).
- 122 Zurek, B., Proell, M., Wagner, R. N., Schwarzenbacher, R. & Kufer, T. A. Mutational analysis of human NOD1 and NOD2 NACHT domains reveals different modes of activation. *Innate Immun* **18**, 100-111, doi:10.1177/1753425910394002 (2012).
- 123 Liao, K. C. & Mogridge, J. Activation of the Nlrp1b inflammasome by reduction of cytosolic ATP. *Infect Immun* **81**, 570-579, doi:10.1128/IAI.01003-12 (2013).
- 124 Chavarria-Smith, J., Mitchell, P. S., Ho, A. M., Daugherty, M. D. & Vance, R. E. Functional and Evolutionary Analyses Identify Proteolysis as a General Mechanism for NLRP1 Inflammasome Activation. *PLoS Pathog* **12**, e1006052, doi:10.1371/journal.ppat.1006052 (2016).
- 125 Nagata, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol* **36**, 489-517, doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053010 (2018).
- 126 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257, doi:10.1038/bjc.1972.33 (1972).
- 127 Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207-2216 (1992).

- 128 Wang, Y. *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* **547**, 99-103, doi:10.1038/nature22393 (2017).
- 129 Veyer, D. L., Carrara, G., Maluquer de Motes, C. & Smith, G. L. Vaccinia virus evasion of regulated cell death. *Immunol Lett* **186**, 68-80, doi:10.1016/j.imlet.2017.03.015 (2017).
- 130 Taabazuing, C. Y., Okondo, M. C. & Bachovchin, D. A. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chem Biol* **24**, 507-514 e504, doi:10.1016/j.chembiol.2017.03.009 (2017).
- 131 Galluzzi, L., Kepp, O., Chan, F. K. & Kroemer, G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol* **12**, 103-130, doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100247 (2017).
- 132 Feoktistova, M. *et al.* cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* **43**, 449-463, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.011 (2011).
- 133 Zindel, J. & Kubers, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol* **15**, 493-518, doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847 (2020).
- 134 Zhang, T. *et al.* Influenza Virus Z-RNAs Induce ZBP1-Mediated Necroptosis. *Cell* **180**, 1115-1129 e1113, doi:10.1016/j.cell.2020.02.050 (2020).
- 135 Kaiser, W. J. *et al.* Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem* **288**, 31268-31279, doi:10.1074/jbc.M113.462341 (2013).
- 136 Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-267, doi:10.1098/rspb.1957.0048 (1957).
- 137 Fensterl, V., Chattopadhyay, S. & Sen, G. C. No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annu Rev Virol* **2**, 549-572, doi:10.1146/annurev-virology-100114-055249 (2015).
- 138 Gizzi, A. S. *et al.* A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. *Nature* **558**, 610-614, doi:10.1038/s41586-018-0238-4 (2018).
- 139 McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**, 87-103, doi:10.1038/nri3787 (2015).
- 140 Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-15628, doi:10.1073/pnas.95.26.15623 (1998).
- 141 Netea, M. G., van de Veerdonk, F. L., van der Meer, J. W., Dinarello, C. A. & Joosten, L. A. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol* **33**, 49-77, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112306 (2015).
- 142 Menkin, V. Biochemistry of inflammation. *Lancet* **1**, 660-662, doi:10.1016/s0140-6736(47)91407-4 (1947).
- 143 Lonnemann, G. *et al.* Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur J Immunol* **19**, 1531-1536, doi:10.1002/eji.1830190903 (1989).
- 144 Loppnow, H. *et al.* Induction of human interleukin 1 by bacterial and synthetic lipid A. *Eur J Immunol* **16**, 1263-1267, doi:10.1002/eji.1830161013 (1986).
- 145 Auron, P. E. *et al.* Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7907-7911, doi:10.1073/pnas.81.24.7907 (1984).

- 146 Cerretti, D. P. *et al.* Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**, 97-100, doi:10.1126/science.1373520 (1992).
- 147 Guma, M. *et al.* Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum* **60**, 3642-3650, doi:10.1002/art.24959 (2009).
- 148 LaRock, C. N. *et al.* IL-1beta is an innate immune sensor of microbial proteolysis. *Sci Immunol* **1**, doi:10.1126/sciimmunol.aah3539 (2016).
- 149 Werman, A. *et al.* The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2434-2439, doi:10.1073/pnas.0308705101 (2004).
- 150 Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670, doi:10.1073/pnas.72.9.3666 (1975).
- 151 Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. & McDermott, M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* **8**, doi:10.12688/f1000research.17023.1 (2019).
- 152 Pinci, F. *et al.* C-tag TNF: a reporter system to study TNF shedding. *J Biol Chem* **295**, 18065-18075, doi:10.1074/jbc.RA120.015248 (2020).
- 153 Daugherty, M. D. & Malik, H. S. Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races. *Annu Rev Genet* **46**, 677-700, doi:10.1146/annurev-genet-110711-155522 (2012).
- 154 Sharp, P. M. & Hahn, B. H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 2487-2494, doi:10.1098/rstb.2010.0031 (2010).
- 155 Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).
- 156 Goffinet, C. *et al.* HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe* **5**, 285-297, doi:10.1016/j.chom.2009.01.009 (2009).
- 157 Keele, B. F. *et al.* Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* **460**, 515-519, doi:10.1038/nature08200 (2009).
- 158 Silvestri, G. Immunity in natural SIV infections. *J Intern Med* **265**, 97-109, doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02049.x (2009).
- 159 Wu, J. J. *et al.* Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell Host Microbe* **18**, 333-344, doi:10.1016/j.chom.2015.07.015 (2015).
- 160 Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088, doi:10.1126/science.282.5396.2085 (1998).
- 161 Kayagaki, N. *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* **341**, 1246-1249, doi:10.1126/science.1240248 (2013).
- 162 Gale, M., Jr. *et al.* Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* **18**, 5208-5218, doi:10.1128/mcb.18.9.5208 (1998).
- 163 Davies, M. V., Chang, H. W., Jacobs, B. L. & Kaufman, R. J. The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J Virol* **67**, 1688-1692, doi:10.1128/JVI.67.3.1688-1692.1993 (1993).

- 164 Zhao, L. *et al.* Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe* **11**, 607-616, doi:10.1016/j.chom.2012.04.011 (2012).
- 165 Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17717-17722, doi:10.1073/pnas.0508531102 (2005).
- 166 Estornes, Y. *et al.* dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death Differ* **19**, 1482-1494, doi:10.1038/cdd.2012.22 (2012).
- 167 Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-426, doi:10.1016/s1097-2765(02)00599-3 (2002).
- 168 Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A. & Tschopp, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* **19**, 615-622, doi:10.1016/j.coi.2007.09.002 (2007).
- 169 Srinivasula, S. M. *et al.* The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* **277**, 21119-21122, doi:10.1074/jbc.C200179200 (2002).
- 170 Weber, C. H. & Vincenz, C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* **26**, 475-481, doi:10.1016/s0968-0004(01)01905-3 (2001).
- 171 Cai, X. *et al.* Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* **156**, 1207-1222, doi:10.1016/j.cell.2014.01.063 (2014).
- 172 Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G. & Latz, E. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol* **1040**, 91-101, doi:10.1007/978-1-62703-523-1_8 (2013).
- 173 Dick, M. S., Sborgi, L., Ruhl, S., Hiller, S. & Broz, P. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat Commun* **7**, 11929, doi:10.1038/ncomms11929 (2016).
- 174 Boucher, D. *et al.* Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med* **215**, 827-840, doi:10.1084/jem.20172222 (2018).
- 175 Thornberry, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774, doi:10.1038/356768a0 (1992).
- 176 Liu, Z. *et al.* Caspase-1 Engages Full-Length Gasdermin D through Two Distinct Interfaces That Mediate Caspase Recruitment and Substrate Cleavage. *Immunity* **53**, 106-114 e105, doi:10.1016/j.immuni.2020.06.007 (2020).
- 177 Wang, K. *et al.* Structural Mechanism for GSDMD Targeting by Autoprocessed Caspases in Pyroptosis. *Cell* **180**, 941-955 e920, doi:10.1016/j.cell.2020.02.002 (2020).
- 178 Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666-671, doi:10.1038/nature15541 (2015).
- 179 He, W. T. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res* **25**, 1285-1298, doi:10.1038/cr.2015.139 (2015).
- 180 Shi, J. *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187-192, doi:10.1038/nature13683 (2014).

- 181 Fernandes-Alnemri, T. *et al.* The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death & Differentiation* **14**, 1590-1604, doi:10.1038/sj.cdd.4402194 (2007).
- 182 Mariathasan, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213-218, doi:10.1038/nature02664 (2004).
- 183 Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 137-161, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155745 (2012).
- 184 Heilig, R. *et al.* The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1beta secretion in mice. *Eur J Immunol* **48**, 584-592, doi:10.1002/eji.201747404 (2018).
- 185 Monteleone, M. *et al.* Interleukin-1beta Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep* **24**, 1425-1433, doi:10.1016/j.celrep.2018.07.027 (2018).
- 186 Gaidt, M. M. *et al.* Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* **44**, 833-846, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.012 (2016).
- 187 Zanoni, I. *et al.* An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* **352**, 1232-1236, doi:10.1126/science.aaf3036 (2016).
- 188 Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153-158, doi:10.1038/nature18629 (2016).
- 189 Broz, P., von Moltke, J., Jones, J. W., Vance, R. E. & Monack, D. M. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* **8**, 471-483, doi:10.1016/j.chom.2010.11.007 (2010).
- 190 Kastner, D. L. Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 74-81, doi:10.1182/asheducation-2005.1.74 (2005).
- 191 Agostini, L. *et al.* NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319-325, doi:10.1016/s1074-7613(04)00046-9 (2004).
- 192 Lachmann, H. J. *et al.* In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Exp Med* **206**, 1029-1036, doi:10.1084/jem.20082481 (2009).
- 193 Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* **9**, 857-865, doi:10.1038/ni.1636 (2008).
- 194 Kingsbury, S. R., Conaghan, P. G. & McDermott, M. F. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res* **4**, 39-49, doi:10.2147/JIR.S11330 (2011).
- 195 Bauernfeind, F. G. *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* **183**, 787-791, doi:10.4049/jimmunol.0901363 (2009).
- 196 Juliana, C. *et al.* Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* **287**, 36617-36622, doi:10.1074/jbc.M112.407130 (2012).
- 197 Perregaux, D. & Gabel, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* **269**, 15195-15203 (1994).
- 198 Dostert, C. *et al.* Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674-677, doi:10.1126/science.1156995 (2008).

- 199 Li, R. *et al.* Surface charge and cellular processing of covalently functionalized multiwall carbon nanotubes determine pulmonary toxicity. *ACS Nano* **7**, 2352-2368, doi:10.1021/nn305567s (2013).
- 200 Kanneganti, T. D. *et al.* Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **281**, 36560-36568, doi:10.1074/jbc.M607594200 (2006).
- 201 Kanneganti, T. D. *et al.* Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-236, doi:10.1038/nature04517 (2006).
- 202 Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237-241, doi:10.1038/nature04516 (2006).
- 203 Munoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L. S. & Nunez, G. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in Staphylococcus aureus-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* **183**, 3942-3948, doi:10.4049/jimmunol.0900729 (2009).
- 204 Gaidt, M. M. *et al.* The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell* **171**, 1110-1124 e1118, doi:10.1016/j.cell.2017.09.039 (2017).
- 205 Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* **9**, 847-856, doi:10.1038/ni.1631 (2008).
- 206 Franchi, L., Kanneganti, T. D., Dubyak, G. R. & Nunez, G. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem* **282**, 18810-18818, doi:10.1074/jbc.M610762200 (2007).
- 207 Petrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583-1589, doi:10.1038/sj.cdd.4402195 (2007).
- 208 Gross, C. J. *et al.* K(+) Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* **45**, 761-773, doi:10.1016/j.immuni.2016.08.010 (2016).
- 209 Chen, J. & Chen, Z. J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **564**, 71-76, doi:10.1038/s41586-018-0761-3 (2018).
- 210 Schroder, K., Zhou, R. & Tschopp, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* **327**, 296-300, doi:10.1126/science.1184003 (2010).
- 211 Broz, P. *et al.* Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. *Nature* **490**, 288-291, doi:10.1038/nature11419 (2012).
- 212 Schmid-Burgk, J. L. *et al.* Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol* **45**, 2911-2917, doi:10.1002/eji.201545523 (2015).
- 213 Ruhl, S. *et al.* ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* **362**, 956-960, doi:10.1126/science.aar7607 (2018).
- 214 Sutterwala, F. S. *et al.* Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* **204**, 3235-3245, doi:10.1084/jem.20071239 (2007).

- 215 Zychlinsky, A., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**, 167-169, doi:10.1038/358167a0 (1992).
- 216 Raupach, B., Peuschel, S. K., Monack, D. M. & Zychlinsky, A. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* **74**, 4922-4926, doi:10.1128/IAI.00417-06 (2006).
- 217 Hu, B. *et al.* Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21635-21640, doi:10.1073/pnas.1016814108 (2010).
- 218 Rauch, I. *et al.* NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. *Immunity* **46**, 649-659, doi:10.1016/j.immuni.2017.03.016 (2017).
- 219 Lightfield, K. L. *et al.* Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun* **79**, 1606-1614, doi:10.1128/IAI.01187-10 (2011).
- 220 Kofoed, E. M. & Vance, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**, 592-595, doi:10.1038/nature10394 (2011).
- 221 Zhao, Y. *et al.* The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**, 596-600, doi:10.1038/nature10510 (2011).
- 222 Tentorey, J. L., Kofoed, E. M., Daugherty, M. D., Malik, H. S. & Vance, R. E. Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Mol Cell* **54**, 17-29, doi:10.1016/j.molcel.2014.02.018 (2014).
- 223 Duncan, J. A. & Canna, S. W. The NLRC4 Inflammasome. *Immunol Rev* **281**, 115-123, doi:10.1111/imr.12607 (2018).
- 224 Yu, J. W. *et al.* Pypin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell* **28**, 214-227, doi:10.1016/j.molcel.2007.08.029 (2007).
- 225 Kim, M. L. *et al.* Aberrant actin depolymerization triggers the pypin inflammasome and autoinflammatory disease that is dependent on IL-18, not IL-1beta. *J Exp Med* **212**, 927-938, doi:10.1084/jem.20142384 (2015).
- 226 Chae, J. J. *et al.* Gain-of-function Pypin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1beta activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity* **34**, 755-768, doi:10.1016/j.immuni.2011.02.020 (2011).
- 227 Sharma, D. *et al.* Pypin Inflammasome Regulates Tight Junction Integrity to Restrict Colitis and Tumorigenesis. *Gastroenterology* **154**, 948-964 e948, doi:10.1053/j.gastro.2017.11.276 (2018).
- 228 Alimov, I. *et al.* Bile acid analogues are activators of pypin inflammasome. *J Biol Chem* **294**, 3359-3366, doi:10.1074/jbc.RA118.005103 (2019).
- 229 Xu, H. *et al.* Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pypin inflammasome. *Nature* **513**, 237-241, doi:10.1038/nature13449 (2014).
- 230 Park, Y. H., Wood, G., Kastner, D. L. & Chae, J. J. Pypin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol* **17**, 914-921, doi:10.1038/ni.3457 (2016).
- 231 Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514-518, doi:10.1038/nature07725 (2009).
- 232 Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509-513, doi:10.1038/nature07710 (2009).

- 233 Burckstummer, T. *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* **10**, 266-272, doi:10.1038/ni.1702 (2009).
- 234 Roberts, T. L. *et al.* HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* **323**, 1057-1060, doi:10.1126/science.1169841 (2009).
- 235 Jin, T. *et al.* Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* **36**, 561-571, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.014 (2012).
- 236 Morrone, S. R. *et al.* Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC. *Nat Commun* **6**, 7827, doi:10.1038/ncomms8827 (2015).
- 237 Rathinam, V. A. *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* **11**, 395-402, doi:10.1038/ni.1864 (2010).
- 238 Jakobs, C., Perner, S. & Hornung, V. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLoS One* **10**, e0131702, doi:10.1371/journal.pone.0131702 (2015).
- 239 D'Osualdo, A. *et al.* CARD8 and NLRP1 undergo autoproteolytic processing through a ZU5-like domain. *PLoS One* **6**, e27396, doi:10.1371/journal.pone.0027396 (2011).
- 240 Wang, R. *et al.* Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor. *Mol Cell* **33**, 692-703, doi:10.1016/j.molcel.2009.02.016 (2009).
- 241 Wang, C., Yu, C., Ye, F., Wei, Z. & Zhang, M. Structure of the ZU5-ZU5-UPA-DD tandem of ankyrin-B reveals interaction surfaces necessary for ankyrin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4822-4827, doi:10.1073/pnas.1200613109 (2012).
- 242 Huang, M. *et al.* Structural and biochemical mechanisms of NLRP1 inhibition by DPP9. *Nature*, doi:10.1038/s41586-021-03320-w (2021).
- 243 Finger, J. N. *et al.* Autolytic proteolysis within the function to find domain (FIIND) is required for NLRP1 inflammasome activity. *J Biol Chem* **287**, 25030-25037, doi:10.1074/jbc.M112.378323 (2012).
- 244 Tinel, A. *et al.* Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *EMBO J* **26**, 197-208, doi:10.1038/sj.emboj.7601473 (2007).
- 245 Frew, B. C., Joag, V. R. & Mogridge, J. Proteolytic processing of Nlrp1b is required for inflammasome activity. *PLoS Pathog* **8**, e1002659, doi:10.1371/journal.ppat.1002659 (2012).
- 246 Chui, A. J. *et al.* N-terminal degradation activates the NLRP1B inflammasome. *Science* **364**, 82-85, doi:10.1126/science.aau1208 (2019).
- 247 Sandstrom, A. *et al.* Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. *Science* **364**, doi:10.1126/science.aau1330 (2019).
- 248 Hollingsworth, L. R. *et al.* Mechanism of filament formation in UPA-promoted CARD8 and NLRP1 inflammasomes. *Nat Commun* **12**, 189, doi:10.1038/s41467-020-20320-y (2021).
- 249 Gong, Q. *et al.* Structural basis for distinct inflammasome complex assembly by human NLRP1 and CARD8. *Nat Commun* **12**, 188, doi:10.1038/s41467-020-20319-5 (2021).

- 250 Johnson, D. C. *et al.* DPP8/DPP9 inhibitor-induced pyroptosis for treatment of acute myeloid leukemia. *Nat Med* **24**, 1151-1156, doi:10.1038/s41591-018-0082-y (2018).
- 251 de Vasconcelos, N. M. *et al.* DPP8/DPP9 inhibition elicits canonical Nlrp1b inflammasome hallmarks in murine macrophages. *Life Sci Alliance* **2**, doi:10.26508/lsa.201900313 (2019).
- 252 Okondo, M. C. *et al.* Inhibition of Dpp8/9 Activates the Nlrp1b Inflammasome. *Cell Chem Biol* **25**, 262-267 e265, doi:10.1016/j.chembiol.2017.12.013 (2018).
- 253 Ross, B. *et al.* Structures and mechanism of dipeptidyl peptidases 8 and 9, important players in cellular homeostasis and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E1437-E1445, doi:10.1073/pnas.1717565115 (2018).
- 254 Hollingsworth, L. R. *et al.* DPP9 sequesters the C terminus of NLRP1 to repress inflammasome activation. *Nature*, doi:10.1038/s41586-021-03350-4 (2021).
- 255 Okondo, M. C. *et al.* DPP8 and DPP9 inhibition induces pro-caspase-1-dependent monocyte and macrophage pyroptosis. *Nat Chem Biol* **13**, 46-53, doi:10.1038/nchembio.2229 (2017).
- 256 Linder, A. *et al.* CARD8 inflammasome activation triggers pyroptosis in human T cells. *EMBO J* **39**, e105071, doi:10.15252/embj.2020105071 (2020).
- 257 Johnson, D. C. *et al.* DPP8/9 inhibitors activate the CARD8 inflammasome in resting lymphocytes. *Cell Death Dis* **11**, 628, doi:10.1038/s41419-020-02865-4 (2020).
- 258 Sharif, H. *et al.* Structural mechanism of CARD8 regulation by DPP9. *BioRxiv*, doi:10.1101/2021.01.13.426575 (2021).
- 259 Smith, H. & Keppie, J. Observations on experimental anthrax; demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by Bacillus anthracis. *Nature* **173**, 869-870, doi:10.1038/173869a0 (1954).
- 260 Smith, H., Keppie, J. & Stanley, J. L. The chemical basis of the virulence of Bacillus anthracis. V. The specific toxin produced by B. Anthracis in vivo. *Br J Exp Pathol* **36**, 460-472 (1955).
- 261 Beall, F. A., Taylor, M. J. & Thorne, C. B. Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of Bacillus anthracis. *J Bacteriol* **83**, 1274-1280, doi:10.1128/JB.83.6.1274-1280.1962 (1962).
- 262 Banks, D. J., Barnajian, M., Maldonado-Arocho, F. J., Sanchez, A. M. & Bradley, K. A. Anthrax toxin receptor 2 mediates Bacillus anthracis killing of macrophages following spore challenge. *Cell Microbiol* **7**, 1173-1185, doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00545.x (2005).
- 263 Bhatnagar, R. & Batra, S. Anthrax toxin. *Crit Rev Microbiol* **27**, 167-200, doi:10.1080/20014091096738 (2001).
- 264 O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J. & Leppla, S. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun* **47**, 306-310, doi:10.1128/IAI.47.1.306-310.1985 (1985).
- 265 Wright, G. G. & Mandell, G. L. Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J Exp Med* **164**, 1700-1709, doi:10.1084/jem.164.5.1700 (1986).
- 266 Hoover, D. L. *et al.* Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. *Infect Immun* **62**, 4432-4439, doi:10.1128/IAI.62.10.4432-4439.1994 (1994).

- 267 Klimpel, K. R., Arora, N. & Leppla, S. H. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol* **13**, 1093-1100, doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x (1994).
- 268 Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M. & Montecucco, C. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α . *FEBS Lett* **462**, 199-204, doi:10.1016/s0014-5793(99)01502-1 (1999).
- 269 Hoffmeyer, A. *et al.* Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *J Biol Chem* **274**, 4319-4327, doi:10.1074/jbc.274.7.4319 (1999).
- 270 Friedlander, A. M. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J Biol Chem* **261**, 7123-7126, doi:10.1016/s0021-9258(17)38364-3 (1986).
- 271 Hanna, P. C., Acosta, D. & Collier, R. J. On the role of macrophages in anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10198-10201, doi:10.1073/pnas.90.21.10198 (1993).
- 272 Roberts, J. E., Watters, J. W., Ballard, J. D. & Dietrich, W. F. Ltx1, a mouse locus that influences the susceptibility of macrophages to cytolysis caused by intoxication with *Bacillus anthracis* lethal factor, maps to chromosome 11. *Mol Microbiol* **29**, 581-591, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00953.x (1998).
- 273 Boyden, E. D. & Dietrich, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38**, 240-244, doi:10.1038/ng1724 (2006).
- 274 Gai, K. *et al.* DPP8/9 inhibitors are universal activators of functional NLRP1 alleles. *Cell Death Dis* **10**, 587, doi:10.1038/s41419-019-1817-5 (2019).
- 275 Sastalla, I. *et al.* Transcriptional analysis of the three Nlrp1 paralogs in mice. *BMC Genomics* **14**, 188, doi:10.1186/1471-2164-14-188 (2013).
- 276 Newman, Z. L. *et al.* Susceptibility to anthrax lethal toxin-induced rat death is controlled by a single chromosome 10 locus that includes rNlrp1. *PLoS Pathog* **6**, e1000906, doi:10.1371/journal.ppat.1000906 (2010).
- 277 Moayeri, M. *et al.* Inflammasome sensor Nlrp1b-dependent resistance to anthrax is mediated by caspase-1, IL-1 signaling and neutrophil recruitment. *PLoS Pathog* **6**, e1001222, doi:10.1371/journal.ppat.1001222 (2010).
- 278 Hellmich, K. A. *et al.* Anthrax lethal factor cleaves mouse nlrp1b in both toxin-sensitive and toxin-resistant macrophages. *PLoS One* **7**, e49741, doi:10.1371/journal.pone.0049741 (2012).
- 279 Levinsohn, J. L. *et al.* Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog* **8**, e1002638, doi:10.1371/journal.ppat.1002638 (2012).
- 280 Chavarria-Smith, J. & Vance, R. E. Direct proteolytic cleavage of NLRP1B is necessary and sufficient for inflammasome activation by anthrax lethal factor. *PLoS Pathog* **9**, e1003452, doi:10.1371/journal.ppat.1003452 (2013).
- 281 Mitchell, P. S., Sandstrom, A. & Vance, R. E. The NLRP1 inflammasome: new mechanistic insights and unresolved mysteries. *Curr Opin Immunol* **60**, 37-45, doi:10.1016/j.coi.2019.04.015 (2019).
- 282 Squires, R. C., Muehlbauer, S. M. & Brojatsch, J. Proteasomes control caspase-1 activation in anthrax lethal toxin-mediated cell killing. *J Biol Chem* **282**, 34260-34267, doi:10.1074/jbc.M705687200 (2007).
- 283 Wickliffe, K. E., Leppla, S. H. & Moayeri, M. Killing of macrophages by anthrax lethal toxin: involvement of the N-end rule pathway. *Cell Microbiol* **10**, 1352-1362, doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01131.x (2008).

- 284 Wickliffe, K. E., Leppla, S. H. & Moayeri, M. Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. *Cell Microbiol* **10**, 332-343, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01044.x (2008).
- 285 Tang, G. & Leppla, S. H. Proteasome activity is required for anthrax lethal toxin to kill macrophages. *Infect Immun* **67**, 3055-3060, doi:10.1128/IAI.67.6.3055-3060.1999 (1999).
- 286 Xu, H. *et al.* The N-end rule ubiquitin ligase UBR2 mediates NLRP1B inflammasome activation by anthrax lethal toxin. *EMBO J* **38**, e101996, doi:10.15252/embj.2019101996 (2019).
- 287 Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186, doi:10.1126/science.3018930 (1986).
- 288 Baker, R. T. & Varshavsky, A. Inhibition of the N-end rule pathway in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1090-1094, doi:10.1073/pnas.88.4.1090 (1991).
- 289 Cirelli, K. M. *et al.* Inflammasome sensor NLRP1 controls rat macrophage susceptibility to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **10**, e1003927, doi:10.1371/journal.ppat.1003927 (2014).
- 290 Ewald, S. E., Chavarria-Smith, J. & Boothroyd, J. C. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **82**, 460-468, doi:10.1128/IAI.01170-13 (2014).
- 291 Witola, W. H. *et al.* NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun* **79**, 756-766, doi:10.1128/IAI.00898-10 (2011).
- 292 Zhong, F. L. *et al.* Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell* **167**, 187-202 e117, doi:10.1016/j.cell.2016.09.001 (2016).
- 293 Schmid-Burgk, J. L. *et al.* A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem* **291**, 103-109, doi:10.1074/jbc.C115.700492 (2016).
- 294 Liao, K. C. & Mogridge, J. Expression of Nlrp1b inflammasome components in human fibroblasts confers susceptibility to anthrax lethal toxin. *Infect Immun* **77**, 4455-4462, doi:10.1128/IAI.00276-09 (2009).
- 295 Faustin, B. *et al.* Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**, 713-724, doi:10.1016/j.molcel.2007.01.032 (2007).
- 296 Gerlic, M. *et al.* Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7808-7813, doi:10.1073/pnas.1215995110 (2013).
- 297 Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232, doi:10.1038/nature04515 (2006).
- 298 Gregory, S. M. *et al.* Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome. *Science* **331**, 330-334, doi:10.1126/science.1199478 (2011).
- 299 Reubold, T. F., Hahne, G., Wohlgenuth, S. & Eschenburg, S. Crystal structure of the leucine-rich repeat domain of the NOD-like receptor NLRP1: implications for binding of muramyl dipeptide. *FEBS Lett* **588**, 3327-3332, doi:10.1016/j.febslet.2014.07.017 (2014).

- 300 Feldmeyer, L. *et al.* The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol* **17**, 1140-1145, doi:10.1016/j.cub.2007.05.074 (2007).
- 301 Sollberger, G. *et al.* Caspase-1 activity is required for UVB-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **135**, 1395-1404, doi:10.1038/jid.2014.551 (2015).
- 302 Watanabe, H. *et al.* Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **127**, 1956-1963, doi:10.1038/sj.jid.5700819 (2007).
- 303 Faustin, B. & Reed, J. C. Sunburned skin activates inflammasomes. *Trends Cell Biol* **18**, 4-8, doi:10.1016/j.tcb.2007.10.004 (2008).
- 304 Fenini, G. *et al.* Genome Editing of Human Primary Keratinocytes by CRISPR/Cas9 Reveals an Essential Role of the NLRP1 Inflammasome in UVB Sensing. *J Invest Dermatol* **138**, 2644-2652, doi:10.1016/j.jid.2018.07.016 (2018).
- 305 Sand, J. *et al.* Expression of inflammasome proteins and inflammasome activation occurs in human, but not in murine keratinocytes. *Cell Death Dis* **9**, 24, doi:10.1038/s41419-017-0009-4 (2018).
- 306 Zurawek, M. *et al.* A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. *Hum Immunol* **71**, 530-534, doi:10.1016/j.humimm.2010.02.004 (2010).
- 307 Magitta, N. F. *et al.* A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun* **10**, 120-124, doi:10.1038/gene.2008.85 (2009).
- 308 Jin, Y. *et al.* NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* **356**, 1216-1225, doi:10.1056/NEJMoa061592 (2007).
- 309 Jin, Y., Birlea, S. A., Fain, P. R. & Spritz, R. A. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J Invest Dermatol* **127**, 2558-2562, doi:10.1038/sj.jid.5700953 (2007).
- 310 Soler, V. J. *et al.* Whole exome sequencing identifies a mutation for a novel form of corneal intraepithelial dyskeratosis. *J Med Genet* **50**, 246-254, doi:10.1136/jmedgenet-2012-101325 (2013).
- 311 Levandowski, C. B. *et al.* NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1beta processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2952-2956, doi:10.1073/pnas.1222808110 (2013).
- 312 Dieude, P. *et al.* NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosing alveolitis pathogenesis. *Ann Rheum Dis* **70**, 668-674, doi:10.1136/ard.2010.131243 (2011).
- 313 George, R. D. *et al.* Trans genomic capture and sequencing of primate exomes reveals new targets of positive selection. *Genome Res* **21**, 1686-1694, doi:10.1101/gr.121327.111 (2011).
- 314 Dickson, M. A. *et al.* Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**, 1436-1447, doi:10.1128/mcb.20.4.1436-1447.2000 (2000).
- 315 Grandemange, S. *et al.* A new autoinflammatory and autoimmune syndrome associated with NLRP1 mutations: NAIAD (NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis). *Ann Rheum Dis* **76**, 1191-1198, doi:10.1136/annrheumdis-2016-210021 (2017).

- 316 Harapas, C. R. *et al.* DPP9 deficiency : an Inflammasomopathy which can be rescued by lowering NLRP1/IL-1 signaling. doi:10.1101/2021.01.31.21250067 (2021).
- 317 Drutman, S. B. *et al.* Homozygous NLRP1 gain-of-function mutation in siblings with a syndromic form of recurrent respiratory papillomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 19055-19063, doi:10.1073/pnas.1906184116 (2019).
- 318 Moecking, J. *et al.* NLRP1 variant M1184V decreases inflammasome activation in the context of DPP9 inhibition and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*, doi:10.1016/j.jaci.2020.12.636 (2020).
- 319 Robinson, K. S. *et al.* Enteroviral 3C protease activates the human NLRP1 inflammasome in airway epithelia. *Science* **370**, doi:10.1126/science.aay2002 (2020).
- 320 Tsu, B. V. *et al.* Diverse viral proteases activate the NLRP1 inflammasome. *Elife* **10**, doi:10.7554/eLife.60609 (2021).
- 321 Bouchier-Hayes, L. *et al.* CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. *J Biol Chem* **276**, 44069-44077, doi:10.1074/jbc.M107373200 (2001).
- 322 Razmara, M. *et al.* CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 13952-13958, doi:10.1074/jbc.M107811200 (2002).
- 323 Mao, L. *et al.* Loss-of-function CARD8 mutation causes NLRP3 inflammasome activation and Crohn's disease. *J Clin Invest* **128**, 1793-1806, doi:10.1172/JCI98642 (2018).
- 324 Ito, S., Hara, Y. & Kubota, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther* **16**, R52, doi:10.1186/ar4483 (2014).
- 325 Ball, D. P. *et al.* Caspase-1 interdomain linker cleavage is required for pyroptosis. *Life Sci Alliance* **3**, doi:10.26508/lsa.202000664 (2020).
- 326 Griswold, A. R. *et al.* DPP9's Enzymatic Activity and Not Its Binding to CARD8 Inhibits Inflammasome Activation. *ACS Chem Biol* **14**, 2424-2429, doi:10.1021/acscchembio.9b00462 (2019).
- 327 Chui, A. J. *et al.* Activation of the CARD8 Inflammasome Requires a Disordered Region. *Cell Rep* **33**, 108264, doi:10.1016/j.celrep.2020.108264 (2020).
- 328 Adams, S. *et al.* PT-100, a small molecule dipeptidyl peptidase inhibitor, has potent antitumor effects and augments antibody-mediated cytotoxicity via a novel immune mechanism. *Cancer Res* **64**, 5471-5480, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0447 (2004).
- 329 Chiravuri, M. *et al.* A novel apoptotic pathway in quiescent lymphocytes identified by inhibition of a post-proline cleaving aminodipeptidase: a candidate target protease, quiescent cell proline dipeptidase. *J Immunol* **163**, 3092-3099 (1999).
- 330 Schon, E. *et al.* The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. *Eur J Immunol* **17**, 1821-1826, doi:10.1002/eji.1830171222 (1987).
- 331 Wang, Q. *et al.* CARD8 is an inflammasome sensor for HIV-1 protease activity. *Science* **371**, doi:10.1126/science.abe1707 (2021).
- 332 Green, R. & Rogers, E. J. Transformation of chemically competent E. coli. *Methods Enzymol* **529**, 329-336, doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8 (2013).

- 333 Goldeck, M., Schlee, M., Hartmann, G. & Hornung, V. Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand. *Methods Mol Biol* **1169**, 15-25, doi:10.1007/978-1-4939-0882-0_2 (2014).
- 334 Rubio, I., Pusch, R. & Wetzker, R. Quantification of absolute Ras-GDP/GTP levels by HPLC separation of Ras-bound [(32)P]-labelled nucleotides. *J Biochem Biophys Methods* **58**, 111-117, doi:10.1016/j.jbbm.2003.07.001 (2004).
- 335 Pettersen, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* **30**, 70-82, doi:10.1002/pro.3943 (2021).
- 336 Briolant, S., Garin, D., Scaramozzino, N., Jouan, A. & Crance, J. M. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. *Antiviral Res* **61**, 111-117, doi:10.1016/j.antiviral.2003.09.005 (2004).
- 337 Franchi, L. *et al.* Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K⁺ efflux. *J Immunol* **193**, 4214-4222, doi:10.4049/jimmunol.1400582 (2014).
- 338 Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M. & Takeuchi, T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* **29**, 97-99, doi:10.7164/antibiotics.29.97 (1976).
- 339 Harris, P. A. *et al.* High throughput screening identifies ATP-competitive inhibitors of the NLRP1 inflammasome. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 2739-2743, doi:10.1016/j.bmcl.2015.05.032 (2015).
- 340 Vermeire, J. *et al.* Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PLoS One* **7**, e50859, doi:10.1371/journal.pone.0050859 (2012).
- 341 Schumann, K. *et al.* Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10437-10442, doi:10.1073/pnas.1512503112 (2015).
- 342 Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R. & Paludan, S. R. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* **80**, 5059-5064, doi:10.1128/JVI.80.10.5059-5064.2006 (2006).
- 343 Klein, S. *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* **11**, 5885, doi:10.1038/s41467-020-19619-7 (2020).
- 344 Wolff, G. *et al.* A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science* **369**, 1395-1398, doi:10.1126/science.abd3629 (2020).
- 345 Cassel, S. L. & Sutterwala, F. S. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* **40**, 607-611, doi:10.1002/eji.200940207 (2010).
- 346 Kranzusch, P. J., Lee, A. S., Berger, J. M. & Doudna, J. A. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep* **3**, 1362-1368, doi:10.1016/j.celrep.2013.05.008 (2013).
- 347 Civril, F. *et al.* Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* **498**, 332-337, doi:10.1038/nature12305 (2013).
- 348 Ahmad, S. & Hur, S. Helicases in Antiviral Immunity: Dual Properties as Sensors and Effectors. *Trends Biochem Sci* **40**, 576-585, doi:10.1016/j.tibs.2015.08.001 (2015).

- 349 Danot, O. How 'arm-twisting' by the inducer triggers activation of the MalT transcription factor, a typical signal transduction ATPase with numerous domains (STAND). *Nucleic Acids Res* **43**, 3089-3099, doi:10.1093/nar/gkv158 (2015).
- 350 Cavlar, T., Deimling, T., Ablasser, A., Hopfner, K. P. & Hornung, V. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J* **32**, 1440-1450, doi:10.1038/emboj.2013.86 (2013).
- 351 Nour, A. M. *et al.* Anthrax lethal toxin triggers the formation of a membrane-associated inflammasome complex in murine macrophages. *Infect Immun* **77**, 1262-1271, doi:10.1128/IAI.01032-08 (2009).
- 352 Besch, R. *et al.* Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* **119**, 2399-2411, doi:10.1172/JCI37155 (2009).
- 353 Li, T., Chen, J. & Cristea, I. M. Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. *Cell Host Microbe* **14**, 591-599, doi:10.1016/j.chom.2013.10.007 (2013).
- 354 Schulz, O. *et al.* Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe* **7**, 354-361, doi:10.1016/j.chom.2010.04.007 (2010).

8 Abkürzungsverzeichnis

2pRNA	5'-Diphosphat-RNA
3pRNA	5'-Triphosphat-RNA
aa	<i>amino acid</i>
AAA+ ATPasen	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>
AD	<i>acidic transactivation</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADAR1	<i>adenosine deaminase acting on RNA 1</i>
AIADK	<i>autoinflammation with arthritis and dyskeratosis</i>
AIM	<i>absent-in-melanoma</i>
ALRs	<i>absent-in-melanoma-like receptors</i>
AML	akute myeloischen Leukämie
AMP	antimikrobielle Proteine
AP-1	<i>activator protein 1</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APOBEC3	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3C</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
BIR	<i>baculovirus inhibitor of apoptosis repeat</i>
BMDMs	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
bp	Basenpaar
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	<i>cryopyrin-associated periodic syndrome</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CARD8	<i>caspase recruitment domain-containing protein 8</i>
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
cDNA	komplementäre DNA
c-FLIP	<i>cellular FADD-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein</i>
cGAMP	zyklisches GMP-AMP
cGAS	<i>cGAMP synthase</i>
CHX	Cycloheximid
CIITA	<i>class II, major histocompatibility complex, transactivator</i>
CINCA	<i>chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome</i>
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i>
CMA	10-Carboxymethyl-9-Acridanon
Cryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
CTD	<i>carboxy-terminal domain</i>
CTLRs	<i>C-type lectin-like receptors</i>
CTP	Cytidintriphosphat
CV	<i>column volume</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddhCTP	3'-Desoxy-3',4'-didehydro-CTP
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DPP	Dipeptidylpeptidase
dsRNA	doppelsträngige RNA
DSS	Dimethylsuccinylsuccinat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	<i>edema factor</i>
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
ET	Edematoxin
EtOH	Ethanol
<i>F. tularensis</i>	<i>Fransicella tularensis</i>
FCAS	<i>familial cold autoinflammatory syndrome</i>
FCS	fetales Kälberserum
FIIND	<i>function-to-find-domain</i>
FKLC	<i>familial keratosis lichenoides chronica</i>
FMF	<i>familial mediterranean fever</i>
FP	fluoreszierendes Protein
<i>g</i>	<i>g</i> -Kraft
<i>g</i>	Gramm
GSDMD	Gasdermin D
GSDME	Gasdermin E
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HAMPs	<i>homeostasis-altering molecular processes</i>
HCl	Salzsäure
HD	helikale Domänen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIN	<i>hematopoietic expression, interferon-inducible nature, and nuclear localization</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
HT-DNA	<i>herring testis-DNA</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
ICE	<i>interleukin-1 converting enzyme</i>
IFI16	<i>Gamma-interferon-inducible protein 16</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1Ra	IL-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1 β	Interleukin-1 β
IP	<i>immunoprecipitation</i>
IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRF	<i>interferon-regulatory factor</i>
ISGs	IFN-stimulierte Gene
IVT	In-vitro-Transkription
JAK	<i>Janus kinases</i>
JRRP	<i>juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis</i>

K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
L	Liter
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LF	Letalfaktor
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
Lipo	Lipofectamine
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
LRR(k)	LRR(kurz)
LRR(l)	LRR(lang)
LT	Letaltoxin
M	Molar
Mal	<i>MyD88 adapter-like</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MCM	<i>minichromosome maintenance</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated 5</i>
MDP	Muramyl-Dipeptid
Me-Bs	Bestatin-Methylester
MEFV	<i>Mediterranean Fever</i>
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MINCLE	<i>macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor</i>
MKK	MAPK Kinasen
ml	Milliliter
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like</i>
mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSPC	<i>multiple self-healing palmoplantar carcinoma</i>
MV	Masernvirus
MVA	Modified Vaccinia Ankara
MWS	<i>Muckle-Wells syndrome</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NACHT	<i>domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP-1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NBD	nucleotide-binding domain
Nef	<i>negative factor</i>
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NHEK	<i>Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes</i>

Nig.	Nigericin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLRA	<i>NLR family acidic transactivation domain containing proteins</i>
NLRB	<i>NLR family BIR domain containing proteins</i>
NLRC	<i>NLR family CARD containing proteins</i>
NLRP	<i>NLR family PYD containing proteins</i>
NLRP1	<i>NLR family PYD containing protein 1</i>
NLRs	<i>nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing proteins</i>
nM	Nanomolar
NNRTIs	nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOMID	<i>neonatal-onset multisystem inflammatory disease syndrome</i>
ns	nicht signifikant
nt	<i>nucleotides</i>
NT	<i>NeedleTox</i>
OAS	<i>2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein</i>
OASL	<i>OAS-like protein</i>
PA	Protektives Antigen
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAPA	<i>pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne</i>
PBL	<i>PBS1-like kinase</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PI	Propidiumiodid
PIDD	<i>p53-inducible protein with a death domain</i>
PKR	<i>protein kinase RNA-activated</i>
pmol	Picomol
poly(I:C)	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PYD	<i>pyrin domain</i>
PYHIN	<i>pyrin and HIN domain</i>
RbCl	Rubidiumchlorid
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RIG-I	<i>retinoic-acid inducible gene 1</i>
RIPK	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase</i>
RKS1	<i>resistance-related kinase 1</i>
RLRs	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase L	<i>Ribonuclease L</i>
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFV	Semliki Forrest Virus
SIV	Simiane Immundefizienz-Virus
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAND	<i>signal transduction ATPases with numerous domains</i>

STAT	<i>signal transducer and activator of transcription proteins</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TACE	<i>tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein</i>
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
TREX1	<i>3' repair exonuclease 1</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIM21	<i>Tripartite motif containing-21</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNC5	<i>uncoordinated protein 5</i>
UPA	<i>conserved in UNC5, PIDD and Ankirins</i>
UV	Ultraviolett
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
v/v	Volumen/Volumen
VACV	<i>Vaccinia Virus</i>
VAMAS1	<i>Vitiligo-associated multiple autoimmune disease 1</i>
VbP	Val-boro-Pro
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
Vpx	<i>viral protein X</i>
w/v	Gewicht/Volumen
WHD	<i>winged helix domain</i>
wt	Wildtyp
ZAR1	<i>HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1</i>
ZBP1	<i>Z-DNA-binding protein 1</i>
ZU5	<i>found in ZO-1 and UNC5</i>
μ M	Mikromolar

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper und Verwendung.	31
Tabelle 2: Bakterienstämme.....	31
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	33
Tabelle 4: Restriktionsenzyme.....	33
Tabelle 5: Oligonukleotide für Klonierungszwecke (alle von IDT).	34
Tabelle 6: Verwendete und generierte Plasmide.	36
Tabelle 7: Verwendete und generierte rekombinante Proteine.	36
Tabelle 8: Puffer und Zusammensetzungen.	38
Tabelle 9: Antibiotika und Konzentrationen.....	38
Tabelle 10: Geräte.	38
Tabelle 11: Software.....	39
Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Linearisierung eines Plasmids.	39
Tabelle 13: Reaktionsansatz für eine <i>Gibson assembly</i>	40
Tabelle 14: Reaktionsansatz für eine Ligation mit T4-Ligase.	40
Tabelle 15: Oligonukleotide zur Generierung kurzer dsDNA- und dsRNA-Fragmente.	41
Tabelle 16: Oligonukleotide zur Generierung eines <i>templates</i> für die IVT4-Generierung.	41
Tabelle 17: Oligonukleotide zur Generierung eines <i>templates</i> für IVTs.	42
Tabelle 18: Reaktionsansatz zur PCR.	42
Tabelle 19: Zyklusbedingungen für die PCR.....	42
Tabelle 20: Reaktionsansatz zur IVT.	43
Tabelle 21: Viren.....	43
Tabelle 22: Zelllinien.....	43
Tabelle 23: crRNAs (alle von IDT) und anvisierte Stellen.....	45
Tabelle 24: Verwendete biotinylierte Oligonukleotide.	48
Tabelle 25: Verwendete Fluorescein-markierte Oligonukleotide.....	52

10 Danksagung

Allgemein möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet haben und ein Teil dieser außergewöhnlichen Zeit waren.

Besonderer Dank gilt Professor Dr. Veit Hornung. Ich bin Dir sehr dankbar, dass ich in Deiner Gruppe forschen durfte. Einerseits konnte ich die Freiheit genießen eigene Ideen einzubringen und Ansätze zu verfolgen, andererseits hattest Du aber auch immer eine offene Tür, um interessante Ergebnisse sowie auch Probleme zu besprechen. Danke Dir vielmals.

Danke an alle Kolleginnen und Kollegen der vergangenen und gegenwärtigen Jahre. Es herrschte immer eine angenehme und lebendige Atmosphäre in der man sich sehr wohlfühlte. Ein besonderer Dank gilt auch Larissa und Jochen für deren technische Unterstützung und Hilfe.

Ich bin auch unseren Kollaborationspartnern sehr dankbar, die uns mit Reagenzien, wie Viren, Proteinen, Inhibitoren oder interessanten Ideen, unterstützt haben.

Danke an die *International Max Planck Research School for Molecular Life Sciences*, vor allem Maximiliane Reif, Hans-Jörg Schäffer und Ingrid Wolf, für ein tolles Rahmenprogramm und vielfältige Veranstaltungen.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern, meiner Familie sowie meinen Freunden, die mich unterstützt und mir auf meinem Weg geholfen haben, auch wenn uns zumeist einige hundert Kilometer getrennt haben. Danke euch.

Last but not least gebührt ein großer Dank Matthias. Ich bin sehr froh dich als *partner in crime* zu haben und mein Leben mit dir teilen zu können. Danke dir auch für unsere Kollaboration und dass du mir die Biochemie nähergebracht hast.