



**Identifizierung und Charakterisierung von IFN γ regulierten
Effektormolekülen (mGBP7, SSPII) in der antimikrobiellen
Immunantwort**

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Cornelia Beuter-Gunia

aus Herdecke

Düsseldorf 2008

aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Klaus Pfeffer
Koreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Mechanismen des angeborenen Immunsystem	2
1.1.1 Pathogenerkennung über konservierte Rezeptoren	2
1.1.2 Toll-like Rezeptoren	4
1.2 Zytokine	9
1.2.1 Interferon γ	9
1.2.2 Tumor Nekrose Faktor	13
1.3 Antimikrobielle und antivirale Effektorsysteme	15
1.3.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate	15
1.3.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)	16
1.3.3 Die Familie der Interferon induzierten GTPasen	19
1.3.3.1 Mx Proteine	21
1.3.3.2 p47 GTPasen, IRGs	22
1.3.3.3 p65 Guanylat-bindende Proteine	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Bezugsquellennachweis	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Antikörper/-seren	29
2.1.3 Enzyme	29
2.1.4 Radiochemikalien	30
2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	30
2.2 Geräte	30
2.3 Medien und Puffer	31
2.3.1 Stammlösungen und Puffer	31
2.3.2 Zellkulturmedien	35
2.3.3 Medien für die Bakterienkultur	35
2.4 Antibiotika	36
2.5 Bakterien-, Toxoplasmenstämme und Zelllinien	36
2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme	36
2.5.2 Zellen/Zelllinien	36
2.6 Versuchstiere	37
2.7 Primer	37
2.8 Plasmidvektoren	41
2.8.1 Ausgangsvektoren	41
2.8.2 Erstellte Plasmide	42
2.9 Tierversuche	42
2.9.1 Superovulation	42
2.9.2 Generierung chimärer Mäuse	42
2.9.3 Infektion von Mäusen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	43

2.9.4	Organentnahme	43
2.10	Zellbiologische Methoden	43
2.10.1	Kultivierung embryonaler Stammzellen und Fibroblasten	43
2.10.2	Kultivierung von Zelllinien	44
2.10.3	Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM)	45
2.10.4	Transfektion von 293T Zellen mittels Kalzium-Phosphat	45
2.10.5	Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation	45
2.10.6	Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien	45
2.10.7	Stimulation von Zellen	46
2.10.8	Immunfluoreszenz-Färbung	46
2.10.9	<i>In vitro</i> Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	47
2.10.10	Kultivierung von avirulenten Toxoplasmen (ME49)	47
2.10.11	<i>In vitro</i> Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	47
2.11	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	47
2.11.1	Isolierung von Plasmid-DNS	47
2.11.2	Isolierung von chromosomaler DNS aus 96-well Platten	48
2.11.3	Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen oder Schwanzbiopsien	48
2.11.4	Agarosegelelektrophorese	48
2.11.5	Restriktionsverdau von DNS	49
2.11.6	Dephosphorylierung von DNS	49
2.11.7	Ligation von DNS-Molekülen	50
2.11.8	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien	50
2.11.9	Southern Blot Analyse	50
2.11.10	Isolierung gesamtzellulärer RNS	52
2.11.11	Northernblot-Analyse	52
2.11.12	cDNS Synthese aus gesamtzellulärer RNS	53
2.11.13	Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR	53
2.11.14	SMART-RACE-PCR	54
2.11.15	Real-time PCR	54
2.11.16	Mutagenese-PCR	55
2.12	Protein-biochemische Methoden	56
2.12.1	Extraktion von Proteinen aus Organen	56
2.12.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.12.3	Western Blot Analyse	56
2.12.4	Immunpräzipitation	57
2.13	Computerprogramme	57
2.13.1	Klonierungsstrategien	57
2.13.2	Sequenzvergleiche	57
2.13.3	Real-time PCR	57
3	Ergebnisse	59
3.1	mGBP7	59
3.1.1	Einführung	59
3.1.2	Etablierung der Real-time PCR für die Genfamilie der murinen 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine	59
3.1.3	Induzierbarkeit der mGBP Familie in Ana-1 Makrophagen	61
3.1.4	Regulation von mGBP7 durch den Transkriptionsfaktor IRF-1	64
3.1.4.1	IRF-1-Abhängigkeit der mGBP Expression in embryonalen Fibroblasten	64
3.1.4.2	IRF-1-Abhängigkeit der mGBP Expression in Knochenmarksmakrophagen	66
3.1.5	<i>In vivo</i> Expression der 65kDa GTPasen	69
3.1.5.1	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	69
3.1.5.2	mGBP7 Expression nach Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	71
3.1.6	Subzelluläre Lokalisation von mGBP7	72
3.1.6.1	Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Infektion mit <i>L. monocytogenes in vitro</i>	73
3.1.6.2	Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Infektion mit <i>Toxoplasma gondii in vitro</i>	74
3.1.6.3	Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Phagozytose von Latexkugeln	77
3.1.6.4	Lokalisation von mGBP7 Mutanten	78
3.1.6.5	Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 Mutanten nach Infektion mit <i>Toxoplasma gondii in vitro</i>	80

3.1.7	Vorarbeiten zur Erstellung einer mGBP7 defizienten Mauslinie	82
3.2	AW112010-SSPII	84
3.2.1	<i>In silico</i> Charakterisierung von AW112010-SSPII	84
3.2.1.1	Protein-Vorhersagen	85
3.2.1.2	SSPII in anderen Spezies	88
3.2.2	Expressionsanalyse von SSPII	89
3.2.2.1	Expression in Ana-1 und Knochenmarks-Makrophagen	89
3.2.2.2	Expression von SSPII in der Infektion	92
3.2.3	Nachweis der Sekretion <i>in vitro</i>	97
3.2.4	Subzelluläre Lokalisation von SSPII	98
3.2.5	Gene Targeting: Inaktivierung des SSPII Gens der Maus	102
4	Diskussion	105
4.1	mGBP7 in der Infektionsabwehr	105
4.1.1	Expression der murinen 65 kDa GTPasen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	105
4.1.1.1	Expression von mGBP7 in Ana-1 Makrophagen und <i>in vivo</i>	107
4.1.2	Expressionsanalyse von mGBP7 in Wt und IRF-1 defizienten Fibroblasten und BMDM	108
4.1.3	Subzelluläre Lokalisation von mGBP7	110
4.1.3.1	Lokalisation von mGBP7 in infizierten Zellen	111
4.1.3.2	Veränderte Lokalisation von mGBP7 G-Domänen-Mutanten	113
4.2	SSPII in der Infektabwehr	115
4.2.1	SSPII: Identifizierung und Charakterisierung als potentiell sekretorisches Protein	115
4.2.2	Subzelluläre Lokalisation von SSPII	116
4.2.3	SSPII Expression <i>in vitro</i>	117
4.2.4	SSPII in der Infektionsabwehr	118
4.3	Ausblick	121
5	Zusammenfassung	123
6	Anhang	127
7	Literaturverzeichnis	129
8	Tabellarischer Lebenslauf	147
9	Danksagung	149

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: MyD88 abhängiger und MyD88 unabhängiger TLR Signalweg.	7
Abb. 1.2: JAK-STAT Signalweg des IFN γ Rezeptors.	11
Abb. 1.3: TNF/TNFR1 Signalweg.	14
Abb. 1.4: ROI und RNI Produktion durch die Enzyme Phox und iNOS.	16
Abb. 1.5: Die Domänenstruktur der humanen Dynamamin Superfamilie.	20
Abb. 1.6: Die GTP-Bindungs-Motive der G-Domäne.	20
Abb. 1.7: Phylogenetischer Baum der murinen GBP-Familie.	24
Abb. 3.1: Test der Primer- und Sonden-Kombination für mGBP9 mittels real-time PCR.	61
Abb. 3.2: Induktion der murinen GBPs in Ana-1 Makrophagen durch IFN γ .	62
Abb. 3.3: Real-time Analyse der Expression der murinen GBPs 1 bis 10 in Ana-1 Makrophagen nach 16 h Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und TLR-Liganden.	63
Abb. 3.4: Expression von mGBP7 und mGBP2 in mEF von IRF-1 ko und Wt.	65
Abb. 3.5: Westernblotanalyse von mGBP2 und mGBP7 in Wt und IRF-1 ko mEF.	65
Abb. 3.6: Real-time Analyse von cDNS generiert aus stimulierten BMDM von Wt und IRF-1 ko Makrophagen.	67
Abb. 3.7: Westernblotanalyse von Proteinlysaten aus BMDM von Wt und IRF-1 ko Mäusen.	68
Abb. 3.8: Expression der mGBP-Familie in a) Milz und b) Leber von Listerien infizierten C57BL/6 Mäusen.	70
Abb. 3.9: Expression des mGBP7-Proteins in der Milz und in der Leber nach Listerien-Infektion.	71
Abb. 3.10: Proteinexpression von mGBP7 in <i>Toxoplasma gondii</i> infizierten C57BL/6 Mäusen in der Milz und der Lunge.	71
Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 in Makrophagen (RAW 264.7) im Konfokalmikroskop.	73
Abb. 3.12: Lokalisation von mGBP7 in der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .	74
Abb. 3.13: Kolokalisation von mGBP7 mit der PV von <i>T. gondii</i> in RAW 264.7 Makrophagen.	75
Abb. 3.14: Lokalisation von GFP-mGBP7 Fusionsprotein mit <i>Toxoplasma gondii</i> in der stabil transduzierten murinen Fibroblasten-Zelllinie 3T3.	76
Abb. 3.15: Lokalisation von eGFP-mGBP7 Fusionsprotein und phagozytierten Latexkugeln.	77
Abb. 3.16: Lokalisation der mGBP7 Mutanten in transfizierten RAW-Makrophagen und Einfluß von IFN γ auf die subzelluläre Distribution.	79
Abb. 3.17: Lokalisation der mGBP7 Mutanten R48-A, K51-A, S52-N, T75-A, E99-A und D182-R in RAW 264.7 Makrophagen nach Infektion mit <i>T. gondii</i> (ME49).	81
Abb. 3.18: Schematische Darstellung der Rekombinationsstrategie des mGBP7 Lokus.	83

Abb. 3.19: Sondentest der 5' flankierenden Southernsonde.	83
Abb. 3.20: Nachweis und Größenbestimmung der AW112010 mRNA in Ana-1 Makrophagen im Northernblot.	84
Abb. 3.21: RACE-PCR Ergebnis von AW112010 oder SSPII.	85
Abb. 3.22: Signalpeptid-Vorhersage mit dem Programm SignalP 3.0.	87
Abb. 3.23: Vergleich der Nukleotidsequenzen von SSPII (Maus) und XM_579948 (Ratte)	88
Abb. 3.24: Vergleich der Proteinsequenz von SSPII (Maus) und Ratte XP_579948.	89
Abb. 3.25: Northernblot-Analyse von SSPII mRNA und β -Aktin in Ana-1 Makrophagen.	90
Abb. 3.26: SSPII-Expression in IFN γ stimulierten Makrophagen.	90
Abb. 3.27: SSPII Induktion durch verschiedene Stimuli (16h) in Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen.	91
Abb. 3.28: SSPII Induktion durch verschiedene Stimulationen (16h) in Knochenmarksmakrophagen aus IFN γ R ^{-/-} Mäusen.	92
Abb. 3.29: Northernblot-Analyse, SSPII mRNA in Milz und Leber nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .	93
Abb. 3.30: Transkriptionsmenge von a) SSPII und b) iNOS induziert durch Listerien-Infektion in verschiedenen Organen.	94
Abb. 3.31: Immunpräzipitation von SSPII Protein verschiedener Organlysate nach Listerien-Infektion.	95
Abb. 3.32: Expression von SSPII, iNOS und IFN γ Transkripten (real-time-PCR) in Milz und Lunge von <i>Toxoplasma gondii</i> infizierten C57BL/6 Mäusen.	95
Abb. 3.33: mRNA Expression von SSPII, iNOS, IFN γ und IL-12p40 während der <i>Trypanosoma cruzi</i> Infektion in der Milz von C57BL/6 Mäusen.	96
Abb. 3.34: Sekretionsnachweis von SSPII-6xHis Fusionsprotein.	97
Abb. 3.35: Subzelluläre Lokalisation von SSPII-DsRed Fusionsproteinen in 264.7 RAW-Makrophagen.	98
Abb. 3.36: SSPII Kolokalisation mit subzellulären Kompartimenten.	100
Abb. 3.37: SSPII-Lokalisation in <i>Toxoplasma gondii</i> infizierten RAW Makrophagen.	101
Abb. 3.38: Schematische Darstellung der Rekombinationsstrategie des SSPII Lokus.	102
Abb. 3.39: Southernblot-Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination im SSPII Lokus und der einmaligen Integration der Neomycin Resistenz Kasette.	103
Abb. 3.40: Southernblot-Analyse zur Typisierung der Keimbahnmaus.	104
Abb. 6.1: Expression von SSPII in lymphatischen Zellen und Mikroglia.	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Toll-like Rezeptoren und bekannte Liganden.	5
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.	35
Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums.	35
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.	36
Tabelle 2.4: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme.	36
Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien.	36
Tabelle 2.6: Oligo-Nukleotide zur Klonierung von DsRed und eGFP Fusionskonstrukten.	37
Tabelle 2.7: Oligo-Nukleotide zur Klonierung von pWPXL-GFP Fusionskonstrukten.	38
Tabelle 2.8: Mutageneseprimer für Klonierung in pDsRed-Monomer-N1 Vektoren.	38
Tabelle 2.9: Oligo-Nukleotide zur Klonierung des mGBP7 Rekombinationsvektors, sowie die Sonden zur Detektion positiver Klone.	39
Tabelle 2.10: Oligo-Nukleotide zur Klonierung des SSPII Rekombinationsvektors, sowie die Sonden zur Detektion positiver Klone.	39
Tabelle 2.11: Sequenzen von Oligo-Nukleotiden und Sonden für real-time RT-PCR.	40
Tabelle 2.12: Verwendete Ausgangsvektoren.	41
Tabelle 2.13: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide.	42
Tabelle 3.1: Voranalyse der AW112010-Protein-Sequenz.	86

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillatum, zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BAC	bacterial artificial chromosome
BMDM	aus Knochenmarkszellen gereifte Makrophagen
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNS	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	DesoxyriboNukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten
EP	Elektroporation
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KA	kurzer Arm
kb	Kilobasenpaare
ko	knock-out
kDa	Kilodalton
LA	langer Arm
LIF	leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar
min	Minute(n)
MCS	multiple cloning site
mRNS	Boten-RNS
ORF	offener Leserahmen
p.i.	nach Infektion (post infection)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
poly (I:C)	Polyinosin-polycytidin-Säure
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription und PCR

SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat Lösung
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ü/N	über Nacht
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
WB	Westernblot
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

Das Immunsystem der Säugetiere hat sich im Laufe der Evolution zu einem komplexen System entwickelt, um eindringende Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten wirkungsvoll zu bekämpfen. Zunächst schützt sich der intakte Körper durch anatomische Barrieren, wie Haut (Epidermis/Dermis) und Mucosa vor dem Eindringen fremder Organismen. Ein niedriger pH Wert der Haut verhindert die Ansiedlung von Pathogenen; sezernierte Proteine wie Defensine und Lysozyme stellen vor allem in den Schleimhäuten erste Effektormechanismen gegen fremde Erreger dar. Gelangen dennoch Pathogene durch z.B. Verletzungen in den Körper, so steht diesen Pathogenen eine Reihe von Abwehrmechanismen gegenüber. Hierbei unterscheidet man zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

Während die angeborene Immunität in der frühen Phase einer Infektion zum Tragen kommt, greift die adaptive oder erlangte Immunität erst in der späten Phase einer Infektion ein. Das adaptive Immunsystem (T- und B-Zellen) ist durch die hohe Spezifität gegen Pathogenbestandteile (Antigene) charakterisiert, welche sie durch ungerichtete Umordnung der Rezeptorgene in Lymphozyten (somatische Rekombination) und, nach Kontakt mit dem Pathogen, gerichtete klonale Expansion dieser Zellen erreicht. Ein weiteres Merkmal der adaptiven Immunität ist der Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei einer Zweitinfektion mit demselben Pathogen schneller diesem entgegenwirken kann („memory“ T- und B-Zellen). Da der Aufbau der primären adaptiven Immunität mehrere Tage benötigt, muss der Körper in der Lage sein, die Ausbreitung des Erregers zu verhindern oder zumindest zu verlangsamen.

In der frühen Phase einer Infektion kommt daher zunächst das angeborene Immunsystem zum Tragen. Hierzu gehört das Komplementsystem, welches aus einer hohen Anzahl verschiedener löslicher Proteine besteht und die Aufgaben hat, Pathogene über die Komplementkaskade direkt zu lysieren oder für Phagozyten zu kennzeichnen (Opsonisierung). Das Komplementsystem übernimmt auch die wichtige Rolle inflammatorische Zellen zum Pathogen zu rekrutieren (Chemoattraktion). Neben den löslichen Komponenten haben die zellulären Komponenten eine zentrale Funktion in der angeborenen Immunität. Diese Zellen sind in der Lage, über konservierte Rezeptoren fremde von körpereigenen Bestandteilen zu unterscheiden. Zu diesen Zellen gehören vor allem die Phagozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und weitere inflammatorische Zellen. Diese können bereits vor Aufbau einer adaptiven Immunabwehr potente antimikrobielle Effektormechanismen aufbauen und tragen somit zusätzlich dazu bei, Erreger zu eliminieren oder die Infektionsausbreitung zu verzögern. Phagozyten sind außerdem die entscheidenden Vermittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Diese Vermittlung wird über lösliche Proteine, den Zytokinen und Chemokinen, gesteuert, welche durch exakt geregelte transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen sezerniert werden, und als Signalstoffe

die Immunantworten akkurat regeln können. Somit hat sich im Laufe der Evolution durch ständige Anpassung an das sich ändernde Erregerrepertoire das Immunsystem der Säugetiere zu einem hoch komplexen System entwickelt. Das Studium dieser, durch Interaktionen von Wirt und Pathogen entstandenen, genetischen und molekularen Bestandteile des Immunsystems soll zu mehr Verständnis dieser Mechanismen führen.

1.1 Mechanismen des angeborenen Immunsystem

1.1.1 Pathogenerkennung über konservierte Rezeptoren

Die angeborene Immunität ist nicht vollständig unspezifisch, sondern kann zuverlässig zwischen „Selbst“ und einer Vielzahl von Pathogenen unterscheiden (Hoffmann et al., 1999; Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Die Oberflächen von Mikroorganismen tragen in der Regel Wiederholungsmuster von molekularen Strukturen, sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (**pathogen-associated molecular patterns**, PAMPs) (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Das angeborene Immunsystem erkennt solche Pathogene mithilfe von Rezeptoren, die an bestimmte Strukturmerkmale dieser regelmäßigen Muster binden können. Diese Rezeptoren erkennen PAMPs und werden PRRs (**pathogen-recognition receptors**) genannt. PRRs sind im Genom eines Organismus festgelegt und werden innerhalb einer Klasse von Zellen identisch exprimiert. Durch ihre genomische Konservierung unterscheiden sich diese Rezeptoren grundsätzlich von den hochspezifischen und durch somatische Rekombination und Hypermutation entstehenden T- und B-Zell Rezeptoren der adaptiven Immunantwort.

PRRs kommen vor allem auf Zelloberflächen von Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen vor sowie in intrazellulären Kompartimenten und werden in den Blutkreislauf oder in Gewebeflüssigkeiten sekretiert (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Wichtige **sezernierte** Pathogenrezeptoren sind das Mannan-bindende Lektin (MBL), das C-reaktive Protein (CRP) und das Serum Amyloid Protein (SAP), welche bereits in der frühen Phase der Infektion von der Leber produziert werden (Gewurz et al., 1982; Schwalbe et al., 1992; Fraser et al., 1998). CRP und SAP gehören zur Familie der Pentraxine, und wirken opsonisierend durch Bindung von Phosphorylcholin auf bakteriellen Oberflächen. Außerdem sind sie durch Bindung des C1q Proteins in der Lage, das klassische Komplementsystem zu aktivieren (Agrawal et al., 2001).

MBL gehört zur Familie der Kollektine, welche durch das Vorkommen einer Kollagenartigen Region und einer C-Typ Lektin (zuckerbindende) Domäne charakterisiert ist (Epstein et al., 1996; Holmskov, 2000). MBL ist in der Lage, Mannose-Reste zu binden, die auf Mikroorganismen in hohen Mengen zu finden sind. Nach Assoziation von MBL mit speziellen Serinproteasen können diese die Komplement Proteine C2 und C4 spalten, und somit das Lektin-abhängige Komplementsystem aktivieren (Fraser et al., 1998). Zwei weitere Mitglieder der Kollektin-Familie sind die Surfactant Proteine A und D (Sp-A, SP-D), welche vor allem in der Lunge vorkommen, dort mit Pathogenen assoziieren und die Phagozytose einleiten. Ein Defekt von SP-A oder SP-D

im Mausmodell führt zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber Lungenpathogenen (LeVine et al., 1998; van Roozendaal et al., 2000; Linke et al., 2001).

Auch auf der Zelloberfläche von Phagozyten kommen **membranständige** PRRs vor und erkennen konservierte Oberflächenmoleküle von Pathogenen. Die Bindung dieser Liganden führt vor allem zur Phagozytose der gebundenen Erreger. Wichtige Rezeptoren sind CD14, Makrophagen Mannose Rezeptor (MMR), Makrophagen Scavenger Rezeptor (MSR) und MARCO. CD14, welches LPS und Peptidoklykane bindet, dient vor allem als Korezeptor für Toll like Rezeptoren (Wright et al., 1990). MMR gehört zur Familie der C-Typ Lektine und interagiert mit einer Vielzahl von gram-negativen und gram-positiven Bakterien sowie mit Pilzpathogenen (Fraser et al., 1998). Eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität spielt der Makrophagen Scavenger Rezeptor. MSR besitzt eine außergewöhnlich breite Spezifität für polyanionische Liganden, darunter doppelsträngige RNS, LPS und Lipoteichonsäure (LTA) (Pearson, 1996). MSR defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, Herpes Simplex Virus und Malaria (Suzuki et al., 1997; Thomas et al., 2000). Neben MSR gehört auch MARCO (**m**acrophage **r**eceptor with **c**ollagenous structure) zu den cysteinreichen Scavenger-Rezeptoren. MARCO ist in der Lage, bakterielle Zellwandkomponenten zu binden und die Phagozytose einzuleiten (Elomaa et al., 1995).

Eine Reihe von Erregern wie alle Viren, einige Bakterien (z.B.: Mykobakterien, Listerien, Salmonellen) und auch einzellige Parasiten (z.B.: *T.gondii*, *T.cruzi*, u.a.) können Zugang zu intrazellulären Kompartimenten der Wirtszellen erlangen, wie zum Beispiel das Zytosol, um sich dort zu replizieren und zu persistieren. Es konnten **intrazelluläre** PRRs identifiziert werden, welche vor allem intrazelluläre virale und/ oder bakterielle Bestandteile erkennen, und die Hemmung der Pathogenreplikation initiieren können. Die Protein Kinase R (PKR) wird durch Bindung von doppelsträngiger RNS, die während viraler Replikation gebildet wird, aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung und Inaktivierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α und schließlich zum Abbruch der viralen und zellulären Proteinsynthese (Clemens and Elia, 1997). Aktivierte PKR ist außerdem in der Lage, den NF- κ B und MAP-Kinase Signalwege zu aktivieren, was wiederum zur Induktion von antiviralen Typ I Interferonen führt (Williams, 1999). Doppelsträngige virale RNS führt ebenfalls zur Aktivierung des 2'-5'-oligoadenylat Synthase (OAS)/RNaseL Signalwegs, welches zum Abbau von sowohl viraler als auch zellulärer RNS führt und somit zur Apoptose der infizierten Zelle (Kumar and Carmichael, 1998). Weitere PRRs dieser Klasse sind RIG-I und LGP-2 (Saito et al., 2007).

Eine weitere wichtige Klasse von intrazellulären PRRs stellen die NOD (**n**ucleotide-binding **o**ligomerization **d**omain) Proteine dar. Diese bestehen aus einer aminoterminalen CARD (**c**aspase **r**ecruitment **d**omain) Domäne, einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) und einer carboxyterminalen LRR (**l**eucin-**r**ich **r**epeat) Region. Die CARD Domäne von NOD1 und NOD2 assoziiert mit einer Protein Kinase, RIP2, welche wiederum NF- κ B und MAP-Kinase Signalwege aktiviert (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999; Ogura et al., 2001). NOD1 und NOD2 Proteine

sind in der Lage – vermutlich durch Bindung an die LRR Regionen – bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane (PGN) zu erkennen (Inohara et al., 2001; Strober et al., 2006).

Die meisten PRRs, welche auf Zelloberflächen exprimiert werden, findet man auf phagozytierenden Zellen, insbesondere auf Makrophagen. Durch Erkennung konservierter Moleküle vorwiegend auf den Oberflächen der Pathogene, führen diese Rezeptoren zur Phagozytose des Mikroorganismus und sind somit entscheidend beim Aufbau einer effektiven Immunantwort beteiligt.

1.1.2 Toll-like Rezeptoren

Eine Familie von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die das Vorliegen von mikrobiellen Bestandteilen (PAMP) erkennt, ist die Familie der Toll-like Rezeptoren. Der Toll-Rezeptor wurde erstmals in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, in der er während der Embryogenese bei der Festlegung des dorsoventralen Körpermusters eine Rolle spielt (Hashimoto et al., 1988). Später konnte außerdem gezeigt werden, dass die Signalwege, die durch dToll aktiviert werden, bemerkenswerte Ähnlichkeiten zum mammalischen Interleukin 1 (IL-1) Signalweg zeigen, welches zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, ein Molekül, das wichtige Funktionen während der Immunantwort übernimmt. Auffälligerweise sind die zytoplasmatischen Domänen des dToll und des IL-1 Rezeptors hoch konserviert, und werden folglich als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domänen bezeichnet. Später konnte auch gezeigt werden, dass der dToll Signalweg in der antifungalen Immunantwort der Taufliege eine Rolle spielt, da Mutationen in diesem Signalweg zu einer erhöhten Suszeptibilität der mutanten Fliegen bei Pilzinfektionen führen (Lemaitre et al., 1996). Bisher konnten insgesamt elf zu dToll homologe mammalische Gene identifiziert werden, welche als Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet werden und wichtige Bedeutungen in der Pathogenerkennung und -abwehr besitzen (Medzhitov et al., 1997; Akira and Takeda, 2004). Dabei sind TLR1-9 im Menschen und der Maus homolog und funktionell, während TLR10 in der Maus eine C-terminale nicht verwandte Sequenz aufweist, die das Maus TLR10 in seiner funktionellen Eigenschaft zerstört (Takeda and Akira, 2005). TLR11 hingegen – in der Maus funktionell – weist im menschlichen *TLR11* Gen ein Stopp-Kodon auf, welches zum Fehlen eines funktionellen TLR11 Proteins im Menschen führt (Zhang et al., 2004).

Die Mitglieder der TLR-Familie sind in der Lage, PAMPs, wie Lipoproteine, Carbohydrate, Peptide und Nukleinsäurestrukturen, von verschiedenen Mikroorganismen zu erkennen. Die bisher identifizierten Liganden für die verschiedenen TLRs sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

In ihrer Struktur weisen die TLRs eine extrazelluläre LRR (leucin-rich repeats) Domäne und eine intrazelluläre TIR Domäne auf. Die TIR Domäne der TLRs, wie auch des IL-1 Rezeptors, ist von entscheidender Bedeutung bei der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle. C3H/HeJ Mäuse, die eine Mutation in der TIR Domäne des TLR4 Gens besitzen, zeigen Defekte in ihrer Fähigkeit auf

LPS zu reagieren (Poltorak et al., 1998). Die LRR Domäne hingegen scheint direkt für die Interaktion mit Bestandteilen von Pathogenen verantwortlich zu sein.

Tabelle 1.1: Toll-like Rezeptoren und bekannte Liganden. N.D.: nicht determiniert. Überarbeitet nach Akira und Takeda, 2004.

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	Triacyl Lipopeptide lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteine / Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modul Glykoinositolphospholipide Glykolipide Porine atypische Lipopolysaccharide atypische Lipopolysaccharide Zyosan	Diverse Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze
TLR3	Heat-shock Protein 70 doppelsträngige RNS	Wirt Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Hüllenproteine Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Typ III Repeat Extra Domäne Oligosaccharide von Hyaluronsäure Polysaccharid Fragmente von Heparansulfat Fibrinogen	Gram-negative Bakterien Pflanzen Viren <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyl Lipopeptide Lipoteichonsäure Zyosan	<i>Mykoplasma</i> Gram-positive Bakterien Pilze
TLR 7	Imidazolquinolin Loxoribin Bropirimin	Synthetische Verbindungen Synthetische Verbindungen Synthetische Verbindungen
TLR8	Einzelsträngige RNS Imidazolquinolin	Viren Synthetische Verbindungen
TLR9	Einzelsträngige RNS CpG enthaltende DNS	Viren Viren
TLR10	N.D.	-
TLR11	N.D. Profilin	Uropathogene Bakterien <i>Toxoplasma gondii</i>

Trotz hoher Sequenzkonservierung der verschiedenen LRR Domänen, sind die unterschiedlichen TLRs in der Lage, eine Vielfalt nicht verwandter PAMPs zu detektieren (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002; Akira and Takeda, 2004). Das TLR4 Protein wurde als erstes beschrieben und detektiert LPS von gram-negativen Bakterien (Medzhitov et al., 1997; Hoshino et al., 1999). Die Detektion von LPS ist jedoch nur möglich, wenn LPS zunächst von im Serum gelöstem LPS-bindendem Protein (LBP) gebunden wird. Dieser Komplex wird dann von CD14 erkannt, ein durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Zellmembran verankertes Molekül, das primär von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen Zellen exprimiert wird. LPS Stimulation der Zellen resultiert in erhöhter Proximität von CD14 und TLR4, was für eine Interaktion beider Moleküle bei der LPS Erkennung spricht (Jiang et al., 2000). Ein weiteres Molekül, welches sich an der Erkennung von LPS durch TLR4 verantwortlich zeichnet, ist MD-2. Dieses kleine Molekül

weist keine Transmembrandomäne auf, wird jedoch an der Zelloberfläche exprimiert und assoziiert mit der Ektodomäne von TLR4 und ist essentiell für die Erkennung von LPS (Shimazu et al., 1999).

TLR2 erkennt eine Vielzahl mikrobieller Komponenten wie Lipoproteine/Lipopeptide von verschiedenen Pathogenen, Peptidoglykan und Lipoteichonsäuren gram-positiver Bakterien, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Glykosylphosphatidylinositol-Anker von *Trypanosoma cruzi*, sowie Zymosan von Pilzen und einige virale Proteine von VMV (Visna-Maedi Virus) und HCV (Hepatitis-C Virus). Dabei wurde beobachtet, dass TLR2 zur Ausbildung eines potenten Signals koordiniert mit anderen TLRs insbesondere TLR1 und TLR6 interagiert (Ozinsky et al., 2000; Takeda et al., 2003), wobei TLR1 und TLR6 strukturell mit TLR2 verwandt sind. Die Heterodimerbildung mit diesen TLRs sowie mit anderen Rezeptoren ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass TLR2 in der Lage ist, so viele verschiedene Liganden zu erkennen. So zeigen Makrophagen von TLR6-defizienten Mäusen keine Produktion von inflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit Triacyl-Lipopeptiden von gram-negativen Bakterien. Andererseits erkennen TLR1-defiziente Makrophagen Diacyl-Lipopeptide von Mycoplasmen, zeigen sich aber nicht responsiv gegenüber Triacyl-Lipopeptiden (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). In beiden Fällen wurde die Heterodimerbildung mit TLR2 nachgewiesen. Dies zeigt, dass TLR2 in Assoziation mit TLR1 oder TLR6 zwischen verschiedenen mikrobiellen Komponenten unterscheiden kann. Desweiteren ist TLR2 in der Lage, zusammen mit Dectin-1, einem Rezeptor der Lektin-Familie, β -Glycane des Zymosans, einem Zellwandbestandteil der Hefe, zu erkennen. Die Aktivierung von NF- κ B über TLR2 wird dabei durch Anwesenheit von Dectin-1 verstärkt (Gantner et al., 2003).

Für das TLR5 Protein wurde gezeigt, dass es das Flagellin Protein von Bakterien – dem Hauptbestandteil der Flagellen, welche aus der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien herausragen – binden kann. (Hayashi et al., 2001). Bemerkenswert bei der Expression von TLR5 ist vor allem, dass es basolateral und nicht auf der apikalen Seite von Epithelzellen des Darms vorkommt. Somit wird hier nur Flagellin von pathogenen Bakterien, wie *Salmonella typhimurium*, die das Epithel durchdringen, erkannt (Lyons et al., 2004). Kommensalen, wie *E. coli*, lösen, obwohl auch sie Flagellin besitzen, keine proinflammatorische Genexpression aus, da sie nicht zur basolaterale Seite gelangen (Gewirtz et al., 2001).

Während TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 und 11 an der äußeren Zellmembran exprimiert werden, kommen TLR3, 7, 8 und 9 hauptsächlich intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder in endosomalen Membranen vor, wo sie mikrobielle Nukleinsäuren detektieren (Wagner and Bauer, 2006; Trinchieri and Sher, 2007). Für TLR3 wird vermutet, dass es doppelsträngige RNS, welche in der Zelle bei viralen Infektionen auftritt, und synthetische Analogons, wie poly(I:C), detektieren kann (Alexopoulou et al., 2001). TLR9 bindet an unmethylierten CpG Motiven doppelsträngiger DNS, die zwar selten in mammalischen Genomen zu finden sind, jedoch häufige Bestandteile bakterieller DNS darstellen; aber auch virale CpG haltige DNS wird über TLR9 erkannt (Hemmi et

al., 2000; Lund et al., 2003). Die Erkennung der CpG Motive erfolgt dabei vermutlich intrazellulär in Endosomen nach unspezifischer Aufnahme in die Zelle (Wagner, 1999). TLR7 und TLR8 sind zu TLR9 hoch homolog. Nachdem lange Zeit nur synthetische Produkte gefunden werden konnten, welche von TLR7 und TLR8 erkannt werden, konnte kürzlich einzelsträngige RNS als natürlicher Stimulus identifiziert werden (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Die Liganden von TLR10 und TLR11 sind bislang unbekannt, jedoch konnte für murines TLR11 gezeigt werden, dass uropathogene Bakterien sowie *T. gondii* Profilin über diesen Rezeptor erkannt werden (Zhang et al., 2004; Yarovinsky et al., 2005).

Die Stimulation der TLRs durch mikrobielle Komponenten löst die Expression von Genen der Immunantwort aus. Die Erkennung der Liganden führt zur Dimerisierung der TLRs. TLR2 bildet, wie schon erwähnt, Heterodimere mit TLR1 oder TLR6, die weiteren TLRs bilden hingegen Homodimere (Akira and Takeda, 2004). Die Signalwege, die von aktivierten TLRs eingeschaltet werden, sind, wie ebenfalls schon erwähnt, hoch homolog zum IL-1 Rezeptor (IL-1R) Signalweg. Sowohl TLRs als auch IL-1R besitzen eine intrazelluläre TIR Domäne, welche mit dem Adapterprotein MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) interagiert. Nach Stimulation kann MyD88 eine Serin/Threonin Kinase, die IL-1R-assoziierte Kinase (IRAK4), rekrutieren und phosphorylieren, welche wiederum die Kinaseaktivität von IRAK1 induziert. Aktivierte IRAK1 autophosphoryliert und führt zur Bindung des Adapterproteins TRAF6. Dieser Komplex führt im Folgenden zur Aktivierung zweier für das Immunsystem wichtiger Signalwege: JNK (JUN N-terminale Kinase) und NF-κB (Takeda et al., 2003; Carmody and Chen, 2007) (Abbildung 1.1).

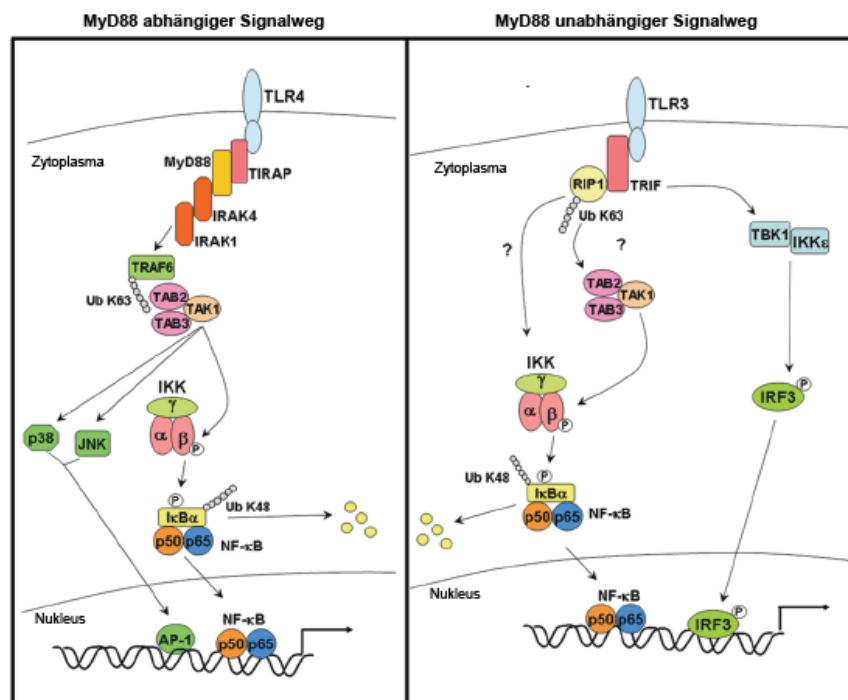


Abb. 1.1 MyD88 abhängiger Signalweg am Beispiel von TLR4 und der MyD88 unabhängige TLR Signalweg am Beispiel von TLR3. Abbildung nach Carmody und Chen, 2007.

Zum einen führt dabei aktiviertes TRAF6 zur Aktivierung von IKK. IKK wiederum phosphoryliert I κ B α , den NF- κ B-Inhibitor, der dadurch für den proteasomalen Abbau markiert wird und den aktiven dimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B freisetzt. Zum anderen führt TRAF6 zur Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade, die zur Translokation des Transkriptionsfaktors AP-1 in den Zellkern führt. Neben dem beschriebenen MyD88 abhängigen Signalweg, konnte jedoch auch ein MyD88 unabhängiger Signalweg beschrieben werden. MyD88 defiziente Mäuse zeigen weiterhin eine Responsivität nach LPS Stimulation über TLR4, jedoch mit verzögerten Kinetiken der JNK und NF- κ B Aktivierung (Kawai et al., 1999). Der MyD88-unabhängige Signalweg wurde weiter charakterisiert bei der Untersuchung der Genexpression in MyD88 defizienten Makrophagen, die mit LPS stimuliert wurden. Einige Gene wurden dabei identifiziert, die als IFN-induzierte Gene bekannt sind, wie IRG1 (immunoresponse Gene 1) und CXCL10 (CXC-Chemokin Ligand 10). Im Gegensatz dazu werden die inflammatorischen Zytokine, wie TNF, IL-6 und IL-1 β in Abwesenheit von MyD88 nicht mehr exprimiert. In TLR4 defizienten Makrophagen konnte dagegen gezeigt werden, dass die IFN induzierten Gene, IRG1 und CXCL10 nicht mehr produziert werden und daher diese Gene TLR4 abhängig aber MyD88-unabhängig nach LPS Stimulation induziert werden (Toshchakov et al., 2002). Obwohl auch für TLR3 der MyD88 abhängige Signalweg beschrieben wurde (Alexopoulou et al., 2001), läuft die Signaltransduktion hier hauptsächlich über den MyD88 unabhängigen Signalweg ab, da nach poly (I:C) Stimulation in MyD88 defizienten Mäusen eine normale Produktion inflammatorischer Zytokine beobachtet wurde (Akira and Takeda, 2004). Der MyD88 unabhängige Signalweg wird auch als TRIF-abhängig bezeichnet, da er zusätzlich in der Lage ist den Transkriptionsfaktor IRF3 zu aktivieren, und somit die Expression von Typ-I Interferonen zu induzieren (Akira and Takeda, 2004; Carmody and Chen, 2007).

Die Bedeutung der TLR vermittelten Antwort auf Fremdorganismen erstreckt sich deutlich über das Einleiten von Phagozytose hinaus. Durch Aktivierung von NF- κ B, MAP Kinasen und IRF3 wird die Expression einer Vielzahl immunrelevanter Gene induziert, welche sowohl großen Einfluss auf die unmittelbare, angeborene Immunantwort haben, als auch adaptive Immunantworten regulieren können.

1.2 Zytokine

1.2.1 Interferon γ

Interferone (IFN) sind wichtige Zytokine, die in der immunologischen Abwehr des Organismus gegen Pathogene von außerordentlicher Bedeutung sind. Ursprünglich wurden Interferone als Agenzien entdeckt, die mit der viralen Replikation interferieren. Man unterscheidet aufgrund ihrer Homologien zwischen Typ-I Interferonen, mit 23 Vertretern von IFN α und einem Vertreter von IFN β , und Typ-II Interferon, auch IFN γ genannt. Dabei wird den Typ-I Interferonen vor allem besondere Bedeutung in der antiviralen Immunabwehr zugeschrieben, und obwohl von den meisten Zellen in niedrigen Mengen exprimiert, gelten hematopoetische Zellen und Fibroblasten als die Hauptproduzenten von IFN α und IFN β (Schroder et al., 2004). IFN γ ist der einzige Vertreter des Typ-II Interferons und strukturell nicht mit den Typ-I Interferonen verwandt. Es bindet an einen anderen Rezeptor und ist außerdem auf einem separaten chromosomalen Locus kodiert. Anfänglich nahm man an, dass die einzigen Produzenten von IFN γ CD4 T-Zellen, CD8 cytotoxische T-Zellen und NK-Zellen sind. Mittlerweile konnten auch B-Zellen, NKT-Zellen und professionell Antigen präsentierende Zellen (APCs) als IFN γ sekretierende Zellen identifiziert werden (Yoshimoto et al., 1998; Carnaud et al., 1999; Frucht et al., 2001). IFN γ , produziert durch APCs (Makrophagen/Monozyten, dendritische Zellen), wirkt dabei lokal und autokrin sowie parakrin auf die benachbarten Zellen. Während die Produktion durch NK-Zellen und APCs wichtig bei der frühen Immunantwort gegen Pathogene ist, sind T-Zellen die Hauptquelle der IFN γ Produktion der adaptiven Immunantwort (Frucht et al., 2001; Sen, 2001). Die Produktion von IFN γ wird durch Zytokine, vor allem IL-12 und IL-18, welche von APCs sekretiert werden, kontrolliert. Diese Zytokine dienen dabei als Bindeglied zwischen Infektion und IFN γ Produktion in der angeborenen Immunantwort. Makrophagen, die über PRRs Pathogene erkennen, sezernieren daraufhin IL-12 und Chemokine (z.B. macrophage-inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)) (Salazar-Mather et al., 2000). NK-Zellen werden durch die Chemokine zum Ort der Infektion gelockt (Chemoattraktion), IL-12 führt dann zur Induktion der IFN γ -Produktion in diesen Zellen. In Makrophagen, NK und T-Zellen wird durch die Kombination von IL-12 und IL-18 die IFN γ Produktion dann weiter verstärkt (Munder et al., 1998; Akira, 2000; Schindler et al., 2001; Fukao et al., 2001). Um einer überschießenden Entzündungsreaktion entgegen zu wirken, wird die IFN γ Produktion negativ reguliert von den Zytokinen IL-4, IL-10, TGF- β (transforming growth factor- β) sowie außerdem von Glucocorticoiden (Fukao et al., 2000; Sen, 2001; Schindler et al., 2001). IFN γ interagiert mit einem spezifischen Oberflächenrezeptor, der ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt. Allerdings wird er unterschiedlich quantitativ exprimiert (200-25000 x pro Zelle) (Farrar and Schreiber, 1993). Der IFN γ Rezeptor (IFNGR) besteht aus einem Tetramer, aufgebaut aus zwei mal zwei Untereinheiten, den 90 kDa α -Ketten (IFNGR1) mit einer hohen Bindeaffinität für IFN γ sowie den 35 kDa β -Ketten (IFNGR2), welche für die Signalweiterleitung

zuständig sind. Die Aufklärung des IFN-Signalweges führte zur Entdeckung des JAK-STAT-Signalweges (Darnell, Jr. et al., 1994; Schindler and Darnell, Jr., 1995; Ihle, 1995). Das zugrundeliegende Prinzip der Aktivierung von spezifischen Mitgliedern der zwei Protein Familien, JAKs (Janus Kinasen) und STATs (signal transducers and activators of transcription), werden dabei von mehr als 50 Mitgliedern der Zytokin-Rezeptor Superfamilie genutzt (Ihle, 1996). Prinzipiell werden dabei nach Zytokinbindung die rezeptorständigen Tyrosinkinasen der Janus-Kinase-Familie aktiviert. Die Kinasen phosphorylieren anschließend die STATs, welche daraufhin aufgrund von Wechselwirkungen mit ihrer SH2-Domänen Homo- und Heterodimere bilden. Die STAT-Dimere können dann in den Zellkern verlagert werden, wo sie an GAS Elemente (gamma interferon activation sites) der Promotorregionen binden und damit die Expression von Genen induzieren. Für den IFNGR im Speziellen läuft die Signalvermittlung wie folgt ab: An den Rezeptor Untereinheiten sind spezifische Janus Kinasen (JAK) konstitutiv gebunden, JAK1 an den IFNGR1 Ketten und JAK2 an den IFNGR2 Ketten. Nach Ligandenbindung erfahren die intrazellulären Rezeptordomänen gewisse Konformationsänderungen, welche zur Auto-phosphorylierung und Aktivierung von JAK2 führen. Aktiviertes JAK2 führt wiederum zu Transphosphorylierung der JAK1 Moleküle, die nun in der Lage sind, spezifische Tyrosinreste der IFNGR1 Ketten zu phosphorylieren. Dies führt zur Entstehung von spezifischen Bindestellen für SH2 Domänen der latenten zytosolischen STAT1 Moleküle. Diese werden wiederum phosphoryliert, vermutlich durch JAK2, und bilden aktive Homodimere, welche schließlich vom Rezeptor dissoziieren und in den Nukleus translozieren. Die STAT1 Homodimere, auch GAF (gamma-interferon activation factor) genannt, können nun durch Bindung an spezifische GAS (gamma activated site) und ISRE (interferon stimulated response element) Konsensussequenzen die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004) (Abbildung 1.2). Dabei werden diese Gene als primär-responsive Gene bezeichnet, und werden häufig bereits 15 bis 30 Minuten nach IFN γ Behandlung induziert (Kerr and Stark, 1991). Dazu gehören einige Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel IRF-1, die ihrerseits weitere Gene in ihrer Transkription regulieren. Hier spricht man von sekundär-responsiven Genen. Neben der Homodimerisierung von STAT1 kommt es jedoch auch zu STAT1-STAT2 Heteromerbildung sowie zu Heterotrimeren bestehend aus z.B. STAT1-STAT1-IRF-9 oder STAT1-STAT2-IRF9 während der IFN γ induzierten Signalkaskade. STAT2 ist das einzige STAT-Protein ohne DNA-Bindemotiv. Der STAT1-STAT2-IRF-9 Komplex (ISGF3) ist ein typischer Typ I Interferon Transkriptionsfaktor. Mittlerweile gibt es jedoch Beweise dafür, dass Typ I Interferone primär über ISGF3 signalisieren, jedoch auch STAT1 Homodimere gebildet werden. Vice versa werden bei der Typ II Interferon Signalkaskade primär STAT1 Homodimere gebildet, jedoch führt auch die Komplexbildung von ISGF3 zur Transkription von Genen, welche über ISRE Elemente reguliert werden (Matsumoto et al., 1999). Dies erklärt den überlappenden Effekt auf die Genregulation von Typ I und II Interferonen in der Pathogenabwehr.

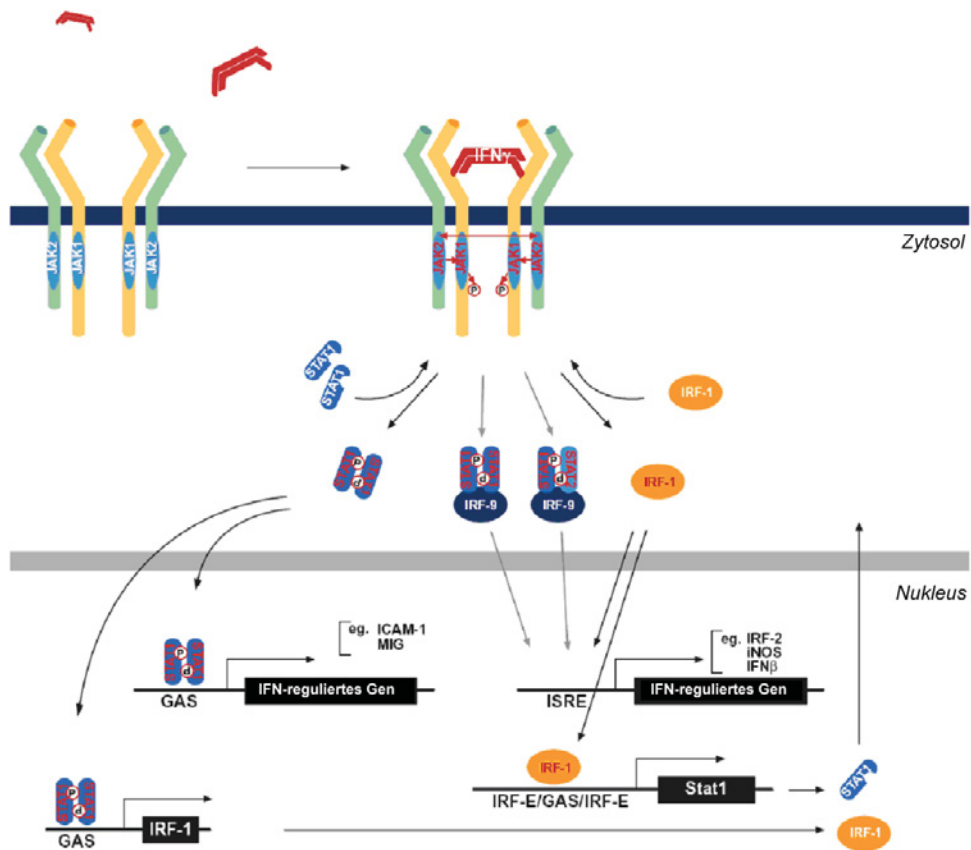


Abb. 1.2 JAK-STAT Signalweg des IFN γ Rezeptors. Abbildung nach Schroder et al., 2004.

Die IFN γ induzierte Signalkaskade unterliegt einer Negativ-Regulation, um einem Überschießen der Inflammation entgegen zu wirken. So konnte beobachtet werden, dass die STAT1 Aktivierung schon nach 1 h IFN γ Behandlung der Zellen inhibiert wird, trotz des kontinuierlichen Vorhandenseins von extrazellulärem IFN γ . Dafür sind Mechanismen verantwortlich, welche direkt auf die einzelnen Stufen der IFN γ Signalkaskade einwirken (Darnell, Jr., 1997; Stark et al., 1998). So wird der IFN γ -IFNGR1 Komplex zunächst internalisiert und gelangt in den endosomalen Abbauprozess, wo dieser Komplex dissoziiert (Schreiber and Farrar, 1993). In einigen Zelltypen gelangt der IFNGR1 dann wieder ungebunden an die Zelloberfläche, während der Ligand, IFN γ , abgebaut wird (Anderson et al., 1983; Celada and Schreiber, 1987; Farrar and Schreiber, 1993). Aber auch der internalisierte Rezeptor kann abgebaut werden und ein quantitativer Rückgang von membranständigem IFNGR1 führt somit zur verminderten Responsivität der Zelle gegenüber extrazellulärem IFN γ . Weiterhin werden durch IFN γ verschiedene Proteine exprimiert, welche an unterschiedlichen Stellen der IFN γ R-Signalkaskade interferieren und die Signalweiterleitung hemmen. So genannte SOCS (suppressors of cytokine signaling) Proteine, insbesondere SOCS-1 und SOCS-3, sind für die Regulation des Interferon Signalweges verantwortlich. Hierbei assoziieren SOCS-1/3 mit JAK1/2 durch Interferenz mit der Tyrosin Kinase Domäne und inhibieren dadurch die nachgeschaltete Phosphorylierung der STAT Proteine. Zusätzlich agieren SOCS Proteine als Adaptoren, die aktivierte Signalmoleküle für den proteasomalen Degradationsweg markieren (Zhang et al., 1999). Neben der Regulation durch

SOCS Proteine kann der Signalweg auch durch Protein-Tyrosin Phosphatasen (PTPs) beeinflusst werden. Hierbei dephosphorylieren die PTPs Shp1 und Shp2 aktiviertes JAK1/2 (Haque et al., 1997; You et al., 1999). Auch die STAT1 Phosphorylierung wird durch Dephosphorylierung im Kern reguliert. Dabei wird STAT1 durch PTPs nach Bindung an die DNA dephosphoryliert, die DNA-Bindung dabei aufgelöst, und inaktiviertes STAT1 transloziert in einem Ran-GTPase abhängigen Weg ins Zytoplasma (Mowen and David, 2000; McBride et al., 2006). Eine weitere Beeinflussung der Transkription von IFN γ regulierten Genen wird dadurch erreicht, dass IRF-1 sowie ISGF3 mit dem Repressormolekül IRF-2 um das ISRE oder IRF-E Bindemotiv konkurriert. Die Bindung von IRF-2 führt dabei zu keiner Genexpression (Harada et al., 1994).

Die zellulären Effekte von IFN γ sind sehr vielfältig und beeinflussen sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort. So werden durch IFN γ mehrere Gene induziert, welche für die MHC Klasse I vermittelte Antigenpräsentation wichtig sind. Dabei werden die MHC I Komplexe, – bestehend aus der schweren und leichten Kette – durch IFN γ induziert, was für die Präsentation von intrazellulären Pathogenbestandteilen wichtig ist (Shirayoshi et al., 1988). Durch Induktion einiger proteasomaler Untereinheiten, welche als „Immunproteasom-“ Untereinheiten bezeichnet werden und kompetitiv einige konstitutiv exprimierten Proteasomen-Untereinheiten ersetzen, wird die Quantität, Qualität und das Repertoire an Peptiden, welche auf MHC I Molekülen geladen werden, entschieden erhöht, was wiederum zu erhöhter und effektiverer Klasse I Antigenpräsentation beiträgt (Groettrup et al., 2001; Schroder et al., 2004). Zusätzlich wird durch IFN γ die Antigenpräsentation über MHC II erhöht, was zur Peptid spezifischen Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führt (Mach et al., 1996). IFN γ induziert dabei in professionellen APCs, wie B-Zellen, DCs und Makrophagen, die Expression von Klasse II MHC Molekülen und kann somit die Klasse II Antigenpräsentation verstärken (Mach et al., 1996). Durch IFN γ wird zusätzlich die adaptive Immunantwort in Richtung T_H1 Antwort verschoben. Dabei wird die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H1 Zellen gefördert, und T_H1 typische Effektormechanismen induziert, wie Aktivierung von NK Zellen, Förderung spezifischer zytotoxischer Immunität und Aktivierung von Makrophagen (Boehm et al., 1997).

IFN γ übt außerdem antiproliferative Effekte auf eine Vielzahl von Zellen aus, indem es Einfluss auf den Zellzyklus nimmt und Apoptose induzieren kann. Des Weiteren beeinflusst IFN γ den Isotyp Wechsel von B-Zellen zu IgG2a, übernimmt chemoattraktive Funktionen durch Regulation einiger Chemokine wie IP-10, MIG, MIP-1 und RANTES, und verstärkt die TLR4 vermittelte Immunantwort auf LPS, indem es die Expression von TLR4, MyD88 und IRAK induziert (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004).

Die bedeutsamsten antiviralen Mechanismen, die von IFN γ gesteuert werden, führen zur Hemmung der Proteinsynthese und somit zur Inhibierung der viralen Replikation. Dabei wird die Transkription von drei wichtigen Genen durch IFN γ induziert: die bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnte PKR und OAS/RNaseL, sowie auch die doppelsträngige RNS spezifische Adenosin Deaminase (dsRAD), welche die Desaminierung von Adenosin zu Inosin in doppelsträngiger RNS

katalysiert, und damit die Synthese funktioneller viraler Proteine verhindern kann (Boehm et al., 1997). Ferner konnte für einige IFN γ -induzierte 65 kDa Guanylat-bindende Proteine (GBPs) eine antivirale Wirkung gezeigt werden (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005).

Einer der wichtigsten Effekte von IFN γ auf Makrophagen besteht in der Aktivierung von antimikrobiellen Effektorfunktionen. Durch IFN γ aktivierte Makrophagen zeigen eine erhöhte Pinozytose und Rezeptor-vermittelte Phagozytose sowie eine erhöhte mikrobizide Aktivität. Letztere wird insbesondere durch Induktion von iNOS und NADPH Oxidase bewirkt, Enzyme, die zur Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffintermediate benötigt werden (RNI und ROI) (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004). Darüber hinaus führt IFN γ in humanen Zellen lokal zur Tryptophandepletion durch die Induktion der Indolamin 2,3 Dioxygenase (IDO), ein Mechanismus, dem beim Menschen antiparasitäre und antibakterielle Effekte zugeschrieben werden (Daubener and MacKenzie, 1999).

1.2.2 Tumor Nekrose Faktor

Der Tumor Nekrose Faktor ist ein essentielles proinflammatorisches Zytokin, und gehört zu einer großen Familie verwandter Proteine, die als TNF Superfamilie bezeichnet wird. Diese übernehmen in Säugetieren essentielle biologische Funktionen (Locksley et al., 2001; Hehlhans and Pfeffer, 2005). Dabei binden die Mitglieder der TNF Superfamilie an einen oder mehrere spezifische membrangebundene oder auch lösliche Rezeptoren, welche zusammen die TNF Rezeptor (TNFR) Superfamilie bilden (Hehlhans and Pfeffer, 2005). Die Aktivierung der TNF/TNFR Superfamilie führt zu einer Vielzahl an biologischen Effekten. Dazu zählen wichtige Funktionen bei der Organogenese von sekundären lymphatischen Organen, während der Entzündung sowie der protektiven Immunantwort. Allerdings werden auch schädigende Effekte, wie Sepsis, Fieber, Kachexie und Autoimmun-Erkrankungen, auf die Aktivität der TNF/TNFR Superfamilie zurückgeführt. Es sind mehr als 40 Mitglieder der TNF/TNFR Superfamilie bekannt und viele von ihnen sind wichtige Ziele therapeutischer Behandlung (Hehlhans and Pfeffer, 2005). TNF ist ein membrangebundenes trimeres Molekül, welches durch proteolytische Spaltung auch in gelöster Form vorkommt; beide Formen sind biologisch aktiv (Idriss and Naismith, 2000). TNF bindet an zwei verschiedene Rezeptoren: TNFR1 und TNFR2. Beide Rezeptoren besitzen die für die TNFR Superfamilie charakteristische cysteninreiche Domäne (CRD) und bilden selbstassemblierende Homotrimere (Chan et al., 2000). Bindet TNF an den TNFR1 so wird über zytosolische „death Domänen“ (DD) das Adaptermolekül TRADD (**TNFR associated death domain**) rekrutiert (Abbildung 1.3.). Wird dieser Komplex internalisiert, so führt die TRADD Bindung über weitere Komplexierung mit dem Molekül FADD und der Pro-Caspase 8 zur Aktivierung der Kaspase-Kaskade und zur Apoptose. Alternativ interagiert TRADD mit TRAF1 und TRAF2 (**TNFR associated factor**) sowie mit RIP (**receptor interacting protein**), was andererseits zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP1 führt. Durch die Einleitung der Gentranskription werden unter anderem Apoptose-inhibierende Gene induziert. Daraus folgt, dass das TNFR1

vermittelte Signal erst bei fehlender Proteinsynthese zur Apoptose führt. Im Gegensatz zu Fas, einem weiteren Mitglied der TNFR Superfamilie, welches durch Bindung an FADD (Fas associated death domain) direkt zur Kaspasen-Aktivierung und Apoptose-Einleitung führt (Hehlgans and Pfeffer, 2005).

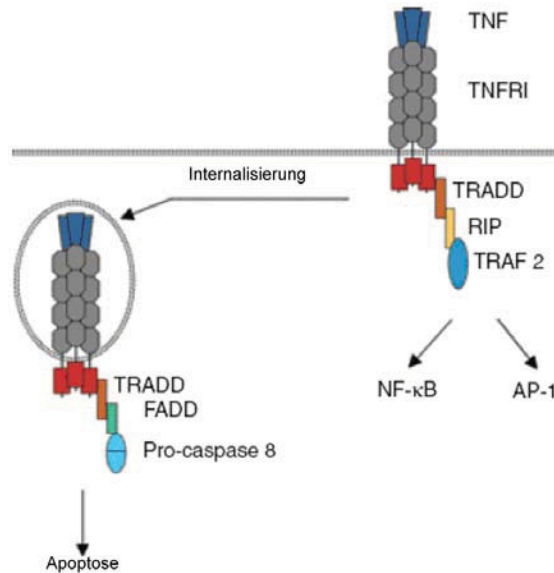


Abb. 1.3 TNF/TNFR1 Signalweg. Abbildung nach Hehlgans und Pfeffer, 2005.

Der TNFR2 wird nach Bindung an den Liganden proteolytisch gespalten; zusätzlich existieren sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre lösliche Formen des TNFR2, welche die Fähigkeit zur Ligandenbindung ebenfalls aufweisen (Seitz et al., 2001; Hehlgans and Mannel, 2002). Der TNFR2 besitzt im Gegensatz zum TNFR1 keine zytosolische DD. Die Signalweiterleitung erfolgt hier über ein so genanntes TRAF interagierendes Motiv (TIM), welches nach Rezeptoraktivierung TRAF Proteine rekrutiert und zur Aktivierung von NF-κB und JNK sowie von p38, ERK und der PI3K führt (Dempsey et al., 2003).

Der Aufbau der Immunantwort gegen Pathogene wird sehr stark von TNF und TNFR1 beeinflusst. TNFR1 defiziente Mäuse sind hochgradig suszeptibel gegenüber Infektionen mit intrazellulär replizierenden Pathogenen wie *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* und *Salmonella typhimurium* (Pfeffer et al., 1993; Ehlers et al., 2003; Hehlgans and Pfeffer, 2005). Bemerkenswert dabei ist, dass TNFR1 defiziente Mäuse nach der Infektion mit *L. monocytogenes* die antimikrobiellen Effektorsysteme ROI und RNI funktionell generieren, diese jedoch nicht zum Aufbau einer effektiven Immunität gegen das Pathogen ausreichen (Endres et al., 1997).

TNF trägt entscheidend sowohl zur antimikrobiellen protektiven als auch zur inflammatorischen Immunantwort gegen *M. tuberculosis* bei. Dabei ist TNF essentiell zum einen bei der Differenzierung spezifischer T-Zellen und der Induktion von Zytokinen durch T_H1 Zellen, zum anderen bei der Entwicklung von Granulomen, in denen das mykobakterielle Wachstum inhibiert wird (Ehlers, 2003). Weiterhin steigert TNF die Phagozytoseaktivität der Makrophagen, welche insbesondere zusammen mit $IFN\gamma$ deutlich erhöhte mykobakterizide Aktivität entwickeln (Bekker

et al., 2001). Außerdem werden durch TNF bei der Bildung von Granulomen auch Chemokine und Adhäsionsmoleküle induziert, welche zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen an den Ort der Infektion führen (Roach et al., 2002).

Während durch Studien mit TNFR1 defizienten Mäusen wichtige biologische Funktionen der TNF Antwort bei parasitären Infektionen, wie *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* und *Toxoplasma gondii* gezeigt werden konnte, konnten bei TNFR2 defizienten Mäusen keine Defekte nach *T. gondii* Infektion gefunden werden (Hehlgans and Pfeffer, 2005). Eine Studie konnte allerdings eine Rolle des TNFR2 in humanen unreifen dendritischen Zellen während des Aufbaus einer Toxoplasmose belegen (Giese et al., 2004).

Ein sehr bedeutender Effekt von TNF ist die systemische endotoxische Aktivität, welche zu Fieber, Hypotension und Schock führen kann. TNF ist durch seine Fähigkeit die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren zu induzieren, ein zentraler inflammatorischer Mediator. Diese potenten Effekte sind allerdings auch für Krankheitsbilder, wie Sepsis, chronische Polyarthrit und den Morbus Chron verantwortlich; dabei weist die Sepsis nach wie vor eine hohe Mortalitätsrate auf (Hehlgans and Pfeffer, 2005).

1.3 Antimikrobielle und antivirale Effektorsysteme

1.3.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate

Neben zytotoxischen T-Zellen gelten Makrophagen als die wichtigsten zellulären Effektoren der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen Pathogene. Dabei werden die Makrophagen primär durch einen IFN γ Stimulus aktiviert, woraufhin durch die Induktion einer Vielzahl von Genen weitreichende biochemische Veränderungen ablaufen. So wird die Antigenpräsentation, Phagozytose und die Responsivität auf weitere Zytokine, wie TNF, erhöht. Diese Aktivierung geschieht durch proinflammatorische Zytokine, ausgeschüttet von aktivierten T_H1 Zellen. In den aktivierten Makrophagen fusionieren nun die Lysosomen effektiver mit den Phagosomen, wobei letztere intrazelluläre oder kurz zuvor aufgenommene extrazelluläre Mikroben somit mit einer Vielzahl an bakteriziden lysosomalen Enzymen in Kontakt bringen. Aktivierte Makrophagen bilden darüber hinaus Sauerstoffradikale (ROI, reactive oxigene intermediate) und Stickstoffintermediate (RNI, reactiv nitrogen intermediate), die beide sehr effizient Keime abtöten sowie antimikrobielle Peptide und Proteasen, die freigesetzt werden und extrazelluläre Parasiten angreifen (Janeway, Jr. et al., 2005). ROI werden durch eine spezielle NADPH Oxidase gebildet. Diese Phagozyten-Oxidase (Phox) stellt Zwischenschritte bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser her. Unter RNI versteht man verschiedene Oxidationsstufen von Stickstoffprodukten, welche durch die katalytische Wirkung der induzierbaren NO Synthase (iNOS= NOS2) entstehen (Nathan and Shiloh, 2000). Die Produktion von ROI und RNI durch die Enzyme Phox und iNOS sind in Abbildung 1.4 schematisch zusammengefasst.

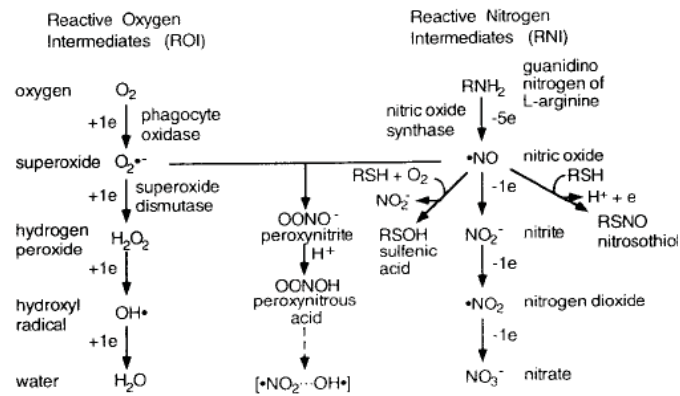


Abb. 1.4: ROI und RNI Produktion durch die Enzyme Phox und iNOS in mammalischen Zellen, entnommen Nathan und Shiloh 2000.

ROI und RNI gelten als chemisch hoch reaktive Moleküle, die zum einen zur Zerstörung von Nucleinsäuren sowie zu einer Vielzahl von chemischen Verbindungen führen. Dabei gelten sie aufgrund dieser Eigenschaften in der Maus als die wichtigsten antimikrobiellen Effektorsysteme. Zum anderen sind sie allerdings durch ihre hohe Reaktivität an der lokalen Zerstörung des Gewebes beteiligt, daher wird ihre Aktivität erst im Rahmen der Immunantwort freigesetzt und nicht konstitutiv. Die gewebezerstörende Wirkung erlaubt jedoch die Bekämpfung größerer parasitärer Organismen wie Würmer, die nicht phagozytiert werden können (Nathan and Shiloh, 2000; Janeway, Jr. et al., 2005). Interessanterweise verfügen einige Pathogene auch über Enzyme, die einen Teil der reaktiven Substanzen unschädlich machen können. So ist der einzellige Parasit *Trypanosoma cruzi* in der Lage, Sauerstoffintermediate über eine eigene Superoxiddismutase zu neutralisieren (Temperton et al., 1996); ebenso neutralisiert *Staphylococcus aureus* über eine Katalase Wasserstoffperoxid (Mandell, 1975).

1.3.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Antimikrobielle Peptide sind weitverbreitete Effektormoleküle im Tier- und Pflanzenreich. Sie übernehmen vor allem in der angeborenen Immunität weitreichende Aufgaben. Man findet sie sowohl in Protozoen, Prokaryoten, Pflanzen, als auch in Invertebraten und Vertebraten. Bei Säugetieren sind vor allem zwei Gruppen von AMPs vorzufinden: die Defensine und die Cathelicidine. Defensine werden vor allem von Epithelzellen und Phagozyten produziert und liegen dort oft in hohen Konzentrationen vor (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985). Cathelicidine sind strukturell zu den Defensinen unterschiedliche AMPs, in Verteilung und Häufigkeit sind diese den Defensinen sehr ähnlich (Zanetti et al., 1995; Lehrer and Ganz, 2002). Andere in Säugetieren vorzufindende AMPs, wie die Histatine (Histidinreiche Peptide) (Tsai and Bobek, 1998), Dermicidine (Schitteck et al., 2001) und „anionische Peptide“ (Brogden et al., 1997) sind beschränkt auf einige Tierarten und Gewebe.

Typisch für die Klasse der Defensine ist ihr kationischer Charakter, sie sind reich an Cysteinen, zeichnen sich durch eine β -Faltblattstruktur aus, wobei sie ihre Stabilität durch drei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten erlangen. Säugetierdefensine sind

klassifiziert in drei Unterfamilien: die α -, β - und θ -Defensine, welche durch die Anordnung der Disulfidbrücken zwischen den sechs Cysteinen unterschieden werden. Die Disulfidbrücken der α -Defensine liegen zwischen dem 1. und 6. Cystein (Cys¹-Cys⁶), Cys²-Cys⁴, sowie Cys³ und Cys⁵, die der β -Defensine liegen zwischen Cys¹-Cys⁵, Cys²-Cys⁴ und Cys³-Cys⁶. Im Gegensatz dazu zeigen die θ -Defensine eine zirkuläre Struktur, bei der die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen Cys¹-Cys⁶, Cys²-Cys⁵ und Cys³-Cys⁴ liegen.

Im Menschen sind 6 α -Defensine bekannt, HNP1, 2, 3 und 4 (**h**uman **n**eutrophile **p**eptide) sowie HD5 und 6 (**h**umanes α -**D**efensin 5, bzw. 6). Die HNPs werden dabei hauptsächlich in Neutrophilen konstitutiv exprimiert, wobei die Synthese schon in Vorläuferzellen des Knochenmarks stattfindet und die reifen Peptide in den Granula der Neutrophilen gespeichert werden. Im Gegensatz dazu wird HD5 als Propeptid vor allem von Panethzellen des Dünndarms konstitutiv exprimiert und erst nach der Sekretion extrazellulär durch Trypsin prozessiert (Ghosh et al., 2002). In der Maus sind die α -Defensine als Cryptidine bekannt und werden dabei nicht von Neutrophilen synthetisiert, sondern kommen in verschiedenen Epithelzellen und hauptsächlich den Panethzellen vor (Eisenhauer and Lehrer, 1992; Shirafuji et al., 1999). Es konnten bisher 28 humane β -Defensine durch Genbankanalysen identifiziert werden, wobei 6 humane β -Defensine (HBD1 bis 6) beschrieben werden, die hauptsächlich von Epithelzellen exprimiert werden. Dabei wird HBD1 konstitutiv in Epithelzellen exprimiert, wohingegen für HBD2 und 3 die Induktion durch virale Bestandteile, Bakterien und mikrobielle Produkte – wie Endotoxin – sowie proinflammatorische Zytokine – wie beispielsweise TNF und Interleukin-1 β (IL-1 β) – beschrieben wurde (Yang et al., 2001; Duits et al., 2003; Sorensen et al., 2005). In der Maus konnten bisher mindestens 4 β -Defensine beschrieben werden, welche vor allem von Epithelzellen exprimiert werden (Bals et al., 1998; Com et al., 2003). Die Defensine werden grundsätzlich als Pre-Pro-Peptide synthetisiert, d.h. sie besitzen eine N-terminale Signalsequenz (ca.19 AS), die kotranslational am rauhen Endoplasmatischem Retikulum abgeschnitten wird, ein mittleres Propeptid (ca. 45 AS), die dem reifen Peptid fehlt, und ein C-terminales kationisches Peptid (bis 30 AS), welches das reife Defensin nach Prozessierung darstellt (Daher et al., 1988; Valore and Ganz, 1992).

Die Aktivität der Defensine in der Infektionsabwehr ist divers. So weisen die meisten Defensine vor allem eine antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien und Pilze auf. Einige Viren mit Hüllmembran werden außerdem durch Defensine inaktiviert. So wird HNP für die CD8⁺ T-Zellen vermittelte antivirale Aktivität gegen HIV in Menschen verantwortlich gemacht, die auch nach langer Zeit als Träger des Virus keine Symptome der Krankheit aufweisen (non-progressor). Dabei ist nicht abschließend geklärt, wie die Sezernierung von Defensinen durch CD8⁺ T-Zellen induziert wird. Auch andere Viren, wie HSV, Papiloma-, Vaccinia- und Rhinoviren werden direkt durch Defensine beeinflusst, indem vor allem die Replikation dieser Viren inhibiert wird (Klotman and Chang, 2006).

Die entscheidenden Mechanismen bei der Abtötung von gramnegativen, wie grampositiven Bakterien, liegen in der durch Defensine vermittelten Kanalbildung der Zytoplasmamembran. Diese Kanalbildung wird durch hohe Transmembranpotentiale, einem hohem Anteil negativ geladener Lipide, dem Fehlen von kationischen Peptiden sowie den Cholesterinen der Bakterienmembran begünstigt. Auf diesen Membranunterschiede zu eukaryotischen Zellen beruht die Selektivität der Defensine gegen Bakterien. In Bakterien wird nach Permeabilisierung vor allem die RNS-, DNS- und Protein- Synthese gehemmt. Trotzdem wirken Defensine vor allem lokal und in hohen Konzentrationen zytotoxisch und sind in entzündeten Geweben an der Beschädigung der umliegenden Zellverbände beteiligt. Verschiedene Defensine zeigen zusätzlich eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen. Dabei binden HBD1 und 2 den Chemokinrezeptor CCR6 von Gedächtnis-T-Zellen und unreifen dendritischen Zellen, während HNP1, 2 und 3 chemotaktisch auf Monozyten, naive T-Zellen und auch unreife dendritische Zellen wirken, ohne dass die hierfür verantwortlichen Rezeptoren bisher identifiziert werden konnten. Eine weitere außergewöhnliche Wirkung konnte für das murine β -Defensin 2 beschrieben werden. In Verbindung mit Tumorantigenen wirkt es als Adjuvant. Wenngleich diese Funktion über TLR4 vermittelt wird, ist der zugrundeliegende Mechanismus der Adjuvantswirkung bisher ungeklärt. Einige weitere Defensine binden *in vitro* an den Rezeptor für das adrenocorticotrophe Hormon (ACTH), ohne den Rezeptor dabei zu aktivieren. ACTH wirkt immunsupprimierend und die kompetitive Hemmung durch Defensine könnte die Immunantwort und Inflammation lokal verstärken.

Die Cathelicidine sind eine heterogene Familie von kationischen AMPs, welche über eine lineare alphahelikale Sekundärstruktur charakterisiert sind. Die AS Sequenzen der Cathelicidine weisen grundsätzlich eine N-terminale Signalsequenz auf, ein mittleres Segment – auch Cathelin-Domäne genannt – und eine C-terminale Domäne, welche nach Prozessierung des Proteins das antimikrobielle Peptid darstellt. Beim Menschen ist ein Cathelicidin bekannt, hCAT-18, welches auch als LL-37 bezeichnet wird, da das reife Peptid aus 37 AS besteht, beginnend mit zwei aufeinanderfolgenden Leucinen. In der Maus ist das Cathelicidin CRAMP sowie CAT-18 bekannt. Grundsätzlich werden Cathelicidine von zirkulierenden Neutrophilen synthetisiert, aber auch in der Zunge, der Submucosa der Atemwege sowie den Geschlechtsorganen, wo sie als Abwehrbarriere fungieren (Malm et al, 2000). Zusätzlich zu ihrer antibiotischen Funktion, sind die alpha-helikalen Cathelicidine in der Lage, Pilze und einige Hefen effizient abzutöten. Das humane Cathelicidin LL-37 neutralisiert darüber hinaus auch Endotoxine diverser Bakterien. Zusammenfassend kann man sagen, dass dem Organismus über das breite Spektrum an AMPs eine weitreichende erste Abwehr gegen mikrobielle Erreger zur Verfügung steht, von denen die hier genannten nur einen kleinen Ausschnitt der bekannten und wohl noch unbekanntenen AMPs darstellen. Daher werden in den nächsten Jahren durch weitere Forschung sicherlich noch zahlreiche AMPs in den diversen Spezies identifiziert und charakterisiert werden, wobei ein speziesübergreifender gezielter Einsatz gegen bestimmte Erreger ein angestrebtes Ziel sein kann.

1.3.3 Die Familie der Interferon induzierten GTPasen

Die Guanosin 5` Triphosphat bindenden Proteine (GTPasen) sind eine große Proteinfamilie. Sie sind in der Lage GTP zu binden und zu hydrolysieren. GTPasen spielen eine zentrale Rolle in verschiedenen zellulären Bereichen, wie der Proteinbiosynthese (Elongations- und Initiationsfaktoren), der intrazellulären Signalweiterleitung (kleine Ras-verwandte Proteine, heterotrimeren G-Proteine), des vesikulären Transports (Rab/Ypt1), der Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung der Zelle (Ras) und der rezeptorvermittelten Endozytose (Dynamine) (Bourne et al., 1990).

Durch das bereits beschriebene Zytokin IFN γ werden neben den bekannten antimikrobiellen Proteinen, wie der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), der Phagozyten Oxidase (Phox), dem „natural-resistance associated macrophage protein“ (NRAMP), der RNA-abhängigen Protein-Kinase (PKR) und der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), vor allem eine Gruppe von Proteinen hochreguliert, welche in die GTPasen-Familie einzuordnen ist. Die Interferon induzierbaren GTPasen umfassen die p47 GTPasen, die p65 GBPs (Guanylate binding proteins), die Mx Proteine und die VLIGs (very large inducible GTPases) (Gupta et al., 1979; Haller et al., 1979; Klamp et al., 2003; Martens and Howard, 2006). Aufgrund von Sequenzhomologien werden die GBPs und die Mx-Proteine zur Superfamilie der Dynamine gezählt (Praefcke and McMahon, 2004). Daher soll kurz auf die Struktur dieser Proteinfamilie eingegangen werden. Die Klasse der Dynamine ist an Prozessen wie Membranfusionen, Vesikelabschnürungen, Vesikeltransportvorgängen sowie der Teilung der Zelle und von Zellorganellen beteiligt (Praefcke and McMahon, 2004). Dabei zeichnen sie sich durch ein Molekulargewicht von durchschnittlich 100 kDa aus und werden daher auch als große GTPasen bezeichnet, um sie von den kleinen Ras-ähnlichen und anderen regulatorischen GTPasen, wie den α -Unterheiten der heterotrimeren G-Proteine, zu unterscheiden. Die Struktur der Dynamine ist charakterisiert durch eine konservierte N-terminale G-Domäne, eine wenig konservierte mittlere Domäne, die eine wichtige Rolle bei der Selbstassemblierung dieser Proteine spielt, eine PH Domäne (Pleckstrin Homology), welche für das Membrantargeting verantwortlich ist, eine konservierte GTPase Effektor Domäne (GED) sowie eine C-terminale prolinreiche Domäne (PRD), die der Interaktion mit anderen Proteinen dient (Praefcke and McMahon, 2004). Ein Vergleich der Proteindomänen von Mitgliedern der Dynamine Superfamilie ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Die Mitglieder der Dynamine Superfamilie weisen gemeinsame biochemische Eigenschaften auf: sie binden Nukleotide mit einer geringen Affinität im μ M Konzentrationsbereich, im Gegensatz zu den kleinen GTPasen der Ras Familie, die Nukleotide mit einer deutlich höheren Affinität binden. Des Weiteren weisen die Dynamine eine hohe Hydrolyserate und eine Tendenz zur Selbstassemblierung und Oligomerisierung auf, die zur Verstärkung der Nukleotid-Hydrolyserate führt (Tuma and Collins, 1994).

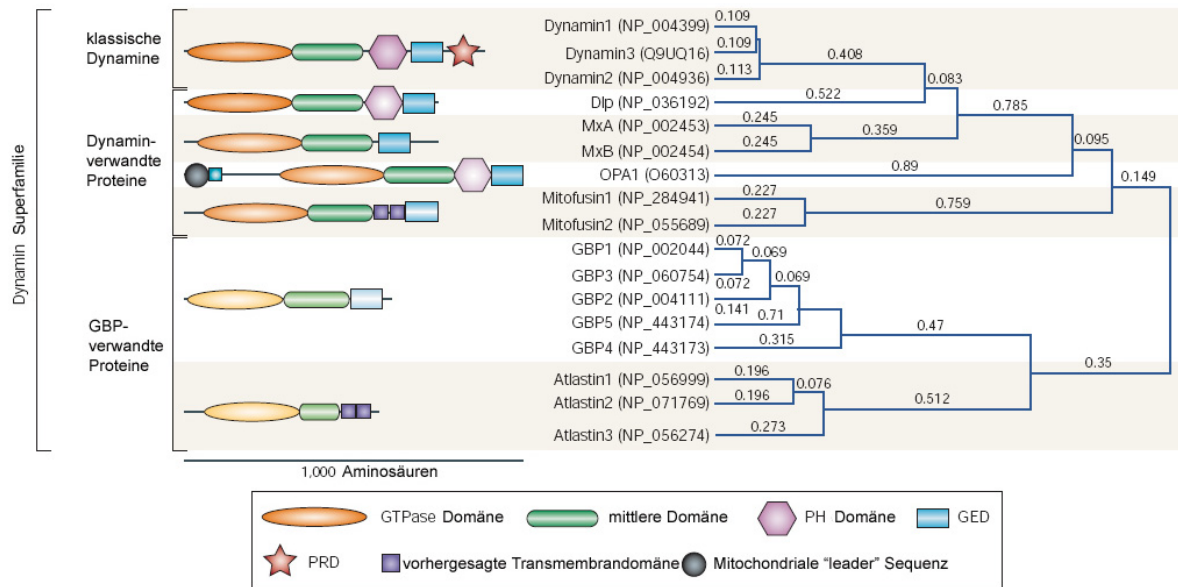


Abb. 1.5: Die Domänenstruktur der humanen Dynamin Superfamilie, nach Praefcke und McMahon, 2004.

Die GTPase Domäne (G-Domäne) besteht aus vier GTP-bindenden Motiven (G1-G4), welche für die GTP Bindung und Hydrolyse essentiell sind. Dabei sind diese Motive in der Familie der GTPasen, mit Ausnahme des G4 Motivs, hoch konserviert. Das G4 Motiv ist bei den Guanylatbindenden Proteinen (GBPs) weniger konserviert (RD statt N/TKXXD). Die katalytische GTPase-Aktivität wird, wie oben erwähnt, durch die Oligomerisierung begünstigt und ist von der Interaktion der G-Domäne mit der mittleren Domäne sowie der GED abhängig (Praefcke and McMahon, 2004). Die konservierten G-Domänen sind in Abbildung 1.6 vergleichend für einige Vertreter der unterschiedlichen GTPasen Subfamilien zusammengestellt.

	G1 (P-loop)	G2 und Schalter I	G3 und Schalter II	G4
Dynamin1	I A V V G G Q S A G K S S V L E N F V G	S G I V T R R P L V	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
DLP1	I V V V G T Q S S G K S S V L E S L V G	T G I V T R R P L I	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
MxA	I A V I G D Q S S G K S S V L E A L S G	S G I V T R C P L V	L I D L P G I T R V	I L T K P D L
OPA1	V V V V G D Q S A G K T S V L E M I A Q	G E M M T R S P V K	L V D L P G V I N T	V L T K V D L
Mitofusin1	V A F F E R T S S G K S S V I N A M L W	I G H I T N C F L S	L V D S P G T D V T	L N H R W D A
GBP1	V A I V G L Y R T G K S Y L M N K L A G	V Q S H T K G I W M	L L D T E G L G D V	V W T L R D F
Atlastin1	V S V A G A F R K G K E F L M D F M L R	N E P L T G F S W R	L M D T Q G T F D S	I F L V R D W
IIGP1	V A V T G E T G S G K S S F I N T L R G	G A A K T G V V E V	F W D L P G I G S T	V R T K V D S
p21 Ras	L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I Q	E Y D P T I E D S Y	I L D T A G Q E E Y	V G N K C D L
EF1α	I V V I G H V D S G K S T T T G H L I Y	E R G I T I D I S L	I I D A P G H R D F	G V N K M D S
Konsensus	GxxxxGKS T	T	LxxG	NKxD T

Abb. 1.6: Die GTP-Bindungs Motive der G-Domäne, nach Praefcke und McMahon, 2004.

1.3.3.1 Mx Proteine

Lindenmann und Kollegen berichteten 1963 erstmals von der Resistenz von A2G Mäusen gegenüber Influenzaviren (Lindenmann et al., 1963). Die Resistenz gegenüber Influenza konnte dabei auf ein dominant vererbtes Gen zurückgeführt werden und der Genlocus wurde Mx (**Myxovirus**) genannt. Mx wird durch Typ I Interferone induziert, da die antivirale Eigenschaft durch die Gabe von Antikörpern gegen Typ I Interferone inhibiert wird (Haller et al., 1979). Mx Proteine kommen in allen untersuchten Vertebraten vor; dabei sind zwei humane Mx Gene bekannt, MxA und MxB (Staehele and Haller, 1985) sowie zwei murine Gene Mx1 und Mx2 (Staehele and Sutcliffe, 1988). Die Mx Gene werden hauptsächlich durch Typ I Interferone induziert (Goetschy et al., 1989) und üben einen starken antiviralen Effekt aus; so sind Mx negative Zellen nach stabiler Transfektion von Mx1 ohne Zugabe von Interferonen gegenüber Mx sensitiven Viren resistent (Staehele et al., 1986; Arnheiter and Meier, 1990). Zusätzlich sind Mx Isoformen bekannt, wie humanes MxB und Mx3 der Ratte, welche keine antivirale Aktivität aufweisen, dabei scheint MxB bei der Regulation von Transportvorgängen in den Zellkern, sowie an der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein (King et al., 2004).

Die Mx Gene kodieren Proteine in der Größe von 70-80 kDa mit einer starken Homologie zu den Dynaminen, vor allem in der N-terminalen G-Domäne. Die C-terminale GED Domäne beinhaltet einen Mx-spezifischen Lysinreichen Bereich (Leucin-Zipper), wohingegen die PH Domäne sowie die prolinreiche Domäne der Dynamine hier fehlen. Weitere biochemische Eigenschaften, wie die Ausbildung von Oligomeren, die Selbstassemblierung und die hohe Rate an intrinsischer GTPase-Aktivität sind den Mx-Proteinen und den Dynaminen gemein (s.o.).

In Interferon stimulierten Zellen lokalisieren humanes MxA Protein und murines Mx2 Protein in granulären Strukturen im Zytoplasma, während nach Überexpression MxA mehr vesikuläre Strukturen aufweist (Reichelt et al., 2004). Außerdem kolokalisiert MxA mit dem glatten ER in La Cross Virus infizierten Zellen, dort wo virale Proteine akkumulieren (Reichelt et al., 2004). Das zytoplasmatische MxA Protein verleiht eine Resistenz gegen das Influenza, Thogoto, La Cross und Masern Virus sowie gegen VSV (vesicular stomatitis virus) (Staehele et al., 1986; Pavlovic et al., 1990; Schnorr et al., 1993; Hefti et al., 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass MxA am glatten ER mit dem Nukleokapsidprotein (N-Protein) des La Cross Virus interagiert und dort zusammen mit dem glatten ER-Marker Syntaxin 17 kolokalisiert. Dabei rekrutiert erst das membranständige N-Protein das zytosolische MxA zur Membran, allerdings ist das weitere Schicksal dieses Komplexes bisher nicht geklärt (Reichelt et al., 2004). MxA ist außerdem in der Lage, den Transport des Nukleokapsids des Thogoto Virus in den Nukleus der Wirtszelle zu inhibieren, was nachweislich GTP-abhängig geschieht (Kochs and Haller, 1999). Im Gegensatz zu MxA des Menschen lokalisiert das murine Mx1 im Nukleus der Zelle, wofür eine nukleäre Signalsequenz in der C-terminalen Proteinregion verantwortlich ist. Dort inhibiert Mx1 die Transkription der RNS des Influenzavirus (Pavlovic et al., 1992). Humanes MxA hingegen

inhibiert die virale Replikation von Influenza in einer späteren Phase, da humanes Wt MxA nicht im Zellkern vorliegt. Bemerkenswert dabei ist jedoch die Tatsache, dass artifiziell in den Zellkern eingeschleußtes MxA sich wie Mx1 verhält und die primäre Transkription der viralen (Influenza) RNS blockiert, während vice versa Mx1 im Zytoplasma zu keiner Inhibition der viralen Infektion befähigt ist (Zurcher et al., 1992a; Zurcher et al., 1992b). Die Lokalisation der Mx Proteine gibt daher einen Hinweis auf den Ort der antiviralen Aktivität. Des Weiteren hängt die antivirale Aktivität der Mx Proteine von einer funktionellen G-Domäne ab. Dabei konnte für MxA gezeigt werden, dass die Interaktion mit dem Thogoto Virus GTP-bindungsabhängig ist. Der C-terminale Leucin-Zipper ist zusätzlich essentiell für die antivirale Eigenschaft und scheint außerdem, da in diesem Bereich die größten Sequenzunterschiede der Mx Proteine untereinander liegen, für die virale Spezifität der Mx-Proteine verantwortlich zu sein (Zurcher et al., 1992a; Johannes et al., 1997; Ko et al., 2004).

1.3.3.2 p47 GTPasen, IRGs

Die p47 GTPasen, auch IRG (immunity-related GTPases) genannt, sind eine Unterfamilie der GTPasen, welche bis auf wenige Ausnahmen stark durch IFN γ induziert werden. Die IRG Proteine besitzen typischerweise ein Molekulargewicht von 47 kDa mit einer kanonischen G-Domäne, die ca. 80 AS vom N-Terminus entfernt vorliegt. Die AS Sequenz wird bei den bekannten IRGs, mit Ausnahme einer Subgruppe in Knochenfischen, durch ein einzelnes langes Exon kodiert (Bekpen et al., 2005). In der Maus sind bisher 23 IRG Gene bekannt, wobei 4 als Pseudogene beschrieben wurden. Die Gene liegen dabei geclustert auf den Chromosomen 11 und 18, mit Ausnahme von Irgc (CINEMA), das auf Chromosom 7 lokalisiert ist (Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991). Drei Maus IRG Proteine haben eine nichtkanonische Sequenz in der G1-Domäne: GX₄GMS anstatt der konservierten Sequenz: GX₄GKS. Daher werden 2 Subfamilien klassifiziert: die GMS und die GKS IRGs (Boehm et al., 1998). Im Menschen existiert nur ein zu den IRGs homologes Gen, welches nicht durch IFN γ induzierbar ist (Bekpen et al., 2005). IRGs sind bei Vertebraten weit verbreitet, nur in der Linie der Primaten fehlen sie weitgehend. Die biochemische Beschreibung der IRGs beschränkt sich bis zum heutigen Zeitpunkt auf Untersuchungen zu Irga6 (IIGP) (Uthaiyah et al., 2003). Dabei bindet Irga6, wie die Dynamine, Nukleotide im μ M Bereich und weist eine GTP-abhängige Oligomerisierung sowie eine kooperative GTPase Aktivität auf.

IFN γ ist der Hauptinduktor der Expression der IRGs; obwohl z.T. auch Typ I Interferone sowie LPS ebenfalls die Expression induzieren können, wird dies auf eine sekundär induzierte IFN γ Produktion zurückgeführt (Zerrahn et al., 2002; Lapaque et al., 2006). Zur Expression der Proteine sind Immunzellen sowie nicht-Immunzellen – wie Fibroblasten – befähigt (Boehm et al., 1998).

Die Generierung von IRG defizienten Mauslinien konnte eine signifikante Bedeutung der einzelnen p47 GTPasen in der Pathogenabwehr aufdecken. So sind Irgm1 (LRG47) defiziente Mäuse suszeptibel gegenüber Infektionen mit *T. gondii*, *L. major*, *T. cruzi*, *M. tuberculosis*, *M.*

avium, *L. monocytogenes* und *S. typhimurium*. *Irgm3* (IGTP) defiziente Mäuse, welche mit denselben Pathogenen infiziert wurden, zeigten jedoch nur eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *L. major* und *T. gondii*. Auch *Irgd* (IRG47) defiziente Mäuse sind unterschiedlich suszeptibel; so sind sie resistent gegenüber Infektionen mit *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes* und *S. typhimurium*, wohingegen sie suszeptibel nach Infektion mit *T. gondii* sind (Taylor et al., 2004; MacMicking, 2005; Martens and Howard, 2006). Somit scheinen die IRGs essentielle nicht-redundante Proteine in der Abwehr gegen die untersuchten Pathogene in der Maus zu sein. In der antiviralen Immunität spielen die IRGs anscheinend nur eine untergeordnete Rolle. So wurde bislang nur in *Irgb6* (TGTP) und *Irgm2* (GTPI) überexprimierenden Zellen eine leicht erhöhte antivirale Wirkung gegen VSV oder Coxsackie Virus beobachtet (Carlow et al., 1998; Zhang et al., 2003). Gendefiziente Mäuse, *Irgd*^{-/-}, *Irgm1*^{-/-} und *Irgm3*^{-/-}, weisen nach Infektion mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) eine normale Resistenz gegen die virale Infektion auf (Taylor et al., 2004).

Die IRG Proteine lokalisieren intrazellulär überwiegend membranassoziiert (Golgi, ER), sind aber auch im Zytosol unterschiedlich stark vorzufinden (Martens et al., 2004; Martens and Howard, 2006). Weitere Studien haben die subzelluläre Lokalisation der IRGs nach Infektion mit intrazellulären Pathogenen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass manche IRGs von ihren ursprünglichen Zielorten nach Infektion mit *T. gondii* rasch die pathogenhaltigen Vakuolen erreichten. Alle IRGs, außer *Irgm1*, gelangten so in Astrozyten, embryonalen Fibroblasten oder 3T3 Zellen, nach Präinkubation mit IFN γ , zur parasitophoren Vakuole (PV) von *T. gondii*, während *Irgm1* anscheinend in der Lage ist, zu mykobakterienhaltigen Phagosomen in IFN γ präinkubierten Makrophagen zu translozieren (MacMicking, 2005; Martens et al., 2005). Diese Kolokalisation korreliert mit den Ergebnissen der *Irgm1* defizienten Mauslinie, da *Irgm1* defizienten Mäuse eine verringerte und verzögerte Azidifizierung der mykobakterienhaltigen Phagosomen aufweisen (MacMicking et al., 2003). Bemerkenswert dabei ist, dass *Irgm1* nicht zur PV von *T. gondii* transloziert, obwohl *Irgm1* defiziente Mäuse suszeptibel gegenüber *T. gondii* sind. Die IRG vermittelten Resistenzen gegen *T. gondii* können daher womöglich nicht durch einen einzelnen Effektormechanismus erklärt werden. Für die GMS-Subgruppe der IRG-Proteine, zu denen *Irgm1* gehört, wird daher diskutiert, dass sie eine Rolle bei der korrekten subzellulären Lokalisation der weiteren p47 GTPasen zur PV von *T. gondii* ausüben (Martens and Howard, 2006).

1.3.3.3 p65 Guanylat-bindende Proteine

Die 65 bis 67 kDa GBPs wurden schon früh als IFN γ induzierte Proteine mit einer Größe von 44 bis 68 kDa in humanen Fibroblasten identifiziert (Gupta et al., 1979). Sie besitzen die ungewöhnliche Eigenschaft, GTP-, GDP- sowie GMP-Agarose mit ähnlicher Affinität zu binden, weswegen diese Proteine Guanylat-bindende Proteine (GBP, guanylate binding proteins) genannt wurden (Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1985). Später konnte gezeigt werden, dass diese Proteine in der Lage sind, nicht nur GTP zu GDP sondern, im Gegensatz zu den anderen bekannten GTPasen, auch zu GMP zu hydrolysieren (Schwemmle and Staeheli, 1994; Neun et al., 1996; Praefcke et al., 1999).

Zahlreiche zu GBP homologe Gene wurden seit dem in verschiedenen Spezies identifiziert. Mit diesen Studien wurde klar, dass es sich bei den GBPs um eine konservierte Genfamilie handelt. Bisher konnten GBPs beim Menschen, bei der Maus, bei der Ratte und beim Huhn gefunden werden. Im Menschen sind sieben GBPs und ein Pseudo GBP bekannt, die in einem Gencluster auf dem Chromosom 1 liegen (Olszewski et al., 2006). In der Maus existieren mindestens elf GBPs und zwei Pseudogene, die jeweils in Clustern auf Chromosom 3 (*gbp1*, *gbp2*, *gbp3*, *gbp5*, *gbp7*, *pseudo gbp1*) bzw. Chromosom 5 (*gbp4*, *gbp6*, *gbp8*, *gbp9*, *gbp10*, *gbp11*, *pseudo gbp2*) angeordnet sind (Abbildung 1.7) (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008). Alle murinen GBPs zeichnen sich dabei durch eine sehr starke Homologie der Genesequenzen in den Exon- und Intronstrukturen aus; die murinen GBPs sind höchstwahrscheinlich durch Genduplikationen entstanden (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008).

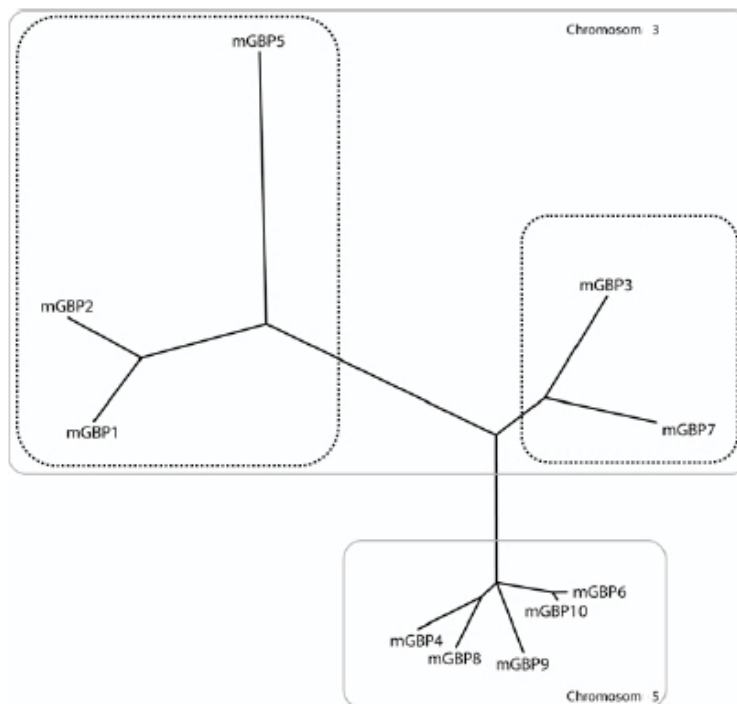


Abb. 1.7: Phylogenetischer Baum der murinen GBP-Familie. Abbildung nach Degrandi et al. 2007.

Die Domänenstruktur der GBPs weist eine Dynamin-typische große G-Domäne, eine Mitteldomäne und eine GTPase Effektor-domäne auf (Abbildung 1.5). Dabei ist ihre Hydrolyseaktivität oligomerisierungsabhängig (Praefcke and McMahon, 2004). Die GBP Familienmitglieder von Mensch und Maus weisen eine hohe Homologie in der N-terminalen G-Domäne mit den kanonischen GTP-Bindemotiven G1-G3 auf und besitzen das nicht-kanonischen G4 Motiv RD (Abbildung 1.6). Daneben zeichnen sich einige GBPs (hGBP1, hGBP2, hGBP5, mGBP1, mGBP2, mGBP5) durch ein C-terminales CaaX Motiv aus, welches als Signal der posttranslationalen Isoprenylierung dient (Stickney and Buss, 2000). Es konnte dazu gezeigt werden, dass isoprenyliertes mGBP2 in vesikelartigen oder granulären Strukturen innerhalb des Zytosols vorliegt, während mutiertes mGBP2, welches nicht mehr isoprenyliert werden kann, diese typische subzelluläre Verteilung verliert (Vestal et al., 2000). Allerdings konnten die mGBP2-haltigen vesikelartigen Strukturen bisher nicht näher charakterisiert werden.

Die murinen GBPs (mGBP1-5) werden durch Typ I und Typ II Interferone in vielen Zelltypen induziert. Dabei gehören einige Mitglieder der mGBPs zu den am höchsten IFN γ induzierbaren Proteinen in murinen Makrophagen (Boehm et al., 1998). Auch LPS führt zu einer transienten Induktion von mGBP1-5 (Nguyen et al., 2002). Das humane GBP1-Protein zeigt außerdem eine deutliche Induzierbarkeit durch IL-1 α , IL-1 β und TNF (Guenzi et al., 2001; Lubeseder-Martellato et al., 2002).

Die biologische Funktion der GBPs ist bisher noch nicht ausreichend geklärt. Es konnte zum jetzigen Zeitpunkt gezeigt werden, dass hGBP1 sowie mGBP2 regulierende Funktionen auf das Zellwachstum ausüben (Guenzi et al., 2001; Gorbacheva et al., 2002). In humanen Endothelzellen, die retroviral hGBP1 überexprimieren, wird die Zellproliferation inhibiert. Dabei ist die Hemmung der Proliferation unabhängig von der GTPase-Aktivität oder der posttranslationalen Modifikation von hGBP1 (Guenzi et al., 2003). Die Überexpression von mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten führt hingegen zur Verstärkung des Zellwachstums. Dabei ist diese Zellproliferationssteigerung abhängig von der intakten GTP-Bindestelle (Gorbacheva et al., 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine hGBP1 Expression in Endothelzellen die Expression von Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1) negativ reguliert und somit zur verringerten Invasion der Endothelzellen in die Matrix führt (Guenzi et al., 2003). Bei diesem Effekt ist die GTPase-Aktivität von hGBP1 essentiell, im Gegensatz zu der o.g. Inhibierung der Zellproliferation.

In zwei weiteren Studien wurde ein hemmender Einfluß von hGBP1 sowie mGBP2 auf die virale Replikation gezeigt. Dabei wurde die Vermehrung des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) durch die Überexpression von hGBP1 in HeLa-Zellen bzw. von mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten inhibiert (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005).

Trotz der bemerkenswert starken Responsivität der GBPs auf proinflammatorische Zytokine ist ihre Rolle in der Infektionsabwehr gegen mikrobielle Pathogene bisher wenig untersucht.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die proinflammatorischen Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und TNF spielen bei der antimikrobiellen Immunabwehr eine zentrale Rolle. Durch diese Zytokine wird eine große Anzahl von Genen in Makrophagen induziert, womit antimikrobielle Abwehrmechanismen, z.B. ROI und RNI, gegen intrazelluläre Pathogene der Zelle zur Verfügung stehen. Studien konnten belegen, dass TNFR1 defiziente Mäuse eine normale Aktivität der Enzyme ROI und RNI aufweisen und auch die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und anderer bekannter proinflammatorischer Zytokine weitgehend normal ist. Trotzdem sind diese gen-defizienten Mäuse hochgradig susceptibel gegenüber Infektionen mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* (Pfeffer et al., 1993; Endres et al., 1997). Diese Ergebnisse belegen deutlich, dass es weitere durch $\text{IFN}\gamma$ und TNF induzierte, bisher noch nicht bekannte bzw. charakterisierte Mechanismen existieren, die zu einer effektiven antimikrobiellen Aktivität des Wirts beitragen.

Durch vorangegangene Microarray Transkriptomanalysen (Degrandi, 2007) bei denen Ana-1 Makrophagen mit $\text{IFN}\gamma$ oder TNF, sowie einer Kombination von $\text{IFN}\gamma$ /TNF stimuliert wurden, konnten zwei Genfamilie als hochgradig $\text{IFN}\gamma$ reguliert identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die sogenannten IRGs und murinen 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine (GBPs). Im Rahmen von Transkriptomanalysen wurden drei neue Mitglieder der mGBP Familie identifiziert, dabei handelt es sich um mGBP6, mGBP7 und mGBP8 (Degrandi et al., 2007). Weitere Familienmitglieder, mGBP9 und 10, konnten zusätzlich durch *in silico* Analysen identifiziert werden (Kresse et al., 2008). Das Hauptaugenmerk in der hier vorgelegten Arbeit lag auf der Charakterisierung der neuen Mitglieder der GBP Familie anhand ihrer Expression *in vitro* unter proinflammatorischen Bedingungen und *in vivo* während einer Infektion. Anhand eines bisher nicht beschriebenen Familienmitgliedes - mGBP7 - sollte das subzelluläre Verhalten während Infektionen mit intrazellulären Erregern mikroskopisch analysiert werden.

Ein weiteres durch $\text{IFN}\gamma$ und TNF induziertes Gen war das nur als EST in der Datenbank vorhandene und noch nicht näher beschriebene Gen AW112010/SSPII. Auch dieses Transkript sollte im Rahmen dieser Arbeit näher durch *in silico* Charakterisierung und durch seine Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Das Verhalten des translatierten Proteins sollte mikroskopisch und funktionell untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Generierung einer AW112010/SSPII „knock out“ Maus, um die Rolle des Gens im Verlauf von Infektionen *in vivo* studieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hamburg
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bactoagar	BD Biosciences, Heidelberg
BES	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CpG ODN 1668	TIB MolBiol, Berlin
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
DesoxyriboNucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Dextransulfat	Amersham Biosciences, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium	Gibco, Eggenstein
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL	GE Healthcare, München
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
ExpressHyb Hybridisierungslösung	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll™ 400	Amersham, Braunschweig
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
FKS (Fötales Kälberserum) low Endotoxin	Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ, USA
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex, Aachen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Gentamycin	Gibco, Eggenstein
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
HEPES	Gibco, Karlsruhe
IMDM Medium	BioWhittaker, Lonza, Belgien

Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
LTA (<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC 43251)	Thomas Hartung, Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS <i>E. coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Marker 1kb DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
MassRuler™ DNS-Leiter	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Methylenblau	Merck, Darmstadt
mIFN- β	R&D Systems, Mainz
mIFN- γ	R&D Systems, Mainz
mIL1- β	R&D Systems, Mainz
mIL-2	R&D Systems, Mainz
mIL-4	R&D Systems, Mainz
mTNF- α	R&D Systems, Mainz
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP-40 (IGEPAL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
poly (I:C)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker, High-Range Rainbow	GE Healthcare, München
Proteinmarker, Low-Range Rainbow	GE Healthcare, München
RPMI Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIZOL Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Ultrapure H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
VLE RPMI-CLICKS 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Ziegenserum	DaKoCytomation, Hamburg

2.1.2 Antikörper/-seren

Antikörper/-seren	Bezugsquelle
Anti-β-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-IRF-1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
Anti-Tetra-His	Qiagen, Hilden
Anti-Listeria monocytogenes	BioTrend Chemikalien GmbH, Köln
Anti-Toxoplasma gondii [TP3]	Abcam, Cambridge, UK
Cy TM 2 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy TM 2 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy TM 3 Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy TM 3 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat Anti-Rabbit IgG POX	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat Anti-Mouse POX	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-mGBP2 (EVNGKPVTSDEYLEHC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP7 (CGGKSSMNTNSDKVRK)	Eurogentec, Belgien
Anti-SSPII (TLETSSGKSHPLGRS)	Eurogentec, Belgien

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	NEB, Frankfurt a. M.
DNS High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
DNS T4 Ligase	NEB, Frankfurt a. M.
DNS Polymerase, AccuPrime TM Pfx	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DNS Polymerase, <i>Bca</i>	Invitrogen, Karlsruhe
DNS Polymerase, Expand High Fidelity	TaKaRa, Shiga, Japan
DNS Polymerase, Native Pfu	Roche, Mannheim
DNS Taq-Polymerase	Stratagene, Texas, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	NEB, Frankfurt a. M.
	Roche, Mannheim
	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RNase, DNase frei	Roche, Mannheim
RNase out	Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/μL)	GE Healthcare, München

2.1.4 Radiochemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP redivue

Das Reagenz wurde von der Firma GE Healthcare (München) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit ($T_{1/2} = 14,262 \text{ d}$) verwendet.

2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL
BD SMART RACE cDNA Amplification Kit	BD Bioscience Clontech, Heidelberg
Bis-Tris Gele (4-12 %)	Invitrogen, Karlsruhe
Filme: Hyperfilm TM -ECL	GE Healthcare, München
Filtermate A 1205-401	PerkinElmer, Finnland
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Dassel
Ladderman TM Labeling Kit	TaKaRa, Shiga, Japan
MicroSpin TM S-200 HR Säulen	Amersham Biosciences, Braunschweig
Nylonmembran, Hybond N+	Amersham, Braunschweig
Nitrocellulosemembran Protan BA85	Whatman, Dassel
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
PCR-Aufreinigungskit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
Plasmid Isolierungskits	Macherey-Nagel, Düren
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
qPCR MasterMix No ROX	Eurogentec, Liege, Belgien
Quik-Change II Site Directed Mutagenese Kit	Stratagene, Californien
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Tricin Gele 16%	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Geräte

Gerät/Bezeichnung	Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Brutschrank, BBD6220	Heraeus, Hanau
Counter, 120S Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügelshausen
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophorese von DNS und RNS, Agagel Maxi/Midi	Biometra, Göttingen
Elektroporationsgerät, Gene Pulser II	Biorad, München
ELISA Reader, Sunrise	Tecan, Crailsheim
Entwicklermaschine, Curix 60	Agfa, Köln
Geldokumentationssystem, BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Heizofen, OV3	Biometra, Göttingen
Harvester, Basic 96 Harvester	Satron instruments, Tampere, Finnland

Kühlzentrifugen, Sorvall® RC26 PLUS	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Konfokalmikroskop, LSM510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Mikroskope, Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
TE2000	Nikon, Düsseldorf
PCR Maschine, Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Real-time-PCR Maschine, iCycler IQ5	Biorad, München
Phosphoimager	FLA-3000, FujiFilm, Düsseldorf
Photometer, GeneQuant II	Pharmacia, Braunschweig
Spannungsquelle, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PS 500 XT	HIS, San Francisco, USA
Sterilbank, HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
Thermoblöcke, Termomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen, Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau
Ultra-TURRAX®	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad, WNB22	Memert, Schwabach
Zellkulturschüttler, 3015	GFL, Burgwedel

2.3 Medien und Puffer

2.3.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung	
BBS (2 x)	280 mM	NaCl
	50 mM	BES
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH = 6,96
DNS Verdaulösung	500 µl	TNE
	50 µl	SDS 10 %
	25 µl	Pronase E
	7,5 µl	Proteinase K
5 x DNS Auftragspuffer	15 %	Ficoll Typ 400
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
10 x DNS Auftragspuffer	1 mg/ml	Orange G
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	30 %	Gelatine
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP

ES Zell Lysepuffer	10 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM	EDTA
	0,5 %	Sarkosyl
HEBS (2 x)	0,28 M	NaCl
	0,05 M	HEPES
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ pH = 7,0
Minimal-TE	1 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,01 mM	EDTA
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ pH = 7,4
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50 %	Phenol, pH 8,0
	48 %	Chloroform
	2 %	Isoamylalkohol
10 x PCR Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine
Pronase E	10 mg/ml	Pronase E
	10 mM	Tris, pH 8,0
	10 mM	NaCl
Proteinase K	10 mg/ml	Proteinase K in H ₂ O _{bidest} gelöst
RNS Elektrophoresepuffer		1 x MESA-Puffer
2 x RNS Auftragspuffer	48,0 %	Formamid
	10,0 %	10 x MOPS-Puffer
	17,3 %	Formaldehyd
	14,0 %	DEPC-H ₂ O
	5,3 %	Glyzerin
	5,3 %	Bromphenolblau
10 x MOPS-Puffer	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat·3H ₂ O
	10 mM	EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O pH = 7,2

20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
50 x TAE Elektrophoresepuffer	2 M	Tris, pH 8,0
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA
TBS-T	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,6
	0,1 %	Tween-20
TE Puffer	10 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
TNE	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
Waschlösung I (Southern+Northern)	2 x	SSC
	0,05 %	SDS
Waschlösung II (Southern+Northern)	0,1 x	SSC
	0,1 %	SDS
WB Auftragspuffer (5 x)	45 %	Glyzerin
	25 %	β -Mercaptoethanol
	10 %	SDS
	0,15 %	Bromphenolblau
	30 mM	Tris/HCl pH 6,8
WB Tricin Auftragspuffer (2x)	12 %	Glyzerin
	4 %	SDS
	0,0025 %	Coomassie Blue G
	0,0025 %	Phenol Red
	450 mM	Tris HCl pH 8,45
	2 %	β Mercaptoethanol
WB Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH = 7,6
	1 %	Triton X 100
	1 %	NP-40
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA

WB IP Lysepuffer	140 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	20 mM	Tris/HCl pH = 7,6
	1 %	NP-40
WB IP Waschpuffer	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH = 7,6
	2 mM	EDTA
	0,2 %	NP-40
WB Organ Lysepuffer		PBS
	1 %	NP-40

Den WB Lysepuffern wurde vor Gebrauch Proteaseinhibitor cocktail (Sigma) oder complete mini (Roche) nach Herstellerangaben hinzugefügt.

WB Laufpuffer	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris Base
	1 mM	EDTA
	0,1 %	SDS pH = 7,7
WB Tricin Laufpuffer	100 mM	Tris Base
	100 mM	Tricin
	0,1 %	SDS pH = 8,3
WB Transferpuffer	25 mM	Bicin
	25 mM	Bis/Tris
	1 mM	EDTA
	20 %	Methanol

2.3.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zelltyp	Grund- medium	FKS*	Penicillin	Streptomycin	β -ME	L-Glutamin
ANA-1 Makrophagen	RPMI 1640 VLE	10 %			0,05 mM	2 mM
BMDM**	RPMI 1640 VLE	10 %			0,05 mM	2 mM
EF Zellen	DMEM hohe Glukose	5 %	100 U/ml	100 μ g/ml	0,05 mM	2 mM
ES Zellen***	DMEM hohe Glukose	15 %	100 U/ml	100 μ g/ml	0,05 mM	2 mM
NIH 3T3 Zellen	DMEM hohe Glukose	10 % NKS	100 U/ml	100 μ g/ml	0,05 mM	2 mM
RAW 264.7 Makrophagen	RPMI 1640 VLE	10 %	100 U/ml	100 μ g/ml	0,05 mM	2 mM
293(F)T Zellen	DMEM hohe Glukose	10 %	100 U/ml	100 μ g/ml		2 mM

* für ES und EF speziell getestetes ES-FKS, für Makrophagenzelllinien und BMDM getestetes Endotoxin freies FKS

** M-CSF wurde als Kulturüberstand der M-CSF produzierenden Zelllinie L-929 zugegeben

***1 % LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugegeben

2.3.3 Medien für die Bakterienkultur

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums.

Medium	Zusammensetzung
LB (pH 7,2)	Caseinhydrolysat 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 5 g H ₂ O _{dest} ad 1 l

Das Medium wurde durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiert. Das Festmedium entstand durch Zusatz von 15 g Agar pro Liter Medium. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Klone 1:1 mit 98 % sterilem Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.4 Antibiotika

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium je nach verwendetem Plasmid Ampicillin oder Kanamycin zugegeben.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O _{bide} st, sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bide} st, sterilfiltriert	100 µg/ml

2.5 Bakterien-, Toxoplasmenstämme und Zelllinien

2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Toxoplasmenstämme unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen
<i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251
GFP - <i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium stabil mit GFP transfiziert	(Chakraborty, Gießen)
<i>T. gondii</i> ME49, Gruppe II	obligat intrazellulär replizierende Protozoa	(Parmley et al., 1994)

2.5.2 Zellen/Zelllinien

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellen unter Angabe der Eigenschaften und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien.

Zellen	Eigenschaften	Referenz
ANA-1	Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen, immortalisiert mittels J2 Retrovirus	(Cox et al., 1989)
BMDM	aus dem Knochenmark mit M-CSF <i>in vitro</i> ausdifferenzierte Makrophagen	frisch isoliert
EF Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus CD1 Embryonen	frisch isoliert (Klein et al., 1993)
ES Zellen	embryonale Stammzellen aus SvJ 129/Ola Mäusen	(Kuhn et al., 1991a)
HS27	humane Vorhaut Fibroblasten	ATCC, CRL-1634™

IRF-1 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus IRF-1 ^{-/-} Embryonen	(Matsuyama et al., 1993)
L-929	Fibroblasten	(Sanford et al., 1948)
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie	ATCC, CRL-1658™
264.7 RAW	murine Monozyten/Makrophagenzelllinie aus BALB/c Mäusen, ursprünglich aus Peritoneum	(Raschke et al., 1978)
293T Zellen	humane primäre embryonale Nierenzelllinie transformiert mit humanem Adenovirus Type 5 DNS	(Graham et al., 1977)
293FT Zellen	293T Zellen zusätzlich mit pCMVSPORT6Tag.neo transformiert	Invitrogen

2.6 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wildtyptiere der Mausstämme C57BL/6 und CD1 verwendet. Alle Mäuse wurden in IVCs (individual ventilated cages, Hersteller: Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland) in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und ggf. bei der Firma Charles River bezogen.

2.7 Primer

Die in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion bezogen.

Für die SSPII RACE PCR wurden folgende Primer verwendet:

SSPII-3' -RACE: CTG CAA GAT GTC TCC CAT CCC TCT GAT

SSPII-5' -RACE: GTT TGT CAT GAC GAC CTG GGT CTG GTA

In Tabelle 2.6 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung von DsRed- und eGFP-Fusionskonstrukten verwendet wurden.

Tabelle 2.6: Oligo-Nukleotide zur Klonierung von DsRed und eGFP Fusionskonstrukten.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
pDsRed-Monomer-(eGFP)N1-mGBP7_for	CAA GCT TTG ATG GCA TCT GGT C	mGBP7-pDsRed-(eGFP) Fusionskonstrukt
pDsRed-Monomer-(eGFP)N1-mGBP7_rev	ATC CTT TGG AGA TTT TCT AAC TTT G	
pDsRed-Monomer-C1-mGBP7_for	CAA GCT TGA TGG CAT CTG GTC C	pDsRed-mGBP7-Fusionskonstrukt
pDsRed-Monomer-C1-mGBP7_rev	ATC CTT TGG AGA TTT TCT AAC TTT G	
pDsRed-Monomer-(eGFP)N1-SSPII_for	CTC GAG ACC ATG TCT CCC ATC	SSPII-pDsRed-(eGFP) Fusionskonstrukt
pDsRed-Monomer-(eGFP)N1-SSPII_rev	GTC GAC TCG TTT TGC TTC TTT AAA G	
pDsRed-Monomer-C1-SSPII_for	CTC GAG ACA TGT CTC CCA TCC	pDsRed-SSPII-Fusionskonstrukt
pDsRed-Monomer-C1-SSPII_rev	GTC GAC TCG TTT TGC TTC TTT AAA G	

In Tabelle 2.7 sind die Primer aufgeführt, die zur Klonierung von GFP-mGBP-7 Fusionskonstrukten zur Erstellung der stabilen Linie mGBP7 verwendet wurden.

Tabelle 2.7: Oligo-Nukleotide zur Klonierung von pWPXL-GFP Fusionskonstrukten.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pWPXL-GFP-mGBP7_for	ATA TCC CGG GAG CAT CTG GTC CCA ACA TGG AG	GFP-mGBP7 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP7_rev	ATA TCA TAT GTT AGA GTT TTC TAA CTT TGT CTG A	GFP-mGBP7 Fusionskonstrukt

In Tabelle 2.8 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung von pDsRed-Monomer-N1-mGBP7 Fusionskonstrukten verwendet wurden, die Mutationen in den GTP-Bindestellen aufweisen. Die Mutationen sind fett hervorgehoben.

Tabelle 2.8: Mutageneseprimer für Klonierung in pDsRed-Monomer-N1 Vektoren.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pDsRed-N1-mGBP7 R48A_fwd	GCC ATT GTA GGA CTA TAC GCA ACG GGA AAA TCC TAC TTG A	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 R48A_rev	T CAA GTA GGA TTT TCC CGT TGC GTA TAG TCC TAC AAT GGC	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 K51A_fwd	GA CTA TACCGT ACG GGA GCA TCC TAC TTG ATG AAG CG	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 K51A_rev	CG CTT CAT CAA GTA GGA TGC TCC CGT ACG GTA TAG TC	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 S52N_fwd	GGA CTA TAC CGT ACG GGA AAA AAC TAC TTG ATG AAC CGC	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 S52N_rev	GCG GTT CAT CAA GTA GTT TTT TCC CGT ACG GTA TAG TCC	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 T75A_fwd	C ACA GTT AGG TCT GAA GCC AAG GGC ATC TGG ATG	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 T75A_rev	CAT CCA GAT GCC CTT GGC TTC AGA CCT AAC TGT G	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 E99A_fwd	GTG CTT CTG GAC ACG GCT GGC TTA GGA GAT GTG	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 E99A_rev	CAC ATC TCC TAA GCC AGC CGT GTC CAG AAG CAC	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 D182R_fwd	CA GAT TTT ATC TGG ACT GTT CGA CGT TTC GTT CTG GAG C	Mutagenese von mGBP7
pDsRed-N1-mGBP7 D182R_rev	G CTC CAG AAC GAA ACG TCG AAC AGT CCA GAT AAA ATC TG	Mutagenese von mGBP7

In Tabelle 2.9 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung des mGBP7 Targetingvektors (TV) und der Sonde, zur Detektion positiver Klone, verwendet wurden.

Tabelle 2.9: Oligo-Nukleotide zur Klonierung des mGBP7 Rekombinationsvektors, sowie die Sonden zur Detektion positiver Klone.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
mGBP7-KA fwd	ATA TGC GGC CGC CCT GAG ATT TGT AGA TTG	TV- mGBP7kurzer Arm
mGBP7-KA rev	ATA TTC TAG AGC CTC CAT GTT GGG A CC AGA TG	
mGBP7-LA fwd	ATA TCT CGA GCC AAT TCG AAG GCC AAG ACC TTG	TV- mGBP7langer Arm
mGBP7-LA rev	ATA TGG TAC CGG ATA TGC TCA TCA TAC CGT G	
5' Sonde fwd	TAA GGT ACT GTT GTC TTT CAC AG	5' Sonde mGBP7
5' Sonde rev	GAT GAT ACA TGG ATA TGA TTC T	

In Tabelle 2.10 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung des SSPII Targetingvektors (TV) und der Sonde, die zur Detektion positiver Klone verwendet wurde, sowie die Primer für die Screening-PCR.

Tabelle 2.10: Oligo-Nukleotide zur Klonierung des SSPII Rekombinationsvektors, sowie die Sonden zur Detektion positiver Klone.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
SSPII-KA fwd	GCG GCC GCC ATC CTT TTG TCT CAG CTC CA	TV- SSPII kurzer Arm
SSPII-KA rev	CTA GTC GTT CTT AGA AGA CTT ATA CGC CAG GT	
SSPII-LA fwd	AAC TCG AGT CTT CTG CCA TCA AGC CAA T	TV-SSPII langer Arm
SSPII-LA rev	AAG GTA CCT GTG GCT CGG TGG TCC T	
5' Sonde fwd	CAA GTG GGA AAA GGC TCT TG	5' Sonde SSPII
5' Sonde rev	CTG GCC CTT CAT ATG CCT AC	
Screening PCR ko/Wt fwd	GAA GCT GAT TAT GGG ATG GA	PCR-Screening positiver Klone
Screening PCR ko rev	GTG TTG GGT CGT TTG TTC G	
Screening PCR Wt rev	CAT ATT TCC ACC CAC CAG AGA	

In Tabelle 2.11 sind die Sequenzen von Primern und Sonden, die für die RT-PCR verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 2.11: Sequenzen von Oligo-Nukleotiden und Sonden für Real-time RT-PCR Analysen.

Primername	Sequenz (5'→3')	Sonde
β-Actin fwd	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	CTCTGGCT
β-Actin rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	
GTP-BP1 fwd	GGT GCA GAG CAA AGA TGA TG	CAGCCTCC
GTP-BP1 rev	ATC TGG AAT ATC GGG CAC AT	
IFN-γ fwd	TCT GGA GGA ACT GGC AAA AG	CAGAGCCA
IFN-γ rev	TTC AAG ACT TCA AAG AGT CTG AGG	
IL-12p40 fwd	ATC CAG CGC AAG AAA GAA AA	GGAGACAG
IL-12p40 rev	CTA CGA GGA ACG CAC CTT TC	
iNOS fwd	CTTTGCCACGGACGAGAC	AGGCAGAG
iNOS rev	TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC	
LRG 47 fwd	AAG GCC ACT AAC ATC GAA TCA	CTCCTCTG
LRG 47 rev	TGC CTT ATC TCA CTT AAT ACT CCT CA	
mGBP1 fwd	CAG ACT CCT GGA AAG GGA CTC	GGCTGAAG
mGBP1 rev	CTT GGA TTC AAA GTA TTT TCT CAG C	
mGBP2 fwd	TGA GTA CCT GGA ACA TTC ACT GAC	AGGAGCTG
mGBP2 rev	AGT CGC GGC TCA TTA AAG C	
mGBP3 fwd	GGC TGA GGA CTG TCC CTG T	CAGAGCCA
mGBP3 rev	CAT GGT CCA CTC GGA AGC	
mGBP4 fwd	GCC AAG ATC AAG ACC CTC AG	ACTGGGAA
mGBP4 rev	CCA CGT AGG TTG TCA CCA GA	
mGBP5 fwd	TCA CTG AAG CTG AAG CAA GG	ACTGGGAA
mGBP5 rev	GCG TCA AAA ACA AAG CAT TTC	
mGBP6/10 fwd	ATA TTT CAA CAT TTT TTG TTC CTT GT	AGTCATGTTCAATCTT CTCCCTCTTGTC
mGBP6/10 rev	TGG AAG ACT TCA CTT GCC TTC AC	
mGBP7 fwd	GCA GAG AAT CCG GTG CAG	TCTGGTCC
mGBP7 rev	TTT CCA CTA GGC ACA CAG GA	
mGBP8 fwd	AAG AAG CTG AAG GAA CAA AAG GC	TGTTTCAGTTGCTGTA TCTCTCCATCCA
mGBP8 rev	GAA ATG GGA GAA AAA ATA AAT GAA GC	

mGBP9 fwd	TTC CAA AAC TTT CTC CAG TCA CAG TA	CCAGCAGTGAGGGCT CTATCTGCCT
mGBP9 rev	GGC ACG CTC CTC TGC AA	
SSPII fwd	GCC ATC AAG CCA ATG ATG TA	ACACTGGA
SSPII rev	GTG GCT TTT TCC ACT TGA GG	

Die Sonden zu mGBP6/10, 8 und 9 wurden von der Firma TIB MolBiol, Berlin, entworfen und synthetisiert. Alle weiteren Sonden sind Teil der Universal Probe Library der Firma Roche, Mannheim und beinhalten LNAs (locked nucleoid acid), so dass kurze Sondensequenzen benutzt werden können. Alle Sonden sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert.

2.8 Plasmidvektoren

2.8.1 Ausgangsvektoren

Tabelle 2.12: Verwendete Ausgangsvektoren.

Name	Eigenschaften	Referenz
pCR II-TOPO	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ α - Fragment	Invitrogen
pEF-Sem	Expressionsvektor, EF1 α -Promotor, Amp ^R , Neo ^R	Labor Pfeffer
pBluescript II KS+	Klonierungsvektor, Amp ^R , Neo ^R	Fermentas
HSV-TK-Kpnl	Vektor mit HSV-Tymidinkinase mit Kpnl-Linkern, pGEM7-Derivat, Amp ^R	Labor Pfeffer
pDsRed2-Mito	Expressionsvektor mit DsRed2 und mitochondrialer Targetingsequenz (Untereinheit VIII von humaner Cytochrom C Oxidase), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pDsRed2-ER	Expressionsvektor mit DsRed2 und ER Targetingsequenz (Calreticulin), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pEGFP-Endo	Expressionsvektor mit EGFP und Endosomenmarker (RhoB), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pECFP-Mem	Expressionsvektor mit ECFP und Targetingsequenz von zellulären Membranen (Neuromodulinfragment), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pAcGFP1-Golgi	Expressionsvektor mit AcGFP1 und Golgi Targetingsequenz (humane beta 1,4-galactosyltransferase), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pDsRed-Monomer-C1	Expressionsvektor für N-terminales DsRed-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pEGFP-C2	Expressionsvektor für N-terminales EGFP-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pWPXL	Ausgangsvektor zur Klonierung von pWPXL-GFP-w/o-STOP, EF1- α -Promotor, Amp ^R	Labor Trono (Pan et al., 2007)
pLP/VSVG	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (envelope), Expression des VSV-G Gens (VSV G Glycoprotein), CMV-Promotor, Amp ^R	Invitrogen
psPAX2	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (Packaging), Expression von Gag, Pol und Env, CMV-Promotor, Amp ^R	Labor Trono

2.8.2 Erstellte Plasmide

Tabelle 2.13: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide.

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
SSP II-His-pEF-Sem	pEF-Sem	SSP II-6xHis	Proteinexpression von SSP II-6xHis
SSP II-DsRed-N1	DsRed-N1	SSP II ORF	für subzelluläre Lokalisation
SSP II-DsRed-C1	DsRed-C1	SSP II ORF	für subzelluläre Lokalisation
SSP II-eGFP-N1	eGFP-N1	SSP II ORF	für subzelluläre Lokalisation
SSP II-TV	pBluescript II KS+	KA-Neo-LA-Neo-TK-	SSP II-Targetingvektor
mGBP7-DsRed-C1	DsRed-C1-Monomer	mGBP7 ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-eGFP-N1	eGFP-N1-Monomer	mGBP7 ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1-R48A	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 R48A ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1-K51A	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 K51A ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1-S52N	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 S52N ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1-T75A	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 T75A ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1-E99A	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 E99A ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP7-DsRed-N1-D182R	DsRed-N1-Monomer	mGBP7 D182R ORF	für subzelluläre Lokalisation
pWPXL-GFP mGBP7	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP7 ORF	Lentivirale Transduktion

2.9 Tierversuche

2.9.1 Superovulation

Um eine größtmögliche Anzahl von Blastozysten zu erhalten, wurde weiblichen Mäusen zur Superovulation 10 U Follikelreifungshormon („pregnant Mare Serum Gonadotropin“, PMSG) und 44 Stunden später 10 U humanes Choriongonadotropin (hCG) intraperitoneal injiziert. Die Ovulation erfolgt etwa 12 Stunden nach hCG Gabe. 12 Stunden nach Verpaarung der superovulierten Weibchen wurde die erfolgreiche Begattung durch Untersuchung auf einen vaginalen Pfropf bestätigt. Dieser Zeitpunkt wird als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung bezeichnet. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 post coitum (p.c.) entnommen.

2.9.2 Generierung chimärer Mäuse

Um chimäre Mäuse aus den homolog rekombinierten ES Zellen zu erhalten, wurden diese in Blastozysten (Tag 3,5) von superovulierten C57BL/6 Spendertieren injiziert. Dafür wurden die ES

Zellen auf einer 5 cm Zellkulturschale mit Mitomycin C (MMC) behandelten EF Zellen ausplattiert, am nächsten Tag das Medium gewechselt und an Tag 3 auf zwei 5 cm Zellkulturschalen ohne EF Zellen umgesetzt. Am vierten Tag wurde wiederum das Medium gewechselt und an Tag 5 wurden die rekombinierten ES Zellen in die Blastozysten injiziert. 10 - 20 dieser Blastozysten wurden anschließend in den Uterus einer scheinchwangeren CD1 Ammenmutter transferiert (durchgeführt von Nicole Krafzik). Etwa sieben Tage nach der Geburt konnten anhand der Fellfarbe chimäre Mäuse identifiziert werden.

2.9.3 Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (ATCC 43251) wurden über Nacht in 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium kultiviert und für die Infektion auf eine OD₆₀₀ von 0,7 eingestellt. Für die Expressionsexperimente wurden C57BL/6 Mäuse intraperitoneal mit 0,1 x LD₅₀ in einem Volumen von 0,35 ml infiziert.

2.9.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen aus Mäusen wurden diese durch cervicale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe steril entnommen und das Knochenmark mit Medium gespült. Zur RNS- bzw. Protein-Extraktion wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen und Fibroblasten

Zellkultur von ES/EF Zellen

Embryonale Stammzellen (E14.1) wurden auf mit Mitomycin C (10 µg/ml) vorbehandelten EF Zellen (2 h, 37°C) ko-kultiviert. Um das Ausdifferenzieren zu verhindern, wurde den ES Zellkulturen LIF-Überstand in das Medium zugegeben (1000 U/ml Endkonzentration). Undifferenzierte ES Zellen erscheinen im Phasenkontrast-Mikroskop als runde bis ovale Kolonien mit einem glatten, doppelbrechenden Rand. Ausdifferenzierte Kolonien sind grau, matt und bilden Pseudopodien aus.

Elektroporation von ES Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit dem Rekombinationsvektor SSPII transfiziert. Dafür wurden ES Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen mit EF Zellen expandiert. Für die Elektroporation wurden 5 x 10⁷ Zellen in 7 ml ES Medium aufgenommen und mit 200 µg linearisiertem Rekombinationsvektor in 1 ml PBS gemischt. Pro Ansatz wurden je 800 µl in Elektroporationsküvetten überführt und bei 300 V/250 µF elektroporiert. Elektroporierte Zellen wurden anschließend 10 min auf Eis abgekühlt und je Ansatz auf zwei 10 cm Kulturschalen mit EF Zellen verteilt.

Selektion rekombinanter ES Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES Zellen einem zweifachen Selektionsdruck mit Geneticin (G418) und Gancyclovir unterzogen, um homolog rekombinierte ES Zellklone anzureichern. Nach der Transfektion wurden die Zellen für zwei Tage ohne Selektion kultiviert. Am Tag 2 wurde zur Positivselektion dem Medium Geneticin (G418) (200 µg/ml) zugegeben und an Tag 4 zur Negativselektion zusätzlich 2 mg/ml Gancyclovir. Anschließend wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt, bis ES Zellkolonien gewachsen waren (Tag 11). Die Kolonien wurden mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS überschichtet. Mit einer sterilen Pipette wurden die Einzelkolonien in 20 µl PBS aufgenommen und in eine 96-well Rundboden Platte überführt. Der Zellverband der Kolonien wurde durch Trypsin/EDTA Behandlung aufgelöst und mit EF Zellen ko-kultiviert. Nach 2 Tagen wurde ein Teil der Zellen (2/3) auf eine 48-well Platte mit EF Zellen gesplittet und die restlichen Zellen in der 96-well Platte belassen. Die ES Zellen in der 48-well Platte wurden nach zwei Tagen eingefroren und die Zellen in der 96-well Platte auf zwei 96-well Flachbodenplatten ohne EF Zellen gesplittet. Die ES Zellen in den 96-well Platten wurden wachsen gelassen, bis sie eine dichte Zellschicht gebildet hatten. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren oder die Zellen direkt lysiert.

Einfrieren von ES Zellen

Die Zellen wurden vor dem Einfrieren mit Trypsin/EDTA vereinzelt und die Reaktion mit Medium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension 1:1 mit Einfriermedium (80 % FKS, 20 % DMSO) gemischt, für 30 min bei -20°C inkubiert und dann ü/N bei -80°C gelagert. Die Zellen konnten so bis zu 6 Wochen aufbewahrt werden. Zur längeren Konservierung der ES Zellen wurden diese zu größeren Zellzahlen expandiert und anschließend in Einfriermedium in Cryotubes in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.10.2 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken (Lamina AIR Flow) mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 8 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. ANA-1 und 264.7 RAW Makrophagen wurden mit komplettem Medium unter Verwendung von Plastikpipetten von der Kulturschale abgespült und dann verdünnt umgesetzt. NIH 3T3, 293T und 293FT Zellen wurden alle zwei Tage mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in Medium verdünnt auf neue Platten ausplattiert. HS27 Zellen zur Kultivierung von Toxoplasmen wurden in T75 Flaschen (Nunc) bis Passage 40 passagiert. Von konfluent bewachsenen Flaschen wurde einmal wöchentlich das Medium gewechselt. Dicht bewachsene T75 Flaschen wurden gesplittet indem die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert wurden. Vereinzelte Zellen wurden in Medium 1:6 in T25 Flaschen umgesetzt.

2.10.3 Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM)

Knochenmarkszellen wurden aus dem Femur der Maus herausgespült. Mit einer Plastikpipette wurde durch Resuspendieren eine Einzelzellsuspension erzeugt, die Zellzahl bestimmt und zu 2×10^6 Zellen auf bakteriologische Petrischalen mit BMDM Kulturmedium (s. Tab. 2.1) kultiviert. Alle drei Tage wurde ein Teil des Mediums abgenommen und frisches Medium zugegeben. Nach acht bis zehn Tagen Kultur waren die Zellen zu Makrophagen ausgereift und konnten geerntet, neu ausgesät (5×10^6) und stimuliert werden.

2.10.4 Transfektion von 293T Zellen mittels Kalzium-Phosphat

Zur transienten Transfektion von Zellen (293T) wurden am Vortag 1×10^6 Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Nach 16 h wurden in einem sterilen Röhrchen (Falcon) $16 \mu\text{g}$ Expressionsvektor und $80 \mu\text{l}$ CaCl_2 gemischt und mit ddH_2O auf $400 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Unter kontinuierlichem Mischen wurden tropfenweise $400 \mu\text{l}$ $2 \times$ BBS zugegeben, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. 16 h später wurde das Medium gewechselt. Der Erfolg der Transfektion konnte nach weiteren 24 h am Fluoreszenzmikroskop oder per Western Blot analysiert werden.

2.10.5 Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation

Die transiente Transfektion der 264.7 RAW Makrophagen erfolgte durch Elektroporation. Dafür wurden die Zellen einen Tag vor der Elektroporation passagiert. Am Tag der Elektroporation wurden $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in $400 \mu\text{l}$ EP-Medium (RPMI Medium mit 40 % FKS) aufgenommen und pro Elektroporationsansatz $20 \mu\text{g}$ Plasmid-DNS zur Zellsuspension pipettiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und bei $280 \text{ V}/975 \mu\text{F}$ elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 15 min bei RT inkubiert und anschließend in Röhrchen mit 10 ml Medium gegeben. Nach 5 min Zentrifugation bei 1200 UpM wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und ü/N im Brutschrank inkubiert.

2.10.6 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien

Um stabile Zelllinien zu generieren, wurden diese mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems transduziert.

Generierung von Virusüberstand

5×10^6 293FT Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Zur Transfektion wurden $5 \mu\text{g}$ pLP/VSVG, $10 \mu\text{g}$ psPAX2 und $20 \mu\text{g}$ Expressionsvektor mit $125 \mu\text{l}$ $0,5 \text{ M}$ CaCl_2 gemischt und mit $0,05 \text{ M}$ HEPES auf $250 \mu\text{l}$ aufgefüllt. In sterile Röhrchen wurden $250 \mu\text{l}$ $2 \times$ HEBS vorgelegt und die DNS unter Vortexen tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde für 30 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium der 293FT Zellen durch FKS-freies Medium ersetzt und anschließend die DNS auf die Zellen getropft. Nach 6 h erfolgte

ein Mediumwechsel mit 6 ml FKS-haltigem Medium. Nach 48 h wurde der Virusüberstand von den Zellen abgenommen, für 10 min bei 2000 UpM zentrifugiert und der Überstand mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert. Der Virusüberstand wurde anschließend in Cryotubes aliquotiert, kurz in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lentivirale Transduktion von Zielzellen (NIH 3T3, 264.7 RAW Makrophagen)

Einen Tag vor der Transduktion wurden 3 x 10⁴ Zellen auf 24-well Platten ausplattiert. 1 ml Virusüberstand wurden mit 25 µg Polybrene zur Transduktion der jeweiligen Zelllinie versetzt und auf die Zellen gegeben. Diese wurden für 30 min im Brutschrank inkubiert und dann für 2 h bei 1200 UpM und 32°C zentrifugiert. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurde der Virusüberstand durch 1 ml Medium ersetzt. Die transduzierten Zellen wurden alle 2 Tage bis zur 10 cm Kulturschale auf eine größere Zellkulturplatte umgesetzt. Der Erfolg der Transduktion wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

2.10.7 Stimulation von Zellen

Die Stimulation der verschiedenen primären Zellen und Zelllinien erfolgte in den in Abschnitt 2.3.2 angegebenen Nährmedien, wobei die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte eine ca. 75 %ige Konfluenz erreicht hatten. Folgende Zytokine und Chemikalien wurden zur Stimulation eingesetzt: IFN γ (10 ng/ml), IFN β (10 ng/ml), TNF (10 ng/ml), IFN γ /TNF, CpG 1668 (1 µM), CpG 1720 (1 µM) als Kontrolle, LPS (100 ng/ml), Listeria LTA (1 µg/ml), IL-2 (10 ng/ml) als Negativkontrolle, IL-1 β (10 ng/ml), poly (I:C) (50 µg/ml). Die Stimulation der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe der entsprechenden Substanzmenge zum Nährmedium.

2.10.8 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Färbung intrazellulärer Toxoplasmen wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewendet. Dafür wurden auf Glasplättchen ausgesäte und mit Toxoplasmen infizierte Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit 4 % PFA/PBS im Dunkeln auf einem Schüttler fixiert. Danach wurden die Zellen für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 0,05 % Saponin/PBS bei RT für 15 min abgedunkelt permeabilisiert und anschließend mit 0,005 % Saponin/PBS + 2 % Ziegen Serum 20 min bei RT abgedunkelt geblockt. Der Primärantikörper wurde in 0,0005 % Saponin/PBS + 0,2 % Ziegen Serum verdünnt. Die Zellen wurden dann mit dem verdünnten Antikörper für 1 h bei RT abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal 5 min mit 0,0005 % Saponin/PBS gewaschen und mit Sekundärantikörper verdünnt in 0,0005 % Saponin/PBS + 0,2 % Ziegen Serum für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden die Zellkerne in DAPI Lösung (1:2500 in PBS verdünnt) 3 min bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit Fluoromount-G auf Objektträger fixiert und bei 4° C gelagert.

2.10.9 *In vitro* Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Transfizierte Zellen (3×10^4) wurden auf Glasplättchen in 24-well Platten ausgesät und im Brutschrank ü/N inkubiert. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mit IFN γ (100 U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. 16 h später wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 (Zellen:Bakterien) mit eGFP-transfizierten *L. monocytogenes* für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 min im Dunkeln mit 4 % PFA/PBS Lösung fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Zellkerne wurden mit einer 1:2500 in PBS verdünnten DAPI Lösung für 3 min angefärbt und erneut zweimal gewaschen. Die Glasplättchen wurden schließlich auf Objektträger geklebt und mikroskopiert.

2.10.10 Kultivierung von avirulenten Toxoplasmen (ME49)

Zur Vermehrung avirulenten ME49 Toxoplasmen (Parmley et al., 1994) wurden die Parasiten in T25 Zellkulturflaschen, einschichtig bewachsen mit HS27 Fibroblasten, kultiviert. Nach Vermehrung der Toxoplasmen wurde der Überstand abgenommen, bei 50 x g und 22°C 5 min zentrifugiert und der Überstand mit den Zellresten abgesaugt. Bei einer weiteren Zentrifugation des Überstandes mit 600 x g für 15 min bei 22°C wurden die Parasiten pelletiert. Diese wurden anschließend in frischem IMDM-Zellmedium resuspendiert. Für die weitere Passage wurden $0,5-1,5 \times 10^6$ Parasiten in eine T25 Zellkulturflasche mit HS27 Fibroblasten gegeben.

2.10.11 *In vitro* Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Es wurden 3×10^4 Zellen (mGBP7 bzw. SSPII transfiziert oder mGBP7 stabil überexprimierend) auf Glasplättchen in 24-well Platten ausgesät und im Brutschrank ü/N inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen im Verhältnis 1:50 (Zellen:Parasiten) mit *T. gondii* (Stamm ME49) für 2 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 min im Dunkeln mit 4 % PFA/PBS Lösung fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die intrazellulären Parasiten wurden mittels Immunfluoreszenztechnik angefärbt (s. Abschnitt 2.10.8).

2.11 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.11.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Plasmid-DNS Isolierung erfolgte mit Hilfe eines Kits von Macherey-Nagel. Je nach benötigter DNS-Menge wurden Mini- oder Maxi-Säulen verwendet. Um bei einer Transfektion von Zelllinien eine Kontamination mit Endotoxinen zu verhindern wurde das Endofree Maxi Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11.2 Isolierung von chromosomaler DNS aus 96-well Platten

Zur genomischen Southern Blot Analyse wurde aus selektierten ES Zellklonen die chromosomale DNS isoliert. Dafür wurden pro well 20 µl ES Zell Lysepuffer mit 0,4 mg/ml Proteinase K zu den Zellen geben und die Platte über Nacht bei 56°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kondensat kurz abzentrifugiert und zur Abkühlung 1 h bei RT inkubiert. Zum Fällen der DNS wurden pro well 100 µl 100 % Ethanol zupipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNS 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend trocknen gelassen und für genomische Southern Blot Analyse verdaut.

2.11.3 Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen oder Schwanzbiopsien

5 x 10⁷ Zellen oder eine Schwanzspitze wurden in Verdauungslösung (500 µl TNE; 50 µl 10 % SDS; 7,5 µl Proteinase K 10 mg/ml; 25 µl Pronase E 10 mg/ml) aufgenommen und zunächst 1 h bei 37°C und anschließend ü/N bei 56°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde für 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert und die wässrige Phase mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben. Mit 950 µl Ethanol absolut (-20°C) wurde die DNS gefällt und der DNS-Faden ausgespinnelt, in 70 % Ethanol (-20°C) gewaschen und in 100-500 µl TE gelöst.

2.11.4 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNS-Fragmenten verwendet. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus des Molekulargewichtes invers proportional ist. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid im Gel fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht. Das Muster kann photographisch festgehalten und analysiert werden.

0,8-2 % (w/v) Agarose wurden in TAE Puffer aufgeköcht bis eine klare homogene Lösung entstand. Nach Abkühlung der Agarose wurde Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugeben und in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämmen gegeben. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE Puffer überschichtet. Die 1:5 mit Auftragspuffer vermischten DNS-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese je nach Gelgröße bei 80-150 Volt durchgeführt. Das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoreszierte bei UV-Bestrahlung (Transilluminator, 280 nm) und das Bandenmuster konnte photographisch dokumentiert werden.

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurde die Gelelektrophorese wie oben beschrieben durchgeführt, die gewünschten Banden im Gel jedoch unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Die DNS wurde schließlich aus dem Gelstück mittels eines Gel Extraction Kits (Roche) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Bestimmung von Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle bestimmt werden und deren Konzentration abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 1 Kb-Leiter von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) oder der MassRuler™ der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) verwendet.

2.11.5 Restriktionsverdau von DNS

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen beider Stränge entstehen DNS-Moleküle mit definierten Enden, die für Klonierungen verwendet werden können. Die durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente wurden auch als Sonden eingesetzt, um spezifische Sequenzen durch Hybridisierung zu identifizieren. Für den Verdau von DNS wurden 2-5 Einheiten Enzym pro µg Plasmid-DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro µg genomischer DNS eingesetzt.

allgemeiner Ansatz:	DNS-Lösung	x µl
	10 x Reaktionspuffer	2 µl
	Enzym	2-5 Einheiten/µg DNS
	H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl

Die Menge des eingesetzten Enzyms sollte 10 % des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da zu hohe Glyzerinmengen die Reaktion beeinträchtigen können.

2.11.6 Dephosphorylierung von DNS

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden und um eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment zu begünstigen, wurden die 5'-Enden des Vektors mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau des Vektors wurde dem Ansatz eine Einheit Alkalische Phosphatase zugegeben und dieser bei 37°C eine Stunde inkubiert. Um bei der anschließenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden, wurde das Enzym für 10 min bei 65°C inaktiviert.

2.11.7 Ligation von DNS-Molekülen

T4-Ligase

Die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNS-Moleküle. Sie kann sowohl überstehende Enden als auch glatte Enden miteinander verknüpfen. Hierfür wurden Vektor und DNS-Insert im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und 2 µl 10-fach Inkubationspuffer und 1 Einheit T4-DNS-Ligase hinzugefügt und mit A. bidest. ad 20µl aufgefüllt. Inkubiert wurde bei RT ü/N.

TOPO TA Cloning® Kit

Bei Klonierungen von PCR-Produkten in den Vektor pCR II-TOPO (Abschnitt 2.1.5) wird die Eigenschaft thermostabiler DNS-Polymerasen, an alle doppelsträngigen DNS-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenutzt. PCR-Produkte können so direkt in den Vektor kloniert werden, da sie die kompatiblen Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzen. Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11.8 Transformation von *E. coli* Bakterien

CaCl₂ behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden. Hierfür wurden die Bakterienstämme DH5α oder Top10 (Invitrogen) verwendet. 100 µl der kompetenten Bakterien (Lagerung bei -80°C) wurden kurz auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz bzw. etwa 100 ng zirkuläre doppelsträngige DNS zupipettiert. Anschließend wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 sek. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium wurde für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert um die Expression der plasmidkodierte Antibiotikumresistenz zu ermöglichen. Der Gesamtansatz wurde auf Agarplatten ausplattiert und ü/N bei 37°C unter Selektionsdruck wachsen gelassen.

2.11.9 Southern Blot Analyse

Diese Methode kann zum Nachweis spezieller DNS-Fragmente unter einer großen Anzahl elektrophoretisch aufgetrennter DNS-Moleküle dienen (Southern, 1975). Durch DNS/DNS Hybridisierung mit einer komplementären Sonde können die gesuchten DNS-Sequenzen markiert und anschließend detektiert werden.

Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen

Nach dem Restriktionsverdau der DNS werden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlung werden die Fragmente denaturiert. Mittels eines Kapillarblots werden sie auf eine Nylonmembran transferiert, so dass ein Abbild des Fragmentmusters des Agarosegels auf der Membran entsteht. Nach dem Restriktionsverdau wurden 20 µg genomische DNS in einem 0,8 % Agarosegel mit 0,2

$\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (30V/ü/N) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur partiellen Depurinierung 15 min in 0,25 N HCl geschwenkt und zur Denaturierung und Spaltung an den depurinierten Stellen 30 min in 0,4 N NaOH.

Aufbau des Kapillarblots:

- ca. 10 cm Zellstoffpapier
- 2 Lagen mit 0,4 N NaOH Blotlösung befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier
- Nylonmembran
- Gel luftblasenfrei auf die Membran legen
- 2 Lagen mit 0,4 N NaOH Blotlösung befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier
- ein mit Blotlösung befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier (Transfer-Whatman), das auf dem Gel liegt und bis in eine mit Blotlösung gefüllte Wanne reicht
- Glasplatte mit Gewicht

Der Kapillarblot wird mit etwa 0,5 kg beschwert und ü/N bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung durch das Zellstoffpapier gesaugt und die DNS-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und anschließend die DNS durch UV-Bestrahlung kreuzvernetzt und somit auf der Membran fixiert.

Radioaktive Markierung der Sonde

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wird das Klenow-Fragment verwendet, welches an einzelsträngiger DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten Nukleotiden zu unmarkierten Nukleotiden wird die neusynthetisierte DNS markiert. Zur Markierung der Sonden wurde das „readiprime“-Kit (Amersham) nach Herstellerangaben verwendet, mit dem bis zu 25 ng DNS unter Verwendung von 1 MBq ^{32}P -dCTP markiert werden können. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden anschließend mit Microspin S-200 Säulchen (Amersham) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/DNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären nachzuweisenden chromosomalen DNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybrid-Moleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde die Membran mind. 1 h bei 60°C in 10 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyb, BD) prähybridisiert und dann die markierte, hitzedenaturierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 60°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min bei RT mit Lösung I und einmal 15 min bei 50°C mit Lösung II gewaschen. Spezifisch gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe von Kodak Biomax MS Film detektiert.

2.11.10 Isolierung gesamtzellulärer RNS

Zur Isolierung von RNS wurde das TRIzol Reagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidiniumthiocyanat Methode. Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11.11 Northernblot-Analyse

Analog zur Southernblot-Analyse handelt es sich bei der Northernblot-Analyse um eine Methode zum Nachweis von RNS-Molekülen einer Probe (Alwine et al., 1977). Dabei wird gesamtzelluläre RNS in einem denaturierenden Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet und fixiert. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde kann die mRNA der Probe anhand der Größe und Stärke der Bande qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Die Elektrophorese der RNS erfolgte in einem denaturierenden Agarosegel, um die Hybridisierung von RNS-Molekülen und die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Bei der gebräuchlichsten Methode, die RNS einzelsträngig zu halten, läßt man die freien Amine der Purin- bzw. Pyrimidinbasen mit Formaldehyd reagieren. Die resultierende Schiff'sche Base kann keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen ausbilden (Lehrach et al., 1977).

Durchführung:

- in einer gebackenen 500 ml Schraubdeckelflasche 2,5 g Agarose und 180 ml DEPC-H₂O aufkochen, bis eine klare Lösung entsteht
- auf ca. 50°C abkühlen lassen
- unter Schwenken 45 ml Formaldehyd (37 %) und 25 ml 10 x MOPS zugeben
- Gel gießen und erstarren lassen
- erstarrtes Gel in Elektrophorese Apparatur einsetzen und mit Laufpuffer überschichten
- pro Spur 20 µg RNS in 10µl DEPC-H₂O 1:1 mit RNS-Auftragspuffer versetzen
- 10 min bei 70°C denaturieren und auf das Gel auftragen
- Auftrennung bei konstanten 20 V ÜN

Anschließend wurde das Gel dann 2 mal 5 min in H₂O geschwenkt. Unter Verwendung von 10 x SSC als Transferlösung und einer positiven Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) wurde dann wie unter „alkalischer DNS-Transfer“ der Kapillarblot aufgebaut und ausgeführt. Nach dem ü/N Transfer wurde dann die Membran kurz in 2 x SSC geschwenkt, dann auf Whatmanpapier getrocknet und unter UV-Bestrahlung kreuzvernetzt.

Die Markierung der DNS-Sonde, die DNS/RNS Hybridisierung und die Detektion der Banden mit einem Phosphoimager (FujiFilm) wurden, wie unter der Southernblot-Analyse beschrieben, durchgeführt.

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

1. DNS Denaturierung	95°C	5 min
2. DNS Denaturierung	95°C	1 min
3. Primerhybridisierung	55-65°C	30 sec
4. Primerverlängerung	72°C	1 min/Kb des Produktes
5. Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	unendlich

Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch 30-mal wiederholt.

2.11.14 SMART-RACE-PCR

Die RACE PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) dient der Identifizierung von cDNA Enden bei Transkripten, bei denen nur Teile der Sequenz bekannt sind. Zur Identifizierung der Vollängen-Sequenz der SSPII mRNS wurde die SMART-RACE-PCR (*switching mechanism at 5' end of RNA transcript*) von BD Bioscience mit dem „BD SMART RACE cDNA Amplification Kit“ durchgeführt. Bei der SMART-RACE-PCR von BD wird bei der Synthese der 5` bzw. 3` cDNS an die jeweiligen Enden sog. universelle oligo bzw. Ankersequenzen angehängt. Diese dienen bei der nachfolgenden RACE-PCR den universellen Kit Primern als Anlagerungsstelle neben den genspezifischen internen Primern für SSPII. Die cDNS-Synthese wurde in zwei parallelen Ansätzen für jeweils 5` bzw. 3` cDNS nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RACE-PCR wurde darauffolgend mit den entsprechenden SSPII Primern sowie den universellen Kit Primern in zwei parallelen Ansätzen (5` bzw. 3` RACE-PCR) nach Herstellerangabe durchgeführt. Danach konnten die PCR-Produkte kloniert und sequenziert werden.

2.11.15 Real-time PCR

Die Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während eines jeden PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, indem eine spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde, bei der die Fluorophore zuvor gequencht vorliegen, während der Polymerisierung abgebaut wird und die Fluorophore freigesetzt werden.

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

Reaktionsansatz:	5 µl	1:5 verdünnte cDNS
	0,3 µl	Primer 1
	0,3 µl	Primer 2
	12,5 µl	qPCR Mastermix-No ROX (Eurogentec)
	6,4 µl	H ₂ O _{bidest}
	0,5 µl	Sonde

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

1. DNS Denaturierung	95°C	7 min
2. DNS Denaturierung	94°C	20 sec
3. Primerhybridisierung und -verlängerung	60°C	1 min
4. Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	unendlich

Die Schritte 2 bis 3 wurden zyklisch 40-mal wiederholt. Unmittelbar nach jedem 3. Schritt wurde die Fluoreszenz gemessen. Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme konnte in CT Werten dargestellt und die verschiedenen cDNS Proben und Gene verglichen werden.

2.11.16 Mutagenese-PCR

Zur Insertion einzelner Mutationen in eine DNS wurde der QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

Reaktionsansatz:	5-10 ng	dsDNS Template
	125 ng	Primer 1
	125 ng	Primer 2
	5 µl	10 x Puffer
	1 µl	dNTP
	1 µl	Pfu Polymerase (2,5 U/µl)
	ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

1. DNS Denaturierung	95°C	30 sec
2. DNS Denaturierung	95°C	30 sek
3. Primerhybridisierung	55°C	1 min
4. Primerverlängerung	68°C	1 min/Kb der Plasmidlänge
5. Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	unendlich

Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch 12-18 Mal in Abhängigkeit von der eingefügten Mutation wiederholt. Für eine Punktmutation werden 12 Zyklen, für einen einzelnen Aminosäureaustausch 16 Zyklen und für eine Insertion oder Deletion mehrerer Aminosäuren 18 Zyklen vom Hersteller angegeben. Nach der Amplifikation wurden die Produkte für 1 h bei 37°C mit DpnI verdaut, um die methylierten, nicht-mutierten Templates zu fragmentieren. Anschließend wurde 1 µl der DNS zu den kompetenten XL1-Blue Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock (45 sek., 42°C) und 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt und 250 µl auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausplattiert.

2.12 Protein-biochemische Methoden

2.12.1 Extraktion von Proteinen aus Organen

Zur Proteinextraktion wurden Organe von infizierten und uninfizierten Kontrollmäusen in 2 ml PBS mit Proteaseinhibitor mit dem Ultra-TURRAX® homogenisiert. Durch Zugabe von 1 % Triton X-100 wurden die Organe für 15 min bei 4°C auf dem Drehrad lysiert. Zellreste wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 4500 UpM abzentrifugiert und der Überstand anschließend in ein neues Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13000 UpM) und Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß wurde das Lysat bis zur weiteren Verwendung (Western Blot) bei -80°C gelagert.

2.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet. Lysate wurden hierfür in mehreren Verdünnungsstufen (1:3) neben einer BSA-Verdünnungsreihe (2 mg/ml Ausgangskonzentration) als Standard auf eine 96-well Flachbodenplatte ausplattiert. Durch Zugabe von 200 µl Reagenz A+B (50:1) und Inkubation von 20 min bei 37°C konnte anschließend im ELISA-Reader (562 nm) die Konzentration der Proteine in den Lysaten gemessen werden. Für Western Blot Analysen wurden 35 µg Protein eingesetzt.

2.12.3 Western Blot Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurden verschiedene Proteine in Zelllysaten durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden 1×10^6 - 1×10^7 Zellen mit 50 µl - 500 µl Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 13000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Zum Überstand wurde je nach Lysatvolumen 5 x Auftragspuffer gegeben. Die Lysate mit Auftragspuffer wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gradienten Gel (4% - 12%) bzw. bei kleinen Proteinen (SSPII) 16% Tricin SDS Gel 10min bei 95°C aufgeköcht. Der Gellauf erfolgte in Laufpuffer (entweder Tricin-Laufpuffer für Tricin-Gele oder Glyzin-Laufpuffer nach Lämmli für die mit dem NuPAGE® Electrophorese System von Invitrogen nach Protokollangaben des Herstellers bei 150-200 V. Im Anschluss wurde das Gel auf eine Nylonmembran für Proteingele mit Transferpuffer mit 20 % Methanol in demselben NuPAGE® Electrophorese System geblottet. Der Aufbau des Blots erfolgte nach Herstellerprotokoll. Zur Detektion der geblotteten Proteine wurde die Membran zuerst mit 5 % Milchpulver, gelöst in TBS-T, für 1 h bei RT geblockt um eine unspezifische Proteinbindung des Antikörpers zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in 3 % Milchpulverlösung nach Angaben des Antikörperherstellers verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper abzuwaschen wurde der Blot bei RT für 15 min bei mehrmaligem Wechsel des Waschpuffers (TBS-T) gewaschen. Der Meerrettich Peroxidase

gekoppelte Sekundär-Antikörper wurde ebenfalls in 3 % Milchpulver gelöst und für 2 h mit der Membran inkubiert und im Anschluss mehrmals insgesamt 30 min gewaschen. In der Dunkelkammer erfolgte die Proteindetektion mit Chemolumineszenzlösung (ECL, Amersham, Braunschweig) mit anschließender Exposition und Entwicklung des durch Chemolumineszenz belichteten Films.

2.12.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um die sehr geringe Menge an endogenem SSPII-Protein aus einem Organlysat anzureichern und nach darauffolgender Westernblotanalyse nachzuweisen. Hierfür wurden Organlysate hergestellt und 10 µl aufgereinigter polyklonaler SSPII Antikörper dazugegeben. Nach einer dreistündigen bis über Nacht Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad wurden 50 µl Protein G Sepharose hinzupipettiert und zwei weitere Stunden bei 4°C auf dem Drehrad belassen. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2 % NP40) wurde das Pellet vollständig trocken gesaugt und mit 40 µl 5 x Auftragspuffer versehen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht, anschließend für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand erneut in ein frisches Gefäß überführt. Es wurde je 20 µl Probe auf ein Tricin SDS-Gel (16 %) aufgetragen und wie unter 2.12.3 beschrieben ein Western Blot durchgeführt. Zum Proteinnachweis wurde mit polyklonalem SSPII Antikörper aus dem Kaninchen mit darauffolgender Inkubation mit HRP gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt.

2.13 Computerprogramme

2.13.1 Klonierungsstrategien

Strategien zum Klonieren von Expressions- und Rekombinationsvektor wurden mit Hilfe des Programms Gene Construction Kit2 von TEXTCO Company New Hampshire, U.S.A erstellt.

2.13.2 Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm SeqMen von DNASTar durchgeführt.

2.13.3 Real-time PCR

Für die Auswertung der Real-time PCR Daten wurden die CT Werte mit Hilfe der iQ5 Software von der Firma Biorad ermittelt. Die $\Delta\Delta CT$ Methode (Pfaffl, 2001) wurde zur Ermittlung der Expressionszunahme der einzelnen Gene zugrunde gelegt.

Für die statistische Auswertung und die Darstellung der Real-time Daten wurde das Programm GraphPad Prism 4 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 mGBP7

3.1.1 Einführung

In vorangegangenen Microarray Transkriptomanalysen (Degrandi, 2007), bei denen Ana-1 Makrophagen mit IFN γ oder TNF sowie IFN γ in Kombination mit TNF stimuliert wurden, konnte eine Genfamilie als hochgradig IFN γ reguliert identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die sogenannten murinen 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine (GBPs). Im Rahmen der Transkriptomanalyse wurden drei neue Mitglieder dieser Familie identifiziert, mGBP6, mGBP7 und mGBP8 (Degrandi et al., 2007). Weitere Familienmitglieder, mGBP9 und 10, konnten zusätzlich durch *in silico* Analysen identifiziert werden (Kresse et al., 2008). In diesem Kontext wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die gesamte 65 kDa GBP-Genfamilie auf mRNA Expressionsebene charakterisiert. Dafür wurden für alle Familienmitglieder spezifische Real-time PCR Primer- und Sonden- Kombinationen etabliert und die Expression dieser Gene in Makrophagen und nach Listerien-Infektion *in vivo* analysiert. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Charakterisierung des neuen, noch unbeschriebenen Proteins mGBP7 auf Expressionsebene *in vivo* nach Listerien- und Toxoplasmen-Infektion durchgeführt sowie *in vitro* die subzelluläre Lokalisation des Proteins analysiert. Abschließend wurde eine Targetingstrategie zur Deletion des Genlokus *mgbp7* erstellt und der Rekombinationsvektor kloniert.

3.1.2 Etablierung der Real-time PCR für die Genfamilie der murinen 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine

Um ein umfangreiches Expressionsprofil der gesamten Familie der murinen Guanylat-bindenden Proteine zu erstellen, sollten spezifische Real-time PCR Sonden und Primer für jedes Mitglied (mGBP1-10) etabliert werden. Die Amplifikate sollten, wenn möglich, Intron-überspannend sein, damit die Amplifikation und Detektion von genomischer DNS verhindert wird. Des Weiteren ist es für die Verwendung eines großen Probenumfangs und der gleichzeitigen Durchführung der Real-time PCR für ein geeignetes Housekeeping Gen hilfreich, wenn die Primer und Sonden aller PCRs bei gleicher Annealingtemperatur und somit parallel durchgeführt werden können. Daher wurde zunächst überprüft, ob die einzelnen mGBPs mit Hilfe von Sonden der sogenannten Universal Probe Library gemessen werden können. Diese Sonden basieren auf der Taqman Technologie (Sonden mit Fluorophor und Quencher), sind aber nur 8-9 Nukleotide lang (klassische Taqman-Sonden 25-30 nt). Durch Einbau von stabilen DNS Analoga, den sog. LNAs (Locked Nucleic Acids), sind diese Sonden jedoch so thermostabil wie klassische Taqman-Sonden. Diese bei uns im Labor vorhandenen Sonden sollten mit spezifischen Primern für die Real-time Analysen der mGBPs eingesetzt werden. Dafür wurden mit Hilfe des Programms Universal Probe Finder (<https://qpcr1.probefinder.com/roche2.html>) und Eingabe der Accession Nummer der

jeweiligen mRNA oder den vorher identifizierten mGBP Sequenzen, Intron-umspannende Primer und Sonden ausgesucht. Diese Primer Sequenzen wurden dann auf ihre Spezifität für das einzelne mGBP Gen untersucht, indem die Sequenzen mit den cDNS-Sequenzen der anderen Familienmitglieder verglichen wurden (MegAlign, DNASTar, ClustalW Methode). Dabei konnten für die Gene mGBP1 bis mGBP5 und mGBP7 spezifische Primer und Sonden gefunden werden. Für die hoch homologen Sequenzen mGBP6, 9 und 10 wurden in Zusammenarbeit mit der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) klassische Taqman Sonden und Primer entwickelt. Auch für mGBP8 wurden herkömmliche Sonden von TIB MOLBIOL entwickelt, da die Sequenz stark homolog zu mGBP4 ist. Die Real-time PCR für mGBP4 hingegen konnte mittels Primer- und Sonden-Kombination der Universal Probe Library durchgeführt werden, da der forward Primer im Exon 5 liegt und die Sonde sowie der reverse Primer im Exon 6. Ein homologes Exon 6 ist in der Sequenz von mGBP8 nicht vorhanden (Kresse et al., 2008).

Die Real-time Sonden und Primer der hochhomologen Gene wurden dann mit Hilfe der klonierten Sequenzen gegeneinander getestet, indem Primer und Sonden von der einen GTPase mit dem cDNS Template der anderen GTPasen amplifiziert und detektiert wurden. Als Beispiel ist in Abbildung 3.1 die Test-PCR gezeigt, bei der die Sonden- und Primer-Kombination von mGBP9 unter Einsatz von mGBP9 cDNS als Template (CP-Werte: 9,91 und 9,71) sowie in gleicher Menge eingesetzt das cDNS Template von mGBP6 (CP-Werte: 36 und 37) durchgeführt wurden; der Unterschied liegt somit bei 26 PCR Zyklen. Umgekehrt wurde mit der Real-time PCR für mGBP6 und Einsatz von mGBP6 cDNS und mGBP9 cDNS Template ein Unterschied der Zyklenzahl von 24 ermittelt.

Auf dieses Beispiel bezogen müssten, bei der Annahme, dass sich die Anzahl der Produkte nach jedem Zyklus verdoppelt, rund 10^7 - 10^8 mehr Kopien von mGBP9 in der Probe vorhanden sein, um einen ähnlichen CP-Wert wie für mGBP6 zu erhalten. Dabei ist die Konkurrenz um Primer und Sonden durch das bevorzugte Produkt mGBP6 noch nicht mit einbezogen. Daher kann angenommen werden, dass unter den in dieser Arbeit definierten Amplifikationsbedingungen die jeweilige PCR spezifisch ist. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit den Primer- und Sonden-Kombinationen für mGBP8 unter Verwendung von mGBP4, 6, 9 und 10 cDNS als Template, erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Ein anderes Bild stellt sich in Bezug auf die mGBP6 Primer- und Sonden-Kombination beim Einsatz von mGBP10 cDNS Template und umgekehrt dar. Hierbei konnte wegen der großen Übereinstimmungen in den Sequenzen mit 98,4 % Identität (Kresse et al., 2008) keine für nur ein Template spezifische Primer- und Sonden-Kombination etabliert werden, die Intron-überspannend beide Genprodukte voneinander abgrenzt, da nur in der Sonde ein Mismatch vorliegt. Aus diesem Grund wurden die erzielten Ergebnisse als mGBP6/10 dargestellt.

Aufgrund der Experimente konnten für alle Real-time PCRs der mGBPs und β -Aktin eine Annealingtemperatur von 60°C bestimmt werden, wobei für alle Amplifikationen ein spezifisches Ergebnis erzielt werden konnte (Ausnahme: mGBP6 und mGBP10).

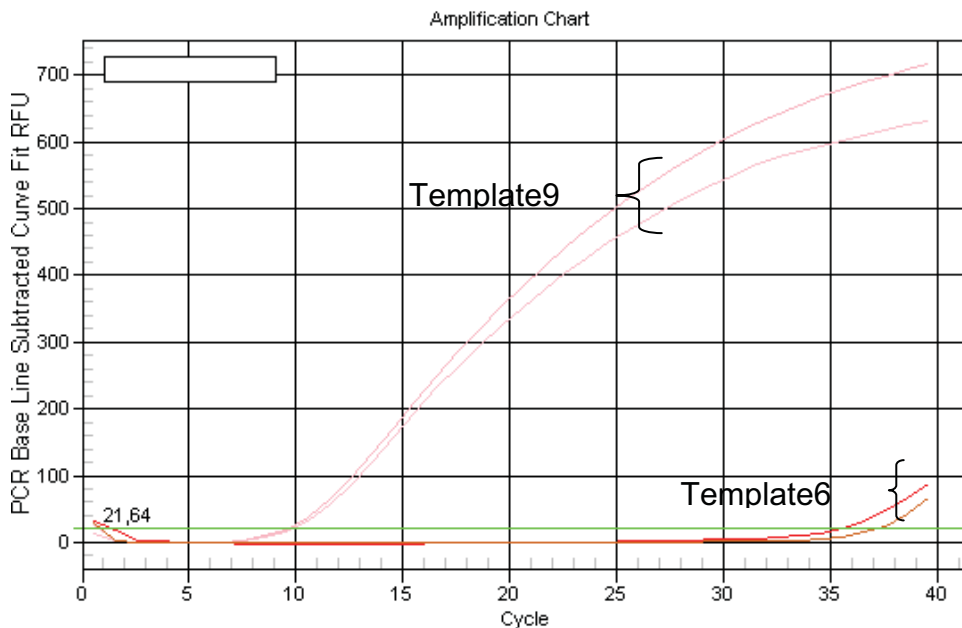


Abb. 3.1: Test der Primer- und Sonden-Kombination für mGBP9 mittels Real-time PCR. Als Template wurde in einer PCR cDNS von mGBP9 (rosa) und in einer weiteren PCR cDNS von mGBP6 (rot/braun) eingesetzt. Die PCR wurde jeweils bei einer Annealingtemperatur von 60°C in 40 Zyklen durchgeführt.

3.1.3 Induzierbarkeit der mGBP Familie in Ana-1 Makrophagen

Zur Validierung der Microarray Daten wurden Ana-1 Makrophagen mit murinem IFN γ (10ng/ml entsprechend 100U/ml) stimuliert. Zu den Zeitpunkten 2, 6 und 16 h nach IFN γ Zugabe wurden die Zellen geerntet, daraus mRNA aufgereinigt und anschließend in cDNS umgeschrieben. Um die Induzierbarkeit der jeweiligen Gene zu ermitteln, wurde deren Ratio, also der Expressionsunterschied der stimulierten bezogen auf die unstimulierte Probe, mittels der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode (Pfaffl, 2001) ermittelt. Hierbei wurden die jeweiligen CP Werte der Gene vorher auf das Housekeeping Gen β -Aktin normalisiert (ΔCP) und dann die Ratio ($2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$) berechnet.

In Abbildung 3.2 sind die relativen Expressionsunterschiede von mGBP1-10, GTPBP-1 (GTP Binde Protein) als Negativ- sowie iNOS (induzierbare NO Synthase) als Positiv-Kontrolle dargestellt. Wie abzulesen ist, stieg die relative mRNA Menge schon ab 2 h nach Stimulation bei allen Mitgliedern an und nahm bis einschließlich 16 h zu. Somit bestätigten sich dabei auch die vorangegangenen Array Daten für die neuen Mitglieder (mGBP6, 7, 8, 9 und 10), so dass diese zu den IFN γ -induzierten GTPasen zu zählen sind. Auch die iNOS mRNA Menge nahm bis 6 h (höchste Ratio) zu, um dann bis 16 h wieder leicht abzunehmen, wobei der 16 h Wert noch deutlich den Wert für 2 h überstieg. Im Gegensatz dazu lag die Ratio bei GTPBP1 zu jedem Zeitpunkt um den Wert 1, was einer zu allen Zeitpunkten (0-16 h) vergleichbaren mRNA-Menge entsprach. Dieses Gen, das homolog zu den mGBPs ist, war daher als nicht induzierbar durch IFN γ zu betrachten und trotz der Möglichkeit GTP zu binden, nicht zu den 65kDa GBPs zu zählen, die alle durch die IFN γ regulierte Expression charakterisierbar sind.

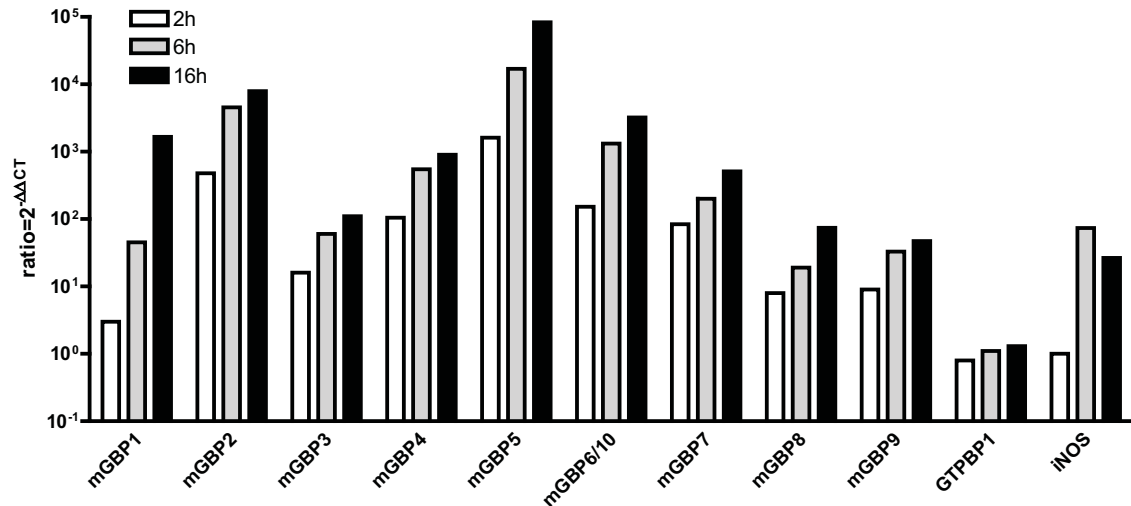


Abb. 3.2: Induktion der murinen GBPs in Ana-1 Makrophagen durch IFN γ . Aus IFN γ stimulierten Makrophagen (0, 2, 6 und 16 h) wurde mRNS gewonnen, in cDNS umgeschrieben und Real-time PCRs durchgeführt. Dargestellt sind die jeweiligen Expressionsunterschiede der Gene mGBP1-10, GTPBP-1 und iNOS, bezogen auf den 0 h Wert und normalisiert zu β -Aktin ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Wie in früheren Arbeiten beschrieben (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002), werden mGBP1, 2 und 5 neben IFN γ auch durch IFN β , IL-1 β , TNF und LPS induziert. Die Fähigkeit dieser und weiterer Zytokine sowie TLR-Liganden wurde für die bisher beschriebenen (mGBP1-5) und neuen mGBPs (mGBP6-10) untersucht. Hierzu wurden Ana-1 Makrophagen 16 h mit IFN γ (10 ng/ml), TNF (10 ng/ml), TNF/IFN γ (je 10 ng/ml), IFN β (10 ng/ml), IL-2 (10 ng/ml) als Negativkontrolle, IL-1 β (10ng/ml), LPS (100 ng/ml), Listerien-LTA (1 μ g/ml), CpG ODN 1668 (1 μ M) und poly (I:C) (1 μ g/ml) stimuliert. Analog zum vorherigen Versuch wurde cDNS synthetisiert und Real-time PCRs der verschiedenen mGBP-Familienmitglieder und Kontrollen durchgeführt (Abbildung 3.3). Als weitere Positivkontrolle der Stimulation mit den verschiedenen Liganden wurde die Interleukin 12 Untereinheit p40 (IL-12p40) Expression gemessen. Wie schon im vorherigen Versuch (Abbildung 3.2) beschrieben, waren die mGBPs1-10 stark induziert durch IFN γ . Das Zytokin TNF konnte in den Ana-1 Makrophagen nur die Expression von mGBP4 induzieren. Im Gegensatz dazu wurden alle Mitglieder, ausgenommen mGBP1, synergistisch von IFN γ und TNF induziert, wobei die synergistische Steigerung durch beide Zytokine am deutlichsten bei mGBP6/10 (Ratio IFN γ : 18800; IFN γ /TNF: 32000) und am geringsten bei mGBP9 (11; 17) zum Tragen kam. IFN β erhöhte die Expression in Ana-1 Makrophagen bei mGBP2, 3, 4, 6/10, 7, 8 und 9. Dem gegenüber konnte eine Expressionssteigerung bei mGBP1 und 5 in Ana-1 Makrophagen nicht detektiert werden. Durch das als T-Zellen Wachstumsfaktor beschriebene Interleukin-2 (Janeway, Jr. et al., 2005) wurde keine vermehrte Genexpression der gemessenen Gene in Ana-1 Makrophagen induziert.

Das Zytokin IL-1 β löst nur bei mGBP2 eine leichte Steigerung der Expression aus, während bei allen anderen mGBP-Genen kein Effekt nachzuweisen war. Die TLR-Liganden LTA, LPS und CpG führten zur Erhöhung der Transkriptmenge der Positivkontrollen IL-12p40 und iNOS, jedoch nur bei mGBP6/10 führte LTA, LPS und CpG, bei mGBP2 LPS und CpG und bei mGBP1 nur CpG zur

Expressionszunahme. Das Gen GTPBP1 wurde weder von den Zytokinen, noch von den TLR-Liganden induziert. Wie im vorherigen Versuch fungierte auch hier dieses Gen als Negativkontrolle im Kontrast zur Beschreibung des Proteins (Senju et al., 2000), welches dort in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 durch $\text{IFN}\gamma$ induziert wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Genexpression dieser GTPasen-Familie bei allen Mitgliedern durch $\text{IFN}\gamma$ und $\text{IFN}\beta$ induzierbar ist, während andere Stimuli, wie TLR-Liganden, unterschiedliche mGBPs in ihrer Expression beeinflussen können.

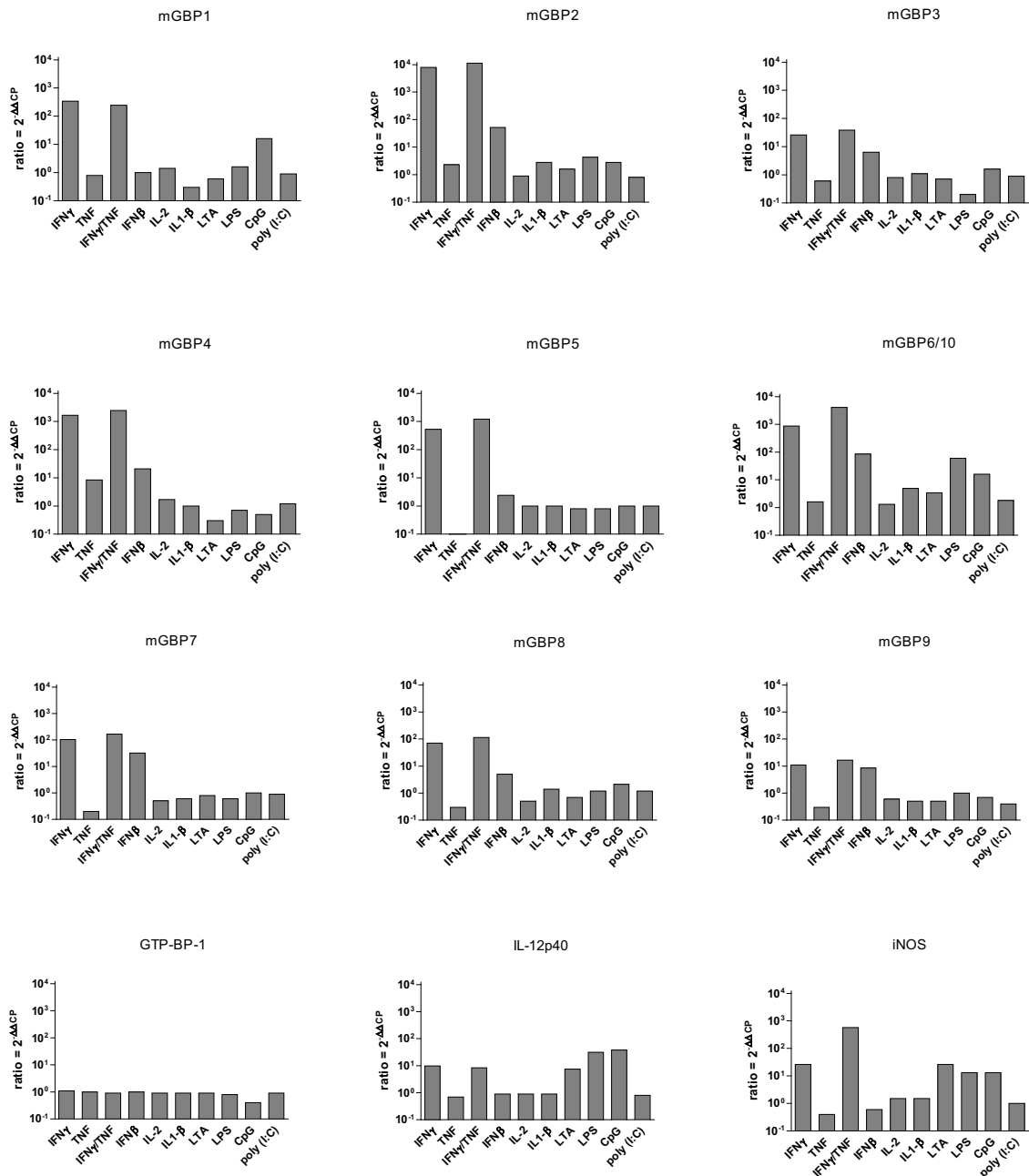


Abb. 3.3: Real-time Analyse der Expression der murinen GBPs 1 bis 10 in Ana-1 Makrophagen nach 16 h Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und TLR-Liganden. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$) für jedes Gen bei den angegebenen Stimulationen.

3.1.4 Regulation von mGBP7 durch den Transkriptionsfaktor IRF-1

Unerlässlich für die Expression von Genen sind Transkriptionsfaktoren, welche nach Stimulation von Zellen aktiviert und/oder neu synthetisiert werden. Diese lagern sich im Promotorbereich der Genloci vorübergehend an und beeinflussen die Transkription der nachgelagerten Gene positiv (Lewin, 1998). Im Promotorbereich der beiden GTPasen mGBP1 und mGBP2 konnten je zwei ISRE und eine GAS Sequenz identifiziert werden (Briken et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird durch den Stimulus mit Interferonen, insbesondere $\text{IFN}\gamma$, neu synthetisiert und reguliert die Transkription verschiedener Gene somit sekundär durch Anlagern an ISRE Sequenzen. Insbesondere für iNOS und auch mGBP2 wurde eine starke Abhängigkeit von der $\text{IFN}\gamma$ induzierten IRF-1 Neusynthese in Makrophagen und embryonalen Fibroblasten beschrieben (Huang et al., 1993; Kamijo et al., 1994; Boehm et al., 1998). mGBP7 besitzt 2 GAS-Elemente innerhalb der 5' Region stromaufwärts von Exon 1 und eine putative ISRE Sequenz 3' der GAS Elemente, allerdings bei wenigen Transkripten überlappend mit einem erweiterten Exon 1 (Olszewski et al., 2006). Somit stellt sich hier die Frage, ob die Transkription von mGBP7 die Produktion von IRF-1 erfordert.

3.1.4.1 IRF-1-Abhängigkeit der mGBP Expression in embryonalen Fibroblasten

Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst murine embryonale Fibroblasten (mEF) von C57BL/6 (Wt) und *irf-1*^{-/-} (IRF-1 ko) Mäusen 16 h mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Anschließend wurden Zellysate zum Proteinnachweis hergestellt sowie mRNS für Real-time RT-PCR Analysen aufgereinigt. In den Wt Fibroblasten fand eine leichte Steigerung der Transkriptmenge von mGBP7 statt, während die mGBP2 mRNS-Menge durch $\text{IFN}\gamma$ Stimulation deutlich stärker anstieg. Ein anderes Bild ergab sich bei der Stimulation der *irf-1*^{-/-} Fibroblasten, hier fand eine weitaus stärkere Induktion von mGBP7 durch $\text{IFN}\gamma$ statt als von mGBP2. Allerdings wurde die mGBP2 mRNS-Menge auch ohne den Transkriptionsfaktor IRF-1 hochreguliert, jedoch stark verringert, im Vergleich zu den Wt Fibroblasten (Wert: 590 in Wt, Wert: 5,1 in IRF-1 ko). Diese Induktionsfähigkeit in IRF1-ko Fibroblasten bei mGBP2 weist auf einen weiteren Transkriptionsfaktor hin, welcher die Produktion von mGBP2-mRNS beeinflusst.

Die basale Transkriptmenge von mGBP7 und mGBP2 lag in den *irf-1*^{-/-} mEFs deutlich niedriger, als in Wt Zellen. Dieses Ergebnis weist auf einen Einfluß von konstitutiv produziertem IRF-1 auf die Basalexpression von mGBP7 und mGBP2 in unstimulierten Zellen hin.

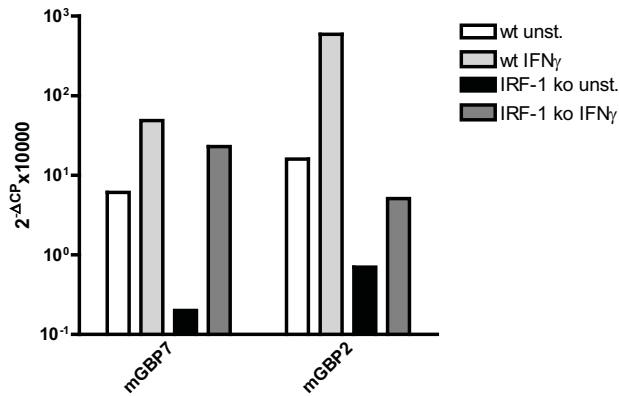


Abb. 3.4: Expression von mGBP7 und mGBP2 in murinen embryonalen Fibroblasten von IRF-1 ko (schwarz, dunkelgrau) und Wt (weiß und hellgrau) Mäusen. Dargestellt ist die mRNA Menge normalisiert zu β -Aktin ($2^{-\Delta CP}$).

Zur Analyse der Proteinexpression (Abbildung 3.5) von mGBP7 und mGBP2 wurde aus den Zelllysaten ein Westernblot erstellt. Hierfür wurden Peptid-Antikörper in Kaninchen hergestellt. Das gegen das spezifische mGBP7-Peptid aufgereinigte Serum der Tiere wurde dann auf seine Spezifität gegen mGBP7 und mGBP2 hin getestet und konnte für die Analyse der Proteinexpression dieser GTPasen im Westernblot herangezogen werden. Hierbei wurden 35 μ g Gesamtprotein pro Tasche aufgetragen und der Westernblot hinterher mit den jeweiligen Antisera inkubiert und entwickelt. Es konnte weder in den IRF-1 ko embryonalen Fibroblasten noch in den Wt embryonalen Fibroblasten mGBP7-Protein nach IFN γ Stimulation detektiert werden. Demgegenüber wurde die Proteinexpression von mGBP2 deutlich in Wt embryonalen Fibroblasten nach IFN γ Stimulation induziert, während keine mGBP2 Proteinexpression ohne den Transkriptionsfaktor IRF-1 (IRF-1 ko) nach IFN γ Stimulation stattfand.

Dieser Versuch zeigte, dass einerseits die Transkription von mGBP7 mit und auch ohne IRF-1 deutlich induziert wird (Real-time RT PCR Analyse), andererseits in Fibroblasten nach alleiniger IFN γ Stimulation keine Proteinexpression nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurde deutlich die IRF-1 Abhängigkeit von mGBP2 in Fibroblasten auf Transkriptions- und Translationsebene belegt.

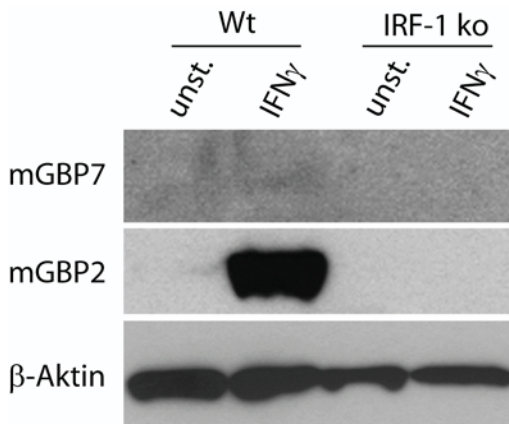


Abb. 3.5: Westernblotanalyse von mGBP2 und mGBP7. Wt und IRF-1 ko mEF wurden 16 h mit IFN γ stimuliert, IRF-1-ko mEF. Es wurden 35 μ g Gesamt-Protein je Probe aufgetragen. Der Westernblot wurde mit anti-mGBP7, -mGBP2, und - β -Aktin inkubiert und entwickelt.

3.1.4.2 IRF-1-Abhängigkeit der mGBP Expression in Knochenmarksmakrophagen

Wie in Ana-1 Makrophagen und embryonalen Fibroblasten gezeigt, wurde mGBP7 stark von IFN γ induziert. Um auch weiterhin zu prüfen, ob mGBP7 in Abhängigkeit von der IRF-1 Neusynthese transkribiert und translatiert wird, wurden Makrophagen aus dem Knochenmark (BMDM) von Wt und *irf-1*^{-/-} Mäusen generiert. Die Makrophagen wurden 16 h mit IFN γ (10 ng/ml), TNF (10 ng/ml), TNF/IFN γ (je 10 ng/ml), IFN β (10 ng/ml), IL-1 β (10ng/ml), LPS (100 ng/ml), CpG ODN 1668 (1 μ M), poly (I:C) (1 μ g/ml) und einem Cocktail (Kombination aus allen Einzelstimulationen plus Listerien-LTA (1 μ g/ml)) stimuliert. Die daraus hergestellte cDNS wurde dann mit Hilfe der Real-time PCR analysiert (Abbildung 3.6).

Die Transkription von mGBP7 in Wt BMDM wurde von IFN γ und auch von TNF alleine induziert. Die Kombination des Stimulus IFN γ /TNF zeigte keinen Synergismus, da keine Steigerung im Vergleich zu IFN γ alleine erfolgte. Weiterhin wurde mGBP7 durch IFN β hochreguliert. Die TLR-Liganden LPS (TLR4) und poly (I:C) (TLR3) induzierten die Transkription des Gens ebenso. Ohne den Transkriptionsfaktor IRF-1 war mGBP7 nur marginal weniger transkribiert als in Wt BMDM, mit Ausnahme beim Stimulus TNF, hier konnte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Erhöhung der mRNS Menge nachgewiesen werden. Durch den Stimulus „Cocktail“ wurde sogar eine etwas höhere Menge an mGBP7 mRNA in IRF-1 ko BMDM produziert als in Wt BMDM (Abbildung 3.6a). Die Transkription von mGBP2 in den Wt BMDM fand im starken Maße nach IFN γ aber auch nach TNF, IFN γ /TNF und IFN β Behandlung statt (Abbildung 3.6b). Wie mGBP7 wurde mGBP2 auch von den TLR-Liganden LPS und poly (I:C) induziert, sowie vom Kombinations-Stimulus „Cocktail“. In den IRF-1 ko BMDM fand nach 16 h Stimulation auch eine Transkriptionserhöhung nach allen Stimulationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle statt, allerdings in einer sehr viel geringeren Menge im Vergleich zu den Wt Makrophagen.

Irgm1 (LRG-47) gehört zu den in der Maus exprimierten p47 GTPasen (IRGs) und die Induktion dieses Gens wurde als IRF-1 unabhängig beschrieben (Boehm et al., 1998). Daher diente Irgm1 als Positivkontrolle für die IRF-1 ko Stimulationen. Das Transkriptionsprofil von Irgm1 war bei Wt und bei IRF-1 ko BMDM dem von mGBP7 sehr ähnlich (Abbildung 3.6c). Auch hier bestand kein oder nur ein marginaler Unterschied in der Transkriptionsmenge von Wt zu IRF-1 ko, wobei nach TNF Stimulation eine etwas geringere Transkriptmenge bei den IRF-1 defizienten Zellen nachweisbar war, wie bei mGBP7 und im Gegensatz zu mGBP2. Die Ergebnisse der iNOS PCR bestätigten die für iNOS beschriebene IRF-1 Abhängigkeit sehr deutlich (Abbildung 3.6d). In Wt BMDM fand ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge nach der Behandlung mit IFN γ sowie eine deutlich stärkere Induktion nach TNF und eine synergistische Induktion durch IFN γ /TNF statt. Auch die TLR-Liganden LPS und poly (I:C) sowie der Kombinations-Stimulus „Cocktail“ führten zur deutlichen Induktion von iNOS. Nach IFN β Stimulation kam es nur zu einer geringen mRNS Synthese, welche jedoch im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle als induziert zu zählen

war. Im starken Gegensatz dazu wurde ohne IRF-1 Synthese kein iNOS nach den Stimulationen $\text{IFN}\gamma$, TNF, $\text{IFN}\beta$ produziert. Eine Induktion fand jedoch nach $\text{IFN}\gamma$ /TNF in Kombination, LPS sowie nach poly (I:C) statt. Diese Erhöhung war jedoch stark reduziert im Vergleich zur Stimulation der Wt BMDM. Der Kombinations-Stimulus „Cocktail“ führte zu einer Transkription von iNOS mRNS in etwa der Höhe des Wt-Wertes. Dies führt zur Hypothese, dass bei einer Kombination von verschiedenen Zytokinen und TLR-Liganden als Stimulus andere Transkriptionsfaktoren redundant zu IRF-1 wirken und somit das Fehlen von IRF-1 in diesen Zellen ausgeglichen werden kann.

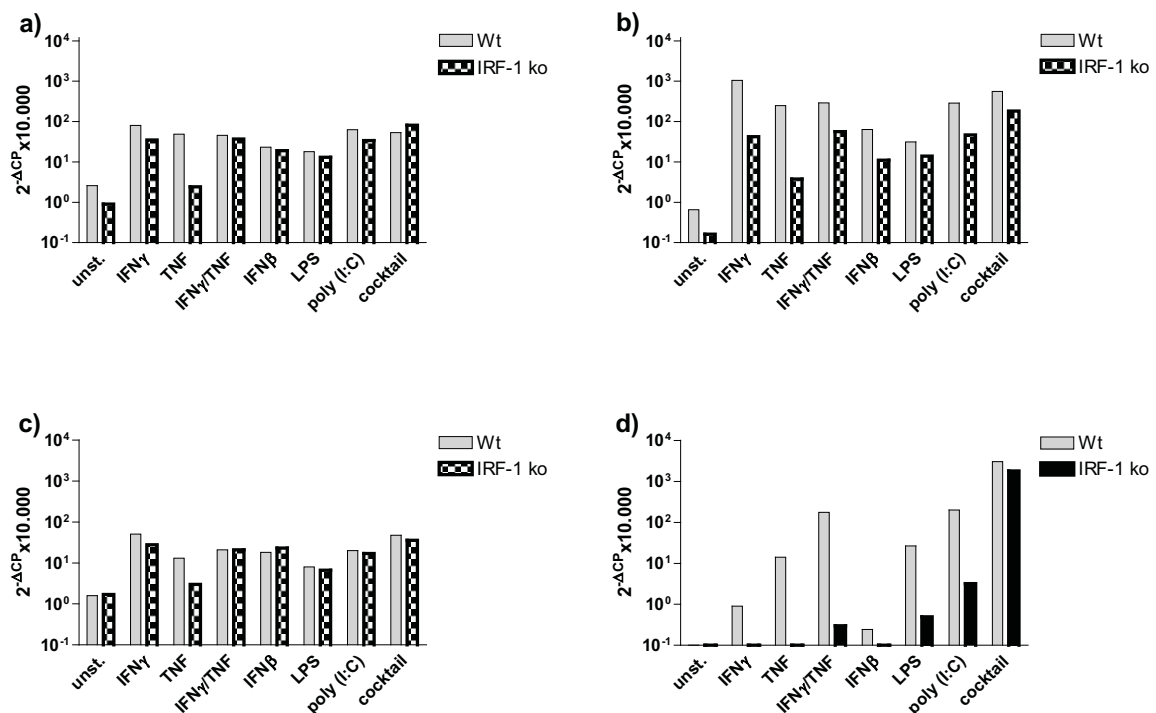


Abb. 3.6: Real-time Analyse von cDNAs generiert aus stimulierten BMDM von Wt und IRF-1 ko Makrophagen. a) mGBP7, b) mGBP2, c) Irgm1 (LRG-47), d) iNOS mRNA-Menge, jeweils Wt (grau) und IRF-1 ko (schwarz) nach unterschiedlichen Stimulationen 16h. Die CP-Werte der PCRs wurden zu β -Aktin normalisiert ($2^{\Delta\text{CP}}$) und mit 10.000 multipliziert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Unterschiede auf der Transkriptionsebene zwischen Wt und IRF-1 ko BMDM bei mGBP7, wie auch bei LRG-47 marginal sind (mit Ausnahme nach TNF Stimulation). Die Transkription von mGBP2 wird jedoch durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 signifikant verstärkt, da ohne IRF-1 zwar eine Expressionserhöhung stattfand, diese jedoch zu weniger mGBP2 Transkripten führte als in den Wt BMDM. Die Induzierbarkeit von iNOS in Abwesenheit von IRF-1 ist nur bei den TLR-Liganden und der Kombination $\text{IFN}\gamma$ /TNF noch deutlich meßbar und erst durch Kombination aller Stimulationen wurde auf Transkriptionsebene das Fehlen von IRF-1 ausgeglichen.

Parallel zum Versuch für die mRNA-Gewinnung wurden Ansätze zur Proteingewinnung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden die Makrophagen mit $\text{IFN}\gamma$ sowie TNF und $\text{IFN}\gamma$ /TNF für 16h stimuliert. Anschließend wurde mit den Zellysaten eine Westernblotanalyse durchgeführt (Abbildung 3.7). Hierbei zeigte sich, dass mGBP7 Protein in Wt,

wie auch in IRF-1 ko Knochenmarksmakrophagen nach IFN γ produziert wurde. Im starken Gegensatz dazu ist überraschenderweise kein mGBP7 Protein nach Stimulation mit TNF bzw. IFN γ /TNF nachweisbar, weder in Wt noch in IRF-1 ko BMDM.

Die Proteinexpression von mGBP2 war nach IFN γ Stimulation in Wt BMDM deutlich messbar, während in den IRF-1 ko BMDM die mGBP2 Proteinexpression sehr stark herabgesetzt war. Nach Stimulation mit TNF konnte kein mGBP2 Protein in den Wt bzw. IRF-1 ko BMDM gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde nach Stimulation mit IFN γ /TNF in Gegenwart von IRF-1 (Wt) aber auch in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors IRF-1 (IRF-1 ko) mGBP2 Protein exprimiert; wobei die Proteinmenge ohne IRF-1 nach IFN γ bzw. IFN γ /TNF Stimulation drastisch vermindert war im Vergleich zur mGBP2 Proteinmenge in den Wt BMDM. IRF-1 Protein wurde in den Wt BMDM nach Stimulation mit IFN γ sowie synergistisch nach Stimulation mit IFN γ /TNF produziert, in den IRF-1 ko BMDM konnte dagegen kein IRF-1 detektiert werden.

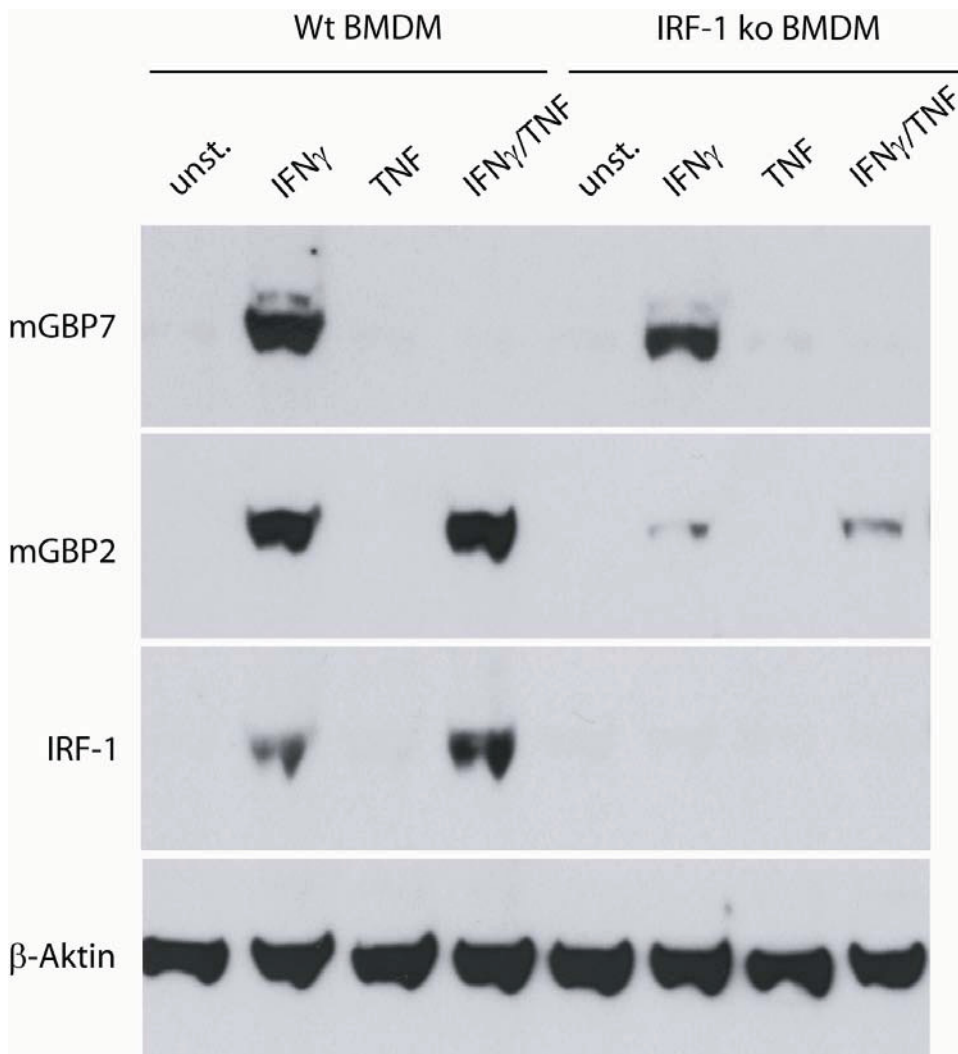


Abb. 3.7: Westernblotanalyse von Proteinlysaten aus Knochenmarksmakrophagen von Wt und IRF-1 ko Mäusen. Die Zellen wurden mit IFN γ , TNF und IFN γ /TNF stimuliert und der Westernblot mit anti-mGBP7, -mGBP2, -IRF-1 und - β -Aktin inkubiert und entwickelt.

Die Untersuchung der IRF-1 ko BMDM zeigt deutlich, dass zwei GTPasen aus der Familie der 65 kDa GBPs, mGBP7 und mGBP2, ganz unterschiedlich durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 reguliert werden. Die Transkription und damit auch die Translation von mGBP2 wird durch die Neusynthese von IRF-1 deutlich verstärkt, während die Transkription und Proteinexpression von mGBP7 nicht von der IFN α induzierten Neusynthese von IRF1 abhängig ist, bzw. die IRF-1 Induktion nicht zur verstärkten mGBP7 Expression führt.

3.1.5 *In vivo* Expression der 65kDa GTPasen

3.1.5.1 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

In vitro konnte gezeigt werden, dass die gesamte mGBP-Familie durch das inflammatorische Zytokin IFN γ aber auch durch das Typ I Interferon IFN β stark reguliert wird. Auch TLR-Liganden haben einen gewissen und z. T. unterschiedlichen Einfluß auf die Transkription der verschiedenen mGBPs (vgl. Kapitel 3.3, Ana-1 Stimulationen). Interferone und auch die verschiedenen TLR Liganden spielen bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle beim Einleiten der angeborenen und sekundär der adaptiven Immunantwort. Für die GTPasen mGBP2 und 4 wurde gezeigt, dass diese nach Infektion mit dem grampositiven Bakterium *Listeria monocytogenes* auf Transkriptionsebene hochreguliert werden (Boehm et al., 1998). Um nachzuprüfen, ob auch die weiteren mGBPs in der frühen Phase der Listerien-Infektion eine mögliche Rolle spielen, wurden C57BL/6 Mäuse mit Listerien vom Stamm ATCC 43251 i.p. infiziert (0,1 x LD₅₀). Zu den Zeitpunkten 0, 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion wurden von je 3 Tieren nach cervicaler Dislokation jeweils Milz und Leber entnommen. Die daraus gewonnene mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und Real-time Analysen der Genfamilie und von Kontrollen durchgeführt (Abbildung 3.8). In der Milz (Abbildung 3.8a) war nach 8 h Infektion nur eine marginale Hochregulation der mGBPs zu beobachten, während ein Anstieg in der iNOS Transkription zu verzeichnen war. Nach 24 h Infektion stiegen alle mGBP mRNA-Mengen deutlich an. Im Falle von mGBP2 war hier auch ein Maximum erreicht, welches zwischen 24 und 48 Stunden nach Infektion in ein Plateau überging. Die Expression aller anderen mGBPs, einschließlich mGBP7, stiegen bis 48 h kontinuierlich an. Auch die Kontrollen iNOS und IFN γ nahmen im weiteren Verlauf der Infektion deutlich zu. Die GTPase GTPBP1 hingegen wurde kaum hochreguliert.

In der Leber (Abbildung 3.8b) zeigte sich ein ähnliches Expressionsprofil: alle untersuchten Gene wurden schon nach 8 h Infektion deutlich hochreguliert, allerdings mit Ausnahme von IFN γ , welches erst nach 24 h signifikant exprimiert wurde. Die Transkriptionsmengen von mGBP1, 6/10 und 8 nahmen im Verlauf der Infektion in der Leber kontinuierlich zu, während die Gentranskripte von allen anderen (einschließlich der Kontrollen) ihr Maximum bei 24 h nach Infektion erreicht hatten und im Falle von mGBP3 und 7 nach 48 h wieder abnahmen. In der Leber wurde mGBP9 deutlich stärker exprimiert als in der Milz.

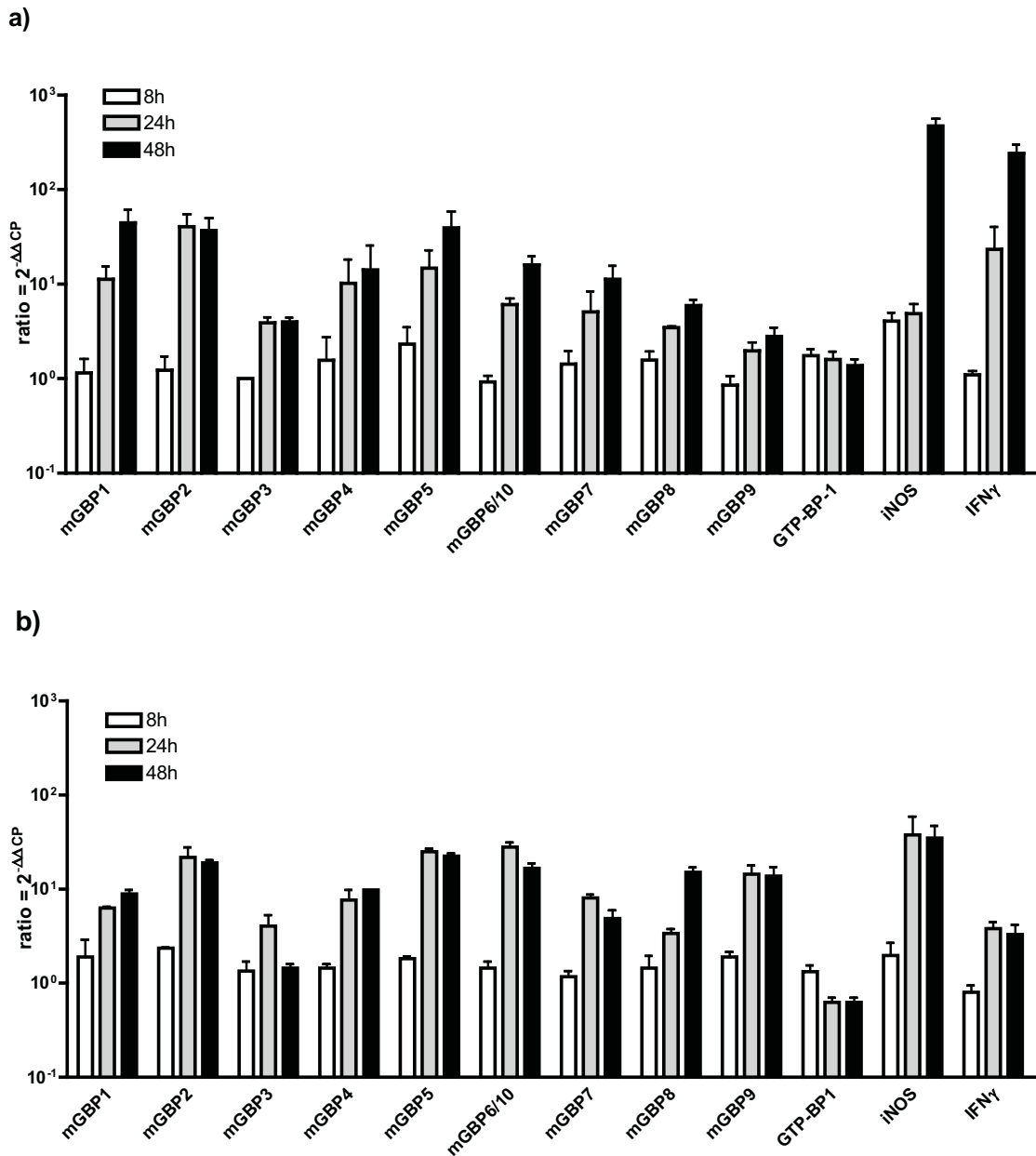


Abb. 3.8: Expression der mGBP-Familie in a) Milz und b) Leber von Listerien infizierten C57BL/6 Mäusen. Die Induktions-Ratio wurde mit der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode berechnet. Analysiert wurden jeweils 3 Organe pro Zeitpunkt ($n=3$) aus denen mRNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben wurde. Die Standardabweichungen (Fehlerbalken) berechnete sich aus den unterschiedlichen Real-time PCR Werten der verschiedenen Mäuse einer Gruppe.

Grundsätzlich waren alle murinen GBPs während der frühen Phase der Listerien-Infektion hochreguliert, wobei zumindest nach 8 h noch kein $\text{IFN}\gamma$ dafür verantwortlich sein konnte, da die Transkription weder in der Leber noch in der Milz bis dahin induziert wurde. Möglicherweise könnte dafür die direkte Erkennung von Pathogenbestandteilen, wie z. B. Listerien-LTA über TLR2 (Schwandner et al., 1999), entscheidend sein.

Ob die in den Real-time PCR Analysen gemessenen Transkripte auch zur Proteintranslation *in vivo* führten, wurde im Rahmen dieser Arbeit für das neue GBP-Mitglied mGBP7 untersucht.

Nach Listerien-Infektion wurden Organlysate hergestellt und jeweils 35 µg Protein im SDS Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der Westernblot wurde dann mit Kaninchen anti-mGBP7 Antiseren inkubiert und entwickelt. Zum Zeitpunkt 0 h konnte schon in beiden Organen, Milz und Leber, eine geringe Basalexpression von mGBP7 nachgewiesen werden. Ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge konnte im Verlauf der Infektion bis 72 h für beide Organe detektiert werden (Abbildung 3.9). Die in den Real-time PCR Analysen gemessene Induktion von mGBP7 Transkripten führte somit zu einer Translation und kontinuierlichen Akkumulation des Proteins mGBP7 in den Organen der infizierten Tiere.

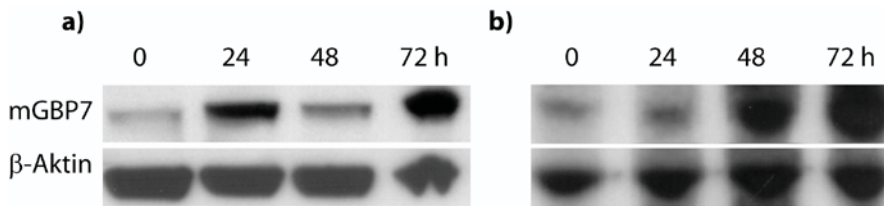


Abb. 3.9: Expression des mGBP7 Proteins a) in der Milz und b) in der Leber nach Listerien-Infektion zu den angegebenen Zeitpunkten.

3.1.5.2 mGBP7 Expression nach Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Die Infektion mit dem obligat intrazellulären einzelligen Parasiten *T. gondii* führt zu einer starken angeborenen Immunabwehr. Über das Verhalten der murinen GBPs in der Toxoplasma-Infektion war bisher nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde die Rolle von mGBP7 in der Toxoplasma-Infektion analysiert. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse i.p. mit 20 Zysten *T. gondii* Stamm ME49 infiziert. Die Organe Lunge und Milz wurden 0, 5, 7 und 12 Tage nach Infektion entnommen und Organlysate hergestellt. Die Westernblot-Analyse nach Inkubation mit dem mGBP7-Antikörper ergab auch in diesem Infektionsmodell eine deutliche Induktion des mGBP7 Proteins (Abbildung 3.10). In der Milz konnte wieder (vgl. Listerien-Infektion) eine Basalexpression festgestellt werden. Bis 12 Tage nach Infektion nahm die Menge an mGBP7 Protein stark und kontinuierlich zu. In der Lunge fand keine Basalexpression des Proteins mGBP7 statt und erst am Tag 5 nach Infektion war eine leichte Proteinbande detektierbar. Die mGBP7 Proteinmenge nahm dann auch in der Lunge im Verlauf der Toxoplasma-Infektion deutlich zu. Murines GBP7, wie auch die anderen 65 kDa GTPasen (Degrandi et al., 2007), werden in der akuten Phase der Infektion dieses Pathogens stark hochreguliert und könnten daher eine antiparasitäre Funktion haben.

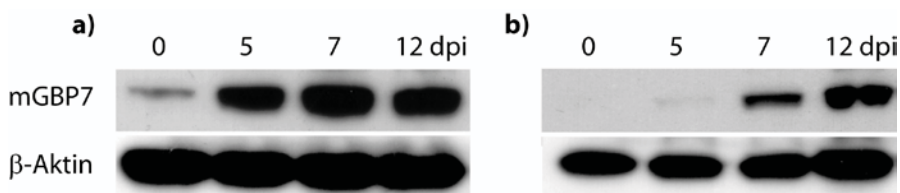


Abb. 3.10: Proteinexpression von mGBP7 in *Toxoplasma gondii* infizierten C57BL/6 Mäusen. a) in der Milz 0 bis 12 Tage nach Infektion, b) in der Lunge 0 bis 12 Tage nach Infektion; dpi = day post infection.

3.1.6 Subzelluläre Lokalisation von mGBP7

Die intrazelluläre Lokalisation kann bei der Untersuchung von Proteinen Aufschluss über deren Funktion geben. Die Untersuchung von mGBP2 zeigte eine vesikelartige nicht näher bestimmte Struktur innerhalb der Zelle (Vestal et al., 2000; Degrandi et al., 2007). Die murinen GBPs 1, 2 und 5 besitzen ein C-terminales Isoprenylierungssignal, welches durch posttranslationale Modifikation eine Verankerung der Proteine mit Membranen vermitteln kann. Das neue Familienmitglied mGBP7 besitzt weder ein solches Isoprenylierungssignal noch eine vorhergesagte Transmembrandomäne (TMHMM 2.0, expasy), so dass eine direkte Verankerung mit einer Membran zunächst unwahrscheinlich erscheint.

Um zu klären, welche subzelluläre Lokalisation mGBP7 aufweist, wurden zunächst unterschiedliche Fusionskonstrukte hergestellt. Zum einen wurden Konstrukte hergestellt, bei denen 3' an die mGBP7 Sequenz die cDNS für das rot fluoreszierende Protein DsRed oder das grün fluoreszierende Protein GFP liegt (mGBP7-DsRed, mGBP7-GFP). Außerdem wurde in einem weiteren Konstrukt am 5' Ende des offenen Leserahmens von mGBP7 die Sequenz für DsRed (DsRed-mGBP7) kloniert. Diese Konstrukte wurden in eukaryotische Zellen transfiziert, die dann die jeweiligen Fusionsproteine mGBP7-DsRed, mGBP7-GFP oder DsRed-mGBP7 produzierten. Diese konnten dann nach Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge (GFP: 488 nm, DsRed: 543 nm) im Konfokalmikroskop detektiert werden.

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Konstrukte verglichen und der Einfluß von IFN γ auf diese untersucht. Dazu wurden RAW 264.7 Makrophagen durch Elektroporation transient transfiziert und für die spätere Konfokalanalyse auf Deckgläschen ausgesät. Nach einem Tag wurde ein Teil der Makrophagen mit IFN γ stimuliert, um eine eventuelle Veränderung der subzellulären Verteilung von mGBP7 durch die Stimulation beobachten zu können. Nach weiterer \bar{u} /N Kultur wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, der Kern mit dem Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt und die Deckgläschen dann auf Objektträger aufgebracht. Bis zur konfokalmikroskopischen Analyse wurden die Präparate im Dunkeln und gekühlt aufbewahrt.

Weder die Stimulation mit IFN γ noch die Art des Fusionskonstruktes veränderten die Lokalisation von mGBP7 innerhalb der Zelle (Abbildung 3.11). Es konnten nur wenige Überlagerungen mit dem DAPI-Farbstoff beobachtet werden, der größte Anteil aller Varianten der mGBP7-Fusionsproteine befand sich im Zytosol. Hierbei war mGBP7 nicht diffus und frei im Zytosol verteilt, sondern in vesikulären „punktuellen“ Strukturen unterschiedlicher Größe. Da im Gegensatz zu mGBP2 kein Isoprenylierungsmotiv vorhanden ist und eine andere posttranslationale Membranverbindung fehlt, führt dies zu der Hypothese, dass diese vesikelartigen Strukturen keine membran-assoziierten Bestandteile sind oder anderenfalls das mGBP7 Protein über Brückenproteine sekundär mit einer Membran assoziiert wird.

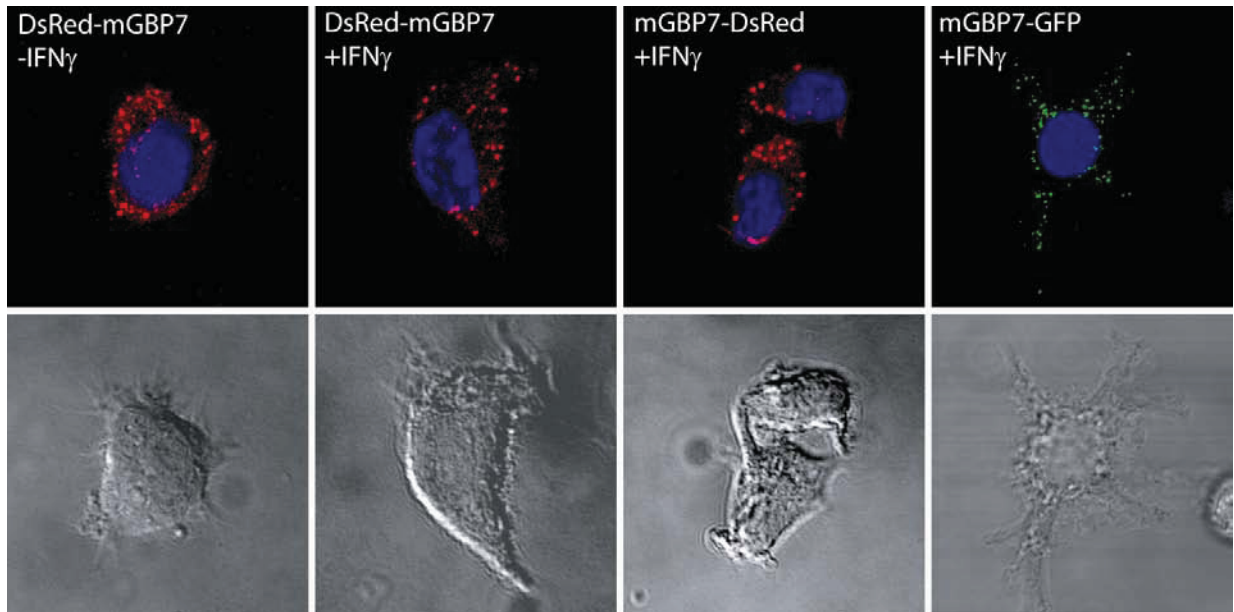


Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 in Makrophagen (RAW 264.7) im Konfokalmikroskop. Die obere Zeile zeigt die mGBP7-Fusionsproteine (rot bzw. grün) und die Kerngegenfärbung in blau (DAPI). Die untere Zeile zeigt die Differential-Kontrastaufnahmen der Zellen der oberen Zeile. Erste Spalte: DsRed-mGBP7 ohne IFN γ Stimulation. Die Spalten zwei bis vier zeigen die Fusionsproteine DsRed-mGBP7, mGBP7-DsRed und mGBP7-GFP nach IFN γ Stimulation der transfizierten Makrophagen.

3.1.6.1 Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Infektion mit *L. monocytogenes in vitro*

Wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, wurde mGBP7 nach Listerien- und nach Toxoplasma-Infektion in der Maus hochreguliert. Ein möglicherweise direkter Einfluss in Form einer Kolo-kalisation von mGBP7 mit Pathogenen, wie für einige p47-GTPasen beschrieben (MacMicking et al., 2003; Martens et al., 2005), sollte im Folgenden untersucht werden. Zunächst wurden RAW 264.7 Makrophagen mit dem mGBP7-DsRed-Konstrukt transient transfiziert und ausgesät. Nach 24 h wurden diese dann mit IFN γ (100U/ml) für weitere 16 h stimuliert. Dann erfolgte eine 30 Minuten andauernde Inkubation mit GFP-exprimierenden Listerien (MOI 10). Die Zellen wurden danach mit Paraformaldehyd fixiert und der Kern mit DAPI gegengefärbt. Wie in Abbildung 3.12 dargestellt, veränderte sich die subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Listerien-Infektion im Vergleich zu Abbildung 3.11 nicht.

Die GFP-Listerien waren unabhängig von IFN γ Vorinkubation der Makrophagen im Zytosol der infizierten Zellen zu finden. Das Fusionsprotein blieb weiterhin vesikulär im Zytosol verteilt, wobei es zu keiner Kolo-kalisation von Listerien mit mGBP7-Fusionsprotein kam.

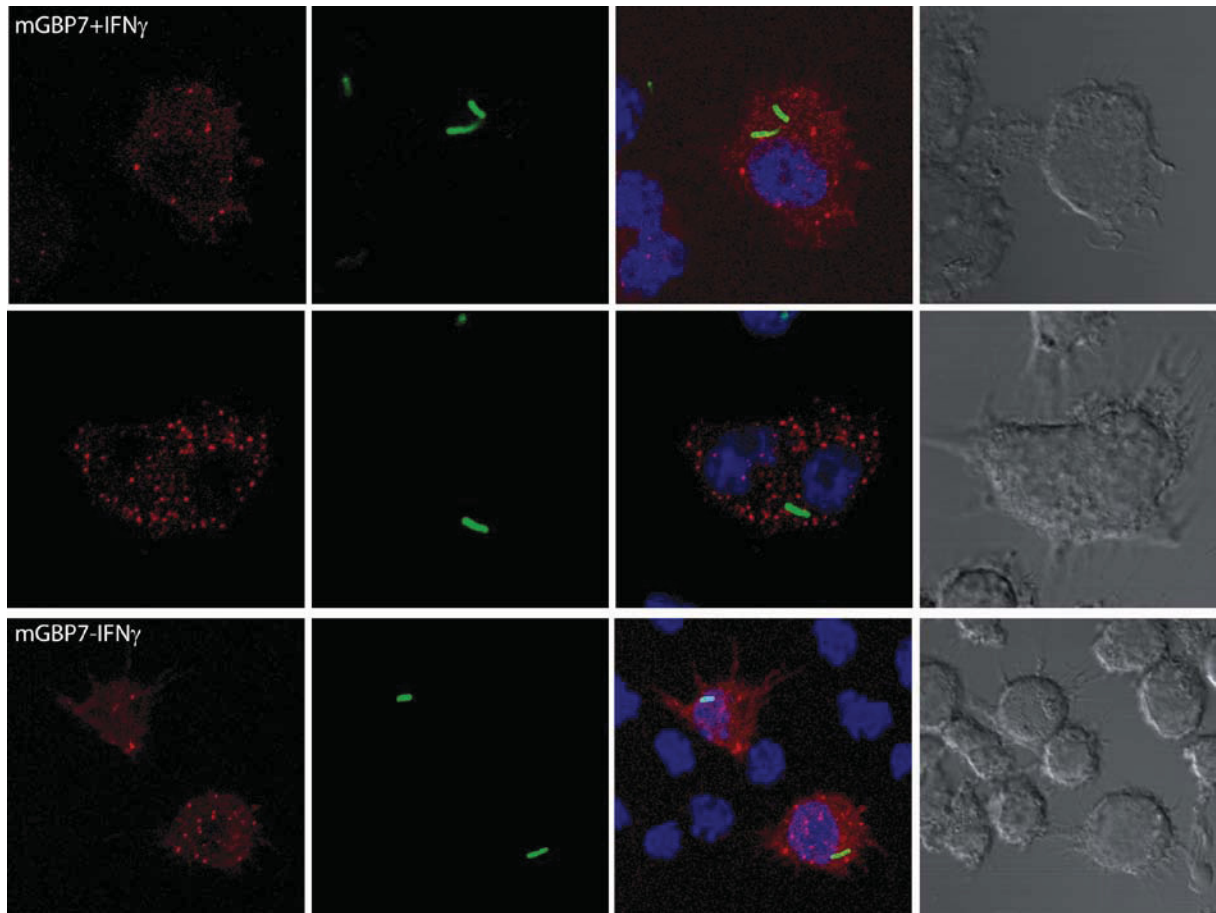


Abb. 3.12: Lokalisation von mGBP7 in der Infektion mit *Listeria monocytogenes*. RAW Makrophagen wurden mit mGBP7-DsRed Konstrukten transfiziert, 16 h mit IFN γ stimuliert und anschließend 30 Minuten mit eGFP exprimierenden Listerien (1:10) inkubiert. Die oberen zwei Zeilen zeigen die Zellen nach IFN γ , die untere Zeile zeigt die Zellen ohne IFN γ Stimulation. Die erste Spalte zeigt das mGBP7 Fusionsprotein in Rot. Die zweite Spalte zeigt die Listerien in Grün. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte 1 und 2 mit dem Kernfarbstoff DAPI. Die vierte Spalte zeigt die Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

3.1.6.2 Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* *in vitro*

Um eine Interaktion des Fusionsproteins mGBP7 mit der parasitophoren Vakuole von *T. gondii* zu untersuchen, wurden, wie zuvor beschrieben, RAW 264.7 Makrophagen mit mGBP7-Fusionsproteinen transfiziert, IFN γ stimuliert und dann mit Tachyzoiten (Stamm ME49, MOI 50) für 2 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Parasiten mit einem spezifischen Antikörper gegen das Oberflächenprotein SAG1 gefärbt. Im Konfokalmikroskop wurden die Präparate analysiert. Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, kam es zu einer deutlichen Umlagerung von mGBP7-Protein an der parasitophoren Vakuole (PV) von *T. gondii*. In den drei oberen Zeilen der Abbildung, welche die Makrophagen nach IFN γ und Toxoplasma-Infektion zeigen, erschien außerdem weniger mGBP7-Fusionsprotein in der Zelle verteilt zu sein, als in Zellen, bei denen keine Vorstimulation mit IFN γ erfolgte (untere Zeile exemplarisch). Dies sieht man sehr deutlich in den beiden mittleren Reihen. Hier und in vielen anderen Zellen, konnte außerdem beobachtet werden, dass nach fast vollständiger Anlagerung

von mGBP7-Protein an die PV, der Parasit mit SAG1-Antikörper kaum mehr anzufärben war (Zeile zwei von oben, exemplarisch).

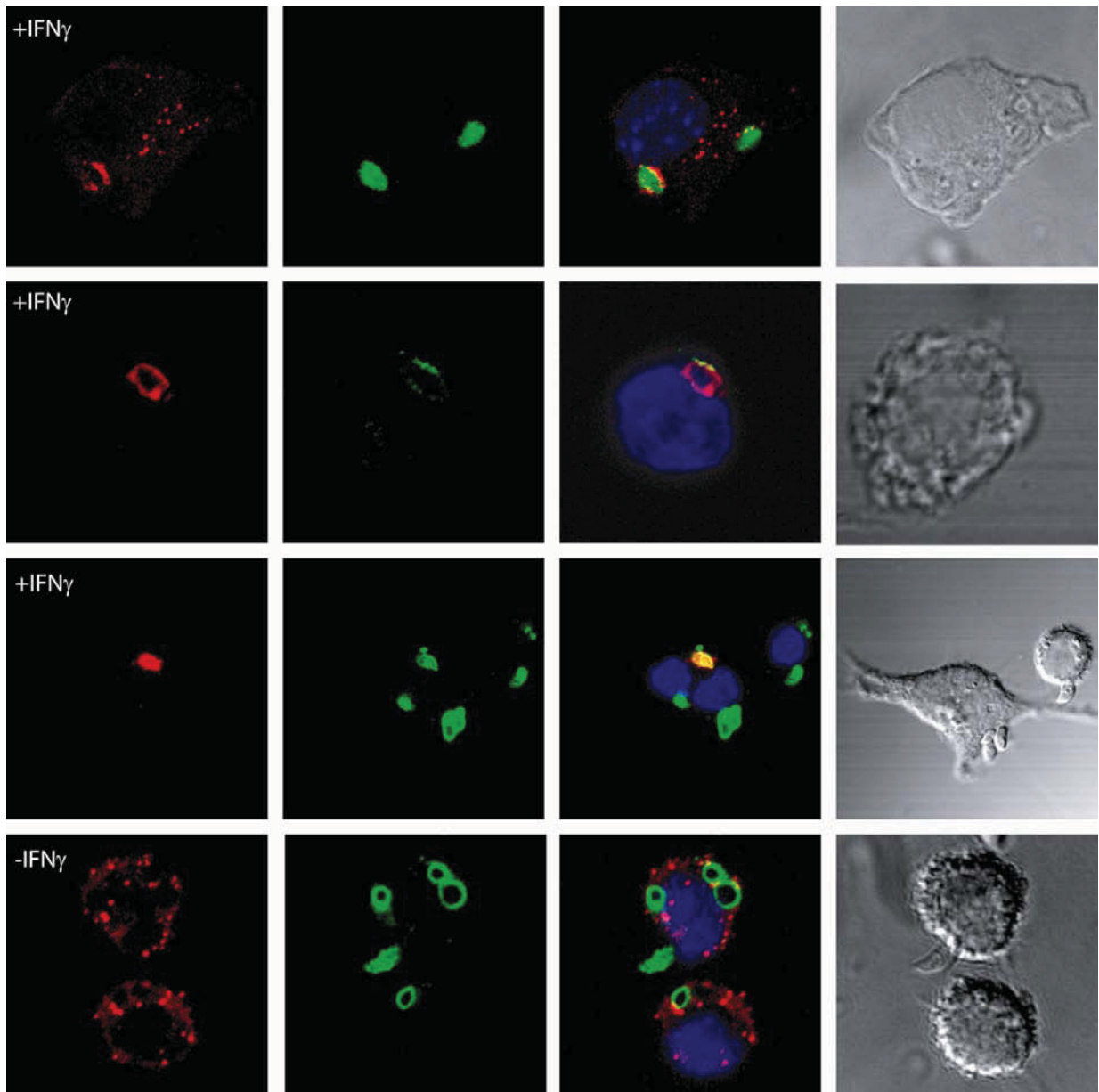


Abb. 3.13: Kolokalisation von mGBP7 mit der PV von *T. gondii*. Analyse der *in vitro* Toxoplasma-Infektion in RAW 264.7 Makrophagen und Lokalisation von mGBP7-DsRed innerhalb der infizierten Zellen. Die oberen drei Zeilen zeigen die Zellen nach 16 h Vorinkubation mit $\text{IFN}\gamma$ mit anschließender Toxoplasma-Infektion für 2h (MOI 50). Die untere Zeile zeigt die Zellen nach 2 h Toxoplasma-Infektion ohne Vorinkubation mit $\text{IFN}\gamma$. Die erste Spalte zeigt in Rot das mGBP7-DsRed Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün das SAG1 Toxoplasmprotein. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung von Spalte eins und zwei mit dem DAPI gefärbten Zellkern in Blau. Die vierte Spalte zeigt die Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

Des Weiteren konnte ohne vorherige $\text{IFN}\gamma$ Stimulation keine mGBP7-Rekrutierung zum Parasiten hin beobachtet werden. Auch die simultane Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ bei der Infektion reichte nicht zur Anlagerung von mGBP7 an die PV aus (Daten nicht gezeigt).

Im Weiteren sollte analysiert werden, ob mGBP7 in einer nicht-professionell-phagozytierenden Zellart mit der PV von *T. gondii* kolokalisiert. Dafür wurde über lentivirale Transduktion eine

murine Fibroblasten-Zelllinie (3T3-mGBP7) hergestellt, die das Fusionsprotein eGFP-mGBP7 (mGBP7 C-terminal) stabil exprimiert. Die Zellen wurden ü/N mit IFN γ stimuliert und anschließend 2 h mit Toxoplasmen infiziert. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse der konfokalmikroskopischen Untersuchung dargestellt. Das Oberflächenprotein von *T. gondii*, SAG1 (rot), wurde ohne IFN γ Stimulation nicht von mGBP7 (grün) umschlossen. Dagegen zeigten IFN γ stimulierte 3T3-Zellen auch hier die Fähigkeit der Assoziation von mGBP7 mit intrazellulären Toxoplasmen. Auch hier konnte beobachtet werden, dass das Fusionsprotein fast ausschließlich an der PV lokalisiert, während in unstimulierten Zellen eine nahezu gleichmäßig punktuelle Verteilung von mGBP7 Protein im Zytosol der Zelle vorliegt.

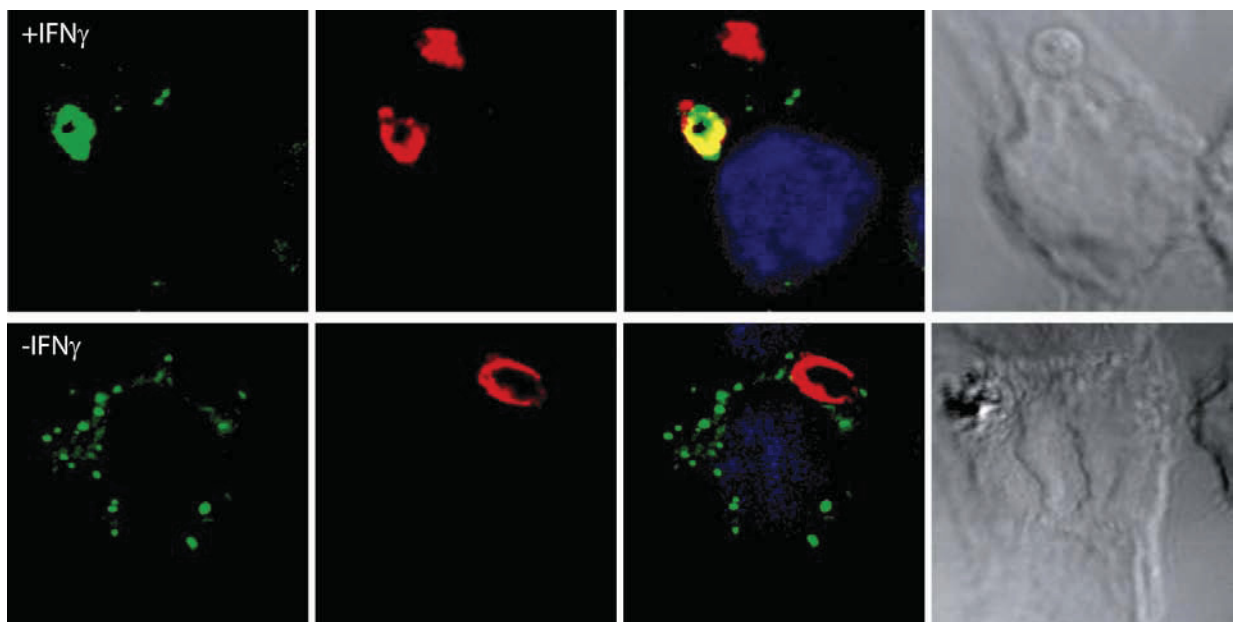


Abb. 3.14: Lokalisation von GFP-mGBP7 Fusionsprotein (grün) mit *Toxoplasma gondii* (rot) in der stabil transduzierten murinen Fibroblasten-Zelllinie 3T3. Die obere Zeile zeigt die 3T3 Zellen nach ü/N Inkubation mit IFN γ und anschließender Infektion für 2 h mit *T. gondii*. Die untere Zeile zeigt die 3T3 Zellen ohne IFN γ Vorstimulation nach 2 h Infektion mit *T. gondii*. Die erste Spalte zeigt in Rot das mGBP7-DsRed Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün das SAG1 Toxoplasmaprotein. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung von Spalte eins und zwei mit dem DAPI gefärbten Zellkern in Blau. Die vierte Spalte zeigt die Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

3.1.6.3 Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 nach Phagozytose von Latexkugeln

In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob mGBP7 mit dem Phagosom in Makrophagen assoziiert. Hierfür wurde die durch lentivirale Transduktion erstellte Makrophagen-Zelllinie mGBP7-RAW 264.7 verwendet, die das Fusionsprotein GFP-mGBP7 stabil exprimiert. Die Makrophagen wurden ü/N mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert, bzw. unstimuliert belassen und dann 2 h mit rot fluoreszierenden Latexkugeln inkubiert. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.15) zeigen, dass das Fusionsprotein eGFP-mGBP7 (grün) nicht mit den phagozytierten Latexkugeln (Pfeile) in den Makrophagen assoziiert, unabhängig der Vorstimulation mit $\text{IFN}\gamma$. Diese und die vorangegangenen Versuche verdeutlichen, dass mGBP7 nicht mit dem Phagosom in Makrophagen kolokalisiert sondern mit der parasitophoren Vakuole *T. gondii* infizierter Makrophagen und 3T3 Fibroblasten.

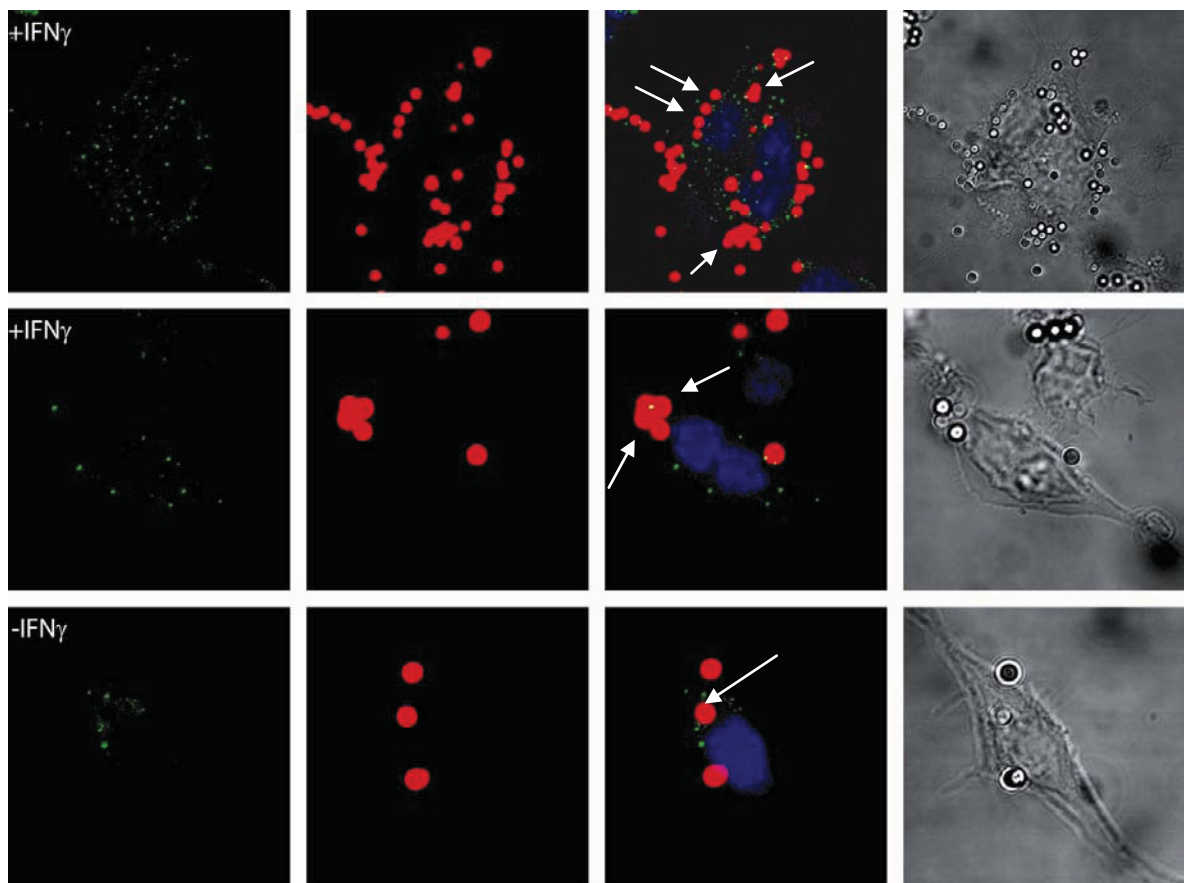


Abb. 3.15: Lokalisation von eGFP-mGBP7 Fusionsprotein (grün) und phagozytierten Latexkugeln (rot): stabil transduzierte RAW 264.7 Makrophagen wurden mit $\text{IFN}\gamma$ ü/N stimuliert (+ $\text{IFN}\gamma$), bzw. unstimuliert belassen (- $\text{IFN}\gamma$) und mit Latexkugeln für 2 h inkubiert. Erste Spalte zeigt GFP-mGBP7 in Grün. Die zweite Spalte zeigt die Latexkugeln in Rot. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung von Spalte 1 und 2 mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau). Die vierte Spalte zeigt die Differential-Kontrastaufnahme der Zellen. Pfeile: Beispiele phagozytierter Latexkugeln.

3.1.6.4 Lokalisation von mGBP7 Mutanten

Untersuchungen an humanem GBP1 mit Mutationen in den unterschiedlichen GTP-Bindestellen hatten gezeigt, dass als biochemische Eigenschaft, die Bindungsaffinität zu GTP und nicht die Hydrolyseaktivität, essentiell für die Lokalisation dieses Proteins mit dem Golgi-Apparat ist (Modiano et al., 2005).

Die Aminosäuresequenz des Proteins mGBP7 zeigt die gleiche Domänenstruktur, wie sie für die anderen Mitglieder der GBP-Familie beschrieben ist: eine GTPase Domäne (G-Domäne), eine mittlere Domäne, sowie die GTPase Effektor Domäne. Anders als hGBP1 und 2 sowie mGBP1, 2 und 5, fehlt bei mGBP7 – wie bereits erwähnt – ein C-terminales CaaX-Motiv.

Im vorangegangenen Kapitel der mGBP7 Lokalisation konnte der deutliche Phänotyp der Kolo-kalisation von mGBP7 mit der PV von *T. gondii* beobachtet werden. Es wurden nun sechs verschiedene Mutanten von mGBP7 erzeugt, um die Auswirkungen von Punktmutationen in der G-Domäne auf die Verteilung von mGBP7 in der Zelle und die Umlagerung an die Toxoplasma-PV zu beobachten. Diese Mutationen wurden in Anlehnung an vorherige Publikationen in der G-Domäne des Proteins vorgenommen. Dabei untersuchten Praefcke und Kollegen Punktmutationen im humanen GBP1 Protein, welche für die Nukleotid-Bindung und GTP Hydrolyse wichtig sind (Praefcke et al., 2004). Mit Hilfe des „QuickChange site-directed mutagenesis kit“ der Firma Stratagene und spezifisch gewählten Primern wurden die unterschiedlichen Punktmutationen eingebracht. Als Ausgangspunkt zur Herstellung dieser Mutanten diente der Vektor mGBP7-DsRed aus dem vorangegangenen Kapitel; somit konnten die entstehenden Mutanten-Vektoren zur Transfektion von Zellen, wie der wildtypische Vektor, angewendet und im Konfokalmikroskop beurteilt werden.

Die ersten drei mutierten Aminosäuren lagen im GTP-Bindemotiv G1 (G(X)₄GKS/T) und sind Arginin (R) 48, Lysin (K) 51 und Serin (S) 52. Diese wurden im folgenden mutiert zu Alanin (R48-A und K51-A) und Asparagin (S52-N). Bei der nächsten Mutation wurde Threonin 75 durch Alanin ersetzt (T75-A). Threonin 75 liegt in der G2 oder sogenannten switchI Region. Diese Aminosäure ist hoch konserviert in den GTP-Binde-Proteinen und interagiert mit dem γ -Phosphat von GTP und dem Ko-Faktor Mg²⁺ (Praefcke et al., 2004), welcher für die Hydrolyse von GTP unerlässlich ist. Bei der fünften Mutation wurde Glutaminsäure durch Alanin ersetzt (E99-A). Diese Mutation liegt in der G3 oder switch II Region (D(X)₂G). Die letzte Mutation wurde durch Austausch von Asparaginsäure durch Arginin (D182-R) in der G4 Region (RD) durchgeführt.

Anschließend wurden die Fusionskonstrukte in RAW Makrophagen transfiziert und die Zellen nach 24 h für weitere 16 h mit IFN γ stimuliert. Nach Fixierung und Gegenfärbung mit dem Kernfarbstoff DAPI wurden Präparate erstellt und die Lokalisation der einzelnen Mutanten wurde im Konfokalmikroskop analysiert.

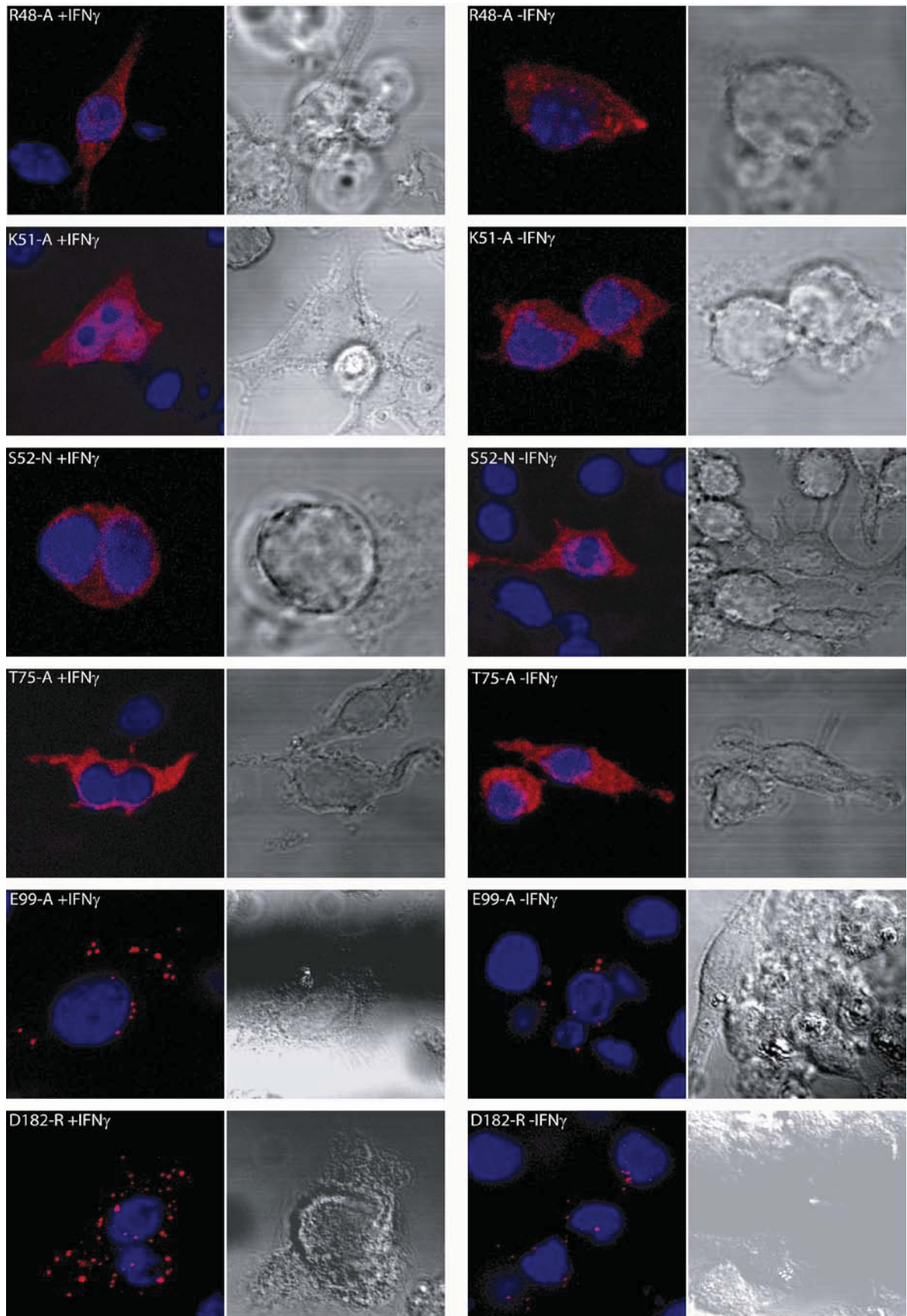


Abb. 3.16: Lokalisation der mGBP7 Mutanten in transfizierten RAW-Makrophagen und Einfluß von $\text{IFN}\gamma$ auf die subzelluläre Distribution. Die einzelnen mGBP7 Mutanten sind in der Abbildung benannt. Linke Spalten nach 16 h Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$, rechte Spalten ohne $\text{IFN}\gamma$ Stimulation. Rot: mGBP7-Fusionsproteine; Blau: Zellkern (DAPI); Grau: Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

Hierbei wurde festgestellt, dass die Mutationen in der G1 (P-loop) und G2 (switch I) Region zu einem nahezu vollständigen Verlust der vesikulären Struktur von mGBP7 führten. Die Zugabe von IFN γ hatte keine weitere Veränderung der Lokalisation der Fusionsproteine innerhalb der Zelle zur Folge.

Die Mutationen in der G3 (E99-A) und der G4 (D182-R) Region erscheinen für die subzelluläre Verteilung von mGBP7 in der Zelle unerheblich. Hier blieb in beiden Fällen das mGBP7 Fusionsprotein weiterhin in seiner vesikulären „punktuellen“ Struktur erhalten und auch die Distribution im Zytosol glich der des Wildtyps. Auch hier führte die Zugabe von IFN γ zu keiner Umverteilung (Abbildung 3.16).

3.1.6.5 Subzelluläre Lokalisation von mGBP7 Mutanten nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* in vitro

Bei der nächsten Versuchsreihe wurden die transient transfizierten Zellen zusätzlich wie zuvor beschrieben mit *T. gondii* infiziert. Hierbei sollte der Einfluß der Mutationen in den verschiedenen Regionen der G-Domäne auf die Rekrutierung zur PV von *T. gondii* untersucht werden (Abbildung 3.17). Da ohne die Zugabe von IFN γ kein Einfluss auf die Distribution der jeweiligen Fusionsproteine zu beobachten war, wurden diese Aufnahmen in Abbildung 3.17 nicht gezeigt.

Nach Analyse der Präparate konnte bei zwei Mutanten eine Anlagerung des mGBP7-Proteins an die Toxoplasma PV beobachtet werden. Wie die Pfeile in Abbildung 3.17 verdeutlichen, konnte bei der Mutante K51-A (G1-Region) und E99-A eine Umverteilung des jeweiligen mutierten mGBP7 Proteins mit der PV detektiert werden. Hierbei ließ sich jedoch feststellen, dass diese Fähigkeit im Vergleich zum Wildtyp Protein stark vermindert war. Bei der Mutante T75-A (switch I Region) ist ein schwaches DsRed-Signal an der PV zu erkennen. Jedoch ist die Fähigkeit dieser Mutante zur PV zu gelangen so stark herabgesetzt, dass keine weiteren Kollokalisierungen in den untersuchten Zellen detektiert werden konnten. Alle weiteren Mutanten hatten die Fähigkeit, mit der PV zu lokalisieren, vollständig verloren. Auch die Mutante D182-R war nicht an der PV zu finden, obwohl diese weiterhin eine vesikuläre Struktur ausbilden konnte. Die Mutationen in der G-Domäne dieser GTPase hatten somit starke Auswirkungen auf deren Fähigkeit nach IFN γ Stimulation zur parasitophoren Vakuole zu gelangen.

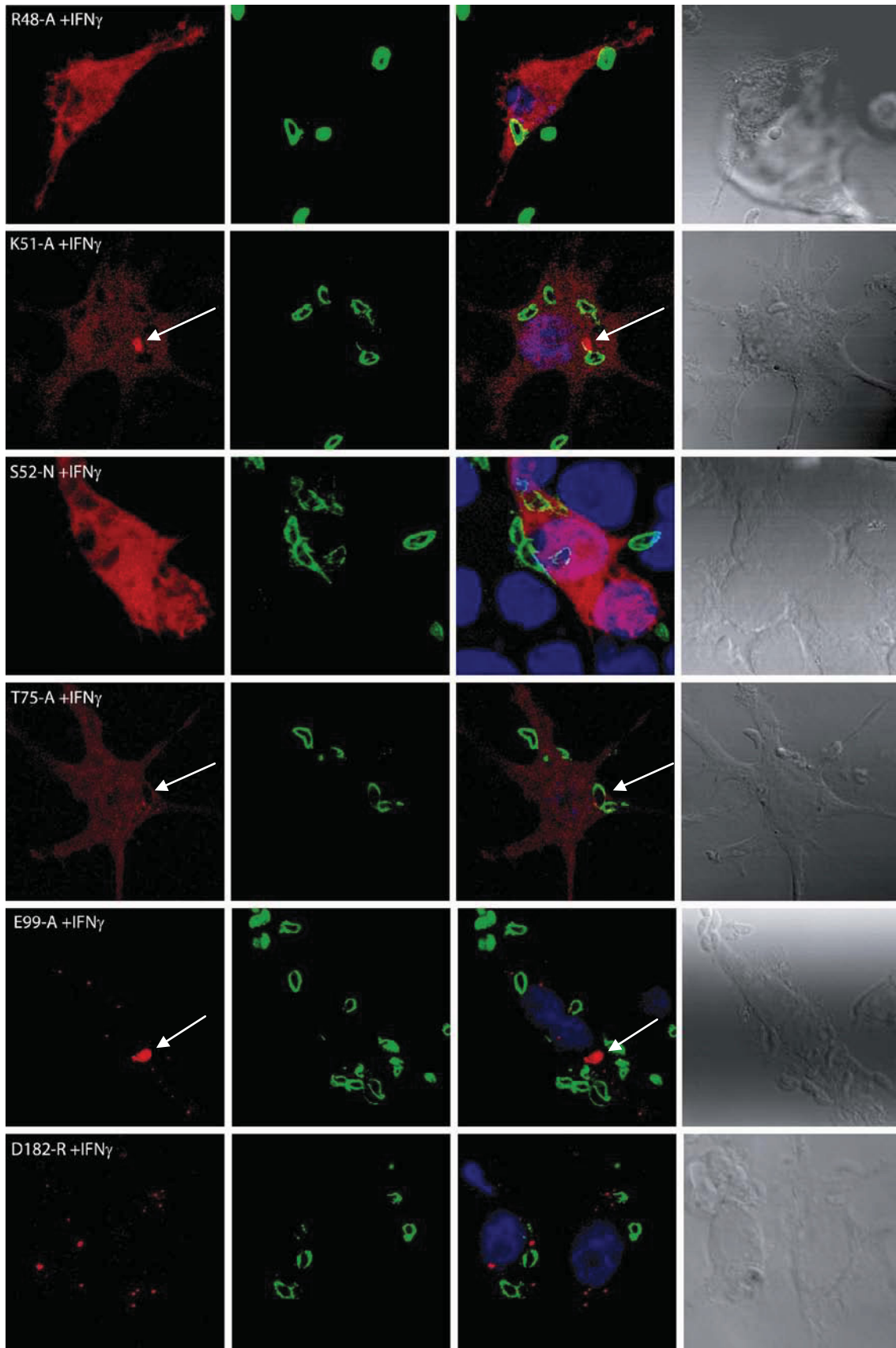


Abb. 3.17: Lokalisation der mGBP7 Mutanten R48-A, K51-A, S52-N, T75-A, E99-A und D182-R in RAW 264.7 Makrophagen nach Infektion mit *T. gondii* (ME49). Die erste Spalte zeigt das mGBP7-Fusionsprotein in Rot. Die zweite Spalte zeigt *T. gondii* (SAG1) in Grün. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte 1 und 2 mit dem Kernfarbstoff DAPI in Blau. Die vierte Spalte zeigt die Differential-Kontrastaufnahmen der Zelle. Pfeile: Akkumulation des Fusionsproteins mit der Toxoplasma- PV.

3.1.7 Vorarbeiten zur Erstellung einer mGBP7 defizienten Mauslinie

Das *Gene Targeting* durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus führt zur systematischen Generierung von Mauslinien mit definierten genetischen Veränderungen. Dadurch läßt sich die Funktion bestimmter Gene *in vivo* untersuchen. Beispielsweise konnten durch das *Gene Targeting* detaillierte Erkenntnisse über die Entwicklung, Selektion und Funktion von T und B Zellen sowie über Funktion von Zytokinen gewonnen werden (Pfeffer and Mak, 1994). Um die Rolle von mGBP7 *in vivo* untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit vorbereitende Schritte unternommen, um eine embryonale Stammzelllinie (ES) aus 129/Ola Mäusen (Kuhn et al., 1991) zu generieren. Eine solche ES Zelle trägt dabei ein mutiertes Allel, welches durch homologe Rekombination mit einem gentechnisch veränderten Genlocus erzielt wird.

Der Genlocus von mGBP7 ist ca. 18 kb groß und besteht aus 11 Exonen. Im Exon 2 befindet sich das Start-Kodon ATG, im Exon 11 das Stopp-Kodon.

Die Rekombinations-Strategie wurde so geplant, dass eine Neomycin-Resistenz-Kassette in den Genlocus eingesetzt wurde, die den 3' Teil von Exon 2, die Exone 3 bis 5 komplett sowie den 5' Teil von Exon 6 deletierte (Abbildung 3.18). Das Start-Kodon bleibt weiterhin erhalten. Die Neomycin-Resistenz-Kassette wurde hierbei in entgegengesetzter transkriptioneller Richtung zur Leserichtung von mGBP7 eingesetzt, wobei der starke Promotor von Neomycin eine Transkription von mGBP7 verhindern soll. In den Exonen 2 bis 6 ist die G-Domäne kodiert, welche für die vollständige Funktion der GTPase essentiell ist (GTP-Bindung). Mit dieser Deletionsstrategie soll verhindert werden, dass eventuell entstehende trunkierte mGBP7 Proteine eine GTPase-Aktivität ausführen könnten.

Um das Ereignis der homologen Rekombination zu erreichen, wurden 5' und 3' der Neomycin-Resistenz-Kassette die homologen Regionen des Gens kloniert. Der kurze Arm (KA) des Rekombinationskonstruktes bestand aus der Intronsequenz und einem Teil des Exon 2 und hat eine Gesamtlänge von 1,5 kb. Über die durch PCR angefügten Schnittstellen Not I und Xba I wurde der KA in den Targetingvektor eingebracht. Der Lange Arm (LA) bestand aus der Genlokussequenz, die im Exon 6 startet und im Intronbereich hinter Exon 8 endet. Der LA war ca. 3 kb lang und wurde über die neu eingefügten Schnittstellen Xho I und Kpn I eingebracht. Für die Negativselektion wurde die HSV-TK über die Schnittstelle Kpn I als letztes eingefügt. Für die Methode des Targetings wurde der hergestellte Vektor dann über die Schnittstelle Not I linearisiert. Nach erfolgreichem Targeting können in Zukunft die ES-Zell-Klone mit der 5' flankierenden Sonde detektiert werden. Dazu werden die Klone mit dem Restriktionsenzym Spe I geschnitten und mit der 5'Sonde im Southernblot hybridisiert. Das wildtypische Allel wird als Bande mit einer Größe von ca. 18 kb sichtbar und das rekombinierte knockout Allel als Bande von ca. 5 kb, da über den Targetingvektor eine zusätzliche Spe I Schnittstelle vor der Neomycin-Resistenz-Kassette eingefügt wurde. Eine 5' flankierende Southern-Sonde, die das wildtypische

Allel genomischer DNS von E14 Zellen detektiert, wurde bereits getestet (Abbildung 3.19). Die Klonierung des Vektors ist abgeschlossen und soll in Zukunft zur homologen Rekombination von E14 pluripotenten embryonalen Stammzellen herangezogen werden.

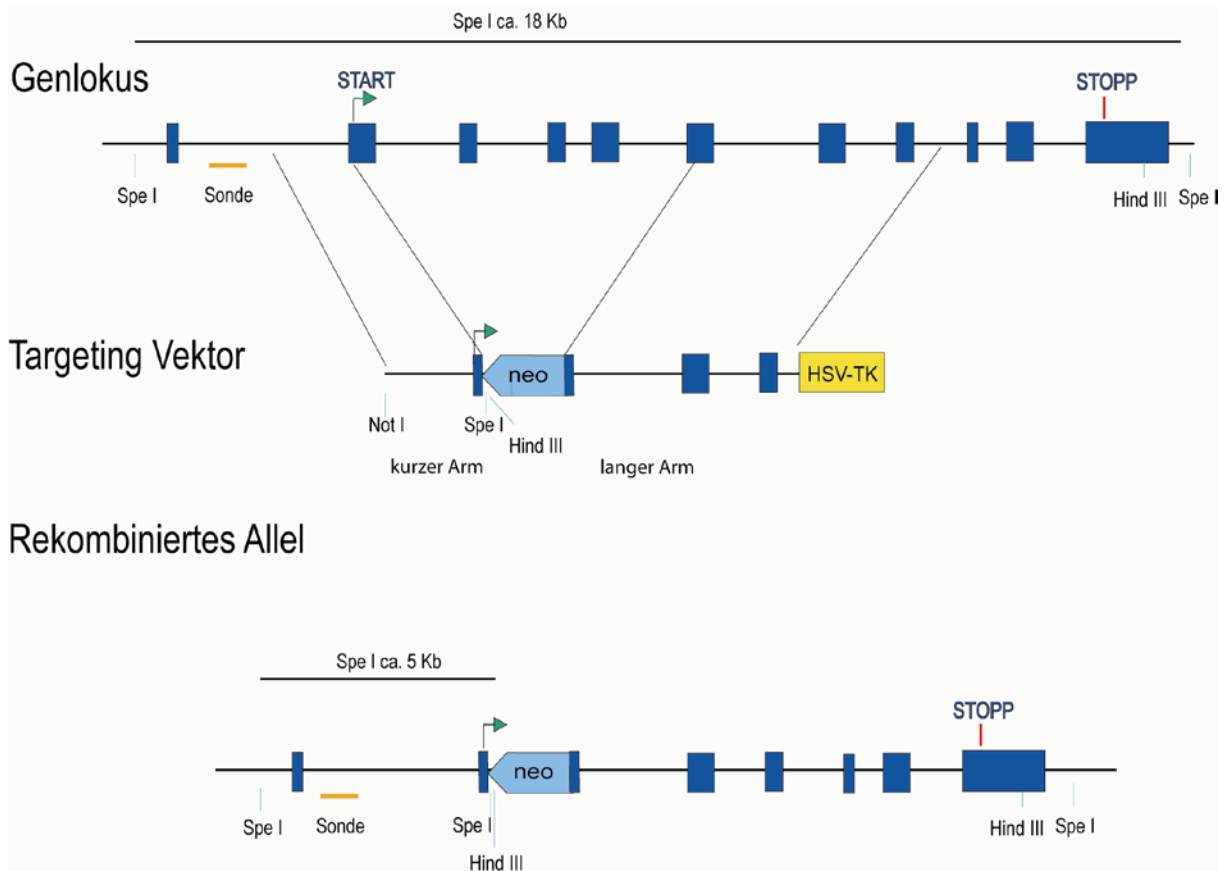


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der Rekombinationsstrategie des mGBP7 Lokus. Oben: Genlokus mGBP7. Mitte: Rekombinationsvektor mit den homologen Bereichen und den eingefügten Selektionsmarkern Neomycin-Resistenz-Kassette (neo) und HSV-Thymidinkinase Kassette (HSV-TK). Unten: Rekombinierter Lokus nach erfolgreicher Integration der Neomycin-Kassette in reverse Richtung.

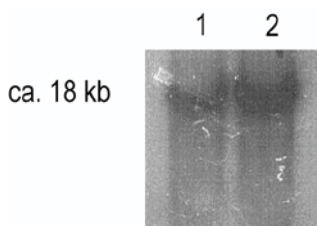


Abb. 3.19: Sondentest der 5' flankierenden Southernsonde. Zwei Proben genomischer DNS (E14) wurden mit dem Enzym Spe I verdaut und mit der P-32 radioaktiv markierten 5' Sonde hybridisiert.

3.2 AW112010-SSPII

3.2.1 *In silico* Charakterisierung von AW112010-SSPII

Ein weiteres Transkript, das bei der initialen Transkriptomanalyse als IFN γ induziert gefunden wurde, ist AW112010 (Degrandi et al., 2008). Nach IFN γ Stimulation wies AW112010 eine Expressionssteigerung von 5,5 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf. Des Weiteren zeigten die Daten der Microarray Transkriptomanalyse eine synergistische transkriptionelle Expressionssteigerung von AW112010 um den Faktor 11,3, nach simultaner Stimulation mit IFN γ und TNF.

Über das Gen AW112010 war zu Anfang der Arbeit nur die Information bekannt, welche in der NCBI Nukleotid Datenbank unter der Accession Nummer AW112010 hinterlegt war. Daraus geht hervor, dass AW112010 ein Klon einer cDNS-Bibliothek ist, die erstellt wurde, um die Genexpression in der Leber nach Dioxan Behandlung bei C57BL/6 Mäusen zu untersuchen. Dort wurde es als 536 nt lange sequenzierte cDNS-Sequenz beschrieben. Die genomische Analyse ergab, dass AW112010 ein 3 Exon Gen ist und auf Chromosom 19 des Mausgenoms lokalisiert ist.

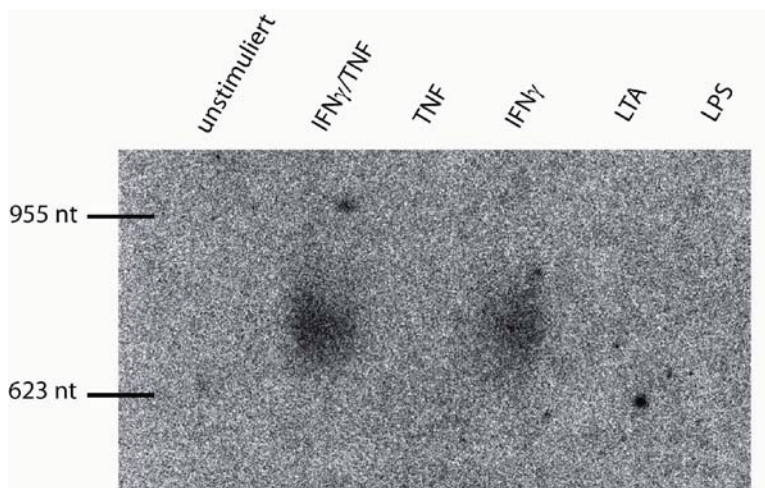


Abb. 3.20: Nachweis und Größenbestimmung der AW112010 mRNA in Ana-1 Makrophagen im Northernblot. Die Makrophagen wurden 16 h mit TNF/IFN γ , TNF, IFN γ , LTA und LPS stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Die Gesamt-RNS wurde aus den Zellen gewonnen und im Northernblot analysiert.

Bei der Überprüfung der Microarray Daten im Northernblot konnte eine für AW112010 spezifisch hergestellte Sonde eine Bande zwischen 700 und 900 nt statt bei rund 536 nt, detektieren (Abbildung 3.20). Um die Gesamtlänge der cDNS von AW112010 herauszufinden, wurde eine RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) zur Amplifikation der 3' und 5' Bereiche der cDNS mit dem BD SMART RACE cDNA Amplification KIT durchgeführt. Als Vorlage hierzu diente Gesamt-RNS aus Ana-1 Makrophagen, welche 16 h mit IFN γ und TNF (jeweils 10ng pro ml) stimuliert wurden. Die Resultate der Sequenzierung ergaben keine zusätzliche Sequenz in 5'Richtung aber eine Sequenzverlängerung in 3'Richtung. Diese Methode führte zu einer vollständigen cDNS-Sequenz, welche nun 730 nt lang war (ohne angehängte Poly(A) Sequenz) und somit mit den Größen im Northernblot vergleichbar war. An den Nukleotid-Positionen 712-

717 befindet sich das Poly(A)-Signal (AATAAA) welches für die Anheftung eines sogenannten Poly(A)-Schwanzes (Polyadenylierung) verantwortlich ist (Abbildung 3.21).

```

1  cgaattctcc  tgttttagcaa  atagtgtcccc  aaagcaattc  aaagggaaaag  tgaaactgac
61  atttctcaaac  tttatataaaa  aaaccaaaga  gaagatcagc  aggagtctag  cagacaacct
121 gagctgcaag  ATGTCTCCA  TCCCTCTGAT  ATTTATCTTT  GGTGGTGTGC  TCATCATCTG
181 CCTGATGCAA  CAATACCTGG  CGTATAAGTC  TTCTAAGAAC  GTCGTTAAAG  TCTTCTGCCA
241 TCAAGCCAAT  GATGTACATA  TATACCAGAC  CCAGGTCGTC  ATGACAAACA  CACTGGAAAC
301 CTCAAGTGA  AAAAGCCACC  CACTGGGTCG  TTCAGGAGAG  ATCCAGTCTT  TAAAGAAGCA
361 AAACTAGaga  caaaaataag  tcctcttctc  tctagatgtg  catcatctgc  ttcttccttc
421 cctagaagac  tgagggagct  atctttcaca  gagtgtattc  agtggtatac  gtggagctca
481 gaagtagaca  cttgccttgc  ctctattagg  acttgattga  acccaaatac  cacaaaattc
541 tttctctctg  ctgagaaaaa  ggaaatthta  gatgggaacc  aagcactgtg  tggtcaacat
601 ccatgagcat  ggtttaatat  acataccatg  tgcttgtttt  tctgcttggtg  aacttgtag
661 atagaaaaac  tccaagtca  tccactttta  cttgttatca  ttcagtcaca  tAATAAAttt
721 cgattgtgca  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaa

```

Abb. 3.21: RACE-PCR Ergebnis, in der NCBI-Datenbank unter expressed Sequence AW112010 hinterlegte Sequenz = 536 nt (schwarz, fett). Durch die RACE-PCR konnten im 3' Bereich weitere 219 Nukleotide (rot) identifiziert werden. Hierzu zählt das Poly(A)-Signal (blau: AATAAA), welches für die Ausbildung des Poly(A)-Schwanzes verantwortlich ist. Die vollständige mRNA Sequenz wurde in der NCBI-Datenbank unter dem Namen SSPII (gi:151349577) hinterlegt, ORF: fett, Großbuchstaben.

Die Sequenz Analyse Software Windows 32 **EditSeq** 5.02 © 1989-2001 DNASTAR ergab, dass der offene Leserahmen von AW112010 237 nt lang ist (131 bis 367nt). Die vollständige Sequenz wurde unter dem Namen SSPII, Small Secreted Protein Interferon Induced, in der NCBI Datenbank hinterlegt (gi:151349577). Der Name, SSPII, wurde gewählt, da aufgrund der folgenden Ergebnisse dieser Arbeit davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um ein kleines sezerniertes Protein handelt.

3.2.1.1 Protein-Vorhersagen

Aus dem offenen Leserahmen der Nukleotidsequenz ergibt sich eine Proteinsequenz mit 78 Aminosäuren. Dieses Protein besitzt eine Masse von ca. 8,7 kDa, mit einem Isoelektrischen Punkt (pI) bei 9,275, einer positiven Ladung von 4,33 bei pH7 (EditSeq-Berechnung) und ist daher zu den kleineren kationischen Proteinen zu zählen. Zum Vergleich: kleine GTPasen wie Ras und Rho besitzen eine molekulare Masse von 20-25 kDa, das Insulin-Molekül: 5,7 kDa, das kationische α -Defensin HNP-1: ca. 3,3 kDa, das kationische humane Peptid LL-37: 4,5 kDa.

Um Hinweise zu erhalten, welche Aufgaben ein Protein haben kann, bietet sich ein Vergleich der Sequenz mit vorhandenen Sequenzen an bzw. mit Algorithmen zur Vorhersage bestimmter Funktionen. Der ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org> vom Schweizer Institut für Bioinformatik, Genf) bietet eine Reihe von Programmen, mit denen ein unbekanntes Protein auf bekannte Strukturen oder Sequenzenmotive hin analysiert werden kann. Diese Tools wurden von verschiedenen Institutionen zur Verfügung gestellt, welche beim Aufrufen der einzelnen Programme im Internet benannt werden. Eine Auswahl von Programmen, die für eine Voranalyse von AW112010 verwendet wurden sowie der Ergebnisse, ist in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Voranalyse der AW112010-Protein-Sequenz: Vorhersageprogramme zur Voranalyse von Proteinensequenzen. <http://www.expasy.org> vom Schweizer Institut für Bioinformatik, Genf.

Programm:	Vorhersage von:	Resultat:
PROSITE	Proteinfamilien und Domänen	Keine Treffer
SignalP 3.0	Signalpeptid-Schnittstelle	Signalpeptid: ja, mit Schnittstelle an der Position 24 und 25 (YLA-YK)
TargetP 1.1	Zielsequenz -Untersuchung	Protein des sekretorischen Wegs
iPSORT	Protein-Zielort	sekretorischer Weg
TMHMM 2.0	Transmembrandomänen	1 putative TM Helix an Position 4-25
NetPhos 2.0	Phosphorylierungsstellen	3 putative Phosphorylierungsstellen an den AS 27, 59 und 62
NetOGlyc 3.1	O-Glykosylierungs-Stellen	Keine O-Glycosylierungs-Stellen
NetNGlyc 1.0	N-Glykosylierungs-Stellen	Keine N-Glykolysierungs-Stellen
ProP 1.0	Propeptid-Schnittstellen	Keine Propeptid-Schnittstelle (Arginin/Lysin) vorhanden

Für das Protein SSPII konnte mit dem Softwaretool PROSITE, das Proteinfamilien und Domänenstrukturen sucht, die mit der eingegebenen Zielsequenz vergleichbar sind, keine Übereinstimmungen mit bekannten Proteindomänen aufgezeigt werden. Hingegen wurde mit SignalP, TargetP und iPSORT jeweils ein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt, welches an der AS-Position 24-25 (YLA-YK) vom Restprotein abgeschnitten wird. Als Beispiel dafür ist in Abbildung 3.22 die Vorhersage des Programms SignalP 3.0 dargestellt. Es fand für jede Aminosäure eine Bewertung hinsichtlich Signalpeptidvorhersage (S-score), Schnittstelle (cleavage site, C-score) und der Y-score, eine Ableitung des C-Wert kombiniert mit dem S-Wert (Bendtsen et al., 2004) statt. Ein hoher S-Wert, wie für SSPII in der N-terminalen Region vorhergesagt (grüne Kurve im Bereich AS 1-24), bedeutet, dass das Protein ein Signalpeptid aufweist, ein niedriger S-Wert weist hingegen auf ein reifes Protein hin. Der C-Wert, der für jede Aminosäure jeder Position angezeigt wird, deutet auf die Schnittstelle der Signal Peptidase I (SPase I) hin und wird nur bei hoher Signifikanz angezeigt. Abgeleitet vom C-Wert wird der Y-Wert. Dieser kombiniert den C- und den S-Wert, was in einer höheren Genauigkeit der Schnittstellenvorhersage resultieren soll. Die Schnittstelle, vom Y-Wert zugewiesen, wird dort gesetzt, wo der Anstieg des S-Wertes steil und ein signifikanter C-Wert vorhanden ist (Bendtsen et al., 2004). Bei dem Protein SSPII liegt die Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 24-25 (YLA-YK). Dies würde zu einem Protein mit einer verbleibenden Größe von 54 Aminosäuren – entsprechend 6 kDa – einem pI bei 9,576 und einer positiven Ladung bei pH7 von 4,376 (EditSeq), führen.

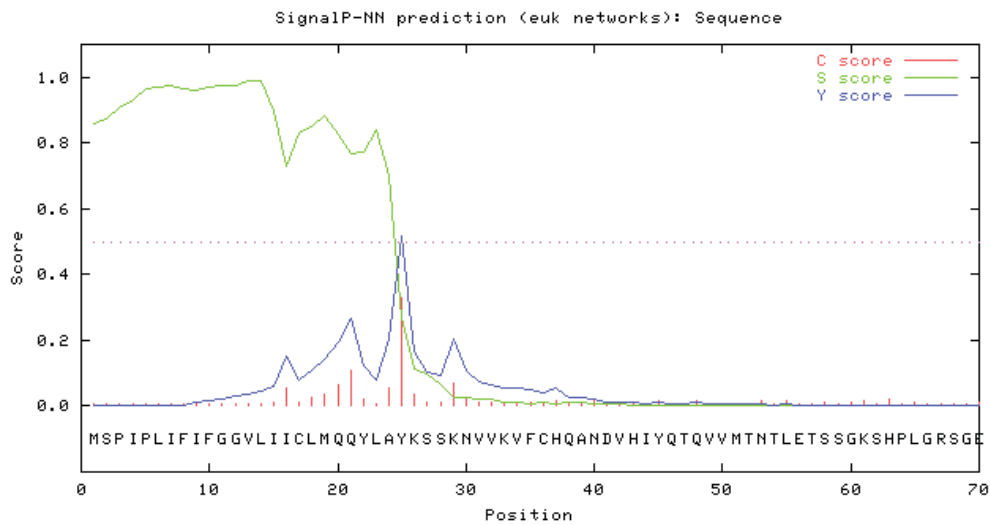


Abb. 3.22: Signalpeptid-Vorhersage mit dem Programm SignalP 3.0. Dargestellt ist die AS-Sequenz von SSPII, wobei jeder AS ein C- (rot), S- (grün) und ein Y-Wert (blau) zugeteilt wurde.

Proteine mit einer N-terminalen Signal-Sequenz assoziieren während ihrer Synthese (cotranslational) mit der ER-Membran. Diese Proteine gelangen dann in das endoplasmatische Reticulum und von dort weiter in den Golgi-Apparat. Ohne ER- oder Golgi-Rückhaltesignale werden diese Proteine durch die Plasmamembran sezerniert. Laut Vorhersage mit TargetP, wäre SSPII ein Protein des sekretorischen Weges. Mit der Software TMHMM hingegen wurde die N-terminale Sequenz von AS 4 bis 20 als Transmembrandomäne interpretiert, da beide Sequenzstrukturen (Signalpeptid und TMD) über einen hydrophoben Bereich verfügen. Für SSPII konnten außerdem 3 putative Serin-Phosphorylierungsstellen an den AS 27, 59 und 62 identifiziert werden. Viele sekretorische Proteine werden im ER oder Golgi Apparat posttranslational verändert. So werden z.B. Oligosaccharide auf bestimmte Asparaginsäure-Reste (N-Glykosylierung, im ER) oder an bestimmte Serine und Threonine (O-Glykosylierung, im Golgi-Apparat) der Proteine übertragen; für AW112010 konnten allerdings keine Glykosylierungsstellen vorhergesagt werden. Auch die Analyse, ob es sich bei AW112010 um ein Protein handelt, welches wie z.B. Insulin, zunächst als Propeptid vorliegt, wurde mit dem Programm ProP 1.0 untersucht. Da in der AS-Sequenz von AW112010 keine geeignete Schnittstelle (Arginin/Lysin) vorhanden ist, liegt AW112010 wahrscheinlich nicht als „unreifes“ Propeptid vor.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass SSPII ein kleines Protein ist, welches am rauhen ER translatiert wird und unter Abspaltung der Signalsequenz über den sekretorischen Weg mit nur geringen weiteren posttranslationalen Veränderungen (keine Glykosylierung, eventuell Phosphorylierung) sezerniert wird.

3.2.1.2 SSPII in anderen Spezies

Die im letzten Abschnitt durchgeführten Vorhersageanalysen zu SSPII ergaben, dass es sich um ein potentiell sezerniertes Protein handelt, wobei es keine bekannten Domänenstrukturen aufweist. Um weitere Informationen zu erhalten, die zur Aufklärung der Funktion beitragen oder zur Klärung der Verwandtschaft von SSPII mit anderen Proteinen in anderen Spezies, wurde der Sequenzvergleich mit BLAST N (Nukleotid-Sequenz, nr-Datenbank) und BLAST P (Protein-Sequenz) des NCBI Servers durchgeführt. Das Alignment der Treffer ist in den Abbildungen 3.23 und 3.24 mit dem Programm JalView dargestellt. Die BLAST N und BLAST P Sequenzvergleiche ergaben einen Treffer mit einer Sequenz von *Rattus norvegicus* (BLAST N: *Rattus norvegicus* predicted XM_579948.2, BLAST P: hypothetical protein *Rattus norvegicus* XP_579948.2). Es konnten keine signifikanten Treffer mit anderen Proteinen oder Nukleotid-Sequenzen in anderen Spezies gefunden werden.

Wie der Nukleotid-Sequenzvergleich in Abbildung 3.23 zeigt, gibt es über die gesamte Sequenz Übereinstimmungen in Maus und Ratte, vor allem am 5' Bereich bis nt 57 und im 3' Bereich. Basierend auf einigen Sequenzunterschieden und 9 fehlenden Nukleotiden im Vergleich zur SSPII-Sequenz käme es bei einer Translation der Rattensequenz (XM_579948) zu Verschiebungen des offenen Leserahmens gegenüber der Mausequenz. Dennoch lagen die Übereinstimmungen auf Proteinebene bei 35%. Des Weiteren führte eine TargetP Vorhersage der Ratten-Proteinsequenz zu einem mit der SSPII Sequenz vergleichbaren Ergebnis, auch hier wurde ein Protein des sekretorischen Weges vorhergesagt. Jedoch wurde mit SignalP dabei kein Signal-Peptid vorhergesagt, da die Schnittstellenvorhersage (C-score) zu schwach ist. Statt dessen ist laut Signal-Peptid-Vorhersage ein Signalanker bei der Ratten-Proteinsequenz XP_579948 wahrscheinlicher. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass noch keine Informationen zur Präsenz der Sequenz *in vivo* vorhanden sind. Da es sich bei der Sequenz XM_579948 der Ratte um eine vorhergesagte mRNA handelt (Vorhersagemethode GNOMON), gibt es keine weiteren aufschlußreichen Informationen, die mögliche Funktionen bei SSPII aufzeigen können.

```

sspii/1-237      1 ATGTCCTCCCATCCCTCTGATATTTATCTTTGGTGGTGTGCTCATCATCTGCCTGATGC 58
xm_579948/1-228 1 ATGTCCTGTGCTCCCTGGAATAATTGTCCTTGGTGGGACGATCCTCATGTGCCTGGTGT 58

sspii/1-237      59 AACAAATACCTGGC-GTATAAGTCTTCTAAGAACGTCGTTAAAGTCTTCTGCCATCAAG 115
xm_579948/1-228 59 GCC--TGCTTGCTAGTAGGAGG-----AATAATACCTGTTTCATTCTCCTACCGGAACA 109

sspii/1-237      116 CCAATGATGTACATATATACCAAGACCCAGGTGTCATGACAAACACACTGGAAACCTC 173
xm_579948/1-228 110 CCAATAATGTATATGTGCATCGGCCCCAAGTCATCATTTGAAACACAGTGT---TCTC 164

sspii/1-237      174 AAGTGGAAAAGCCACCCACTGGGTCGTTCAAGAGAGATCCAGTCTTTAAAGAAGCAA 231
xm_579948/1-228 165 AAGTGGACAAGA CCTTCCACTGGATTGTTCAAGAGAGATCCAGCTTTACAAAGAAGGAA 222

sspii/1-237      232 AACTAG 237
xm_579948/1-228 223 AACTAG 228

```

Abb. 3.23: Vergleich der Nukleotidsequenzen von SSPII (Maus) und XM_579948 (Ratte).

```

sspii/1-78      1 MSP I P L I F I F G G V L I I C L M Q Q Y L A Y K S S K N V V K V F C H Q A N D V H I Y Q T Q V V M T N T L E T S S G 60
xp_579948/1-75 1 M S V L R G I I V L G G T I L M C L V C L L A S R R N - - N T C S F S Y R N T N N V Y V H R P Q V I I E N T V F S S - G 57

sspii/1-78      61 K S H P L G R S G E I Q S L K K Q N 78
xp_579948/1-75 58 Q D L P L D C S R E I Q P Y K K E N 75

```

Abb. 3.24: Vergleich der Proteinsequenz von SSPII (Maus) und Ratte XP_579948.

Mit mRNA- oder Protein-Datenbanken des Menschen gab es mit Hilfe von BLAST N und P keine signifikanten Übereinstimmungen. Jedoch wurde über den Ensemble Browser (<http://www.ensembl.org>) der genomische Lokus von AW112010/SSPII untersucht und mit dem der Ratte (XM_579948) verglichen. Ein Vergleich bekannter Gene 3' und 5' der Genloci SSPII (Chromosom 19) und Ratte XM_579948 (Chromosom 1) ergab eine Übereinstimmung der Lage bekannter Gene wie z.B. Ms4a8a (membrane spanning 4 domain subfamily 8a), Ms4a10, Ccdc86 (coiled coil domain containing 86) und Zp1 (zona pelucida glycoprotein 1). Diese bekannten Gene befinden sich in derselben Anordnung auf dem Chromosom 11 des humanen Genoms, jedoch ohne Hinweis auf ein SSPII oder XM_579948 ähnliches Gen (Vergleich Lokus AW112010 (Maus) und XM_579948 (Ratte) über <http://www.ensembl.org/>).

3.2.2 Expressionsanalyse von SSPII

3.2.2.1 Expression in Ana-1 und Knochenmarks-Makrophagen

Nach den umfangreichen *in silico* Analysen und Vorhersagen, sollten zunächst die Array Daten validiert werden. Hierzu wurden Ana-1 Makrophagen mit unterschiedlichen Stimuli für 16 h inkubiert (10 ng/ml IFN γ , 10 ng/ml TNF, je 10 ng/ml IFN γ /TNF, 100 ng/ml LPS, 1 μ g/ml LTA) und die Gesamt-RNS mit Trizol aufgereinigt. 15 μ g RNS je Probe wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine Membran geblottet. Die spezifische RNS-Sonde für SSPII wurde mit α P³²-dCTP markiert und konnte dann mit der Membran hybridisieren. Das Signal wurde mit einem Phosphoimager detektiert (Abbildung 3.25). In Ana-1 Makrophagen war keine Basalexpression von SSPII detektierbar, erst nach IFN γ Stimulation konnte ein Signal im Northernblot nachgewiesen werden und nach IFN γ /TNF Stimulation wurde SSPII synergistisch hochreguliert. Die Stimulation mit TNF alleine sowie die Stimuli mit den TLR-Liganden LPS und LTA ließen im Northernblot keine SSPII mRNA erkennen.

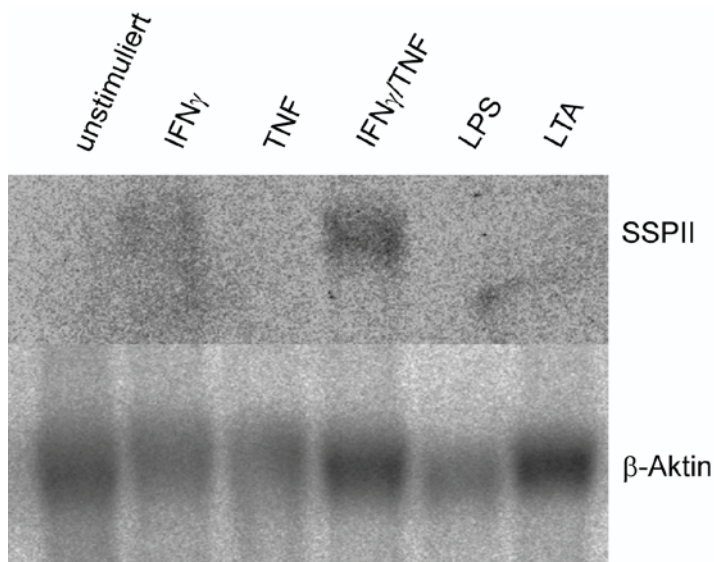


Abb. 3.25: Northernblot-Analyse von SSPII mRNA und β -Aktin. Ana-1-Makrophagen wurden 16 h mit IFN γ , TNF, IFN γ /TNF sowie den TLR-Liganden LPS und LTA stimuliert. 15 μ g Gesamt-RNS wurden je Ansatz aufgetragen.

Während der Northernblot nur eine geringe IFN γ -Regulation vermuten lässt, wurde eine Kinetik von 0 bis 48 h Stimulationsdauer mit IFN γ von Ana-1 Makrophagen durchgeführt (Abbildung 3.26). Aus den Zellen wurde cDNS synthetisiert und mit spezifischen Primern und Sonden für SSPII und β -Aktin wurden anschließend Real-time PCRs durchgeführt. Hierbei wurde eine Steigerung der Transkriptmenge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle im Laufe der Stimulationszeit deutlich nachgewiesen. Während nach 2 h noch keine Erhöhung der Transkriptmenge stattgefunden hat (Ratio=1), wurde ein stetiger Anstieg (Ratio=7,7; 18; 31) von 6 über 16 bis 24 h Stimulation gemessen. Der Wert der Ratio steigt von 24 bis 48 h auf mehr als das Vierfache an, was auf sekundäre Effekte schließen lassen könnte, wie z.B. IRF-1 Produktion, TNF Produktion mit autokriner Wirkung auf die Makrophagen und synergistischem Effekt zu IFN γ .

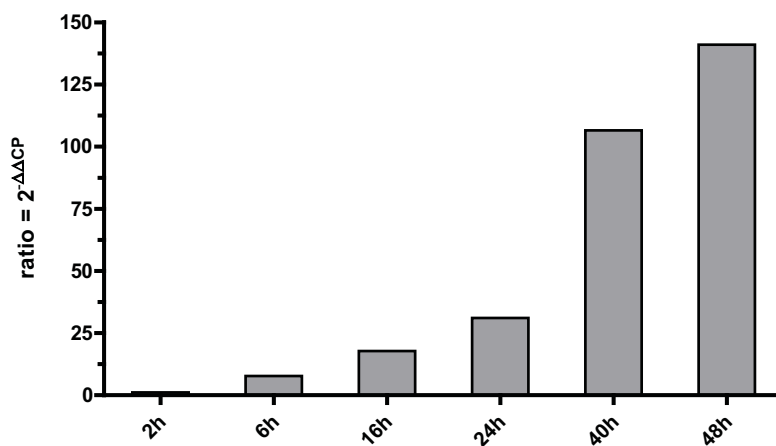


Abb. 3.26: SSPII-Expression in IFN γ stimulierten Makrophagen. Ana1-Makrophagen wurden in einer Dichte von 2×10^6 Zellen am Vortag ausgesät und mit IFN γ 2, 6, 16, 24, 40 und 48 h stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die RNS mit TRIZOL aufgereinigt, in cDNS umgeschrieben und Real-time PCR Analysen mit spezifischen Primer und Sonden für SSPII und β -Aktin durchgeführt. Die relative Veränderung zum unstimulierten Zustand, normalisiert zur β -Aktin-Kontrolle wurde mit der delta-delta-CP-Methode (Pfaffl, 2001) ermittelt und dargestellt.

In weiteren Analysen wurden aus Knochenmark von C57BL/6 Mäusen in 10 Tagen unter Verwendung von M-CSF Makrophagen generiert und mit unterschiedlichen Stimuli 16 h behandelt. Nach Ernten der Zellen, RNS-Aufbereitung und cDNS-Synthese wurden SSPII und iNOS Real-time PCR Analysen durchgeführt (Abbildung 3.27). Nach Zytokinstimulation ($\text{IFN}\gamma$, TNF, $\text{IFN}\gamma$ /TNF und $\text{IFN}\beta$) sowie nach Stimulation mit den TLR-Liganden LPS und poly (I:C) konnte jeweils eine deutliche Transkriptionssteigerung gemessen werden. Im Gegensatz zu den Ana-1 Stimulationen trat in den Knochenmarks-Makrophagen kein synergistischer Effekt durch $\text{IFN}\gamma$ /TNF Kostimulation auf. Das typischerweise auf T-Zellen wirkende Zytokin IL-2 wurde hier als Negativkontrolle benutzt und zeigte in den Makrophagen keine Auswirkungen auf die Expression von SSPII (Ratio bei 1).

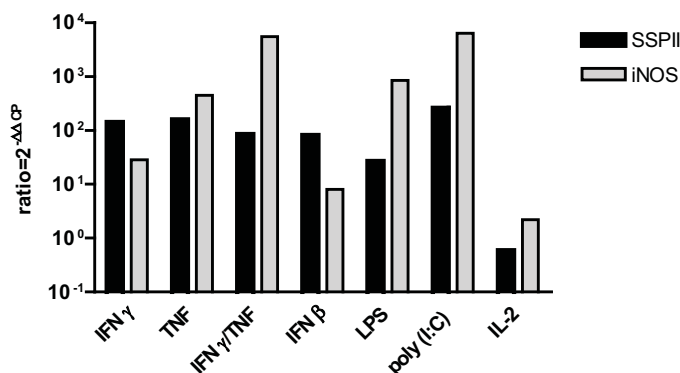


Abb. 3.27: SSPII Induktion durch verschiedene Stimuli (16 h) in Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen. Die Zellen wurden 16 h mit den angegebenen Stimuli behandelt, die RNS aus den Zellen aufgereinigt und in cDNS umgeschrieben. Real-time PCRs wurden generiert und mittels der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode (Pfaffl, 2001) analysiert und als Ratio dargestellt.

Ob die Hochregulation von SSPII Transkripten von der Signalweiterleitung über den $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor abhängt, wurde in weiteren Versuchen untersucht, bei denen Knochenmarksmakrophagen aus $\text{IFN}\gamma\text{R ko}$ Mäusen generiert wurden. Auch diese wurden für 16 h mit $\text{IFN}\gamma$, als Negativkontrolle, mit TNF, $\text{IFN}\beta$ und den TLR-Liganden LPS und poly (I:C) stimuliert. Nach der Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ konnte weder eine Hochregulation von SSPII noch von dem Kontroll-Gen iNOS ermittelt werden. Hingegen konnte eine deutliche Zunahme beider Gen-Transkripte durch die Zytokine TNF und $\text{IFN}\beta$ sowie die TLR-Liganden LPS und poly (I:C) gemessen werden (Abbildung 3.28).

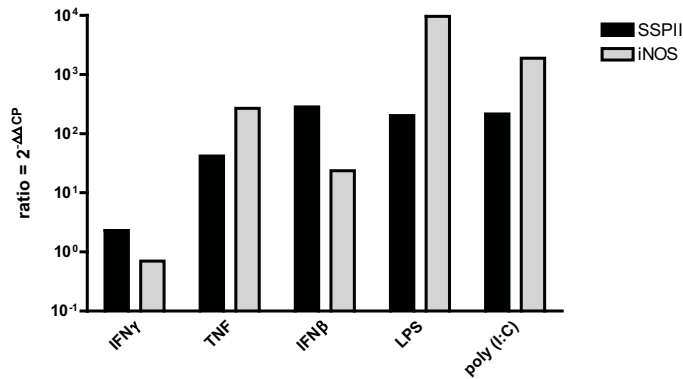


Abb. 3.28: SSPII Induktion durch verschiedene Stimulationen (16 h) in Knochenmarksmakrophagen aus IFN γ R⁻ Mäusen. Die Zellen wurden mit IFN γ , TNF, IFN β und den TLR-Liganden LPS und poly (I:C) stimuliert, die RNS aufgereinigt und cDNS synthetisiert. Real-time PCRs von SSPII und iNOS wurden mittels der $\Delta\Delta$ CP-Methode analysiert (Pfaffl, 2001) und sind als Ratio dargestellt.

3.2.2.2 Expression von SSPII in der Infektion

Die Regulation von SSPII durch Typ I und II Interferone sowie TNF und TLR Liganden konnte in den vorherigen *in vitro* Versuchen eindeutig gezeigt werden. Diese Zytokine sowie die Erkennung von Pathogenen über TLRs spielen bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort eine wichtige Rolle.

Ob auch in der Abwehr gegen verschiedene Pathogene SSPII transkribiert wird, sollte durch Infektionsversuche mit den Modellpathogenen *Listeria monocytogenes* und *Toxoplasma gondii* untersucht werden.

Zunächst wurden C57BL/6 Mäuse mit der Infektionsdosis 0,1 x LD₅₀ i.p. mit Listerien infiziert. Nach 8, 24 und 48 h wurden die Tiere durch cervicale Dislokation getötet und die Organe entnommen. Aus diesen Organen wurde RNS aufbereitet sowie Proteinlysate hergestellt. Nicht infizierte Tiere unter gleichen Haltungsbedingungen dienten als uninfizierte Kontrolle. Die Gesamt-RNS pro Organ, Maus und Zeitpunkt wurde aufgereinigt und gemessen. In Abbildung 3.29 ist ein Northernblot der Organe Milz und Leber zu den Zeitpunkten 0 und 48 h dargestellt. Aufgetragen sind jeweils 15 μ g RNS. Zum Zeitpunkt 0 h war in der Milz bei keiner der zwei Mäuse SSPII-RNS detektierbar, allerdings konnte in diesen Proben generell sehr wenig RNS (β -Aktin-Kontrolle) detektiert werden, so dass eine Aussage schwer zu treffen ist. Nach 48 h war in der Milz ein deutliches Signal von SSPII Transkripten messbar. In der Leber konnte schon zum Zeitpunkt 0 h SSPII detektiert werden. Dieses Signal wurde bei den 48 h Werten deutlich höher und zeigte zum einen, dass SSPII in der Leber schon in uninfizierten Tieren basal exprimiert wurde und zum anderen, dass es in diesem Organ nach Infektion hochreguliert wurde.

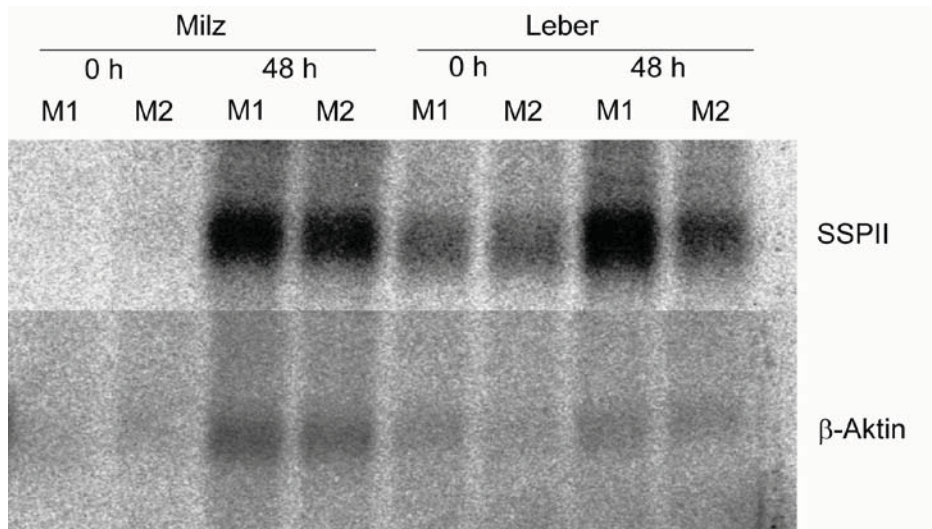


Abb. 3.29: Northernblot-Analyse, SSPII mRNA in Milz und Leber nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils 15 µg Gesamt-RNS. Die Hybridisierung erfolgte mit spezifischen Sonden gegen SSPII und β -Aktin. Die Detektion der radioaktiv (P-32) markierten Banden erfolgte mit einem Phosphoimager.

Für weitere Analysen zur Expression von SSPII wurden aus der RNS cDNS synthetisiert und Real-time PCRs erstellt. Um die jeweilige Menge an RNS (bzw. cDNS) in verschiedenen Organen von jeweils zwei Mäusen pro Zeitpunkt zu bestimmen, wurde von der $\Delta\Delta\text{CP}$ Methode abgeleitet der ΔCP Wert der PCRs ermittelt und über die Formel $2^{-\Delta\text{CP}}$ die Transkriptmenge berechnet. Dieser Wert gibt dann die zu β -Aktin normalisierte Menge des Transkriptes zum jeweiligen Zeitpunkt an und nicht die Erhöhung bzw. Ratio. Zur besseren Darstellung wurden alle Werte mit dem Faktor 10.000 multipliziert.

Die Berechnung der Transkriptmenge nach der Real-time PCR von SSPII und iNOS wurde in den Organen Milz, Leber, Thymus, Niere, Lunge und Gehirn durchgeführt und in Abbildung 3.30 dimensionslos dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von jeweils 2 Proben dar. In der Milz war eine Basalexpression von SSPII bei 0 h zu erkennen (Wert 100) der Wert stieg abhängig von der Infektion auf den Mittelwert 400 bei Zeitpunkt 48 h nach Infektion an. In der Leber war die SSPII Transkriptmenge bei 0 Stunden deutlich höher als beim 0 Stunden-Wert der Milz und stieg bis 48 h nach Infektion noch weiter deutlich an (Wert 0 h: 340; 48 h: 615). Die SSPII Transkription wurde auch im Thymus (0 h:20; 48 h: 550), in der Niere (73; 420) und der Lunge (65; 180) durch die Infektion mit Listerien erhöht. Hingegen fand im Gehirn fast keine Transkription von SSPII statt (Werte: 2; 8). Die Werte für die iNOS-Kontrolle zeigten eine deutliche Induktion der iNOS mRNA in der Milz nach Infektion (0 h: 0,16; 48 h: 67) eine geringere Erhöhung in der Leber (0,2; 8) und nur sehr wenig Transkripte in Thymus, Niere, Lunge und Gehirn zu den angegebenen Zeitpunkten.

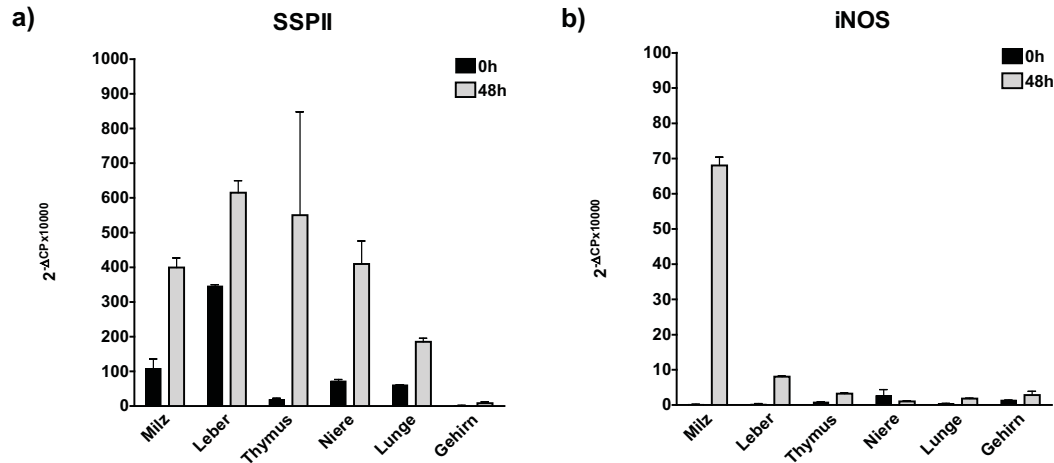


Abb. 3.30: Transkriptionsmenge von a) SSPII und b) iNOS induziert durch Listerien-Infektion in verschiedenen Organen zum Zeitpunkt 0 h und 48 h p.i. Die Werte beider Gene wurden auf β -Aktin normalisiert und in dimensionsloser Einheit dargestellt.

Die Expressionsanalyse mittels Northernblot und Real-time RT PCR zeigten eine basale Expression von SSPII in der Leber, welche noch durch die Infektion mit Listerien erhöht wurde, sowie infektionsbedingte Induktionen von SSPII in den Organen Milz, Thymus, Lunge und Nieren. Allerdings wurde auch deutlich, dass im Gehirn keine basale SSPII Expression stattfindet, diese wurde zu den angegebenen Zeitpunkten auch nicht nach Infektion induziert.

Durch die Etablierung eines polyklonalen Antikörpers gegen SSPII aus immunisierten Kaninchen sollte im Weiteren endogenes SSPII-Protein nachgewiesen werden. Da in Vorexperimenten festgestellt wurde, dass das Protein nur in sehr geringen Mengen vorliegt, wurde für den Proteinnachweis in Organen eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei wurden die Organlysate (je $\frac{1}{2}$ Organ, Leber: $\frac{1}{8}$) mit dem Kaninchen-anti-SSPII-Antikörper bei 4°C vorinkubiert und danach die Antikörper an G-Sepharose gekoppelt. Das Präzipitat wurde dann nach Abtrennung von der Sepharose-Matrix denaturiert und Westernblots erstellt. Das SSPII Protein wurde darauf wieder mit dem polyklonalen Antikörper auf dem Westernblot detektiert. In Abbildung 3.31 sind die Ergebnisse der Immunpräzipitation mit nachfolgendem Nachweis durch Westernblot dargestellt.

Dabei konnte in der Milz 48 h p.i SSPII Protein in beiden Mäusen der jeweiligen Gruppe nachgewiesen werden, wohingegen in den uninfizierten Kontrollen kein SSPII detektierbar war. In der Leber konnte deutlich eine basale Produktion des SSPII Proteins festgestellt werden. Nach 48 h Infektion mit Listerien wurde die SSPII Translation in der Leber zumindest einer Maus (Maus 1) deutlich gesteigert. In den Organen Lunge, Thymus und Gehirn konnte weder in den uninfizierten Kontrollen, noch nach 48 h Infektion mit Listerien, SSPII Protein detektiert werden. Die Größe des detektierten Proteins lag bei ca. 6,5 kDa. Die Spezifität der detektierten Bande wurde mit Hilfe des Peptidblocks bei Leberlysaten getestet (Daten nicht gezeigt).

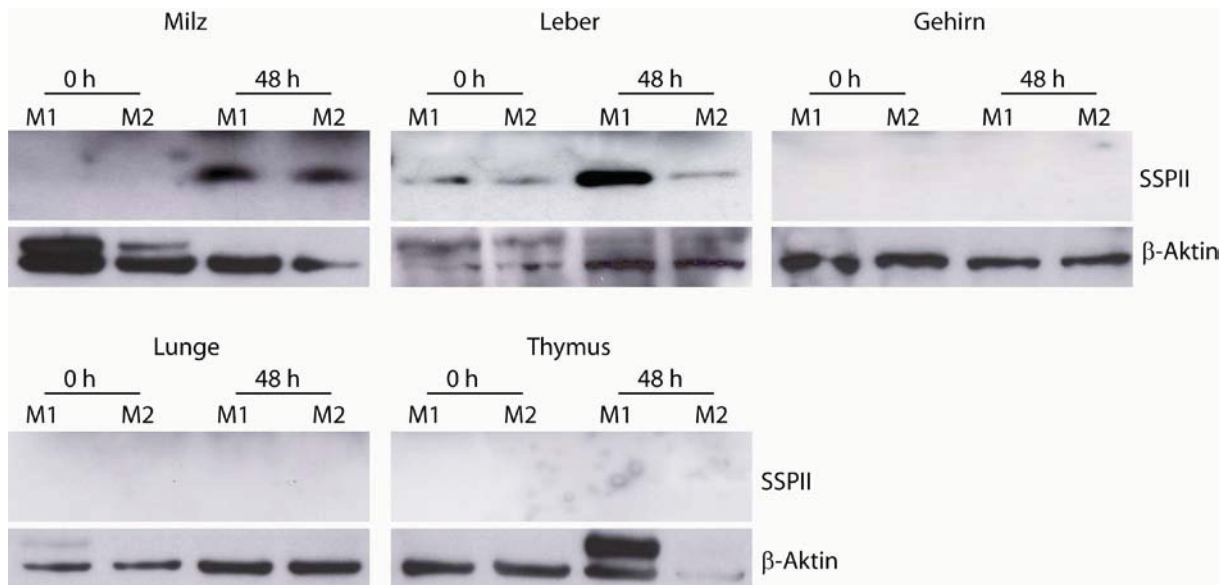


Abb. 3.31: Immunpräzipitation von SSPII Protein verschiedener Organlysate nach Listerien-Infektion. Dargestellt sind pro Organ zwei Zeitpunkte mit je 2 Mäusen (0 und 48 hpi, Maus 1 und Maus 2). In den jeweiligen oberen Reihen sind die Resultate der Immunpräzipitation und Westernblotanalyse von SSPII (ca. 6,5 kDa) mit polyklonalem anti-SSPII-Antikörper und darunter die Ladekontrolle der Lysate mit anti- β -Aktin (ca. 45 kDa) dargestellt.

In einem weiteren Infektionsmodell wurden C57BL/6 Mäuse mit dem obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* infiziert. Jeweils 3 Tieren wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Organe Milz und Lunge entnommen und gesamt RNS gewonnen. Real-time Analysen zur Ermittlung der Expressionserhöhung wurden für SSPII und die Kontrollgene iNOS und $\text{IFN}\gamma$ erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 als Ratio ($2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$) dargestellt. In der Milz konnte eine Expressionszunahme von SSPII ab 7 Tage nach Infektion gemessen werden, welche bis Tag 12 nach Infektion wieder leicht abnahm. Die iNOS Expression nahm erst ab Tag 7 nach Infektion zu, während die $\text{IFN}\gamma$ Induktion schon 5 Tage nach Infektion erfolgte. In der Lunge war der höchste Wert der SSPII Induktion im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle schon nach 5 Tagen erreicht und nahm dann bis 12 Tage nach Infektion wieder ab, obwohl in der Lunge die Transkription von $\text{IFN}\gamma$, welche auch für die SSPII Expression verantwortlich ist, noch bis 12 Tage nach Infektion weiter zunahm.

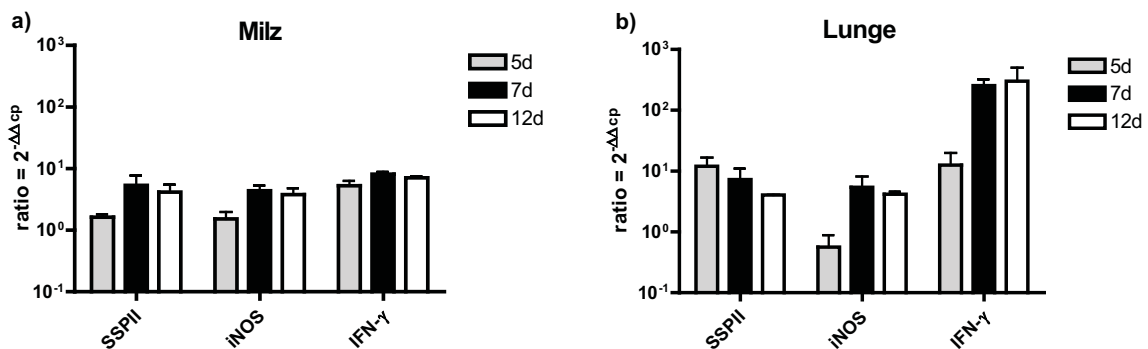


Abb. 3.32: Expression von SSPII, iNOS und $\text{IFN}\gamma$ Transkripten (Real-time-PCR) in den Organen a) Milz und b) Lunge von *T. gondii* infizierten C57BL/6 Mäusen (n=3). Infektionsdosis: 20 Zysten intraperitoneal. Dargestellt sind die Expressionserhöhungen relativ zur uninfizierten Kontrolle, normalisiert auf β -Aktin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SSPII auch in diesem Infektionsmodell eine Rolle spielen kann, da eine Zunahme der Transkriptmenge in Milz und Lunge messbar war.

Ein weiterer einzelliger Parasit ist *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der südamerikanischen Chagas Krankheit. Gesamt-RNS aus Milzen von infizierten C57BL/6 Mäusen (n=3), welche mit 50 Blutstadien (trypomastigote) von *T. cruzi* i.p. infiziert wurden, wurden von Christoph Hölscher, Tuberkulosezentrum Borstel, zur Verfügung gestellt. Nach cDNS Synthese konnten Real-time PCRs von SSPII und den für eine adaptive Immunabwehr wichtigen Kontrollgenen iNOS, IFN γ und IL-12p40 erstellt werden. Da nur RNS von Milzen der Zeitpunkte 8 und 14 Tage nach Infektion vorhanden waren, wurden die Werte wie zuvor bei der Listerien-Infektion nicht auf uninfizierte Kontrolltiere relativiert, sondern die CP-Werte der PCR auf β -Aktin normalisiert und als Transkriptmenge (dimensionslos) zu den Zeitpunkten 8 und 14 Tagen nach Infektion dargestellt. Die in Abbildung 3.33 dargestellten Resultate zeigen, dass während der *T. cruzi* Infektion SSPII RNS produziert wurde und von Tag 8 bis Tag 14 nach Infektion ansteigt. In dieser Zeitspanne nahmen auch die Transkriptmengen von iNOS und IFN γ stark zu, während IL-12p40 wieder abnahm.

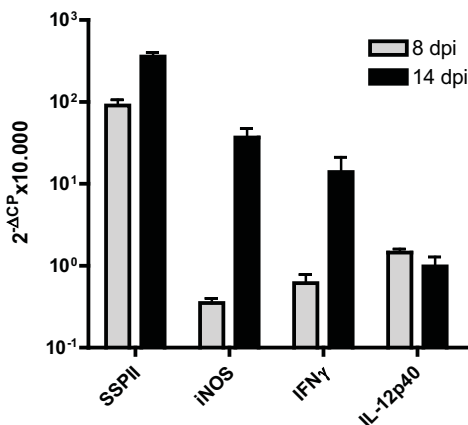


Abb. 3.33: mRNS Expression von SSPII, iNOS, IFN γ und IL-12p40 während der *Trypanosoma cruzi* Infektion in der Milz von C57BL/6 Mäusen zu den Zeitpunkten 8 und 14 dpi (n=3). Die Expression wurde normalisiert zu β -Aktin ($2^{-\Delta CP} \times 10.000$). Die Mäuse wurden mit einer Infektionsdosis von 50 Trypanosomen (Stamm Tulahuen) i.p. infiziert. Die mRNS wurde von Christoph Hölscher, Tuberkulosezentrum Borstel, zur Verfügung gestellt.

Alle drei Infektionsmodelle ergaben, dass in der ersten Phase der jeweiligen Infektion, mit dem grampositiven Bakterium *L. monocytogenes*, den intrazellulären Parasiten *T. gondii* (Apicomplexa) und *T. cruzi* (Kinetoplastida), die Transkription von SSPII induziert wurde. Zusätzlich wurde das SSPII Protein durch die Listerien-Infektion in der Milz und in der Leber induziert. Des Weiteren lagen geringe Mengen SSPII Protein in der Leber als basal exprimiertes Protein in uninfizierten Mäusen vor.

3.2.3 Nachweis der Sekretion *in vitro*

Der N-terminale Bereich der SSPII Aminosäuresequenz weist, wie im Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, auf ein Signalpeptid hin. Da die weitere Sequenz lt. *in silico* Analysen keine ER- oder Golgi-Rückhaltesequenz beinhaltet, könnte SSPII demnach ein sekretorisches Protein sein. Um dies experimentell zu untersuchen, wurde ein Fusionskonstrukt von SSPII mit 6 Histidinen am C-Terminus unter der Kontrolle des EF-Promoters (EF= humaner Elongationsfaktor 1 α) hergestellt. Damit wurden je 2×10^6 293T-Zellen transient transfiziert (Kalzium-Phosphat-Methode). Nach einem Tag wurde das Vollmedium ersetzt durch Medium ohne FKS. Nach weiteren 48 Stunden wurde dann der Überstand entnommen und mit der 5 fachen Menge Aceton gefällt. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit Ethanol wurde das Protein-Pellet in PBS mit Proteaseinhibitor aufgenommen und stand zur Analyse bereit. Aus den Zellen wurde Zellysate erstellt. Drei Ansätze unter vergleichbaren Bedingungen wurden durchgeführt und im Western-Blot analysiert. Abbildung 3.34 zeigt den Nachweis des Fusionsproteins SSPII-6xHis mit einem Tetra-His-Antikörper.

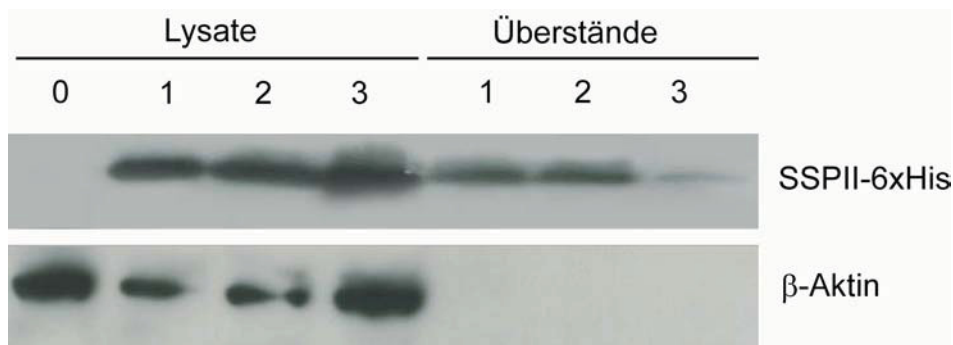


Abb. 3.34: Sekretionsnachweis von SSPII-6xHis Fusionsprotein. 293T Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pEF-Sem-SSPII-6xHis (Lysate/Überstände 1-3) sowie mit dem Leervektor pEF-Sem (Lysat 0) transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Überstände abgenommen und mit Aceton die Proteine gefällt sowie aus den Zellen Zellysate erstellt und daraus ein Westernblot hergestellt. Die obere Reihe zeigt den Westernblot nach Inkubation mit Tetra-His-Antikörper, die untere Reihe zeigt denselben Westernblot nach Inkubation mit β -Aktin-Antikörper.

In der oberen Reihe der Abbildung 3.34 sind die Banden des SSPII-6xHis Fusionsproteins gezeigt, in der unteren Reihe die β -Aktin-Banden. In der ersten dargestellten Spalte (Lysat 0) wurde das Lysat von 293T-Zellen, transfiziert mit dem Leervektor (Konstrukt ohne SSPII-6xHis), aufgetragen. In den nächsten drei Spalten wurde Zellysate der drei Transfektions-Ansätze mit dem Fusionskonstrukt (Lysate 1-3) und in den letzten drei Spalten die jeweiligen Überstände (1-3) der Transfektion mit Fusionskonstrukt aufgetragen. Während im Leer-Vektor-Lysat keine SSPII-6xHis Bande detektierbar war, konnte sowohl in den Lysaten 1 bis 3, als auch in den dazugehörigen Überständen 1 bis 3, SSPII-6xHis nachgewiesen werden. Die β -Aktin-Kontrolle zeigt deutlich, dass zwar in allen aufgetragenen Lysaten β -Aktin meßbar war, jedoch nicht in den Überständen. Das weist darauf hin, dass die Überstände, die vor Ernte abzentrifugiert wurden, frei von abgelösten Zellen oder Zellbestandteilen sind.

Dieser Versuch belegt die Sezernierung von SSPII-Protein in den Überstand von SSPII produzierenden Zellen.

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation von SSPII

Die Aminosäuresequenz von Proteinen trägt Erkennungssequenzen, die für die jeweilige Lokalisation des reifen Proteins verantwortlich sind (Blobel, 2000). Die SSPII Sequenz weist ein solches Erkennungsmotiv am N-Terminus auf. Die durch einen hydrophoben Bereich gekennzeichnete Leader Sequenz deutet zum einen auf ein putatives Signalpeptid hin, zum anderen auf eine Transmembran-Helix (vgl. Kapitel 3.2.1.1 Proteinvorhersage durch SignalP und TMHMM). Um die subzelluläre Lokalisation von SSPII zu bestimmen, wurden daher SSPII Fusionskonstrukte erstellt und in RAW 264.7 Makrophagen oder 293T-Zellen transient transfiziert. In Abbildung 3.35 sind die subzellulären Lokalisationen von zwei unterschiedlichen SSPII-Fusionsproteinen dargestellt. Zunächst wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem das Fusionsprotein das rot fluoreszierende DsRed am C-Terminus trägt (SSPII-DsRed). Mit einem weiteren Konstrukt sollte die Auswirkung der SSPII-Signalsequenz untersucht werden. Dafür wurde das Konstrukt so kloniert, dass das DsRed-Protein am N-Terminus des Fusionsproteins liegt (DsRed-SSPII).

Die Lokalisationen der beiden Fusionsproteine waren sehr unterschiedlich: befand sich SSPII am N-Terminus, so lag das Protein netzartig im Zytoplasma der Zelle vor, der Zellkern (DAPI-Färbung) blieb ausgespart; d.h. hier war kein SSPII-DsRed-Protein lokalisiert (obere Reihe). Wurde die putative N-terminale Signalsequenz von SSPII vom vorgelagerten DsRed-Protein verdeckt (DsRed-SSPII), so lag das Fusionsprotein ubiquitär in der Zelle und im Zellkern vor.

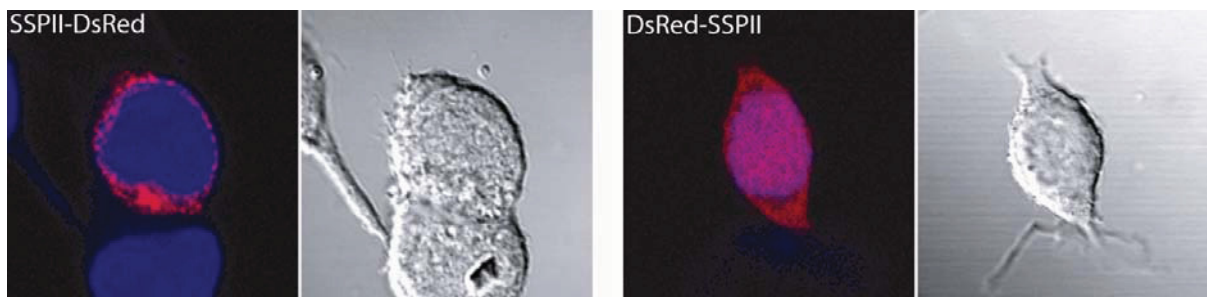


Abb. 3.35: Subzelluläre Lokalisation von SSPII-DsRed Fusionsproteinen in 264.7 RAW-Makrophagen. Links: SSPII-DsRed Fusionsprotein (rot) und Zellkerngegenfärbung mit DAPI. Rechts: DsRed-SSPII Fusionsprotein (rot) und Zellkerngegenfärbung mit DAPI. Grau: Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

Als nächstes sollte die Identität der subzellulären Kompartimente genauer untersucht werden, in denen sich das SSPII-Protein befindet. Daher wurden 293T-Zellen mit SSPII-DsRed transfiziert sowie simultan mit grün fluoreszierende GFP-gekoppelten Proteinen, die Zielsequenzen für bestimmte Zellkompartimente besitzen. Bei der Untersuchung der potentiellen Kolokalisation von SSPII mit Mitochondrien wurde ein SSPII-GFP Fusionskonstrukt verwendet, da der Mitochondrienmarker nur mit DsRed fusioniert vorlag. Nach 2 Tagen wurden die Zellen fixiert

und mit DAPI der Zellkern gegengefärbt. Die hergestellten Präparate wurden dann im Konfokalmikroskop analysiert. Überlagerungen der beiden Fusionsproteine sind als gelbe Bereiche im konfokalen Überlagerungsbild erkennbar (Abbildung 3.36).

In der oberen Reihe wurde das SSPII-GFP Fusionskonstrukt mit dem Mitochondrien-DsRed Konstrukt ko-transfiziert. Im Überlagerungsbild sind einige Bereiche erkennbar, bei denen SSPII mit Mitochondrien kolokalisiert. In der Reihe darunter wurde die Lokalisation von SSPII-DsRed mit Membranen-CFP Proteinen untersucht. Auch hier sind einige wenige Überlagerungsbereiche erkennbar, jedoch fand beim größten Teil der Moleküle keine subzelluläre Kolokalisation der Proteine statt. Kolokalisationen mit Endosomen (mittlere Reihe) konnten nur in wenigen Bereichen ermittelt werden. Die größten Übereinstimmungen mit SSPII-DsRed Protein konnten mit den subzellulären Organellenbereichen endoplasmatisches Retikulum (ER, zweite Reihe von unten) sowie Golgi-Apparat (untere Reihe) beobachtet werden.

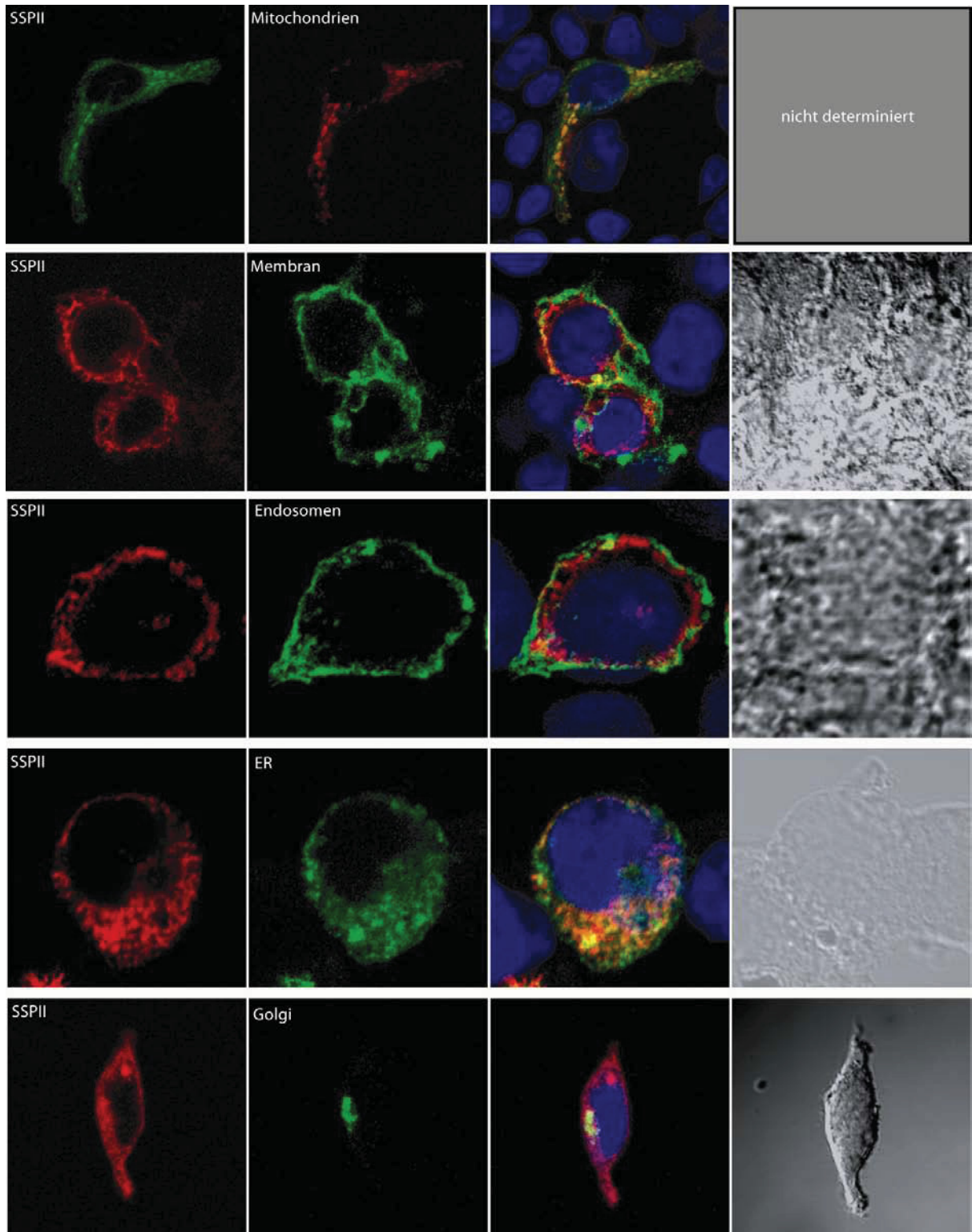


Abb. 3.36: SSPII Lokalisation mit subzellulären Kompartimenten. 293T Zellen wurden mit SSPII sowie verschiedenen Markerkonstrukten für die Organellenbereiche Mitochondrien, Lipidmembranen, Endosomen, endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Apparat, kotransfiziert. Die erste Spalte zeigt das SSPII-Fusionsprotein, die zweite Spalte das jeweilige organellenspezifische Markerprotein, die dritte Spalte die Überlagerung der Spalte eins und zwei mit dem Kernfarbstoff DAPI und die vierte Spalte die Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

Des Weiteren sollte überprüft werden, wie sich die subzelluläre Lokalisation von SSPII bei einer Infektion von RAW 264.7 Makrophagen mit dem intrazellulären Parasiten *T. gondii* (ME49) verhält. Hierzu wurden RAW 264.7 Zellen transient mit SSPII-GFP transfiziert, nach 24 h mit $\text{IFN}\gamma$ über Nacht stimuliert und weitere 2 h mit Toxoplasma Tachyzoiten (MOI 10) infiziert. Danach wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und die Parasiten mit anti-SAG1 Antikörper gefärbt. Der Kern wurde wieder mit DAPI gegengefärbt. Die Präparate wurden ebenfalls im konfokalen Mikroskop analysiert (Abbildung 3.37). Hierbei konnten keine Assoziationen des SSPII Proteins mit dem intrazellulären Parasiten beobachtet werden, unabhängig von einer $\text{IFN}\gamma$ Vorstimulation.

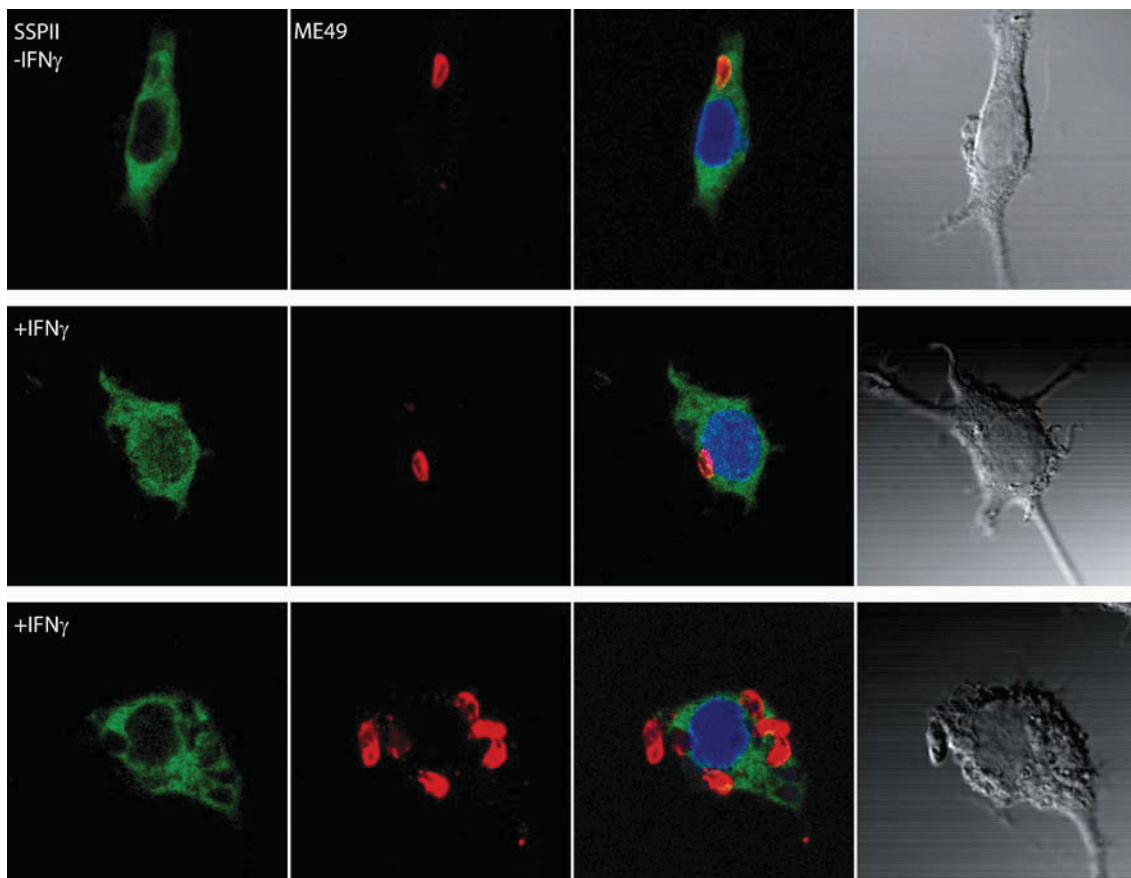


Abb. 3.37: SSPII-Lokalisation in *T. gondii* (ME 49) infizierten 264.7 RAW Makrophagen. Erste Spalte: SSPII-GFP (grün), zweite Spalte: Toxoplasma (rot), dritte Spalte: Überlagerungsbild aus Spalte eins und zwei mit dem Kernfarbstoff DAPI, vierte Spalte: Differential-Kontrastaufnahme der Zellen.

Aufgrund der in diesem Abschnitt vorgestellten Beobachtungen lässt sich zusammenfassend schließen, dass das SSPII-Protein vor allem im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi Apparat, außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist. Weder die Vorstimulation mit $\text{IFN}\gamma$ noch die Infektion mit *T. gondii* veränderten die Lokalisation von SSPII innerhalb der Zelle.

3.2.5 Gene Targeting: Inaktivierung des SSPII Gens der Maus

Wie in Abschnitt 3.1.7 für mGBP7 beschrieben, sollte zur detaillierten Aufklärung der Funktion von SSPII im Gesamtorganismus eine SSPII-defiziente Mauslinie generiert werden. Zunächst sollte eine embryonale Stammzelllinie (ES) aus 129/Ola Mäusen mit homologer Rekombination des SSPII-Lokus generiert werden. Ziel dabei ist die erfolgreiche Keimbahntransmission des gentechnisch veränderten Genlokus zur Generierung einer SSPII defizienten Mauslinie.

Die Rekombinations-Strategie ist in Abbildung 3.38 gezeigt. Der Genlokus von SSPII ist ca. 3 kb lang (von Exon 1 bis 3) und besteht aus 3 Exonen. Am Ende von Exon 1 befindet sich das Start - Kodon ATG, im Exon 3 das Stopp-Kodon TAG.

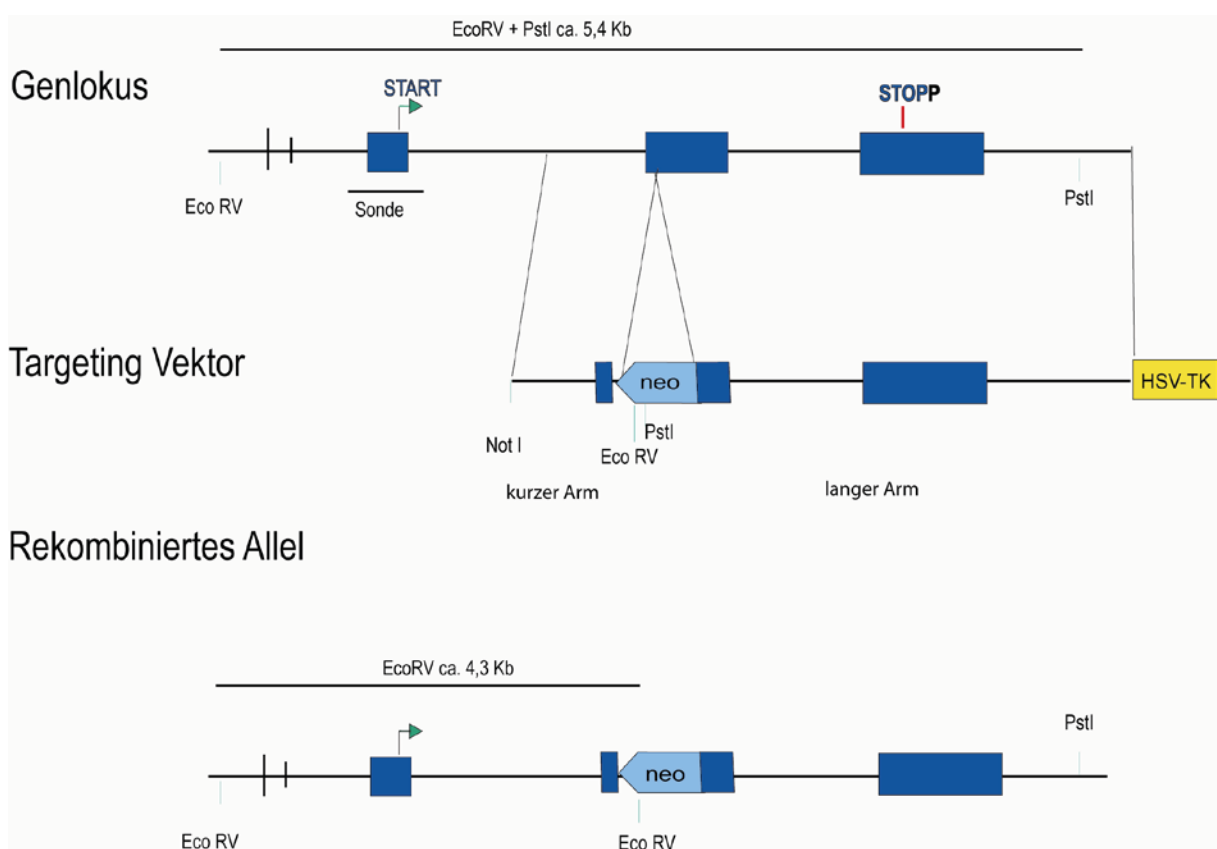


Abb. 3.38: Schematische Darstellung der Rekombinationsstrategie des SSPII Lokus. Oben: Genlokus von SSPII. Mitte: Rekombinationsvektor mit den homologen Bereichen und den eingefügten Selektionsmarkern Neomycin-Resistenz-Kassette (neo) und HSV Thymidinkinase Kassetten (HSV-TK). Unten: Rekombinierter Lokus nach erfolgter Integration der Neomycin-Kassette in reverser Orientierung.

Die Neomycin-Resistenzgen-Kassette sollte in reverser Orientierung zur Leserichtung von SSPII in Exon 2 in den Genlokus eingesetzt werden. Hierbei wurde keine endogene SSPII Sequenz deletiert, allerdings sollte der starke Promotor der Neomycin-Resistenz-Kassette eine Transkription von SSPII verhindern.

Um das Ereignis der homologen Rekombination zu erreichen, wurden 5' und 3' der Neomycin-Resistenz-Kassette (Neo-Kassette) die Gen-Lokus-Bereiche kurzer Arm und langer Arm gesetzt. Der kurze Arm (KA) bestand aus der Intronsequenz von Intron 1 und einem Teil des Exon 2 und

hatte eine Gesamtlänge von 0,65 kb. Über die durch PCR angefügten Schnittstellen Not I und Spe I wurde der KA in den Targetingvektor eingebracht. Der lange Arm (LA) bestand aus der Genlokussequenz die im Exon 2 startet und im Intronbereich hinter Exon 3 endet. Der LA war ca. 2,5 kb lang und wurde über die eingefügten Schnittstellen Xho I und Kpn I eingebracht. Für die Negativselektion wurde die HSV-TK über die Schnittstelle Kpn I als Letztes eingefügt. Für die Durchführung der homologen Rekombination wurde der hergestellte Vektor dann über die Schnittstelle Not I linearisiert. Nach erfolgreicher Rekombination konnten die Klone mit der 5' flankierenden Sonde analysiert werden. Dazu wurden die Klone mit dem Restriktionsenzym EcoR V und Pst I geschnitten und mit der 5'Sonde im Southernblot hybridisiert. Durch Einbringen einer EcoR V Schnittstelle über die Neo-Kassette in den SSPII Lokus ergab das rekombinierte knockout Allel eine Bande in der Größe von 4,3 kb während das wildtypische Allel als Bande eine Größe von 5,4 kb ergab.

Bisher konnten drei positive ES-Zell-Klone detektiert werden, allerdings konnten zwei Klone nach dem Auftauen nicht mehr expandiert werden. Der verbleibende positive Klon 2 (Klon 2 des ersten Targetings) wurde nach Auftauen im Southernblot analysiert (Abbildung 3.39). Deutlich ist hier bei allen drei aufgetragenen und mit EcoR V und Pst I geschnittenen Proben die wildtypische Bande bei <5 kb zu erkennen. Während Klon 1 und E14 keine weitere Bande mehr aufwies, war bei Klon 2, wie vorausgesagt, eine weitere Bande bei 4 kb detektierbar. Diese liegt in gleicher Stärke wie die wildtypische Bande vor, so dass es sich hierbei um keinen sogenannten Mischklon handelt. In Abbildung 3.39 b) wurde der Klon 2 auf die einmalige Integration der Neo-Kassette hin überprüft. Dazu wurde die genomische DNS der Klone 1, 2 sowie E14 mit den Enzymen Sma I bzw. Spe I geschnitten und im Southernblot analysiert. Hierbei konnte eindeutig nur eine Integration der Neo-Kassette in das Genom von Klon 2 nachgewiesen werden. Die E14-Kontroll-DNS wies keine spezifische Bande auf, wohingegen bei Klon 1 deutlich wurde, dass dort die Neomycin-Resistenz-Kassette in das Genom integriert wurde, allerdings an falscher Stelle, wie auch die zu Klon 2 unterschiedlich großen Banden belegen.

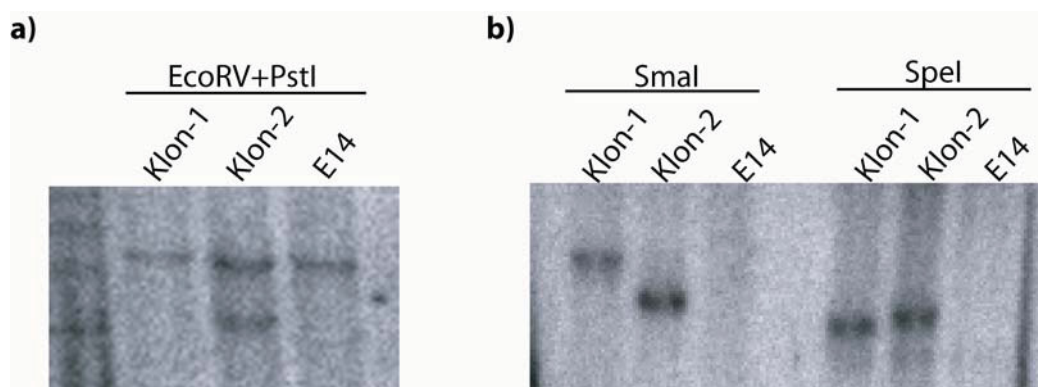


Abb. 3.39: Southernblot-Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination im SSPII Lokus und der einmaligen Integration der Neomycin Resistenz Kassette. a) aufgetragen wurde die genomischen DNS der Klone 1 und 2 sowie E14 nach Restriktionsverdau mit EcoRV und PstI und Hybridisierung mit der 5'-Sonde; b) aufgetragen wurde die genomische DNS von Klon 1 und 2 sowie E14 nach Restriktionsverdau mit SmaI (links) bzw. SpeI (rechts) und Hybridisierung mit der Neomycin-Sonde.

Der durch homologe Rekombination erhaltene Klon 2 wurde mehrfach in C57BL/6 Blastozysten injiziert und in Ammentiere (Stamm CD1) transferiert. Die daraus resultierenden chimären Tiere wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Diese Verpaarungen führten in einem Fall zu einer sogenannten Keimbahnmaus, welche aus dem genetischen Material des Klons 2 besteht. Eine Schwanzbiopsie wurde im Southernblot analysiert (Abbildung 3.40). Hierbei wurde belegt, dass Tier Nr. 7343 nicht das erhoffte knockout Allel trug, sondern das genetische Material des wildtypischen Allels.

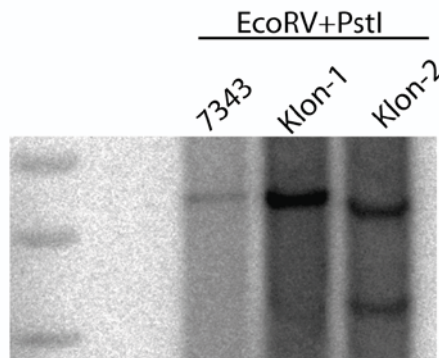


Abb. 3.40: Southernblot-Analyse zur Typisierung der Keimbahnmaus. Aufgetragen wurde jeweils die genomische DNS der Schwanzbiopsie der Keimbahnmaus 7343 sowie die genomische DNS von Klon 1 und 2 nach Verdau mit EcoRV und PstI.

Weitere Verpaarungen der Chimären sollen zukünftig zu Keimbahntieren mit dem erhofften knockout Allel führen. Auch soll das erneute Durchführen des Targetings zu weiteren positiven Klonen führen, um die Chance der Keimbahntransmission durch eventuell potentere Klone zu erhöhen.

4 Diskussion

4.1 mGBP7 in der Infektionsabwehr

Die 65 kDa GTPasen konnten schon früh als IFN γ induzierte Gene identifiziert werden (Gupta et al., 1979; Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1985). Obwohl die starke Induktion durch Interferone (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002) zu der Entdeckung und Aufklärung des JAK-STAT Signalweges bei der IFN γ und IFN α/β Signaltransduktion beitrugen, ist die biologische Funktion dieser GTPasen noch immer unklar.

Zu Beginn dieser Arbeit waren 5 Mitglieder der murinen 65 kDa GBPs bekannt (Cheng et al., 1983; Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002). Durch umfangreiche Transkriptomanalysen mittels Microarrays von IFN γ und TNF stimulierten Ana-1 Makrophagen konnten in unserem Labor drei weitere mGBPs identifiziert werden, mGBP6, 7 und 8 (Degrandi et al., 2007). Im Rahmen von *in silico* Untersuchungen genomischer Datenbanken zur Klärung der genomischen Organisation der mGBP Loci auf den Chromosomen 3 und 5 der Maus, konnten weitere mGBPs identifiziert werden, so dass mittlerweile sogar insgesamt 11 Mitglieder der murinen GBPs sowie zwei Pseudogene bekannt sind (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008). Zeitgleich zu den in unserem Labor angefertigten umfangreichen Analysen der murinen GBPs wurde die genomische Organisation von neuen Mitgliedern der murinen als auch humanen GBPs von der Arbeitsgruppe um Deborah Vestal analysiert (Olszewski et al., 2006). Nach Sequenzanalysen stellte sich heraus, dass das dort beschriebene mGBP6, dem in unserer Arbeitsgruppe bearbeiteten und publiziertem Gen mGBP7 entspricht (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008) und in der hier vorliegenden Arbeit auch weiterhin als mGBP7 geführt wird.

Zunächst wurde die transkriptionelle Regulation von mGBP1 bis 10 *in vivo* und *in vitro* analysiert, wobei weiterführende Untersuchungen, wie die Regulation durch den Transkriptionsfaktor IRF-1, die Induktion in *T. gondii* infizierten Mäusen und die subzelluläre Lokalisation, primär für mGBP7 durchgeführt wurden.

4.1.1 Expression der murinen 65 kDa GTPasen *in vitro* und *in vivo*

Durch die Etablierung der Real-time RT-PCR für mGBP1-10 im Rahmen dieser Arbeit konnten umfangreiche Expressionsstudien dieser Genfamilie durchgeführt werden. Für mGBP1-5 war bereits bekannt, dass diese nach IFN γ Stimulus in embryonalen Fibroblasten und Ana-1 Makrophagen sowie in RAW 264.7 Zellen hochreguliert werden (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002). In dieser Arbeit konnte für mGBP1-5 und ebenfalls für mGBP6-10 eine starke Induktion der Transkriptmenge durch IFN γ in Ana-1 Makrophagen, im zeitlichen Verlauf der Stimulation von 0, 2, 6 und 16 h gezeigt werden. Mehr noch, die Expression wurde auch von Typ I Interferon (IFN β) bei allen GBPs, mit Ausnahme von mGBP5 (hier nur eine Ratio von 2,4), deutlich hochreguliert. Dies weist auf die transkriptionelle Beteiligung von ISRE Elementen in

den Promotorbereichen der einzelnen Genloci der mGBPs hin. Die Induzierbarkeit durch Typ I Interferon war bisher nur für hGBP1 und mGBP2 beschrieben (Cheng et al., 1986; Vestal et al., 2000; Gorbacheva et al., 2002). In der Promotorregion von hGBP1 wurde neben einem ISRE auch ein GAS Motiv identifiziert. Beide sind für die Induzierbarkeit durch Typ I bzw. Typ II Interferone verantwortlich (Decker et al., 1991; Lew et al., 1991). ISRE Elemente, sowie auch GAS Elemente, konnten vor allem in den Promotorregionen von mGBP1-5 und 7 beschrieben werden (Olszewski et al., 2006). In der Promotorregion des humanen GBP1 Gens liegt ein NF- κ B-Bindemotiv, welches dort für die Induzierbarkeit nach TNF Stimulus verantwortlich ist (Naschberger et al., 2004). Auch für mGBP3, 4 und 5 konnte ein NF- κ B-Bindemotiv in der Promotorregion beschrieben werden (Olszewski et al., 2006). In unserem Stimulationsmodell wurde nur bei mGBP4 und in geringem Maße bei mGBP2 eine Expression nach TNF-Stimulus beobachtet, während TNF auf die Expression von mGBP3, 5, 7, 8 und 9 einen negativen Effekt ausübte, was an der Ratio <1 zu erkennen ist. Über die Ursache kann nach jetzigem Kenntnisstand nur spekuliert werden, denn entweder ist die Induktion über diese Motive im Falle von mGBP3 und 5 transient oder es müssen weitere Transkriptionsfaktoren synergistisch wirken, um diese Genexpressionen zu induzieren. Möglicherweise werden durch TNF Genprodukte induziert, die tatsächlich negativ auf die Expression von mGBP3, 5, 7, 8 und 9 wirken. Ein negativer Effekt von TNF auf proinflammatorische Gene ist allerdings bisher nicht beschrieben. Ein synergistischer Effekt von IFN γ und TNF konnte hier für alle mGBPs, mit Ausnahme von mGBP1, ermittelt werden.

Nguyen und Kollegen konnten außerdem in RAW Makrophagen eine Induktion von mGBP1, 2, 3 und 5 durch LPS nachweisen, wobei diese Expression transient ist und nach 12 h auf den unstimulierten Wert wieder abfällt (Nguyen et al., 2002). Bei der Stimulation von Ana-1 Makrophagen wurde nur mGBP6/10 durch LPS nachhaltig hochreguliert, was darauf hindeuten könnte, dass auch in dieser Makrophagenzelllinie die Expression der anderen GBPs 16 h nach Stimulation wieder auf den Ausgangswert der unstimulierten Zellen abgesunken war. Dies bedarf weiterer Messungen der mGBP Expression im Zeitverlauf nach Stimulation mit LPS, wie für das Zytokin IFN γ bereits durchgeführt. Die mGBPs6 und 10 wurden außerdem durch den TLR9 Liganden CpG hochreguliert, gleiches konnte in dieser Expressionsstudie zusätzlich nur für mGBP1 festgestellt werden. Auch das Zytokin IL-1 β löste nur eine leichte Induktion von mGBP6/10 sowie von mGBP2 aus, was konsistent zu den Daten in RAW Makrophagen von Nguyen und Kollegen ist (Nguyen et al., 2002). Die unterschiedlichen transkriptionellen Expressionsmuster der 65 kDa GBPs führen daher zu der Hypothese, dass sie funktionell nicht redundant sind, sondern einer komplexen transkriptionellen Kontrolle nach der Erkennung von unterschiedlichen PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) unterliegen und somit eigene Aufgaben erfüllen könnten.

Die *in vivo* Expressionsanalyse von mGBP1-10 zeigt deutlich eine Induzierbarkeit aller untersuchten GBPs in den Organen Leber und Milz nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*.

Bemerkenswert an dieser in C57BL/6 Mäusen durchgeführten Analyse ist, dass auch mGBP1 hier und in Ana-1 Makrophagen, die aus C57BL/6 Mäusen generiert wurden (Cox et al., 1989), eindeutig hochreguliert wurde. In früheren Studien wurde gezeigt, dass nach Injektion von poly (I:C) oder LPS in verschiedene Mausstämme, mGBP1 in C57BL/6 Mäusen nicht induziert wurde weswegen man von einem Fehlen eines funktionellen Allels in diesem Mausstamm ausgegangen war (Staheli et al., 1984; Nguyen et al., 2002). In unserem Stimulations- als auch Infektionsmodell konnte eindeutig mGBP1 auf Transkriptionsebene (diese Arbeit) aber auch auf Proteinebene nach Listerien- und Toxoplasma-Infektion mittels spezifischen Antisera nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in Mausorganen von C57BL/6 Mäusen die alleinige Gabe von LPS oder poly (I:C) nicht ausreicht, um eine transkriptionelle Induktion von mGBP1 auszulösen. Möglicherweise müssen erst komplexere, durch eine Infektion ausgelöste Stimulationsbedingungen vorliegen, so dass der mGBP1 Genlocus frei liegt zur Transkription, wobei möglicherweise zunächst Repressorproteine verdrängt werden. Diese Spekulationen müssen in weiterführenden Arbeiten verfolgt werden und können durch die bisher ausgeführten Experimente noch nicht ausreichend beantwortet werden.

4.1.1.1 Expression von mGBP7 in Ana-1 Makrophagen und *in vivo*

In Ana-1 Makrophagen wurde mGBP7 nach Stimulation durch Typ I und II Interferone deutlich hochreguliert. Das lässt in diesem Falle auf GAS sowie ISRE Motive im Promotorbereich schließen, welche, wie oben erwähnt, im Promotorbereich von mGBP7 vorhanden sind. Des Weiteren konnten in der Promotorregion mehrere AP-1 (activating protein-1) Bindemotive, aber kein NF- κ B-Konsensus Element identifiziert werden (Olszewski et al., 2006).

TNF führte nur synergistisch mit IFN γ zur deutlichen Hochregulation der mGBP7 Transkripte in Ana-1 Zellen. Die Stimulation mit den TLR-Liganden LTA (TLR2), LPS (TLR4), CpG (TLR9) und poly (I:C) (TLR3) führte in diesen Makrophagen zu keiner Induktion von mGBP7. Dies könnte mit den fehlenden NF- κ B Motiven in der Promotorregion von mGBP7 erklärt werden.

Nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. monocytogenes* wurde die mGBP7 Expression transkriptionell mittels Real-time RT-PCR analysiert. Zusätzlich wurde die mGBP7 Expression auf Proteinebene mittels Westernblot nach Listerien- und Toxoplasma-Infektion untersucht. Deutlich konnte eine Transkriptionserhöhung von mGBP7 in der Leber und in der Milz nach *L. monocytogenes* Infektion beobachtet werden. Es zeigte sich außerdem auch eine verstärkte mGBP7 Proteinproduktion in diesen beiden untersuchten Organen nach Infektion. In beiden Organen war eine basale Expression des Proteins vorhanden, was auf eine konstitutive Expression in diesen Geweben schließen lässt. Auch für die Proteine mGBP3 und 5 konnte in unserem Labor eine basale Expression detektiert werden, während mGBP1 und 2 erst im Verlauf der Infektion gebildet werden (Degrandi et al., 2007).

Nach Toxoplasma-Infektion wurde in der Milz und in der Lunge die Expression von mGBP7 auf Proteinebene gemessen. Hier konnte wieder eine Basalexpression in der Milz gezeigt werden,

jedoch war im Lungengewebe uninfizierter Tiere kein mGBP7 Protein in nachweisbaren Mengen vorhanden. Im Verlauf der Infektion konnte allerdings auch in der Lunge der Mäuse eine starke Zunahme des mGBP7 Proteins gemessen werden. Die Proteinexpression von mGBP1, 2, 3 und 5 in der Lunge war basal ebenfalls nicht nachweisbar. Erst ab Tag 5 nach Infektion konnten hier mGBP1, 2, 3 und 5 Proteine nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007). Um diesen interessanten Unterschied in der konstitutiven Proteinexpression der einzelnen mGBPs zu klären, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Dabei sollte zunächst der Frage nachgegangen werden, in welchen weiteren Geweben der Maus eine basale Proteinexpressionen der unterschiedlichen mGBPs vorhanden ist. Die Herstellung von gendefizienten Mauslinien muriner GBPs könnte dabei zur Aufklärung der Bedeutung der basalen Expression beitragen. In Bezug auf mGBP2, bei der die defiziente Mauslinie bereits in unserem Labor hergestellt wurde, konnte hinsichtlich der Organentwicklung allerdings kein Phänotyp gefunden werden (Konermann et al., unveröffentlicht), allerdings lag mGBP2 nicht als basal exprimiertes Protein in der Milz von Wt Tieren vor.

Zusammen genommen könnte dieser Umstand in den Expressionsunterschieden jedoch ein Hinweis auf differentielle Funktionen der untersuchten p65 kDa GBPs in der Infektabwehr im Gesamtorganismus oder auf zellulärer Ebene sein.

4.1.2 Expressionsanalyse von mGBP7 in Wt und IRF-1 defizienten Fibroblasten und BMDM

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass mGBP1 und 2 sowie iNOS transkriptionell sekundär responsive Gene sind, die erst nach Proteinneusynthese von IRF-1 (Interferon regulatory factor-1) nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation in embryonalen Fibroblasten und Makrophagen gebildet werden (Kimura et al., 1994; Kamijo et al., 1994). Im Weiteren konnten in der Promotorregion von mGBP1 und 2 funktionelle ISRE Motive beschrieben werden, die auch als Bindemotiv für IRF-1 (Interferon regulatory factor 1) dienen (Briken et al., 1995). Im Gegensatz dazu wurde für die Expression von humanem GBP1 keine Abhängigkeit von der IRF-1 Neusynthese in Fibroblasten belegt; hier ist das beschriebene GAS-Element in der Promotorregion funktionell und für die Synthese von hGBP1 verantwortlich (Decker et al., 1989). Für mGBP7, für das in der Promotorregion 2 GAS Elemente aber auch ein ISRE Element beschrieben wurden (Olszewski et al., 2006), war deshalb die Überprüfung der IRF-1 abhängigen Synthese ein interessanter Punkt dieser Arbeit. Daher wurden IRF-1 ko Fibroblasten sowie IRF-1 ko BMDM stimuliert und zunächst auf mRNA Transkripte hin untersucht. Bei der Analyse der IRF-1 ko Fibroblasten konnte eine deutliche Induktion von mGBP7 Transkripten nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ nachgewiesen werden, so dass hier die GAS Elemente funktionell zu sein scheinen. Jedoch reichte eine Induktion von mGBP7 durch $\text{IFN}\gamma$ in Wt und IRF-1 ko Fibroblasten für die Proteinsynthese nicht aus (was der Westernblot zeigte). Die Induktion von mGBP2 hingegen

zeigte auffällige Unterschiede zwischen Wt und IRF-1 ko Fibroblasten. Hier wurde die Transkriptmenge deutlich durch die Neusynthese von IRF-1 verstärkt. Im Gegensatz dazu war die mGBP2 Transkriptmenge in IRF-1 ko Zellen stark vermindert und führte auch zu keiner Proteinsynthese. In diesen Zellen ist die mGBP2 Transkription und Translation von der IRF-1 Neusynthese stark abhängig. Auffallend bei mGBP7 und 2 war außerdem, dass die basale Transkriptmenge beider GTPasen in den IRF-1 ko Fibroblasten stark verringert war. IRF-1 liegt in geringen Mengen konstitutiv in Zellen vor (Salkowski et al., 2000), was eventuell auch für die basale Expression von mGBP7 und 2 verantwortlich sein kann.

Die umfangreiche Analyse der Stimulation von Wt und IRF-1 ko BMDM konnte zum einen zeigen, dass mGBP7 in Wt Makrophagen auch nach Stimulation durch den TLR-Liganden LPS und poly (I:C) induziert wurde sowie zum anderen auch nach TNF Stimulus. Dies zeigt, dass im Gegensatz zu Ana-1 Makrophagen hier trotz des Fehlens von NF- κ B Bindemotiven im mGBP7 Promotorbereich alternative Elemente für die Induktion von mGBP7 verantwortlich sein müssen, die in Ana-1 Makrophagen nicht aktiv sind. Zunächst einmal befinden sich im mGBP7 Promotorbereich mehrere AP-1 (activation protein 1) Elemente. Diese können neben NF- κ B über den TNF Signalweg via TRAF2 angesprochen werden (Karin et al., 1997; LaMonica et al., 2001). Andererseits werden Typ I Interferone nach TLR3 (z.B. poly (I:C)) und TLR4 (LPS) Stimulation durch den Transkriptionsfaktor IRF3 in Makrophagen produziert (Toshchakov et al., 2002; Doyle et al., 2002) und könnten dann in einem autokrinen Stimulationsweg über die ISRE Bindestelle die Produktion von mGBP7 in den BMDM induzieren. Zusätzlich bindet IRF3 an ISRE Elemente und kann somit die Transkription von mGBP7 direkt induzieren (Fitzgerald et al., 2003).

Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR Analyse zeigen außerdem, dass in IRF-1 ko Makrophagen zum Wt vergleichbare Mengen an mGBP7 Transkripten gebildet wurden. Hier findet eine IRF-1 unabhängige Induktion von mGBP7 statt. Allerdings konnte durch TNF Stimulation nur eine geringere Expression von mGBP7 gemessen werden: hier scheint die IRF-1 Neusynthese beteiligt zu sein, um die Transkription von mGBP7 in Menge der Wt Stimulation zu induzieren. Die basale Expression in BMDM lag – wie in den IRF-1 Fibroblasten – etwas geringer vor als in den Wt Zellen. Möglicherweise führt auch hier eine konstitutive IRF-1 Synthese zu diesem Zustand.

Die p47 GTPase Irgm1 (LRG-47) wurde in Makrophagen als von IRF-1 unabhängig exprimiert beschrieben (Boehm et al., 1998). Auch in dieser Arbeit konnte durch die Real-time RT-PCR Analyse in Makrophagen gezeigt werden, dass Irgm1 ohne IRF-1 in gleichem Maße nach unterschiedlichen Stimulationen exprimiert wird, wie in den Wt Makrophagen. Es stellte sich außerdem heraus, dass auch die Basalexpression dieser GTPase ohne IRF-1 in gleicher Höhe vorkommt wie in Wt Makrophagen, was konsistent zu den Daten von Boehm und Kollegen ist (Boehm et al., 1998).

Die Expression von mGBP2 in BMDM zeigte starke transkriptionelle Unterschiede. Bei allen Stimulationsarten war die Menge der mGBP2 Transkripte ohne IRF-1 deutlich niedriger, was eine Beteiligung von IRF-1 an der Transkription belegt. Jedoch fand auch ohne IRF-1 eine, jedoch

geringere, Induktion von mGBP2 statt. Dieser Versuch belegt die Verstärkung der Transkription von mGBP2 durch die Neusynthese von IRF-1, allerdings bleibt eine IRF-1 unabhängige Induktionsfähigkeit weiterhin vorhanden. Auch die induzierbare NO Synthase (iNOS) wurde von IRF-1 abhängig induziert, wie das bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte (Martin et al., 1994); nur ein Kombinationsstimulus mit den Zytokinen $\text{IFN}\gamma$, TNF, $\text{IFN}\beta$ und IL-1 β sowie den TLR-Agonisten LPS, LTA, poly (I:C) und CpG konnte hier das Fehlen des Transkriptionsfaktors in den IRF-1 ko Makrophagen ausgleichen und iNOS in vergleichbaren Mengen, wie in Wt Zellen, produzieren.

Die Proteinsynthese von mGBP7 wurde von $\text{IFN}\gamma$ stark in Wt BMDM induziert. Auch ohne IRF-1 wurde mGBP7 Protein in vergleichbaren Mengen produziert, wie auch in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors IRF-1. Bemerkenswert ist das völlige Fehlen von mGBP7 Protein nach der simultanen Stimulation mit den Zytokinen $\text{IFN}\gamma$ /TNF, da die Resultate der Real-time RT-PCR in Wt, wie auch in IRF-1-ko BMDM die Transkription von mGBP7 mRNS belegen. Hier scheinen postranskriptionelle Mechanismen, wie z.B. die Anwesenheit regulatorischer microRNS, die Proteinsynthese von mGBP7 vollständig zu blockieren. Im Gegensatz dazu verdeutlichen die Daten der Westernblotanalyse von mGBP2 die Abhängigkeit dieses Proteins von der Neusynthese von IRF-1, da in Abwesenheit von IRF-1 (Stimulation mit TNF in Wt BMDM, Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$, TNF sowie $\text{IFN}\gamma$ /TNF in IRF-1 ko BMDM) kein oder nur sehr wenig mGBP2 Protein nachweisbar war. Auch kam es zur Proteinsynthese von IRF-1 sowie mGBP2 durch die Kombination von $\text{IFN}\gamma$ /TNF in den Wt BMDM. Dies belegt zum einen die Abhängigkeit der mGBP2 Synthese von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors IRF-1 und zum anderen die Tatsache, dass die mGBP2 Proteinsynthese nicht denselben posttranskriptionellen Regulationsmechanismen wie mGBP7 unterliegt.

Zusammen betrachtet verdeutlichen diese Ergebnisse jedoch die unterschiedlichen Effekte und Regulationsmöglichkeiten durch verschiedene Komponenten der Pathogenerkennung (Zytokin- und TLR-Signalwege) bei zwei GTPasen derselben Genfamilie. IRF-1 reguliert und verstärkt die Produktion von mGBP2, während mGBP7 nicht oder kaum durch die Neusynthese von IRF-1 abhängig produziert wird.

4.1.3 Subzelluläre Lokalisation von mGBP7

In früheren Studien an mGBP2 konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Verteilung dieses Proteins granulär bzw. in Vesikeln von heterogener Größe in der Zelle vorliegt (Vestal et al., 2000; Degrandi et al., 2007). Die genaue Identität dieser vesikelartigen Strukturen konnte allerdings bisher nicht näher bestimmt werden. In dieser Arbeit sollte die subzelluläre Struktur des neu identifizierten Proteins mGBP7 untersucht werden. Dafür wurden unterschiedliche Fusionskonstrukte kloniert, welche entweder N-terminal oder C-terminal von mGBP7 ein fluoreszierendes Protein tragen. Die zelluläre Verteilung dieser Fusionsproteine wurde dann in Abhängigkeit vom $\text{IFN}\gamma$ Stimulus in transfizierten RAW Makrophagen untersucht. Hierbei konnte

festgestellt werden, dass diese mGBP7 Fusionsproteine unabhängig von der Position des jeweiligen fluoreszierenden Proteins (DsRed N- bzw. C-terminal, GFP C-terminal), ebenfalls in vesikulären Strukturen im Zytoplasma der Zellen vorlagen. Die Präinkubation mit IFN γ hatte zunächst keine Auswirkung auf die zelluläre Distribution von mGBP7, es lag auch nach IFN γ Stimulation vesikulär im Zytoplasma unter Aussparung des Zellkerns vor. Während mGBP1, 2 und 5 ein C-terminales CaaX Motiv tragen, welches für die posttranslationale Isoprenylierung und damit Assoziation mit Membranen verantwortlich ist, konnte ein solches Motiv für mGBP7 nicht identifiziert werden. Auch wurde keine Transmembrandomäne mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagt. Für mGBP2 konnte außerdem festgestellt werden, dass die Mutation des CaaX Motivs zu STIL zur Veränderung der subzellulären Lokalisation führt und die mGBP2 Mutante im Zytoplasma der Zelle die vesikuläre Verteilung vollkommen verliert (Vestal et al., 2000). Um so erstaunlicher ist daher das Resultat, dass mGBP7 ohne ein solches Isoprenylierungsmotiv in den Zellen in granulären oder vesikelartigen Strukturen lokalisiert ist. Bei der biochemischen Untersuchung von hGBP1 konnte in Abhängigkeit von GTP Bindung und Hydrolyse eine Oligomerisierung dieses Proteins beobachtet werden (Praefcke et al., 2004). Möglich ist daher, dass mGBP7 mit mGBP1, 2 oder 5 Heteromere bildet und somit über diese Proteine in vesikulären Strukturen eingebracht wird.

4.1.3.1 Lokalisation von mGBP7 in infizierten Zellen

In früheren Publikationen wurde für mehrere Mitglieder der p47 GTPasen eine Kolo-kalisation dieser Proteine mit Pathogenen beschrieben. So zeigen MacMicking und Kollegen, dass Irgm1 mit mykobakterienhaltigen Phago-lysosomen assoziiert und eine antibakterielle Funktion ausübt (MacMicking, 2005). In weiteren Veröffentlichungen wird für die 47kDa GTPasen Irga6 (IIGP1), Irgb6 (TGTP), Irgd (IRG47), Irgm2 (GTPI) und Irgm3 (IGTP) eine Akkumulation um die parasitophore Vakuole von *T. gondii* beschrieben (Martens et al., 2005; Martens and Howard, 2006). In dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob mGBP7 mit intrazellulären Pathogenen assoziiert oder andere subzelluläre Lokalisationsveränderungen von mGBP7 durch Pathogene hervorgerufen werden.

In RAW Makrophagen, die 30 Minuten mit *L. monocytogenes* inkubiert wurden, konnte keine Veränderung der subzellulären Verteilung des mGBP7-DsRed Proteins beobachtet werden. Auch die Vorstimulation mit IFN γ veränderte die Lokalisation nicht. Es fand hier keine nachweisbare Interaktion von mGBP7 mit dem Pathogen statt.

Ein anderes Bild ergab sich in der *in vitro* Toxoplasma-Infektion. In mit mGBP7-DsRed transfizierten RAW Makrophagen, die zuvor mit IFN γ 16 h stimuliert wurden und dann für zwei Stunden mit avirulenten Toxoplasmen des Stamms ME49 infiziert wurden, konnte hingegen eine eindeutige Kolo-kalisation von mGBP7-DsRed Fusionsprotein mit dem Pathogen beobachtet werden. Diese Akkumulation war von der IFN γ Vorinkubation abhängig, denn ohne IFN γ

Präinkubation, wie auch bei der gleichzeitigen Gabe von IFN γ zum Zeitpunkt der Parasiteninfektion konnte diese Kolokalisation nicht beobachtet werden.

Für *T. gondii* wurde beschrieben, dass dieser die Wirtszelle aktiv durch Veränderung der Zellmembran penetriert und nicht aktiv von der Wirtszelle phagozytiert wird (Jones et al., 1972). Das Eindringen des Parasiten ist verbunden mit der Bildung einer spezialisierten Membran, die nicht mit Lysosomen verschmilzt und als parasitophore Vakuolenmembran (PVM) bezeichnet wird (Joiner et al., 1994). Es kann ferner davon ausgegangen werden, dass mGBP7 mit aktiv eingedrungenen Parasiten und nicht mit phagozytierten Parasiten assoziiert, da weitere Versuche mit phagozytierten Latexkugeln in stabil transduzierten RAW Makrophagen keine Akkumulation von GFP-mGBP7-Protein mit dem Phagosom zeigte (unabhängig einer IFN γ Vorinkubation). Die *in vitro* Infektion von stabil transduzierten murinen NIH 3T3 Fibroblasten, welche keine professionell phagozytierenden Zellen sind, konnte zudem eine Kolokalisation von mGBP7-GFP Protein mit der parasitophoren Vakuole der Toxoplasmen zeigen. Auch dieser Versuch belegt die Hypothese, dass aktiv eingedrungene Parasiten mit mGBP7 kolokalisieren.

Martens und Kollegen konnten zeigen, dass Irga6 (IIGP1) und andere p47 GTPasen direkt mit der PV von *T. gondii* (ME49) nach IFN γ Stimulation interagieren und möglicherweise die Membran der PV zersetzen (Martens et al., 2005). Diese Zerstörung konnte fluoreszenz-mikroskopisch und elektronenmikroskopisch beobachtet werden und wurde in drei Stufen eingeteilt: „smooth“, dabei ist die PV glatt umrandet mit dem IIGP1-Protein; „rough“: hier zeigt sich die PV als weniger kompakt und das IIGP1 Protein liegt in breiteren Strukturen um die PV herum. Als dritte Stufe wurde „disrupted“ beschrieben. Dabei akkumuliert IIGP1 in breiten Strukturen um die PV herum, zusätzlich wird die PV nicht mehr komplett durch IIGP1 umrandet. Bei der letzten Stufe wird die PV Membran als zersetzt interpretiert, da sich tatsächlich PV Membranmaterial in dieser Stufe vom Parasiten absetzt und den Parasiten nicht mehr einheitlich umschließt. Zersetzte, sog. „disrupted“ PVs wurden schon nach 2stündiger Infektion beobachtet; ihr Anteil nahm mit zunehmender Infektionszeit zu. Nach diesen Beobachtungen wurde ein antiparasitärer Effekt für einige Mitglieder der 47kDa GTPasen, speziell IIGP1, vermutet.

In dieser Arbeit konnten einige der mGBP7 positiven PVs mit der auffälligen Morphologie von „rough“ bis „disrupted“ vergleichbar gezeigt werden (Abbildung 3.13 oberen zwei Reihen), was möglicherweise zur Zerstörung der PV Membran durch mGBP7 führt. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass mGBP7 durch direkte Assoziation mit der PV des Parasiten einen antimikrobiellen Effekt auslöst, der das Wachstum des Parasiten inhibiert oder den Parasiten für weitere zelluläre Effektoren wie z.B. NO oder reaktive Sauerstoffe zugänglich macht. Es wäre allerdings auch möglich, dass der Effekt von mGBP7 erst durch Interaktionen mit p47 GTPasen oder/und mit weiteren GBPs zusammen an der PV zustande kommt, die nach IFN γ Stimulus ebenfalls aktiviert werden.

4.1.3.2 Veränderte Lokalisation von mGBP7 G-Domänen-Mutanten

In der Aminosäuresequenz von mGBP7, konnten im Protein drei Bindestellen identifiziert werden, welche hohe Motivhomologien zu den früher beschriebenen mGBP1-5 GTP-Bindestellen besitzen (Degrandi et al., 2007). Diese Bindestellen sind verantwortlich für die Hydrolyse von GTP zu GDP aber, und damit unterscheiden sich die GBPs von allen anderen GTPasen, auch zu GMP. Modiano und Kollegen konnten bei GTP-Bindestellen Mutanten von humanem GBP1 zeigen, dass die GTP Bindung, aber nicht die Hydrolyse, essentiell zur Assoziation des Proteins mit dem Golgi Apparat ist (Modiano et al., 2005). Die Auswirkungen der Mutationen auf die GTPase Aktivität von mGBP7 sind bislang biochemisch noch nicht untersucht worden. Jedoch lassen sich aufgrund der Tatsache, dass die GTP-Bindedomänen in der Familie der GBPs hoch konserviert sind, und die funktionellen Regionen bei mGBP7 vorhanden sind, ähnliche biochemische Eigenschaften postulieren, wie für hGBP1 beschrieben (Praefcke and McMahon, 2004; Praefcke et al., 2004; Degrandi et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von gentechnisch eingebrachten Punktmutationen in der G-Domäne von mGBP7 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der konservierten G1 Domäne (P-loop) sowie der switch I Region (G2) zur völligen Auflösung der vesikulären Struktur von mGBP7 führten und das Protein ubiquitär in der Zelle vorlag. Im Gegensatz dazu wurde die subzelluläre Verteilung durch Mutationen in der switch II Region (G2) und der G4 Domäne nicht verändert und die granuläre Struktur blieb erhalten. Für die Mutationen in der G1 und switch I Region bei humanem GBP1 wurde beschrieben, dass diese zum völligen Verlust der kooperativen Hydrolyse durch hGBP1 Dimere sowie zur starken Herabsetzung der Hydrolyserate (Praefcke et al., 2004). Dies führt zu einer drastischen Verminderung der GMP Produktion. Der Austausch von Arginin (R48) in der G1 Domäne von hGBP1 hatte jedoch keine Auswirkung auf die GTP-Bindung. Beim Austausch von Lysin (K51) bzw. Serin (S52) in der G1 Domäne wurde jedoch eine verminderte GTP-Bindung beschrieben. Die Mutation von Threonin in der switch I Region führte ebenfalls zu einer verminderten GTP Hydrolyserate und zur zehnfachen Verringerung der GTP Bindung. Da die vesikuläre Struktur bei mGBP7 in dieser Arbeit bei allen vier Mutanten (P-loop und switch I) gleichermaßen zerstört war, liegt die Vermutung nahe, dass die Hydrolyse-Eigenschaft, die bei diesen Mutanten bei hGBP1 gleichermaßen drastisch verringert war, und nicht die GTP-Bindung, für die vesikuläre Struktur von mGBP7 verantwortlich ist. Die weiteren Mutationen in der switch II (E99-A) sowie G4 Domäne (D182-R) führten bei mGBP7 zu keiner Auflösung der vesikulären Struktur. Bei hGBP1 konnte dabei beobachtet werden, dass die Mutation E99 die Fähigkeit zur kooperativen Hydrolyse nicht beeinträchtigt und auch bei der Mutation von D184 die Hydrolyserate bestehen blieb, die Dimer-vermittelte kooperative Hydrolyse allerdings vermindert aber nicht aufgehoben war (Praefcke et al., 2004). Daraus lässt sich wiederum ableiten, dass die Beibehaltung der Hydrolyseaktivität für die vesikuläre Struktur von mGBP7 wichtig ist und nicht die GTP Bindung.

Wie zuvor beschrieben, konnte nach Infektion von mGBP7 transfizierten RAW Makrophagen mit *T. gondii* eine IFN γ abhängige Translokation von mGBP7 zur PV des Parasiten beobachtet werden. Die Mutationen von mGBP7 in der G-Domäne führten teilweise zu veränderten subzellulären Lokalisationen der einzelnen Mutanten und sollten weiter auf die Fähigkeit hin untersucht werden, an der PV von *T. gondii* zu akkumulieren. Dabei zeigte sich, dass mGBP7 Proteine, die in der G1 Domäne mutiert waren (R48-A und S52-N), nicht mehr in der Lage waren, zur PV des Parasiten zu gelangen. Die Mutante K51-A hingegen – ebenso in der G1 Domäne – hatte eine Restfähigkeit zur Akkumulation an der PV behalten, jedoch war diese stark eingeschränkt und daher in verringerter Häufigkeit als das Wt Protein zu beobachten. Auch die Mutante in der switch I Region, T75-A, hatte die Fähigkeit zur Assoziation mit der PV fast vollständig verloren und nur eine Zelle konnte beobachtet werden, bei der eine partielle Kolo-kalisation mit der PV von *T. gondii* detektiert werden konnte. Bei der Mutante E99-A in der switch II Region konnte die Assoziation mit der PV weiter beobachtet werden, obgleich auch hier die Häufigkeit gegenüber dem Wt Protein herabgesetzt war. Die Mutante D182-R in der G4 Domäne verlor nachhaltig jede Assoziationsfähigkeit, obwohl hier die vesikuläre Struktur des Proteins weiterhin zu beobachten war. Demnach ist die Fähigkeit zur Assoziation mit der PV nicht allein mit der vesikulären Struktur des Proteins bzw. mit dem Erhalt der Hydrolyserate zu erklären, da diese weiterhin bei der D182 Mutante im hGBP1 erhalten ist (Praefcke et al., 2004). Bei dem Prozess der Akkumulation von mGBP7 an der PV scheinen demnach GTP-Bindung und Hydrolysefähigkeit sowie Potenzierung der Hydrolyserate durch kooperative Hydrolyse an Protein-Dimeren eine große Rolle zu spielen. Ist dieser Prozess durch das Einfügen von Mutationen in das mGBP7-Protein gestört, führt dies zur starken Herabsetzung des beim Wt mGBP7-Protein beobachteten Phänotyps der Assoziation mit der PV von *T. gondii*. Es ist außerdem denkbar, dass durch die verminderte Fähigkeit zur Oligomerisierung der Mutante D182 auch die mögliche Fähigkeit der Heteromerbildung mit anderen GTPasen verhindert und daher die Rekrutierung zur PV des Parasiten unterbunden wird. Diese Hypothese soll in weiteren Untersuchungen analysiert werden, bei denen Wt und Mutanten von mGBP7 auf ihre Fähigkeit der Interaktion untereinander und mit anderen mGBPs hin untersucht werden.

4.2 SSPII in der Infektabwehr

4.2.1 SSPII: Identifizierung und Charakterisierung als potentiell sekretorisches Protein

Bei der Transkriptomanalyse mittels Microarray von IFN γ und TNF stimulierten Ana-1 Makrophagen wurde das Transkript AW112010 (SSPII) als induziertes Gen identifiziert. Da über dieses Gen zunächst wenig bekannt war, wurde das Transkript genauer charakterisiert. Mit Hilfe eines Northernblots konnte zunächst gezeigt werden, dass die mRNA von SSPII größer ist, als in der NCBI Datenbank hinterlegt. Die genaue Größe wurde dann mittels SMART RACE PCR (BD Clontech) identifiziert und konnte, statt 536 nt, wie in NCBI unter AW112010 angegeben, als 730 nt lange Sequenz unter dem Namen SSPII in der NCBI Datenbank hinterlegt werden. Am 3' Ende der SSPII Sequenz konnte so zusätzlich ein Poly(A)-Signal (AATAAA) identifiziert werden, welches für die Polyadenylierung der naszierenden mRNA verantwortlich ist. Die Polyadenylierung ist ein wichtiger Schritt für alle mRNA-Spezies in eukaryotischen Zellen mit Ausnahme von einigen Histon-Transkripten (Edmonds, 2002), wirkt stabilisierend und ist zusätzlich wichtig für die Translation sowie den Transport der mRNA (Zhao et al., 1999; Mangus et al., 2003). Somit lässt sich hier ableiten, dass es sich bei der in dieser Arbeit ermittelten SSPII Sequenz um die vollständige mRNA handelt. Bei der Untersuchung des offenen Leserahmens mit einer Sequenzlänge von 237 nt konnte außerdem festgestellt werden, dass SSPII für ein kleines Protein kodiert, mit umgerechnet 78 Aminosäuren. Dieses Protein beinhaltet eine N-terminale Signalsequenz, welche bei anderen Proteinen für die Translation am rauhen ER, Abtrennung des Signalpeptides und Weiterleitung über den Golgi-Apparat verantwortlich ist. Dies konnte z.B. für Defensine als wichtige sekretorische Proteine der Immunabwehr gezeigt werden (Ganz et al., 1985; Daher et al., 1988). Daher ist auch bei SSPII anzunehmen, dass dieses am rauhen ER translatiert wird. Im Folgenden konnte mit Hilfe weiterer Vorhersageprogramme bestimmt werden, dass SSPII keine weiteren bekannten ER- oder Golgi-Rückhaltesignale beinhaltet und daher ein Protein des sekretorischen Weges ist. Die Sekretion von SSPII wurde außerdem mittels eines SSPII-6xHis Fusionsproteins gezeigt. Dieses war nach Überexpression transient transfizierter 293T Zellen in den Überstand der Zellkultur sezerniert worden (Abbildung. 3.34).

Weitere Vorhersageprogramme wie z.B. PROSITE, bei der die Aminosäuresequenz von SSPII mit bekannten Domänenstrukturen und Proteinfamilien verglichen wurden, führten zu keinem positiven Ergebnis, so dass davon ausgegangen werden muss, dass SSPII keine prominente Domäne aufweist. Für die Defensine, als antimikrobielle Proteine, ist bekannt, dass auch sie keine bestimmten Domänen beinhalten, außer der N-terminalen Signalsequenz, aber durch intramolekulare Disulfidbrücken über 6 bis 8 Cysteinen innerhalb des Proteins charakterisiert sind (Ganz, 2003; Bulet et al., 2004). Auch die kleinen sezernierten Proteine der Chemokin-Familien CXC und CC, die bei der Rekrutierung von Lymphozyten eine große Rolle spielen,

weisen charakteristische Cysteine auf, über welche sie klassifiziert werden (Stein and Nombela-Arrieta, 2005). Weitere antimikrobielle Peptide bestehen aus einem hohen Anteil an ein oder zwei bestimmten Aminosäuren, wie Prolin, Arginin, Tryptophan, Histidin oder Glyzin, so z.B. das anti-mikrobielle Peptid Acanthoscurin der Spinne *Acanthoscurria gomesiana*, bei der 73 % der 92 Aminosäuren aus Glyzin aufgebaut sind (Bulet et al., 1999). Solche Charakteristika konnten bisher für SSPII anhand der Aminosäuresequenz nicht festgestellt werden, was die Einordnung dieses Proteins in eine bestimmte Proteinklasse momentan nicht zuläßt.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation von SSPII

Wichtige Erkenntnisse über die Funktion von Proteinen können über die Identifizierung der subzellulären Lokalisation gewonnen werden. Transkriptionsfaktoren finden sich beispielsweise im Kern der Zelle wieder, oder werden nach Aktivierung durch aktiven Transport dahin importiert. Dabei beinhalten zelluläre Antworten die Translokation von Proteinen innerhalb der Zelle, was für weitere molekulare Regulationsmöglichkeiten biologischer Prozesse sorgt (Schwoebel and Moore, 2000; Smith and Koopman, 2004). Die subzelluläre Lokalisation von SSPII Fusionsproteinen sollte daher weiteren Aufschluß über die zelluläre Funktion dieses Proteins geben. Die Untersuchung verschiedener SSPII Fusionskonstrukte führte zum Ergebnis, dass einerseits das Maskieren der N-terminalen Signalsequenz durch das DsRed-Protein (DsRed-SSPII) zu einer ubiquitären Verteilung des SSPII-Proteins führt, während es andererseits bei dem Fusionsprotein, bei dem DsRed am C-Terminus von SSPII kloniert wurde, zu einer netzartigen Verteilung des SSPII-DsRed Fusionsproteins kommt, welches um den Zellkern herum verteilt im Zytoplasma vorliegt. Außerdem wurde bei der Untersuchung der Kolokalisation des SSPII-Fusionsproteins mit Proteinen spezifischer Organellen festgestellt, dass das SSPII-Protein vor allem mit dem ER und dem Golgi-Apparat kolokalisiert, während Assoziationen mit Mitochondrien, Membranen oder Endosomen marginal blieben. Diese Ergebnisse belegen die Vorhersage des N-terminalen Signalpeptides des SSPII-Proteins experimentell und zeigen die Assoziation von SSPII mit dem ER und dem Golgi-Apparat.

Intrazelluläre Abwehrmechanismen benötigen den Kontakt mit Pathogen, um ihre Funktion auszuüben (Miller et al., 2004). Aus der Sicht des Pathogens wurde für den intrazellulär replizierenden Parasiten *T. gondii* gezeigt, dass dieser extensive Assoziationen mit Mitochondrien und dem ER der Wirtszelle eingeht, wobei noch spekuliert wird, ob dies der Aufnahme von metabolisch wichtigen Nährstoffen und Proteinen dient (Jones et al., 1972; Sinai et al., 1997). Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von SSPII-GFP in *T. gondii* infizierten Makrophagen nach Stimulation mit IFN γ untersucht. Bei diesem Experiment konnte jedoch keine direkte Kolokalisation von SSPII-GFP mit *T. gondii* beobachtet werden und es scheint daher unwahrscheinlich, dass intrazelluläre Interaktionen von SSPII mit dem Pathogen bestehen und SSPII eine potentielle antimikrobielle Funktion direkt am oder im ER ausübt.

4.2.3 SSPII Expression *in vitro*

Bei der Microarray Transkriptomanalyse wurde das Genprodukt SSPII in Ana-1 Zellen als etwa 11-fach synergistisch durch IFN γ und TNF induziert gefunden, wohingegen IFN γ alleine zur Transkriptionssteigerung um den Faktor 6 führte. In dieser Arbeit wurden zur Validierung dieses Ergebnisses Ana-1 Makrophagen stimuliert und die mRNS im Northernblot analysiert. Hierbei bestätigte sich der ursprüngliche Befund. Dabei konnte ein Synergismus von IFN γ mit TNF auf die SSPII Expression ermittelt und eine geringere Induktion durch IFN γ alleine beobachtet werden. In diesen Makrophagen konnte keine Transkription des SSPII Gens durch TNF, LPS oder LTA Stimulus ermittelt werden. Eine Kinetik Analyse mittels Real-time RT-PCR von IFN γ stimulierten Ana-1 Makrophagen machte deutlich, dass mit zunehmender Zeit die Induktion von SSPII durch IFN γ Stimulation deutlich zunahm. Dies würde darauf hinweisen, dass SSPII ein sekundär responsives Gen ist und die Produktion eines weiteren Faktors, induziert durch IFN γ , die Expression von SSPII verstärkt. Beispielsweise ist beschrieben, dass die Expression des Transkriptionsfaktors IRF-1 durch synergistische Wirkung von IFN γ und TNF verstärkt wird (Ohmori et al., 1997). Möglicherweise könnte dieser Transkriptionsfaktor für die Expressionsverstärkung der Kombination von IFN γ und TNF verantwortlich sein, aber auch für die verzögerte Expression von SSPII nach IFN γ Stimulus. Hierbei muss postuliert werden, dass im Promotorbereich des SSPII Gens ein IRF-1 bzw. ISRE Bindemotiv vorhanden ist. Bei der Überprüfung der möglichen Promotorregion vor dem SSPII Locus konnte allerdings kein IRF-1, jedoch 109-119 nt 5' von Exon 1 ein NF- κ B Bindemotiv festgestellt werden. Erst ca. 80 nt 5' vor dem Start-Kodon, allerdings schon im 5' UTR-Bereich des Exon 1 des SSPII Locus, befindet sich eine vorhergesagte ISRE Bindestelle. Für das Tumorsuppressor-Gen p53 ist bekannt, dass dieses ein ISRE Bindemotiv im Exon 1 sowie in der anschließenden Intronsequenz besitzt, welches für die IFN α/β Responsivität in der antiviralen Abwehr verantwortlich ist (Takaoka et al., 2003). Somit ist es auch für das Genprodukt SSPII denkbar, dass das ISRE Element im Exon 1 vor dem Start-Kodon funktionell ist.

Die Untersuchung der SSPII Expression in Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen zeigten starke Induktionen durch IFN γ aber auch TNF, IFN β und den TLR-Liganden LPS (TLR4) und poly (I:C) (TLR3), wohingegen keine synergistische Steigerung der Induktion durch IFN γ /TNF in diesen BMDM stattfand. In diesen Makrophagen bestätigt sich die Funktionalität des NF- κ B Bindemotives, welches durch TNF über TRAF 2 zur Aktivierung von NF- κ B führt. Allerdings können auch TLR4 über den MyD88 abhängigen Signalweg sowie TLR3 über den MyD88 unabhängigen Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen (Hehlgans and Mannel, 2002; Hehlgans and Pfeffer, 2005; O'Neill, 2006) und somit vermutlich zur Induktion der SSPII Expression führen. Die Induktion von SSPII durch IFN γ findet, ohne entsprechende GAS Bindesequenz im SSPII Promotorbereich, möglicherweise über die Aktivierung des STAT1-IRF9-Komplexes und die Bindung an das ISRE Element in Exon 1 statt,

auch die IFN β Induktion führt sehr wahrscheinlich über einen STAT1-STAT2-IRF9-Komplex (ISGF3) und dessen Bindung an ISRE zur SSPII Induktion. Diese Ergebnisse weisen auf die Funktionalität der ISRE Bindestelle im Exon 1, sowie auf das Vorhandensein des NF- κ B Bindemotivs im 5' Bereich von Exon 1 des SSPII Lokus hin. In Makrophagen generiert aus dem Knochenmark von IFN γ R ko Mäusen wurde ebenfalls eine Expressionssteigerung von SSPII durch TNF, IFN β sowie LPS und poly (I:C) detektiert. Hierfür gelten die oben genannten Signalwege entsprechend und verdeutlichen, dass SSPII nicht nur über IFN γ , sondern auch über Typ I Interferon sowie TNF aber auch über PAMP Rezeptoren, TLR3 und 4, induziert wird. Diese Resultate sprechen deutlich für eine direkte Teilnahme von SSPII an der frühen Abwehr gegen verschiedene Pathogene.

4.2.4 SSPII in der Infektionsabwehr

Um die Expression von SSPII *in vivo* zu untersuchen, wurden Mäuse mit *L. monocytogenes*, *T. gondii* (Stamm ME49) sowie *T. cruzi* (Stamm Tulahuen) infiziert, welche als Modellorganismen für intrazellulär replizierende Bakterien und Parasiten verwendet wurden. Nach i.p. Infektion in der Maus akkumulieren Listerien zunächst in den Organen Leber und Milz, in denen sie intrazellulär replizieren (Hof et al., 1997). Noch bevor eine adaptive Immunantwort eingeleitet werden kann, wird in diesen Organen die Ausbreitung der Infektion primär durch Granulozyten eingedämmt, die an die infektiösen Foci rekrutiert werden (Conlan, 1999). Conlan und North konnten belegen, dass den Neutophilen in der Milz eine geringere Bedeutung zukommt als in der Leber (Conlan and North, 1994). In der Milz findet nach zwei Tagen eine verstärkte Einwanderung von Makrophagen statt, die an der Begrenzung der Infektion und zu einer Aktivierung einer adaptiven Immunantwort gegen Listerien beitragen (Mandel and Cheers, 1980; Portnoy, 1992; Endres et al., 1997). In der Milz der infizierten Tiere konnte nach 48 h eine deutliche Hochregulation von SSPII Transkripten wie auch von SSPII-Protein beobachtet werden, dies möglicherweise aufgrund der Einwanderung von aktivierten Makrophagen in das infizierte Gewebe. In der Leber der Tiere konnte schon eine basale Expression von SSPII detektiert werden, allerdings stieg auch hier die Expression der SSPII Transkripte und auch des SSPII-Proteins im Verlauf der Infektion weiter an. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass SSPII an der Infektionsabwehr beteiligt sein könnte. Mit Hilfe der Real-time RT-PCR konnte weiter auch ein Anstieg der SSPII Transkriptmengen im Thymus, in der Niere und in der Lunge detektiert werden, wohingegen allerdings kein SSPII-Protein in diesen Organen detektiert werden konnte. Es kam aber nicht zu einer verstärkten iNOS Transkription in diesen Organen im Gegensatz zu Leber und Milz, so dass hier eine erhöhte Infektionslast, die zur Akkumulation von aktivierten Makrophagen führt, eher ausgeschlossen werden kann. Eine Erklärung für das Fehlen des SSPII-Proteins könnte sein, dass das gering exprimierte Protein unter der im Westernblot möglichen Nachweisgrenze liegt. Unklar bleibt jedoch weiter die Interpretation dieses Ergebnisses, während in den Organen Niere und Lunge bei einer sublethalen Infektion mit Listerien Einwanderungen

der Bakterien möglich sind, sind Listerien im Thymus als primäres lymphatisches Organ, nicht beschrieben. Möglicherweise ist der Anstieg der SSPII Transkripte daher auf einwandernde Makrophagen oder dendritische Zellen zurückzuführen. Auch ist eine Expression in den reifenden T-Zellen möglich, darüber kann hier aber nur spekuliert werden und diese Fragestellung müsste in Folgeexperimenten weiter untersucht werden. Dabei ist es auf der einen Seite denkbar die Expressionsfähigkeit von SSPII in noch nicht reifen thymusständigen T-Zellen zu untersuchen und andererseits, bei infizierten Tieren mittels Zellsortierung nach den Zellpopulationen zu suchen, die neben T-Zellen im Thymus zusätzlich für die SSPII Expression verantwortlich sein könnten. Grundsätzlich können T-Zellen SSPII in geringem Maße exprimieren, wie in der Real-time PCR Abb.6.1 (im Anhang) gezeigt. Diese T-Zellen wurden aus der Milz mit anti-CD90-Antikörper gekoppelten magnetischen Partikeln heraussortiert und anschließend mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern für 2 Tage stimuliert; dabei stieg die SSPII Transkriptmenge auf das 4,5 fache im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen an.

In den Infektionsexperimenten mit den intrazellulären Parasiten *T. gondii* und *T. cruzi* konnten ebenfalls Anstiege der SSPII Transkription in der akuten Phase der jeweiligen Infektion gemessen werden. Alle drei Modellinfektionen (einschließlich *L. monocytogenes*) induzieren in Mäusen eine überwiegend proinflammatorische Immunantwort (T_H1), in der die SSPII Produktion eine noch nicht genau bestimmbare Rolle spielt. Bei der Transkriptomanalyse von suszeptiblen und resistenten Mauslinien nach *M. tuberculosis* Infektion wurde SSPII ebenfalls als induziertes Gen in der Lunge in allen Mäusen detektiert, so dass auch in diesem Infektionsmodell die SSPII Produktion bei der Abwehr gegen ein weiteres Pathogen den Verlauf der Krankheit mitbestimmen könnte. Jedoch wurden keine Unterschiede in der Höhe der Expression in Abhängigkeit des Mausstammes vorgefunden (Keller et al., 2006). Aus HBV transgenen Mäusen generierte Hepatozyten induzieren nach $IFN\gamma$ sowie nach $IFN\beta$ Stimulation eine Gruppe von Genen, zu denen auch SSPII gehört. Es wird dabei postuliert, dass diese Gene an der Verhinderung der Replikation des Hepatitis B Virus direkt beteiligt sind (Wieland et al., 2003). Da SSPII in der Leber schon konstitutiv exprimiert wird, aber auch nach den diversen o.g. Infektionen durch Interferone zusätzlich induziert wird, kann diesem Protein eine besondere Rolle in der Abwehr nahe gelegt werden und es ist daher zukünftig notwendig die biologische Funktion von SSPII weiter zu untersuchen. Hinzu kommt, dass es sich bei SSPII um ein sekretorisches Protein handelt. Es ergibt sich daher die dringende Frage, ob sezerniertes SSPII antimikrobielle Effekte auslöst, oder ob es sich dabei um ein chemotaktisches Protein, vergleichbar mit den Chemokinen oder auch Zytokinen handelt. Dabei muss festgestellt werden, auf welche Zellen das Protein wirkt, an welchen Rezeptor SSPII bindet und welche Zellpopulationen einen SSPII Rezeptor exprimieren. Um diese Fragen zu beantworten, muss das Protein in ausreichender Menge synthetisiert werden und Effekte auf verschiedene Pathogene bzw. Mauszellen müssen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, aus SSPII überexprimierenden Zellen, wie 293T, 3T3 oder COS7, SSPII-6xHis aufzureinigen. Diese

Versuche blieben jedoch erfolglos, da sich das Protein leider nicht in genügender Menge anreichern ließ. Eine methodische Verbesserung könnte die Expression des Proteins im bakteriellen System sein, wobei die Proteinfaltung und auch mögliche posttranslationale Veränderungen im bakteriellen System nicht denen der mammalischen Zellen entsprechen. Ein weiterer interessanter Punkt wäre die Charakterisierung der Expression von SSPII in Infektionsmodellen, die überwiegend die T_H2-Antwort des Immunsystems auslöst, die vor allem dominiert wird von Zytokinen wie IL-4, IL-10 und TGFβ. Dieser Frage könnte z.B. durch das Infektionsmodell mit Eiern der parasitären Würmer *Schistosoma mansoni* beantwortet werden (Janeway, Jr. et al., 2005).

Ein weiterer wichtiger experimenteller Ansatz wäre die Etablierung einer SSPII defizienten Mauslinie. Die Phänotypisierung von SSPII defizienten Tieren in Infektionsmodellen könnte dabei ein wichtiger Schritt bei der Charakterisierung dieses Proteins sein. Möglicherweise hat das Fehlen der basalen Expression von SSPII in der Leber schon Auswirkungen auf die Vitalität der Tiere, wahrscheinlicher jedoch ist, dass das Fehlen von SSPII erst in der Infektion mit den o.g. Pathogenen seine Auswirkung zeigt.

4.3 Ausblick

Um die Funktion der in dieser Arbeit charakterisierten „neuen“ GTPase mGBP7 weiter zu klären, sollte zunächst die Generierung einer mGBP7 defizienten Mauslinie forciert werden. Dabei werden sich die infektiologischen Untersuchungen der mGBP7 defizienten Mauslinie im besonderen Maße auf die Rolle von mGBP7 bei der *T. gondii* Abwehr konzentrieren. Hier konnte bereits durch konfokalmikroskopische Untersuchungen ein direkter Effekt auf die PV des Parasiten *in vitro* beobachtet werden. Zusätzlich sollen auch andere Infektionsmodelle, wie *L. monocytogenes* aber auch virale Infektionen in dieser Mauslinie Aufschluss über die Rolle von mGBP7 in der Infektabwehr geben. mGBP7 defiziente Zelllinien können außerdem in einem sog. Toxoplasma-kill-assay auf die Fähigkeit der Eindämmung der parasitären Replikation hin untersucht werden. Außerdem könnte in diesen Zelllinien durch elektronenmikroskopische aber auch konfokalmikroskopische Untersuchungen geklärt werden, ob mGBP7 direkt an der Zersetzung der PV des Parasiten beteiligt ist.

Des Weiteren soll durch Interaktionsstudien – zum einen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System, zum anderen über gezielte Immunpräzipitation – das mögliche Zusammenspiel von mGBP7 mit weiteren an der PV von *T. gondii* beobachteten mGBPs sowie den p47 GTPasen, eingehender analysiert werden.

Die translationale Regulation von mGBP7 sollte näher charakterisiert werden. Hier scheint durch das Zytokin TNF, trotz simultaner IFN γ Stimulation, die Expression des Proteins mGBP7 inhibiert zu werden. Dieser Mechanismus ist bisher nicht beschrieben. MicroRNS könnte die mRNS von mGBP7 zerstören. Die Halbwertszeit der mGBP7 mRNS kann dabei Aufschluss darüber geben, ob die Translation auf dieser Ebene unterbrochen wird. Die Regulation der einzelnen mGBPs unterliegt nicht denselben Mechanismen, wie die IRF-1 unabhängige Expression von mGBP7 bzw. die IRF-1 abhängige mGBP2 Expression gezeigt hat. Daher sollten für die gesamte Familie der murinen GBPs mittels Real-time PCR und Westernblot-Analyse weiter die expressionellen Unterschiede näher untersucht werden, um die unterschiedlichen Regulationen der einzelnen GBPs näher zu charakterisieren.

Die Bedeutung von SSPII in der Immunabwehr gegen mikrobielle Pathogene sollte ebenfalls durch die Generierung einer SSPII defizienten Mauslinie charakterisiert werden. Durch geeignete Verpaarungen der SSPII chimären Tiere sollte in Kürze die Keimbahntransmission und Etablierung der *sspii*^{-/-} Mauslinie bewerkstelligt werden.

Ein wichtiger experimenteller Ansatz wäre außerdem die Messung der Effekte des sezernierten SSPII-Proteins auf verschiedene Zellpopulationen, da SSPII möglicherweise bei der Chemotaxis und/ oder Aktivierung/ Reifung anderer Zellpopulationen eine Rolle spielen könnte. Über ein Fusionskonstrukt mit Fc-Protein und SSPII soll außerdem ein möglicher Rezeptor gefunden werden, an das das sezernierte SSPII bindet. Des Weiteren ist ein direkter Effekt auf verschiedene

Pathogene denkbar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Dafür wäre die Aufreinigung von hohen Mengen des SSPII-Proteins erforderlich. Ein monoklonaler Antikörper gegen das SSPII-Protein könnte außerdem in Wt-Mäusen eine Rolle des SSPII-Proteins belegen, wenn diese Infektionen ausgesetzt werden. Diese Strategie könnte – so lange die defiziente Mauslinie noch nicht etabliert ist – Hinweise auf die biologische Funktion von SSPII geben.

5 Zusammenfassung

Die Zytokine IFN γ und TNF induzieren eine starke antimikrobielle Immunantwort gegen verschiedene Pathogene. Neben bekannten antimikrobiellen Effektorsystemen (z.B. RNI, ROI) zeichnet sich eine Klasse von Proteinen als hochgradig IFN γ induzierbar aus: die murinen 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine (mGBPs) 1-10.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Etablierung der Real-time PCR für die zehn Familienmitglieder der mGBPs ein umfangreiches Expressionsprofil erstellt werden. Dadurch konnte die IFN γ abhängige Expression in Ana-1 Makrophagen von mGBP1 bis mGBP5 belegt werden. Es stellte sich dabei zusätzlich heraus, dass die hoch homologen „neuen“ Mitglieder mGBP6, 7, 8, 9 und 10 auch zu den IFN γ induzierten GTPasen zu zählen sind. Die Expression der gesamten Genfamilie zeigte sich auch in der *in vivo* Infektion mit *Listeria monocytogenes* als stark induzierbar nach der Infektion.

Im Verlauf der Arbeit konnte mGBP7 eingehender charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass mGBP7-Protein nach der *in vivo* Infektion mit *L. monocytogenes* in der Leber und der Milz sowie nach der Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* in der Leber und der Lunge induziert wird. Die transkriptionelle Expression von mGBP7 wurde in Ana-1 Makrophagen durch IFN γ und IFN γ /TNF induziert, während in Knochenmarksmakrophagen auch IFN β sowie die TLR-Agonisten LPS und poly (I:C) die mGBP7 mRNA Synthese induzierten. Die Expression von mGBP7 geschieht in Makrophagen dabei generell IRF-1 unabhängig, sodass hier das beschriebene ISRE Element nicht funktionell ist, im Gegensatz zur klassischen IRF-1 abhängigen mGBP2 Transkription. Zusätzlich zeigte sich in diesen Zellen ein weiterer interessanter Regulationsmechanismus durch TNF: trotz Kostimulation mit IFN γ wird kein mGBP7-Protein in Makrophagen bei gleichzeitiger TNF Stimulation produziert. TNF scheint über noch nicht beschriebene Mechanismen die Proteinsynthese von mGBP7 zu inhibieren. Ein weiterer Unterschied der Regulation von mGBP7 im Vergleich zu mGBP2 ist das Fehlen des mGBP7-Proteins in embryonalen Fibroblasten nach IFN γ Stimulation.

Die Überexpression von mGBP7-eGFP bzw. -DsRed -Fusionsproteinen in RAW Makrophagen oder Fibroblasten zeigten, dass mGBP7 granulär bzw. in vesikelartigen Strukturen in der Zelle vorliegt. Nach Infektion mit dem avirulenten *T. gondii* Stamm ME 49 in IFN γ stimulierten Makrophagen und Fibroblasten konnte eine Translokation der vesikulären mGBP7-Proteine zur parasitophoren Vakuole des Parasiten beobachtet werden. Gezielt eingebrachte Mutationen in der G-Domäne von mGBP7 hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die Distribution des Proteins innerhalb der Zelle. So kam es zu einem völligen Verlust der vesikulären Struktur bei gezielten Punktmutationen in den G1 (G(X)₄GKS/T) und G2 (T) GTP-Bindemotiven, während bei Mutationen in den G3 (DXXG) und G4 (RD) Motiven die vesikuläre Verteilung von mGBP7 erhalten blieb. Auch wurde durch alle diese Mutationen die Fähigkeit von mGBP7 weitgehend

inhibiert mit der PV von *T. gondii* zu kolokalisieren. Vorarbeiten zur Erstellung einer mGBP7 defizienten ES-Zelllinie sollen zur Generierung einer mGBP7 defizienten Mauslinie führen und die biologische Funktion von mGBP7 in der Infektionsabwehr zukünftig klären helfen.

Ein weiteres Gen, welches durch IFN γ und TNF Stimulation in murinen Makrophagen differenziell exprimiert wird, ist SSPII. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde dieses noch unbekannte Gen näher charakterisiert. Mittels RACE PCR konnte die Gesamtlänge des Gens auf 730 nt bestimmt werden. Die 237 nt lange kodierende Sequenz ergibt ein kationisches Protein in der Größe von 78 AS und einem Molekulargewicht von 8,7 kDa. Während SSPII keine bekannten Domänenstrukturen aufweist, kodieren die ersten 24 AS jedoch für ein N-terminales Signalpeptid. Dieses Signalpeptid ist für die im Westernblot nachgewiesene Sekretion des Proteins aus der Zelle verantwortlich. Lokalisationsexperimente bei denen SSPII mit DsRed oder GFP am C-Terminus von SSPII fusioniert vorlag, zeigten eine subzelluläre Lokalisation von SSPII mit dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischem Retikulum innerhalb der Zelle. Dagegen kam es nach Maskierung der N-terminalen Signalsequenz durch DsRed am N-Terminus von SSPII zur Fehllokalisierung und diffusen Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle kam. Somit konnte gezeigt werden, dass SSPII ein sezerniertes Protein ist.

Expressionsversuche zeigten darüber hinaus, dass in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit den Zytokinen IFN γ , IFN γ /TNF, TNF, IFN β aber auch durch die TLR-Agonisten LPS und poly (I:C) die Expression von SSPII induziert wird. Des Weiteren konnte die Induktion der mRNA Expression auch in den *in vivo* Infektionen bei C57BL/6 Mäusen mit den Pathogenen *L. monocytogenes*, *T. gondii* und *Trypanosoma cruzi* detektiert werden. Dabei konnte auch das Wt Protein im Westernblot nach *L. monocytogenes* Infektion detektiert werden, womit SSPII als ein funktioneller Genlokus definiert werden kann. Um die Rolle von SSPII in der Infektabwehr weiter zu definieren, wurde eine ES-Zelllinie etabliert, welche ein nicht funktionelles SSPII Allel besitzt. Die Generierung einer SSPII defizienten Mauslinie kann in künftigen Arbeiten für die weitere Charakterisierung der biologischen Funktion von SSPII verwendet werden.

Summary

The cytokines IFN γ and TNF induce a potent immune response against various pathogens, including well described anti-microbial effector mechanisms such as RNI and ROI. In addition to this a group of murine proteins with marked IFN γ inducibility has become recognised, the guanylate-binding proteins (mGBP) 1 to 10.

In this dissertation a comprehensive expression profile of the 10 members of this class of proteins was established using real-time PCR. Using this tool the IFN γ dependent expression profile of mGBP1 to mGBP5 in Ana-1 macrophages could be elucidated. Furthermore it was demonstrated that the highly homologous “newer” members, mGBP6-10, were also IFN γ induced and that the expression of the whole family is induced by *in vivo* infection with *Listeria monocytogenes*.

In the course of this project it was found that, after infection with *L. monocytogenes*, the protein mGBP7 was expressed in the liver and spleen and also that, after infection with the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, expression in the liver and lung was induced. The transcriptional expression of mGBP7 in Ana-1 macrophages was induced by IFN γ whereas in bone marrow macrophages IFN β and the TLR agonists LPS and poly (I:C) also induced a marked mGBP7 expression. The expression of mGBP7 was, generally speaking, independent of IRF-1 and thus the ISRE element is, in contrast to the classical IRF-1-dependant mGBP2 transcription, non-functional. These cells demonstrated a further interesting regulatory mechanism in that despite co-stimulation with IFN γ , TNF stimulation induced no expression of mGBP7 protein. TNF appears to inhibit the protein mGBP7 synthesis by an unknown mechanism. A further difference in the regulation of mGBP7 compared to mGBP2 is that in contrast to the latter no mGBP7 is detectable in embryonal fibroblasts after IFN γ stimulation.

Overexpression of mGBP7-eGFP or mGBP7-DsRed fusion proteins in RAW macrophages or fibroblasts showed that mGBP7 is to be found in granular or vesicular structures in the cytoplasm. Infection of IFN γ stimulated macrophages and fibroblasts with the avirulent *T. gondii* strain, ME 49, resulted in a translocation of the vesicular mGBP7 protein to the *T. gondii* parasitophorous vacuole (PV). Targeted mutations in the G-domain of mGBP7 had various effects on the distribution of the protein in the cytoplasm. A point mutation in the G1 (G(X)₄GKS/T) and G2 (T) GTP-binding motif resulted in the complete loss of the vesicular distribution whereas the point mutation in the G3 (DXXG) and G4 (RD) motifs had no such effect. All these mutations inhibited the co-localisation of mGBP7 with the PV. Work towards the establishing of a mGBP7 deficient ES-cell line in order to generate a mGBP7 knock out mouse is underway. This should help to better describe the function of mGBP7 in the immune response to infection.

A further gene differentially expressed in macrophages after stimulation with IFN γ and TNF is SSPII. The gene for this protein was characterized in the second part of this thesis. Using RACE-PCR the full length of this gene was determined to be 730 nt. The 237 nt coding sequence produces a cationic protein of size 78 AA with molecular mass of 8,7 kDa. Whereas SSPII does not demonstrate a known domain structure, the first 24 AA represent an N-terminal signal peptide. This signal peptide could be shown by western blot to be responsible for the translocation of the protein out of the cell. Using SSPII labeled with DsRed or GFP at the C-terminal end it was shown that the protein is to be found in the Golgi apparatus and endoplasmatic reticulum, whereas masking the N-terminal signal peptide lead to a diffuse cytoplasmic distribution throughout the cell. Thus it is concluded that SSPII is a secreted protein.

Expression of SSPII was induced by stimulation of bone marrow macrophages with the cytokines IFN γ , IFN γ /TNF, TNF, IFN β and also the TLR agonists LPS and poly (I:C). Moreover the in vivo infection of C57BL/6 mice with the organisms *L. monocytogenes*, *T. gondii* and *Trypanosoma cruzi* induced the mRNA expression of SSPII. In this infection model the wildtype protein was detected by western blot after infection with *L. monocytogenes* thus confirming SSPII as a functional gene locus. To investigate the role of SSPII in infection an ES cell line with a non functional SSPII allele was created. This may be used to create a SSPII deficient mouse line, which will be decisive in the future investigation of the biological function of SSPII.

6 Anhang

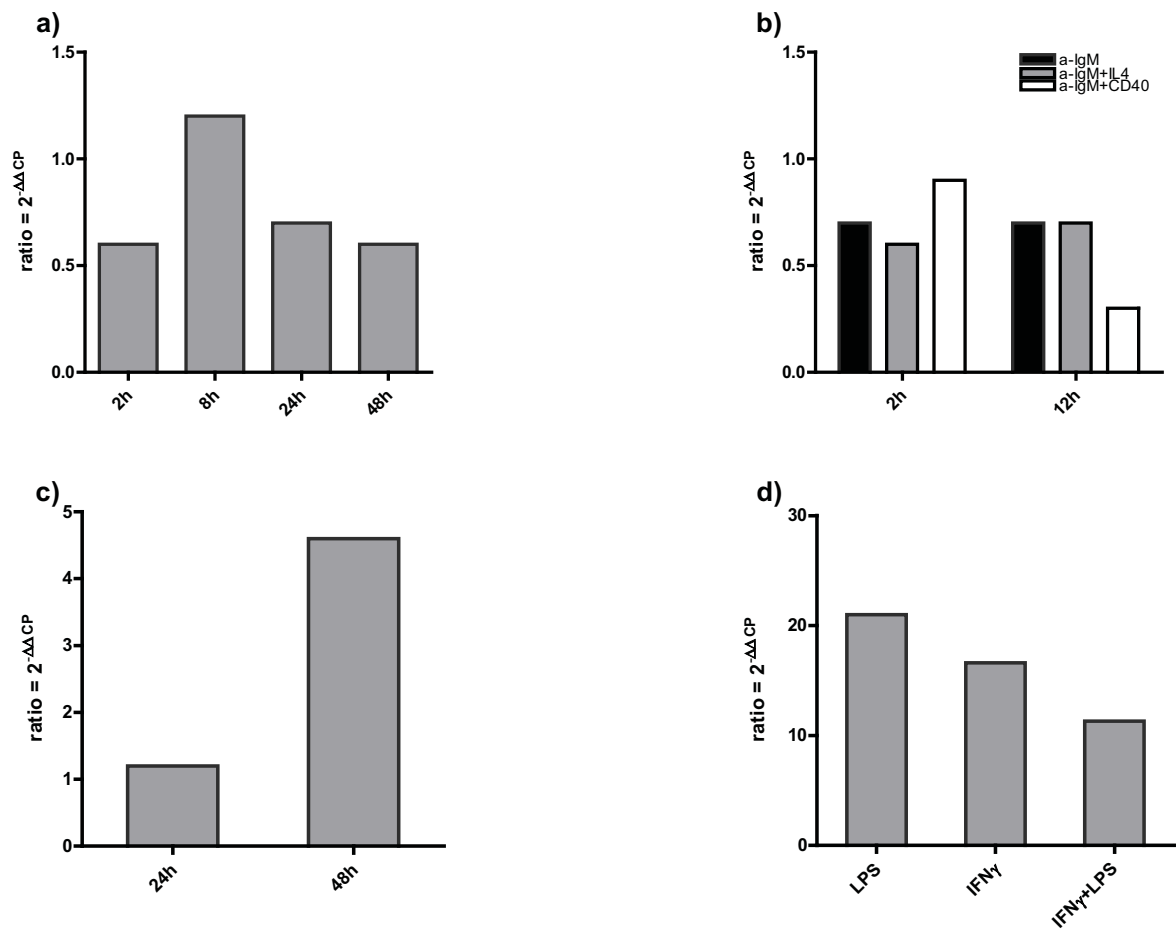


Abb. 6.1: Expression von SSPII in lymphatischen Zellen und Mikroglia. a) B220 positive Milzzellen (B-Zellen) wurden mit IgM 2 bis 48h stimuliert. b) CD90 negative Milz und Lymphknotenzellen wurden mit unterschiedlichen Stimulationen behandelt. c) SSPII in T-Zellen. CD90 positive Zellen wurden aus vereinigten Milz- und Lymphknotenhomogenat herausortiert und mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern (T-Zellstimulus) 24 und 48h lang behandelt. d) Aus dem Gehirn von neugeborenen Mäusen generierte Mikroglia-Zellen wurden mit LPS, IFN γ und LPS/IFN γ aktiviert. Die Expressionsunterschiede zu unstimulierten Zellen, relativ zu beta-Aktin sind als Ratio dargestellt.

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal,A., Shrive,A.K., Greenhough,T.J., and Volanakis,J.E. (2001). Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J. Immunol.* *166*, 3998-4004.
- Akira,S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 59-63.
- Akira,S. and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499-511.
- Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.
- Alwine,J.C., Kemp,D.J., and Stark,G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *74*, 5350-5354.
- Anderson,P., Yip,Y.K., and Vilcek,J. (1983). Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *258*, 6497-6502.
- Anderson,S.L., Carton,J.M., Lou,J., Xing,L., and Rubin,B.Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* *256*, 8-14.
- Arnheiter,H. and Meier,E. (1990). Mx proteins: antiviral proteins by chance or by necessity? *New Biol.* *2*, 851-857.
- Bals,R., Goldman,M.J., and Wilson,J.M. (1998). Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect. Immun.* *66*, 1225-1232.
- Bekker,L.G., Freeman,S., Murray,P.J., Ryffel,B., and Kaplan,G. (2001). TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J. Immunol.* *166*, 6728-6734.
- Bekpen,C., Hunn,J.P., Rohde,C., Parvanova,I., Guethlein,L., Dunn,D.M., Glowalla,E., Leptin,M., and Howard,J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* *6*, R92.
- Bendtsen,J.D., Nielsen,H., von Heijne,G., and Brunak,S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* *340*, 783-795.
- Bertin,J., Nir,W.J., Fischer,C.M., Tayber,O.V., Errada,P.R., Grant,J.R., Keilty,J.J., Gosselin,M.L., Robison,K.E., Wong,G.H., Glucksmann,M.A., and DiStefano,P.S. (1999). Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *274*, 12955-12958.
- Blobel,G. (2000). Protein targeting (Nobel lecture). *ChemBiochem.* *1*, 86-102.

- Boehm,U., Guethlein,L., Klamp,T., Ozbek,K., Schaub,A., Futterer,A., Pfeffer,K., and Howard,J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J. Immunol.* *161*, 6715-6723.
- Boehm,U., Klamp,T., Groot,M., and Howard,J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 749-795.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* *348*, 125-132.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.
- Briken,V., Ruffner,H., Schultz,U., Schwarz,A., Reis,L.F., Strehlow,I., Decker,T., and Staeheli,P. (1995). Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol. Cell Biol.* *15*, 975-982.
- Brogden,K.A., Ackermann,M., and Huttner,K.M. (1997). Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 1615-1617.
- Bulet,P., Hetru,C., Dimarcq,J.L., and Hoffmann,D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp Immunol.* *23*, 329-344.
- Bulet,P., Stocklin,R., and Menin,L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* *198*, 169-184.
- Carlow,D.A., Teh,S.J., and Teh,H.S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J. Immunol.* *161*, 2348-2355.
- Carmody,R.J. and Chen,Y.H. (2007). Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol. Immunol.* *4*, 31-41.
- Carnaud,C., Lee,D., Donnars,O., Park,S.H., Beavis,A., Koezuka,Y., and Bendelac,A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* *163*, 4647-4650.
- Carter,C.C., Gorbacheva,V.Y., and Vestal,D.J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch. Virol.* *150*, 1213-1220.
- Celada,A. and Schreiber,R.D. (1987). Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J. Immunol.* *139*, 147-153.
- Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L., and Lenardo,M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* *288*, 2351-2354.

- Cheng, Y.S., Becker-Manley, M.F., Chow, T.P., and Horan, D.C. (1985). Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J. Biol. Chem.* *260*, 15834-15839.
- Cheng, Y.S., Becker-Manley, M.F., Nguyen, T.D., DeGrado, W.F., and Jonak, G.J. (1986). Nonidentical induction of the guanylate binding protein and the 56K protein by type I and type II interferons. *J. Interferon Res.* *6*, 417-427.
- Cheng, Y.S., Colonna, R.J., and Yin, F.H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J. Biol. Chem.* *258*, 7746-7750.
- Clemens, M.J. and Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* *17*, 503-524.
- Com, E., Bourgeon, F., Evrard, B., Ganz, T., Collet, D., Jegou, B., and Pineau, C. (2003). Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol. Reprod.* *68*, 95-104.
- Conlan, J.W. (1999). Early host-pathogen interactions in the liver and spleen during systemic murine listeriosis: an overview. *Immunobiology* *201*, 178-187.
- Conlan, J.W. and North, R.J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* *179*, 259-268.
- Cox, G.W., Mathieson, B.J., Gandino, L., Blasi, E., Radzioch, D., and Varesio, L. (1989). Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver. *J. Natl. Cancer Inst.* *81*, 1492-1496.
- Daher, K.A., Lehrer, R.I., Ganz, T., and Kronenberg, M. (1988). Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 7327-7331.
- Darnell, J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* *277*, 1630-1635.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 1415-1421.
- Daubener, W. and MacKenzie, C.R. (1999). IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* *467*, 517-524.
- Decker, T., Lew, D.J., Cheng, Y.S., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1989). Interactions of alpha- and gamma-interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein. *EMBO J.* *8*, 2009-2014.
- Decker, T., Lew, D.J., and Darnell, J.E., Jr. (1991). Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol. Cell Biol.* *11*, 5147-5153.
- Degrandi, D. Transkriptomanalyse von Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor regulierten Genen in murinen Makrophagen: Klonierung und Charakterisierung von IRG1 und mGBP6. 2007.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Degrandi,D., Hoffmann,R., and Pfeffer,K. (2008). The proinflammatory cytokine induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J. Interferon Cytokine Res.*

Degrandi,D., Konermann,C., Beuter-Gunia,C., Kresse,A., Wurthner,J., Kurig,S., Beer,S., and Pfeffer,K. (2007). Extensive Characterization of IFN-Induced GTPases mGBP1 to mGBP10 Involved in Host Defense. *J. Immunol.* *179*, 7729-7740.

Dempsey,P.W., Doyle,S.E., He,J.Q., and Cheng,G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 193-209.

Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.

Doyle,S., Vaidya,S., O'Connell,R., Dadgostar,H., Dempsey,P., Wu,T., Rao,G., Sun,R., Haberland,M., Modlin,R., and Cheng,G. (2002). IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity.* *17*, 251-263.

Duits,L.A., Nibbering,P.H., van Strijen,E., Vos,J.B., Mannesse-Lazeroms,S.P., van Sterkenburg,M.A., and Hiemstra,P.S. (2003). Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *38*, 59-64.

Edmonds,M. (2002). A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *71*, 285-389.

Ehlers,S. (2003). Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann. Rheum. Dis.* *62 Suppl 2*, ii37-ii42.

Ehlers,S., Holscher,C., Scheu,S., Tertilt,C., Hehlhans,T., Suwinski,J., Endres,R., and Pfeffer,K. (2003). The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* *170*, 5210-5218.

Eisenhauer,P.B. and Lehrer,R.I. (1992). Mouse neutrophils lack defensins. *Infect. Immun.* *60*, 3446-3447.

Elomaa,O., Kangas,M., Sahlberg,C., Tuukkanen,J., Sormunen,R., Liakka,A., Thesleff,I., Kraal,G., and Tryggvason,K. (1995). Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* *80*, 603-609.

Endres,R., Luz,A., Schulze,H., Neubauer,H., Futterer,A., Holland,S.M., Wagner,H., and Pfeffer,K. (1997). Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity.* *7*, 419-432.

Epstein,J., Eichbaum,Q., Sheriff,S., and Ezekowitz,R.A. (1996). The collectins in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 29-35.

Farrar,M.A. and Schreiber,R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 571-611.

- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 491-496.
- Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *10*, 363-372.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., and Koyasu, S. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* *22*, 556-560.
- Fukao, T., Frucht, D.M., Yap, G., Gadina, M., O'Shea, J.J., and Koyasu, S. (2001). Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* *166*, 4446-4455.
- Fukao, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. (2000). Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol.* *164*, 64-71.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* *197*, 1107-1117.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 710-720.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., and Lehrer, R.I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest* *76*, 1427-1435.
- Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* *167*, 1882-1885.
- Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J., and Fiedel, B. (1982). C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Intern. Med.* *27*, 345-372.
- Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S.K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S.P., Crabb, J.W., Ganz, T., and Bevins, C.L. (2002). Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* *3*, 583-590.
- Giese, A., Stuhlsatz, S., Daubener, W., and Mackenzie, C.R. (2004). Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF-alpha receptor 2. *J. Immunol.* *173*, 3366-3374.
- Goetschy, J.F., Zeller, H., Content, J., and Horisberger, M.A. (1989). Regulation of the interferon-inducible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine Mx gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. *J. Virol.* *63*, 2616-2622.
- Gorbacheva, V.Y., Lindner, D., Sen, G.C., and Vestal, D.J. (2002). The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J. Biol. Chem.* *277*, 6080-6087.

- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* *36*, 59-74.
- Groettrup,M., Khan,S., Schwarz,K., and Schmidtke,G. (2001). Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* *83*, 367-372.
- Guenzi,E., Topolt,K., Cornali,E., Lubeseder-Martellato,C., Jorg,A., Matzen,K., Zietz,C., Kremmer,E., Nappi,F., Schwemmle,M., Hohenadl,C., Barillari,G., Tschachler,E., Monini,P., Ensoli,B., and Sturzl,M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* *20*, 5568-5577.
- Guenzi,E., Topolt,K., Lubeseder-Martellato,C., Jorg,A., Naschberger,E., Benelli,R., Albini,A., and Sturzl,M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* *22*, 3772-3782.
- Gupta,S.L., Rubin,B.Y., and Holmes,S.L. (1979). Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 4817-4821.
- Haller,O., Arnheiter,H., Gresser,I., and Lindenmann,J. (1979). Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J. Exp. Med.* *149*, 601-612.
- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-580.
- Haque,S.J., Wu,Q., Kammer,W., Friedrich,K., Smith,J.M., Kerr,I.M., Stark,G.R., and Williams,B.R. (1997). Receptor-associated constitutive protein tyrosine phosphatase activity controls the kinase function of JAK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 8563-8568.
- Harada,H., Takahashi,E., Itoh,S., Harada,K., Hori,T.A., and Taniguchi,T. (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1500-1509.
- Hashimoto,C., Hudson,K.L., and Anderson,K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Hefti,H.P., Frese,M., Landis,H., Di Paolo,C., Aguzzi,A., Haller,O., and Pavlovic,J. (1999). Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J. Virol.* *73*, 6984-6991.
- Hehlgans,T. and Mannel,D.N. (2002). The TNF-TNF receptor system. *Biol. Chem.* *383*, 1581-1585.
- Hehlgans,T. and Pfeffer,K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* *115*, 1-20.
- Heil,F., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Kirschning,C., Akira,S., Lipford,G., Wagner,H., and Bauer,S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.

- Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Hof,H., Nichterlein,T., and Kretschmar,M. (1997). Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 345-357.
- Hoffmann,J.A., Kafatos,F.C., Janeway,C.A., and Ezekowitz,R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313-1318.
- Holmskov,U.L. (2000). Collectins and collectin receptors in innate immunity. *APMIS Suppl* *100*, 1-59.
- Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* *162*, 3749-3752.
- Huang,S., Hendriks,W., Althage,A., Hemmi,S., Bluethmann,H., Kamijo,R., Vilcek,J., Zinkernagel,R.M., and Aguet,M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* *259*, 1742-1745.
- Idriss,H.T. and Naismith,J.H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* *50*, 184-195.
- Ihle,J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* *377*, 591-594.
- Ihle,J.N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* *84*, 331-334.
- Inohara,N., Koseki,T., del Peso,L., Hu,Y., Yee,C., Chen,S., Carrio,R., Merino,J., Liu,D., Ni,J., and Nunez,G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* *274*, 14560-14567.
- Inohara,N., Ogura,Y., Chen,F.F., Muto,A., and Nunez,G. (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* *276*, 2551-2554.
- Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197-216.
- Janeway,C.A., Jr., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th Edition. (New York and London: Garland Science).
- Jiang,Q., Akashi,S., Miyake,K., and Petty,H.R. (2000). Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J. Immunol.* *165*, 3541-3544.
- Johannes,L., Kambadur,R., Lee-Hellmich,H., Hodgkinson,C.A., Arnheiter,H., and Meier,E. (1997). Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *J. Virol.* *71*, 9792-9795.

- Joiner, K.A., Beckers, C.J., Bermudes, D., Ossorio, P.N., Schwab, J.C., and Dubremetz, J.F. (1994). Structure and function of the parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *730*, 1-6.
- Jones, T.C., Yeh, S., and Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* *136*, 1157-1172.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J., and . (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* *263*, 1612-1615.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 240-246.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. *11*, 115-122.
- Keller, C., Hoffmann, R., Lang, R., Brandau, S., Hermann, C., and Ehlers, S. (2006). Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infect. Immun.* *74*, 4295-4309.
- Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett.* *285*, 194-198.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamijo, R., Vilcek, J., Mak, T.W., and . (1994). Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science* *264*, 1921-1924.
- King, M.C., Raposo, G., and Lemmon, M.A. (2004). Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8957-8962.
- Klamp, T., Boehm, U., Schenk, D., Pfeffer, K., and Howard, J.C. (2003). A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *J. Immunol.* *171*, 1255-1265.
- Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L., and Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the *trkB* neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* *75*, 113-122.
- Klotman, M.E. and Chang, T.L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 447-456.
- Ko, J.H., Takada, A., Mitsuhashi, T., Agui, T., and Watanabe, T. (2004). Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631. *Anim Genet.* *35*, 119-122.
- Kochs, G. and Haller, O. (1999). GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol. Chem.* *274*, 4370-4376.

- Kresse,A., Konermann,C., Degrandi,D., Beuter-Gunia,C., Wuerthner,J., Pfeffer,K., and Beer,S. (2008). Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC. Genomics* *9*, 158.
- Kuhn,R., Rajewsky,K., and Muller,W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* *254*, 707-710.
- Kumar,M. and Carmichael,G.G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1415-1434.
- LaMonica,R., Kocer,S.S., Nazarova,J., Dowling,W., Geimonen,E., Shaw,R.D., and Mackow,E.R. (2001). VP4 differentially regulates TRAF2 signaling, disengaging JNK activation while directing NF-kappa B to effect rotavirus-specific cellular responses. *J. Biol. Chem.* *276*, 19889-19896.
- Lapaque,N., Takeuchi,O., Corrales,F., Akira,S., Moriyon,I., Howard,J.C., and Gorvel,J.P. (2006). Differential inductions of TNF-alpha and IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol.* *8*, 401-413.
- Lehrach,H., Diamond,D., Wozney,J.M., and Boedtke,H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* *16*, 4743-4751.
- Lehrer,R.I. and Ganz,T. (2002). Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.* *9*, 18-22.
- Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- LeVine,A.M., Kurak,K.E., Bruno,M.D., Stark,J.M., Whitsett,J.A., and Korfhagen,T.R. (1998). Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 700-708.
- Lew,D.J., Decker,T., Strehlow,I., and Darnell,J.E. (1991). Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol. Cell Biol.* *11*, 182-191.
- Lewin,B. (1998). *Molekularbiologie der Gene*.
- Lindenmann,J., Lane,C.A., and Hobson,D. (1963). THE RESISTANCE OF A2G MICE TO MYXOVIRUSES. *J. Immunol.* *90*, 942-951.
- Linke,M.J., Harris,C.E., Korfhagen,T.R., McCormack,F.X., Ashbaugh,A.D., Steele,P., Whitsett,J.A., and Walzer,P.D. (2001). Immunosuppressed surfactant protein A-deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J. Infect. Dis.* *183*, 943-952.
- Locksley,R.M., Killeen,N., and Lenardo,M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Lubeseder-Martellato,C., Guenzi,E., Jorg,A., Topolt,K., Naschberger,E., Kremmer,E., Zietz,C., Tschachler,E., Hutzler,P., Schwemmler,M., Matzen,K., Grimm,T., Ensoli,B., and Sturzl,M. (2002).

Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am. J. Pathol.* *161*, 1749-1759.

Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R., and Iwasaki,A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *198*, 513-520.

Lyons,S., Wang,L., Casanova,J.E., Sitaraman,S.V., Merlin,D., and Gewirtz,A.T. (2004). Salmonella typhimurium transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J. Cell Sci.* *117*, 5771-5780.

Mach,B., Steimle,V., Martinez-Soria,E., and Reith,W. (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 301-331.

MacMicking,J.D. (2005). Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 74-82.

MacMicking,J.D., Taylor,G.A., and McKinney,J.D. (2003). Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* *302*, 654-659.

Mandel,T.E. and Cheers,C. (1980). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect. Immun.* *30*, 851-861.

Mandell,G.L. (1975). Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J. Clin. Invest* *55*, 561-566.

Mangus,D.A., Evans,M.C., and Jacobson,A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* *4*, 223.

Martens,S. and Howard,J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 559-589.

Martens,S., Parvanova,I., Zerrahn,J., Griffiths,G., Schell,G., Reichmann,G., and Howard,J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS. Pathog.* *1*, e24.

Martens,S., Sabel,K., Lange,R., Uthaiiah,R., Wolf,E., and Howard,J.C. (2004). Mechanisms regulating the positioning of mouse p47 resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on cellular membranes: retargeting to plasma membrane induced by phagocytosis. *J. Immunol.* *173*, 2594-2606.

Martin,E., Nathan,C., and Xie,Q.W. (1994). Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* *180*, 977-984.

Matsumoto,M., Tanaka,N., Harada,H., Kimura,T., Yokochi,T., Kitagawa,M., Schindler,C., and Taniguchi,T. (1999). Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol. Chem.* *380*, 699-703.

Matsuyama,T., Kimura,T., Kitagawa,M., Pfeffer,K., Kawakami,T., Watanabe,N., Kundig,T.M., Amakawa,R., Kishihara,K., Wakeham,A., and . (1993). Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2

results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* **75**, 83-97.

McBride,H.M., Neuspiel,M., and Wasiak,S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **16**, R551-R560.

Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4-9.

Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397.

Miller,B.H., Fratti,R.A., Poschet,J.F., Timmins,G.S., Master,S.S., Burgos,M., Marletta,M.A., and Deretic,V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun.* **72**, 2872-2878.

Modiano,N., Lu,Y.E., and Cresswell,P. (2005). Golgi targeting of human guanylate-binding protein-1 requires nucleotide binding, isoprenylation, and an IFN-gamma-inducible cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 8680-8685.

Mowen,K. and David,M. (2000). Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7273-7281.

Munder,M., Mallo,M., Eichmann,K., and Modolell,M. (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* **187**, 2103-2108.

Naschberger,E., Werner,T., Vicente,A.B., Guenzi,E., Topolt,K., Leubert,R., Lubeseder-Martellato,C., Nelson,P.J., and Sturzl,M. (2004). Nuclear factor-kappaB motif and interferon-alpha-stimulated response element co-operate in the activation of guanylate-binding protein-1 expression by inflammatory cytokines in endothelial cells. *Biochem. J.* **379**, 409-420.

Nathan,C. and Shiloh,M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8841-8848.

Neun,R., Richter,M.F., Staeheli,P., and Schwemmler,M. (1996). GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* **390**, 69-72.

Nguyen,T.T., Hu,Y., Widney,D.P., Mar,R.A., and Smith,J.B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 899-909.

O'Neill,L.A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 3-9.

Ogura,Y., Inohara,N., Benito,A., Chen,F.F., Yamaoka,S., and Nunez,G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **276**, 4812-4818.

Ohmori,Y., Schreiber,R.D., and Hamilton,T.A. (1997). Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between

signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* *272*, 14899-14907.

Olszewski, M.A., Gray, J., and Vestal, D.J. (2006). In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J. Interferon Cytokine Res.* *26*, 328-352.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13766-13771.

Pan, Y.W., Scarlett, J.M., Luoh, T.T., and Kurre, P. (2007). Prolonged adherence of human immunodeficiency virus-derived vector particles to hematopoietic target cells leads to secondary transduction in vitro and in vivo. *J. Virol.* *81*, 639-649.

Parmley, S.F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L.D., Sucharczuk, A., and Remington, J.S. (1994). Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* *66*, 283-296.

Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P. (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J. Virol.* *66*, 2564-2569.

Pavlovic, J., Zurcher, T., Haller, O., and Staeheli, P. (1990). Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.* *64*, 3370-3375.

Pearson, A.M. (1996). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 20-28.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.

Pfeffer, K. and Mak, T.W. (1994). Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 367-411.

Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* *73*, 457-467.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* *282*, 2085-2088.

Portnoy, D.A. (1992). Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr. Opin. Immunol.* *4*, 20-24.

Praefcke, G.J., Geyer, M., Schwemmler, M., Robert, K.H., and Herrmann, C. (1999). Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J. Mol. Biol.* *292*, 321-332.

- Praefcke,G.J., Kloep,S., Benschaid,U., Lilie,H., Prakash,B., and Herrmann,C. (2004). Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* *344*, 257-269.
- Praefcke,G.J. and McMahon,H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133-147.
- Raschke,W.C., Baird,S., Ralph,P., and Nakoinz,I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* *15*, 261-267.
- Reichelt,M., Stertz,S., Krijnse-Locker,J., Haller,O., and Kochs,G. (2004). Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic*. *5*, 772-784.
- Roach,D.R., Bean,A.G., Demangel,C., France,M.P., Briscoe,H., and Britton,W.J. (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.* *168*, 4620-4627.
- Saito,T., Hirai,R., Loo,Y.M., Owen,D., Johnson,C.L., Sinha,S.C., Akira,S., Fujita,T., and Gale,M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 582-587.
- Salazar-Mather,T.P., Hamilton,T.A., and Biron,C.A. (2000). A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest* *105*, 985-993.
- Salkowski,C.A., Thomas,K.E., Cody,M.J., and Vogel,S.N. (2000). Impaired IFN-gamma production in IFN regulatory factor-1 knockout mice during endotoxemia is secondary to a loss of both IL-12 and IL-12 receptor expression. *J. Immunol.* *165*, 3970-3977.
- Sanford,K.K., Earle,W.R., and Likely,G.D. (1948). The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *9*, 229-246.
- Schindler,C. and Darnell,J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 621-651.
- Schindler,H., Lutz,M.B., Rollinghoff,M., and Bogdan,C. (2001). The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J. Immunol.* *166*, 3075-3082.
- Schitteck,B., Hipfel,R., Sauer,B., Bauer,J., Kalbacher,H., Stevanovic,S., Schirle,M., Schroeder,K., Blin,N., Meier,F., Rassner,G., and Garbe,C. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* *2*, 1133-1137.
- Schnorr,J.J., Schneider-Schaulies,S., Simon-Jodicke,A., Pavlovic,J., Horisberger,M.A., and ter,M., V (1993). MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J. Virol.* *67*, 4760-4768.
- Schreiber,R.D. and Farrar,M.A. (1993). The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol. Jpn.* *28 Suppl 4*, 88-94.

- Schroder,K., Hertzog,P.J., Ravasi,T., and Hume,D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163-189.
- Schwalbe,R.A., Dahlback,B., Coe,J.E., and Nelsestuen,G.L. (1992). Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* *31*, 4907-4915.
- Schwandner,R., Dziarski,R., Wesche,H., Rothe,M., and Kirschning,C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* *274*, 17406-17409.
- Schwemmler,M. and Staeheli,P. (1994). The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J. Biol. Chem.* *269*, 11299-11305.
- Schwoebel,E.D. and Moore,M.S. (2000). The control of gene expression by regulated nuclear transport. *Essays Biochem.* *36*, 105-113.
- Seitz,C., Muller,P., Krieg,R.C., Mannel,D.N., and Hehlhans,T. (2001). A novel p75TNF receptor isoform mediating NFkappa B activation. *J. Biol. Chem.* *276*, 19390-19395.
- Selsted,M.E., Harwig,S.S., Ganz,T., Schilling,J.W., and Lehrer,R.I. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest* *76*, 1436-1439.
- Sen,G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* *55*, 255-281.
- Senju,S., Iyama,K., Kudo,H., Aizawa,S., and Nishimura,Y. (2000). Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of GTPBP1. *Mol. Cell Biol.* *20*, 6195-6200.
- Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., and Kimoto,M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* *189*, 1777-1782.
- Shirafuji,Y., Oono,T., Kanzaki,H., Hirakawa,S., and Arata,J. (1999). Detection of cryptdin in mouse skin. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* *6*, 336-340.
- Shirayoshi,Y., Burke,P.A., Appella,E., and Ozato,K. (1988). Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 5884-5888.
- Sinai,A.P., Webster,P., and Joiner,K.A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 17)*, 2117-2128.
- Smith,J.M. and Koopman,P.A. (2004). The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet.* *20*, 4-8.
- Sorensen,O.E., Thapa,D.R., Rosenthal,A., Liu,L., Roberts,A.A., and Ganz,T. (2005). Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J. Immunol.* *174*, 4870-4879.

- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* *98*, 503-517.
- Staehele, P., Danielson, P., Haller, O., and Sutcliffe, J.G. (1986). Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol. Cell Biol.* *6*, 4770-4774.
- Staehele, P. and Haller, O. (1985). Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol. Cell Biol.* *5*, 2150-2153.
- Staehele, P., Prochazka, M., Steigmeier, P.A., and Haller, O. (1984). Genetic control of interferon action: mouse strain distribution and inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology* *137*, 135-142.
- Staehele, P. and Sutcliffe, J.G. (1988). Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene. *Mol. Cell Biol.* *8*, 4524-4528.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 227-264.
- Stein, J.V. and Nombela-Arrieta, C. (2005). Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* *116*, 1-12.
- Stickney, J.T. and Buss, J.E. (2000). Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2191-2200.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 9-20.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., and . (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* *386*, 292-296.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., and Taniguchi, T. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* *424*, 516-523.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* *17*, 1-14.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 335-376.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* *13*, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* *169*, 10-14.

- Taylor,G.A., Feng,C.G., and Sher,A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 100-109.
- Temperton,N.J., Wilkinson,S.R., and Kelly,J.M. (1996). Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**, 339-343.
- Thomas,C.A., Li,Y., Kodama,T., Suzuki,H., Silverstein,S.C., and El Khoury,J. (2000). Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J. Exp. Med.* **191**, 147-156.
- Toshchakov,V., Jones,B.W., Perera,P.Y., Thomas,K., Cody,M.J., Zhang,S., Williams,B.R., Major,J., Hamilton,T.A., Fenton,M.J., and Vogel,S.N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* **3**, 392-398.
- Trinchieri,G. and Sher,A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179-190.
- Tsai,H. and Bobek,L.A. (1998). Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* **9**, 480-497.
- Tuma,P.L. and Collins,C.A. (1994). Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* **269**, 30842-30847.
- Uthaiiah,R.C., Praefcke,G.J., Howard,J.C., and Herrmann,C. (2003). IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 29336-29343.
- Valore,E.V. and Ganz,T. (1992). Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* **79**, 1538-1544.
- van Rozendaal,B.A., van Spriel,A.B., van De Winkel,J.G., and Haagsman,H.P. (2000). Role of pulmonary surfactant protein D in innate defense against *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* **182**, 917-922.
- Vestal,D.J., Gorbacheva,V.Y., and Sen,G.C. (2000). Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 991-1000.
- Wagner,H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv. Immunol.* **73**, 329-368.
- Wagner,H. and Bauer,S. (2006). All is not Toll: new pathways in DNA recognition. *J. Exp. Med.* **203**, 265-268.
- Wieland,S.F., Vega,R.G., Muller,R., Evans,C.F., Hilbush,B., Guidotti,L.G., Sutcliffe,J.G., Schultz,P.G., and Chisari,F.V. (2003). Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J. Virol.* **77**, 1227-1236.
- Williams,B.R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**, 6112-6120.

- Wright,S.D., Ramos,R.A., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., and Mathison,J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* *249*, 1431-1433.
- Yang,D., Chertov,O., and Oppenheim,J.J. (2001). Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* *69*, 691-697.
- Yarovinsky,F., Zhang,D., Andersen,J.F., Bannenberg,G.L., Serhan,C.N., Hayden,M.S., Hieny,S., Sutterwala,F.S., Flavell,R.A., Ghosh,S., and Sher,A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.
- Yoshimoto,T., Takeda,K., Tanaka,T., Ohkusu,K., Kashiwamura,S., Okamura,H., Akira,S., and Nakanishi,K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J. Immunol.* *161*, 3400-3407.
- You,M., Yu,D.H., and Feng,G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2416-2424.
- Zanetti,M., Gennaro,R., and Romeo,D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* *374*, 1-5.
- Zerrahn,J., Schaible,U.E., Brinkmann,V., Guhlich,U., and Kaufmann,S.H. (2002). The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum- associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J. Immunol.* *168*, 3428-3436.
- Zhang,D., Zhang,G., Hayden,M.S., Greenblatt,M.B., Bussey,C., Flavell,R.A., and Ghosh,S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* *303*, 1522-1526.
- Zhang,H.M., Yuan,J., Cheung,P., Luo,H., Yanagawa,B., Chau,D., Stephan-Tozy,N., Wong,B.W., Zhang,J., Wilson,J.E., McManus,B.M., and Yang,D. (2003). Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J. Biol. Chem.* *278*, 33011-33019.
- Zhang,J.G., Farley,A., Nicholson,S.E., Willson,T.A., Zugaro,L.M., Simpson,R.J., Moritz,R.L., Cary,D., Richardson,R., Hausmann,G., Kile,B.J., Kent,S.B., Alexander,W.S., Metcalf,D., Hilton,D.J., Nicola,N.A., and Baca,M. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 2071-2076.
- Zhao,J., Hyman,L., and Moore,C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *63*, 405-445.
- Zurcher,T., Pavlovic,J., and Staeheli,P. (1992a). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.* *11*, 1657-1661.
- Zurcher,T., Pavlovic,J., and Staeheli,P. (1992b). Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* *187*, 796-800.

8 Tabellarischer Lebenslauf

Name: Cornelia Beuter-Gunia, geb.: Beuter
 Geb.: 16.09.1972
 Geb.-Ort.: Herdecke

Familienstand: verheiratet

Schulische Bildung:

Grundschule: Dorfschule Witten-Heven
08/1979-06/1983
 Realschule: Otto-Schott-Realschule Witten
08/1983-06/1989
 Gymnasium: Albert-Martmöller-Gymnasium
08/1989-06/1992
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung:

Stammhauslehre Siemens: *10/1993-09/1995*
 Abschluß: Industriekauffrau IHK, Land Bayern
 Angestellte Vertrieb Düsseldorf: *10/1995-09/1996*

Studium:

Universität: Ruhr-Universität Bochum
 Studiengang: Wirtschaftswissenschaften und Englisch, Lehramt
10/1992-09/1993
 Biologie, Diplom
10/1996-11/2002
 Diplomarbeit: AG „Spezielle Zoologie“ / Max-Planck-Institut für
 Immunbiologie (Freiburg)
 Thema: „Rekonstitution der alymphoiden Knock-out-Maus
 RAG2^{-/-}γc^{-/-} zur Analyse der Immunantwort bei
 einer *Trypanosoma cruzi* Infektion“
 Betreuer: Prof. Dr. G.A. Schaub (Bochum) / Dr. H. Mossmann
 (Freiburg)
 Abschluß: Diplom Biologin
 Ergänzende Arbeiten am MPI zur *T. cruzi* Infektion
11/2002-02/2004
 Promotion: Institut für Medizinische Mikrobiologie und
 Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine
 Universität Düsseldorf
ab 03/2004
 Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von IFN γ
 regulierten Effektormolekülen (mGBP7, SSPII) bei
 der antimikrobiellen Immunantwort“
 Betreuer: Prof. Dr. Klaus Pfeffer/ Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

9 Danksagung

Herrn **Professor Dr. Klaus Pfeffer** möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die fürsorgliche Betreuung der vorliegenden Arbeit danken.

Herrn **Professor Dr. Heinz Mehlhorn** danke ich recht herzlich für die Bereitschaft der Betreuung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Sandra Beer** für die große Unterstützung und die kreativen Gespräche und Ideen.

Lieben Dank an **Daniel Degrandi** für das super Teamwork die Freundschaft und Unterstützung in allen Lagen des Laboralltags.

Carolin Konermann möchte ich für den guten Austausch von Ideen hinsichtlich der GTPasen danken.

Herzlichen Dank an **Nicole Krafzig** für die Maus-Unterstützung, Blastozysteninjektion und Transfer sowie die Freundschaft!

Karin Buchholz möchte ich für die Laborunterstützung und den regen Info-Austausch herzlich danken.

Simone Brandt und **Anne Mausberg** gilt ein besonderer Dank für ihre Freundschaft in und außerhalb des Labors.

Allen anderen Mitgliedern der Pfeffer/Beer/Scheu-Gruppe möchte ich auch herzlich danken, für anregende Gespräche und gegenseitige Unterstützung. Als da wären: Philipp Dresing (Sardinien war doch super, auch ohne Koffer!), Steffi Borkens, Steffi Scheu, Sonja Kropp, Magdalena Kocur, Regina Jakubiak, Bernhard Reis, Max von Holleben und Sarah Lahme.

Meinem Ehemann **Frank Gunia** gilt der größte Dank, mit seiner Liebe und Geborgenheit hat er mir den größten Halt gegeben. Auch meiner Familie: Eltern, Geschwistern, Omas und Tante, Schwiegereltern, Schwägerin und Schwager sowie meiner Nichte Sarah gilt mein besonderer Dank, da sie mir den Blick für das Wesentliche geben sowie jedwede Unterstützung.