

Charakterisierung der homologen Gene *imap38* und
himap1 als Prototypen einer neuen Genfamilie in
Maus und Mensch

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

vorgelegt von
Olaf Stamm
aus Düsseldorf

Düsseldorf
2001

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Wunderlich
2. Berichterstatter: PD Dr. Ralf Kölling-Paternoga

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Krücken, J., O. Stamm, H.-P. Schmitt-Wrede, A. Mincheva, P. Lichter, and F. Wunderlich. 1999. Spleen-specific expression of the malaria-inducible intronless mouse gene *imap38*. *J. Biol. Chem.* 274: 24383-24391.

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
1.1	Die Ausbreitung von Malaria als Folge von anthropogenen Umweltveränderungen	1
1.2	Biologie und Pathogenese von Malaria	3
1.3	Partielle Immunität contra Immunevasion	4
1.4	Aktuelle Bekämpfungsstrategien: Vakzinierung und Therapeutika	5
1.5	Die Funktion der Milz bei der Immunabwehr gegen <i>Plasmodien</i>	7
1.6	Wie ein Wirt sich wehrt: Die Maus als Modellorganismus für Malariainfektionen	8
1.7	Zielsetzung der Arbeit	12
2.0	Material & Methoden	13
2.1	Chemikalien und Enzyme	13
2.2	Lösungen und Puffer	14
2.3	Versuchstiere	17
2.4	<i>Plasmodium chabaudi</i> -Malaria Stamm	17
2.5	Bakterienstämme	17
2.6	Vektoren	18
2.7	Organentnahme und Zellisolation	18
2.7.1	Isolation von Gesamtmilzzellen	18
2.7.2	Fraktionierung von Milzzellen für FAC-Sortierung	18
2.8	Isolation von genomischer DNA	19
2.8.1	Isolation von genomischer DNA aus Blut	19
2.9	Isolation von Plasmid DNA	20
2.10	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	20
2.11	Restriktion und Elektrophorese von DNA	20
2.12	Elektrophorese von DNA	20
2.13	Transfer von DNA auf Membranen und Hybridisierung „Southern Blot“	20
2.14	Radioaktive Markierung von DNA	21
2.15	Isolation von DNA aus Agarosegelen	21
2.16	Isolation von RNA	21
2.16.1	Isolation von RNA über CsCl Gradienten und Isolation von poly (A)+RNA	21
2.16.2	Isolation von RNA durch saure Phenol Extraktion	21
2.17	Elektrophorese von RNA und „Northern Blot“	22
2.18	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	22
2.19	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	22
2.19.1	Synthetische Oligonucleotide (Primer)	22

2.19.2	Reverse Transkription mit anschließender PCR Reaktion (RT-PCR)	25
2.19.3	Plasmid PCR	25
2.19.4	Genomische PCR	25
2.19.5	Klonierung von PCR-Produkten	25
2.19.6	Klonierung des 5'-Bereiches von himap-1 mit Hilfe der Marathon-Ready™ cDNA	26
2.20	Screening von high-density cDNA Filtern	26
2.21	DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse	26
2.21.1	Sequenzierung mit [$\alpha^{35}\text{S}$]-dATP	26
2.21.2	Sequenzierung mit IR-gekoppelten Primern	26
2.22	<i>In vitro</i> Transkription	27
2.23	<i>In vitro</i> Translation	28
2.24	<i>In situ</i> Hybridisierung	28
2.25	Reportergen-Messungen	29
2.26	Zellkultur	29
2.26.1	Immortalisierte Zelllinien	29
2.26.2	Kultivierung von Säugerzelllinien	29
2.26.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien	30
2.26.4	Transiente und stabile Transfektion von Säugerzellen	30
2.27	Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen mit dem Two-Hybrid System	31
2.27.1	cDNA Synthese und Klonierung in den HybriZAP-Vektor	31
2.27.2	Verpackung der Phagen DNA und Tittersbestimmung der Primärbibliothek	31
2.27.3	<i>In vivo</i> Excision von pAD-GAL4 aus dem HybriZAP-Vektor und von Einzelklonen	32
2.27.4	Massen <i>in vivo</i> Excision	33
2.27.5	Amplifikation der pAD-GAL4 Bibliothek	33
2.27.6	„Two-Hybrid“-Vektoren	33
2.27.7	„Two-hybrid“-Hefestämme	34
2.27.8	Transformation von Köder-Plasmiden in Hefe	35
2.27.9	Transformation von „Target“-Plasmiden (pAD-GAL4-Bank) in Hefe	35
2.27.10	Transformation von Plasmiden nach der modifizierten Methode von Gietz	36
2.27.11	Plasmidisolierung aus Hefe	36
2.27.12	„Screening“ der C57BL/10-immun-cDNA-Bibliothek	37
2.27.13	Overlay Assay	37
2.27.14	Charakterisierung positiver Screening Ergebnisse	37
2.27.15	Proteinextrakte aus Milzgewebe/-zellen	38
2.27.16	Proteinextrakte aus <i>E.coli</i>	38
2.27.17	Proteinextrakte aus <i>S. cerevisiae</i>	38
2.27.18	Proteinextrakte aus Zellkulturzellen	38
2.27.19	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
2.27.20	Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	39
2.27.21	Anfärbung von Proteinen nach SDS Gelelektrophorese	39
2.27.22	Hochauflösende 2D Gelelektrophorese (Isoelektrische Fokussierung)	39
2.27.23	Nichtgleichgewichtsgelelektrophorese	40
2.27.24	Anfärbung von Proteinen im Gel	40
2.27.25	Massenspektrometrie von Proteinen	40
2.27.26	Proteintransfer auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen	41
2.27.27	Immundetektion	41
2.27.28	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i>	41

2.27.29	Metallaffinitätschromatographie	42
2.27.30	Immunisierung von Versuchstieren zur Antikörpergewinnung	43
2.27.31	Aufreinigung von Antiseren durch Filteradsorption	43
2.27.32	Aufreinigung von Antiseren durch Affinitätschromatographie	43
2.27.33	Markierung von Antikörpern mit HRP	44
2.27.34	Kovalente Koppelung von synthetischen Polypeptiden an KLH	44
2.28	Zelluläre Lokalisation von Proteinen	44
2.28.1	Anfärbung verschiedener Zellkompartimente (Nucleus, ER, Lysosomen, Zellmembran)	45
2.29	Mikroskopie	45
2.29.1	Lichtmikroskopie und Phasenkontrastmikroskopie	45
2.29.2	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	45
2.30	GTP/ATP Bindungsnachweis	46
3.0	Ergebnisse	47
3.1	Funktionelle Charakterisierung der putativen <i>imap38</i> Genprodukte	47
3.1.1	Identifizierung eines unbekanntes Kernlokalisierungssignals	54
3.1.2	Expression und Charakterisierung von IMAP38-2	55
3.1.3	Identifizierung und Isolierung von putativen IMAP38-1 Protein aus immunen Milzzellen	58
3.1.4	MALDI-TOF Analyse der isolierten Proteine und Abgleich mit Peptid-Datenbanken	59
3.1.5	Zelltypspezifität der <i>imap38</i> Expression	61
3.1.6	Nachweis einer Protein-Protein Wechselwirkung mit IMAP38-1	65
3.2	Klonierung und Charakterisierung der <i>himap1</i> cDNA	68
3.2.1	Vergleich von <i>himap1</i> mit ähnlichen cDNA bzw. Proteinsequenzen	70
3.2.2	Gruppierung von HIMAP mit ähnlichen Proteine in Stammbäumen	72
3.2.3	Genomische Organisation des <i>himap1</i> Gens	75
3.2.4	Charakterisierung des HIMAP Proteins	77
3.2.5	Überprüfung einer GTP/ATP Bindung von HIMAP und IMAP	78
3.2.6	Expression der <i>himap1</i> mRNA in Zelllinien und Geweben	80
3.2.7	Analyse des <i>himap1</i> Promotors	83
4.0	Diskussion	88
4.1	Ein Gen, zwei Proteine – überlappende Leseraster in Eukaryonten	88
4.2	Unterschiedliche Eigenschaften der IMAP Proteine und Hinweise auf eine mögliche Funktion.	93
4.3	Zelltypspezifität der <i>imap38</i> Expression	95
4.4	Genomische Organisation des <i>himap1</i> Gens	97
4.5	Aktivität und Kontrolle des <i>himap1</i> Promotors	97
4.6	Eigenschaften und Funktion des HIMAP Proteins	99

5.0	Zusammenfassung	102
6.0	Literatur	103
7.0	Abkürzungsverzeichnis	116

1.0 Einleitung

1.1 Die Ausbreitung von Malaria als Folge von anthropogenen Umweltveränderungen

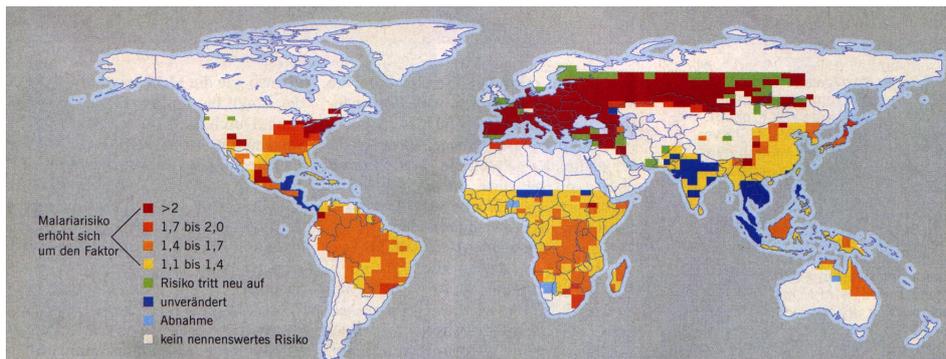
Dass sich die Erdatmosphäre erwärmt, stellt heute kaum ein Wissenschaftler in Frage. Ende Januar 2001 prognostizieren die 123 Wissenschaftler der UN Klima-Arbeitsgruppe (IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change) bis zum Ende des 21. Jahrhunderts einen Anstieg der Welt-Durchschnittstemperatur um 1,4-5,6 Grad Celsius (DPA 23.01.01). Die Anpassungsfähigkeit der Ökosysteme wird damit bei weitem überfordert, da maximal ein Grad pro 100 Jahre als verkraftbar gilt. Im Vordergrund der Folgen dieser Entwicklung stehen in erster Linie die direkt kalkulierbaren Schäden wie Stürme (Hurricanes), Überflutungen, Desertifikation etc. Weit weniger diskutiert, aber nicht minder gefährlich, sind die Sekundärfolgen. Durch globale Klimaveränderungen und andere regionale anthropogene Einflüsse (Rodungen, Zersiedlung, Wasserbauprojekte) werden sich Infektionskrankheiten ausbreiten und an Intensität und Häufigkeit zunehmen, die durch Stechmücken (Vektor-vermittelt) übertragen werden (Patz *et al.* 2000). Wirkmechanismen dieser Veränderungen sollen im Folgenden am Beispiel Malaria näher erläutert werden.

Als Folge der globalen Klimaveränderungen wird sich der hydrogeologische Kreislauf beschleunigen. Aus dem erwärmten Meerwasser verdunstet das Wasser schneller, warme Luft nimmt mehr Feuchtigkeit auf und das zusätzliche Wasser geht als intensiverer Regen zu Boden. Dies bedeutet verbesserte Lebensbedingungen für alle im Wasser lebenden Vektoren. Gleichzeitig expandieren die Habitate dieser Vektoren mit der globalen Erwärmung in die gemäßigten Klimazonen (Kirk-Davidoff *et al.* 1999, Martens 1998, Sutherst 1993). Die Temperatur ist ein kontrollierender Faktor für die Entwicklung der Stechmücken, die Häufigkeit ihrer Blutmahlzeiten, die Aufnahme und die Reifung der Parasiten innerhalb des Vektors. Während bei 20 °C *P. falciparum* 26 Tage für seine volle Entwicklung benötigt, genügen bei 25 °C nur 13 Tage (Lindsay & Martens 1998). Die für die Entwicklung benötigten Minimaltemperaturen liegen bei 18 °C für *P. falciparum* und bei 15 °C für *P. vivax* (Barry 1992). Auch aufgrund ihrer Höhe vor Stechmücken bislang geschützte Regionen werden zunehmend schrumpfen. Im 19. Jahrhundert siedelten die europäischen Kolonisten in den kühleren Bergregionen, um der gefährlichen Sumpfluft („mala-aria“) zu entgehen. Seit 1970 ist die Grenze, oberhalb der nur Minusgrade herrschen, in den Tropen um 150 m angestiegen. Seit 1980 wird die Stechmückenart *Aedes aegyptii*, die sich einst aus Temperaturgründen mit dem Tiefland begnügen musste, oberhalb 1600 Meter in den Gebirgen Nordindiens und in einer Höhe von 2000 Meter in den kolumbianischen Anden angetroffen (Bary 1992). In den Bergregionen im westlichen Kenia traten vermehrt Malaria Ausbrüche auch oberhalb von 2000 m auf, wenn die monatliche Durchschnittstemperatur 18 °C erreichte und die Niederschlagsmenge 15 mm im Monat überstieg (Malakooti *et al.* 1998). Vergleichbare Beobachtungen wurden in den Jahren 1987 und 1988 in Ruanda (Loevinsohn 1994) gemacht.

Häufig gewinnt man Einblicke in den Mechanismus eines komplexen Systems durch Studium eines Teilsystems. Ein solches Teilsystem, das als Modell für die klimabedingte Ausbreitung von Infektionskrankheiten (besonders Malaria) dienen kann (Bouma & van Kaay 1994, 1996, 1997), ist das Meeresphänomen „El Niño“. Es trat bisher mit einer Frequenz von ca. 5 Jahren im tropischen Pazifik auf. Das Meer vor Peru erwärmt sich dabei unge-

Abbildung 1

Temperaturabhängigkeit des Malariarisikos. Das Risiko, an Malaria zu erkranken, wird bis zum Jahr 2020 in vielen Teilen der Erde ansteigen. Die Karte zeigt das Ergebnis von Berechnungen, die von einer Temperatur um 1,8 Grad Celsius ausgehen. Außer der Überschreitung einer Temperaturschwelle wurden keine weiteren Einflussgrößen berücksichtigt. Die Farben geben an, um welchen Faktor sich das durchschnittliche Risiko im Verhältnis zu dem der Jahre 1961 bis 1990 erhöhen wird.



wöhnlich stark und bleibt monatelang auf diesem hohen Niveau, bevor sich seine Temperatur wieder normalisiert oder gar ins andere Extrem umschlägt (genannt „La Niña“). Der volle Name ist „El Niño/Southern Ocean Oscillation“ (Enso). Die „Südliche Schwingung“ bezeichnet Veränderungen in der Atmosphäre der gesamten Südhalbkugel, die mit den pazifischen Temperaturverschiebungen synchron verlaufen. Während eines „El Niño“ kann die Verdunstung über dem erwärmten östlichen Pazifik zu ungewöhnlich heftigen Regenfällen in Teilen Südamerikas und Afrikas führen. Auch Veränderungen des Luftdrucks über dem tropischen Pazifik sind weltweit spürbar, bis hin zu milderem Wintern in einigen nördlichen Regionen der USA und im Westen Kanadas (Ropelewski & Halpert 1987). In den Jahren mit „El Niño“ nimmt vor allem in Gebieten die von Überschwemmungen oder Dürren heimgesucht werden, die Häufigkeit von Krankheiten zu, die durch verunreinigtes Wasser oder andere Überträger bedingt sind. Langzeituntersuchungen in Kolumbien, Venezuela, Indien, Pakistan (Bouma & van Kaay 1994) und Zimbabwe (Freeman & Bradley 1996) zeigen, dass Malaria verstärkt im Zuge von „El Niño“ auftritt. „Enso“ ist nicht nur ein Warnzeichen für zukünftige Probleme, sondern auch einer ihrer Mechanismen. Verschiedene Klimamodelle sagen voraus, dass in dem Maße, wie sich die Atmosphäre und Meere aufheizen, das Phänomen „El Niño“ selbst häufiger und heftiger in Erscheinung treten wird, mitsamt den Wetterkatastrophen und den Krankheiten in seinem Gefolge (Epstein *et al.* 1998, Bradley 1993, Martens *et al.* 1994, Lindsay 1996). Nicht unerwähnt jedoch soll bleiben, dass auch hier Ausnahmen die Regel bestätigen. So traten die schweren Malariaepidemien 1953 und 1958 in Äthiopien in Jahren ohne „El Niño“ Jahren auf.

Neben den zuvor beschriebenen klimatischen Faktoren gibt es viele direkte Eingriffe des Menschen in die empfindlichen Ökosysteme der Tropen und Subtropen. Viele Arten der Malariaparasiten und deren Vektoren reagieren besonders empfindlich auf Veränderungen ihrer Habitate: Abholzung, landwirtschaftliche Nutzung, Besiedlung/Bevölkerungsexplosion und wasserbauliche Eingriffe (wie Staueisen) sind einige dieser Maßnahmen. Direkte Beispiele für eine Koinzidenz zwischen dem Auftreten von Malaria und veränderter Landnutzung durch Besiedlung gefolgt von Abholzung gibt es für Afrika (Coluzzi *et al.* 1979, 1985), Asien (Bunnag *et al.* 1979) und Lateinamerika (Kaplan *et al.* 1980, Tadei *et al.* 1998). In Brasilien traten im Zeitraum von 1971 bis 1986 als Folge von Bergbau und Landnahme 76 % mehr Malariafälle auf. Der Vektor war *A. darlingi* welcher überproportional *P. falciparum* gegenüber *P. Vivax* transportiert. Ein Begleiteffekt von Bergbau und anderen Erschließungsmaßnahmen ist der Einstrom von (neuen) nicht an das Ökosystem angepassten lebenden Menschen. Diese werden schnell infiziert und bilden ein neues Reservoir für die Krankheit. Eine interessante Untersuchung von Kaplan *et al.* 1980 zeigte ein vermehrtes Auftreten von Malaria *P. Vivax*, *P. falciparum*, und *P. malariae* bei den Waroni-Indianern in Ecuador, wenn diese in ökologisch veränderter Umwelt sesshaft wurden. Die weiterhin traditionell nomadisierend lebenden Volksstämme hatten keine Malariaerkrankungen und keine schützenden anti *P. falciparum* Antikörper in Ihrem Blut. Entgegen allgemeiner Annahme wurde also *P. falciparum* nicht in die Waldgebiete übertragen. Das bestimmte künstliche Vegetationsveränderungen für wiederholte Malariaausbrüche verantwortlich sind, zeigte sich 1940 in Trinidad. Nach Abholzung wurden zur Abschattung der Kakaopflanzen Bäume mit ausladenden Kronen gepflanzt, welche große Mengen von Bromelidengewächsen beherbergen. Diese Bromelien bilden dauerhaft kleine Wasserreservoirs, die Brutplätze für *A. bellator* darstellen. Nachdem die Bromelien entfernt und vernichtet wurden, ging die Malaria auf ihr altes Niveau zurück (Downs & Pittendrigh 1946).

Der Klimawandel wird das Risiko einer Wiedereinführung von Malaria in nicht endemischen Gebieten stark erhöhen. (WHO 1999). Im Kaukasus und Wolgabecken wurden in den Jahren 1934 bis 1936 neun Millionen Malariafälle registriert (Buce-Chwatt 1988). Es besteht kein Zweifel, dass in diesen Staaten und anderen Staaten Osteuropas wie Aserbaidjan und der Türkei schon beobachtet, die Malaria wieder erfolgreich einziehen wird. Vor dem Hintergrund, dass diese Länder der Herausforderung mit ineffektiven Gesundheitssystemen gegenüberstehen, bekommt der politische Begriff der „Europäischen Expansion“ eine neue zusätzliche Bedeutung.

1.2 Biologie und Pathogenese von Malaria

Sogar die nüchternen Zahlen in den Statistiken der WHO weisen Malaria als ein enormes Problem von globaler Bedeutung aus. Malaria ist in 101 Ländern endemisch, die von 2,4 Milliarden Menschen bewohnt werden, dies entspricht 40 % der Gesamtbevölkerung der Erde. Die weltweite Verbreitung verzeichnet jedes Jahr 300-500 Millionen Krankheitsfälle und 1-2 Millionen Todesfälle, von denen 90 % in den afrikanischen Staaten südlich der Sahara auftreten. Die Sterblichkeitsrate liegt auch bei optimaler medizinischer Versorgung im Bereich von 20-30 % und erreicht ihre Höchstwerte bei jungen afrikanischen Kindern (WHO 2001).

Die vier humanpathogenen Plasmodium-Arten (Gattung: *Sporozoa*) haben eine sehr ähnliche Entwicklung. Der Lebenszyklus umfasst einen obligatorischen Wirtswechsel (Mehlhorn & Walldorf, 1988). Endwirte der säugerparasitierenden *Plasmodien* sind Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Beim Stich einer infizierten Anopheles Mücke (nur die Weibchen saugen in der Nacht Blut!) werden Sporozoiten mit dem Speichel in Blutkapillaren injiziert. Sie erreichen in kürzester Zeit die Leber und invadieren Leberparenchymzellen. Innerhalb von sechs bis 16 Tagen wachsen Sie in einer parasitophoren Vakuole im Hepatozyten heran und durchlaufen dabei die Schizogenie (exoerythrozytäre Schizogenie), die zur Bildung von 10.000 bis 30.000 Merozoiten führt. Bei *P. vivax* und *P. ovale* entstehen parallel zur Schizogenie Wartestadien (Hypnozoiten), die sich erst nach Monaten weiterentwickeln, weshalb diese Erreger auch Jahreszeiten überdauern, in denen keine Übertragung stattfindet. *P. falciparum* und *P. malariae* etablieren dagegen chronische Blutstadien-Infektionen.

Es kommt zu einer zeitlichen Staffelung der Produktion von Lebermerozoiten. Die beim Platzen der Hepatozyten freiwerdenden Merozoiten dringen ausschließlich in Erythrozyten ein und setzen hier wiederholte Schizogonien (erythrozytäre Schizogenie) in Gang (Cohen & Lambert, 1982). Aus jeder Schizogenie gehen neben einem Restkörper jeweils 8 bis 16 Merozoiten hervor, die neue Erythrozyten befallen (Good *et al.* 1998). Eine erythrozytäre Schizogenie dauert in Abhängigkeit von der Art 48 oder 72 Stunden und ist bei *P. vivax*, *P. ovale*, und *P. malariae* streng synchronisiert, so dass die gesamte Parasitenpopulation in den Erythrozyten sich zeitgleich im gleichen Entwicklungsstadium befindet. Diese Synchronisation erfolgt neueren Erkenntnissen nach in Abhängigkeit von der Serotonin-Ausschüttung des Wirts, die eine Freisetzung der Merozoiten während der Schlafphase bewirkt: der Zeit, in der die Vektoren (Mücken) aktiv sind. Mehrere Tage oder Wochen nach Beginn der erythrozytären Schizogenie differenziert sich ein Teil der Merozoiten zu Gametozyten. Dann finden sich im Blut sowohl Schizogenie-Stadien als auch Gametozyten. In geeigneten Überträgermücken bilden sich – induziert durch die physiologischen Verhältnisse des Mückenmagens – innerhalb von nur ca. zehn Minuten die Gameten. Bei den Mikrogametozyten wird diese Differenzierung als Extraflagellation bezeichnet und geht mit einem dramatischen Gestaltwechsel einher: Jeder Mikrogametozyt bildet sehr schnell acht Plasmaprotuberanzen aus, in die je ein Kern einwandert. Es schnüren sich Mikrogameten ab, die die Makrogameten befruchten. Die bewegliche Zygote (Ookinete) wandert durch Epithelzellen des Mückenmagens und etabliert sich zwischen Epithelzellen und Basalmembran. Der Ookinete wächst zu einer Oozyste heran, in der die Sporogonie abläuft. Dabei werden nach einer Reduktionsteilung etwa tausend Sporozoiten gebildet. In einer *Anopheles* Mücke können mehr als 100 Oocysten auftreten, so dass die Anzahl der Sporozoiten sehr groß sein kann. Die Entwicklung zum Sporozoiten wird durch höhere Temperaturen begünstigt und dauert eine bis mehrere Wochen. Die Sporozoiten wandern in die Speicheldrüse der Mücke ein und sind jetzt für den Menschen infektiös.

Die Malaria-Symptome sind ausschließlich mit der erythrocytären Phase verbunden. Hier kommt es zu den typischen Fieberschüben. Bei *P. falciparum*-Infektionen kommt es in komplizierten Fällen jedoch auch zu Koma, Glomerulonephritis mit Nierenversagen, schwerer Anämie, Azidose, Atemnot bis zum -stillstand, Hypoglykämie, Blutungen, intravaskulärer Hämolyse und Schock (Cohen & Lambert, 1982, Warell *et al.* 1990). Häufig sind zahlreiche Organe gleichzeitig betroffen, wobei Anämie, Atemstillstand und cerebrale Malaria zu den häufigsten und lebensbedrohlichsten Komplikationen gehören (Marsh *et al.* 1995).

1.3 Partielle Immunität contra Immunevasion

Wiederholte Infektionen mit Plasmodien bauen eine labile Immunität auf, die durch ständige Neuinfektionen aufrechterhalten wird. Die meisten Erwachsenen, die in Malaria-Gebieten leben, sind deshalb weitgehend vor Erkrankung geschützt. Sie werden zwar infiziert, aber ihr Immunsystem kann die Malaria kontrollieren. Bei Stress, zum Beispiel durch andere Infektionen oder bei Schwangerschaft geht diese Immunität jedoch zurück. Auch wenn eine Zeitlang Neuinfektionen ausbleiben, beispielsweise bei saisonaler Übertragung, sinkt der Immunschutz. Häufig wirkt der Schutz auch nur gegen die lokalen Parasitenstämme, so dass eine Infektion mit fremden Stämmen zur Erkrankung führen kann. Diese Immunität geht auf Antikörper- und T-Zell-Antworten gegen zahlreiche verschiedene Antigene der unterschiedlichen Plasmodienstadien zurück. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung von Antikörpern aus dem Serum immuner Personen Kinder vor schweren Malariaanfällen schützen kann. Die Schutzwirkung von T-Zell-Antworten geht auf die Unterstützung der Antikörperantwort und die Aktivierung von Effektorzellen durch T-Helferzellen zurück, die infizierte Hepatozyten angreifen und abtöten können. Außerdem kommt es im Laufe der Infektion zu polyklonaler B-Zell Aktivierung und Hypergammaglobulinämie (Cohen & Lambert, 1982).

Gegen solche schützenden Immunantworten haben Plasmodien effiziente Vermeidungsstrategien entwickelt, die bislang nur zum Teil aufgeklärt sind.

Als wichtigster Bestandteil der Immunevasion wird die intrazelluläre Lokalisation im Erythrozyten angesehen. Erythrozyten können als kernlose Zellen kein MHC-I Antigen produzieren und damit keine Antigene der Parasiten präsentieren, die eine Abtötung der Zelle durch cytotoxische T-Zellen zur Folge hätte.

Die Zerstörung von infizierten Erythrocyten durch aktivierte Makrophagen der Milz kann *P. falciparum* durch Sequestration, das heißt Anheftung an die Endothelien postkapillarer Gefäße der inneren Organe, vermeiden. Trophozoiten und Schizonten werden dadurch weitgehend aus der Zirkulation entfernt und passieren die Milz nicht mehr. Die Anheftung an Epithelien erfolgt durch eine Familie von Parasitenproteinen (PfEMP1), die als integrale Proteine in die Membran der Wirtszellen eingebaut werden und Rezeptoren für Wirtsstrukturen wie CD36, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin, Thrombospondin oder Chondroitinsulfat darstellen (Borst *et al.* 1995).

Eine weitere Vermeidungsstrategie ist die Variation der Adhäsionsproteine, mit deren Hilfe infizierte Erythrozyten sich an Kapillarendothelien anheften. Gut untersucht ist PfEMP, eine Familie von Adhäsionsproteinen von 200 bis 350 kDa. Diese liegen in Ausstülpungen (knobs) der Oberfläche infizierter Erythrozyten und sind für die Funktion von PfEMP1 von entscheidender Bedeutung. Sie weisen konservierte Transmembranproteine und eine hochvariable Region auf, welche die Bindung an unterschiedliche Moleküle der Oberfläche von Endothelzellen des Wirtes ermöglicht. Gezielte Deletion des „knob-associated histidine-rich protein“ (KAHRP) führt zum Verschwinden der „knobs“ an der Oberfläche parasitierter Erythrocyten. Während PfEMP1 normalerweise in der Membran über den „knobs“ lokalisiert ist, kommt es in den KAHRP-Mutanten zu einer gleichmäßigen Verteilung über die gesamte Plasmamembran. Außerdem haben KAHRP-parasitierte Erythrocyten die Fähigkeit zur Adhärenz an CD36 unter Strömungsbedingungen verloren (Crabb *et al.* 1997).

PfEMP1-Proteine werden von der etwa 50-150 Mitglieder umfassenden *var*-Genfamilie kodiert (Baruch *et al.* 1995, Smith *et al.* 1995, Sue *et al.* 1995). Jede *P. falciparum*-Zelle exprimiert ein Mitglied der Genfamilie, das durch seine Bindungseigenschaften den Adhäsions-Phänotyp festlegt. Auch die so genannte Rosettenbildung, das heißt die Bindung mehrerer nicht-infizierter an einen infizierten Erythrocyten, kann anscheinend durch bestimmte PfEMP1-Proteine vermittelt werden (Rowe *et al.* 1997). Ein spontaner Wechsel des exprimierten *var*-Gens führt zu einer veränderten Antigenizität und einem veränderten Bindungsverhalten der parasitierten Erythrocyten an mögliche Liganden (Baruch *et al.* 1995; Su *et al.* 1995; Smith *et al.* 1995). Solch ein spontaner Wechsel des Phänotyps kommt bei *P. falciparum in vitro* mit einer Rate von etwa 2 % pro Generation vor (Roberts *et al.* 1992) und liegt damit höher als bei anderen pathogenen Organismen mit vergleichbarer Antigen-Variation, z. B. 10^{-2} - 10^{-7} für *Trypanosoma brucei*, 10^{-3} - 10^{-4} für *Borrelia hermsii* (Deitsch *et al.* 1997). Eine analoge Super-

familie von variablen Genen (*vir* Gene, 600-1000 in jedem haploiden Genom), welche in der subtelomeren Region lokalisiert sind wurde unlängst auch für *P. vivax* beschrieben (Portillo *et al.* 2001).

Diese Bindung über PfEMP kann durch Antikörperantworten des Wirtes inhibiert werden (Blackman *et al.* 1991). Allerdings wurden auch Antikörper gefunden, die ihrerseits diese schützenden Antikörper wieder inaktivieren. Diese sind gegen Epitope gerichtet, die am N-terminalen Ende von PfMSP liegen (Holder *et al.* 1999). Das Ziel muss demnach die Konstruktion eines Fragmentes sein, das die Bildung von schützenden Antikörper induziert, ohne gleichzeitig die Entwicklung von komplementären inhibitorischen Antikörpern zu induzieren.

Eine andere Strategie von *P. falciparum* besteht in der Desorientierung des Immunsystems. So erfolgt bei Malaria-Episoden eine polyklonale Aktivierung von Lymphozyten, die vermutlich durch parasiteneigene Mitogene hervorgerufen wird. Nachfolgend tritt, wahrscheinlich infolge einer Erschöpfung bestimmter Lymphozytenpopulationen, eine deutliche Immunsuppression ein. Malariapatienten haben nach akuten Attacken zum Beispiel verminderte T-Zell-Reaktionen gegen Impfantigene. Darüberhinaus induzieren Plasmodien die Bildung großer Mengen irrelevanter Antikörper, während relevante Epitope nur schwach immunogen sind.

Der relativ langsame Aufbau schützender Immunantworten führt dazu, dass in endemischen Gebieten Kinder sehr stark durch Malaria gefährdet sind. Im ersten Lebensjahr besteht meist ein partieller Schutz vor Infektionen, der auf mehrere Faktoren zurückgeht. In den ersten Monaten weisen Kinder noch einen Anteil fetalen Hämoglobins auf, das von Plasmodien nicht effizient verwertet werden kann. Zusätzlich können schützende IgG-Antikörper wirken, die von der Mutter diaplazentar übertragen wurden. Bei Säuglingen enthält das Serum (bedingt durch die Milchdiät) nur sehr wenig para-Amino-Benzoesäure, die ein essentieller Wachstumsstoff für Plasmodien ist. Bei Kleinkindern nach dem Abstillen wirken diese Schutzmechanismen nicht mehr und sie sind bis zum Aufbau einer eigenen Immunantwort bis zum fünften Lebensjahr stark gefährdet.

Verlauf und Ausgang von Malaria-Infektionen werden stark von genetischen Faktoren bestimmt. Beim Menschen sind neben Hämoglobinogenen (Sichelzellenanämie, Thallassämie) auch Gene für Erythrocyten-Oberflächenantigene (Bande3, GlycophorinA und -B, ABO- und Duffy-Blutgruppe), bzw. Proteine des Cytoskeletts (Spektrin) oder des Stoffwechsels (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) von Erythrocyten mit Resistenz oder Suszeptibilität in Verbindung gebracht worden (Hill, 1998). Außer solchen Veränderungen der Wirtszellen, die die Invasion oder Entwicklung des Parasiten im Erythrocyten behindern können, spielen Polymorphismen in den Genen des MHC-Komplexes, im TNF- α -Promotor, im *ICAM-1* und im *Complement-Rezeptor-1*-Gen möglicherweise eine Rolle.

1.4 Aktuelle Bekämpfungsstrategien: Vakzinierung und Therapeutika

Resistenz der Mücken gegen Insektizide und der Parasiten gegen Chemotherapeutika führten in den letzten dreißig Jahren dazu, dass sich die Malaria-Situation in den Tropen wieder dramatisch verschlimmert hat. Insbesondere die rasche Ausbreitung von *P. falciparum*-Stämmen, die resistent gegen eines oder mehrere Chemotherapeutika sind, schränkt die Behandlungsmöglichkeiten zunehmend ein (Wernsdorfer 1991, Wilairatana *et al.* 1997)

Die Entwicklung einer Vakzine gegen *P. falciparum* stellt deshalb seit langem ein vordringliches Ziel der WHO dar. Impfung mit abgeschwächten oder toten Erregern, etwa bestrahlten Sporozoiten, ist zwar durchaus möglich, für eine Massenproduktion sind solche Impfstoffe aber völlig ungeeignet (Clyde *et al.* 1973). Außerdem ist die Gefahr nicht von der Hand zu weisen, dass auch immunpathologische Reaktionen durch einen solchen Impfstoff ausgelöst werden können. Ein in den Tropen praktikabler Impfstoff muss billig, sicher und einfach anzuwenden sein. Mit modernen, molekularbiologischen Methoden lassen sich kostengünstig rekombinante Proteine herstellen, die ein oder mehrere schützende Epitope des

Parasiten enthalten können. Versuche solche Moleküle anstelle ganzer Parasiten als so genannte Subunit-Vakzine einzusetzen, waren bisher jedoch wenig erfolgreich (Kwiatkowski & Marsh 1997, Good *et al.* 1998).

Die wichtigsten Kandidaten sind das Circumsporozoitenprotein (CSP), die Hauptkomponente der Oberflächenhülle von Sporozoiten (Potocnjak *et al.* 1980). Hier wurden bereits erste vielversprechende Versuche in Nagern mit gegen CSP gerichteten monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Mittlerweile sind jedoch zehn Jahre vergangen, in denen viele Fusionsproteine und Immunstimulantien mit enttäuschenden Resultaten getestet wurden (Rogers & Hoffmann 1999). Die beiden führenden Vakzinkandidaten gegen asexuelle Blutstadien sind das „Merozoit-Surface“ Antigen (MSP-1) und das Apicale Membran Antigen (AMA-1). MSP-1 konnte in Kombination mit zwei anderen Antigenen in Feldversuchen die Parasitämie bei Kindern um 62 % verringern (Genton *et al.* 2000) und auch AMA-1 konnte Mäuse und Affen erfolgreich schützen (Crewther *et al.* 1996). In jüngster Zeit wurde sogar eine kurze Cystein-reiche Domäne Region aus PfEMP als erfolgreiches Vakzinierungstarget eingesetzt (Smith 2000).

Als Alternative hat sich nach der Entdeckung des Malaria-Toxins GPI (Glykosyl-phosphatidyl-inositol) die Immunisierung mit detoxifizierten GPI herausgestellt. Diese Immunisierung bekämpft nicht den Parasiten, sondern die Symptome der Krankheit, indem u. a. die schädliche Wirkung von Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF) abgemildert wird (Tachado *et al.* 1997).

Aufgrund der komplexen Parasit-Wirt-Wechselwirkungen, der ausgeprägten Stamm- und Stadienspezifität der erworbenen Immunität gegen Malaria, der polymorphen Natur der meisten Malaria-Antigene und der Fähigkeit der Parasiten zur Antigen-Variation hat sich inzwischen die Auffassung durchgesetzt, dass ein erfolgreicher Malaria-Impfstoff einen Cocktail von Antigenen enthalten muss, so dass sich die hervorgerufene Immunantwort gegen mehrere Allele, mehrere Antigene und mehrere Entwicklungsstadien des Parasiten richtet (Conway 2000, Doolan & Hoffman 1997).

Das immer größer werdende Problem der Ausbreitung von gegen Chemotherapeutika resistenten Malariaerregern zwingt dazu, immer neue und effektivere Mittel gegen bestehende und neue Ziele zu entwickeln. Eine Vielzahl von Enzymen unterschiedlicher Stoffwechselwege wurden als potentielle Kandidaten identifiziert, aber nur wenige bisher validiert (Olliaro & Yuthavong 1999).

Da sich unterdessen in ganz Südasien und Südamerika Resistenzen gegen Chloroquin (CQ) ausgebreitet haben, werden zunehmend Pyrimethamin (PYR) in Kombination mit Sulfadoxin (SDX) als Mittel der vordersten Front eingesetzt (Winstanley 2000). Der Parasit entzieht sich jedoch auch der Wirkung dieser Wirkstoffe durch Mutationen in der Dehydrofolatreduktase (DHFR), dem Wirkziel dieser Mittel oder durch Nutzung exogener Folate (Sirawaporn 1998). Als Angriffspunkt für Chloroquin wird das Ferriprotoporphyrin (FP) akzeptiert, das sich durch aktive Aufnahme bis zum 1000-fachen Wert der Normkonzentration in der parasitophoren Nahrungsvakuole anreichern kann (Ginsburg 1999). Die eigentliche Wirkung von CQ erfolgt dann durch Inhibierung der FP-Polymerisation und des Abbaus von FP, was letztendlich zur toxischen Schädigung der Parasiten-Lipide durch Peroxidierung führt (Loria *et al.* 1999). Neue potentielle Wirkziele haben sich durch Fortschritte in der Transportercharakterisierung bei *P. falciparum* ergeben. Malaria infizierte Erythrozyten zeigen eine erhöhte Durchlässigkeit für eine breites Spektrum an Metaboliten und Salzen, eine Eigenschaft, die vom Parasit über neue Permeationswege induziert wird (Wellems 1990, Ginsburg 1999).

Relativ wenig ist bisher auch über den Fettstoffwechsel in *P. falciparum* bekannt, welcher kürzlich als neuer therapeutischer Ansatzpunkt ins Feld geführt wird. Nach der Entdeckung der nicht mehr photosynthetisch aktiven Plastide in Malariaparasiten und anderen apikomplexen Protozoen konnte McFadden 1996 zeigen, dass dieser Plastide in seinem Genom Proteine kodiert, die am Fettstoffwechsel vom Typ II beteiligt sind (Mc Fadden 1999). Das Inhibitoren der Fettsäurebiosynthese und der prokaryontischen Translation auch bei Parasiten funktionieren, konnte *in vitro* bereits gezeigt werden (Clough 1999).

Trotz dieser hoffnungsvollen Ansätze sollte man nie vergessen, dass dieser Parasit nicht eine simple Zelle darstellt, sondern durch seine endosymbiontische Entstehung die Vorteile zweier Organismen verbunden und im Laufe der Evolution perfektioniert hat.

1.5 Die Funktion der Milz bei der Immunabwehr gegen Plasmodien

Die Milz spielt bei der Immunantwort während einer Malaria-Infektion eine zentrale Rolle. Die operative Entfernung der Milz führt zu erhöhter Suszeptibilität für *P. falciparum*- und *P. malariae*-Infektionen (Wyler *et al.* 1979, Wyler 1983). In verschiedenen Maus-Modellen wie *Plasmodium yoelii* 17XNL führt eine Splenektomie zu einem letalen Ausgang in ansonsten selbstheilenden Parasit-Wirt-Kombinationen (Weiss, 1989). Infektionen mit *P. c. chabaudi* AS in C57BL/6-Mäusen verlaufen nach Splenektomie chronisch, wobei immer neue Wellen mit hohen Parasitämien auftreten (Yap & Stevenson 1994). Diese Wellen werden von kurzen Perioden unterbrochen, in denen die Parasitämie auf subpatente, im Giemsa gefärbten Blutausstrich nicht nachweisbare Werte sinkt. Transfer von Milzzellen, nicht aber von B-Zell depletierten Milzzellen aus syngenen, immunen Spendermäusen in splenektomierte Empfängermäuse führt zur Ausbildung von protektiven Immunmechanismen. In splenektomierten Mäusen werden zwar hohe Titer Malariaspezifischer Antikörper erreicht, und das Spektrum der erkannten Plasmodium-Antigene unterscheidet sich nicht wesentlich von dem einer Kontrollgruppe, schützend wirken aber anscheinend nur die von B-Zellen aus immunen Mäusen produzierten Antikörper. Damit naive B-Zellen protektive Antikörper produzieren können, benötigen sie bestimmte Signale von T-Zellen. Weder naive noch Gedächtnis-T-Zellen sind anscheinend in der Lage, diese Signale außerhalb der Umgebung der Milz zu erzeugen. Gedächtnis-B-Zellen aus immunen Mäusen benötigen diese Signale offensichtlich nicht mehr und können auch in splenektomierten Mäusen schützende Antikörper produzieren. Warum die von B-Zellen aus naiven Mäusen produzierten hohen Antikörper-Titer nicht schützend wirken, ist bislang unklar.

Während der Infektion kommt es zu einer dramatischen Größenzunahme der Milz. Neben der Einwanderung von Zellen aus der Zirkulation spielen die Neubildung von Zellen durch Hämatopoese, aber auch polyklonale B-Zell Aktivierung eine bedeutende Rolle. In Maus-Malaria-Modellen ist die Milz als hämatopoetisches Organ von deutlich größerer Bedeutung als das Knochenmark. Während die Hämatopoese im Knochenmark während einer Malaria-Infektion unterdrückt ist, kommt es in der Milz zu einer stark vermehrten Erythropoese (Weiss *et al.* 1989, Villeval *et al.* 1990, Mohan & Stevenson 1998). Bei genetischer Prädisposition und chronischer Malaria kann es beim Menschen zum Malaria-bedingten Hyperreaktivitäts-Syndrom (auch Tropisches Splenomegalie-Syndrom), einer Hypersensitivitätsreaktion mit extrem vergrößerter Milz kommen (Crane, 1986). Eine Ruptur der Milzkapsel kommt sehr selten als lebensbedrohliche Komplikation bei akuter Malaria (Falk *et al.* 1992), häufiger jedoch bei chronischer Malaria mit tropischem Splenomegalie-Syndrom vor (Touze *et al.* 1989).

Einschneidende morphologische Veränderungen in der Milz führen während einer Infektion von Mäusen mit *P. yoelii* (Weiss *et al.* 1986) oder *P. chabaudi adami* (Alves *et al.* 1996), oder von Ratten mit *Plasmodium berghei* (Wyler 1983) zum Übergang von einer offenen zu einer geschlossenen Blutzirkulation. Dabei kommt es zur Aktivierung von fibroblastischen Stromazellen der Milz, die das „Filtrationsbett“ formen. Diese Zellen („barrier cells“) teilen sich, bilden Ausläufer, fusionieren („barrier-forming complexes“) und bilden so eine Blut-Milz-Schranke aus, die erythropoetische Inseln und heranreifende Lymphocyten gegen zirkulierende Parasiten mehr oder weniger erfolgreich abschotten kann (Weiss, 1989). Die Filtrationsrate der Milz ist in dieser Phase deutlich niedriger als in naiven Mäusen, da der größte Teil des Blutes direkt aus den Arteriolen in den venösen Sinus strömt, ohne zuvor die Billroths-Stränge zu passieren (Wyler 1983, Weiss *et al.* 1986, Weiss 1989). Während einer Infektion mit dem nicht-letalen Stamm *P. yoelii* 17XNL werden – anders als bei letalen *P. yoelii* 17XL-Infektionen – heranreifende Retikulozyten und Lymphocyten durch diese Barriere wirksam von zirkulierenden Parasiten abgeschirmt. Die Auflösung der Barriere während des Übergangs von der „Precrisis“ zur „Crisis“-Phase, und die damit einhergehende Freisetzung von Retikulozyten und Effektorzellen führt zum schnellen Rückgang von Parasitämie und

Anämie. Dazu trägt sicherlich auch die Wiederherstellung der Filtrationskapazität der Milz bei, die aufgrund der Splenomegalie nun deutlich größer als in naiven Mäusen ist. Aufgrund ihrer geringen Verformbarkeit sind infizierte Erythrocyten kaum in der Lage die interendothelialen Spalten zwischen Billroths-Strängen und venösen Sinus zu passieren und bleiben so in der roten Pulpa der Milz gefangen. Hier werden sie einerseits durch aktivierte Makrophagen phagozytiert, andererseits von antiparasitischen Produkten wie reaktiven Stickstoff-Intermediaten (RNI), reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) und Antikörpern attackiert. Ähnliche morphologische Veränderungen in der Milz wurden auch für Infektionen mit *P. chabaudi adami* beschrieben (Alves *et al.* 1996).

1.6 Wie ein Wirt sich wehrt: Die Maus als Modellorganismus für Malariainfektionen

Vorläufige Ergebnisse des kommerziellen Mausgenomprojektes schätzen die Zahl der Gene die den Menschen von der Maus unterscheiden auf 300 (Celera, März 2001): ein weiterer Grund, weshalb die Bedeutung der Maus für die Erforschung von Infektionskrankheiten noch zunehmen wird. Die Malariaforschung ist sogar in dreifacher Weise auf die Maus als Modellorganismus angewiesen. Patienten müssen in der Regel sofort therapiert werden, die bisher entwickelten *in vitro* Ansätze sind unvollständig und sowohl ethische, als auch finanzielle Gründe sprechen gegen ausgedehnte Versuche mit Primaten. Die Vielzahl der vorhandenen und gut charakterisierten Maus-Inzuchtstämme haben ihre Verwendung bei der Erforschung von Parasit-Wirt-Wechselwirkungen eindrucksvoll bewiesen (Taylor-Robinson 1995). Ähnlich wie bei einigen humanpathogenen Malariaerregern führen nicht lethale Infektionen (z. B. *P. chabaudi*, *P. yoelii* und *P. vinkeii*) zu einer protektiven Immunität gegenüber weiteren Infektionen. Andere Erreger sind nur in bestimmten Mausstämmen lethal. Die meisten Infektionen unabhängig davon, ob letal oder nicht, zeigen ähnliche Symptome wie *P. falciparum* in der humanen Malaria. *Plasmodium chabaudi* führt in seinem natürlichen Wirt, Ratten der Art *Thamnomys rutilans*, ebenso wie in Labormäusen zu synchronen Infektionen mit einer Peridiozität des erythrocytären Zyklus von 24 h. *P. chabaudi chabaudi* ist als murines Modell für *P. falciparum*-Infektionen weit verbreitet. Beide Parasiten gehören zur Gruppe der Plasmodien mit extrem hohem AT-Gehalt im Genom, beide infizieren bevorzugt Normocyten, und die späten asexuellen Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont sequestrieren an den Endothelien der postkapillaren Gefäße der inneren Organe (Carter & Walliker, 1975; Phillips *et al.*, 1994). *P. c. chabaudi* bildet allerdings an der Oberfläche der Wirtszellen keine sogenannten "knobs" (Cox *et al.*, 1987). Während *P. falciparum* mit stammspezifischen Präferenzen in zahlreichen inneren Organen, insbesondere Leber, Gehirn und Plazenta sequestriert, findet man *P. c. chabaudi* hauptsächlich an den Endothelien in Blutgefäßen der Leber (Gilks *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 1994). Dieser Kritikpunkt am Mausmodell kann in Zukunft aber durch Verwendung von *P. berghei* Infektionen in F1 Tieren von (BALB/c x C57 BL/6) Tieren umgangen werden. Im Gegensatz zu C57BL/6 Tieren wurden bei diesen F1 Tieren infizierte Erythrozyten und Monozyten in den Endothelien des Gehirns gefunden (Hearn *et al.* 2000). *Plasmodium c. chabaudi* zeigt Antigen-Variation und die Frequenz des Wechsels im variablen Antigen-Typ (VAT) liegt mit $1,3 \times 10^{-2}$ bis $4,3 \times 10^{-4}$ in derselben Größenordnung wie bei *P. falciparum* (Brannan *et al.*, 1994). Der Verlauf einer *P. chabaudi*-Infektion in Labormäusen ist stark von der jeweiligen Wirt-Parasit-Kombination abhängig. Verschiedene Stämme von *P. chabaudi* zeigen einen unterschiedlichen Verlauf der Infektion, unterschiedliche maximale Parasitämie und Letalität. Selbst Subklone des bereits klonierten Stammes *P. c. chabaudi* AS zeigen Unterschiede hinsichtlich der Höhe der maximalen Parasitämie, der Ausprägung von nachweisbaren Wiederausbrüchen und der Bevorzugung von Normocyten oder Reticulocyten als Wirtszellen (Phillips *et al.*, 1997). Der Einfluß des Wirt-Genotyps auf den Verlauf und Ausgang von *P. chabaudi* Blutstadien-Infektionen wurde ausführlich untersucht. Während C57BL/6-, C57BL/10-, NIH- und CBA- Mäuse Infektionen mit 10^5 - 10^6 *P. chabaudi*-parasitierten Erythrocyten in der Regel ausheilen können, sind andere Stämme wie A/J, Balb/c, C3H/HeJ und DBA2/J suszeptibel und sterben an der Infektion (Wunderlich *et al.*, 1988b; Stevenson *et al.*, 1982; 1984; Langhorne *et al.*, 1993; Phillips *et al.* 1997). Die Fähigkeit von Mäusen protektive Immunmechanismen auszubilden, hängt

sowohl von Genen des *H-2*-Komplexes, und hier der MHC-Klasse-II-Antigene kodierenden *H-2A* und *H-2E*-Regionen, als auch von einem oder mehreren Genen im genetischen Hintergrund ab (Wunderlich *et al.*, 1988b; 1991; Taylor-Robinson & Phillips, 1992).

Die Bekämpfung der Erreger erfolgt in der Maus auch über die angeborenen Komponenten des Immunsystems wie Akute-Phase Proteine, Komplement, Phagozytose und NK-Zellen. Mäuse mit hoher NK-Zell Aktivität sind generell resistenter gegenüber *P. chabaudi* Infektionen als Mausstämmen mit niedriger Aktivität wie A/J oder BDA/2 Mäuse (Mohan *et al.* 1997). Neben ihrer cytolytischen Funktion sind NK-Zellen eine wichtige Quelle für die IFN γ Produktion (Rudin 1997), welches wiederum die Aktivierung von Makrophagen und anderen Antigen-Präsentierenden-Zellen (APZ) unterstützt und verstärkt. Für die Aktivierung der NK-Zellen ist wiederum das Interleukin IL-12 verantwortlich. Dieses Interleukin ist im Plasma von *P. chabaudi* infizierten Mäusen bereits zwei Tage nach der Infektion nachzuweisen. Die Injektion von rekombinanten IL-12 in infizierte A/J Mäuse hilft diesen die ansonsten letale Infektion zu bewältigen (Stevenson *et al.* 1995). Da allein Makrophagen und dendritische Zellen direkt ohne andere Signale auf die Blutstadien der Erreger reagieren können (Basu *et al.* 2000), bewirkt ihre IL-12 Produktion die Differenzierung von TH0 zu TH1 Zellen (Crutcher *et al.*, 1994; Stevenson *et al.*, 1995; Gately *et al.*, 1998), was eine der wichtigsten Schritte bei der Bekämpfung der Erreger darstellt. CD4⁺ Zellen bekämpfen den Parasiten dabei nicht direkt, sondern erreichen diesen Effekt durch die Stimulation anderer Effektorzellen. TH1 Zellen produzieren IL-2, IFN γ und TNF- β und initiieren so eine Immunantwort durch die Aktivierung von Makrophagen. TH2 Zellen produzieren IL-4, -5, -6, -13 und regulieren damit die Antikörper abhängige Antwort über die Stimulation von B-Zellen. Die zusätzliche Produktion von IL-10, das anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt, ist ein Antagonist für die TH1 Antwort.

Während bei anderen Infektionen - am besten charakterisiert für *Leishmania major* (Launois *et al.* 1997) - der Ausgang der Infektion wesentlich davon abhängt, ob eine TH1- oder eine TH2-Antwort induziert wird, kommt es bei Infektionen mit *P. chabaudi* in resistenten Mausstämmen zu einer zeitlichen Abfolge von TH1- und TH2-Antwort. Erstere ist in der Lage, die in der "Precrisis"-Phase scheinbar ungebremst steigende Parasitämie zu stoppen und die Infektion zeitweise auf ein subpatentes Niveau zurückzudrängen. CD4⁺ T-Zellen vom TH1-Typ produzieren proinflammatorische Cytokine wie IFN- γ und IL-2 (Langhorne 1989; Stevenson *et al.*, 1990; Stevenson & Tam 1993, von der Weid & Langhorne 1993, Phillips *et al.* 1994) aber auch cytostatisch wirkende reaktive Stickstoff-Radikale, die durch induzierbare Stickoxid-Synthetase (iNOS) aus L-Arginin freigesetzt werden (Taylor-Robinson *et al.* 1994; Taylor-Robinson, 1997). Die eigentlichen Effektorzellen dieses TH1-Mechanismus sind jedoch Makrophagen, die durch IFN- γ und toxische Parasitenprodukte aktiviert werden (Bate *et al.*, 1988; Stevenson *et al.*, 1992; Phillips, 1994; Jakobsen *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996a). Diese Makrophagen produzieren TNF- α , welches über einen autokrinen Mechanismus die Transkription von iNOS in aktivierten Makrophagen induziert (Drapier *et al.*, 1989; Tonetti *et al.* 1997). Die erzeugten hohen NO-Konzentrationen wirken cytostatisch und hemmen das Parasitenwachstum (Kowanko *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1995; Taylor-Robinson *et al.* 1993; 1996). Die Rolle dieser Verbindungen bleibt jedoch umstritten, da ihre schädigende Wirkung auf den Parasiten bisher nur *in vitro* eindeutig bestätigt werden konnte (Li *et al.* 2001). Die Bedeutung von Makrophagen bei der Abwehr durch den TH1-Mechanismus wird nach Zerstörung des Retikuloendothelialen Systems durch Silikat deutlich, wodurch die Suszeptibilität von Mäusen gegenüber *P. chabaudi* stark zunimmt (Stevenson *et al.* 1989). Da von aktivierten humanen neutrophilen Granulocyten bekannt ist, daß sie in der Lage sind, *P. falciparum* über einen Sauerstoff-unabhängigen Mechanismus zu zerstören (Kowanko *et al.*, 1996), ist zu vermuten, dass auch Neutrophile als Effektorzellen eine Rolle spielen.

Cytokine regulieren die Funktion von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen während des Infektionsverlaufs auf vielfältige Weise. In Experimenten mit rekombinanten Cytokinen und neutralisierenden Antikörpern wurde die schützende Wirkung der TH1-Cytokine IFN- γ (Meding *et al.* 1990, Stevenson *et al.* 1990) und TNF- α demonstriert (Stevenson & Ghardirian, 1989, Jacobs *et al.* 1996a, 1996b). Dabei greifen die Erreger direkt über Toxine in die Immunregulation des Wirts ein. Diese Toxine, die als Glycosylphosphatidylinositol (GPI) charakterisiert wurden, werden beim Platzen von Schizonten frei und stimulieren unter an-

derem Makrophagen zur Produktion von TNF- α , IL-1, IL-6 und RNI, wobei sie mit IFN- γ synergistisch wirken (Schofield & Hackett 1993; Tachado *et al.* 1996, 1997, Bate *et al.* 1988, 1989, 1992b, 1992c, Jakobsen *et al.* 1995).

Mit dem Fortschreiten der Primärinfektion ist bei *P. chabaudi* Infektionen nach ca. drei Wochen eine Veränderung im CD4+ Zellmuster zu erkennen (Langhorne 1989). Der vorherrschende Zelltyp ist dann der der TH2 Zellen. Der Zeitpunkt dieses Umschaltens ist kritisch für die Ausbildung einer protektiven Immunität und geschieht, wenn die Parasitämie und damit die Antigendosis zurückgeht. Ein Vergleich der Cytokinmuster zwischen letalen und nicht-letalen Infektionen zeigte, dass IFN- γ und IL-10 bei einem letalen Verlauf parallel zueinander gebildet werden. Bei einem nicht letalen Verlauf war IL-10 nicht nachweisbar (Kobayashi 1996). Das Ausbleiben der TH2 Antwort verhindert die Ausbildung der protektiven Immunität, weil Parasiten ohne B-Zellen und Antikörper nicht eliminiert werden können (Von der Weid *et al.* 1996). Der Wechsel wird auch von einer dritten Gruppe, den TH3-Suppressorzellen beeinflusst. Die Hauptaufgabe dieser Zellen ist Unterdrückung der TH1 und TH2 Immunantwort (Groux *et al.* 1997). Die TH3 Zellen produzieren in großen Mengen TGF- β , einen Regulator von Entzündungsprozessen, der eine Balance zwischen der Bekämpfung der Parasiten und der schädigenden Wirkung der Immunantwort herstellt.

Diese proinflammatorischen Reaktionen werden aber nicht nur mit protektiver Immunität in Verbindung gebracht, sondern auch mit schweren Komplikationen der Malaria. Insbesondere ist die cerebrale Malaria bei humanen *P. falciparum*-Infektionen (Grau *et al.*, 1989b; Wilairatana *et al.* 1997), aber auch im murinen Modell einer *P. berghei* ANKA-Infektion in CBA/Ca-Mäusen (Grau *et al.*, 1986; 1987; 1988; 1989a) mit starker lokaler Freisetzung von TNF- β und NO in Verbindung gebracht worden. Die bei synchroner Entwicklung der Parasiten gleichzeitig platzenden Schizonten können über Toxin-Freisetzung und dadurch hervorgerufene Sezernierung der endogenen Pyrogene TNF- β und IL-1 die Malaria-typischen Fieberschübe verursachen. TNF- β ist auch in der Lage, die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin auf Endothelzellen zu erhöhen (Rothlein *et al.* 1988). Hierbei wirkt es synergistisch mit Malaria-Toxinen, die auch direkt zur Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führen können (Schofield *et al.*, 1996). Diese Adhäsionsmoleküle wiederum werden von parasitierten Erythrocyten als Rezeptoren bei der Sequestration genutzt und tragen damit nicht nur zum Überleben der Parasiten, sondern auch zur Pathologie, insbesondere zur Ausbildung cerebraler Malaria bei (Turner 1997, Wilairatana *et al.* 1997).

Wenn schützende TH1-Mechanismen durch Malaria-Toxine direkt induziert werden, kann das durchaus vorteilhaft für den Erreger sein. Wären die Parasiten in der Lage, sich im Wirt ungebremst zu vermehren, würde dieser innerhalb weniger Tage an Anämie sterben. Für eine möglichst erfolgreiche Verbreitung der Parasiten ist eine chronische Infektion mit niedriger Parasitämie wesentlich günstiger, da mit der Zeit die Chance zunimmt, daß der Wirt von einer Anopheles-Mücke gebissen wird, und diese metazyklische Gamonten aufnimmt (Kwiatkowski, 1993). Wenn ab einer gewissen Populationsdichte der Parasiten durch freiwerdende Toxine eine protektive TH1-Immunantwort in Gang gesetzt wird, so wird dadurch die Vermehrung der Parasiten gebremst. Durch die TH1-Antwort kann eine Parasitämie von mehr als 50 % innerhalb weniger Tage auf ein subpatentes Niveau gesenkt werden, ohne daß dadurch die Parasiten völlig eliminiert werden könnten. Eine erfolgreiche TH1-Antwort ist somit eine notwendige Voraussetzung für den Übergang von der akuten zur chronischen Phase der Infektion. Die folgenden patenten Parasitämiewellen unterscheiden sich von den vorhergehenden durch einen neuen Oberflächen-Antigentyp - ein anderes exprimiertes *var*-Gen - und werden durch TH2-Zellen und Antikörper eliminiert. In natürlichen Wirt-Parasit-Beziehungen kommt es so zu einer chronischen Infektion (Phillips *et al.*, 1997). Mit *P. chabaudi* infizierte Labormäuse sterben je nach Inzuchtstamm entweder an Anämie bei ungebremsster Entwicklung der Parasiten (z. B. A/J-Stamm) oder ein bis zwei Tage nach dem Höhepunkt der ersten Parasitämiewelle (z. B. Balb/c und B10.A). Resistente Stämme wie C57BL/10, C57BL/6, B10.D2 und NIH eliminieren *P. chabaudi* nach der zweiten oder dritten Parasitämiewelle über einen TH2-Mechanismus und Antikörper (von der Weid & Langhorne 1993b, Taylor-Robinson & Phillips, 1994a; 1996, von der Weid *et al.*, 1996). Bei Wiederausbrüchen oder Reinfektionen ist die dominierende T-Zell Antwort in der Milz nicht mehr wie auf dem Höhepunkt der ersten Parasitämiewelle vom TH1- son-

dem vom TH2-Typ geprägt (Langhorne 1989, Taylor-Robinson *et al.* 1993, Taylor-Robinson & Phillips 1993, 1994a). Wann genau dieser Umschwung in der T-Zell Antwort stattfindet, ist nicht bekannt, er erfolgt jedoch nicht, wenn B-Zellen, die eigentlichen Effektorzellen dieses Immunmechanismus fehlen (Taylor-Robinson & Phillips 1994a, von der Weid *et al.* 1996). Eine in einigen Mäusestämmen früh im Infektionsverlauf einsetzende TH2-Antwort korreliert mit letalem Ausgang der Infektion (Stevenson & Tam 1993; Jacobs *et al.* 1996b). Dennoch können auch TH2-Mechanismen früh in der Infektion protektiv sein. Arbeiten von Taylor Robinson und Phillips haben gezeigt, daß sowohl früh im Infektionsverlauf isolierte *P. chabaudi*-spezifische T-Zell Klone vom TH1-Typ als auch spät im Infektionsverlauf isolierte T-Zell Klone vom TH2-Typ nach Adoptivtransfer in T-Zell depletierte Mäuse Schutz gegen eine homologe Infektion vermitteln können (Taylor-Robinson *et al.*, 1993; Taylor-Robinson & Phillips 1993, 1994b).

Im Zusammenhang von Resistenz und Suszeptibilität dürfen auch andere Faktoren wie das Geschlecht nicht unbeachtet bleiben. Generell ist bei männlichen A/J Mäusen eine höhere Parasitämie und Sterblichkeit zu beobachten als bei weiblichen Tieren. Diese erhöhte Sterblichkeit ist auf das männliche Geschlechtshormon Testosteron zurückzuführen. Werden weibliche Mäuse mit Testosteron behandelt, reagieren sie empfindlicher auf sonst nicht-letale Infektionen (Mossmann *et al.* 1997, Schmitt-Wrede *et al.* 1991). Umgekehrt werden kastrierte männliche Mäuse resistenter gegenüber *P. chabaudi* Infektionen. (Wunderlich *et al.* 1991). Die Wirkung von Testosteron beruht auf einer Verringerung der IFN- γ Produktion von T-Zellen (Paavonen 1994) und der Verringerung der Produktion von TNF alpha und IL-12 durch Makrophagen (Wilcoxen 2000). Männliche Tiere können deshalb mit einer schwächeren inflammatorischen Antwort die Frühstadien der Infektion weniger effektiv bekämpfen. Im Kontrast hierzu bewirkt eine Hochregulierung der Entzündungsantwort durch z. B. IL-10 bei weiblichen Mäusen eine Verstärkung der Krankheitssymptome wie Hyperglykämie, Fieber, und Gewichtsverlust (Li *et al.* 1999).

Die Pathogenese einer Malariainfektion wird demnach nicht allein von der Parasitämie, sondern auch von der Reaktion des Wirtes (Immunantwort, Cytokin-Produktion) beeinflusst. Eine schwache initiale inflammatorische Antwort ist mit hoher Parasitämie und Sterblichkeit assoziiert. Die Kehrseite einer starken Immunantwort ist jedoch ein schwererer Krankheitsverlauf und daraus resultierend auch eine erhöhte Sterblichkeit trotz eingedämmter Parasitämie. Das Überleben und die Immunität erfordern eine fein abgestimmte Balance der Cytokin-Ausschüttung, um eine Immunantwort ohne starke Eigenschädigung gewährleisten zu können.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Auf der Suche nach den molekularen Mechanismen einer protektiven Immunität gegen Malaria wurde mit einer cDNA Bibliothek aus Milzzellen immuner C57/BL10 Weibchen ein differentielles „Screening“ durchgeführt, um Gene zu finden, deren Expression sich mit dem Ausbilden einer Immunität verändert. Positive Klone aus diesem „Screening“ wurden im Northern Blot Experiment auf ihre differentielle Expression überprüft. Einer dieser isolierten partiellen cDNA Klone pM41, hybridisierte mit einer RNA, welche in Milzen immuner Tiere Mäuse deutlich stärker exprimiert war als in Milzen suszeptibler Tiere. Das entsprechende Gen wurde als *imap38* bezeichnet (Krücken 1995).

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der *imap38* cDNA, sowie die Klonierung und molekulare Charakterisierung des homologen humanen Gens. Diese Arbeit umfasst die heterologe Expression der putativen Leseraster mit dem Ziel a) Antikörper für den *in vivo* Nachweis zu gewinnen, b) die intrazelluläre Lokalisation der Proteine zu identifizieren, c) mit Hilfe des Two-Hybrid Systems mögliche Interaktionspartner aufzuspüren, d) die Zelltypspezität der Expression zu untersuchen.

Mit der Klonierung der homologen humanen cDNA sollte die Untersuchung der e) genomischen Organisation und chromosomalen Lokalisation f) die phylogenetische Einordnung von bekannten homologen Genen g) die Expressionsanalyse in humanen Geweben und Zelllinien erfolgen und mit den Maus-Ergebnissen korreliert werden.

2.0 Material & Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Amplify: Amersham Buchler GmbH & CoKG, Braunschweig

Agar; Hefeextrakt; Trypton, Pepton, Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

Agarose: Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf

BIO-RAD DC Protein Assay; BIO-RAD Protein Assay: BIORAD, München

cDNA Synthesis Kit, HybriZAP Two-Hybrid Predigested Vector/Gigapack Cloning Kit, Epicurian COLI XL2-Blue MRF' ultracompetent cells; ExAssist/SOLR-System; Gigapack III Gold Packaging Extract: Stratagene, Heidelberg

Chemilumineszenz ELISA Substrat (β -Gal); DOSPER Transfektionsreagenz; Expand High Fidelity PCR System; FuGENE 6 Transfektionsreagenz: Boehringer, Mannheim

Coomassie Brilliant Blue R 250: Serva, Heidelberg

Doxyzyklin Hydrochlorid: ICN, Meckenheim

Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie: BIOZYM Diagnostik, Oldendorf; Boehringer, Mannheim; Fermentas, St. Leon Rot; Invitrogen, Leek; Pharmacia, Freiburg; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg; USB, Bad Homburg

Epicurian COLI XL2-Blue MRF' ultracompetent cells; ExAssist/SOLR-System; Gigapack III Gold Packaging Extract; Predigested Lambda ZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit; Rapid Excision Kit: Stratagene, Heidelberg

Fötale Kälberserum (FCS): Biochrom, Berlin

Fugene Transfektionsreagenz Roche, Mannheim

G418 Sulfat (Geneticin): Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.

GeneAmp RNA PCR-Kit; Tropix Tropilon plus Nylonmembran: Perkin Elmer, Weiterstadt

Great EscAPe SEAP Genetic Reporter System: Clontech, Palo Alto, U.S.A.

Maxiscript in vitro Transcription Kit; RPA-II System: Ambion, Austin, TX, U.S.A.

Megaprime DNA Labeling Kit; Nylonmembran Hybond-N; pMOSBlue T-vector cloning Kit; Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP; Rapid Hyb.-Lösung: Amersham, Braunschweig

MitoTrackerTMRed CMX Ros; LysoTrackerTMRed DND-99: Molecular Probes, Göttingen

Nitrocellulosemembran: Schleicher und Schuell, Dassel

Nitrozellulosemembranen; Protan BA 85: Schleicher und Schuell GmbH, Dassel

Oligonukleotide/Primer: Birsner und Grob, Denzlingen; Gibco BRL, Karlsruhe; MWG, Ebersberg

Petrischalen für Gewebekultur und Mikrobiologie: Greiner, Solingen, Waldeck, Münster

Qiagen Blood and Cell Culture Genomic DNA Purification Kit: Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid-DNA Isolationskit, Qiaquick PCR Purification Kit; Isolationskit für genomische DNA: Qiagen, Hilden

Radiochemikalien: ICN, Meckenheim; Amersham, Braunschweig

RPMI-Medium: GIBCO BRL, Karlsruhe

Sonstige Laborchemikalien (p. a.): Acros Organics, Geel, Belgien; Baker, J. T., Deventer, Niederlande; Bio-Rad, München; Biozym Diagnostik, Hameln; Fluka, Neu-Ulm; Grüssing GmbH, Filsum; Janssen Chimica, Geel, Belgien; Merck, Darmstadt; National Diagnostics, Atlanta, Georgia, U.S.A.; Riedel-de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen

Sonstige Laborchemikalien (p.a.): Fluka, Neu Ulm; Merck, Darmstadt; Riedel-de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen

Sterilfilter: Nunc, Wiesbaden

Streptomycin/Penicillin Lösung: Sigma, Deisenhofen

T7-Sequencing Kit: Pharmacia, Freiburg

TALONspin-Chromatographie-Säulen; Tet-Off System: Clontech, Palo Alto, U.S.A.

TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System;

TransFast; Luciferase Assay System: Promega, Heidelberg

RotiLoad-Puffer (4x): Roth, Karlsruhe

Zeocin: Invitrogen, Leek, NL

2.2 Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzung folgender Puffer und Lösungen wird im Text nicht näher erläutert:

Acrylamid Stock (AA/Bis): 29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid in H₂O

Acrylamid Stock: 29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

AP-Substratpuffer: 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 100 mM Tris-HCl, pH 9,5 in H₂O

Arginin haltiges Medium: 21 g dehydriertes PPLO-Broth in 730 ml H₂O, autoklaviert; 100 ml 10 % Hefeextrakt, autoklaviert; 100 ml mycoplasmenfreies Pferdeserum; 10 ml sterilfiltriertes 0,2 % Phenolrot in H₂O; 50 ml sterilfiltriertes 20 % L-Arginin in H₂O; pH 6,5-6,5 mit sterilfiltrierter 1 M HCl einstellen

BCIP-Stock: 50 mg / ml Brom-Chlor-Indolyphosphat in H₂O

Beladungspuffer (2x): 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 2 M EDTA in H₂O

Bindepuffer (5x): 100 mM HEPES pH 7,6; 5 mM EDTA; 50 mM (NH₄)₂SO₄; 5 mM DTT; Tween 20 1 % (w/v); 150 mM KCl

Blotpuffer (Western Blot): 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % Methanol, pH 8,3 in H₂O

CsCl-Lösung: 5,7 M CsCl; 0,1 M EDTA, pH 7,5

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH in H₂O

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

Denhardt's (50x): 5 g Ficoll 400; 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g BSA (Fraction V) ad 500 ml H₂O

Denhardt's Lösung (50x): 5 g Ficoll; 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g BSA ad 500 ml H₂O

DMEM: 1 Pckg. Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 4,5 g Glucose; 3,7 g NaHCO₃ ad 1 l H₂O, pH 7,3, sterilfiltriert; 10 % steriles, inaktiviertes FCS, DTT (1 M) 3,09 g in 20 ml 0,01 M Na-Acetat, pH 5,2, sterilfiltrieren

DMEM-Medium: 1 Pckg. DMEM-Medium; 3,7 g NaHCO₃; 10 % FCS ad 1 l H₂O, pH 7,3, sterilfiltriert

EDTA (0,5 M): 232,6 g ad 1 l H₂O, pH 8,0

Färbelösung (SDS-PAGE): 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in Fixierlösung

Färbelösung (Western Blot): 10 ml AP-Substratpuffer; 66 µl NBT-Stock; 33 µl BCIP-Stock

Fixierlösung: 20 % Isopropanol; 7 % Essigsäure in H₂O

Glyoxal-Ladungspuffer: 50 % Glycerin; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 0,25 % Bromphenolblau in H₂O, aus RNase-freien Stammlösungen ansetzen

GTC-Lösung: 4 M Guanidiniumthiocyanat; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 7 % 2-Mercaptoethanol in H₂O

HAM's F-12: 1 Pckg. Ham's F-12 Medium; 1,176 g NaHCO₃ ad 1 l H₂O, pH 7,3, sterilfiltriert; 10 % steriles, inaktiviertes FCS

Ham's F12-Medium: 1 Pckg. Ham's F12-Medium; 1,176 g NaHCO₃; 10 % FCS ad 1 l H₂O, pH 7,3, sterilfiltriert

Hanks balanced Salts (HBSS): 1 Pckg HBSS; 0,35 g NaHCO₃; ad 1 l H₂O, pH 7,3, sterilfiltriert

Harnstoff-Lysispuffer (8 M): 8 M Harnstoff; 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, pH 8,0; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, pH 8,0 in H₂O

HBSS: 1 Pckg. Hanks' Balanced Salts; 0,35 g NaHCO₃ ad 1 l H₂O, pH 7,3, sterilfiltriert

High-Salt-Puffer: 1 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 in H₂O

Hybridisierungslösung: 6 x SSC; 0,5 % SDS; 100 µg/ml denaturierte Heringsperma-DNA

Imidazol-Elutionspuffer: 8 M Harnstoff; 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, pH 8,0; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 100 mM Imidazol, pH 8,0 in H₂O

Ladungspuffer: 0,25 x TBE-Puffer, 60 % Glycerin; Bromphenolblau 0,2 % (w/v)

Ladungspuffer (6x): 30 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF in H₂O

Laufpuffer (SDS-PAGE 1x): 0,025 M Tris-Base; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS in H₂O

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Agar

LB-Medium: 1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt in H₂O, pH 7,5

LB-Top-Agarose: LB-Medium mit 0,7 % Agarose

Lösung D: 4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Natriumcitrat; pH 7,0; 0,5 % Natriumlauroylsarcosinat; 100 mM 2-Mercaptoethanol

Low-Salt-Puffer: 200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 in H₂O

Lysepuffer: 20 mM Natriumphosphat, pH 7,8; 1 mM MgCl₂; 0,2 % Triton X-100

MnCl₂-Lösung: 10 mM MnCl₂ in Na⁺-HBS-Puffer, pH 7,3

Na⁺-HBS: 150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 0,8 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 20 mM D-Glucose; 20 mM Hepes in H₂O, pH 7,3

Na⁺-HBS o. Ca²⁺: 150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 20 mM D-Glucose; 20 mM Hepes; 1 mM EGTA in H₂O, pH 7,3

Nährlösung: 1 g Ca(NO₃); 0,25 g MgSO₄ x 7 H₂O; 0,25 g KNO₃; 0,25 g KH₂PO₄; 40 mg FeSO₄ ad 1 l H₂O; mit 0,5 M K₂HPO₄ auf pH 5,0 einstellen; sterilfiltrieren

NBT-Stock: 50 mg/ml Nitro-Blue-Tetrazolium-Chlorid in 70 % Dimethyl-formamid

Neutralisierungslösung: 1 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl in H₂O

Neutralisierungslösung: 1 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl

NZY-Agar: NZY-Medium mit 1,5 % Agar

NZY-Medium: 5 g NaCl; 2 g MgSO₄ x 7 H₂O; 5 g Hefeextrakt; 10 g NZ-Amin ad 1 l H₂O, pH 7,5

NZY-Top-Agarose: NZY-Medium mit 0,7 % Agarose

PBS (10x): 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 2,4 g KH₂PO₄ ad 1 l H₂O, pH 7,4

PBS (1x): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 0,15 g NaH₂PO₄ x H₂O; 0,2 g KH₂PO₄ ad 1 l H₂O, pH 7,2-7,4

PFA-Lösung: 1 % bzw. 3,7 % PFA in PBS-, aufkochen, pH 7,2

pH 7,3, sterilfiltriert

Ponceau S: 0,5 % Ponceau S; 1 % Eisessig in H₂O

Prähybridisierungslösung: 6x SSC; 2x Denhardts; 0,1 % SDS; 100 µg/ml denaturierte fragmentierte Heringssperma-DNA in H₂O

Prähybridisierungslösung: 6 x SSC; 2 x Denhardt's; 0,1 % SDS; 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

Puffer 1: 10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 1 Protease Inhibitor Cocktail-Tablette "Complete-Mini" (Boehringer, Mannheim) auf 10 ml Puffer

Puffer 3: 20 mM HEPES pH 7,9; 25 % Glycerin; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA 0,5 mM DTT; 1 Protease Inhibitor Cocktail-Tablette "Complete-Mini" (Boehringer, Mannheim) auf 10 ml Puffer

Puffer A: 5 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10mM KCl; 0,5 mM DTT; 1 Protease Inhibitor Cocktail-Tablette "Complete-Mini" (Boehringer, Mannheim) auf 10 ml

Puffer C: 20 mM HEPES; 25 % Glycerin; 0,5 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 1 Protease Inhibitor Cocktail-Tablette "Complete-Mini" (Boehringer, Mannheim) auf 10 ml Puffer

Roti-Blue-Färbelösung: 20 ml Roti-Blue 5x-Konzentrat; 20 ml Methanol; 60 ml H₂O

RPMI-Medium: 1 Pckg. RPMI-1640-Medium; 2 g NaHCO₃; 10 % FCS ad 1 l H₂O,

Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS in H₂O

Sequenzgel-Lösung: 32 ml SequaGel XR Monomerlsg. (19:1 AA zu Bis); 8 ml SequaGel XR Puffer; 300 µl 10 % APS

SM-Phagenpuffer: 100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01 % Gelatine in H₂O

SOC-Medium: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 20 mM Glucose in H₂O

Sorbitolpuffer: 40 mM K₂HPO₄; 40 mM KH₂PO₄; 0,5 mM MgCl₂, pH 6,5; 1,2 M Sorbitol in H₂O

SSC (20x): 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 in H₂O

TAE-Puffer (40x): 1,6 M Tris; 1,33 M Natriumacetat; 0,04 M EDTA in H₂O, pH 8,0

TBE-Puffer (5x): 54 g Tris; 28 g Borsäure; 3,4 g EDTA ad 1 l H₂O

TBT-Puffer (1x): 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,15 M NaCl; 0,1 % Triton X-100 in H₂O

TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,0; 1 mM EDTA in H₂O

Transferlösung: 3 M NaCl; 8 mM NaOH, pH 11,40-11,45 in H₂O

Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS in H₂O

Trypanblau-Färbelösung: 0,25 % Trypanblau in sterilem H₂O, filtrieren

TST-Puffer (1x): 0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,05 % Tween-20 in H₂O

Vectashield-Einbettmedium: 500 µl Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.); 500 µl Glyzerin; 2 % DABCO

2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/10 sowie Mäuse des Inzuchtstammes NMRI aus der zentralen Tierversuchsanlage der HHU. Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen auf Kleintierstreu gehalten und mit der Standarddiät 10H10 (Nohrlin, Bad Salzuflen) sowie Wasser *ad libitum* ernährt. In den Experimenten wurden Mäuse im Alter zwischen 9 und 12 Wochen eingesetzt.

2.4 *Plasmodium chabaudi*-Malaria Stamm

Bei den meisten Experimenten wurde der Malaria-Erreger *Plasmodium chabaudi* eingesetzt. Er stammte ursprünglich aus dem National Institute of Research, Mill Hill, London, (U.K.) und wird in der Abteilung für Molekulare Parasitologie seit Jahren durch Passage von infiziertem Blut in NMRI-Mäusen gehalten.

Plasmodium-Parasiten wurden wöchentlich auf naive NMRI-Mäuse übertragen (Wunderlich *et al.* 1982). Die Parasitämie der Mäuse wurde bestimmt, indem aus einem an der Schwanzspitze entnommenen Blutstropfen ein Ausstrich angefertigt wurde. Dieser wurde mit Giemsa und May-Grünwald gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Der getrocknete Ausstrich wurde 3 min mit May-Grünwald-Färbelösung überschichtet. Diese wurde anschließend mit etwa einem Volumen Sörensen-Puffer verdünnt. Nach abermals 3 min wurde die Färbelösung abgeschüttet und für 5 min mit Giemsa-Sörensen-Färbelösung überschichtet.

Mäuse, die eine Parasitämie im peripheren Blut von 20 %-40 % aufwiesen, wurden mit Diethylether narkotisiert. Das Blut wurde mit einer in CPD-Puffer gespülten Pasteurpipette aus dem Retroorbitalplexus entnommen und in CPD-Puffer aufgenommen. Nach Ermittlung der Erythrocytenzahl in der Neubauerkammer und Bestimmung der Parasitämie, wurde die Zellzahl so eingestellt, dass sich in 500 µl PBS 1×10^6 mit Plasmodien parasitierte Erythrocyten (p.E.) befanden (Wunderlich *et al.*, 1991). Diese wurden dann NMRI-Mäusen (Passage) oder Versuchstieren intraperitoneal injiziert. Für Versuche wurden Mäuse im Alter von 9-12 Wochen verwendet. In einigen Experimenten wurden immune Mäuse verwendet. Dazu wurden die Versuchstiere mit 1×10^6 Plasmamembranen („ghosts“) parasitierter Erythrocyten in komplettem Freund's Adjuvans vakzinieren (Wunderlich *et al.* 1988). Nach einer Woche wurde eine Primärinfektion mit 1×10^6 parasitierten Erythrocyten intraperitoneal gesetzt. Tiere, die die Infektion selbständig ausheilten, wurden 9 Wochen nach Infektion als immun verwendet (Wunderlich und Helwig 1987; Wunderlich *et al.* 1992). Als nicht immune Mäuse wurden gleichaltrige, parallel gehaltene Tiere verwendet, die jedoch weder eine Vakzinierung noch eine Primärinfektion erhielten.

2.5 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]

E. coli SOLR

e14-(mcrA) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ umuC::Tn5 (kanr) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 IR[F' proAB laqIqZDM15] Su- (Short, 1992)

E. coli TOPO

endA1 hsdR17 (rK12-mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA+B+ lacIqZDM15::Tn10(TcR)]; (Invitrogen, Leek NL)

E. coli DH5α

F- f80dlacZDM15 D(lacZYA-arff)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK,mK+) phoA supE44 l- thi-1 gyrA96 relA1 (Amersham, Braunschweig)(Hanahan,1983)

***E. coli* BL21(DE3)pLysS**

F- dcm ompT hsdSB (rB- mB-) gal l(DE3)[pLysS Camr](Stratagene, Heidelberg)

***E. coli* XL0LR**

D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [proAB+ lacIq lacZDM15 Tn10 (tetr)] Su- IR (Stratagene, Heidelberg)

2.6 Vektoren

λ -ZAPII (Stratagene, Heidelberg); pBluescript SK (+/-) (Short et al., 1988);

pSEAP-Basic (Clontech, Palo Alto)

pSEAP-Control (Clontech, Palo Alto)

pBD-GAL4 (Clontech, Palo Alto)

pAD-GAL4 (Clontech, Palo Alto)

pcDNA3.1 (Invitrogen, Leek, Niederlande)

pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto)

pEGFP-N3 (Clontech, Palo Alto)

pRSET-B (Invitrogen Leek, NL)

pMyc-His Tag A (pSecTagA ohne Sekretionssignal, Ig κ -Kette) (Invitrogen, Leek NL)

pCR-TOPO2.1 (Invitrogen, Leek NL)

pGEX-3X (Pharmacia, Freiburg)

2.7 Organentnahme und Zellisolation

Mäuse wurden, wenn nicht anders beschrieben, durch cervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, und die Organe aseptisch entnommen. Diese wurden entweder direkt nach der Entnahme in Lösung D1 im Ultraturax homogenisiert oder zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Tiefgefrorene Organe wurden in auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmter Lösung D1 homogenisiert.

2.7.1 Isolation von Gesamtmilzzellen

Milzzellen wurden aus weiblichen Mäusen isoliert. Hierbei wurden unterschiedliche Infektionsstadien und Mausstämmen gewählt. Die Mäuse wurden mit Diethylether betäubt und dann durch cervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Milz entnommen und durch ein feines Sieb (Drahtgewebe: V2A $0,32 \times 0,20 \times 1000\text{ mm}$, Draht-Steinle, Freiburg, Deutschland) in mit RPMI⁺ Medium gedrückt, um den Zellverband zu lösen. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Beckmann Untertischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen für 1 min in 1 ml Lyselösung pro Milz resuspendiert. Anschließend wurden 15 ml RPMI⁺ Medium pro Milz hinzugegeben und wiederum bei den oben erwähnten Parametern für 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Hiernach wurden die Zellen in 10 ml RPMI⁺-Medium aufgenommen. Ein 100 μl Aliquot wurde 1:1 mit Trypanblau verdünnt und die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

2.7.2 Fraktionierung von Milzzellen für FAC-Sortierung

Für die Trennung und Aufreinigung der immunologisch relevanten Zelltypen wurden Milzzellen wie unter 2.7.1 isoliert und quantifiziert. Milzzellen wurden mit Waschpuffer (PBS, 0,1 % NaN₃, 1 % FCS) gewaschen und bei 350 g 5 min abzentrifugiert. Aliquots von

1×10^6 / ml wurden mit Waschpuffer eingestellt. Die Primärantikörper wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt und 20 min vor Licht geschützt inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit Waschpuffer wurden die Zellen auf 4×10^7 / ml verdünnt und direkt für die Sortierung im „FACSorter“ MOFLO der Firma Cytometix (Freiburg) eingesetzt. In den Fällen, in denen keine direkt fluoreszenzmarkierten Primärantikörper zur Verfügung standen, erfolgte eine zweite Inkubation mit dem entsprechend markierten Sekundärantikörper und 3 zusätzlichen Waschschritten (im Falle der Biotin Markierung des Erstantikörpers). Es wurden von jedem Zelltyp minimal 1×10^6 Zellen aussortiert und entsprechend ihrer weiteren Verwendung behandelt (*in situ* Hybridisierung bzw. quantitative PCR).

Zelltyp	Antikörper	Bestellnummer	Markierung
B Zellen	CD45R/B220	01125B	Phycoerythrin
T Zellen α/β	TCR- β -chain	01304D	FITC
T Zellen γ/δ	$\gamma\delta$ TCR	01314D	FITC
Makrophagen	CD11b (Mac-1)	01715B	Phycoerythrin
Granulozyten	Ly-6G (Gr1)	01214D	FITC
Natürliche Killerzellen	NK Cells/2B4	01702D	FITC

Tabelle 1

Für die FACSortierung von immunologisch relevanten Zelltypen der Milz verwendete Antikörper

2.8 Isolation von genomischer DNA

Gewebe verschiedener Organe und pelletierte Zellkulturzellen wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Isolation bei -80°C gelagert. Die Isolation erfolgte nach Sambroock *et al.* 1989 mit Modifikationen. Die Gewebe wurden im vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff fein zerrieben. Die Zellpellets wurden direkt in Proteinase K-Puffer resuspendiert. Das Pulver wurde vorsichtig in Proteinase K-Puffer aufgenommen und Proteinase K (Merck, Darmstadt) bis zu einer Endkonzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ sowie RNaseA (Sigma, Deisenhofen) bis zu $20 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die Zellpellets wurden direkt in Proteinase K-Puffer resuspendiert und mit RNase wie oben behandelt.

Nach Inkubation bei 56°C über Nacht wurde die DNA einmal mit Phenol/Tris, einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert, mit einem Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 13.000 rpm im Beckman JS13.1 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, vorsichtig an der Luft getrocknet und in Wasser gelöst.

2.8.1 Isolation von genomischer DNA aus Blut

Humanes Blut von einem gesunden männlichen Spender (der Autor) wurde im Rahmen einer Blutspende am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der HHU gewonnen. Das Blut (ca. 20 ml) wurde in Gegenwart von Zitronensäure als Gerinnungsschutz transportiert und unmittelbar für Lymphocytenabtrennung vorbereitet. Verdünntes, gerinnungsgemhmtes Blut wird dafür über Ficol-Hypaque geschichtet und zentrifugiert. Rote Blutkörperchen und polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten besitzen eine größere Dichte und werden durch das Ficoll-Hypaque (Dichte = $1,078$) hindurch zentrifugiert, während mononucleäre Zellen (Lymphocyten und einige Monozyten) darüber eine Bande bilden und von der Grenzschicht aufgenommen werden können. Das Blut wurde mit dem einfachen Volumen PBS verdünnt und vorsichtig auf das vorgelegte Ficoll (Biocoll, Biochrom) aufgeladen. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 1000 g , welche ohne Bremse beendet werden muss, (aktives Abbremsen würde die Schichtung des Gradienten verwirbeln) zeigt sich ein Pellet aus Erythrozyten und Interphase aus Leukozyten. Die Interphase wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und mit 25 ml PBS gewaschen um Zuckerreste des Ficolls zu entfernen. Das gewaschene Zellpellet wurde in Proteinase K Puffer aufgenommen und Proteinase K (Merck, Darmstadt) bis zu einer Endkonzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ sowie RNaseA (Sigma, Deisenhofen) bis zu $20 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt (modifiziert nach

Sambrook *et al.* 1989) Nach einer Inkubation über Nacht wurde die DNA mit Phenol/Tris, einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt, nach einer Zentrifugation bei 10.000 g wurde das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser gelöst.

2.9 Isolation von Plasmid DNA

Plasmide wurden in den Bakterienstämmen *E. coli* XL1-Blue (Stratagene), *E. coli* DH5 α für eine Isolation angereichert. Eine Flüssigkultur (2xYT Medium) mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde über Nacht bei 37°C bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die Isolation der Plasmide erfolgte entweder aus 1,5 ml Kultur mit Hilfe des „Plasmid Spin Prep“ Kit (Macherey & Nagel), oder aus 25-50 ml Kultur mit Hilfe des Plasmid-DNA-Isolations Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.10 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch (Spektrophotometer DU 640, Fa. Beckmann) bei 260 nm. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook *et al.* 1989 berechnet. Plasmid-DNA für die Transfektion von Zellen wurde einer zusätzlichen Mengenbestimmung in einem 1 %igen TBE-Agarosegel durch den Vergleich mit 1 μ g Standard l-DNA unterzogen.

2.11 Restriktion und Elektrophorese von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und Temperatur (in der Regel 37°C).

2.12 Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarosegelelektrophorese nach der Methode von Sambrook *et al.* 1989. Es wurden 0,5–2%ige Agarosegele in TBE- oder TAE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von 0,5 μ g Ethidiumbromid/ml Gellösung wurde die DNA gefärbt. Als Längenstandard dienten 1 μ g *EcoRI*/*HindIII* doppelt restringierte DNA bzw. bei kleineren Fragmenten 1 μ g *HaeIII* restringierte FX174-DNA.

2.13 Transfer von DNA auf Membranen und Hybridisierung „Southern Blot“

Die in einem Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mittels der Methode des "Downward Alkaline Capillary Transfer" (Chomczynski, 1992) auf eine Nylonmembran (Hybond-N Amersham, Braunschweig) übertragen. Der Kapillartransfer erfolgte über einen Zeitraum von 2 Stunden. Die Membran wurde für die Hybridisierung gegen radioaktiv markierte Sonden eingesetzt. Dazu wurde sie für 2 h bei 65 °C in Prähybridisierungslösung inkubiert, die zur Hybridisierung durch Hybridisierungslösung ersetzt wurde. Bei Verwendung von Rapid Hyb.-Lösung (Amersham, Braunschweig) war die Prähybridisierung mit einer Prähybridisierungslösung nicht notwendig. Die Hybridisierung mit einer durch "Random Priming" markierten Sonde (Kap. 2.14) wurde bei 65 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 20 min bei 65 °C mit einer Waschlösung aus 2 x SSC/0,1 % SDS und dreimal für je 1 h bei 65 °C mit 0,2 x SSC/0,1 % SDS gewaschen. Eine durch "End-Labeling" am 5'-Ende radioaktiv markierte Sonde wurde in 4 h bei 60 °C hybridisiert, das Waschen erfolgte bei 60 °C einmal mit 2 x SSC/0,1 % SDS für 10 min und zweimal mit 1 x SSC/0,1 % SDS für 30 min. Die Membran wurde mit einem Amersham Röntgenfilm (Hyperfilm-MP) und einer Verstärkerfolie für einen Tag bis 2 Wochen bei – 80 °C exponiert.

2.14 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte durch "Random Priming" in Gegenwart von [α 32P]-dCTP, in Anlehnung an die Methode von Feinberg und Vogelstein 1984. Die Reaktion wurde unter Verwendung des Megaprime DNA Labeling Kits (Amersham, Braunschweig) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je Ansatz wurden 50 ng linearisierte Plasmid-DNA und 50 μ Ci [α 32P]-dCTP (ICN, 10 μ Ci/ μ l; spez. Akt.: 3000 Ci/mmol) eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Elutip D-Ionenaustauschersäule (Schleicher und Schuell, Dassel) nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren abgetrennt. Die Probenaktivität wurde durch Messung der Cerenkow-Strahlung eines 1 μ l Probenaliquots in einem Beckmann LS 6000 SC Szintillationszählers bestimmt. Vor der Hybridisierung wurde die Probe für 5 min bei 94 °C denaturiert.

2.15 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem TAE-Agarosegel, in welches ein Fenster aus gleichprozentiger "low melting point"-Agarose (BIOZYM, Oldendorf) gegossen wurde. Nach dem Einlaufen der gewünschten Fragmente in dieses Fenster, wurden sie unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und durch den Verdau mit dem Enzym Agarase (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch das Auftragen von 1/10 des Volumens auf ein Agarosegel. Die Isolation von RNA aus TBE-Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Spin Kit (Qiagen, Hilden) exakt nach den Angaben des Herstellers.

2.16 Isolation von RNA

Das Arbeiten mit RNA verlangt noch größere Reinheit als der Umgang mit DNA. Im Gegensatz zu DNasen sind RNasen äußerst stabil, benötigen keinerlei Cofaktoren für ihre Aktivität und können durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden. Auch in hochreinen Puffern vorhandenen RNasen können durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert werden. Dies erfolgt durch eine kovalente Bindung von DEPC an Histidinreste im aktiven Zentrum der RNase. Überschüssiges DEPC muss durch Autoklavieren entfernt werden, da es sonst zu Modifikationen der RNA kommt (Carbomethoxylierung der Adenine). Auch wird so die gesundheitsschädliche Wirkung von DEPC aufgehoben, da es beim Erhitzen zu Kohlendioxid und Ethanol zerfällt.

2.16.1 Isolation von RNA über CsCl Gradienten und Isolation von poly (A)+RNA

Milzen wurden in Lösung D2 mit dem Ultraturax homogenisiert bis die Viskosität der Lösung abnahm. Es wurde N-Laurylsarcosin bis zu einer Konzentration von 0,5 % zugesetzt und 15 min bei 60 °C inkubiert. Mit dem Homogenat wurde vorsichtig ein Cäsiumchlorid-Dichtekissen (2 ml in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen) überschichtet. Nach Zentrifugation bei 28.000 rpm im Beckman SW41-Rotor bei 20 °C für 16 h wurde der Überstand abgekippt, das Zentrifugenröhrchen – mit der Öffnung nach unten – mit einem rotglühenden Skalpell etwa 1 cm vom Boden entfernt abgeschnitten und das Pellet in 1 ml DEPC-H₂O gelöst. Die RNA wurde wie zuvor beschrieben umgefällt und wieder gelöst. Die Selektion von poly (A)+RNA erfolgte durch zweimalige Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose (Boehringer Mannheim) (Aviv & Leder, 1972) wie in Sambrook *et al.* 1989 beschrieben.

2.16.2 Isolation von RNA durch saure Phenol Extraktion

Standardmäßig wurde RNA aus Organen und Zellen durch Extraktion mit saurem Phenol isoliert. Die Methode von Chomchynski und Sacchi 1987 wurde leicht modifiziert. Homogenate in Lösung D1 wurden mit N-Laurylsarcosin bis zu einer Konzentration von 0,5 %

versetzt. Nacheinander wurden 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4, 1 Volumen wasser-gesättigtes Phenol und 0,2 Volumen Chloroform zugegeben. Zwischen jedem Schritt wurde das Homogenat kräftig geschüttelt und am Schluss 15 s mit dem Vortex resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 4.600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein RNase-freies JA-20 Röhrchen überführt, mit einem Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 60 min im Beckman JS 13.1 Rotor wurde das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 1 ml DEPC- H_2O gelöst, in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 0,1 ml 3 M Natriumacetat pH 5,5 und 1 ml Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde im Beckman JA18.1 Rotor bei 15.000 rpm für 60 min zentrifugiert, gewaschen, getrocknet und in DEPC- H_2O gelöst. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt.

2.17 Elektrophorese von RNA und „Northern Blot“

Die Denaturierung der RNA mit Glyoxal und DMSO sowie die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgten wie beschrieben (Sambrook *et al.* 1989). 20 μg RNA in einem Volumen von 5,4 μl wurden mit 5,4 μl deionisiertem 40 %igem Glyoxal, 16,1 μl DMSO und 3 μl 0,1 M Natriumphosphatpuffer versetzt und 1 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 4 μl Glyoxal-Ladungspuffer zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2 % Agarosegel in 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7 bei 3–4 V/cm. Mit Hilfe einer abwärts gerichteten Kapillarblot-Technik unter Verwendung eines alkalischen Transferpuffers (Chomczynski, 1992) wurde die RNA auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond-N, Amersham, Braunschweig) geblottet. Die Membran wurde 15 min in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 neutralisiert und schließlich 15 min bei 80°C gebacken.

Zur Größenabschätzung wurden 10 μg EcoRI/HindIII verdauter λ -DNA (Fermentas, St. Leon Rot) glyoxyliert und parallel zur RNA aufgetrennt. Spuren mit λ -DNA wurden nach der Elektrophorese vom Rest des Gels abgetrennt, 20 min in 50 mM NaOH gewaschen, um das Glyoxal zu entfernen, 15 min in 10 mM Natriumphosphat-Puffer neutralisiert und schließlich im selben Puffer mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid gefärbt. Die Hybridisierung wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 2.13 durchgeführt.

2.18 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden *E. coli* XL1-Blue „subcloning grade competent cells“ (Stratagene, Heidelberg) oder *E. coli* TOPO der Firma Invitrogen (Leek, NL) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.19 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PTC 150-16 oder PTC 150-25 MiniCycler der Firma MJ Research (BIOZYM, Hess. Oldendorf) durchgeführt.

2.19.1 Synthetische Oligonucleotide (Primer)

Für die Amplifizierung von *imap38* und *himap-1-4* Fragmenten wurden Oligonucleotide der Firma MWG Biotech (Ebersberg) verwendet. Der T_m der jeweiligen Oligonucleotide wurde nach der Formel $T_m = 69,3^{\circ}\text{C} + (0,41 \times \text{GC}) - 660/n$ berechnet, wobei n die Anzahl der einzelnen Nucleotide angibt.

Primer	Sequenz
pRSET-R1BamHI	GGGGGATCCATGCAGAAAGGAGAGACGGGGAAG
pRSET-R1 EcoRI	CCGGAATTCTCTGTTATTGTGGTCCCCAAAGCCCT
raster2-BamHI-pRSET	CGCGGATCCCATGCCCCAGCTGAGGCTCAT
raster2-EcoRI-pRSET	GGCCTTAAGTTATCTGTTATTCTGGTCCCCAAAGC
raster2-Hind	CCCAAGCTTATGCCCCAGCTGAGGCTCATC
raster2-XhoI	GGCCTCGAGTCTGTTATTGTGGTCCCCAAAGCCCT
IAPges-1	GTTTGCCCCCTAAGTAAATAAAAAGGTAATAAAAATA
iapstart-A-	CACAGGCAGCGAGCGGAGGCTCAGGCCTCGAGAGT
iapstart-B	CACAGGCAGCGAGCGGAGGCTCAGGCACTCGAGAGT
iapstart-C	CACAGGCAGCGAGCGGAGGCTCAGGCAACTCGAGAGT
GFP-D4a-Bsp	AAGTCCGGAGGTCACCCAGCTGGGTCG
GFP-D4a-Bam	CGCGGATCCAATAACCGCTTCACCGCGGCCAGC
GFP-D4b-Bsp	AAGTCCGGACGCGGTGAAGCGCTTATTCGG
GFP-D4b-Bam	CGCGGATCCAATCCAGCCAGGTCCTCTTGCGC
GFP-D4c-Bsp	AAGTCCGGAAGAGACCTGGCTGGAGACTC
GFP-D4c-Bam	CGCGGATCCAATTGCGCCACCAGGTCCCGCAGC
GFP-D4d-Bsp	AAGTCCGGAGGACCTGGTGGCCGAGTGCCG
GFP-D4d-Bam	CGCGGATCCAATTGAGCCTGAGCCTCGCGCTCG
LacZ-D4-Bpu	GTTCCAGCTGAGCGGTACCCAGCTGGGTGCTT
LacZ-D4Eco	CGCGAATTC AATTGAGCCTGAGCCTCGCGCTCG
R2-GFP-C1-HindIII	CCCAAGCTTTTATGCCCCAGCTGAGGCTCA
R2-GFP-C1-BamHI	GGCGGATCCTTATCTGTTATTCTGGTCCCCAAAGCC
IMAP2R-HindIII	CCCAAGCTTATGCCCCAGCTGAGGCTCATC
IMAP2R-XhoI	GGCCTCGAGTCTGTTATTCTGGTCCCCAAAGCC
iapRT-76	GAACAGGCAATGTGGGTCCTT
iapRT-313	AGTGCAACTTCTGGTGACAGGCACC
iapRT-546	GCCATCACCTGCTCCCGAATAAC
RT-hu63	AAAGGTAAGGTAAGCATGGGAGGA
RThu562	TGTGTTGCTCACGTAATCGTGCA
RT-hu27	GGCTTCTTGTGGCCAACTCAGA
RT-hu523	GTCCTCCTTCCTGGTGAAGACGA
hu2rHindIII	TGTAAGCTTATGGGAGGAAGGAAGATGGCGACA
hu2rXhoI	GGCCTCGAGGTCAGGCCCGACCTCCGCAACGGC
Marathon-AP1	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
Marathon-AP2	ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGGC
Marathon 57	CTGTCCGAGACTTCAACCGGTGTT
Marathon 112	AAAGAAGTAGACAGCGGTAGAAGGAAGGAGGG
Marathon 341	CCCTCGACTTTTACAGGCCTCACAGG

Primer	Sequenz
pGEX-Bam-HIMAP	CGCGGATCCGCATGGGAGGAAGGAAGATGGCGACAGATGAAGAA
pGEX-Eco-HIMAP	CCCGAATTCTCAGTCAGGCCCGACCTCCGCAACGGCCCTCCGACC
GST-HIMAP-Tmd	CCCGAATTCCCTGGGGGACTTCAGCCACTTCCACAGCCGGGCC
HIMAP-GST-6His	CCCGAATTCTCAATGATGATGATGATGATGATGACCTGGGGGACTTCAGCCACTTCCACAGCCG
IMAP2R-GST-6His	CCCGAATTCTCAATGATGATGATGATGATGATGACGCTCCAGCCCTTCCAGTAGAATTTCCGC
pGEX-IMAP2R-Bam	CGCGGATCCATGCCCCAGCTGAGGCTCATCCTAGTGGGCAGG
pGEX-IMAP2R-Eco	CCCGAATTCTTATCTGTTATTCTGGTCCCCAAAGCCCTTTC
GST-IMAP2R-Tmd	CCCGAATTCCGCTCCAGCCCTTCCAGTAGAATTTCCGCCATCCC
GST-IMAP2R-6His	CCCGAATTCTCAATGATGATGATGATGATGATGACGCTCCAGCCCTTCCAGTAGAATTT
IAN-1-5'	ATGGAAGTCCAGTGCAGTGGTGGTGGGGTTTCATCCC
IAN-1-3'	GTCTTTCATAAACTGGTTGAAGATAAAGGAAGCAAT
IAN-3-5'	ATGGCTGAGCCAGTGCACAACTCTCTGAGG
IAN-3-3'	TGAAAAAAGATGCCATATTTTCAAAGAACTTT
AL110151-5'	ATGAAAGAGAATTTCAAACACAGGCACGTGG
AL110151-3'	TAACTAGGAGTCTTGCCTTCTAGTCTAATAACTG
AK1972-5'	ATGGCAGCCCAATACGGCAGTATGAGCTTCAACCC
AK1972-3'	ATCTTCCGCGAACAGACGTAACAAAATAAAGGAAGC
AK2158-5'	ATGGGAGGATTCCAGAGGGGCAATATGGAAC
AK2158-3'	AATGTAATGAAAGATGAACAGAAAAATAATGAAAAAAG
huprom 11000	TATAGAACCAAAGAAGAGACTGTATAGCCAAGACAA
huprom 17110	CCTGGAAGACTCCCAAACACAATTTGTTAATTCATTTATTC
huprom 11000Mlu	CGGACGCGTTATAGAACCAAAGAAGAGACTGTATAGCCAAGACAATCC
huprom 17110XhoI	GGCCTCGAGCCTGGAAGAGTCCCAAACACAATTTGTTAATTCATTTATTC
huprom 11967MluI	CGGACGCGTCCATTTGACCCAGCAATCCATTACTGGGTATATACCC
huprom 13000MluI	CGGACGCGTGAATAAAGACAGAAACGGTTACTTTTCAATAGGAAGAAGATCC
huprom 13976MluI	CGGACGCGTCCTAACCAGATATGCAGCCTGCTCCTCTGTAGCCTTCTTACCACCC
huprom 14759MluI	GGCCTCGAGCCTTCTCGGTGACAGGCTCTGAAGTTGGCCACAAGAAGCCCC
HuSilence MluI	CGGACGCGTGAGCCTGAGCCTGGGAGTGGCGGGGGCTGGGG
HuSilence XhoI	GGCCTCGAGCCTGGAAGAGTCCCAAACACAATTTGTTAATTCATTTATTC
5'-Prom/MluI	GGGACGCGTAAGCTTGTAGGCAAGGACCTGGACTATCCC
3'-Prom/XhoI	GGGCTCGAGAGCCATGTCCTGTGGAGGCTAAAGGTCCGC
himap-Sonde 5'	ACAGCCGAAGGAAAGCAGCAGGTTGGGGC
himap-Sonde 3'	GGAGGCCGTTGCGGAGGTCGGGCCTGACTGACAGCG
AK1972-Sonde5'	GGCTCCTTTCTAAAAGTAAGGCGAGGATGACA
AK1972-Sonde3'	CAGTAGGCAGAGAAGAAGCCCTTCTTCTTGAA
AL110151-Sonde5'	CACATGCTGTGCAGTATGCAAAGCCAC
AL110151-Sonde3'	ATCTGAGCTGAGAATCATCCTGGTGGGCAA
AK2158-Sonde5'	ACCCCACAATGCCAGGGAGGAAGACA

Primer	Sequenz
AK2158-Sonde3'	ATGTGGTCATCCTCTTCACCCACAAAGAGGA

2.19.2 Reverse Transkription mit anschließender PCR Reaktion (RT-PCR)

Tabelle 2

Übersicht über die verwendeten synthetischen Oligonukleotide.

Für die reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion wurde das GeneAmp RNA PCR-Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet, bei dem beide Reaktionen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden konnten. Bei der RT-PCR wurden je 1 µg Gesamt-RNA mit je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 mM MgCl₂, 1 U RNase-Inhibitor, 1x PCR-Puffer II und 2,5 U MuLV-Reverse Transkriptase in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Als Initiator der cDNA-Synthese wurde 2,5 µM Random-Hexamer-Primer eingesetzt. Auf eine Inkubation für 10 min bei 22 °C folgte die cDNA-Synthese für 1 h bei 42 °C. Das Enzym wurde für 5 min bei 95 °C inaktiviert. Für die anschließende Amplifikation wurde der 20 µl-Reaktionsansatz mit 1x PCR-Puffer II, 2 mM MgCl₂, je 0,5-2 µM sequenzspezifische Strang- und Gegenstrang-Primer sowie mit 2,5 U Ampli Taq-DNA-Polymerase versetzt, auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte über 30 Zyklen zu je 1 min bei 95 °C, 1 min bei der entsprechenden Annealing-Temperatur der Primer, sowie 1 min bei 72 °C und einer abschließenden Elongation für 10 min bei 72 °C. 1/5 des Reaktionsansatzes wurde in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Klonierung der Fragmente erfolgte wie in 2.19.5 in beschrieben. Als Negativkontrolle wurden jeweils Ansätze ohne RNA oder ohne MuLV-Reverse Transkriptase durchgeführt. In einem Ansatz wurde die RNA zuvor mit DNase-freier RNase A (10 mg/ml) (Sigma, Deisenhofen) für 1 h bei 37 °C verdaut, Phenol/Chloroform-extrahiert und gefällt

2.19.3 Plasmid PCR

Für die Amplifikation eines Fragmentes von einem Plasmid wurden 20 ng des Plasmides, je 300 nM der beiden sequenzspezifischen Primer, 10 mM eines dNTP-Mixes, 2,5 U der pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg), sowie 1 x pfu-Polymerasepuffer in einem Volumen von 100 µl angesetzt und mit Mineralöl überschichtet. Die Plasmid-DNA wurde 4 min bei 95 °C denaturiert und dann einem 35-maligen Zyklus von 1 min bei 95 °C, 1 min bei der entsprechenden Annealingtemperatur der Primer und 2 min bei 72 °C unterworfen. Eine 8-minütige „Elongation“ bei 72°C beendete die Reaktion. 1/10 eines solchen Reaktionsansatzes wurde zur Überprüfung der PCR-Fragmente auf einem 1–1,5 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

2.19.4 Genomische PCR

Zur Amplifikation des *himap-1* Promotors aus humaner DNA wurden 450 ng genomische DNA aus humanen Lymphozyten des Blutes, je 500 nM beider Primer, 2,5 U des Enzyms pfu-DNA-Polymerase (Promega, Heidelberg), 10 mM eines dNTP-Mixes, sowie 1 x pfu-Polymerasepuffer in einem Volumen von 100 µl angesetzt und mit Mineralöl überschichtet. Die genomische DNA wurde 4 min bei 95 °C denaturiert und dann einem Zyklus von 1 min bei 95 °C, 1 min bei 55 °C und 2 min bei 72 °C unterzogen. Abschließend erfolgte eine 8-minütige Elongation bei 72 °C. 1/10 des Reaktionsansatzes wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.19.5 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Fragmente, die mit der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert worden waren, konnten direkt in den pMOSBlue T-Vektor (Amersham, Braunschweig) ligiert werden, da die Taq-DNA-Polymerase bei der Amplifikation zu 30 % einen zusätzlichen Desoxyadenosin-Rest an die 3'-Enden der doppelsträngigen DNA, anhängt. Dazu wurden die Fragmente, wie in aufgereinigt, bei 16 °C in 50 ng des T-Vektors ligiert und in kompetente *E. coli* MOSBlue-Zellen transformiert. Sollten dagegen PCR-Fragmente kloniert werden, denen über die Pri-

mersequenz beidseitig eine Restriktionsschnittstelle eingefügt worden war, wurden diese zuerst über ein Agarosegel aufgereinigt, mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease geschnitten, Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA aus dem Überstand gefällt. Die modifizierten DNA-Fragmente wurden in den entsprechend verdauten Vektor ligiert und 1/5-1/10 des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF⁻- oder DH5 α -Zellen transformiert. Die Überprüfung der Klonierung bzw. des richtigen und durchgängigen Leserasters insbesondere für Fusionsproteine wurde durch Sequenzanalyse überprüft.

2.19.6 Klonierung des 5'-Bereiches von *himap-1* mit Hilfe der Marathon-ReadyTM cDNA

Für die Klonierung des 5' Endes der humanen cDNA *himap-1* wurden die „Marathon-Ready-cDNA“ (Clontech #PT1156-1) verwendet. Diese enthält humane Milz cDNA an deren 5' und 3' Ende ein Adaptor Primer ligiert wurde. Die PCR Reaktionen wurden mit dem „Advantage 2 Polymerase Mix“ (Clontech #K1910-1) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Einem initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C folgte abwechselnd ein Annelings/ Elongationsschritt bei 68 °C für 2 min und ein Denaturierungsschritt bei 94 °C für 30 sec., wobei dieser Zyklus 30 mal durchlaufen wurde. Abschließend wurden bei 68 °C für 3 min überhängende Enden aufgefüllt. Die PCR Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt, Banden ausgeschnitten und für die Sequenzierung in den Vektor pCR-TOPO3.1 inkloniert.

2.20 Screening von high-density cDNA Filtern

Die cDNA Filter des Ressourcen-Zentrums/Primäre Datenbank wurden gemäß dem beiliegenden Protokoll behandelt. Die Filter wurden 30 min in einer Lösung aus 5 % SDS; 0,5 M Natriumphosphat pH 7,2; 1 mM EDTA; 0,1 mg/ml Hefe t-RNA (Roche); 1 % BSA prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde direkt in die Prähybridisierungslösung pipettiert und die Filter über Nacht bei 50 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden unspezifisch gebundene Sonde durch mehrmaliges stringentes Waschen mit 40 mM Natriumphosphat pH 7,2, 0,1 % SDS bei 58 °C entfernt und ein Röntgenfilm mit Verstärkerfolie 24-48 h exponiert.

2.21 DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von klonierter DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* 1977.

2.21.1 Sequenzierung mit [³⁵S]-dATP

Die radioaktive Sequenzierung erfolgte mit 5 μ g DNA pro Reaktion mit Hilfe des „T7-Sequencing“-Kit (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Die Fragmente wurden in 60 cm langen und 0,3 mm dicken 6 %igen Polyacrylamid-Gelen mit 8 M Harnstoff in 1 x TBE-Puffer bei 50 Watt aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Fixierlösung für 10 min inkubiert, auf 3MM Whatman Papier abgezogen und getrocknet. Die Autoradiografie erfolgte ohne Verstärkerfolie für 1 bis 4 Tage bei Raumtemperatur.

2.21.2 Sequenzierung mit IR-gekoppelten Primern

Die Sequenzierung mit IR-gekoppelten Primern erfolgte nicht-radioaktiv mit Hilfe des automatischen DNA-Sequenzierers Licor 4000 der Firma MWG (Ebersberg). Infrarotfarbstoffgekoppelte DNA-Fragmente wurden in einem 6 %igen Gel aus einer modifizierten Polyacrylamid-Gelmatrix (Ultra Pure Sequagel XR, National Diagnostics, Atlanta, U.S.A.) mit 7 M Harnstoff in 1 x TBE-Puffer aufgetrennt und über eine Laser-Photomultiplier-Einheit detektiert. Für die Sequenzreaktion wurde das „Thermostenase fluorescent labelled primer

cycle sequencing“ Kit mit 7-deaza-dGTP (Amersham, Braunschweig) eingesetzt. Für eine Reaktion wurden 5 µg DNA mit den entsprechenden Nukleotidmischen sowie 1,2 pmol 5'-IR-gekoppelten Primern versetzt und mit Mineralöl überschichtet. In einem PTC 100 Thermocycler (MJ Research, BIOZYM, Hess. Oldendorf) wurde die Plasmid-DNA 5 min bei 94 °C denaturiert und dann dem Sequenzierzyklus unterzogen, der sich aus 1-minütiger Strangsynthese bei 60 °C und anschließender Denaturierung für 30 sec. bei 94 °C zusammensetzte. Dieser Vorgang wurde 35mal wiederholt. Die IR-markierten DNA-Fragmente wurden in einem 40 cm langen und 0,4 mm dicken Gel aus bei 1500 V und 50 °C aufgetrennt. Zur Detektion und Auswertung des IR-Signals diente das Programm BaseImagIR, Version 2.20, von Licor (MWG, Ebersberg).

Für die Analyse von Sequenzdaten wurde das Programmpaket PC/Gene, Version 6.8 (IntelliGenetics, Mountain View, U.S.A.), sowie das Programmpaket GCG, Version 7.1, der Firma Genetics Computer Group Inc. (Madison, WI, U.S.A.) verwendet. Vergleiche mit bekannten Sequenzen wurden unter Anwendung des FASTA-Algorithmus (Lipman & Pearson 1985) an den EMBL- und SWISSPROT-Datenbanken durchgeführt. Die Identifizierung putativer regulatorischer Sequenzmotive im Promotorbereich erfolgte mit Hilfe der TRANSFAC Datenbank (Quandt *et al.* 1995).

Primer	Sequenz (5'-3')
T3-Promotor	AATTAACCCCTCACTAAAGGG
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
M13 revers	AACAGCTATGACCAT
M13	GTAAAAACGACGGCCAGT
Sp6-Promotor	ACCTTATGTATCATAACACAT
Universal	GTAAAAACGACGGCCAGT
SP6pSPORT	ARTTTAGGTGACACTATA
pRSET-B-3inv	AGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGT
pRSET rev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
pGEX5'seq	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX3'seq	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
GAL4AD5'	AGGGATGTTAATACCACTAC
GAL4AD3'	GCACAGTTGAAGTGAACCTTGC
BGHreverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
EGFP-N	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCA
EGFP-C	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG

2.22 *In vitro* Transkription

Für die Herstellung der für die *in situ* Hybridisierung benötigten Antisense RNA Sonden wurde vom Plasmid pM41 die murine cDNA *in vitro* transkribiert. Die zu transkribierende DNA ist dabei im Vektor von den Promotoren für T3 und T7 Polymerase flankiert (Dunn und Studier, 1983). In diesem Fall führte die Verwendung der T3 Polymerase zu einem „antisense“ Produkt des *imap* Gens, die Verwendung der T7 Polymerase zum „sense“ Produkt, welches als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Der Reaktionsmix enthielt 1 µg *EcoRI* linearisiertes Plasmid pM41; 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche #1175025); 2 µl „DIG RNA Labelling Mix“ (Roche # 1277073); 2µl T3/T7 Polymerase (Roche # 881767/1031163); 1 µl RNase Inhibitor (Roche # 799017); wurde mit DEPC behandelten Wasser auf 20 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch

Abkühlung und Zugabe von 2 µl EDTA 0,5 M gestoppt. Das Reaktionsprodukt wurde mit 2,5 µl 4 M Lithiumacetat und 75 µl Ethanol gefällt und bei 14000 g für 30 min abzentrifugiert. Das mit 70 %igen Ethanol gewaschene Pellet wurde in 30 µl DEPC Wasser mit 30 µl Formamid resuspendiert und die Produktmenge auf einem Agarosegel abgeschätzt.

2.23 *In vitro* Translation

Für die zellfreie *in vitro* Translation wurde das „TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System“ von Promega (Heidelberg) verwendet. Das mit *Mikrococcus*-Nuclease behandelte Retikulozyten-Lysat aus dem weißen Neuseeland-Kaninchen enthält alle notwendigen zellulären Komponenten für die Proteinsynthese (Pelham und Jackson, 1976; Jackson und Hunt, 1983). Es ermöglichte eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation ausgehend von 1 µg zirkularisierter oder mit HindIII bzw. *SalI* linearisierter *imap38*-Plasmid-DNA in einem einzigen Reaktionsgefäß. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 1 µg *imap38*-Plasmid-DNA in 16 µl DEPC-H₂O mit 25 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 2 µl TNT-Reaktionspuffer, 1 µl T3-Phagen-Polymerase (10 U/µl), 1 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin (1 mM) und 4 µl Translabel-Mix (85 % L-[³⁵S]-Methionin, 15 % L-[³⁵S]-Cystein; 10 µCi/µl, spez. Aktivität > 1000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim) auf Eis versetzt und für 90 min bei 30 °C inkubiert. Die Positivkontrolle enthielt 1 µg T3-Luziferase-Kontroll-DNA in 16 µl DEPC-H₂O, die Negativkontrolle nur 16 µl DEPC-H₂O. 1/10 des Proteinansatzes wurde mit 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, für 3 min gekocht und auf 4,5 %ige SDS-Sammelgele geladen. Als Proteinstandard diente der „Prestained SDS Molecular Weight“-Marker (Sigma, Deisenhofen). Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli 1970) in einem 10 %igen SDS-Trenngel der Größe 19 x 15 cm und einer Geldicke von 1,5 mm in 1x SDS-Laufpuffer für ca. 4 h bei 20 mA aufgetrennt. Das Gel wurde für 30 min in die Fixierlösung und für 1 h in die Färbelösung gelegt. Über Nacht wurde nichtgebundener Farbstoff mit der Fixierlösung aus dem Gel entfernt. Zur gesteigerten Detektion der eingebauten radioaktiv markierten ³⁵S-Aminosäuren wurde das Gel für 30 min in 1 M Natriumthiosulfat-Lösung (pH 7,0) oder in einer Fluorophor-Lösung (Amplify, Amersham, Braunschweig) geschwenkt, kurz in H₂O gewaschen und auf einem Gelrockner unter Vakuum für 4–6 h bei 60 °C getrocknet. Die Exposition erfolgte auf einseitig beschichteten ³⁵S-sensitiven Kodak BIOMAX MR Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei – 80 °C.

2.24 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung wurde durchgeführt nach einem abgewandelten Protokoll von Ron Colon (mt. Sianai, Toronto, persönliche Mitteilung) und dem „Nonradiative *in situ* hybridisation application Manual“ (Boehringer Mannheim) mit Zellkulturzellen und sortierten Milzzellfraktionen, die auf poly-L-Lysine beschichteten Deckgläsern angezogen bzw. adhärirt wurden. Mediumreste wurden mit PBS 37 °C gewaschen und die Zellen bei RT für 30 min in einer Lösung aus PBS, 4 % Formaldehyd, 5 % Essigsäure und 0,9 % NaCl fixiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 % EtOH) dehydriert und bei – 80 °C gelagert. Zu Beginn des Hybridisierungsprozesses wurden die Zellen mit der gleichen Alkoholreihe in umgekehrter Reihe schonend wieder hydriert und abschließend mit PBS gewaschen. Es folgte, ein 15 min dauernder Proteinase K Verdau (0,1 % Proteinase K in 0,1M KOH) bei 37 °C, ein Waschschritt mit PBS und eine Nachfixierung mit 1 % Formaldehyd sowie erneut ein PBS Waschschritt. Die DIG markierte Sonde (*in vitro* Transkript) wurde auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl mit Hybridisierungslösung (60 % Formamid, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 25 mM Natriumphosphat, 250 ng/µl Heringssperma DNA) eingestellt. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37 °C. Nach der Hybridisierung wurde zweimal mit auf 37 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung und zweimal mit Konverterlösung (50 % Formamid, 1x SSC 0,1 % Triton X-100) für je 30 min gewaschen. Abschließend wurde einmal mit einer 1:1 Mischung aus Konverterlösung und MABT (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100) bei 37 °C gewaschen und zweimal mit MABT bei Raumtemperatur für je 10 min gewaschen. Vor der nachfolgenden Antikörperdetektion er-

folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit dem Blockierungsreagenz für Nukleinsäuren (Roche # 1096176) in einer Konzentration von 1 % in MABT für 2 h bei Raumtemperatur. Der anti-DIG-AP Antikörper (Roche) wurde in Blockierungslösung 1:1000 verdünnt und für 2h bei RT inkubiert. Darauf folgten 5-6 Waschschrirte mit MABT für je 1 h und ein Waschschrirte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde zur Vorbereitung der Färbereaktion zweimal mit NTMT (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 0,5 % Tween-20 und 0,2 mg/ml Levamisol) gewaschen und mit Färbelösung (NBT/BCIP Stammlösung Roche # 1681451 1:50 in NTMT) vor Licht geschützt für mehrere Stunden bei RT inkubiert.

2.25 Reportergergen-Messungen

Die Stärke verschiedener Promotor-Konstrukte in transfizierten Zellen wurde durch Messung der Aktivität des SEAP-Reportergergens im Kulturüberstand ermittelt (Berger *et al.* 1988). In einem Chemilumineszenz-Assay (Phospha-Light, Tropix, Weiterstadt) wurden je nach Zelllinie 1–25 µl des Überstandes verwendet. Endogene alkalische Phosphatasen wurden durch Inkubation für 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert und außerdem durch L-Homoarginine im Reaktionsansatz inhibiert (Bronstein *et al.* 1994). Im verwendeten Assay setzt die alkalische Phosphatase das Substrat CSPD um, es entsteht ein metastabiles Zwischenprodukt, das sich spontan unter Lichtemission umlagert (Vant Erve *et al.* 1993). Der makromolekulare Enhancer Emerald dient in der Reaktion dazu, das metastabile Zwischenprodukt zu binden und dieses vom Wasser, welches die Lichtentwicklung quencht, abzuschirmen. Die Lichtentwicklung ist über einen Zeitraum von wenigstens 50 min konstant (Yang *et al.* 1997). Der SEAP-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Messung der Chemilumineszenz erfolgte in einem Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold, Bad Wildbad). Die Lichtausbeute wurde über 0,1, 0,5, 2 oder 15 s integriert und in relativen Licht-Einheiten (RLU) gemessen.

2.26 Zellkultur

2.26.1 Immortalisierte Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Nummer	Organismus	Gewebe/ Zelltyp	Bemerkungen	Medium
RAW 264.7	TIB-71	Maus (Balb/C)	Monozyt, Makrophage	Abelson leukemia Virus transformiert	IMDM
CHO-K1	CCL-61	Cricetulus griseus	Ovar, Epithelzelle		Ham 's F12-10
HepG2	HB-8065	Homo sapiens	Leberzellkarzi-nom		RPMI-1640
U937	CRL-1593.2	Homo sapiens	Makrophage	produziert TNF	RPMI-1640
HEK	CRL-1573	Homo sapiens	Niere Epithelzelle	Adenovirus 5 transformiert	RPMI-1640
Jurkat	TIB-152	Homo sapiens	T-Lymphozyt	produziert IL-2	RPMI-1640
THP1	TIB-202	Homo sapiens	Monozyt	Diff. durch Phorbolster	RPMI-1640

2.26.2 Kultivierung von Säugerzelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien CHO-K1, HepG2 und HeLa, bei denen es sich um adhärenzte Zellen handelt, erfolgte in 110 mm Gewebekulturschalen (Greiner, Solingen) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Es wurde für die Aufrechterhaltung der CHO-K1-Zellen Ham's F12 Medium, für die HepG2-Zellen RPMI-Medium und für die HeLa-Zellen DMEM-Medium verwendet. Die Medien enthielten 10 % FCS und wurden vor Ge-

brauch auf 37 °C erwärmt. Zellen, die für eine Transfektion ausgesät wurden, wurden in einem Medium kultiviert, das zusätzlich 50 U Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin enthielt. Zur Subkultivierung von CHO-K1-Zellen wurden diese für 1 h bei 4 °C gelagert und anschließend mechanisch mit einem Zellschaber von der Kulturschale gekratzt. Die Lebendzellzahl wurde von einem 100 µl Aliquot unter Zugabe von 1 Volumen Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die restlichen Zellen wurden für 15 min bei 1200 rpm und 4 °C in einer Beckmann CPKR Zentrifuge pelletiert und in frischem Medium aufgenommen. Auf eine 110 mm Kulturschale wurden 2 x 10⁶ Zellen, auf eine 35 mm Kulturschale 1,5 x 10⁵ Zellen ausgesät. Für die Subkultivierung von HepG2-Zellen wurden die Zellen mit 5 ml HBSS gewaschen und mit 2 ml einer Lösung aus Trypsin/EDTA (Sigma, Diesenhofen) in HBSS versetzt. Es folgte eine 15 minütige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurde die trypsinhaltige Lösung entfernt und die Zellen durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden 3 x mit Hilfe einer 10 ml Einwegspritze durch eine 0,90 x 40 mm Kanüle gezogen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Pelletierung der Zellen bei 4 °C und 1200 rpm für 15 min wurden sie in frischem Medium aufgenommen und ein 100 µl Aliquot wie oben dargestellt ausgezählt. Es wurden dieselben Zellzahlen wie für die CHO-K1-Zellen beschrieben ausgesät. Die Subkultivierung der HeLa-Zellen erfolgte wie die der HepG2-Zellen, mit dem Unterschied, dass die Behandlung mit der Kanüle nicht notwendig war.

2.26.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien

Zur Kryokonservierung wurden nur Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Sie wurden zunächst von der Gewebekulturschale gelöst (Kap. 2.23.2) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4 °C für 15 min pelletiert und der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 5 ml frischem Medium wurde die Lebendzellzahl bestimmt (Kap. 2.23.2). Die Zellsuspension wurde mit Medium auf 5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Es wurde ein Gefrierschutzmittel als Master-Mix, bestehend aus 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO hergestellt. Zu 1 ml der eingestellten Zellsuspension wurden 800 µl des Einfriermediums pipettiert. Es wurden Kryogefäße (Nunc, Wiesbaden) mit 1,8 ml des Gemisches aus Zellsuspension und Gefrierschutzmittel befüllt und in einem bei 4 °C vorgekühlten „Stratacooler“ (Stratagene, Heidelberg) bei -80 °C über Nacht gelagert. Nach 24 h wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff (-180 °C) überführt.

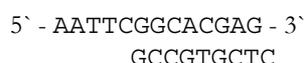
2.26.4 Transiente und stabile Transfektion von Säugerzellen

Die Zellen wurden am Vortag des Transfektionsexperimentes auf 35 mm Gewebekulturschalen mit einer Dichte von 1,5 x 10⁵ Zellen/Schale (CHO-K1-Zellen), bzw. 2 x 10⁵ Zellen/Schale (HepG2-Zellen) ausgesät (Kap. 2.23.2) und in 2 ml Kulturmedium gehalten. Für die transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen und HeLa-Zellen wurde das polykationische liposomale Transfektionsreagenz FUGENE (Boehringer, Mannheim) verwendet. Zunächst wurde das Kulturmedium gegen frisches Medium ersetzt. Ein Master-Mix (Lsg. A) aus DOSPER und PBS wurde für alle zu transfizierenden Schalen angesetzt. Dazu wurden für jede Platte 4 µl DOSPER-Transfektionsreagenz mit 46 µl PBS gemischt. Eine weitere Lösung (Lsg. B) aus je 1 µg der beiden zur Cotransfektion benutzten Plasmide, mit PBS auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht, wurde parallel angesetzt. Bei Mehrfachtransfektionen wurde Lsg. B ebenfalls als Master-Mix hergestellt. Je 50 µl von Lsg. A und Lsg. B wurden vorsichtig gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Tropfenweise wurden 100 µl des DNA/Liposomenkomplexes zu den Kulturen gegeben, wobei das kurz vorher ausgetauschte Kulturmedium nicht ersetzt wurde. Eine Vermischung erfolgte durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschale. Nach 6 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator wurde die Transfektionsmischung durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen und die Kulturüberstände wurden nach 4 Tagen gesammelt. Transfektionen von CHO-K1-Zellen wurden auch mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Boehringer, Mannheim) durchgeführt

2.27 Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen mit dem Two-Hybrid System

2.27.1 cDNA Synthese und Klonierung in den HybriZAP-Vektor

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des ZAP-cDNA-Synthese Kits der Firma Stratagene (Heidelberg). Für die Erststrangsynthese wurde ein oligo-(dT)-Primer eingesetzt, der eine *Xho*I-Schnittstelle enthält. Während der Erststrangsynthese bindet dieser Primer an die mRNA, welche dann mit Hilfe der MMLV-Reversen Transkriptase transkribiert wurde. Durch den Zusatz von methyl-dCTP wurde die DNA hemimethyliert, was sie vor der später folgenden Restriktion mit der Endonuclease *Xho*I schützt. Während der Zweitstrangsynthese schneidet die RNase H die an den Erststrang-cDNA gebundene RNA in mehrere Fragmente, die dann als Primer für die DNA-Polymerase dienen. Die Polymerase transkribiert dann den zweiten cDNA-Strang. Die überhängenden Enden der Doppelstrang-cDNA werden abgetrennt („Blunting“) und *Eco*RI-Adapter werden an die „blunt“-Enden angefügt. Die *Eco*RI-Adapter haben folgende Sequenz :



Für die Erststrangsynthese wurden 5 µg Poly-(A)+-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese (Erststrang-, Zweitstrangsynthese) sowie die darauffolgenden Modifikationen der cDNA (Blunting der cDNA-Enden, Ligation der *Eco*RI-Adapter, *Xho*I-Restriktion) erfolgten laut Protokoll des Herstellers. Nach Restriktion der cDNA mit *Xho*I wurden mit Hilfe von Sepharose CL-4B-Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg) Fragmente entfernt, die kleiner als 400 bp waren. Die Säule wurde mit 3 x 2 ml STE-Puffer äquilibriert und 2 min bei 400 x g abzentrifugiert, wodurch die Sepharose ein kompaktes Kissen im unteren Teil der Säule bildete. Die cDNA (Gesamtvolumen 50 µl) wurde nach Zugabe von 1 Volumen STE-Puffer auf das Sepharose-Kissen der Säule geladen. Die Säule wurde für 2 min bei 400 g zentrifugiert und das Eluat in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Das Eluat wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol bei -80 °C für 15 min gefällt. Die präzipitierte cDNA wurde für 1 Stunde bei 18 000 x g, 4 °C (Beckman JA 18.1) abzentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 10 µl TE-Puffer gelöst. Mit Hilfe eines Ethidiumbromid-Platten-Assays wurde die Konzentration der größenfraktionierten cDNA abgeschätzt. Auf eine 0,8 %ige TBE-Agarose-Platte mit 1 µg Ethidiumbromid /ml wurde eine DNA-Konzentrationsreihe (10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 ng) als Standard sowie 0,5 µl der cDNA-Probe aufgetragen. Unter UV-Licht wurde die Fluoreszenz-Intensität der cDNA-Probe mit dem bekannten Standard verglichen. Nach der Größenfraktionierung des cDNA-Gemisches erfolgte die Ligation der cDNA-Fragmente mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Boehringer) in den Hybri-ZAP-Vektor (Stratagene). Pro Ligationsansatz (Gesamtvolumen 5 µl) wurden 200 ng Vektor sowie jeweils 20, 50 und 75 ng cDNA eingesetzt. Die Ligationen erfolgten ÜN bei 12 °C bzw. für 2 Tage bei 8 °C. Anschließend wurden die Ansätze bei 4 °C aufbewahrt.

2.27.2 Verpackung der Phagen DNA und Titerbestimmung der Primärbibliothek

Die *in vitro* Verpackung der rekombinanten Hybri-ZAP-Vektoren in l-Phagen erfolgte mit Hilfe des Gigapack III Gold Verpackungsextraktes der Firma Stratagene (Heidelberg). Je 12,5 µl bzw. 25 µl eines Verpackungsansatzes wurden mit 2 bzw. 4 µl des jeweiligen Ligationsansatzes vermischt und für 1 h 45 min bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Verpackungsansatz 250 bzw. 500 µl SM-Puffer und 10 µl bzw. 20 µl Chloroform dazugegeben, kurz zentrifugiert und dieser bei 4 °C aufbewahrt.

2.27.3 *In vivo* Excision von pAD-GAL4 aus dem HybriZAP-Vektor und von Einzelklonen

Für die Titerbestimmung und die Amplifikation der Primärbibliothek sowie für die *in vivo* Excision wurden als Plattierungszellen *E. coli* XL1-Blue-MRF' verwendet. Zur Anzucht werden 20 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % Maltose mit einer Einzelkolonie eines frischen Ausstrichs (auf einer LB-Amp-Platte) angeimpft und ÜN bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C (Heraeus-Untertischzentrifuge) abzentrifugiert und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Für die Titerbestimmung und die Amplifikation der ausgeschnittenen pAD-GAL4 Bibliothek dienen *E. coli* XLORL als Wirtszellen. Sie werden analog zu den XL1-Blue-Zellen in LB-Medium (ohne Zusatz von MgSO₄ und Maltose) ÜN herangezogen, abzentrifugiert und in 10 mM MgSO₄ zu einer OD₆₀₀ = 1,0 resuspendiert.

Für die Titerbestimmung wurden verschiedene Verdünnungen der Phagensuspension in SM-Puffer angefertigt (1:5, 1:10, 1:30). Jeweils 1 µl von diesen Verdünnungen wurden mit 200 µl XL1-Blue-MRF'-Plattierungszellen (OD₆₀₀ = 0,5) vermischt, leicht schüttelnd für 15 min bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 3–4 ml NZY-Top-Agarose auf NZY-Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Titerbestimmung erfolgte durch das Auszählen der entstandenen Plaques. Nach Multiplikation der Anzahl der Plaques mit dem Verdünnungsfaktor und dem Gesamtvolumen der Primärbibliothek in µl erhielt man die Gesamtanzahl der Klone der Primärbibliothek.

Für die Amplifikation der Primärbibliothek wurden pro Ansatz ca. 5 x 10⁵ pfu aus der Bibliothek mit 600 µl Plattierungszellen vermischt und nach dem oben beschriebenen Verfahren auf quadratischen Platten (Kantenlänge 15 cm) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Danach wurden die Platten mit je 10 ml SM-Puffer überschichtet und für 5–6 Stunden bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Phagensuspension mit einer Pipette abgesaugt, in 50-ml-Gefäßen vereinigt und mit Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 5 % versetzt. Es erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei RT und Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm, 4 °C (Heraeus-Untertischzentrifuge) zur Entfernung der Zelltrümmer. Der Überstand wurde abgenommen, auf 0,3 % Chloroform eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Titerbestimmung der amplifizierten Primärbibliothek erfolgte wie oben angegeben durch das Ausplattieren entsprechender Verdünnungen auf NZY-Platten.

Der pAD-GAL4-Phagemid-Vektor, welcher die rekombinante cDNA enthielt, befand sich zwischen einer Initiations- und Terminationssequenz innerhalb des Hybri-ZAP-Vektors. Beide Sequenzen bildeten den Replikationsursprung des f 1-Phagen und wurden von Helfer-Phagen-Proteinen erkannt, die die dazwischen liegende DNA replizierten und zirkularisierten (otto et al. 1984). Dadurch war eine effektive *in vivo* Excision rekombinanter DNA möglich, die anschließend als Phagemid-Plasmid in l-Phagen verpackt werden konnte. Für die *in vivo* Excision wurde das ExAssist/XLORL System (Stratagene) verwendet.

Zur Feststellung des Anteils an rekombinanten Hybri-ZAP-Vektoren und der Größenverteilung der cDNA-Inserts wurden insgesamt 40 Plaques aus den Agarplatten der Titer-Bestimmung der Primärbibliothek ausgestochen, in 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform überführt und ÜN bei RT geschüttelt. Danach wurden je 200 µl der Phagensuspensionen (ca. 1 x 10⁵ pfu) mit 200 µl *E. coli* XL1-Blue-Zellen (OD₆₀₀ = 1,0) und 1 µl ExAssist-Helferphagen (4 x 10¹¹ pfu/µl) gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml LB-Medium wurden die Ansätze ÜN schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen und die l-Partikel für 20 min bei 70 °C lysiert und die Zelltrümmer für 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Je 1 µl der Überstände, welche die pAD-GAL4-Phagemide enthielten, wurden zu je 200 µl XLORL-Zellen (OD₆₀₀ = 1,0 in MgSO₄) dazugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. Die am nächsten Tag sichtbaren Ampicillin-resistente Kolonien enthielten pAD-GAL4-Phagemide.

Mit ausgesuchten Einzelkolonien von diesen Platten wurden 5 ml LB-Amp-ÜN-Kulturen angeimpft. Die anschließende Plasmidpräparation erfolgt gemäß 2.27.11. Die Inserts der pAD-GAL4-Phagemide wurden durch Doppelverdau mit den Restriktionsendonucleasen

EcoRI und XhoI herausgeschnitten und zur Größenbestimmung über ein 1 %iges TBE-Agarsegel aufgetrennt. Diejenigen Klone, bei denen nach dem Restriktionsverdau kein cDNA-Insert freigesetzt wurde, sind als nicht-rekombinant anzusehen.

2.27.4 Massen *in vivo* Excision

Für die Massen *in vivo* Excision der amplifizierten HybriZAP-cDNA-Bibliothek wurden $1,4-4 \times 10^9$ pfu rekombinante Phagen mit $1-2 \times 10^{10}$ *E. coli* XL-1 Blue-Zellen (bei einer $OD_{600} = 5$ in 10 mM $MgSO_4$ entspricht das ca. 5 ml) und $1-2 \times 10^{11}$ Ex-Assist-Helferphagen gemischt, für 15 min bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 15 ml LB-Medium für weitere 3 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Der Überstand mit den pAD-GAL4-Phagemiden wurde bei 4 °C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Effektivität der *in vivo* Excision wurden verschiedene Verdünnungen der pAD-GAL4-Bibliothek in TE-Puffer angelegt. Je 1 µl davon wurden mit 200 µl XLORL-Zellen gemischt ($OD_{600} = 1.0$, in 10 mM $MgSO_4$) gemischt, nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und UN bei 37 °C inkubiert. Durch das Auszählen der Kolonien wurden die cfu pro ml bestimmt. Die Gesamtzahl der cfu sollte im Bereich der eingesetzten Phagenmenge liegen

2.27.5 Amplifikation der pAD-GAL4 Bibliothek

Die Amplifikation der pAD-GAL4-Bibliothek war notwendig, um eine repräsentative Anzahl an Klonen für die spätere Transformation in die Hefezellen im Rahmen des „Two Hybrid Systems“ bereitzustellen. Für diesen Zweck wurden 8×10^9 pfu der Bibliothek (mind. 10fache Menge der Klone der Primärbibliothek) mit der 10 fachen Menge an XLORL-Zellen gemischt ($OD_{600} = 1$ entspricht etwa 8×10^8 Zellen/ml) und leicht schüttelnd für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 ml LB-Amp-Medium wurde die Kultur bis zum Erreichen einer OD_{600} von ca. 0,4 bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde sie für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C (Beckman JA-10) abzentrifugiert. Die Präparation der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid-Midi-Kits (Qiagen, Hilden) bzw. nach der Methode von Birnboim und Doyle Sambrook *et al.* 1989.

2.27.6 „Two-Hybrid“-Vektoren

Der HybriZAP 2.1 Lambda-Vektor (Stratagene)

kann cDNA bis 6 kb aufnehmen. Durch Massen *in vivo* Excision wird die HybriZAP-2.1 Lambda-Bibliothek in eine pAD-GAL4 Phagemid-Bibliothek umgewandelt. Der HybriZAP 2.1-Vektor enthält nämlich im rechten Arm die Lambda-Gene A bis J und *att*, *int*, *xis* und *cl* 857 im rechten Arm. Der f1 Initiator (I) und Terminator (T) erlauben eine effiziente *in vivo* Excision des pAD-GAL4 Phagemid-Vektors. Der HybriZAP-2.1 Lambda-Vektor und der pAD-GAL4 Phagemid-Vektor beinhalten eine MCS mit mehreren Schnittstellen. Die EcoRI- und XhoI-Schnittstellen ermöglichen eine gerichtete Klonierung der mit Hilfe des „cDNA Synthesis Kit“ von Stratagene konstruierten cDNA-Bibliothek.

pBD-GAL4 und pAD-GAL4 Phagemid-Vektoren

Beide Vektoren beinhalten den ColE1 Replikationsursprung und den f1 Transkriptionsstart von Einzelstrang-DNA (ssDNA) für *E. coli* und den 2µ-Replikationsursprung für Hefe. Für Selektion in *E. coli* enthält der pBD-GAL4-Vektor das Camr-Gen. Für die Selektion in Hefe steht das trp1-Gen zur Verfügung. Der pAD-GAL4-Vektor enthält das β-Lactamase-Gen (*bla*) für Ampicillin-Resistenz (*Ampr*) für Selektion in *E. coli* und das leu2-Gen für Selektion in Hefe. Die Hybridproteine beider Plasmide werden in Hefe vom Alkoholdehydrogenase 1-Promotor (pADH1) aus exprimiert; die Termination erfolgt am ADH1-Terminator (tADH1).

Hefe „Two-Hybrid“ Kontrollplasmide

Das HybriZAP-2.1-„Two Hybrid“ Vektor-System enthält 4 Kontrollplasmide (siehe Tabelle 2.2). Das pGAL4-Kontrollplasmid exprimiert die vollständige Sequenz des GAL4 Proteins Fields und Song, 1989. Das p53 Kontrollplasmid exprimiert die Bindedomäne BD des

GAL4 zusammen mit den Aminosäuren 72-390 des Maus-p53 als Hybridprotein. Das pSV40 Kontrollplasmid exprimiert ein Hybridprotein bestehend aus der Aktivierungsdomäne AD des GAL4 und den AS 84-708 des SV40 T-Antigens (Li und Fields, 1993; Chien *et al.* 1991). Das pLamin C Kontrollplasmid exprimiert als Hybridprotein die Bindedomäne des GAL4 zusammen mit den AS 67-330 des humanen Lamin C (Bartel *et al.* 1993). Eine kurze Charakterisierung der Kontrollplasmide listet die Tabelle 2.2 auf. Die Plasmide wurden einzeln bzw. in paarweiser Kombination als positiv- bzw. Negativ-Kontrollen für die Induktion der Reportergene eingesetzt. Induktion der Gene *ade2* und *his3* ermöglicht den transformierten Hefezellen ein Wachstum auf SD-Platten ohne Adenin bzw. Histidin. Die Induktion des *lacZ*-Gens wurde anhand eines β -Galactosidase-Assays (colorimetrischer Nachweis) oder eines LacZ-Overlay-Assays nachgewiesen. Das pGAL4-Plasmid diente als Kontrolle, ob die Induktion der Reportergene unter den „Two Hybrid“-Bedingungen stattgefunden hatte, und ob diese in dem System detektierbar sind. Die Plasmide p53 und pSV40, deren exprimierte Proteine *in vivo* miteinander wechselwirken, wurden als Positivkontrolle für die Induktion der Reportergene eingesetzt. Die Plasmide pLamin C und pSV40 dienten als Negativkontrolle. Die erwarteten Ergebnisse bezüglich der Interaktion der Kontrollplasmide in den transformierten Hefezellen sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Kontrollplasmid	Insert-Beschreibung	Vektor	Selektionsmarker
pGAL4	Wildtyp GAL4 (Gesamtsequenz)	pRS415	LEU2, Ampr
p53	Maus-p53 (AS 72-390)	pBD-GAL4	TRP1, Ampr
pSV40	SV40 großes T-Antigen (AS 84-708)	pAD-GAL4	LEU2, Ampr
pLaminC	humanes Lamin C (AS 67-230)	pBD-GAL4	TRP1, Ampr

Tabelle 3 Plasmide des „Two-Hybrid“-Systems

Kontroll-plasmide	Erwartete Ergebnisse – Wachstum auf SD-Platten ohne				
	-Leu	-Trp	-Leu, -Trp	-Leu, -Trp, -His	-Leu, -Trp, -Ade
pGAL4	Wachstum, β -Gal-Aktivität	Wachstum, β -Gal-Aktivität	Wachstum, β -Gal-Aktivität	Wachstum, β -Gal-Aktivität	Wachstum, β -Gal-Aktivität
p53-BD		Wachstum, keine β -Gal-Aktivität			
pSV40-AD	Wachstum, keine β -Gal-Aktivität				
pLamin C-BD		Wachstum, keine β -Gal-Aktivität			
p53-BD + pSV40-AD			Wachstum, β -Gal-Aktivität	Wachstum, β -Gal-Aktivität	Wachstum, β -Gal-Aktivität
pLamin C-BD + pSV40-AD			Wachstum, keine β -Gal-Aktivität	Wachstum, keine β -Gal-Aktivität	Wachstum, keine β -Gal-Aktivität

Tabelle 4 Erwartete Ergebnisse einer Wechselwirkung im „Two-hybrid“-System

2.27.7 „Two-hybrid“-Hefestämme

Hefe-Stamm PJ69-4A

Der Hefestamm enthält drei Reportergene für die Detektion von Protein-Protein Wechselwirkungen im Rahmen des „Two-Hybrid“ Systems. Er wurde von dem Hefestamm DGY63::171 abgeleitet und ermöglicht die Identifizierung selbst extrem schwacher Protein-Protein Wechselwirkungen (James, 1992). Der Einsatz von drei Reportergenen, von denen jeder unter der Kontrolle eines anderen Promotors steht, ermöglichte es, die meisten falsch-

positiven Hefekolonien zu eliminieren. Die drei Reportergene sind in das Hefegenom integriert. Das *his3*-Gen – vom GAL1-Promotor reguliert – wurde strangabwärts des *lys2*-Gens integriert. Das Wildtyp-*ade2*-Gen wird vom GAL2-Promotor kontrolliert. *Ade2* Mutanten bilden rote, Wildtypzellen weiße Kolonien. Je nach Expressionslevel des *ade2*-Gens weisen die Hefekolonien verschieden starke Rotfärbung auf, so dass diese ein quantitativer Hinweis auf die Stärke der Protein-Protein Wechselwirkung ist. Das dritte Reportergen *lacZ*, unter der Kontrolle des Gal7 Promotors, wurde in die codierende Region des MET2-Gens inseriert. Alle drei Reportergen-Promotoren GAL1, GAL2 und GAL7 werden durch GAL4 induziert, können auch eine starke Genexpression einleiten und besitzen nur ein Minimum an Sequenz-Identität, was unspezifische Wechselwirkungen reduziert.

2.27.8 Transformation von Köder-Plasmiden in Hefe

Es wurden Köder (Bait)-Plasmide mit jeweils zwei verschiedenen Imap38-1-Fragmenten als Insert transformiert. Das erste „Bait“-Plasmid, als pC-TermBD bezeichnet, enthielt das 651 bp große cytoplasmatische C-terminale Ende des HC-Rezeptors als Insert. Das Insert des zweiten „Bait“-Plasmids, als pLoopBD bezeichnet, bestand aus der 3. cytoplasmatischen Schleife des HC-Rezeptors und war 103 bp groß. Beide Plasmidarten wurden getrennt in jeweils zwei Hefestämme transformiert, in den Stamm PJ 69-4A und in den Stamm Y187.

Da in diesem Fall bereits wenige Transformanten ausreichend waren, wurde die Originalmethode nach Gietz und Woods 1984 angewendet, die laut Angaben der Autoren eine Transformationsrate von durchschnittlich ein paar hundert bis ein paar tausend Transformanten liefert. Bei dieser Methode wurden die Hefezellen mit Hilfe von Lithiumacetat kompetent gemacht. Eine große (2-4 mm) Hefekolonie wurde von einer frischen Platte (bis zu 1 Woche alt) abgekratzt und in 1 ml H₂O resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 sec pelletiert, in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und für 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 sec abzentrifugiert. Auf das Zellpellet wurden folgende Komponenten der Reihe nach pipettiert: 240 µl 50 % PEG, 36 µl 1 M LiAc, 25 µl einzelsträngiger Heringsperma DNA (2,0 mg/ml, Roche), 5 µl Plasmid-DNA (100 ng bis 5 µg) und 45 µl destilliertes H₂O. Die Mischung wurde für mindestens 1 min geschüttelt, bis das Zellpellet völlig resuspendiert war. Die Suspension wurde anschließend für 20 min bei 45 °C inkubiert. Die transformierten Hefezellen wurden danach für 10 sec bei 14 000 rpm abzentrifugiert und auf SD-Platten ohne Tryptophan ausgestrichen. Nach 2 bis 4 Tagen waren die ersten „Bait“-Plasmid-haltigen Kolonien zu sehen.

2.27.9 Transformation von „Target“-Plasmiden (pAD-GAL4-Bank) in Hefe

Es wurden 5 ml YPAD-Medium mit einer frischen Hefekolonie angeimpft und ÜN bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte der Kultur durch Auszählen der Zellzahl in der Neubauer-Kammer (Haemocytometer) bestimmt. Danach wurden 50 ml vorgewärmtes YPAD-Medium mit dem entsprechenden Volumen der ÜN-Kultur angeimpft, so dass die Zelldichte der frischen Kultur 5×10^6 Zellen/ml betrug. Die Kultur wurde dann so lange bei 30 °C geschüttelt, bis sie eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml erreichte, d.h. nachdem jede Hefezelle mindestens zwei Zellteilungen durchlaufen hatte. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 ml-Gefäß für 5 min bei 5000 rpm (Heraeus-Untertischzentrifuge) abzentrifugiert, in 25 ml sterilem H₂O gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Die Hefesuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 15 sec bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zu einem Endvolumen von 500 µl in 100 mM LiAc resuspendiert (entspricht ca. 2×10^9 Zellen/ml).

Die Zellen wurden erneut kurz abzentrifugiert und das LiAc wurde abgenommen. Auf das Zellpellet wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettiert: 240 µl 50 % PEG, 36 µl 1 M LiAc, 50 µl einzelsträngiger Heringsperma-DNA (2,0 mg/ml, Roche), 1 µg bis 10 µg Plasmid-DNA ad 260 µl destilliertes H₂O. Die Mischung wurde für mindestens 1 min bis zum Auflösen des Zellpellets geschüttelt und anschließend für 30 min bei 30 °C und für weitere 30 min bei 45 °C (Hitzeschock) inkubiert. Die Zellen wurden an-

schließend für 15 sec bei 6000 rpm abzentrifugiert. Die Transformationsmischung wurde abgenommen, das Zellpellet vorsichtig in 200 µl sterilen H₂O resuspendiert und auf eine SD-Platte ohne Leucin ausgestrichen. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden zusätzlich mehrere 10 µl-Aliquots der resuspendierten Zellen mit jeweils 90 µl destilliertem H₂O vermischt, auf einzelne SD-Platten ohne Leucin ausgestrichen und nach paar Tagen die sichtbaren Kolonien ausgezählt.

2.27.10 Transformation von Plasmiden nach der modifizierten Methode von Gietz

Eine frische Hefekolonie wurde in 5 ml YPAD-Medium ÜN angezogen. Am folgenden Tag wurde mit 1 ml dieser Vorkultur 1l YPAD-Medium angeimpft und ÜN inkubiert. Die Hefezellen wurden anschließend in 500-ml-Gefäßen für 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Beckmann JA-10). Die Pellets wurden in insgesamt 5 ml LiCl/TE resuspendiert und die beiden Becher mit je 5 ml LiCl/TE nachgewaschen und die Suspensionen vereinigt. Die Suspension wurde für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend im selben Volumen LiCl/TE resuspendiert und für 30 min bei 28 °C inkubiert. Zu der Hefesuspension wurden folgende Komponenten dazugegeben : 200 µl einzelsträngige Heringsperma-DNA (10mg/ml), 10 µg Plasmid-DNA und 1/10 Volumen 96 % Ethanol. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. Nach Zugabe vom 6fachen Volumen einer 40 %PEG/LiCl/TE-Lösung folgten eine Inkubation für 30 min bei 28 °C und ein Hitzeshock für 15 min bei 45 °C. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 4-6 ml Glucose/TE-Lösung resuspendiert und auf SD-Platten ohne Leucin ausplattiert (ca. 400 µl/ Platte). Nach 3-4 Tagen Inkubation wurden die Hefekolonien von den Platten unter Zugabe von ca. 10 ml PBS-Medium/Platte mit einem Drygalski-Spatel vorsichtig abgekratzt und die Suspensionen vereinigt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 50 % Glycerin-50 %YPAD-Medium resuspendiert und in 2 ml-Aliquots bei – 80 °C aufbewahrt.

2.27.11 Plasmidisolation aus Hefe

Plasmidisolation nach Hoffman und Winston 1987

Eine Ade⁺- bzw. His⁺-Hefekolonie wurde in 2 ml des entsprechenden SD-Selektionsmediums bei 30 °C bis zur Sättigung (ca. 2 Tage) angezogen. Danach wurde die Hefekultur in einem Eppendorfgeläß für 10 sec bei 14 000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Hefe Lysis-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 mg Glasperlen (0,5 mm) wurde die Suspension auf höchster Stufe auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 1/10 Vol 3 M NaAc und 2,5 Vol EtOH bei – 20 °C gefällt. Die gefällten Plasmide wurden abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 14 000 rpm; Heareus Biofuge 15R), mit 80 % EtOH gewaschen, getrocknet (Savant Speed-Vac Konzentrator SVC 100H) und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Plasmidisolation aus Hefe

Eine positive Hefe-Einzelkolonie wurde in 5 ml des entsprechenden SD-Selektionsmediums bei 30 °C bis zur Sättigung (ca. 2 Tage) angezogen. Die Zellen wurden aus 1,5-3 ml der Kultur durch Zentrifugation abgeerntet und das Zellpellet wurde in 100 µl STET-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde nach Zugabe von 200 mg Glasperlen (0,5 mm) mindestens für 5 min stark geschüttelt und nach Zugabe von 100 µl STET-Puffer und erneutem kurzen Schütteln für 3 min bei 95 °C gekocht. Danach wurde die Suspension sofort auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 14 000 rpm, 4 °C abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden danach abgenommen, mit 50 µl 7,5 M Ammonium-Acetat versetzt und 1 h bei –20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 14 000 rpm, 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und mit 200 µl eiskaltem Ethanol gefällt. Die präzipitierten Plasmide wurden für 15 min bei 14 000 rpm, 4 °C pelletiert, getrocknet und in 10-20 µl H₂O resuspendiert.

2.27.12 „Screening“ der C57BL/10-immun-cDNA-Bibliothek

Überprüfung der Expression der Reportergene *ade2* und *his3*

Die Transformationsansätze wurden auf großen, quadratischen Ade- Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation von maximal einer Woche wurden die auf den Platten wachsenden Kolonien (1-2 mm Durchmesser) in je 5 ml SD-Medium/-Trp,-Leu überführt und bis zur Sättigung bei 30 °C vermehrt. Kolonien, die erst nach einer Inkubationszeit von mehr als 7 Tagen sichtbar wurden, erfuhren keine Berücksichtigung, da deren langsames Wachstum auf geringe, unspezifische Wechselwirkung zwischen „Bait“- und „Target“-Proteinen zurückzuführen war. Die hochgezogenen Flüssigkulturen wurden erneut auf His- und zusätzlich auf Ade- Platten ausgestrichen. Wurden im Screening pro Platte sehr viele Kolonien detektiert, wurden diese direkt auf neue His- und Ade- Platten mit einem samtüberzogenen Stempel übertragen. Diejenigen Hefeklone, bei denen auch nach mehrtätiger Inkubation (2-4 Tage) auf beiden Kontrollplatten ausreichend große Kolonien zu beobachten waren, wurden auf die Expression des dritten Reportergens *lacZ* hin überprüft.

Überprüfung der Expression des Reportergens *lacZ* :

Die Expression des *lacZ*-Reportergens in den Hefezellen wurde durch Messung der β -Galactosidase-Aktivität mit Hilfe des „Yeast β -Galactosidase Assay Kits“ von Pierce nachgewiesen. Als Substrat für das Enzym diente Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), welches zu Ortho-Nitrophenol (ONP) und Galactose hydrolysiert wird, wobei die Reaktionslösung sich gelb verfärbt. Für die Aktivitätsbestimmung der β -Galactosidase der einzelnen positiven Hefeklone wurde für jeden Klon eine Hefekultur ÜN bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 angezogen. Als Positivkontrolle diente der Hefestamm PJ 69-4A mit den Kontroll-Plasmiden pSV40 und p53, als Negativkontrolle der Hefestamm PJ 69-4A mit den Plasmiden pSV40 und pLaminC. Die genauen OD600-Werte der einzelnen Hefeproben wurden gemessen. Von den einzelnen Kulturen wurden pro Klon je 12 Parallelansätze mit je 70 μ l bzw. Einzelansätze mit je 350 μ l Hefekultur vorbereitet. Der 2x Assay-Puffer wurde mit dem gleichen Volumen der YPER-Lösung verdünnt. Davon wurden je 70 μ l bzw. 350 μ l zu 70 μ l bzw. 350 μ l Hefesuspension dazugegeben. Als Referenzprobe diente eine Reaktion mit 70 μ l bzw. 350 μ l Kulturmedium ohne Hefezellen. Die Reaktionen wurden für ca. 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 56 μ l bzw. 300 μ l 1 M Na₂CO₃ abgestoppt, wobei die genaue Inkubationszeit notiert wurde. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Absorption der Lösungen bei 420 nm mit einem ELISA-Messgerät gemessen. Als Nullpunkt diente dabei die Absorption der Referenzprobe. Die Mittelwerte der Absorptionen der 12 Ansätze pro Klon wurden ermittelt.

2.27.13 Overlay Assay

Für den „Overlay-Assay“ nach Ausubel 1998 und Duttweiler 1996 wurden 0,1g Agarose in 10 ml H₂O und 10 ml Phosphat-Puffer (1 M NaH₂PO₄/NaOH, pH 7.0) in der Mikrowelle erhitzt, zusammengemischt und im 50 °C Wasserbad aufgehoben. Nach Zugabe von 20 μ l 10 % SDS und 400 μ l 0,5 % X-Gal in DMF (5 mg/ml) wurde die Lösung für das Überschichten der Platten mit den zu untersuchenden Hefekolonien benutzt (ca. 10 ml pro Platte). Die Platten wurden bei 30 °C so lange inkubiert, (meistens über Nacht) bis sich eine genügend starke Färbung der Positiv-Kontrolle zeigte.

2.27.14 Charakterisierung positiver Screening Ergebnisse

Die aus Hefen isolierte Plasmid-DNA (Kapitel) stellt in Gemisch von Target-Plasmiden der cDNA-Bank und „Bait“-Plasmiden dar. Beide Plasmidarten können durch Transformation in E.coli-Zellen aufgrund der unterschiedlichen Selektionsmarker getrennt werden. Bakterienzellen, die das „Target“-Plasmid enthalten, wurden aufgrund ihrer Ampicillin-Resistenz auf LB-Amp-Platten selektiert. Anschließend wurden die „Target“-Plasmide wie in Kapitel beschrieben isoliert. Im Anschluss daran wurden die Inserts der „Target“-Plasmide zur Charakterisierung ihrer Größe durch Restriktion mit *Eco*RI und *Xho*I herausgeschnitten und über ein 1,2 % TBE-Agarose-Gel aufgetrennt. Falls mehrere „Target“-Plasmide in einer Hefezelle vorhanden waren, wurde überprüft, welches der Inserts für das mit dem HC110-R

wechselwirkende Protein kodiert. Dafür wurden nun die einzelnen isolierten pAD-GAL4-Plasmide getrennt in entsprechende „Bait“-Plasmid-tragende Hefezellen transformiert (Kapitel 2.9.3) und die Transformanten auf die Expression der drei Reportergene überprüft.

Um unspezifische Wechselwirkungen bei den detektierten positiven Klonen ganz auszuschließen, wurden noch zusätzliche Kontrolltests durchgeführt :

Transformation des entsprechenden „Target“-Plasmids in Hefezellen ohne „Bait“-Plasmid, um eine eventuelle alleinige Aktivierung der Expression beider Reportergene durch das „Target“-Protein auszuschließen.

Co-Transformation des entsprechenden „Target“-Plasmids mit p53 bzw. Lamin C, um eventuelle unspezifische Wechselwirkungen des „Target“-Proteins mit nicht-HC110R-„Bait“-Proteinen auszuschließen.

Co-Transformation des entsprechenden „Target“-Plasmids mit pBD-GAL4 ohne Insert, um eventuelle Wechselwirkungen des „Target“-Proteins mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Proteins auszuschließen.

2.27.15 Proteinextrakte aus Milzgewebe/-zellen

Proteinextrakte aus Milzgewebe/-zellen wurden durch Aufnahme und Zerkleinerung des Organs bzw. des Zellpellets in Lysepuffer mit dem Ultraturax (Janke & Kunkel) gewonnen. Nach der Zerkleinerung wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 14.000 g abgetrennt und der lösliche Überstand mit 4x SDS-Ladungspuffer (Roti-Load, Roth) versetzt. Der Hitzedenaturierung (100 °C für 5 min) folgte eine Zerkleinerung der genomischen DNA mittels Ultraschallstab. Die so behandelten Proben wurden kurzfristig bei –20 °C und längerfristig bei –80 °C gelagert.

2.27.16 Proteinextrakte aus *E. coli*

Proteine aus Bakterien wurden gewonnen, in dem das mit Leitungswasser gewaschene Pellet (Kultur entsprechend 1 OD₆₀₀ abgenommen) in 1x SDS-Ladungspuffer resuspendiert und bei 100 °C für 5 min hitzedenaturiert wurde. Die freiwerdende genomische DNA wurde ebenfalls mit dem Ultraschallsstab zerkleinert.

2.27.17 Proteinextrakte aus *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus einer Hefekultur wurden 5 ml YPAD medium mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und bis zur Sättigung bei 30 °C inkubiert. jeweils 2 ml einer solchen Hefekultur wurden für 2 min bei 1500 g abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen, in 250 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert, in ein kleines Reagenzglas überführt, mit Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) bis knapp unter den Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt und für 5 min auf höchster Stufe im Vibrax (Janke & Kunkel) geschüttelt. Gemäß der nachfolgenden Bearbeitung wurde die Proteinsuspension abgenommen (Enzymtests) oder mit 250 µl 2x Lämmli-Puffer aufgefüllt und anschließend abgenommen (Gelelektrophorese). Zelltrümmer wurden für 5 min bei 10000 g abzentrifugiert. Jeweils 20 µl der so aufbereiteten Proben wurden auf ein Proteingel aufgetragen.

2.27.18 Proteinextrakte aus Zellkulturzellen

Adhärente Säugerzellen wurden zuvor entweder mechanisch durch Ablösen der Zellen mit einer Glaspipette (z. B. HEK-293) oder nach Kälteeinwirkung (1 h, 4 °C) mit einem Zellschaber (z. B. CHO-K1, COS-7, HeLa) gelöst oder aber mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abtrypsiniert (z. B. HepG2). Die Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, für 10 s bei 13000 rpm und RT pelletiert, 2x mit PBS- gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme von $5 \cdot 10^5$ x 10^6 Zellen in 1 ml M-PER (Pierce) mit Protease Inhibitortablette (Complete-Mini, Roche) wurden diese durch kräftiges Vortexen resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgten die Zugabe von SDS-Ladungspuffer, eine Hitzedenaturie-

zung und die Zerkleinerung der genomischen DNA mit dem Ultraschallstab (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.). Alternativ hierzu wurde das Zellpellet auch in 1 ml PBS- oder 8 M Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) mit SDS-Ladungspuffer resuspendiert und einer kurzen Ultraschallbehandlung unterzogen werden. Der Proteingehalt wurde nach Bradford 1976 oder Lowry *et al.* 1951 bestimmt.

2.27.19 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen nach Bradford 1976 wurde mit Hilfe des BIORAD-Protein-Assay (BIORAD, München) bestimmt, sofern der die Proteine enthaltende Puffer relativ frei von Detergentien wie SDS, Triton und Nonidet P-40 war (< 0,1 %), die die Bildung des Farbkomplexes beeinflussen. Der zu bestimmende Proteinextrakt wurde mit H₂O auf 800 µl gebracht und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Extinktion des Farbstoff-Proteinkomplexes wurde nach 10 min bei 595 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 gemessen und die Proteinkonzentration durch den Vergleich mit einer BSA-Standardgeraden bestimmt. Bei Verwendung von SDS-, Triton- oder Nonidet P-40-haltigen Puffern wurde die Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* 1951 mit dem BIO-RAD DC Protein Assay (BIORAD, München) durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 200 µl der zu bestimmenden Proteinprobe, 100 µl Lösung A' (= 1 ml Lösung A + 20 µl Lösung S) und 800 µl Lösung B zusammen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen.

2.27.20 Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli 1970. Aus einer 30 %igen Polyacrylamid-Stocklösung wurde das Sammelgel mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 4,5 % und das Trenngel je nach Größe der aufzutrennenden Proteine mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 8–20 % angesetzt. Die Polymerisation der Gellösung erfolgte mit 10 µl APS (10 %) und 1 µl TEMED pro ml Gellösung. Die Auftrennung von Proteinen in Gelen mit einer Größe von 19 x 15 cm und einer Geldicke von 1 mm erfolgte in der von Reid und Bielecki 1968 beschriebenen vertikalen Elektrophorese-Apparatur in 1x Laufpuffer für ca. 4 h bei einer Stromstärke von 20 mA. Diese wurde auf 30 mA erhöht, sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Außerdem wurde die „Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell“-Apparatur (BIORAD, München) mit einer Gelgröße von 8 x 10 cm und einer Geldicke von 1 mm eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte auch hier in 1x Laufpuffer für ca. 1–2 h bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA. Die Proteine wurden hierzu mit 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, 3 min bei 95 °C denaturiert und auf das Sammelgel geladen. Als Proteinstandard diente der „Prestained SDS Molecular Weight“-Marker (Sigma, Deisenhofen).

2.27.21 Anfärbung von Proteinen nach SDS Gelelektrophorese

Die Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) bzw. Roti-Blue (Roth, Karlsruhe), einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung. Die Empfindlichkeit der Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue liegt bei 0,3–1 µg Protein pro Bande. Hierzu wurde das Gel nach dem Lauf für 2 h bzw. über Nacht vorsichtig in der Färbelösung geschüttelt und danach solange in der Fixierlösung entfärbt, bis alle nichtgebundenen Farbstoffkomplexe entfernt worden waren. Eingespannt zwischen zwei Lagen Zellophanpapier ließ sich das Gel vollständig trocknen und verwahren.

2.27.22 Hochauflösende 2D Gelelektrophorese (Isoelektrische Fokussierung)

Zur Auftrennung von Proteingemischen aufgrund von Ladungsunterschieden wurden die Proteine in Harnstoffpuffer aufgenommen. Pro Analyse wurden $1,5 \times 10^7$ markierte Milzzellen in 200 µl oder 3×10^7 nicht markierte Milzzellen in 200 µl Harnstoffpuffer resuspendiert. Die Proben wurden 2 h bei RT gerüttelt, die genomische DNA mit dem Ultraschallstab ge-

schert und unlösliche Bestandteile durch 20 min Zentrifugation bei 12000 g abgetrennt. Der gelöste Überstand wurde mit etwas Bromphenolblau gefärbt und in die Quellkammer eingebracht. Die 13 cm langen dehydrierten Gelstreifen wurden nach Entfernen der Schutzfolie vorsichtig mit der Gelseite auf das Proteingemisch aufgelegt und die Hydrierung erfolgte für mindestens 4 h bzw. Übernacht. Die Gelstreifen nahmen die Flüssigkeit und somit die Proteine vollständig auf und erreichten eine Dicke von ca. 1 mm. Die Gelstreifen wurden in der Elektrophoresekammer in einem Plastiktablett ausgerichtet. An den Enden wurden mit dest. Wasser angefeuchtete Filterpapierstreifen als Strombrücken aufgelegt, anschließend die Elektroden fixiert und die Kammer mit Silikonöl geflutet. Der Auftrennungsprozess startet mit einer Vorfokussierung von einer Stunde bei 300 V. Danach erfolgt die Fokussierung über Nacht bei 2000 V bis zum Erreichen von mindestens 24000 Vh. Nach der Fokussierung erfolgte entweder direkt die Auftrennung in der 2. Dimension (SDS-PAGE) oder die Lagerung der Gelstreifen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.27.23 Nichtgleichgewichtsgelelektrophorese

Da die hochauflösende 2D Gelelektrophorese nur Proteine mit einem pI von maximal 8-9 auftrennen kann wurde, um auch basische Proteine zu erfassen, die Nichtgleichgewichtsgелеlektrophorese NEPHGE durchgeführt. Vorbehandlung und Puffer sind mit der IEF identisch. Die Apparatur besteht aus einer Vertikalkammer, wobei ein ca 12 cm langes Glasrohr, mit der Gelmatrix enthält, die beiden Puffertanks verbindet. Die Anodenlösung bildet 0,2 %ige Schwefelsäure, die Kathodenlösung 0,02 M NaOH. Die Proteine werden am sauren Ende des Gels aufgetragen und in Richtung Kathode nach ihrer Ladung bei 400 V aufgetrennt (Klose 1975). Die Elektrophorese wurde nach 4–5 beendet, wobei ein mit Cytochrom C beladenes Rundgel (pI 11, 3) als Laufmarker diente. Das Rundgel wurde entweder sofort in der SDS-PAGE weiterbehandelt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.27.24 Anfärbung von Proteinen im Gel

Coomassie Brilliantblau G-250 ist eine methylsubstituierte Form im Vergleich zu R-250 und besitzt eine reduzierte Löslichkeit in 12 % Trichloressigsäure. Der Farbstoff kann daher unter sauren Bedingungen hauptsächlich als kolloidale Dispersion auf das Gel aufgebracht werden. Der gelöste Anteil führt zur Anfärbung der Proteine, während die Hauptmasse des kolloidalen Farbstoffes nicht in das Gel eindringen kann. Dies führt zu einer beinahe hintergrundfreien Anfärbung der Proteine, wodurch ein extensives Auswaschen von überschüssigem Farbstoff überflüssig ist. Zur Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliantblau wurden die Gele über Nacht in der Färb-/Fixierlösung (Roti-Blue, Roth Karlsruhe) geschüttelt, und der nicht gebundene Farbstoff mit Leitungswasser abgewaschen.

2.27.25 Massenspektrometrie von Proteinen

Voraussetzung für eine massenspektroskopische Untersuchung ist die Darstellung des Proteins in möglichst reiner Form. Aus einem komplexen Proteingemisch wie dem Milzzellproteom gelingt dies mit Hilfe von IEF oder NEPHGE und anschließender Auftrennung im SDS-PAGE. Die gewünschten Proteinspots werden durch Mustervergleich bzw. durch Immundetektion identifiziert und mit einem Skalpell aus dem PAA-Gel ausgestanzt. Anschließend werden die Proteine aus der Gelmatrix in PBS eluiert und ein enzymatischer Verdau mit selektiv spaltenden Proteasen (z. B. Trypsin) wird über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Molekülmassen der Spaltfragmente wurden in einem Shimadzu QP-2010 Massenspektrometer bestimmt und mit den entsprechenden Datenbanken verglichen. Der enzymatische Verdau und die Massenspektroskopie wurden im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der HHU durchgeführt.

2.27.26 Proteintransfer auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine nach der horizontalen Semi-Dry-Methode auf eine Nitrozellulosemembran (Protan Cellulosenitrat BA 85, Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet (Kyhse-Andersen, 1984). Hierzu wurde das kontinuierliche Puffer-System nach Lihme & Schafer-Nielsen 1986 herangezogen, bei dem nur die in Blotpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen den beiden Graphitplatten des Biometra Fast Blot (Göttingen) als Pufferreservoir dienen. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 Blotfläche in 1,5–2 h vom SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Zur Kontrolle des Transfers wurden die transferierten Proteine anschließend durch Ponceau S reversibel angefärbt und unter fließendem Millipore- H_2O wieder entfärbt.

2.27.27 Immundetektion

Die geblottete Nitrozellulosemembran wurde für 1 h oder über Nacht in TST-Puffer mit 1 % BSA oder RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. Antiserum gegen HC110-R (1:100–1:10000 in TST-Puffer) für 2 h bei RT. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. Antiserum wurde die Membran für $3 \times 10 \text{ min}$ in TST-Puffer gewaschen und dann für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienen Alkalische Phosphatase- (AP-) bzw. „Horse Radish“ Peroxidase- (HRP-) gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen IgG-, Ziege-anti-Maus IgG- oder Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper meist in einer Verdünnung von 1: 25000. Für den Nachweis mit Alkalischer Phosphatase wurde die Membran anschließend für $2 \times 10 \text{ min}$ in TST-Puffer und einmal für 10 min in Substratpuffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte in 10 ml NBT-BCIP-haltiger Färbelösung unter Bildung eines tiefblauen, unlöslichen Niederschlages, dem 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo McGadey 1970; Blake *et al.* 1984. Der Nachweis mit „Horse Radish“ Peroxidase erfolgte durch Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL Western Blotting Detektionssystems (Amersham, Braunschweig) in Anlehnung an Roswell und White 1978. Hierzu wurden gleiche Volumina der Detektionsreagentien 1 und 2 gemischt und direkt auf die Proteinseite der Membran gegeben ($0,125 \text{ ml}$ des Gemisches/ cm^2 Membran), so dass die Flüssigkeit durch die Oberflächenspannung der Membran zurückgehalten wurde. Nach einer Inkubation für 1 min bei RT wurde die Flüssigkeit abgenommen und der noch feuchte Blot luftblasenfrei zwischen 2 Overheadfolien gelegt. Die Exposition erfolgte auf einem ECL Hyperfilm bzw. Hyperfilm MP (Amersham, Braunschweig) für 10 s bis 1 h. Ferner fand das „ECL Plus Western Blotting“-System (Amersham, Braunschweig) Verwendung. Hierbei entsteht durch enzymatische Reaktionen Licht mit höherer Intensität und länger andauernder Emissionszeit. Mit diesem System konnte eine 10–20fache Steigerung der Sensitivität gegenüber dem herkömmlichen ECL-System erzielt werden (Akhavan-Tafti *et al.* 1994). Die Detektionsreagentien A und B wurden im Verhältnis 40:1 in TST-Puffer verdünnt, auf die Proteinseite der Membran aufgebracht, nach 5 min Inkubationszeit entfernt und – wie oben beschrieben – exponiert.

2.27.28 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das IMAP-Protein wurde der kodierende Bereich mittels PCR in den Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Leek, NL) kloniert und so N-terminal mit einem 6xHis-Tag unter Berücksichtigung des Leserasters fusioniert. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und gerichtet in den ebenfalls *Bam*HI/*Eco*RI linearisierten pRSET B-Expressionsvektor ligiert. In dem pRSET B-Vektor wird die Expression über einen viralen Promotor des Bakteriophagen T7 kontrolliert. Die Klonierung erfolgte deshalb in dem *E. coli* Stamm XL1-Blue, der kein Gen der T7 RNA Polymerase enthält. Das rekombinante Plasmid wurde danach in T7 Polymerase exprimierenden BL21(De3)pLysS *E. coli* Zellen transformiert, die zusätzlich das Plasmid pACYC184 enthalten, das über eine Chloramphenicolresistenz stabilisiert wird, und in geringen Mengen das T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase,

exprimieren. Da diese Zellen unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors stehen, erfolgt bei IPTG-Induktion die Expression der T7 RNA Polymerase und damit auch die des Fusionsproteins.

Eine Einzelkolonie mit dem gewünschten HC110-R-Plasmid wurde von einer frischen LB-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol in 50 ml LB-Medium unter gleichem Selektionsdruck überimpft und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm bis zur stationären Phase geschüttelt. Diese Über-Nacht-Kultur wurde anschließend auf $OD_{600} = 0,3$ verdünnt und 100 ml der Kultur bei 37 °C und 280 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ weitergeschüttelt. 1 OD_{600} -Einheit wurde abgenommen, die nicht-induzierten Zellen kurz abzentrifugiert und in 150 µl 8 M-Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder 150 µl PBS- und 50 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Die nicht-induzierte Probe wurde für 2 min denaturiert, die genomische DNA durch kurze Ultraschallimpulse von wenigen Sekunden im Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) geschert und unlösliche Partikel durch eine 3minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die 100 ml Kultur für weitere 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die induzierten Zellen für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C (Heraeus-Untertischzentrifuge) abzentrifugiert, das Pellet in PBS- gewaschen und anschließend in 8 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder unter nativen Bedingungen in PBS (pH 8,0) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 3maliges Eintauchen der Zellen in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37 °C. Nach der ersten Stickstoffbehandlung wurden 0,75 mg/ml Lysozym zugesetzt. Nach der letzten Inkubation in flüssigem Stickstoff erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 16 °C, gefolgt von einigen kurzen Ultraschallimpulsen zu je 10 s und einer Abkühlung im Eiswasserbad, bis die Lösung eine wasserähnliche Viskosität aufwies. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C (Beckman J2-21; JS 13.1-Rotor) wurden 150 µl einer induzierten Probe entnommen, mit 50 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und die Induktion des jeweiligen HC110-R-Proteinfragmentes zusammen mit der nicht-induzierten Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse mit einem Maus-anti-His-Antikörper überprüft (Tab. 3). Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie in ein frisches Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.27.29 Metallaffinitätschromatographie

Die Anreicherung erfolgte unter denaturierenden oder wahlweise unter nativen Bedingungen über das N-terminale 6xHis-Tag mit Hilfe des IMAC-Systems („Immobilized Metal Affinity Chromatography“) über TALONspin-Säulen von Clontech (Palo Alto, U.S.A.). Das Harz der Säule wurde zunächst separat mit 5 Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder PBS- (pH 8,0) äquilibriert, für 4 min bei 3000 rpm und 4 °C sedimentiert und zusammen mit dem HC110-R-Proteinüberstand für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Harz 3x mit dem 10fachen Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer oder PBS- für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml 8 M Harnstoff-Lysispuffer oder PBS- aufgenommen und damit die Säule beladen; diese wurde im folgenden noch 2x mit dem 3fachen Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer oder PBS- gewaschen, bevor die Elution mit Imidazol-haltigem (100 mM) 8 M Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder PBS- (pH 8,0) in mehreren Fraktionen zu je 150 µl erfolgte. Der Gehalt von Fusionsprotein in den Fraktionen wurde durch Gelanalyse und Proteinbestimmung nach Bradford 1976 ermittelt. Die beiden aufgereinigten Proteine wurden über Centricon-Röhrchen (Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.) bzw. Slide-A-Lyzer Dialyserahmen (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.), die jeweils Moleküle oberhalb von 10 kDa zurückhielten, nach Angaben des Herstellers entsalzt, lyophilisiert und in einer PBS-Lösung aufgenommen.

2.27.30 Immunisierung von Versuchstieren zur Antikörpergewinnung

Immundominante Domänen des IMAP Proteins wurden mit dem PC/Gene-Programm (Version 6.7) „ANTIGEN“ (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) nach der Methode von Hopp und Woods [1981] bestimmt. Peptide, bestehend aus insgesamt 13 Aminosäuren eines ausgewählten immundominanten Bereichs des deduzierten HC110-R-Proteins, wurden von der Firma Biotech GmbH (Denzlingen) synthetisiert und über Tri-Lysine an eine Polystyrol-Polyoxyethylen-Matrix (TentaGel 4 MAP) gekoppelt [Butz et al., 1994]. Je 1 mg des TentaGel-gekoppelten IMAP-Peptides wurde in 2 ml PBS- resuspendiert, bei -80°C eingefroren und nach dem Auftauen mit 2 ml FCA versetzt. Die Immunisierung von 2 Kaninchen mit den so gekoppelten Peptiden wurde von Herrn Dr. Horst Mossmann (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) durchgeführt.

2.27.31 Aufreinigung von Antiseren durch Filteradsorption

Häufig treten beim Einsatz von polyklonalen Antiseren als Primärantikörper beim Immunoblotting unerwünschte Kreuzreaktionen mit zusätzlichen Proteinen neben dem spezifischen Protein (Immunogen) auf. In diesen Fällen empfiehlt es sich, die kreuzreagierenden Antikörper aus dem Gemisch herauszufangen. (Präabsorptionsmethoden), bzw. die spezifischen Antikörper durch Affinitätsreinigung zu isolieren. Eine Methode die letzteres Prinzip relativ einfach schnell und effektiv realisiert, ist die Adsorption an das isolierte spezifische Protein auf NC-Blotmembranen. Die Proteinpräparation wurde durch PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Blot-Membran wurde mit 0,2 % Ponceau S angefärbt, die gewünschten Proteinbanden ausgeschnitten und der Farbstoff mit Leitungswasser ausgewaschen. Nach der Blockierung der Membran mit Roti-Block (Roth) erfolgte die Inkubation mit Antiserum für 1 h, welches zuvor 1:5 mit TST (plus 5 % BSA) verdünnt worden war. Die Membran wurde drei mal mit TST gewaschen und die Antikörper durch Inkubation mit 20 mM Glycin; 10 mM Tris pH 2,0 für 5 min eluiert. Anschließend erfolgte die sofortige Neutralisation mit 1 M Tris pH 7,2 um eine Schädigung der Antikörper durch Hydrolyse zu vermeiden. Die Prozedur wurde mehrfach wiederholt und gesammelten Eluate durch Ultrafiltration (Centricon 10, MWCO 10.000 kDa) aufkonzentriert

2.27.32 Aufreinigung von Antiseren durch Affinitätschromatographie

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren unterscheidet sich von der zuvor beschriebenen Methode mit NC-Membranen durch die kovalente Kopplung des Immunogens (meist ein Protein) an eine Trägermatrix. Durch Dialyse des Proteins (1 mg) gegen PBS wurde der Harnstoffpuffer entfernt, weil die Aminogruppen des Harnstoffes die Kopplung an die aktivierte Trägermatrix beeinträchtigen würde. Für die Kopplung wurde 1 ml Affi-gel-15 (Bio-Rad) mit 5 Volumina eiskaltem Wasser gewaschen und mit 1 mg des Proteins IMAP38-1 für 3 h bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Kopplung wurden über Nacht freie Bindungsplätze durch Inkubation des Trägermaterial mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4 abgesättigt und die Säule mehrfach mit PBS gewaschen. Mit diesem Trägermaterial wurde eine Säule gepackt und wie folgt gewaschen. a) 10 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 b) 16 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid pH 7,5 c) 24 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 d) 16 ml 0,1 M Glycin pH 2,5 d) 50 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Anschließend wurde das unverdünnte Antiserum auf die Säule gegeben und eine Fließgeschwindigkeit von 2 ml/h eingestellt. Nach zweifacher Passage des Antiserums durch die Säule wurde diese mit 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 ml 0,6 M Guanidiniumhydrochlorid pH 7,5 und 30 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Die Antikörper wurden anschließend durch Zugabe von 10 ml 0,1 M Glycin pH 2,5 eluiert und in 500 μl Fraktionen aufgefangen, welche durch Vorlage von 1M Tris-HCl pH 8,0 sofort neutralisiert wurden.

2.27.33 Markierung von Antikörpern mit HRP

Die Markierung von affinitätsgereinigten Antikörpern mit Meerrettich-Peroxidase erfolgte mit Hilfe der amino-reaktiven „EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase“ (Pierce # 31487) exakt gemäß den Angaben des Herstellers. Für die Kopplung wurden 1 mg der affinitätsgerei-

nigten IgG Fraktion aus 2.27.29 eingesetzt. Für die Lagerung der markierten Antikörper wurden diese 1:1 mit Pierce's SuperFreeze™ Peroxidase Conjugate stabilizer (Pierce # 31503) versetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.27.34 Kovalente Koppelung von synthetischen Polypeptiden an KLH

Um Antikörper gegen das zweite offene Leseraster zu gewinnen, wurde ein synthetisches Peptide der immundominanten Domäne des zweiten offenen Leserasters, welche mit dem PC/Gene-Programm (Version 6.7) „ANTIGEN“ (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) nach der Methode von Hopp und Woods 1981 bestimmt worden war, von der Firma B&G Biotech GmbH (Denzlingen) synthetisiert. Da diese zu klein waren um eigenständig eine Immunantwort zu generieren, wurden sie mit Hilfe des „Imject Carboxyl Reactive Antibody Production & Purification Kit with mKLH“ (Pierce, Rockford IL) an „Keyhole Limpet Hemocyanin“ (KLH) gekoppelt. Dieses besteht aus mehreren Untereinheiten mit einem Gesamtgewicht von ca. 8 Millionen Dalton. Bei der Versuchsdurchführung wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Mit den fertigen Komplexen wurden anschließend 10 weibliche BALB/c Mäuse immunisiert, wobei den Tieren an Tag 0, Tag 14, und Tag 21 jeweils eine Dosis von $90\text{ }\mu\text{g}$ Protein zusammen mit $70\text{ }\mu\text{l}$ PBS- und $100\text{ }\mu\text{l}$ Freund-Complete-Adjuvans (FCA) verabreicht wurde. Am Tag 28 wurden die Mäuse mit Hilfe von Diethylether narkotisiert und das Blut mit einer zuvor mit CPD-Puffer gespülten Pasteurpipette aus dem direkt aus dem Herzen entnommen. Um das Serum zu gewinnen folgte eine Inkubation von 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 24 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, die zur Blutgerinnung diente. Um die geronnenen Bestandteile zu entfernen, wurde es 2 mal 5 min bei 3000 rpm (Beckman Untertisch Zentrifuge) zentrifugiert, wobei zwischendurch das Pellet entfernt wurde. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13000 rpm für 5 min, wurde das Serum bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.28 Zelluläre Lokalisation von Proteinen

GFP und Fusionsproteine mit einem C- oder N-terminalen GFP-Tag können bereits 24 h nach der Transfektion *in vivo* unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet werden. Für Kollokalisationsexperimente und Schnittserien durch die Zelle mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops (Kap.2.29.2) wurden die auf 1 % gelatinebeschichteten Deckgläschen ausgesäten und transfizierten Zellen 3x mit PBS- gewaschen, mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS- (pH 7,2) für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und in einer 1:1 Mischung (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg) sowie einer Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt), auf einem Objektträger eingebettet. Die das IMAP- oder HIMAP-Myc/His-Fusionsprotein exprimierenden CHO-K1 Zellen wurden 3x mit PBS- gewaschen und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 3,7 % Paraformaldehyd (pH 7,2), 0,2 % Triton X-100 und 0,02 % Glutaraldehyd in PBS- (pH 7,2) fixiert. Danach wurden freie Aldehydgruppen durch 2maliges Waschen für je 10 min bei RT mit 0,1 % Natriumborhydrid in PBS- (pH 8,0) reduziert. Unspezifische Bindungen wurden für 15 min bei RT in einer Blocklösung (0,5 % BSA, 0,2 % Triton X-100 in PBS-) auf einem Schüttler abgesättigt. Die Zellen wurden für 1 h mit $0,13\text{ }\mu\text{g/ml}$ eines monoklonalen Maus-anti-c-Myc Erstantikörpers (9E10-SC-40, Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.) und nach dreimaligem Waschen in Blocklösung, für 1 h in einer feuchten Kammer im Dunkeln mit $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ eines monoklonalen Ziege-anti-Maus IgG (H+L) F(ab')₂ Fragment Konjugat-Alexa 488-Zweitantikörpers (Molecular Probes, Göttingen) inkubiert, noch weitere 3x mit PBS- gewaschen,- wie oben beschrieben – eingebettet und im konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

2.28.1 Anfärbung verschiedener Zellkompartimente (Nucleus, ER, Lysosomen, Zellmembran)

Die Anfärbung des Endoplasmatischen Reticulums erfolgte mittels Antikörper 24 h nach der Transfektion. Die auf gelatinebeschichtete Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden 3x mit PBS- gewaschen und, wie in Kap. 2.28 beschrieben, fixiert und freie Aldehydgruppen

reduziert. Unspezifische Bindungen wurden durch 30minütiges Blocken bei RT mit 0,5 % BSA und 0,2 % Triton X-100 in PBS- auf einem Schüttler abgesättigt. Der monoklonale Maus-anti-KDEL 78kDa (Grp/Bip) IgG-Primärantikörper (StressGen Biotechnology Corp., Victoria, British Columbia, CA, U.S.A.) wurde 1:600 in Blocklösung verdünnt, und die Deckgläschen mit 70 µl des Antikörpers überschichtet. Inkubiert wurde für 1,5 h bei RT in einer feuchten Kammer. Nach 3maligem Waschen der Zellen für je 5 min in der Blocklösung, wurden die Zellen mit 2 µg/ml eines monoklonalen Ziege-anti-Maus IgG (H + L) F(ab')₂ Fragment Konjugat-Alexa 568-Sekundärantikörpers (Molecular Probes, Göttingen) für 1 h in einer feuchten Kammer im Dunklen inkubiert und anschließend in einer 1:1 Mischung (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg) sowie einer Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) auf einem Objektträger eingebettet.

Die Anfärbung des Zellkerns erfolgt mit Hilfe von in die DNA interkallierenden rot fluoreszierenden Farbstoffen. Auf 1 % gelatinebeschichtete Deckgläschen ausgebrachte und mit diversen Konstrukten transient transfizierte Säugerzellen wurden 24 h nach der Transfektion 3x mit PBS- gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS- (pH 7,2) für 30 min bei 37 °C fixiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS- wurden die Zellen für 30 min bei RT mit einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung permeabilisiert und nach erneutem Waschen die RNA für 1 h mit 0,1 mg/ml RNase A in PBS- verdaut. Die Zellen wurden schließlich in einer 1:1-Mischung (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg), die eine Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) und 5 µg/ml Propidiumiodid enthielt, eingebettet.

2.29 Mikroskopie

Die Expression transient transfizierter Säugerzellen mit GFP oder diversen rekombinanten GFP-Fusionskonstrukten lässt sich *in vivo* nach Anregung der Fluoreszenz des GFP-Proteins bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm in einem inversen Zeiss-Mikroskop IM 35 (Zeiss, Oberkochen) betrachten und fotografieren (Agfa HDC 100, Agfa-Gevaert, Leverkusen). Die Expression von -R-MycHis stabil transfizierter Zellen ließ sich mit Hilfe monoklonaler anti-Myc- oder anti-His-Primärantikörper und FITC- oder Alexa 488-gekoppelter Sekundärantikörper nach Fixierung der Zellen ebenfalls im Phasenkontrastmikroskop kontrollieren.

2.29.1 Lichtmikroskopie und Phasenkontrastmikroskopie

Die Betrachtung und Auswertung der *in situ* Färbungen von Milzzellen und transfizierten Zellen erfolgte im Lichtmikroskop LM1000 (Leitz, Wetzlar).

2.29.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT („Confocal Laser Scanning Microscope Unit“, Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz des GFP-Proteins sowie des Farbstoffes Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) oder Alexa 488 wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser, die für Rhodamin, Texas-Rot, Phycocerythrin, Alexa 568, LysoTracker™Red DND-99, MitoTracker™-Red CMX Ros oder Propidiumiodid bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt. Die Auswertung erfolgte mit der AVS Software (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, U.S.A.), Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0 für Windows.

2.30 GTP/ATP Bindungsnachweis

Der GTP Bindungsnachweis erfolgte nach einer modifizierten Methode von Vater et al. 1992 und Bhullar/Seneviratne 1996. Die Extrakte von *E. coli* Zellen welche HIMAP-1 und IMAP-1 exprimieren wurden in Laemmli Ladungspuffer resuspendiert und 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Die Proteinproben wurden im 10 % igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Mit Hilfe der reversiblen Ponceau-Färbung wurde kontrolliert ob äquimolare Proteinmengen aufgetragen wurden. Der Blot wurde nach Entfärbung mit Leitungswasser 1 h bei Raumtemperatur in Puffer A blockiert (20 mM Tris pH7,5; 150 mM NaCl; 1 % Magermilchpulver; 0,1 % Tween 20). Danach erfolgte die Inkubation für 30 min mit radioaktiv markiertem GTP bzw. ATP in 20 ml Puffer B (wie A, aber zusätzlich mit 20 μCi [α - ^{32}P]GTP/ATP; 2 μM ATP/GTP; 2 mM MgCl_2). Nach dreimaligen Waschen mit Puffer B ohne GTP/ATP wurden die Filter feucht in Plastikfolie eingewickelt und über Nacht ein Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert. Alternativ wurde ein „Phosphor-Imager-Screen (Fuji BAS1500) über Nacht bei Raumtemperatur exponiert und mit Hilfe des ImagemasterRX100 ausgewertet. Die Nachbearbeitung erfolgte mit dem Programm Photoshop 5.0.

Für den Nachweis einer GTP Bindung unter nicht denaturierenden Bedingungen, wurde affinitätsgereinigtes Fusionsprotein mittels Ultrazentrifugationssäulchen (Centricon MWCO10000) entsalzt und in 1ml Puffer A aufgenommen. Das entsalzte Protein wurde mit 100 μl Talon-6xHis Matrix (Clontech) präzipitiert, zweimal mit Puffer A gewaschen und in 250 μl Puffer B resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min mit regelmäßigen Aufwirbeln der Talonbeads wurden diese 5 mal mit 1,5 ml Puffer B gewaschen und die gebundene Menge an Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

3.0 Ergebnisse

Ausgehend von der bereits beschriebenen cDNA Sequenz *imap38* (Krücken, 1998) wurden Untersuchungen hinsichtlich der Funktionalität der beiden Leseraster und deren Proteinprodukte unternommen. Dazu wurde die cDNA *in vitro* und in als Fusionsprotein exprimiert. Die heterologe Expression in einer Säugerzelllinie diente in erster Linie der subzellulären Lokalisation. Das präparativ aufgereinigte Fusionsprotein des ersten Leserasters diente der Immunisierung von Mäusen und Kaninchen mit dem Ziel einen spezifischen Antikörpers zu gewinnen. Die gewonnenen Antiseren wurden hinsichtlich ihrer Spezifität getestet und optimiert. Der direkte Nachweis von Proteinprodukten der *imap38* cDNA in Proteinextrakten von naiven und immunen C57/BL10 Mäusen wurde mit Hilfe ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese versucht. Mögliche Interaktionspartner im Rahmen von Protein-Protein Wechselwirkungen sollten mit Hilfe des Hefe basierten „Two-Hybrid“ Systems identifiziert werden. Die Expression der *himap38* cDNA wurde in den getrennten Fraktionen über *in situ* Hybridisierung bestimmt und Veränderungen der immunologisch relevanten Milzzellsubpopulationen durch FACSortierung ermittelt.

Hinweise auf die Funktion von *imap38* erhoffte man sich von Informationen über homologe Gene anderer Organismen. Im Vordergrund stand hierbei die Klonierung der homologen humanen cDNA bzw. des humanen Genomklons. Die humane cDNA wurde aus einer Milz cDNA Bank des DGHP isoliert und sequenziert. Der entsprechende Genomklon konnte über Sequenzabgleich mit Datenbanken des humanen Genomprojektes ermittelt und kloniert werden. Die Bedeutung verschiedener Regionen der 5' und 3' flankierenden Sequenz für die basale Promotoraktivität wurden in einem Reportergentest in mehreren Zelllinien untersucht (Abschnitt 4.5). Über intensive Datenbankrecherche wurden mehrere verwandte cDNA's ausfindig gemacht und in einer neuen Genfamilie phylogenetisch geordnet. Die Expressionsmuster der humanen cDNA's wurden durch Hybridisierung eines „Multiple Tissue Expression Arrays“ bestimmt. Die Identifizierung von Sequenzmotiven für eine putative Nukleotidbindung erforderte eine biochemische Überprüfung, welche auch den Abschluss der Arbeiten bildete.

3.1 Funktionelle Charakterisierung der putativen *imap38* Genprodukte

Die Länge der *imap38* cDNA beträgt exakt 1900 Basenpaare (bp). Die Deduktion der wahrscheinlich genutzten Leseraster gestaltet sich schwierig, da den ersten drei AUG-Kodons nur sehr kurze Leseraster mit Längen von 3, 22, und 33 Aminosäuren folgen. Erst beim vierten AUG-Kodon in Position 424 entsteht ein Leseraster mit einer Länge von 246 Aminosäuren. Das Molekulargewicht dieses im folgenden als IMAP38-1 bezeichneten Leserasters beträgt 25,8 kDa, der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 10,2 (Appel *et al.* 1994). Die Umgebung dieser Startcodons zeigt keinerlei Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz für Translationsinitiation (Kozak-Sequenz) (Kozak, 1986,1987,1989). Es folgen jedoch drei weitere AUG Kodons an den Positionen 475, 508 und 583 im selben Leseraster, die teilweise eine partielle Übereinstimmung mit der Kozak-Sequenz besitzen. Ein zweites offenes Leseraster beginnt in Position 632 am neunten AUG der cDNA. Dieses Leseraster würde für ein Protein von 277 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 30,8 kDa und einem pI von 9,26 kodieren. Welches dieser beiden Leseraster nun *in vivo* tatsächlich genutzt wird, wird im folgenden experimentell untersucht. Gegen eine Nutzung des zweiten Rasters spricht allerdings das Fehlen einer Kozak-Sequenz und die acht vorherigen Startkodons, welche alle durch einen Regulationsmechanismus maskiert werden müssten. Darüber hinaus wäre der 5'untranslatierte Bereich der cDNA mit über 600 bp enorm lang. Trotzdem sind für eukaryontische Gene überlappende Leseraster mit regulatorischen 5'UTR's beschrieben z. B. das Tumor-Suppressor-Gen INK4A (Zindy 1995) und Molybdoberin-Synthase (Sloan 1999).

Abbildung 2

Sequenz der *imap38* cDNA und deduzierte Aminosäuresequenz der beiden Leseraster. Die Sequenz der *imap38* cDNA ist in 5'-3' Orientierung dargestellt. Startkodons sind gelb unterlegt. Die immundominante Region des zweiten Leserasters ist in oranger Schrift, die Transmembrandomäne des zweiten Leserasters ist in blauer Schrift abgebildet, das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen.

```

1  GTTGGCCCC TAAGTAAATA AAAGGTAATA AANTATTAC CACGAGGAG GAGCTGGCCT GAGACAAGCG AGGAGAAGA
81  GGGAGAAGA TCAATTCCT TCTCTAACT TCGAACAAAC TTGAGAAAG CCCATGTGTC AAAGCTTTGA GTTGTGTCT
161  AGACTGAGCA CTTCCTGGGT TTACACAGG AACACGIGGT AGGCTGCAGC CAACCCCAAT TGCTTAGGAT TGAGGGGCTC
241  CCTGTGCTT GATGGTCCG ATCTCAGAGT GGGGGTTGG GGGGGGGAA GGAACCTTGG TGCTCAATT CAGCATCAGG
321  TCGGCCIGTG TTCAGGACCA GAGACCTTGG TGAACCCAGG AGTATAAAG GAATATTTTG TGAACGTC ACGAGAGCAT
401  CTGAGGTGC ACAGAGAATC CAATGCAGA AAGGAGAGC GGGGAGAAC CTGAGCTCAG AGAACCCAAA GCATGGGGA
      M Q K G E T G K N L S S E N P K Q M G

481  GCACCAGCT TOCAAGGAGA ACAGCAATG TGGGTCTTC CCTGTATG TGAAGCTT AATACAGTC TTTCOCAGG
      A P G F Q G E Q A M W V L P L Y A E G L N T S L S Q

561  GAAGCCGTG GTCTCTGACT CAATGCTGCC ACATCTGATC CTCAGGCTCA GAGGACTUCA GGGCCCCGA GATGCCCCG
      R K A C V S D S M L P H L I L R L R G L Q G P A D A P
      M P Q

641  CTGAGGCTCA TCTTAGTGGG CAGGACTGG ACCGGCAAGA GTGCCACTG CAACAGATC CTGGGTAGA AGTGTCTCT
      A E A H P S G Q D W D R Q E C H W Q Q H P G S E V L P
      L R L I L V G R T G T G K S A T G N S I L G Q K C F

721  GTCCAGCTG GGGGGGTGC CTGTCCAGG AAGTGCCTT TTGGCCAGCA GAATGIGGGC CGGCTGGCAG GTGGAGTGG
      V Q A G G G A C H Q K L H F G Q Q N V G R L A G G G
      L S R L G A V P V T R S C T L A S R M W A G W Q V E V

801  TGGACACCC GGATATCTTC AGCTCCGAGA TCCCGCGAC CGACCTTGG TGCGTGGAGA CAGCCCGCTG CTTTGTGCTG
      G G H P G Y L Q L R D P A D R P W V R G D S P L L C A
      V D T P D I F S S E I P R T D P G C V E T A R C F V L

881  TCGGCCCTG GGGCCAGC GCTGCTGCTG GTCCACCAGC TGGGTGCTT CACCATGAG GACAGCAGG CGCTGGCCG
      V G P W A A R A A A G H P A G S L H H A G Q P G A G R
      S A P G P H A L L L V T Q L G R F T M Q D S Q A L A

961  GGTGAGCGG TTATTCGGGA AGCAGGTGAT GGGCGCACT GTGGTGGTGT TCACGGCCA AGAGGACCTG GCTGAGACT
      G E A V I R E A G D G A H C R G V H A P R G P G W R
      A V K R L F G K Q V M A R T V V V F T R Q E D L A G D

1041  CCTGAGGA TTATGTGAC TGCAGGACA ACCGCGCGT GGGGACCTG GTGGCCAGT GCGGGGGCG CGTGTGGCC
      L P A G L C A L H G Q P R A A G P G G R V R G P R V R
      S L Q D Y V H C T D N R A L R D L V A E C G G R V C A

1121  CTCACAACC GGGCCACAG CAGGAGCGC GAGGCTAGG CTGAGCAGT GCTGGCATG GTTGGTGTG TGGTGGGA
      P Q Q P R H R Q R A R G S G -
      L N N R A T G S E R E A Q A E Q L L G M V A C L V R

1201  GCACGGGGC GGCCTACT CCAATGAGT GTATGAGCTG GTGCAGGACA GCGGGGGC TGACCCCGG GACCAAGTAG
      E H G G A H Y S N E V Y E L V Q D T R C A D P Q D Q V

1281  CCAAGTGGC AGAGTAGTG GCTGAGCCA TGCAGGGG CACCAGTGT CTAGCTGGC TGTGGGATG GCGAAATTC
      A K V A E I V A E R M Q R R T R L L A G L W G W R K F

1361  TACTGPAAG GCTGAGGGG TGGTTTCTCT GTCTTCTGG GTGTGGCAT CTGTATCTAC CTGCTGTCT ACAGAAAGG
      Y W K G W R R G F S V F L G V A I L I Y L L F Y R K

1441  CTTTGGGAC CAGATAACA GATAAGCTG GGTGTAGAG ATGTCTGGT TTTAAAAAG AANTAGTAG AATTCCTGC
      G F G D Q N N R -

1521  AGAGCTTTAA TGATTCAG TGCAGTACT TGGCACTAC TTTCCTAAG TCTGTGTG TGAGGAGCG GTGTGGGGC
1601  AGTACCAAG GCACCAGGA CTGAGCTAA GTCTATGGC TTGCACCTA CTTCCTATA CACTGATA TAGCCACAA
1681  ACATCATGAG AGCTGCAG GTGCACAG ATACTGGTGA ATCCATTTG ATGGAGATAT GCGCTGCTG CCTGATAG
1761  CTGAGCTGC GTGCTGGTG AGGTTGGTG GCTGCTGTG GGTGATGG AACTGAGAT ATATAAGAT GAGAGCCCA
1841  GGGTCTGGG GAGATATAA CAGAGAAA GATGAGACT CAATAACTG CIGTGAAG G (A)n

```

Unter Einbeziehung des Programmes CENSOR konnten drei repetitive Elemente in der *imap38* cDNA identifiziert werden: a) Ein RSINE1 Element an der Position -131 bis -11 und 74 % Ähnlichkeit zur Consensus Sequenz. b) Ein retrovirales RLTR10A Element mit 89 % Ähnlichkeit in der Position +1579 bis +1927 bp in der Umgebung des Polyadenylierungssignals. c) Ein langes eingeschobenes Element der Lx/ Familie in Position +2246 bis +2523 mit einer Ähnlichkeit von 61 % zur Konsensussequenz.

Als erster Schritt zur Überprüfung der beiden Leseraster wurde die zellfreie *in vitro* Translation gewählt. In einem Kaninchen Retikulozytenlysate erfolgte die gekoppelte Transkription und Translation der *imap38* cDNA in Gegenwart von radioaktiv markierten Methionin und Cystein. Die Translationsprodukte wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden die Plasme piapG2 und piapΔ289 benutzt. Bei letzterem ist der 5'UTR entfernt und das AUG⁴²⁶

bildet das erste Startkodon. Bei dieser Deletion fehlen so auch die drei kurzen offenen Leserahmen welche für kurze Peptide von 3, 22, und 33 AS kodieren. Das Konstrukt *piapG2* enthält die gesamte cDNA. Die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abbildung 3) ergibt zwei Banden, eine starke Bande bei 26 kDa und eine etwas schwächere Bande bei 23 kDa. Die Intensität variiert auch in Abhängigkeit der verwendeten Plasmide. Vermutlich ist die 26 kDa große Bande ein Produkt welches das Startkodon AUG⁴²⁶ nutzt, wohingegen die kleinere Bande vom folgenden zweiten oder dritten Startkodon ausgeht. Erstaunlicherweise wird das 23 kDa Produkt stärker exprimiert, wenn der gesamte 5'UTR vorhanden ist (*piapG2*). Allerdings konnte kein Produkt nachgewiesen werden, das mit 31 kDa dem zweiten offenen Leseraster entspräche, was die Vermutung nahelegt, dass das AUG⁶³² nicht als Startkodon in diesem System genutzt wird.

Die Herstellung spezifischer Antikörper gegen ein neu zu charakterisierendes Protein beginnt klassischerweise mit der Expression und Aufreinigung bzw. Anreicherung des Proteins, welches dann zur Immunisierung von Versuchstieren (Maus, Ratte, Kaninchen) eingesetzt wird. Für IMAP1 erfolgte diese Expression in *E. coli*. Der codierende Bereich der cDNA war hierfür mittels PCR in den Vektor pRSET-B kloniert worden und konnte so unter Kontrolle des IPTG induzierbaren T7 Promotors exprimiert werden. Das auf Plasmidebene mit der cDNA fusionierte 6xHis Tag ermöglichte die Aufreinigung mittels Metallaffinitätschromatographie. Aus 200 ml *E. coli* Kultur, welche in der Mitte der logarithmischen Phase durch IPTG Zugabe induziert worden war, konnten ca. 3000 µg gereinigtes IMAP1 Protein gewonnen werden. Die Expression und Reinheit wurden mittels SDS-PAGE überprüft und sind in Abbildung 4 dokumentiert.

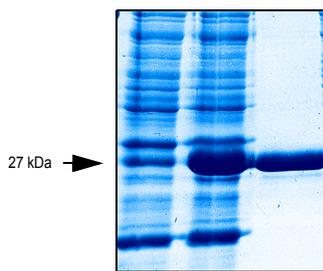


Abbildung 4

Heterologe Expression von IMAP38-1 aus *E. coli*. Coomassie gefärbtes 12,5 %iges SDS Gel mit je 20 µg Bakteriengesamtprotein vor (linke Spur) und nach (mittlere Spur) Induktion mit IPTG. Die rechte Spur dokumentiert die Reinheit der IMAP1 Fraktion nach Elution von der Metallaffinitätschromatographie.

Das affinitätsgereinigte Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet und entsprechende Seren den Tieren vor jeder Injektion zur Kontrolle entnommen. Nach 3–6 Verstärkerinjektionen erfolgte eine größer Blutabnahme. Die Antiseren wurden in verschiedenen Verdünnungen in der Immundetektion von rekombinanten IMAP1 Protein eingesetzt und getestet. Die Ergebnisse belegen das Vorhandensein von spezifischen anti-IMAP1 Antikörpern. Wurden jedoch Milzproteine in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Immundetektion mit den anti-IMAP38-1 Antiseren durchgeführt, so zeigte sich in allen Experimenten eine Doppelbande in Höhe der theoretischen Molekülmasse von IMAP38-1. Diese Doppelbande trat unabhängig von der Herkunft der verwendeten Milz auf. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Proteinextrakten von naiven, infizierten oder immunen Tieren, obwohl die Daten auf RNA Ebene eine um den Faktor 40-50 erhöhte Expression der *imap38* RNA bei infizierten und immunen Tieren ergaben (Krücken 1996). Auch die unterschiedlichsten Methoden der Probenaufarbeitung (Proteinpräparation, Maschenweite der SDS-Gele) bzw. Variation im Verfahren der Immundetektion (Div. Blockierungsreagenzien, Membranen, Puffersysteme) erbrachten keine Verbesserung. Zusätzliche zeigte sich eine Kreuzreaktion des verwendeten Sekundärantikörpers mit dieser Doppelbande. Durch Auswerten verschiedener Sekundärantikörper von diversen Herstellern konnte diese Kreuzreaktion vermieden werden. Um solche Unwägbarkeiten generell zu vermeiden, wurden in letzter Konsequenz IMAP1 spezifische Antikörper aus den vorhandenen Antiseren durch Immunaффinitätschromatographie am rekombinanten Protein angereichert und anschließend kovalent an aktivierte Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die auf diese Weise direkt markierten Antikörper konnten unabhängig von sekundären Antikörpern in der Immundetektion eingesetzt werden, deren Ergebnisse Abbildung 5 dargestellt sind.

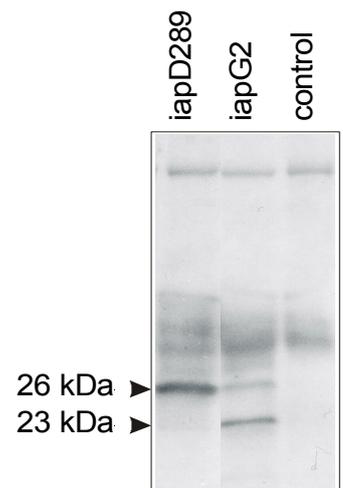


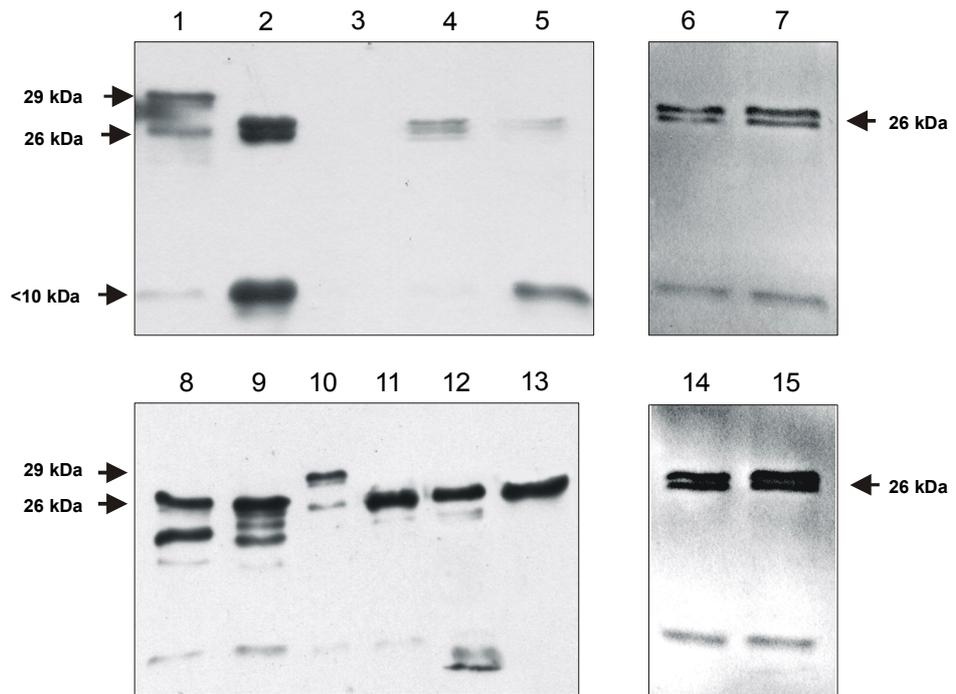
Abbildung 3

In vitro Transkription und Translation der *imap38* cDNA. Die Abbildung zeigt die ³⁵S markierten Expressionsprodukte der gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation nach Auftrennung im 12,5 %igen SDS Gel. Das Konstrukt *piapΔ289* enthält die *imap38* cDNA ohne 5'UTR. Eine Translation kann daher erst ab dem ATG in Position 424 erfolgen. Die Banden in der Höhe von 23 kDa repräsentieren Translationsprodukte der Startkodons 5 (Pos. 475, 6 (Pos. 508) oder 7 (Pos. 527). Das Konstrukt *iapG2* enthält die gesamte *imap38* cDNA und zusätzlich 30 bp aus dem Bereich der 3' flankierenden genomischen Sequenz. Im Vektor pGEM (*NotI* Fragment). Die Kontrolle besteht aus dem Reaktionsansatz mit Retikulozytenlysat und T3/T7 Polymerase jedoch ohne Plasmid. In der Mehrzahl der Experimente wird das 23 kDa Produkt von *iapG2* stärker als das 26 kDa Produkt exprimiert. Weil dieser Effekt bei *piapΔ289* nicht auftritt, kann ein regulativer Einfluß des 5'UTR vermutet werden.

Abbildung 5

Nachweis des IMAP38-1 Proteins mittels Immunedektion. Die beiden oberen Blots wurden mit inaktivierten anti-IMAP38-1 Antiserum und anti-Kaninchen-HRP als sek. AK behandelt; die beiden unteren Blots wurden mit affinitätsgereinigten und HRP-gekoppelten anti-IMAP38-1 Antikörpern inkubiert.

Spur 1: Rohextrakt von CHO Zellen transient IMAP1my6xHis expremierend; **Spur 2:** Zellkernfraktion immuner Milzzellen; **Spur 3:** Cytoplasmafraktion immuner Milzzellen; **Spur 4:** Gesamtprotein immuner Milzzellen; **Spur 5:** Anreicherungsfraktion adhärenter Zellen der immunen Milz (Makrophagen). Die **Spuren 6/14** und **7/15** zeigen Gesamtproteinextrakte von naiven/immunen Milzen, nach Immunedektion mit Antiseren (**6/7**) und gereinigten anti-IMAP1 Antikörpern (**14/15**). Die **Spuren 8-10** zeigen die Expressionsprodukte der drei möglichen Leseraster C, B, A, welche auch bereits mit dem anti-myc AK nachgewiesen wurden (vgl. Abbildung 7). **Spur 11** zeigt Proteinrohextrakte von CHO-K1 Zellen, welche das IMAP38-1 ORF mit optimierter Translationstartumgebung exprimieren. **Spur 12** zeigt CHO-K1 Zellen welche mit dem Plasmid piapG2 transfiziert wurden und **Spur 13** zeigt aufgereinigtes rekombinantes IMAP1 Protein aus *E.coli*.

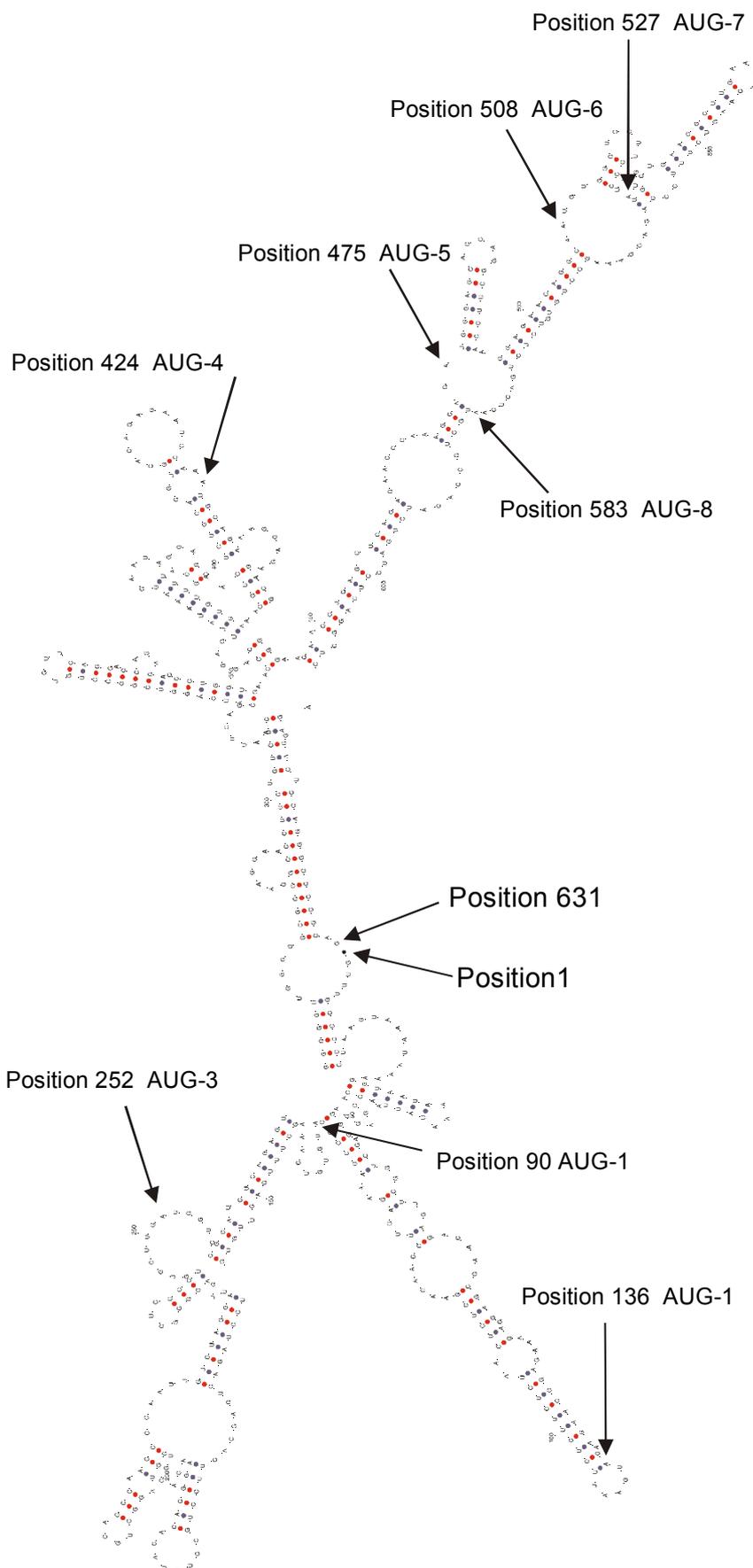


Die Antikörper markieren eine Doppelbande im Bereich von 30 kDa welche ausschließlich in der Zellkernfraktion und in Gesamtproteinextrakten, aber nicht im Cytoplasma nachweisbar ist (Abbildung 5 Spur 1-5). Auch ist dieses Bandenmuster in der adhären Milzfraktion, in der sich vorwiegend Makrophagen und adhären B-zellen befinden, deutlich nachweisbar. Das Auftreten der Banden in der Kernfraktion deckt sich mit den theoretischen Vorhersagen und den Expressionsversuchen im heterologen System der CHO-K1 Zellen. Allerdings ist keine differentielle Verteilung dieser Doppelbande zwischen den Proteinextrakten aus naiven, wie auch immunen Milzen nachweisbar. Werden exakt gleiche Gesamtproteinmengen auf das SDS-Gel geladen und im Immunoblot untersucht, so ist weder innerhalb der Spur noch zwischen den verschiedenen Fraktionen ein Unterschied zu erkennen. Auch der Vergleich von Gesamtproteinextrakten aus naiven mit frisch infizierten Tieren (C57/BL10 oder NMRI), zeigte keinerlei differentielle Expression auf Proteinebene, obwohl auch hier die Unterschiede auf RNA Ebene enorm waren (10 fach am Tag 5, und 40 fach am Tag 10 nach der Primärinfektion). Um die Spezifität der Antiseren und Antikörper zu testen, wurden diese auch zum Nachweis des rekombinanten IMAP1 Proteins, mit dem immunisiert worden war, eingesetzt. Parallel erfolgte die heterologe Expression verschiedener IMAP38-1 Konstrukte in CHO-K1 Zellen, deren Proteinextrakte ebenfalls mit kommerziell erhältlichen Antikörpern (anti-mycTag bzw. anti 6xHis Tag) und den selbst gewonnenen Antiseren im Immunoblot getestet wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5 und Abbildung 7 dargestellt. Die Antiseren und der gereinigte Antikörper erkennen eindeutig das rekombinante in *E. coli* produzierte und gereinigte Protein welches für die Immunisierung eingesetzt worden war (Spur 13). Desweiteren detektieren die Antiseren die artifiziellen Proteinprodukte der transient transfizierten CHO-K1 Zellen (Spur 8-12). Die Spuren 8-10 zeigen das Ergebnis einer heterologen Expression von Konstrukten, welche die natürliche Umgebung des theoretischen Tanslationsstartpunktes (fast der gesamt UTR ist erhalten) mit der Fusion eines C-terminalen c-Myc-6xHis Tags in jedem Leseraster ermöglichen (vgl. Abbildung 7). In Spur 10 ist das IMAP38-1 Protein zu erkennen, welches um das ca. 3 kDa große c-Myc6xHisTag verlängert wurde. In den linken Spuren 8 und 9 wird ebenfalls das IMAP1 Protein in voller Länge (26 kDa), jedoch ohne Fusionsanteil exprimiert. Aufgrund der künstlich eingefügten Leserasterverschiebungen können die Tag's nur den beiden anderen, von IMAP1 offenbar nicht genutzten Rastern exprimiert werden. Zur Überprüfung ob tatsächlich das erste Startcodon des IMAP38-1 ORF's genutzt wird, dient die Expression des IMAP38-1 Proteins vom Konstrukt piapΔ289. Hier wurde der 5'UTR eliminiert und die Umgebung des ersten Startcodons für die Translationsinitiation optimiert (Kozak 1981). Das Ergebnis ist in Spur 11 zu betrachten und zeigt eine Bande auf exakt glei-

cher Höhe wie in den Spuren 8 und 9 bzw. 12. Dies ist Beweis, dass das erste Startkodon auch im Kontext des natürlichen 5'UTR genutzt wird. Ergänzt wird diese Beobachtung durch die Expression des Konstruktes *piapG2*, bei dem die gesamte cDNA stromabwärts eines viralen c-myc Promotors ins Expressionsplasmid eingefügt wurde. Dieses Konstrukt gewährleistet demnach eine der natürlichen Situation am meisten angenäherte Simulation und zeigt ein Proteinprodukt in der erwarteten Größe von 26 kDa. Das die stromabwärts liegenden Startkodons ebenfalls effektiv für eine Translationsinitiation genutzt werden können, zeigen die kleineren Banden in fast allen Spuren. Expressionsprodukte, die am 1. ATG im Leseraster des IMAP1 Proteins beginnen, enden jedoch abrupt an der „Tag“-Kassette und sind somit etwas (ca. 3 kDa) kleiner. Wird der *imap38* Genomklon im Expressionsplasmid in die CHO-K1 Zelllinie eingebracht so ist bereits nach 24 h eine deutliche Bande in der Höhe des rekombinanten IMAP1 Proteins nachweisbar und ein bis zwei schwächere Banden darunter (Spur11). Diese Situation ist der *in vivo* Situation am meisten angenähert. Die cDNA wird ohne Fusionsanteile oder andere Modifikationen transkribiert, so dass die Translationsinitiation unter fast natürlichen Konditionen erfolgt. Die Einschränkung besteht lediglich darin, dass der verwendete Zelltyp Maus- bzw. Malaria-spezifische Translations-Regulationsfaktoren nicht aufweisen kann. Alle Haushaltsgenprodukte für eine „normale“ Translation stehen jedoch zur Verfügung. Alle Experimente zeigen, dass ausschließlich das erste Leseraster der *imap38* cDNA in einer nachweisbaren Menge translatiert wird. Die Expression des zweiten Leserasters kann offenbar in den verwendeten Expressionssystemen wirksam unterdrückt bzw. ganz verhindert werden, was auf eine Regulation auf Translationsebene hindeutet.

Diese Form der regulierten Translation wird oft von Sekundärstrukturen des 5'UTR beeinflusst. Um solchen möglichen Regulationsmechanismen auch bei der *imap38*-RNA nachzugehen, wurde der 5'UTR im Hinblick auf mögliche Sekundärstrukturen untersucht. Diese Sekundärstrukturen resultieren aus Wechselwirkungen innerhalb der Basenstapel und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Zusätzlich kann das Rückgrat mit den Basen oder mit anderen Zucker- bzw. Phosphatgruppen interagieren (Chastein & Tinoco 1991). Die einfachste Struktur ist die perfekte Paarung komplementärer Bereiche zu einem Doppelstrang (Helix oder Stamm), wobei dies auch immer einen ungepaarten Einzelstrang Abschnitts (Loop) als Brücke voraussetzt (Hairpin). Die Doppelstrang-Region kann durch symmetrische oder asymmetrische interne Loops genauso wie durch einseitige Loops (bulge-Loops) unterbrochen werden. Befinden sich derartige Sekundärstrukturen in näherer Umgebung zu einem Startkodon und weisen sie eine ausreichende Stabilität ($\Delta G -50$ kcal/mol) auf, so können sie den Zugang der Translations-Initiationsfaktoren behindern oder unterbinden. Weniger stabile Strukturen können durch die Helicase-Aktivität des Prä-Initiationskomplexes entwunden und so überwunden werden. Der Nachweis solcher Sekundärstrukturen kann mit Hilfe von Computerprogrammen erfolgen, deren Algorithmen auf dem Prinzip der Energieminimierung beruhen (Zucker 1981 und Mathews 1999). Allerdings ist zu beachten, dass nicht immer die Struktur mit der theoretisch errechneten niedrigsten freien Energie die „echte“ Sekundärstruktur darstellt. Die Geschwindigkeit, mit der sich Strukturen während der RNA Synthese bilden, kann auch dazu führen, dass sich metastabile Strukturen durchsetzen. Derartige Möglichkeiten werden mittlerweile auch von verfügbaren Programmen berücksichtigt. Die Struktur des 5'UTRs der *imap38* RNA (Base 1-631) wurde mit dem von Zucker entwickelten Programm untersucht und die energieärmste Struktur hier abgebildet. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den Sequenzbereichen um die AUG Kodons 5-9. Es sind aber keine Sekundärstrukturen ersichtlich, die der Prä-Initiationskomplex nicht mehr überwinden könnte

Um endgültige Klarheit über die Nutzung der beiden Leseraster zu erhalten, wurde die Expression von IMAP38-1 in Säugerzellen in Angriff genommen. Eine nachweislich IMAP38-1 oder -2 exprimierende Mauszelllinie existierte nicht, zumal der genaue Zelltyp noch nicht bestimmt worden war. Auch die Antiseren hatten in den Proteinextrakten der Milz zu keinen eindeutigen Resultaten geführt. Als ein heterologes, gut charakterisiertes und handhabbares Expressionssystem bot sich deshalb die CHO-K1 Zelllinie an, welche alle Haushaltsgene besitzt und ausgezeichnet für das Einbringen von Plasmid-DNA geeignet ist. Das Ziel der Expression war in erster Linie, ähnlich wie bei der zellfreien *in vitro* Translation, eine Antwort auf die Frage zu erhalten, welches Leseraster der RNA genutzt wird. Zu diesem Zweck wurden die cDNA dreimal in den Vektor pMycHisTag kloniert (A,B,C). Auf der

**Abbildung 6**

Sekundärstruktur des 5'UTR's der *imap38* RNA von Position 1 bis 631. Die Struktur wurde mit Hilfe der „M. Zucker RNA folding Website“ erstellt. Die Abbildung zeigt die thermodynamisch stabilste Struktur des 5'UTR. Es sind keine Elemente bzw. Strukturen vorhanden, die von der Helicase-Aktivität des Präinitiationskomplexes nicht aufgelöst werden könnten.

3'-Seite wurde, durch das Einfügen einer (B) bzw. zweier (C) zusätzlichen Basen in den PCR-Primer, eine künstliches Leseraster-Verschiebung erzeugt, so dass in jedem denkbaren Leseraster eine Fusion mit dem C-terminalen MycHisTag erfolgen konnte. Die Konstrukte enthielten fast den gesamten 5'UTR, exklusive des Bereiches stromaufwärts der *HindIII* Restriktionsschnittstelle, und endeten 3'seitig mit der letzten Aminosäure des ersten Leserasters (siehe Primer *iapstart-A,B,C*). Die transiente Transfektion in CHO-K1 Zellen und die Untersuchung der entsprechenden Proteinprodukte mit der Western-Blot Analyse zeigt, dass ausschließlich das erste Leseraster genutzt wird, welches das bekannte 27 kDa Produkt exprimiert. Die Nutzung der AUG's in den beiden anderen Leserastern erfolgt nicht, wie Abbildung 7 deutlich erkennen lässt.

Nachdem sich das erste Leseraster als das „wahrscheinlichere“ Expressionsprodukt erwiesen hatte, erfolgte die nähere Charakterisierung auch weiterhin im heterologen System der CHO-K1 Zelle. Für die zelluläre Lokalisation des IMAP-1 Proteins wurde das Verfahren des Protein-,Taggings“ eingesetzt. Dieses Verfahren fusioniert die kodierende cDNA mit einer für das „Tag“ kodierenden Sequenz, welche den Nachweis des Fusionsproteins nach Expression ermöglicht. Neben der schnellen Durchführbarkeit liegt der Hauptvorteil in der Unabhängigkeit von spezifischen Antikörpern, deren Erzeugung und Qualität nicht immer für die Anforderungen der Immunfluoreszenz ausreicht. Im vorliegenden Fall wurde die kodierende cDNA des IMAP38-1 Proteins mit der des „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP) fusioniert. Das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierte GFP-Gen kodiert für ein Molekül von 238 Aminosäuren (ca 27 kDa) und wurde durch Methoden der Molekularbiologie derart optimiert, dass eine stärkere Fluoreszenz erreicht wurde. Bestimmte Mutationen innerhalb des Chromophors verändern das Absorptionsspektrum. Der Austausch des Ser65 zu Threonin, Cystein, Alanin bewirken einen weitgehenden Verlust des Absorptionsspektrums bei 395 nm und eine verstärkte Anregung bei 488 nm, einer Wellenlänge, die optimal in der Immunfluoreszenz verwendeten Filtern entspricht. Weiterhin zeigt die S65T Mutante des GFP gegenüber dem Wildtyp eine sechsfach stärkere Quantenausbeute (Helligkeit), keine Photoisomerisierung und ein sehr langsam ablaufendes Photobleaching (Cubitt *et al.* 1995). Für den Einsatz in Säugerzellen wurde zusätzlich die Kodon-Nutzung angepasst. Nach Expression in Säugerzellen ist das GFP typischerweise homogen im Cytoplasma und Zellkern verteilt. Offensichtlich besitzt GFP keine Präferenz für ein bestimmtes Zellkompartiment. Hingegen bewirkt die Fusion des Moleküls an vollständige Proteine oder isolierte Signal-Peptide eine spezifische subzelluläre Lokalisierung des GFP, die ausschließlich durch das fusionierte Protein bzw. Peptid bestimmt wird (Köster & Hauser 1999). Im Falle des IMAP38-1 Proteins wurde dieses an den C-Terminus des EGFP fusioniert und transient in CHO-K1 Zellen exprimiert. Das Ergebnis war eine eindeutige Kernlokalisierung des Fusionsproteins und ist in Abbildung 8 dargestellt. Obwohl die Computerunterstützte Suche kein bekanntes Kernlokalisierungssignal in der IMAP38-1 Sequenz identifizieren konnte, enthält die Aminosäuresequenz offenbar Signalelemente die einen Kerntransport auch des 55 kDa großen Fusionsproteins gewährleisten. Die Größe dieses Fusionsproteins sichert, dass ein Kerntransport gerichtet und aktiv erfolgen muss, da nur Moleküle bis zu einer Größe von 50 kDa passiv (durch Diffusion) in den Kern gelangen können.

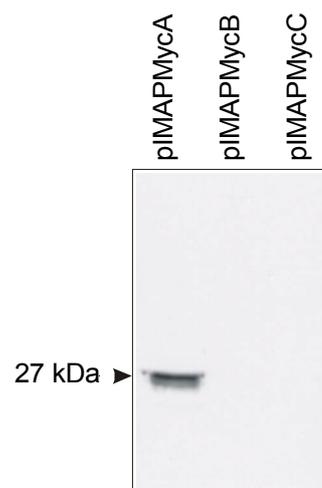
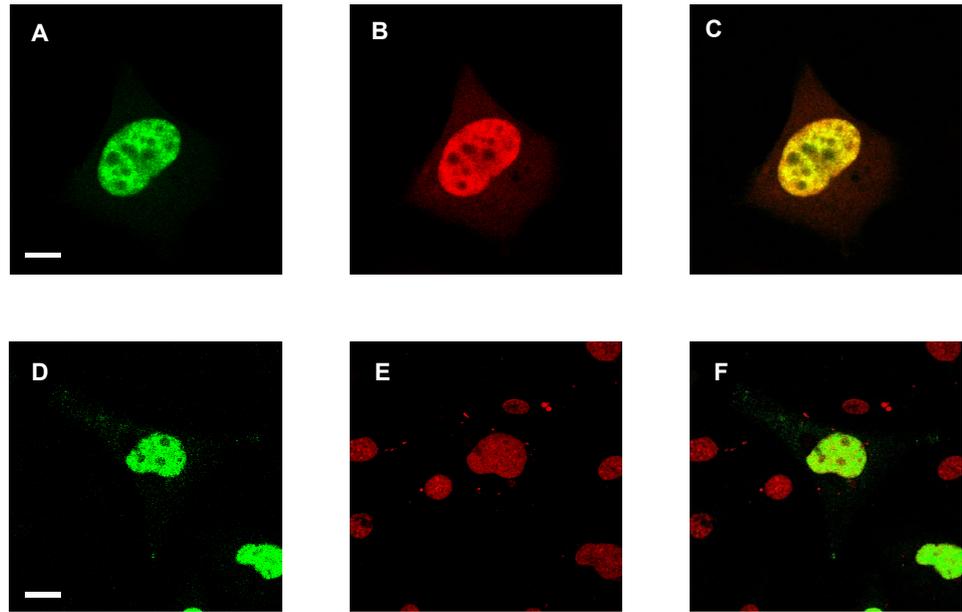


Abbildung 7

Western-Blot von CHO-K1 Zellen transfiziert mit Plasmidkonstrukten welche in jedem Leseraster die Fusion eines Translationsproduktes mit dem Myc6xHisTag ermöglichen. Der Nachweis erfolgte mit einem anti-Myc-AK als Primärantikörper. Das Konstrukt pIMAP38-MycA enthält die *imap38* cDNA inklusive des fast vollständigen 5'UTR und ermöglichen 3'seitig eine Fusion mit dem Myc6xHisTag des Expressionsvektors. Die anderen Konstrukte sind identisch, durch das Einfügen einer bzw. zweier zusätzlicher Basen in die 3' PCR-Primer bei Konstrukt pIMAP38-Myc-B und C können auch Proteinprodukte der anderen beiden Leseraster mit dem Tag fusionieren und detektiert werden. Eine Expression des zweiten großen Leserasters der *imap38* mRNA würde ein Signal im Konstrukt pIMAP38MycB ergeben. Es zeigt sich aber ausschließlich ein Signal in Zellen, welche mit pIMAP38MycA transfiziert worden waren. Dies entspricht der Expression eines Produktes des ersten Leseraster beginnend am AUG⁴²⁶ und einer Größe von ca 27 kDa.

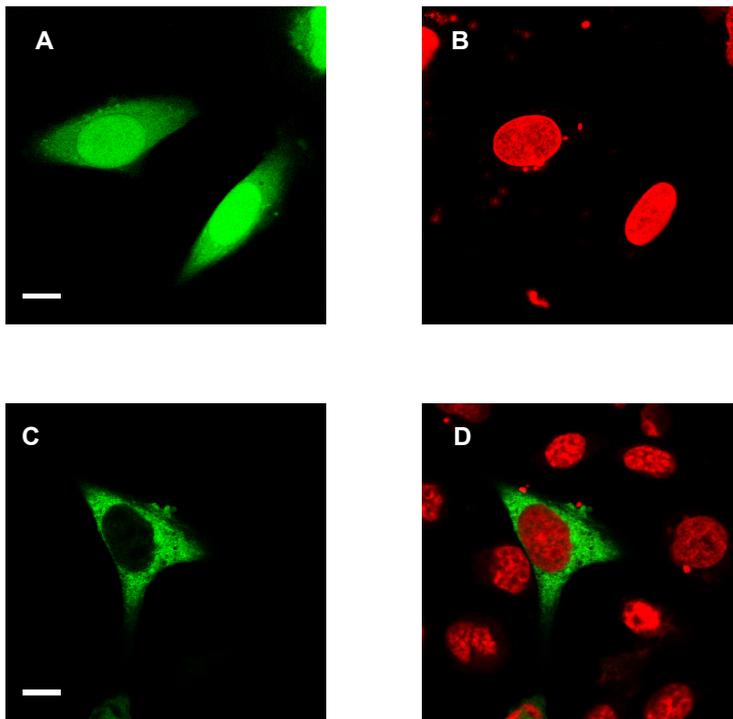
Abbildung 8

Lokalisierung des IMAP38-1 Proteins in CHO-K1 Zellen. CHO-K1 Zellen wurden transient mit den Plasmiden pEGFP-IMAP38-1 (A,B,C) und pIMAP38-1-MycHisTag (D,E,F) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und entweder direkt (EGFP) oder durch Antikörperfärbung (anti Myc-Tag AK + sek AK-FITC) nachgewiesen (grün). Zusätzlich wurde der Zellkern durch Propidiumjodid markiert (rot). Die Überlagerung der beiden Kanäle beweist die Kokolokalisierung von IMAP38-1 mit dem Zellkern (gelb).



3.1.1 Identifizierung eines unbekanntes Kernlokalisierungssignals

Die zelluläre Kokolokalisierung zeigte in allen Experimenten eine eindeutige Kokolokalisierung des IMAP38-1 Proteins im Zellkern. Der Transport von Proteinen ohne Kernlokalisierungssignal (KLS) kann als Kotransport mit anderen Proteinen erfolgen. Der weitaus größte Teil der Proteine wird jedoch in den Zellkern mit Hilfe eines solchen Signals transportiert. Diese Kernlokalisierungssignale lassen sich in drei Kategorien einteilen (Hicks 1995). Das klassische KLS ist das des großen T Antigen beim SV40 Virus. Diese besteht aus vier basischen Aminosäuren (Lysin o. Arginin), denen ein Prolin als α -Helix-brecher vorangestellt ist (PKKKRKV). Ein weiterer Typ von KLS ist das zweigeteilte Signal des Nucleoplasmins (Robbins *et al.* 1991). Es besteht aus zwei basischen Aminosäuren, einem 10 Reste umfassenden Verbindungsstück gefolgt von 3-5 basischen Aminosäuren. Die dritte Kategorie ist das am N-Terminus lokalisierte KLS, welches an einigen Hefe Proteinen z. B. Mat α . Weil die genaue Festlegung von Kernlokalisierungssignalen schwierig ist, orientiert sich das Programm PSORTIII in erster Linie am Anteil der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Ein Anteil von mehr als 20 % dieser Aminosäuren bedeutet eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein im Kern lokalisiertes Protein. Weil das Computerprogramm PSORTIII für das IMAP38-1 Protein keine eindeutige Aussage treffen konnte, sollte ein zweifellos vorhandenes Kernlokalisierungssignal experimentell mit Hilfe von Deletionsklonen eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pEGFP-IMAP38-1 mit den, in der kodierenden Region schneidenden Restriktionsenzymen *BstEII*, *EcoRV*, *ApaI*, und *XmnI* linearisiert. Anschließend wurde mit *BamHI*, das 3'seitig der einklonierten *imap38-1* DNA im Vektor schneidet, ein entsprechendes Stück der *imap38* cDNA entfernt und das Plasmid rezirkularisiert. Die so konstruierten Plasmide ergaben die Deletionsklone Δ 1-4, die C-terminal verkürzte EGFP-IMAP38-1 Proteine exprimieren sollten (Δ 1 44,8 kDa; Δ 2 42 kDa; Δ 3 34 kDa; Δ 4 37 kDa; Ausgangskonstrukt 52 kDa). Diese Deletionsklone wurden in CHO-K1 Zellen transient transfiziert und nach 24h für die konfokale Laserscanningmikroskopie vorbereitet.

**Abbildung 9**

Lokalisierung der EGFP-IMAP38-1 Deletionsklone D1-D4. Bild A zeigt die gleichmäßige Verteilung von EGFP über Cytosol und Zellkern einer CHO Zelle. Bild B lokalisiert durch die Propidium-Jodid gefärbte DNA die Ausdehnung des Zellkerns. Bild C und D zeigen die Lokalisierung des Deletionsklons EGFP-IMAP1- Δ 1. Diese Deletionsklone wurden durch Verkürzung der *imap38* cDNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen und anschließender Re-Ligation im Vektor pEGFP-IMAP1 erzeugt. Die Deletionsklone zeigen eine cytosolische Verteilung des verkürzten EGFP-IMAP38-1 Fusionsproteins, der Zellkern ist ohne Fluoreszenz. Mit der Verkürzung des C-Terminus um 86 Aminosäuren (Deletionsklon Δ 1), wurden offenbar die für die Kernlokalisierung wichtigen Bereiche und Strukturen entfernt. Ein ungerichteter, diffusionsabhängiger Kerntransport des Fusionsproteins ist nicht zu beobachten. Die Abbildung C und D ist exemplarisch für die weiteren Deletionsklone Δ 2- Δ 4. Der Maßstabbalken zeigt eine Länge von 10 μ m.

Die in Abbildung 9 c dargestellte Aufnahme zeigt eine cytoplasmatische Fluoreszenz, des Deletionsklons EGFP-IMAP38-1 Δ 1- Δ 4. Das Erscheinungsbild entspricht der Kontrolle, die EGFP ohne Fusionsanteil exprimiert (Abbildung 9A). Offensichtlich ist der C-Terminus für die Kernlokalisierung verantwortlich, da schon der Deletionsklon Δ 1 bei dem C-terminal 86 Aminosäuren fehlen, nicht mehr in den Kern transportiert wird. Um diese Region hinsichtlich ihrer Steuerungseigenschaften zu testen und ungerichtete Faktoren wie z.B. Diffusionsprozesse auszuschließen wurden diese 84 Aminosäuren mit der 120 kDa großen β -Galactosidase, einem eindeutig cytoplasmatischen Protein, fusioniert. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pcDNA3.1HisB/*lacZ* mit *Bpu*1102I und *Eco*RI geschnitten und ein PCR Amplifikat des 3'Endes der *imap38* cDNA einkloniert. Von diesem Vektor ausgehend, kann die β -Galactosidase als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag und einem C-terminalen IMAP38-1 Anhang exprimiert werden. Wie Abbildung 10 zeigt, ergibt der transient in CHO-K1 Zellen transfizierte Ausgangsvektor pcDNA3.1/His B/*lacZ* eine eindeutige Fluoreszenz im Cytoplasma, der Fusionsvektor ein ebenso eindeutiges Signal im Zellkern.

Hiermit ist der Nachweis erbracht, dass die letzten 86 Aminosäuren des IMAP38-1 Proteins ein Kernlokalisierungssignal enthalten. Ohne ein eindeutiges Steuerungssignal könnte die 120 kDa große β -Galactosidase niemals aufgrund von Diffusionsprozessen in den Zellkern gelangen, da hier die Obergrenze bei einer Größe von 55 kDa liegt. Um eine genauere Eingrenzung der Region zu erhalten, die für den Kerntransport verantwortlich ist, wurde die cDNA, welche die C-terminalen 86 Aminosäuren codiert, mittels PCR in überlappende Subdeletionen unterteilt. Hierfür dienten die PCR Primer GFP-D4a-dBsp und GFP-D4a-bBam. Die so klonierten Fusionen zeigten leider keinerlei Unterschiede hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation, so dass eine eindeutige Zuordnung von wenigen Aminosäuren als Steuersequenz am C-Terminus des IMAP38-1 Proteins nicht erfolgen kann.

3.1.2 Expression und Charakterisierung von IMAP38-2

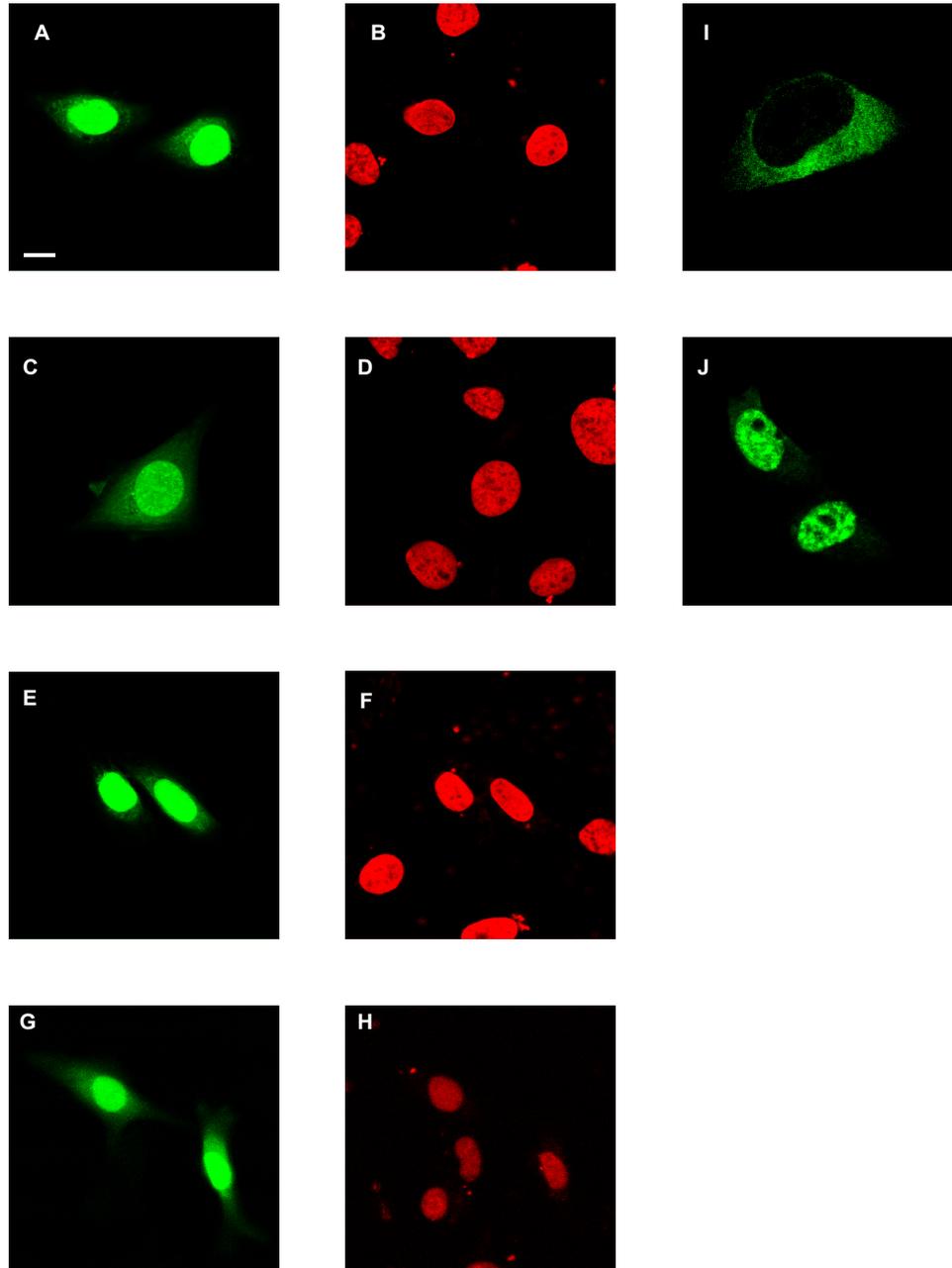
Obwohl in Abschnitt 3.1.1 eine Expression des zweiten Leserasters in CHO-K1 Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine heterologe Expression des zweiten Leserasters in Pro- und Eukaryonten versucht. Möglicherweise sind spezifische Milzzell-Regulationsmechanismen für die Aktivierung der Translation verantwortlich, was allerdings nur mit

Abbildung 10 Funktionaler Beweis für die Wirksamkeit des C-Terminus als Kernlokalisierungssignal. Der C-Terminus wurde mittels PCR in vier überlappende Deletionskonstrukte eingeteilt, $\Delta 4a$ Bild A+B, $\Delta 4b$ Bild C+D, $\Delta 4c$ Bild E+F, $\Delta 4d$ Bild G+H und mit dem

C-Terminus von EGFP fusioniert. Der grüne Kanal zeigt die EGFP Fluoreszenz, der rote Kanal zeigt die Propidiumjodidfluoreszenz und markiert den Zellkern.

Als Kontrolle dient die β -Galactosidase, welche im Cytoplasma lokalisiert ist, Bild I.

Wird jedoch der C-Terminus von IMAP38-1($\Delta 4$) C-terminal an die β -Galactosidase gehängt, so wird auch diese in den Zellkern transportiert, Bild J. Der Masstabkern markiert eine Länge von 10 μ m



einem geeigneten Antikörper *in vivo* überprüft werden kann. Dem Ziel einen solchen Antikörper zu gewinnen, dient die prokaryontische Expression, die eukaryontische hatte die Aufgabe, die zelluläre Lokalisierung vorab in einem heterologen System zu erforschen.

Die Expression des IMAP38-2 Proteins in Bakterien gestaltete sich zunächst als schwierig. Eine Expression ausgehend vom Vektor pRSET-B unter Kontrolle des viralen T7 Promotors zeigte keinerlei Expression. Auch eine Überprüfung mittels Western-Blot Technik (anit 6His-AK) verlief negativ. Die während der Expression aufgenommenen Wachstumskurven zeigten eine Stagnation bzw. eine Abnahme der Bakterienanzahl unmittelbar nach Zugabe des Expressionsinduktors IPTG. Offensichtlich ist auch eine sehr geringe Expression des rekombinaten IMAP38-2 Proteins für die Bakterienzelle toxisch. Aufgrund guter Erfahrungen mit dem GST-Expressionssystem, wurde die kodierende Sequenz von IMAP38-2 mit PCR amplifiziert und in den *Bam*HI-*Eco*RI vorbehandelten Vektor pGEX-3X kloniert. Das Ergebnis ist eine Genfusion des N-Terminus mit dem C-Terminus der Glutathion-S-Transferase (GST). Mit diesem System ließ sich IMAP38-2 problemlos exprimieren, weil die Glutathion-S-Transferase eine toxische Wirkung milderte. Als problematisch erwies sich in diesem Fall aber die schlechte Löslichkeit des GST-IMAP38-2 Fusionsproteins, da im Ge-

gensatz zum 6xHisTag keine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen konnte. Um die Löslichkeit zu verbessern wurde ein neues PCR Amplifikat kloniert, welches die kodierende cDNA bis zur Transmembrandomäne (AS 1-246) enthielt. Doch auch diese Expression führte zu unlöslichen Proteinaggregaten von IMAP38-2 wie in Abbildung 11 zu sehen ist. Der letzte Schritt war die erneute Klonierung der cDNA ohne Transmembrandomäne, aber mit C-terminalen 6xHis Tag, das über die PCR Primer eingefügt wurde. Diese als GST-IMAP38-2-6xHis bezeichnete Genfusion konnte erfolgreich exprimiert und wie Abbildung 31 zeigt auch zur Homogenität aufgereinigt werden. Für die Produktion eines anti-IMAP38-2 Antikörpers wurde ein synthetisches Polypeptid, das mit dem Programm „Antigen“ (PCGENE Paket) identifiziert (vgl. Abbildung 2) worden war, kovalent an KLH gekoppelt und NMRI Mäuse mit diesem Konjugat immunisiert. Die Antiseren wurden mit Hilfe des rekombinanten Proteins getestet, zeigten aber keine ausreichende Spezifität, weshalb wieder das heterologe Expressionssystem der CHO-K1 Zelle für die weiteren Untersuchungen genutzt wurde.

Das Programm PSORTIII ergab für das IMAP38-2 Protein eine Lokalisation im Endoplasmatischen Reticulum. Es ist zwar kein klassisches ER Retentionssignal am C-Terminus vorhanden (KDEL), jedoch findet das Programm ein N-terminales Retentionsmotiv, das dem Typ XXRR entspricht. Es besteht aus den Aminosäuren 2-5 (PQLR). Für die Aminosäuren 251-267 weist die Software eine Transmembrane aus. Die Vorhersage der Membrantopologie nach dem Algorithmus MTOP von Hartmann *et al.* 1989, ergibt eine Orientierung, bei der der N-Terminus ins ER-Lumen ragt, während sich der C-Terminus im Cytosol sich befindet. Die experimentelle Überprüfung der intrazellulären Lokalisation erfolgte durch transiente Expression der cDNA als Fusion mit EGFP und dem Myc6His-Tag. Der für das zweite Leseraster kodierende Bereich der cDNA wurde mit Hilfe der PCR Primer „R2GFPC1HindII“ und „R2GFPC1BamHI“ amplifiziert und in den Vektor pEGFP-N3 ligiert. Mit den Primern „raster2-HindIII“ und „raster2-Xba“ erfolgte die Klonierung in den Vektor pMycHisTag. Die transiente Transfektion zeigte nach 24h eine deutliche Expression der Fusionsproteine, welche im Fall des EGFP direkt, im Fall des MycHisTags nach einer Immunfärbung sichtbar beobachtet werden konnte. Es zeigte sich eine eindeutige Kolokalisation im Endoplasmatischen Reticulum, welche durch Kolokalisation mit dem gegen KDEL gerichteten Antikörper verifiziert wurde.

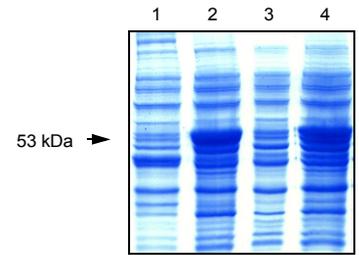
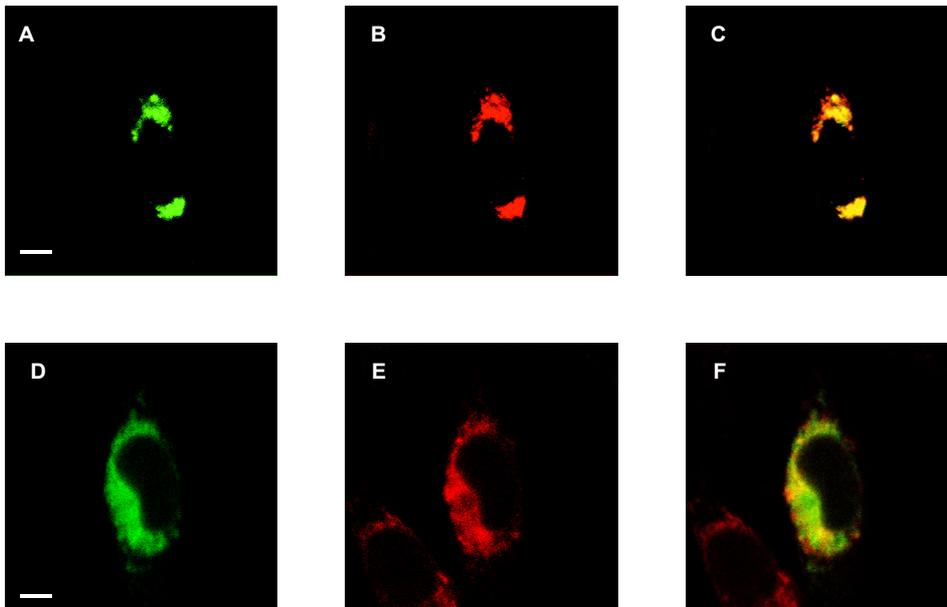


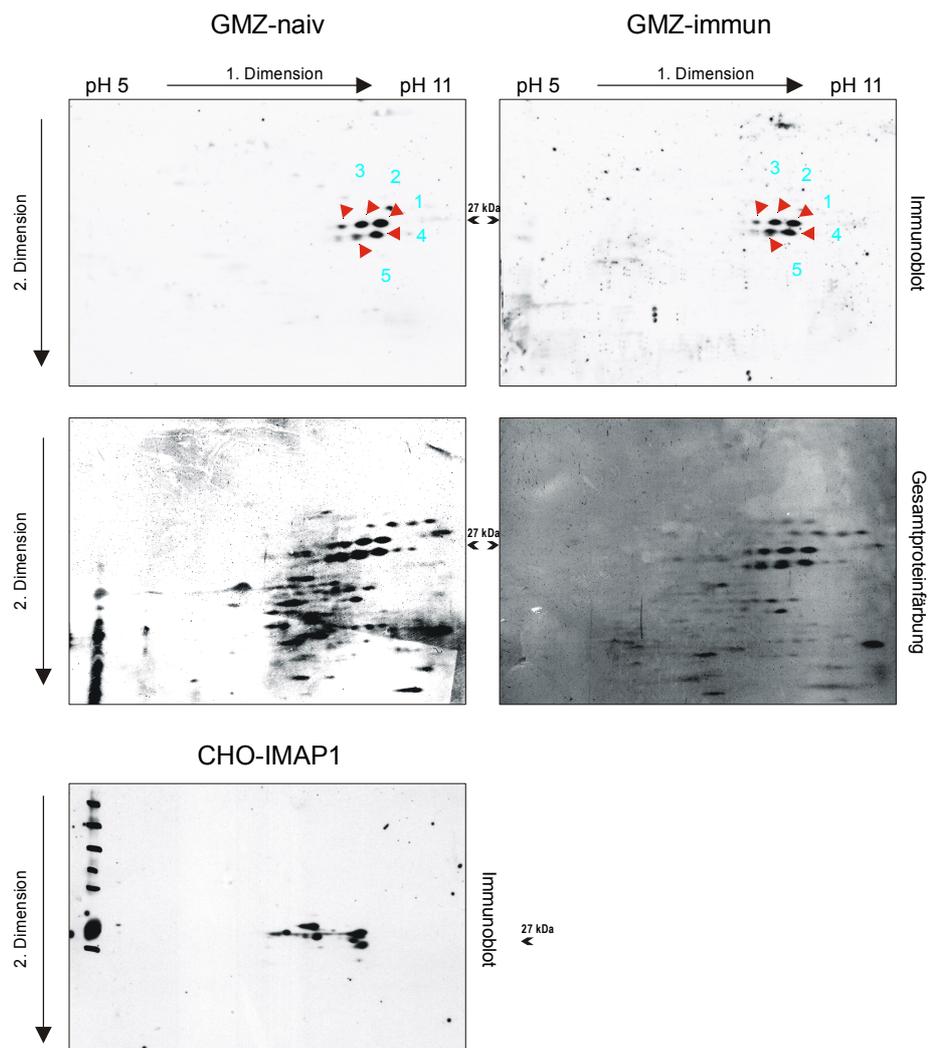
Abbildung 11
Expression von IMAP38-2 als GST-Fusionsprotein in *E. coli*. Spur 1 zeigt *E. coli* Gesamtprotein vor Induktion der Expression und Spur 2 eine Probe 4 h nach der Induktion. Die zusätzliche starke Bande repräsentiert das um den Bereich der Transmembrandomäne verkürzte GST-IMAP38-2 Fusionsprotein. Dieses Produkt war jedoch unter physiologischen Bedingungen unlöslich, wie die Spuren 3 (Überstand nach Zellyse mit Ultraschall = lösliche Fraktion) und Spur 4 (Unlösliches 20.000 g Pellet nach Zellyse) zeigen. Die IMAP38-2 Bande befindet sich ausschließlich in der unlöslichen Fraktion. Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgte dann über ein zusätzlich eingefügtes 6xHis Tag und ist in Abbildung 31 dargestellt.

Abbildung 12
Zelluläre Lokalisation von IMAP38-2 im ER von CHO-K1 Zellen. Die Zellen wurden transient mit den Plasmiden pIMAP38-2-MycHisTag (A,B,C) und mit pIMAP38-2-EGFP transfiziert und das Protein durch Immunfärbung (anti-Myc AK + sek. AK-FITC) bzw. direkt (EGFP) im konfokalen LSCM (grün) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde in den Präparaten das ER mit Hilfe eines spezifisch gegen KDEL gerichteten AK (rot) angefärbt. Die Überlagerung beider Aufnahmen beweist die Kolokalisation von IMAP38-2 mit ER Proteinen (gelb). Die Maßstabbalken zeigen eine Länge von 5 µm.

3.1.3 Identifizierung und Isolierung von putativen IMAP38-1 Protein aus immunen Milzzellen

Die Ergebnisse der in Abbildung 5 dargestellten ein-dimensionalen Immunoblots von Gesamtmilzzellen zeigten keine differentielle Expression zwischen naiven und immunen Tieren, sondern eine sehr intensive Doppelbande auch auf Ebene der Gesamtproteinfärbung. In einer solchen Bande liegen mehrere hundert bis tausend Proteine neben- bzw. übereinander, weswegen der Verdacht nahe lag, dass an dieser Stelle Kreuzreaktionen oder Mengeneffekte von anderen Proteinen die spezifische Antikörperbindung an IMAP38-1 stören könnten. Um diese Beeinflussungen zu umgehen wurde, eine zusätzliche Auftrennung des Proteingemisches in Angriff genommen. Diese, als zweidimensionale Gelelektrophorese bezeichnete Auftrennung, wurde erstmals 1975 von O'Farrel und Klose unabhängig voneinander veröffentlicht. Sie zeigten, dass die Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-Gelelektrophorese in der Lage ist, äußerst komplexe Proteingemische aufzutrennen. Das Verfahren setzte sich rasch als hochauflösende Trenntechnik zur Reinheitsüberprüfung und zur Isolierung von Proteinen durch. Aufgrund des stark basischen Charakters des IMAP1 Proteins (pI 10,2) konnte eine ausreichende Auftrennung der basischen Proteine nur mit Hilfe der Nicht-Gleichgewichts-Gradienten-Gelelektrophorese stattfinden. Hier

Abbildung 13
Immunoblots von Milzzellen und CHO-K1 Proteomen. Für die Identifizierung der von den anti-IMAP38-1 Antikörpern markierten Doppelbande wurden die Milzzellextrakte zusätzlich in der zweidimensionalen Nicht-Gleichgewichts-Gradienten-Gelelektrophorese (NEPHGE) in Abhängigkeit ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Der anschließende Immunoblot erfolgte erneut mit dem gereinigten anti-IMAP38-1 AK und zeigte ein Muster von fünf punktförmigen Banden (Spots) in Höhe des vorhergesagten Molekulargewichtes im basischen Bereich. Dieses Muster war auch in den Gesamtproteinfärbungen (India Ink) gut wiederzufinden, was die präparative Isolierung dieser Spots für die Massenspektroskopie erleichterte. Als Absicherung diente der Vergleich mit dem CHO-K1 Zell Proteom, welches IMAP38-1-c-my-6His-Tag markierten Form exprimiert. Auch befinden sich die 5 bzw. 6 Signal-Spots im erwarteten Molekulargewichtsbe- reich und vergleichbarer Basizität.



wird, wie der Name schon verrät, nicht eine Fokussierung bis zum Erreichen des Isoelektrischen Punkts eines jeden Proteins angestrebt, sondern durch Umkehr der Elektroden und Auftragen des Proteingemisches am sauren Ende des Rundgels, eine verbesserte Auftrennung der basischen Proteine erzielt (O'Farrel, 1977). Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte gemäß der molekularen Größe der Proteine im SDS-Gel. Die Ergebnisse dieser Auftrennung sind in Abbildung 13 dargestellt und zeigen die erfolgreiche Auftrennung der Doppelbande in 5 bzw. 6 einzelne Proteinspots. Das Muster von jeweils drei Spots deren Intensität von sauer nach basisch hin zunimmt ist, sowohl im Immunoblot, als auch in der Gesamtproteinfärbung gut zu erkennen und lässt sich reproduzierbar zur Deckung bringen. Dieses Muster befindet also im erwarteten molekularen Größenbereich und markiert extrem basische Proteine. Als zusätzliche Kontrolle für die Proteingröße und die Basizität wurde parallel das Proteom von CHO-K1 Zellen aufgetrennt, welche das IMAP38-1-c-myc-6xHis Fusionsprotein exprimieren. Dieser Immunoblot wurde dann zuerst mit dem kommerziellen anti-cmyc Antikörper und, nach dem „Strippen“ mit dem gereinigten anti-IMAP1 Antikörper inkubiert. Das Ergebnis war ein identisches Muster von ebenfalls 5 bzw. 6 punktförmigen Banden im gleichen molekularen Größenbereich und gleicher Basizität wie das Muster der Milzzellblots. Das Muster dieser Immunoblots konnte präzise reproduziert werden und ermöglichte die Identifizierung und Isolierung der entsprechen Proteinspots aus dem Coomassie gefärbten Gel, welche anschließend mit Hilfe der Massenspektroskopie näher charakterisiert werden sollten.

3.1.4 MALDI-TOF Analyse der isolierten Proteine und Abgleich mit Peptid-Datenbanken

Unter Massenspektrometrie versteht man eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Sie wird seit den 60er Jahren eingesetzt. Dazu wird der Dampf einer Probe mit Elektronen (70 eV) aus einem Heizdraht beschossen. Die Elektronen brechen Bindungen auf und ionisieren die Probenmoleküle, welche im magnetischen Feld in Abhängigkeit Ihrer Masse und Ladung abgelenkt werden. Bei Biomolekülen wie Proteinen und DNA versagen jedoch herkömmliche Massenspektrometer, weil so große und geladene Moleküle nicht flüchtig sind und zudem unter dem hochenergetischen Elektronenbombardement zerfallen würden. Dieses Problem löst die **Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation (MALDI)** wo intakte Peptide oder Proteine in die Gasphase springen. Dies wird möglich durch den Einbau der Proteine in einen UV-absorbierenden Kristall. Diese mit Protein-Einschlüssen verunreinigten Kristalle werden im Hochvakuum des Massenspektrometers mit einem UV-Laserimpuls bestrahlt. Der setzt die UV-absorbierenden Moleküle und damit auch die eingebauten Proteine frei. Gleichzeitig übertragen die sauren UV absorbierenden Moleküle Protonen auf die Proteine und laden sie positiv auf. Ein Molekül mit

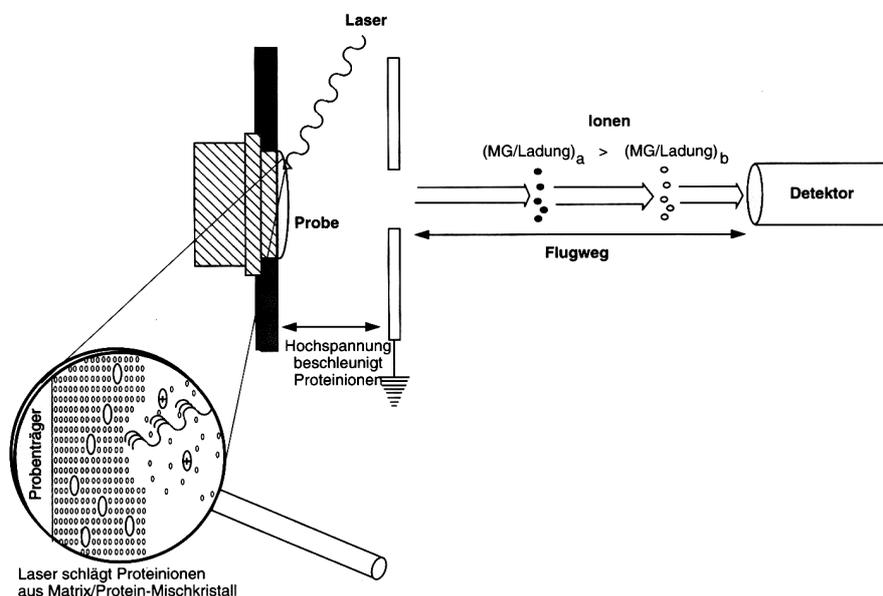


Abbildung 14
Schematische Darstellung der Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionisation.

Tabelle 5

MALDI-TOF Analyse unbekannter Milzproteine nach Trypsin-Spaltung. Die Tabelle zeigt die monoisotopischen Massen der Peptidspaltfragmente, welche im Fall der unbekannt Proteine experimentell ermittelt wurden. Diese wurden dann mit den theoretisch berechneten Massen der HIMAP38-1 und -2 Spaltfragmente verglichen.

den Eigenschaften UV-Absorption, Cokristallbildung und Protonentransfer bezeichnet man als Matrix. Die protonierten Proteine gehen ohne Hydratwasser und Gegenionen wie Na⁺ oder Cl⁻ in die Gasphase und werden durch ein elektrische Feld auf einen Schlitz zu beschleunigt, durch den sie in eine feldfreie Flugröhre gelangen. Alle Ionen werden durch das gleiche Feld beschleunigt, so dass die resultierende Geschwindigkeit proportional zu eins durch die Wurzel aus Masse und Ladung ist. Bei konstanter Wegstrecke erreichen die verschiedenen Proteinionen zu verschiedenen Zeiten den Detektor, weshalb die Analysevorrichtung als Flugzeitanalysator („time of flight“ TOF) bezeichnet wird. Die Genauigkeit der Massenbestimmung liegt zwischen 0,1 und 0,001 Promille (Chait & Kent 1992). Im vorliegenden Fall sollten vom anti HIMAP38-1 Antiserum markierte Protein-Spots mit Hilfe der MALDI-TOF identifiziert werden. Dies erfolgte, indem ein Proteaseverdau (Trypsin) definierte Spaltfragmente lieferte, deren molekulare Massen bestimmt werden. Das Ergebnis war ein „Fingerabdruck“ der unbekannt Proteine, welche mit dem Spaltmuster des HIMAP38-1 Proteins und Datenbanken verglichen wurden. Insofern ist diese Methode eine schnellere und verlässlichere Alternative für die Proteinidentifizierung im Vergleich mit der N-terminalen Proteinsequenzierung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Es zeigt sich, dass kein Muster der Spaltfragmente mit dem theoretischen Muster der Spaltfragmente des HIMAP38-1 Proteins übereinstimmt. Dieses Experiment bildet den Abschluss der Arbeiten mit dem anti-HIMAP38-1 Antiserums. Es ist festzuhalten, dass im Antiserum spezifische, gegen das HIMAP38-1 Protein gerichtete Antikörper, vorhanden sein müssen, weil rekombi-

Probe 1	Probe 2			Probe 3		Probe 4		Probe 5		IMAP 1	IMAP 2
662,5	2163,0	1410,8	2220,1	862,6	2612,1	659,5	1910,9	640,4	2163,0	572,3	604,3
832,5	662,5	1505,9	2190,0	1234,8	2952,0	805,6	1921,0	659,5	2185,1	585,3	620,3
862,6	781,5	1538,9	2257,8	1250,7	3153,1	862,6	1937,0	754,4	2201,1	636,4	625,3
1013,6	785,4	1560,9	2273,1	1310,7	3211,0	1013,6	2163,1	795,6	2245,1	644,4	643,3
1035,6	805,5	1695,8	2296,1	1351,8	4458,2	1168,7	2185,1	805,6	2251,1	880,5	644,4
1087,6	832,5	1717,8	2315,0	1367,8	4535,9	1234,8	2201,1	811,5	2229,1	888,4	670,5
1188,8	836,5	1733,8	2330,9	1433,9		1250,7	2273,1	862,6	2273,2	915,4	737,4
1347,9	862,5	1739,7	2311,1	1475,8		1310,7	2289,1	1003,7	2267,1	1111,6	789,4
1377,8	854,5	1779,9	2352,9	1506,0		1326,8	2295,1	1013,6	2289,1	1155,6	812,5
1399,8	870,4	1755,8	2385,9	1566,8		1351,8	2311,2	1018,6	2296,3	1332,7	821,5
1695,9	1013,6	1799,0	2393,2	1623,8		1376,8	2441,2	1062,7	2307,0	1452,8	886,5
1717,9	1035,6	1820,9	2494,8	1713,9		1377,8	2489,1	1312,8	2311,2	1512,8	907,4
1733,9	1051,5	1836,9	2517,8	1735,9		1383,8	2550,1	1369,9	2329,0	1554,8	919,4
1779,9	1087,6	1851,9	2517,8	1771,0		1433,9	2569,2	1377,9	2345,0	1819,9	1048,5
1799,0	1109,6	1880,1	2517,8	1870,0		1475,9	2612,0	1391,9	2384,0	2175,0	1071,6
1852,0	1125,6	1927,1	2517,8	1883,1		1486,8	2705,0	1407,9	2401,1	2811,3	1074,5
1880,0	1188,8	1902,0	2517,8	1899,1		1506,0	2952,0	1475,9	2550,1	3279,6	1075,6
1927,1	1165,7	1918,0	2517,8	1911,0		1509,8	3211,0	1506,0	2588,1		1409,7
2081,0	1221,7	1949,0	2517,8	1921,0		1566,8		1571,0	2572,2		1730,9
2096,9	1233,8	1965,0	2517,8	1937,0		1607,9		1602,0	2611,2		2091,2
2185,0	1259,7	1994,1	2517,8	1943,1		1623,8		1592,9	2633,3		2092,2
2201,0	1327,7	2008,1	2517,8	2163,1		1713,9		1608,9	2649,2		2178,9
2205,9	1352,9	2023,9	2517,8	2185,1		1735,9		1628,1	2717,0		2204,0
2273,1	1362,7	2039,7	2517,8	2193,0		1751,9		1672,1	4064,2		2562,2
2315,0	1377,8	2080,9	2517,8	2201,1		1771,0		1763,9			
2331,0	1399,7	2096,9		2273,2		1779,9		1779,9			
2386,0	1411,8	2148,9		2441,2		1870,0		1793,1			
2495,8	1415,7	2185,1		2489,1		1883,1		1801,9			
2550,1	1433,8	2201,0		2550,1		1879,9		1817,9			
2611,8	1437,7	2205,9		2569,3		1899,1		1921,1			

nante Proteine im Immunoblot und in der Immunfluoreszenz erkannt werden. In der Milz erkennt dieses Antiserum jedoch Proteine ähnlicher Größe und vergleichbarem pI, die aber, wie mit der Massenspektroskopie gezeigt wurde, nicht mit dem deduzierten IMAP38-1 Protein übereinstimmen.

3.1.5 Zelltypspezifität der *imap38* Expression

Aufgrund der wenig erfolgreichen Experimente mit den gegen IMAP38-1+2 gerichteten Antisera, wurde als alternative Technik die *in situ* Hybridisierung an FAC-sortierten Milzsubpopulationen durchgeführt. Die Vorstudie, mit denen die Methode der *in situ* Hybridisierung validiert wurde, erfolgte an transient transfizierten CHO-K1 Zellen und Milz-Gesamtzellausstrichen. Mit einer DIG markierten Antisense-RNA wurde das *imap38* Transkript in den verschiedenen Zellpopulationen nachgewiesen. Die „Antisense“-Sonde wurde durch *in vitro* Transkription der *imap38* cDNA (linearisiertes Plasmid) unter Verwendung von DIG markierten Nukleotiden erzeugt. Vom gleichen linearisierten Plasmid wurde in der Gegenrichtung eine „Sense“-Sonde als Negativkontrolle transkribiert. Die mit pIAP-G2 transient transfizierten CHO-K1 Zellen zeigten einzelne stark gefärbte Zellen zwischen vielen ungefärbten Zellen. Der Anteil der gefärbten Zellen entsprach der Transfektionsrate, die bei den Arbeiten zur Immunfluoreszenz beobachtet worden war. Die Negativkontrollen mit der „sense“-Sonde zeigten keine gefärbten Zellen und kaum störenden Hintergrund. Auch die Gesamt-Milzzellen zeigten eindeutige Unterschiede zwischen stark gefärbten und ungefärbten Zellen bei Verwendung der „Antisense“-Sonde. Die Verwendung der „Sense“-Sonde ergab ebenfalls durchweg ungefärbte Zellen ohne Hintergrund. Diese Ergebnisse ermutigten, die Hybridisierung der FAC-sortierten Zellfraktionen zu versuchen. Für diesen Zweck wurden jeweils 10.000 Zellen der jeweiligen FAC-sortierten Zellpopulation auf beschichteten Kammerobjektträgern adhärirt und entsprechend der Verwendung in der *in situ* Hybridisierung fixiert. Nach der Hybridisierung und der Immunfärbung wurde durch Auszählen der Anteil der *imap38* exprimierenden (deutlich gefärbten) Zellen ermittelt und auf die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen bezogen, was in Abbildung 15 dargestellt ist. Es zeigt sich, dass 81 % aller B-Zellen, 74 % aller Granulozyten und 71 % der Makrophagen die *imap38* RNA exprimieren, wohingegen es in natürlichen Killerzellen nur 66 % sind. Am auffälligsten sind jedoch die T-Zellen, die mit nur 6 % (α/β) bzw. 4 % (γ/δ) so gut wie gar keine *imap38* Expression aufwiesen. Diese Ergebnisse stimmen mit den früher durchgeführten Northern Experimenten überein (Krücken 1999). Dabei waren Milzzellen infizierter B10A Weibchen in drei verschiedenen Subpopulationen getrennt worden. Zuerst wurden auf Kunststoff-Petrischalen adhärenente Zellen angereichert und nicht adhärenente durch Abspülen entfernt. Die nicht-adhärenente Fraktion wurde nach Markierung mit anti- κ Ig über eine

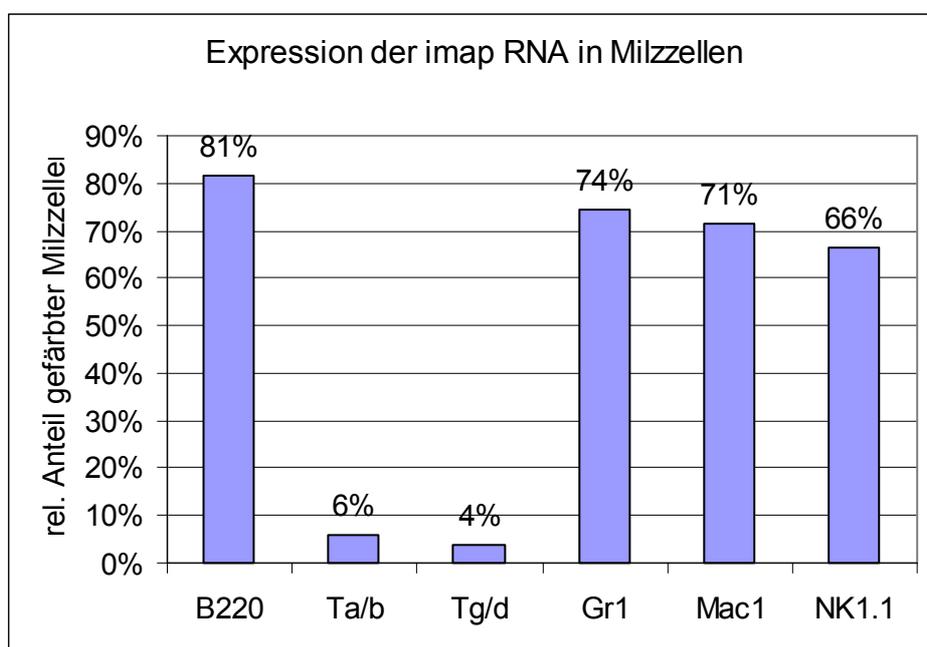


Abbildung 15
Expression der *imap38* cDNA verschiedener Milz Zelltypen immuner B10 Mäuse. Die Graphik zeigt die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung von den FAC-sortierten Milz Zellsubpopulationen. Es wurden jeweils 10.000 Zellen einer homogenen Zellpopulation auf beschichteten Objektträgern adhärirt, fixiert und mit einer *imap38* antisense-RNA Sonde hybridisiert. Die Digoxigenin markierte Sonde wurde über eine Antikörper-Enzymreaktion sichtbar gemacht, so dass der relative Anteil gefärbter Zellen durch Auszählen bestimmt werden konnte. Dieses Zählergebnis repräsentiert das Ausmaß der *imap38* Expression.

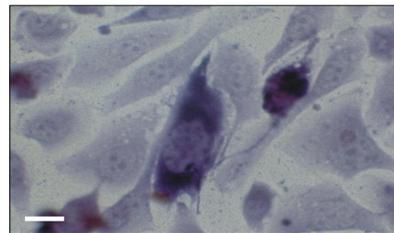
MACS Säule in eine IG+ B-Zell angereicherte und eine IG- T-Zell angereicherte Fraktion getrennt. Es zeigte sich, dass *imap38* stark in der adhärenenten und der Ig+ Fraktion, nicht jedoch in der Ig- Fraktion exprimiert wurde.

Ein zusätzliches Experiment bestand im Nachweis der *imap38* RNA in embryonalen Mäusemilzen die mit Hilfe der freundlichen Unterstützung von Hr. Lars Grotewohl (Institut für Entwicklungs- u. Molekularbiologie der Tiere HHU) durchgeführt wurde. Dadurch konnte auch eine deutliche basale Expression von *imap38* in 12 Tage alten NMRI Mäusen nachgewiesen werden. Die Expression ist dabei gleichmäßig über die innere Milz verteilt und nicht in der äußeren frühen Gewebskapsel sichtbar. Zusätzlich diente dieses Experiment als unabhängige positiv- und negativ-Kontrolle für die Funktion der *in situ* Hybridisierung mit *imap38* „Antisense“ und „Sense“ Sonden.

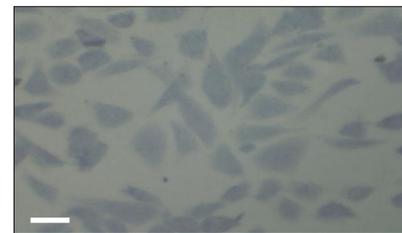
Quasi als Nebenprodukt der Untersuchung der zelltypspezifischen Expression von *imap38* wurde die Umverteilung der immunrelevanten Milzzelltypen nach einer Malariainfektion bestimmt.

Die Milz spielt bei der Immunantwort während einer Malariainfektion eine zentrale Rolle. Dies wird zuerst an der dramatischen Größenzunahme deutlich. Neben der Einwanderung von Zellen aus der Blutzirkulation spielen besonders die Neubildung von Zellen durch Hämatopoese, aber auch polyklonale B-Zell Aktivierung eine bedeutsame Rolle (Alves 1996). Ebenso sind drastische Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Milz zu be-

in situ Hybridisierung von transient transfizierten CHO-K1 Zellen

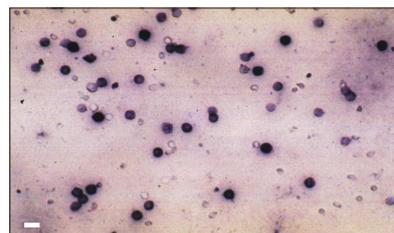


antisense-Sonde

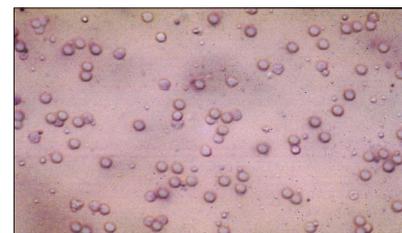


sense-Sonde

in situ Hybridisierung von Gesamt-Milzzellen



antisense-Sonde



sense-Sonde

In situ Hybridisierung von *imap38* RNA in embryonalen (14 Tage) Mäuse-Milzen



sense-Sonde

antisense-Sonde

Abbildung 16

Beispiele für die Validierung der *in situ* Hybridisierung: Als Sonde diente ein DIG-markiertes Antisense-Transkript und zur Kontrolle das entsprechende sense-Transkript der *imap38* cDNA. CHO-K1 Zellen, transient mit pIMAP38-Myc-6xHisTag transfiziert; Gesamtmilzzellen, und auch die embryonalen Milzen von BL10 (Weibchen) zeigen eindeutige Hybridisierungssignale mit dem antisense-Transkript und kein Signal bei Verwendung der Sense-Sonde. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 10 μ m bei den oberen vier Aufnahmen und ca. 100 μ m bei den embryonalen Milzen

beobachten, welche auf die durch *P. chabaudi* induzierte Apoptose in T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen zurückzuführen sind (Helmsby 2000). In Ermangelung einer Möglichkeit, das IMAP38-1 Protein mittels Immunfluoreszenz-Techniken in Milzzellen lokalisieren zu können, wurde als alternative Strategie die *in situ* Hybridisierung ausgewählt. Der Ansatz war, die mRNA mit Hilfe von DIG markierten Nukleinsäuresonden in den Milzzellen zu detektieren, und anschließend mit kommerziellen Antikörpern den Zelltyp zu bestimmen. Diese Methode erwies sich als ebenfalls nicht praktikabel, weil die Oberflächenepitope, welche die Antikörper erkennen sollten, von den Bedingungen der vorangegangenen Fixierungs- und Hybridisierungsschritte zerstört worden waren. Aus diesem Ergebnis entstand der Gedanke, den Vorgang umzukehren, also erst die Zellen zu markieren und danach die *in situ* Hybridisierung durchzuführen. Weil aber die zur Markierung der Antikörper eingesetzten Fluorochrome (FITC, Phycoerythrin) ebenfalls durch eine Hybridisierung beeinträchtigt werden,

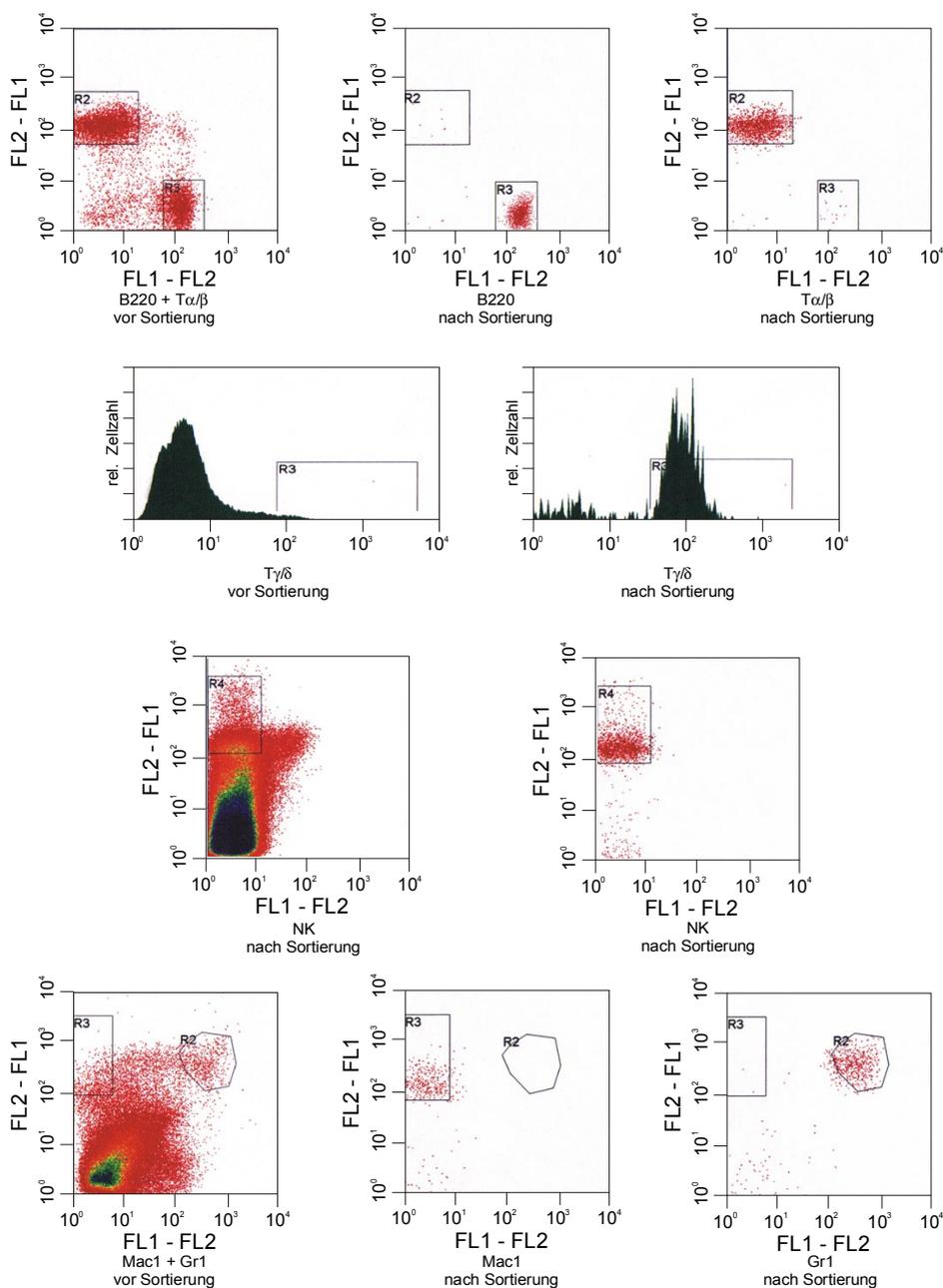
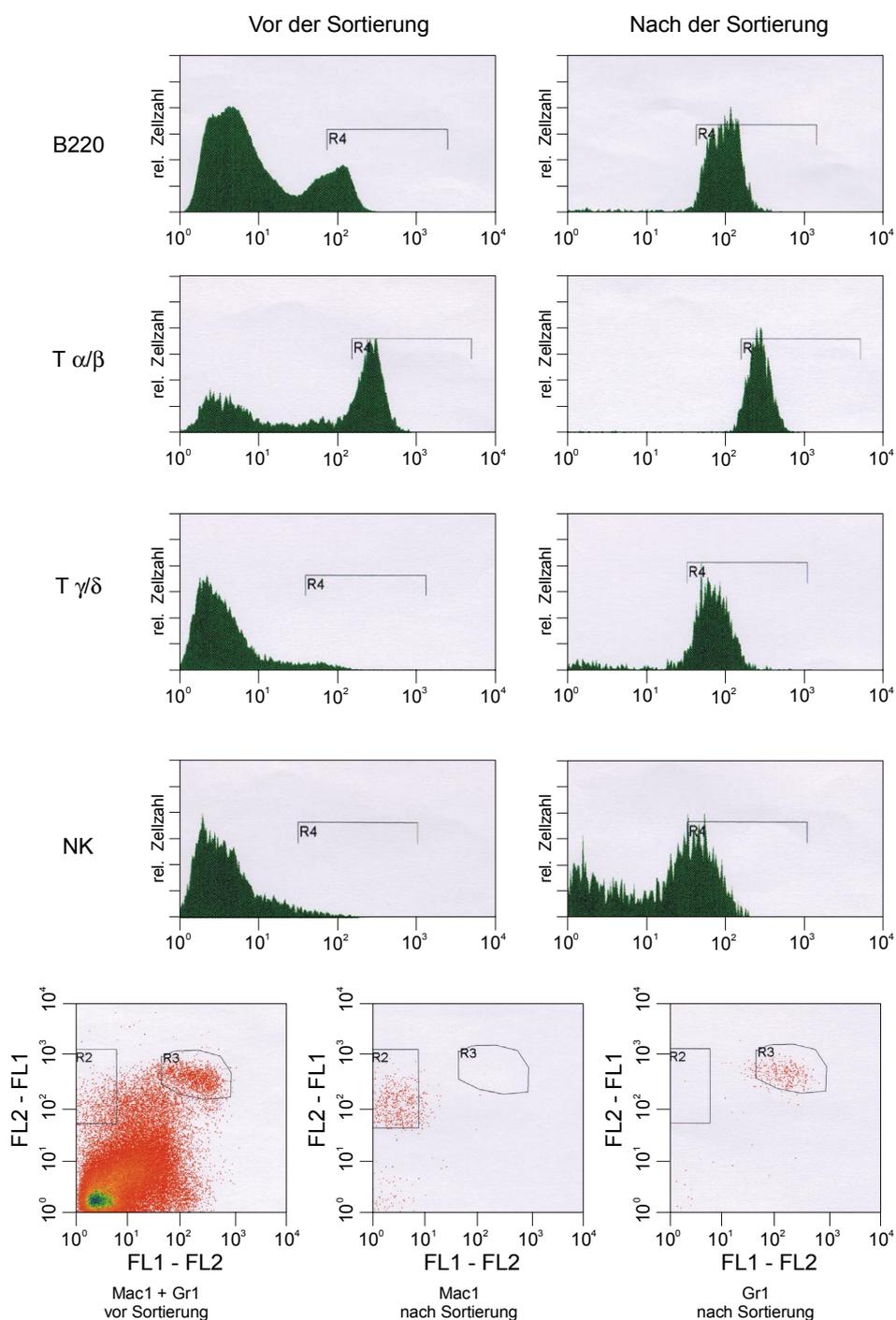


Abbildung 17
 Ergebnisse der FACS Sortierung von naiven Milzzellen von 57BL/10 Mäusen. Die Graphik zeigt die Eingrenzungen („Gates“) der Zellpopulationen vor und nach der Auftrennung

ergab sich als Ausweg nur die **FluoreszenzAktivierteCell-Sortierung (FACS)**. Bei dieser Methode werden monoklonale Antikörper gegen verschiedene Oberflächenproteine mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, um bestimmte Zellen in einer gemischten Population zu markieren. Das Zellgemisch wird dann durch eine Kapillare gedrückt, die einen Strahl feiner Tropfen erzeugt, von denen jeder nur eine Zelle enthält. Alle Tropfen passieren einen Laserstrahl. An den Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung, und die Farbstoffmoleküle, die an die Zelle gebunden sind, werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht. Ersteres liefert Informationen über die Größe und Granularität der Zellen. Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung der markierten monoklonalen Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine. Markiert man die Zellen mit einem einzigen Fluoreszenzfarbstoff, erscheinen die Daten üblicherweise als ein Histogramm der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl. Bei zwei oder mehreren Antikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen erscheinen die Daten hingegen als zweidimensionales Streudiagramm. Der Zellsortierer

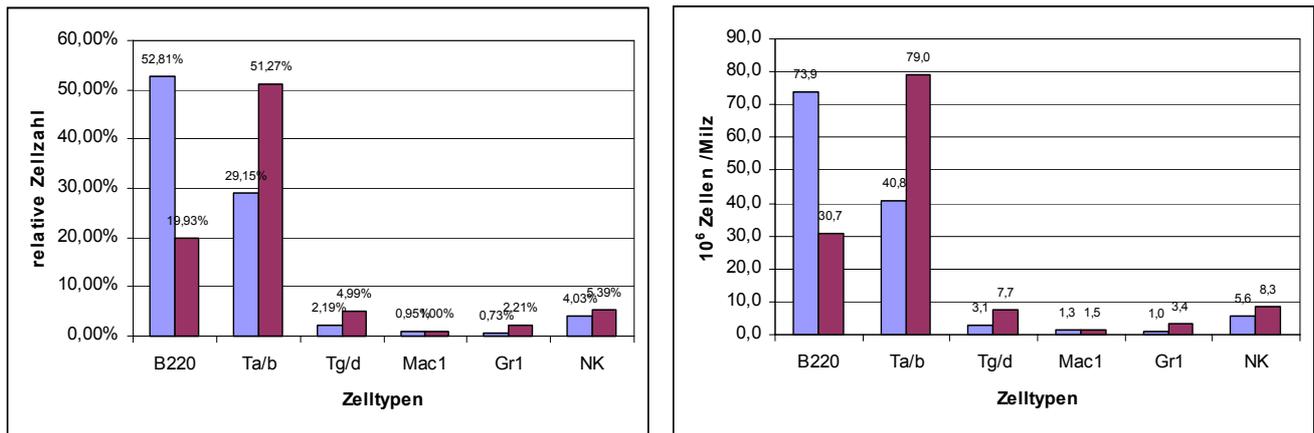
Abbildung 18
Ergebnisse der FACSORTIERUNG der **immun**en Milzzellen von 57BL10 Mäusen. Die Graphik zeigt die Eingrenzungen („Gates“) der Zellpopulationen vor und nach der Auftrennung.



verändert nach Anweisung des Computers die elektrische Ladung der Flüssigkeitstropfen, die markierte Zellen enthalten. Diese Tropfen werden durch ein elektrisches Feld aus dem Zellstrom abgelenkt, so dass sich die markierten Zellen von den unmarkierten abtrennen lassen. Für die Auftrennung der Subpopulationen der Milz wurden die in Tabelle 1 aufgezählten Antikörper verwendet. Diese dienen dazu, B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen und T-Zellen aufzutrennen. Bei den T-Zellen erfolgte eine weitere Auftrennung in α/β und γ/δ positive Zellen. Die Ergebnisse der Auftrennung sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 dokumentiert.

Abbildung 19

Prozentuale und absolute Verteilung immunologisch relevanter Milzzellen in naiven und immunen C57BL/10 Mäusen fünf Wochen nach einer Malariainfektion. Die Angaben resultieren aus der in Abbildung 18 dargestellten FACScan-Analyse. Die Werte der naiven Kontrolltiere C57/BL10 sind blau, die der immunen Tiere sind violett dargestellt.



3.1.6 Nachweis einer Protein-Protein Wechselwirkung mit IMAP38-1

Wertvolle Hinweise für eine Funktion des IMAP Proteins in der Zelle kann neben der Lokalisierung und des Expressionsmusters auch die Identifikation von möglicherweise bekannten Interaktionspartnern liefern. Diese Interaktionen zwischen Proteinen spielen bei den meisten biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Auf biochemischen Wege können solche Wechselwirkungen durch Co-Immunpräzipitation detektiert werden. Dies setzt aber das Vorhandensein von spezifischen, gegen das bekannte Protein gerichteten, Antikörper voraus. Mit Hilfe dieser Methode kann aber nur das apparente Molekulargewicht eines potentiellen Interaktionspartners bestimmt werden. Aussagen über die Sequenz und die damit verbundenen Identifikation des Co-Präzipitats sind auch mit den Methoden der modernen Bioanalytik schwierig zu erhalten. Das Hefe basierte „Two-Hybrid“ System (Fields & Song 1989) bietet die Möglichkeit, Protein-Protein Wechselwirkungen unter eukaryontischen Bedingungen *in vivo* zu untersuchen. Das der Methode zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Tatsache, dass sich eukaryontische Transkriptionsfaktoren wie das GAL4-Protein aus *S. cerevisiae* in eine DNA bindende und eine die Transkription aktivierende Domäne zerlegen lassen. Die DNA-bindende, N-terminale Domäne des GAL4-Proteins (GAL4 BD) erkennt spezifische Sequenzen (UAS) im „upstreambereich von den durch GAL4 regulierten, in das Hefegenom integrierten Reportergenen. Die aktivierende, C-terminale Domäne des GAL4-Proteins (GAL4-AD) initiiert mit Hilfe anderer Bestandteile des Transkriptionsapparates den Transkriptionsprozess. Eine Domäne kann allein die Transkription der Reportergene nicht in Gang setzen. Konstruiert man mit Hilfe von Plasmiden Hybrid-Proteine, bei denen jede der GAL4-Domänen mit einem von zwei miteinander interagierenden Proteinen gekoppelt ist und transformiert diese gemeinsam in Hefezellen, so werden GAL4 BD und GAL4 AD durch die Wechselwirkung zwischen den Proteinen einander so genähert, dass sie die Transkription der Reportergene in Gang setzen können. Die Transkription der Reportergene unterbleibt, wenn die Proteine nicht miteinander interagieren. Durch die Kopplung von Proteinen einer cDNA- oder genomischen Bibliothek an die aktivierende Domäne von GAL4 ist es möglich, die mit einem bekannten Protein interagierenden Partner schnell und effektiv zu detektieren (Bartel Fields 1995, Chien *et al.* 1991). Die Vorteile des „Two-Hybrid“-Systems bei der Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen bestehen

darin, dass die Interaktionen zwischen den Proteinen *in vivo* stattfinden und es aufgrund der Sensitivität des System möglich ist, auch schwächere Wechselwirkungen zu detektieren (Yang *et al.* 1995). Bei der Klonierung von cDNA Bibliotheken in GAL4 AD Plasmide sind die Sequenzinformationen der interagierenden Proteine direkt verfügbar (Luban & Goff 1995). Für die in diesem Fall erstellt cDNA Bank waren folgende theoretische Überlegungen vorausgegangen. Eine aus einer RNA-Population hergestellte cDNA Bibliothek sollte alle zum Zeitpunkt der Isolation exprimierte Gene eines Organismus oder Organs (Milz) enthalten. Da nicht alle mRNA Moleküle in einer Population mit der gleichen Häufigkeit vertreten sind unterscheidet man drei Häufigkeitsklassen: Häufigkeitsklasse I mit mehr 3500 Kopien pro Zelle; Häufigkeitsklasse II mit zwischen 20 und 3500 Kopien pro Zelle; und Häufigkeitsklasse III mit RNA's die in weniger als 20 Kopien vorhanden sind. Entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einer der drei Häufigkeitsklassen ist die mRNA-Sequenz in einer cDNA-Bibliothek repräsentiert. Im Idealfall entspricht die Zahl der rekombinanten Klone bei einer repräsentativen cDNA-Bibliothek dem relativen Anteil der jeweiligen mRNA an der Gesamtpopulation des entsprechenden Gewebes oder Organismus. Es wurde eine Bibliothek konstruiert, bei der auch mRNA's der Häufigkeitsklasse III mit einem Anteil von 0,001 % an der Gesamtpopulation ausreichend repräsentiert sind. Ausgehend von 30.000 verschiedenen mRNA Molekülen pro Zelle müssten dann mindestens 3×10^4 Rekombinante in einer repräsentativen Bibliothek vorliegen. Weil aber bei den verschiedenen Herstellungsschritten immer wieder Verluste auftreten, reicht diese Zahl statistisch nicht aus, um auch seltene mRNAs zu erfassen. Die tatsächliche notwendige Zahl von Klonen (N), die nötig ist, um einen ausreichenden Anteil von an seltenen mRNA Sequenzen zu repräsentieren, lässt sich nach der Gleichung $N = \ln(1-P) / (1 - 1/n)$ von Clark und Carbon 1976 berechnen. Dabei entspricht P der Wahrscheinlichkeit, mit der eine mRNA in der Bibliothek repräsentiert werden soll (hier $P = 0,99$) und der minimalen Anzahl spezifischer Sequenzen (hier $n = 30000$). Daraus ergibt sich für eine Maus-Milz cDNA Bibliothek eine notwendige Größe von ca. 140000 Klonen. Für die Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen können aber nur Fusionskonstrukte im richtigen Leseraster genutzt werden, was die Zahl um den Faktor drei auf 420.000 erhöht.

Die Primärbibliothek umfasste $5,1 \times 10^6$ Klone und konnte somit als repräsentativ bezeichnet werden. Der Anteil von rekombinaten gegenüber nicht-rekombinanten (Klone ohne Fragment nach *EcoRI-XhoI* Restriktion) wurde durch Längenbestimmung der cDNA Inserts ermittelt und lag bei 2,3 %. Der Titer der amplifizierten HybriZAP-cDNA Bibliothek betrug $4,1 \times 10^{10}$ pfu/ml. Bei einem Volumen von 330 ml enthält die amplifizierte Bibliothek eine Gesamtmenge von $1,35 \times 10^{13}$ Klonen. Jeder der in der Primärbank vorhandenen Klone ist in der amplifizierten Bibliothek statistisch gesehen $2,6 \times 10^6$ mal vertreten. Für das Screening wurde ein Teil der amplifizierten HybriZAP-cDNA Bibliothek durch Massen *in vivo* Excision in eine pAD-GAL4 Bibliothek umgewandelt. Diese Umwandlung musste ebenfalls eine hohe Effizienz aufweisen, um die statistische Verteilung der Klone in der Bank nicht zu verändern. Es wurden 3×10^8 pfu der amplifizierten HybriZAP-cDNA Bibliothek eingesetzt, was der 59fachen Menge des Titers der Primärbibliothek entspricht. Die anschließende Titerbestimmung der pAD-GAL4-Plasmid-Bibliothek ergab einen Wert von $3,2 \times 10^8$ was bedeutet, dass auch nach der *in vivo* Excision die eingesetzten Klone repräsentativ in der pAD-GAL4 Bibliothek vertreten sind. Vor der Transformation in Bait-Plasmid-haltige kompetente Hefezellen wurde ein Teil der pAD-GAL4 Bibliothek mit Hilfe von *E. coli* XL0LR amplifiziert. Aufgrund unvollständiger Infektion der *E. coli* XL0LR Zellen durch die eingesetzten Phagemide sowie durch den Verlust bei der anschließenden Plasmidpräparation kann es dabei zu einer Unterrepräsentation von einzelnen Klonen kommen. Daher wurde nach dreimaligen unabhängigen Screening mit einem Amplifikationsansatz eine neue Amplifikation der pAD-GAL4 Bibliothek durchgeführt.

Für das Screening wurde ein Fusionsprotein aus IMAP-1 mit der Bindedomäne von GAL4 konstruiert. Hierzu wurde die gesamte kodierende Sequenz mit PCR amplifiziert und mit der GAL4-Bindedomäne im Vektor pBD-GAL4 fusioniert. Diese Köder-Plasmide wurden zuerst in kompetente Hefen eingebracht, welche anschließend für die Transformation der pAD-GAL4 Bibliothek eingesetzt wurden.

Für die Transformation wurden 50 µg Plasmid DNA der amplifizierten pAD-GAL4 Bibliothek verwendet. Ausgehend von einer durchschnittlichen Plasmidgröße von 8400 bp (7620 bp pAD-GAL4-Vektor + cDNA Insert) entspricht das einer Gesamtzahl von $5,1 \times 10^{12}$ DNA Molekülen pro Transformation. Der Quotient aus diesem Wert und der Amplifikationsrate von $2,6 \times 10^6$ besagt, dass in den verwendeten 50 µg Plasmid $1,96 \times 10^6$ pAD-GAL4 Moleküle vorhanden sind. Bei einer Wahrscheinlichkeit von 1/3 für eine Klonierung im richtigen Leseraster ergeben sich dann für jede Transformation $0,65 \times 10^6$ Moleküle pro 50 µg Plasmid eines jeden in der Primärbibliothek vorhandenen Klons. Die Transformationseffizienz der einzelnen Ansätze schwankte 400 und 1000 Kolonien pro µg eingesetzter pAD-GAL4 DNA. Die Gesamtzahl an pAD-GAL4-haltigen Kolonien pro Transformation lag demnach im Bereich zwischen 2×10^4 und 5×10^4 . Weil sich bei hohen Plasmid-Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Hefe mehrere Plasmide aufnimmt, kann nur über die Wiederholung der Transformationsereignisse und nicht über die eingesetzte Plasmidmenge die Transformantenanzahl erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden maximal drei unterschiedliche Target-Plasmide aus einem Hefeklon isoliert, was bei 5×10^4 Kolonien insgesamt $1,5 \times 10^5$ aufgenommenen unterschiedlichen Plasmiden pro Transformation mit 50 µg Plasmid DNA entspricht. Nur etwa 3×10^{-6} Prozent der eingesetzten DNA Moleküle würden demnach transformiert. Umgerechnet auf die Moleküle eines Klons der Primärbibliothek mit einem cDNA Insert im richtigen Leseraster bedeutet dies, dass die Wahrscheinlichkeit einer Transformation bei 0,005 liegt. Bei einer Transformationseffizienz von 1000 Kolonien pro µg DNA müssten demnach mindestens 200 Transformationen mit der amplifizierten pAD-GAL4 Bibliothek durchgeführt werden um zu gewährleisten, dass jeder in der Primärbibliothek vorhandene Klon im richtigen Leseraster mindestens einmal auf eine Interaktion mit IMAP38-1 getestet würde. Da die konstruierte cDNA Primärbibliothek aber eine 6,5 mal höhere Anzahl an Klonen aufwies, als für eine repräsentative Bank nötig gewesen wäre, würde sich die Zahl der für ein repräsentatives Screening notwendigen Transformationen auf eine Mindestzahl von 31 reduzieren. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 21 voneinander unabhängige, primäre Screening Runden mit der pAD-GAL4 Bibliothek durchgeführt und dabei ca. 400.000 Einzelklone überprüft. Dabei konnten zunächst 236 primär positive Kolonien detektiert werden. Diese Kolonien wurden im Hinblick auf die Expression des zweiten Reportergens (Adeninauxothrophie) überprüft, wobei 44 Kolonien auch hier Wachstum auf Ade-Platten anzeigten. Bei diesen wurde im nächsten Schritt die Expression des dritten Reportergens, der β -Galactosidase, mittels eines Farbstest getestet. Dabei konnten 4 Kolonien als positiv in der Expression aller drei Reportergene identifiziert werden, was in Abbildung 20 deutlich wird. Die Plasmid DNA dieser 4 Klone wurde aus den entsprechenden Hefekulturen isoliert und in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Nach der Präparation der Plasmid DNA wurden die verschiedenen Plasmide getrennt in Bait-haltige Hefezellen retransformiert und erneut auf die Expression der drei Reportergene hin untersucht. Diese Tests verliefen ebenso positiv wie die des Domänenwechsels, bei dem die Insertsequenz der positiven Klone in den Bindedomänen-Vektor kloniert wurde. Gleichzeitig wurde die IMAP38-1 Sequenz mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert und beide Konstrukte erneut in Hefezellen transformiert. Auch hier zeigte sich eine Expression aller drei Reportergene. Die Negativkontrollen, bei denen p53-BD Konstrukte mit den BD-Konstrukten der positiven Klone kotransformiert wurden, zeigten dagegen keine Expression der Reportergene. Zusätzlich ist anzumerken, dass die vier positiven Klone aus vier unabhängigen Screeningrunden entdeckt wurden, und nicht etwa aus einer einzelnen Transformation stammen. Die vier positiven Klone wurden vollständig sequenziert und der Abgleich mit den verfügbaren Genbanken führte zur Identifizierung der Klone als Epitheline (Genebank: MMEPT1 X6232 mRNA 2100 nt). Diese Epitheline, auch als Granuline bezeichnet, bilden eine neue Gruppe von Wachstumsfaktoren die erstmals 1990 von Bateman *et al.* bzw. Shoyab *et al.* 1990 beschrieben wurden. Die mRNA kodiert für ein gemeinsames Vorläufer-Protein Progranulin (Precursor), welcher posttranslational in ca. 6 kDa kleine Peptide gespalten wird.

Abbildung 20

Ergebnisse des „Two-Hybrid“ Screenings mit IMAP38-1 als Köder-Protein. Nach der Selektion durch Wachstum auf -Leu/-Ade Medium wurde das dritte Reportergen der Protein-Protein Wechselwirkung (β -Galactosidase) getestet. Im Falle einer Protein-Protein-WW wird die β -Galactosidase exprimiert und das in der Platte vorhandene Substrat umgesetzt, was zu der deutlich sichtbaren blau-grün Färbung der Hefekolonien führt. Die vier positiven Klone des Screenings, sowie die Positiv-Kontrollen GAL4 und p53-SV40 zeigen eine deutliche blau-grün Färbung. Die Negativ-Kontrollen LaminC-SV40 bzw. p53BD-5/13/39/42 zeigen keinerlei Färbung. Auch eine Wechselwirkung von IMAP38-1 mit sich selbst (z.B. Dimerbildung) ist nicht zu beobachten.

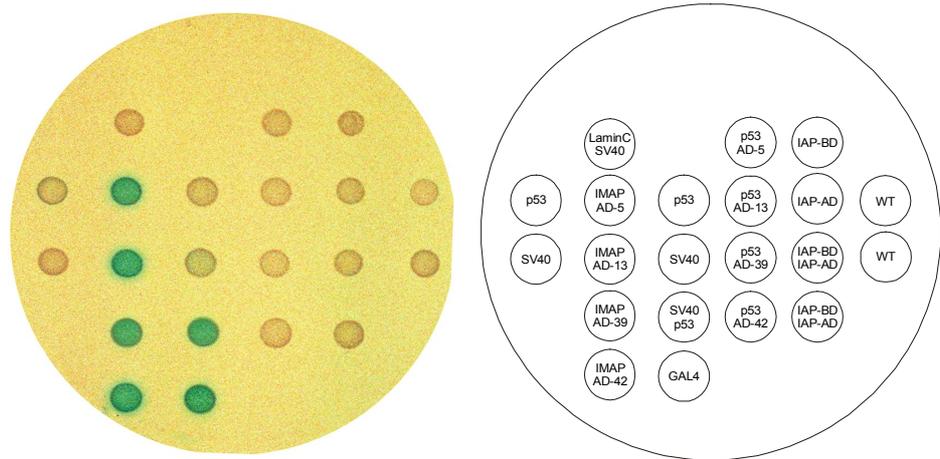
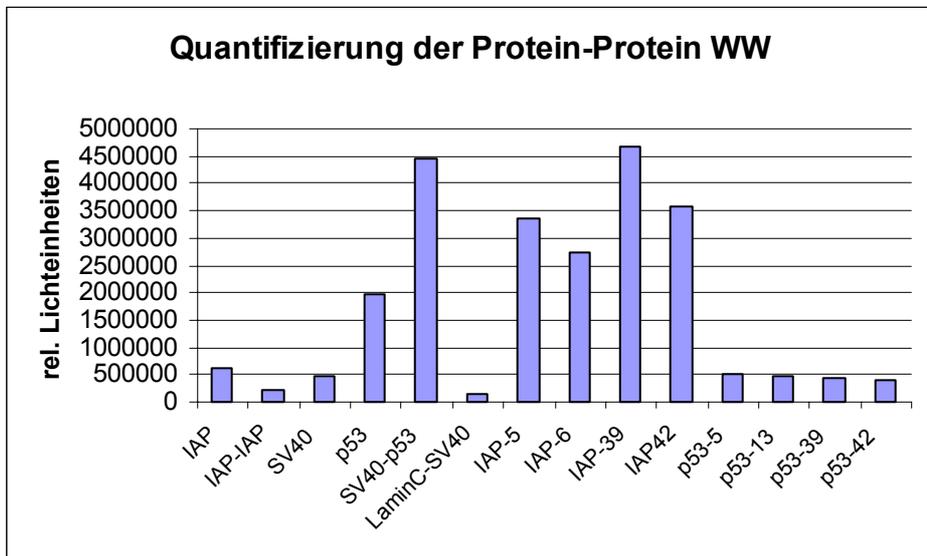


Abbildung 21

Quantifizierung der Protein-Protein Wechselwirkung von IAP mit positiven Klonen des Screenings. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Reporter-Gen Assay, bei dem die Expression des Reportergens β -Galactosidase proportional von der Stärke der Wechselwirkung der beiden Proteine IMAP38-1 mit den Klonen 5, 13, 39, 42 abhängig ist. Als Kontrollen fungieren SV40-p53 (positiv), LaminC-SV40 (negativ) sowie p53- mit den entsprechenden unbekanntenen Klonen (5, 13, 39, 42)



3.2 Klonierung und Charakterisierung der *himap1* cDNA

Die Identifizierung einer zu *imap38-1* homologen cDNA im Menschen erfolgte mit Hilfe der cDNA Genbank Nr. 597 des RZPD (Resourcenzentrum/Primäre Datenbank, im Deutschen Humangenomprojekt am MPI für Molekulare Genetik). Diese Genbank präsentiert cDNA Sequenzen einer männlichen humanen Milz, kloniert im Vektor pSPORT1, und transformiert in *E. coli* DH10B. Die Klone werden einzeln mit Hilfe von Robotertechnologie auf Nylon-Membranen aufgebracht, wobei jeder Filter ca. 27648 Klone enthält. Jeder Klon wird in doppelter Ausführung aufgebracht und ist so an zwei Positionen auf dem Filter zu finden. Diese hohe Dichte gewährleistet keine repräsentative Darstellung von allen in der Milz exprimierten Genen. Der Vorteil besteht jedoch in der Verlässlichkeit, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit, weil bereits nach einer Hybridisierungsrunde ein einzelner Klon definiert werden kann. Die Schätzungen bezüglich der Gesamtzahl humaner Gene, welche aus den Ergebnissen des humanen Genomprojektes abgeleitet werden, gehen mittlerweile von ca. 30000–40000 Genen aus (Ewing & Green 2000). Die Hybridisierung ergab auswertbare Signale, die zur Bestellung von 19 Klonen führten. Diese Klone wurden amplifiziert und die Plasmide isoliert. Von jeder Präparation wurden 10 μ g mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und mit Hilfe der „Southern-Blot“ Technik überprüft. Hierfür diente ebenfalls die Sonde, die für das Durchmuster der Genbank eingesetzt worden war. Es zeigte sich ein positives Hybridisierungssignal beim Klon DKFZp597K0368Q2, der

auch sofort mit Standardprimern von beiden Seiten sequenziert werden konnte. Ein direkter Vergleich der 1230 Basenpaar langen *himap1* cDNA mit der *imap38* cDNA ergab eine Übereinstimmung von 75 %. Die Suche nach offenen Leserastern mit dem Programm Clone-Manager 5 (Scientific & Educational Software) führte zu einem offenen Leseraster von 306 Aminosäuren, welche eine Übereinstimmung von 64 % (identische AS) und 75 % (ähnliche AS) mit dem IMAP38-2 Protein aufwies.

Der Transkriptionsstart wurde mit Hilfe einer vorgefertigten Adaptor ligierten Milz-cDNA „Bank“ hergestellt, welche als Template für die Klonierung sowohl unbekannter von 5', als auch 3' Enden dienen kann (Chenik *et al.* 1995). Diese Methode beginnt mit der cDNA Synthese ausgehend von hochgereinigter humaner Milz Poly(A)⁺ RNA. Für die Erststrangsynthese wurde ein Oligo(dT) Primer verwendet, der im 3' Ende zwei degenerierte Nukleotide enthält. Diese Nukleotide positionieren den Primer am Anfang des Poly-A Schwanzes und vermeiden so Probleme mit der Heterogenität der 3' Enden. Die Zweitstrangsynthese wurde mit einem Gemisch aus *E. coli* DNAPolymerase I, RNaseH und *E. coli* Ligase nach der Methode von Gubler & Hoffman 1983 durchgeführt. Nach dem Entfernen überhängender Enden mittels T4 DNA Polymerase, konnte die doppelsträngige cDNA an die Adaptoren ligiert werden. Diese Adaptoren sind teilweise doppelsträngig und am 5' Ende phosphoryliert, um ein Ligation an beiden Seiten der cDNA zu ermöglichen. Für die erste PCR Reaktion wurde ein *himap1* spezifischer Primer und ein der Adaptorsequenz entsprechender Primer eingesetzt. Nach einer weiteren Runde PCR mit ineinandergeschachtelten Primerpaaren, wurden die Primer und Nukleotide von den Amplifikationsprodukten abgetrennt und die entsprechenden Banden im Agarosegel aufgetrennt, isoliert und in den Vektor pCR2.1-TOPO ligiert. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe von Standardprimern. Das Ergebnis waren 17 unabhängige Klone, wobei 14 ein mit dem Ursprungs-Klon identisches 5' Ende aufwiesen. Drei Klone enthielten nur ein zusätzliches Adenin, was beweist das die cDNA in vollständiger Länge vorlag.

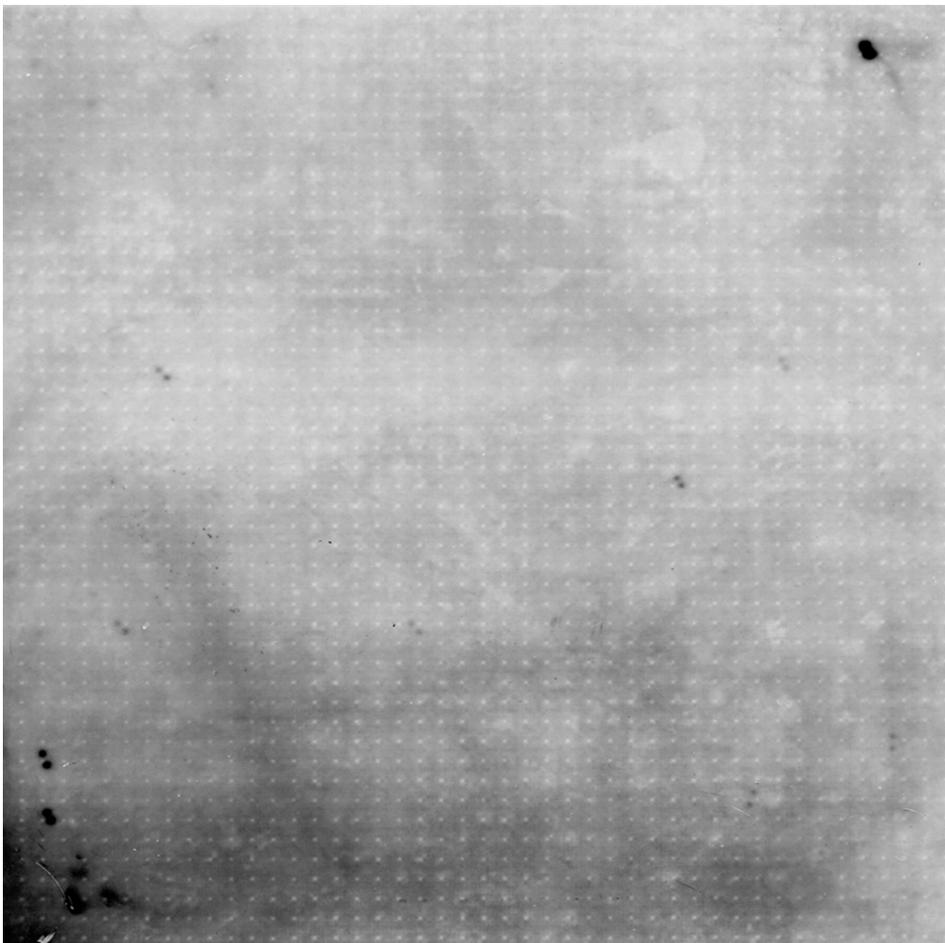


Abbildung 22

Northern-Hybridisierung des „High-Density“ Filters, welcher die Genbank Nr. 597 mit humaner Milz cDNA repräsentiert. Die Abbildung zeigt den Röntgenfilm nach 24h Exposition mit Verstärkerfolie. Die Hybridisierung erfolgte unter semi-stringenten Bedingungen (55° C, 0,5x SSC) mit der *imap38* PCR Sonde. Das Ziel war die Identifizierung einer *imap38* ähnlichen humanen cDNA. Die positiven Hybridisierungssignale sind 19 eng beieinanderliegende Doppelpunkte, deren Koordinaten mit einer Schablone ermittelt werden und zur Bestellung der entsprechenden Einzelklone führten.

Abbildung 23

Sequenz der *himap1* cDNA und deduzierte Aminosäuresequenz. Die Sequenz der *himap1* cDNA ist in 5'-3' Richtung dargestellt. Das Startcodon befindet sich in Position 79 das Stopcodon in Position 997. Das Polyadenylierungssignal befindet sich Position 1219. Das GGRK Motiv (gelb) am N-Terminus entspricht dem ER-Membran-Retentionssignal GRR. Die putative Transmembrandomäne erstreckt sich von AS 276-292 (rot) in der Nähe des C-Terminus.

```

1 ACAGCCGAAGGAAAGCAGCAGGTTGGGGCTTCTGTGGCCAACCTTCAGAGCCTGTACCAGGAAAGGT
70 AAGGTAAGCATGGGAGGAAGGAAGATGGCGACAGATGAAGAAAATGCTATGGTTTTAGAAGAGAACGCT
1 M G G R K M A T D E E N V Y G L E E N A
139 CAGTCCCGGCAGGAGTCCACGCGGAGGCTCATCCTTGTGGGAGAACAGGGGCCGGGAAGAGCGCCACT
21 Q S R Q E S T R R L I L V G R T G A G K S A T
208 GGAACAGCATCCTGGGCCAGAGACGGTTCTTCTCCAGGCTGGGGCCACGTCTGTGACCAGGGCCTGC
44 G N S I L G Q R R F F S R L G A T S V T R A C
277 ACCACGGGCAGCCGAGGTGGGACAAGTCCACCGTGAAGTCTGGGACTCCGGACATTTTCAGCTCC
67 T T G S R R W D K C H V E V V D T P D I F S S
346 CAAGTGTCCAAGACAGATCCTGGCTGTGAGGAGAGAGTCACTGCTACCTGCTCTCGGCCCGGACCC
90 Q V S K T D P G C E E R G H C Y L L S A P G P
415 CACGCGCTGCTCCTGGTGACCCAGTTGGGTCGGTTACCCGCCAGGACCAGCAGGCGGTGAGGCAGGTG
113 H A L L L V T Q L G R F T A Q D Q Q A V R Q V
484 AGGGACATGTTCCGGGAGGACGTCCTAAAATGGATGGTTCATCGTCTTACCAGGAAGGAGACCTGGCC
136 R D M F G E D V L K W M V I V F T R K E D L A
553 GGGGCTCCCTGCACGATTACGTGAGCAACACAGAGAACCAGGCGCTTGCAGGCTGGTGGCCGAGTGC
159 G G S L H D Y V S N T E N R A L R E L V A E C
622 GGGGCGGGTCTGTGCCTTTGATAACCGGGCCACCGGCCGGGAGCAGGAAGCCAGGTGGAGCAGCTG
182 G G R V C A F D N R A T G R E Q E A Q V E Q L
691 CTGGGATGGTTCGAGGGCTTGGTGTGGAGCACAAGGGCGCCATTACTCCAACGAGGTGTATGAGCTG
205 L G M V E G L V L E H K G A H Y S N E V Y E L
760 GCGCAGGTGCTGCGTGGGCAGGCCCTGAGGAGCGGCTCCGGCGGGTGGCGGAGCGGTGGCAGCCAGG
228 A Q V L R W A G P E E R L R R V A E R V A A R
829 GTGCAGAGGAGGCCATGGGCGCCTGGCTGTCCGGCCCGGCTGTGAAGTGGCTGAAGTCCCCAGGAGC
251 V Q R R P W G A W L S A R L W K W L K S P R S
898 TGGAGGCTGGGCTGGCCCTGCTGCTGGGGGGCGGCTCCTGTTCTGGGTGCTGCTCCACAGGCGGTGG
274 W R L G L A L L L G G A L L F W V L I H R R W
967 TCGGAGGCCGTTGCGGAGGTCGGGCTGACTGACAGCGCAGGTCTAAAACGAAGCAACTTGGTTAA
297 S E A V A E V G P D .
1036 GGGAGGCTGAATTCCTGGAGCTGAAGGGAAAACCTCATTCCAACGGAAGGAATCCTGTAGTTTCAGGCA
1105 TAGTTTTAATGACACAGAAAACCTTGTGCATCACCTTTGCAACTTTGCCAAAGCTCAGAGTTCACCTT
1174 TTAAGTTTTTAACTCATTTTAAATGATGTGTATGCAGAGTTTTAAAATAAATTCGTCTA

```

3.2.1 Vergleich von *himap1* mit ähnlichen cDNA bzw. Proteinsequenzen

Mit Hilfe des TBLASTN Programms konnten in der GeneBank Datenbank drei weitere *imap38* ähnliche cDNA's identifiziert werden. Diese werden im folgenden als *himap2* (accession number: AL110151), *himap3* (accession number: AK002158) und als *himap-4* (accession number: AK197200) bezeichnet. Die deduzierten Proteine zeigen einen Anteil von 48 % identischen (69 % ähnlichen) Aminosäuren für HIMAP2; 49 % identische (63 % ähnliche) Aminosäuren für HIMAP3 und 44 % identischen (65 % ähnlichen) Aminosäuren für (HIMAP4). Ein Vergleich mit dem IMAP38-2 Protein der Maus ergab 64 % identische

Aminosäuren und 75 % ähnliche. In der Maus sind bisher drei weitere Proteine beschrieben die eine starke Ähnlichkeit mit HIMAP38-1 bzw. IMAP38-2 aufweisen. Die seit längerem veröffentlichten Sequenzen (wenn auch nicht abgelegt in „Genebank“) von mIAN1 und mIAN3 (Poirier *et al.* 1999) zeigen einen Anteil von 41 % (64 %) bzw. 44 % (71 %) identischen (ähnlichen) Aminosäuren. In der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ist das AIG1 Protein (accession number: U40856) entdeckt worden, welches mit 32 % identischen und 54 % ähnlichen Aminosäuren sicherlich phylogenetisch am weitesten entfernt ist, aber aufgrund der G-Protein-Bindemotive eindeutig als ein Mitglied dieser wachsenden Genfamilie betrachtet werden muss. Erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass in verschiedenen Vertebratengenomen eine TBLAST Suche noch weitere IMAP-ähnliche Sequenzen hervorbrachte, während in den vollständig sequenzierten Genomen von *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans*

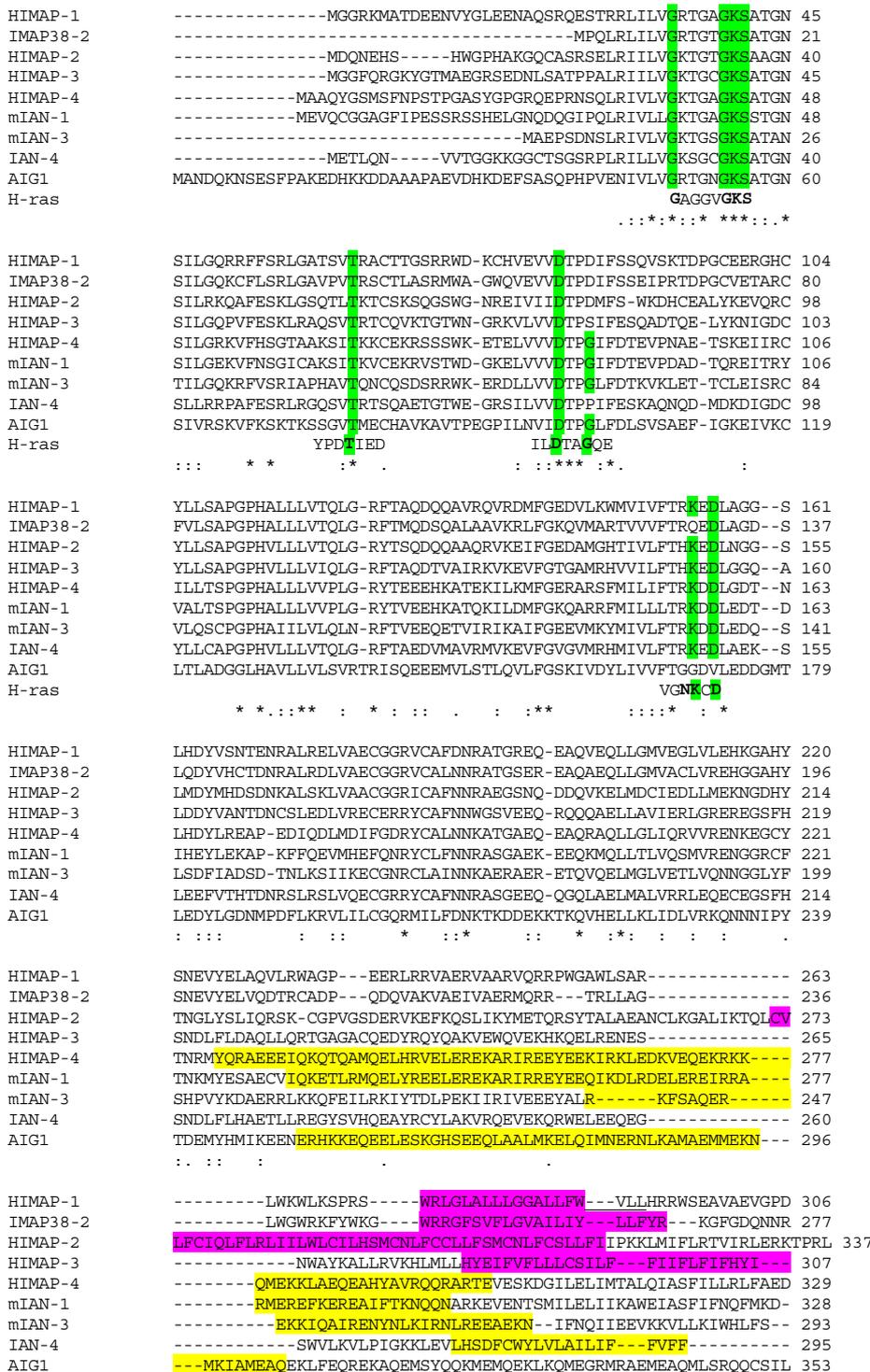


Abbildung 24
Alignment der deduzierten Proteinsequenzen von vier humanen, einer pflanzlichen und vier aus der Maus klonierten himap-ähnlichen cDNA's. Das Alignment erfolgte mit Hilfe des Programms ClustalW. Die Region der Transmembrandomänen ist pink, die der coiled-coil Regionen gelb hinterlegt. Die putativen GTP-Bindungsmotive sind grün hinterlegt.

(HTGS und EST Datenbanken) nichts dergleichen zu finden war. Die Ähnlichkeit dieser Proteine ist allerdings ausschließlich auf Proteinebene sichtbar, weshalb nur die Abbildung eines Protein-Alignment sinnvoll ist.

	IMAP-1	IMAP-2	HIMAP-1	HIMAP-2	HIMAP-3	HIMAP-4	IAN1	IAN2	AIG-1	Durchschnitt
AA	246	277	306	359*	307	329	328	293	301	
Mw	25,9	30,8	34,4	40,3	34,8	37,5	38,0	33,9	33,7	
pI	10,15	9,26	9,11	8,75	6,72	7,66	5,94	8,62	4,93	
AS	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Ala	12,2	9,4	9,2	5,3	6,8	8,2	5,5	5,5	4,0	8,3
Arg	9,3	9,7	11,1	5,0	6,5	8,2	8,2	7,5	3,3	5,7
Asn	1,6	2,5	2,3	4,2	3,6	2,7	3,7	5,1	6,3	4,4
Asp	3,3	4,7	3,9	4,5	4,2	4,0	4,3	4,4	5,3	5,3
Cys	2,4	3,2	2,0	4,7	2,6	1,2	1,8	2,0	2,0	1,7
Gln	8,1	5,8	4,6	5,0	6,5	5,8	5,5	4,8	4,0	4,0
Glu	3,7	4,7	8,2	5,3	7,5	11,9	12,5	10,2	11,3	6,2
Gly	17,1	9,0	9,5	7,0	7,8	6,1	5,8	3,8	6,6	7,2
His	5,7	1,4	2,3	2,8	2,6	1,8	1,5	1,4	1,3	2,2
Ile	0,8	2,5	1,3	5,8	4,9	6,1	6,4	8,9	4,7	5,2
Leu	8,5	10,8	11,4	12,8	11,7	9,1	8,5	10,2	12,6	9,0
Lys	2,0	2,9	2,9	7,2	4,9	7,9	7,3	8,5	8,6	5,7
Met	1,6	2,2	1,6	3,1	1,3	2,7	3,4	1,4	4,0	2,4
Phe	0,8	4,0	2,6	3,6	5,2	2,7	4,6	3,8	2,3	3,9
Pro	9,8	2,9	2,6	2,5	2,0	3,0	2,4	2,4	2,0	5,1
Ser	4,5	4,7	5,9	8,1	4,9	5,2	4,9	5,5	5,6	6,9
Thr	0,8	5,8	4,9	5,6	5,2	5,8	5,5	5,1	6,3	5,8
Trp	2,4	2,2	3,3	1,1	1,3	0,3	0,6	0,7	0,0	1,3
Tyr	0,8	2,2	1,6	2,5	3,3	2,7	2,1	2,0	1,7	3,2
Val	4,5	9,4	8,8	3,9	7,2	4,6	5,5	6,8	8,0	6,6

Tabelle 6

Aminosäurezusammensetzung von Mitgliedern der HIMAP Familie. Die Tabelle zeigt neben Aminosäureanzahl, Molekulargewicht und pI auch die prozentuale Zusammensetzung der deduzierten Proteinsequenzen. Als Vergleich dienen die durchschnittlichen Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren bei 1021 zufällig ausgewählten Proteinen (Durchschnitt s. rechte Spalte) (MacCaldon & Argos 1988)

3.2.2 Gruppierung von HIMAP mit ähnlichen Proteine in Stammbäumen

Zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume aus Sequenzdaten biologischer Makromoleküle haben sich verschiedene Methoden etabliert. Diese lassen sich allgemein in zwei Gruppen unterteilen, in **distanzbasierte** und **merkmalsbasierte** Methoden. (Felsenstein 1982; Swofford 1999; Waterman 1995). Bei den distanzbasierten Methoden wird für alle Sequenzpaare eine evolutionäre Distanz berechnet. Im einfachsten Fall ist dies die Hammingdistanz (Cormen *et al.* 1990), bei der die Anzahl der sich unterscheidenden Basen zweier Sequenzen aufsummiert wird. Die errechnete Distanzmatrix dient als Grundlage zur Konstruktion des Stammbaumes. Hierfür werden zumeist Clustering-Verfahren verwendet. An dieser Methode wird kritisiert, dass die vorhandenen Sequenzdaten zur Berechnung des Baumes auf die Distanzen reduziert werden. (Fitch and Margoliash 1967, Saitou & Nei 1987). Wichtige Vertreter der merkmalsbasierten Methoden sind die Maximum-Parsimony-Methode und der Maximum-Likelihood-Ansatz. Das Maximum-Parsimony-Verfahren konstruiert für alle internen Knoten eines vorgegebenen Stammbaumes Sequenzen, die die von diesen Knoten repräsentierten Organismen gehabt haben könnten. Diese Sequenzen werden so konstruiert, dass die Sequenzen entlang des Baumes, während der vom Stammbaum vorgegebenen evolutionären Entwicklung, möglichst wenigen Mutationen unterworfen sind. Die Gesamtsumme aller im Baum nötigen Mutationen ist dann das Maß für die Qualität des Baumes. Von der Maximum-Parsimony-Methode wird versucht, aus allen möglichen Stammbäumen denjenigen zu finden, für den die geringste Anzahl an Mutationen nötig ist. Diese Methode wurde ursprünglich für morphologische Daten entworfen und hat sich bewährt, wenn sich

die beobachteten Merkmale nur selten ändern. Das gilt im allgemeinen für morphologische Daten. Diese Methode scheitert jedoch, wenn die beobachteten Merkmale hochvariabel sind oder sehr lange Kanten im gesuchten Baum vorkommen. (Swofford and Olsen 1990; Waterman, 1995)

Der anerkannteste Ansatz basiert auf der von Fisher 1912 eingeführten Maximum-Likelihood-Methode (Kreyszig 1975). Die Maximum-Likelihood-Methode wird benutzt, um unbekannte Parameter zu schätzen, von denen eine bekannte Wahrscheinlichkeitsfunktion für einen stochastischen Prozess abhängt. Mit dieser Methode werden dann anhand einer festen Stichprobe, in unserem Fall der Sequenzdaten, die unbekannt Parameter so geschätzt, dass der Wert der Wahrscheinlichkeitsfunktion, bei fester Stichprobe als Likelihood-Funktion bezeichnet, sein Maximum erreicht. Die in der Stammbaumanalyse zu schätzenden unbekannt Parameter sind die Kantenlängen in einem vorgegebenen Baum. (Goldman 1990; Kreyszig 1975)

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass unter Berücksichtigung eines expliziten Evolutionsmodells bei der Berechnung der Stammbäume die vollständigen Daten in die Analyse mit eingehen. Der Hauptnachteil der ML-Methode ist, dass enorme Rechenzeiten nötig sind, um die große Anzahl der möglichen Stammbäume zu überprüfen, die auch bei heuristischen Methoden meist exponentiell mit der Anzahl der benutzten Spezies wächst. (Felsenstein 1981; Swofford & Olsen 1990)

Die meisten merkmalsbasierten Methoden, die Sequenzen biologischer Makromoleküle benutzen, benötigen von diesen Sequenzen ein Alignment. In einem solchen Alignment stehen die homologen Merkmale (hier organische Basen oder Aminosäuren) in Spalten untereinander für jede zu untersuchende Spezies. Alle Sequenzmerkmale einer Spezies stehen hierbei in einer Zeile. In einem solchen Alignment lassen sich Mutationen ablesen, die zwischen zwei Sequenzen liegen, die hier abzulesenden Mutationen sind allerdings nur die offensichtlichen Mutationen. Wieviele Hin- und Rückmutationen es während der Entwicklungsgeschichte gegeben hat und welche Sequenzen die Vorfahren der untersuchten Spezies hatten, können wir heute nicht mehr feststellen. Auch liegen die Sequenzen der Makromoleküle, die wir untersuchen, nach dem Sequenzieren oder der Datenbankrecherche nur als einzelne Buchstabenfolgen vor. Diese zu alignieren, ist ein anderes hervorstechendes Problem, an dem zur Zeit in der Bioinformatik gearbeitet wird. Die meisten Programme zum Alignieren von Sequenzen bringen nur sehr unbefriedigende Ergebnisse, so dass nahezu alle erhaltenen Alignments noch von Hand nachgebessert werden müssen bzw. viele Alignments von vorneherein von Hand angefertigt werden. Die Ergebnisse der Stammbaumanalysen hängen sehr von der Qualität der benutzten Alignments ab. Daher ist es wichtig, Alignments zu benutzen, die möglichst fehlerfrei sind.

In Stammbaumanalysen konstruierte Stammbäume werden graphentheoretisch als binäre Bäume dargestellt. Solche Bäume sind azyklisch verbundene, in diesem Fall ungerichtete Graphen aus einer Menge von Knoten, die mittels Kanten miteinander verbunden sind. In der Menge von Knoten hat jeder Knoten einen Grad $[d < 3]$, d.h. er ist nie mit mehr als drei weiteren Knoten verbunden. Ein Knoten repräsentiert die Wurzel ($d=2$) und jeder interne Knoten hat genau zwei Nachfolger und einen Vorgänger ($d=3$). Die internen Knoten repräsentieren gemeinsame Vorfahren an den Verzweigungspunkten der Artbildung. Bei den Blättern ($d=1$) handelt es sich um rezente Organismen. Die Kantenlängen geben eine Form von Zeit an, die zwischen den einzelnen Knoten liegt, wie z.B. in der Einheit Mutationen

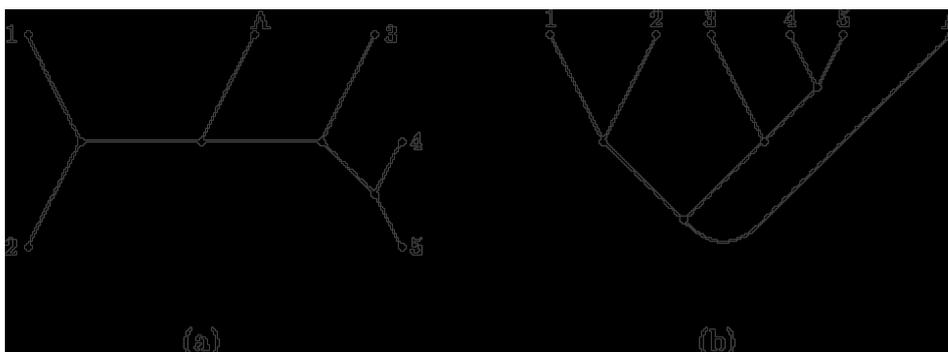


Abbildung 25

Zwei typische rekonstruierte phylogenetische Bäume. (a) ungewurzelt; (b) wurde mittels einer Außengruppe A gewurzelt.

pro Generation. (Brandstädt 1994; Waterman 1995). Es ist natürlich nicht klar, dass an einem Verzweigungspunkt immer genau zwei Arten entstanden sind. Diese Ungenauigkeit wird dadurch umgangen, dass man Kanten mit einer Länge null zulässt. Dies bedeutet, dass die beiden adjazenten Knoten der „Nullkante“ denselben Vorfahren repräsentieren. Beide Knoten haben dann dieselben Merkmale, da die Evolution keine Zeit hatte, eines der Merkmale zu verändern (Felsenstein, 1981).

Ein zweites Problem ist, dass wir keine Möglichkeit haben, die Sequenzen des frühesten gemeinsamen Vorfahren, der Wurzel, zu bestimmen, um den Sitz des Ursprungs des Stammbaums zu bestimmen. Daher nimmt man einen Organismus oder eine Gruppe von Organismen, von denen bekannt ist, dass sie im Stammbaum einen gemeinsamen Vorfahren mit den anderen Organismen besitzen, der zeitlich vor dem Aufspalten der zu untersuchenden Gruppe existiert hat. Ein solcher Organismus bzw. eine solche Gruppe heißt Außengruppe, da sie außerhalb des eigentlich zu untersuchenden Bereichs liegt, und fungiert dann als Wurzel. Es handelt sich bei den gefundenen Bäumen eigentlich um sogenannte ungewurzelte Bäume vgl. Abbildung 25. Auch die Sequenzen der anderen internen Knoten können heute im Normalfall nicht mehr bestimmt werden. Diese werden in Abhängigkeit von der benutzten Methode meist in irgendeiner Form für die Berechnung rekonstruiert. (Felsenstein, 1981; Swofford & Olsen, 1990). Bei der Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume werden im Idealfall alle möglichen Bäume anhand eines vorgegebenen Kriteriums (z.B. Maximum Likelihood) untersucht, um sicher zu gehen, dass man auch den nach diesem Kriterium besten Baum findet. (Felsenstein, 1981, 1982; Swofford and Olsen, 1990). Hierzu muss man allerdings wissen, dass für n Spezies

$$\prod_{k=3}^n (2k-5) = \frac{(2n-5)!}{2^{n-3}(n-3)!}$$

verschiedene ungewurzelte binäre Stammbäume existieren. Betrachtet man gewurzelte Stammbäume, so erhöht sich n um eins, da sich die Wurzel wie ein zusätzliches Blatt im Baum verhält. Dies bedeutet für die Analysen, dass für nur 10 Spezies schon über zwei Millionen ungewurzelter Stammbäume existieren (Felsenstein 1978). Aufgrund dieses immensen Wachstums der Anzahl der Bäume, ist es im allgemeinen nicht möglich, die Gesamtheit aller möglichen Bäume zu betrachten, um den optimalen Baum zu finden. Aus diesem Grund werden heuristische Verfahren verwendet, um die Anzahl der zu betrachtenden Bäume einzuschränken. Zwei häufig verwendete Verfahren sind das Clustering-Verfahren und das schrittweise Einfügen (Swofford & Olsen 1990). Beim Clustering werden die Sequenzen oder Sequenzgruppen gesucht, die sich nach einem bestimmten Maß, meist der evolutionären Distanz zwischen den Sequenzen, am ähnlichsten sind. Diese bilden zusammen eine neue Gruppe und gehen als solche in das weitere Clustering ein. (Swofford & Olsen 1990). Beim schrittweisen Einfügen wird, angefangen mit einer kleinen Teilmenge der zu untersuchenden Taxa, der optimale Baum für diese Taxa bestimmt. Anschließend werden Schritt für Schritt weitere Taxa eingefügt und der, basierend auf dem vorher gefundenen Baum, nächste optimale Baum gesucht. (Felsenstein 1981, Swofford & Olsen 1990).

Bei beiden oben genannten Verfahren handelt es sich um Greedy-Verfahren, die sich Schritt für Schritt von einer lokal besten Entscheidung zur nächsten bewegen. Diese Verfahren sind vergleichbar mit den in der Informatik verwendeten Verfahren von Kruskal bzw. Prim zum Berechnen minimaler Spannbäume (MSB) in Graphen. Clustering entspricht hierbei der Methode von Kruskal, bei der die kürzeste verbindende Kante zwischen zwei Zusammenhangskomponenten im Graphen gesucht wird, die dann durch die gemeinsame Zusammenhangskomponente, hier Organismen-Gruppen, ersetzt werden. Dieses wird solange fortgeführt, bis alle Knoten des Graphen zu einer Zusammenhangskomponente verbunden sind (Cormen *et al.* 1990).

Prim's Algorithmus entspricht dem schrittweisen Einfügen. Hierbei wird die kürzeste Kante gesucht, die einen neuen Knoten mit einer bestehenden Zusammenhangskomponente verbindet. Dabei wird nur eine Zusammenhangskomponente, hier Bäume der bisher betrachteten Organismen, schrittweise vergrößert, bis alle Knoten enthalten sind (Cormen *et al.* 1990).

In Abbildung 26 ist die phylogenetische Eingruppierung von HIMAP1 und homologen Genen des Menschen und der Maus abgebildet. Der Stammbaum geht von einem Alignment der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms ClustalW aus, bei dem alle Lücken manuell entfernt wurden. Das Dendrogramm bestätigt, dass HIMAP1 das humane Homolog zu IMAP38-2 ist. Diese beiden Proteine bilden zusammen mit HIMAP2 und HIMAP3 eine Unterfamilie der IMAP-ähnlichen Proteine. Gemeinsam ist diesen vier Proteinen eine putative Transmembrandomäne in der Nähe des C-Terminus. Das HIMAP4 Protein zeigt allerdings eine nähere Verwandtschaft mit dem Mausprotein mIAN1 und hat ebenso wie mIAN3 keine C-terminale Transmembrandomäne, wohl aber eine putative coiled-coil Domäne in der Nähe des C-Terminus. Diese Beobachtung trifft auch für das AIG1 Protein und andere AIG1-ähnliche Proteine von *Arabidopsis thaliana* zu, weshalb man für die Transmembrandomänen IMAP-Proteine eine jüngere evolutive Geschichte ableiten kann. Allen IMAP-ähnlichen Proteinen ist jedoch das GTP-Bindemotiv gemeinsam. Diese sind vom ersten Motiv G-1 (als „p-loop“ bezeichnet), bis zum Motiv G-5 in einem konservierten Sequenzkontext in den IMAP-ähnlichen Proteinen eingebettet.

3.2.3 Genomische Organisation des *himap1* Gens

Die genomische Organisation des *himap* Genfamilie kann vom PAC Klon RP-1051J4 (accession number: ACC006479) abgeleitet werden. Die Sequenz dieses Klons befindet sich auf dem humanen Chromosom 7q32-34, also im äußeren Viertel auf dem längeren Arm des Chromosoms 7. Die Verteilung der codierenden und nicht-codierenden Bereiche sind für die *himap*- und *imap*-ähnliche Gene in Abbildung 27A dargestellt. Das *himap1* Gen besteht aus drei Exons und dementsprechend zwei Introns, deren Spleißerkennungsstellen (Donor- und Akzeptorstellen) den üblichen Konsensussequenzen entsprechen. Das erste Exon ist nicht kodierend, während das zweite für 14 Aminosäuren kodiert. Das dritte Exon umfasst die restlichen 95 % der Sequenz. Die Struktur der Gene *himap2* und *himap3* kann ebenfalls

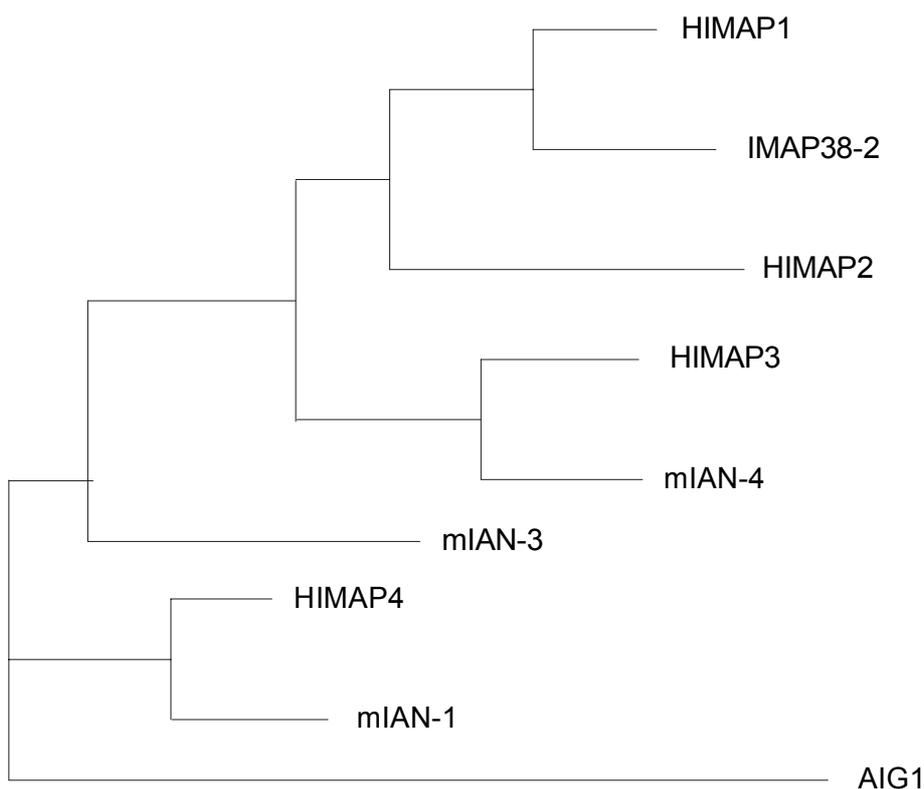


Abbildung 26

Dendrogramm zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse von HIMAP mit verwandten Proteinen des Menschen, der Maus und der Pflanze. Ausgehend von dem mit CLUSTALW erzeugten multiplen Sequenz-Alignments in Abbildung 24, bei dem alle Lücken manuell entfernt wurden, erfolgten die weiteren Analysen mit den Programmen „BOOTSTRAP“ und PROTPARS der PHYLIP-Software. Die Methode der größten Wahrscheinlichkeit wurde mit der MOLPHY Software durchgeführt. Die phylogenetischen Abstände wurden mit PROTML berechnet und die Distanz-Matrix wurde genutzt um mit der „neighbour-joining“ Methode den Stammbaum zu errechnen, der als Basis für die Erzeugung des „maximum-likelihood“ Dendrogramms mit PROTML diente. Alle sechs möglichen Modelle für die Aminosäuresubstitution wurden berechnet und das JTT-F Ergebnis abgebildet.

von diesem PAC Klon abgeleitet werden, während sich die von *himap4* vom BAC Klon RP11-632K21 (accession number HC0693304) ableitet, welcher allerdings auch in der Region q32-34 auf Chromosom 7 liegt. Die Exon-Intron Struktur der vier *himap* Gene ist hochkonserviert und zeigt bei allen ein nicht-kodierendes erstes Exon und ein drittes Exon das 94–95 % der Proteinsequenz kodiert. Zusätzlich zu diesen vier Klonen existiert ein weiterer BAC Klon RP11-511P7 (accession number AC073111) von Chromosom 7, der weitere drei IMAP-ähnliche Sequenzen beinhaltet, ein zusätzlicher Hinweis, dass die *himap* Gene eine Genfamilie (Cluster) auf Chromosom 7q32-34 bilden. Im Gegensatz dazu präsentieren sich die *imap38*-ähnlichen Gene mit einer mehr heterogenen genomischen Organisation, obwohl auch hier das große Exon konserviert ist. Auf dem BAC Klon CT7-315E6 (accession number: AC015887) können neun *imap38*-ähnliche Gene einschließlich *imap38*, mIAN-1 und mIAN-3 mit Hilfe von TBLASTN identifiziert werden. Das mIAN-1 Gen besteht aus vier Exons, wobei das erste Exon ebenfalls nicht kodiert und das zweite Exon die ersten 19 Aminosäuren kodiert. Das mIAN-3 Gen ist nur aus zwei Exons zusammengesetzt, wobei die gesamte kodierende Sequenz im zweiten großen Exon konserviert ist. Das *imap38* Gen ist intronlos, das Exon enthält aber einen relativ langen 5'UTR. Strangaufwärts von diesem langen Exon befindet sich eine konservierte Sequenz von 53 bp mit 79 % Identität zum zweiten Exon von *himap1*. Die Spleißstellen zwischen dem zweiten und dritten Exon bei *himap1*, *himap2* und *himap3* sind ebenso wie bei *himap4* und *mLAN-1* konserviert. Dieser Befund unterstreicht die phylogenetische Beziehung der Maus Gene mit den humanen Genen, wie sie auch im Dendrogramm in Abbildung 26 dargestellt werden. Die Loci der *himap* Gene sind auf dem humanen Chromosom 7q 32-34 lokalisiert, dessen syntäne Region auf dem Maus-Chromosom 6B die *imap38*-ähnlichen Gene enthält. Das erst kürzlich veröffentlichte *Ian4* Gen besteht aus zwei Exons und ist ebenfalls auf Maus Chromosom 6 lokalisiert.

Die vier *himap* Gene erstrecken sich dabei über einen Bereich von 100 kbp auf Chromosom 7. Dabei befindet sich das *himap1* Gen auf dem negativen, die Gene *himap2*, *himap3*, *himap4* auf dem gegenüberliegenden positiven Strang. In diesem, auf dem distalen Ende von Chromosom 7 liegenden Bereich, befinden sich auch die auf dem Maus Chromosom 6 lokalisierten Gene des T-Zellrezeptors, der Caspase 2 und der Protein-Disulfid-Isomerase.

Eine komplett verschiedene genomische Organisation zeigt das *imap*-ähnliche Gen AIG1 aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Es besteht aus sechs von kurzen Introns unterbrochenen Exons, wie die Betrachtung des BAC Klons F12G12 (accession number: AC015446) ergab. Der computergestützte Vergleich ergab zusätzlich weitere 14 AIG1-ähnliche Gene, welche auf Chromosom 1 (neun Mitglieder) und auf Chromosom 4 (drei Mitglieder) lokalisiert sind.

A

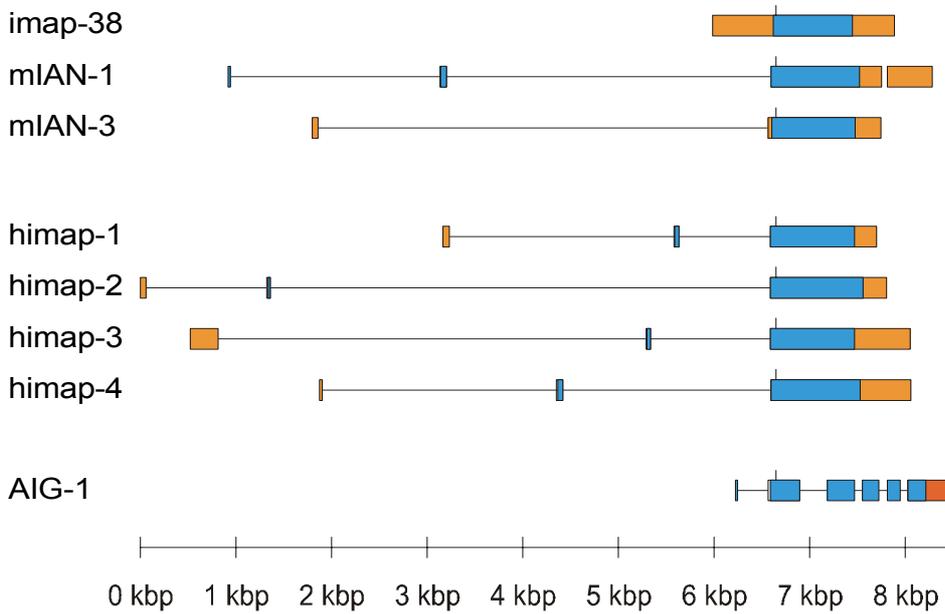


Abbildung 27

A Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation von imap und homologen Genen. A: Vergleich der Intron-Exon Struktur von Mitgliedern der imap-Familie aus Maus, Mensch u. aigl. Die kodierenden Exons sind in blauen, die nicht kodierenden in orangen Boxen dargestellt. Die Introns entsprechen der Linie. Alle Sequenzen sind an der Position des p-loops ausgerichtet (dünne vertikale Linie). Die uEST Sequenzen stammen von drei EST Datenbank Einträgen (accession number: BE447354, BE848188, A1158619) B: Chromosomale Lokalisation und Syntenie der himap und imap Gene als Cluster auf Chromosom 7 (Mensch) und Chromosom 6 (Maus). Tbxas1: thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrom P450, subfamily V); Mkrn1: makorin ring finger protein 1; Braf: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1); Ssbp: single-stranded DNA-binding protein; Tcrb: T cell receptor β ; Kel: Kell blood group; Clcn1: chloride channel, Skelettmuskel; Casp2: caspase 2; Ezh2: enhancer of zeste (Drosophila homolog 2); Erp70: protein disulfide isomerase2; Slc4a2: solute carrier family 4 Anionenaustauscher 2; (erythrocyte membrane protein band 3-like 1); Cdk5: cyclin-dependent kinase 5.

B

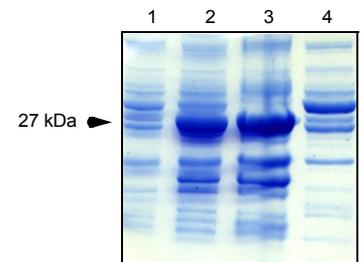
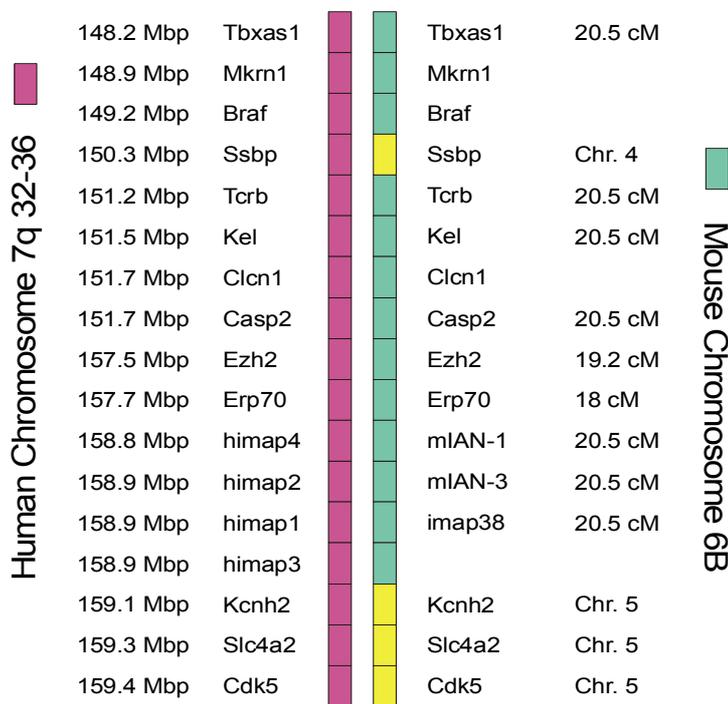


Abbildung 28

Heterologe Expression von HIAMP1 in *E. coli*. Die Coomassie Färbung zeigt Rohextrakte von *E. coli* vor (Spur 1) und nach (Spur 2) 4 h Induktion des HIMAP1-GST-6xHIS Fusionsproteins, sowie die unlösliche (Spur 3) und lösliche Fraktion (Spur 4) des Bakterienlyses nach Aufschluß der Zellen in Phosphatpuffer mit 0,3 % CHAPS. Das HIMAP1-GST-6-HIS ist ausschließlich in der unlöslichen Fraktion wiederzufinden.

3.2.4 Charakterisierung des HIMAP Proteins

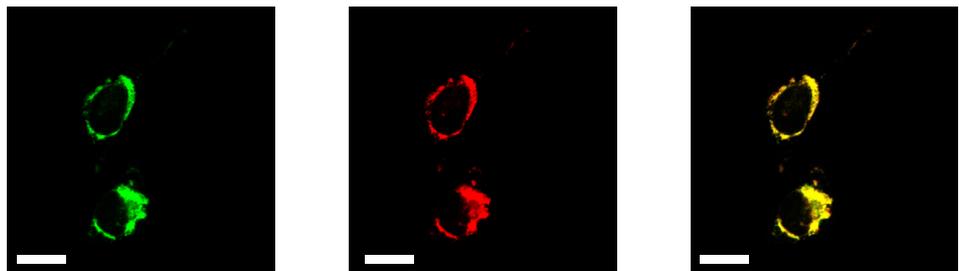
Die heterologe Expression des HIMAP1 Proteins in *E. coli* gestaltete sich insofern als kompliziert, weil das Protein offensichtlich auf die Bakterien toxisch wirkte. Die aufgezeichneten Wachstumskurven (Daten nicht dargestellt) ergaben nach Induktion der Proteinexpression eine Stagnation und teilweise sogar eine geringe Abnahme der *E. coli* Zellzahl. Erst eine Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST), ein für kritische Expressionen häufig verwendetes Protein-Tag konnte das Problem der Toxizität überwinden. Obwohl die 26 kDa große

GST als lösliches Protein oft auch die Löslichkeit der Fusionspartner verbessert, war dieser Effekt bei HIMAP-1 nicht zu beobachten. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, verblieb das GST-HIMAP-1 Fusionsprotein vollständig in der Pelletfraktion und nicht in löslichen Fraktion, was die Aufreinigung über die GST-Sepharosematrix verhinderte. Auch die Expression von Konstrukten, welche das HIMAP-1 Protein ohne die C-terminale Transmembrandomäne exprimierten lieferte immer noch unlösliche Produkte. In letzter Konsequenz erfolgte die Aufreinigung dann mit Fusionskonstrukten, denen C-Terminal über die PCR-Primer ein 6xHis-Tags angehängt wurde, so dass die Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) erfolgen konnte.

Die Untersuchung der HIMAP-1 Proteinsequenz mit dem Program PSORTII ergab ein N-terminales Membran-Retentionssignal für das endoplasmatische Retikulum. Dieses Signal umfasst die Aminosäuren 2-5 (GGRK). Um die Lokalisation des Proteins in der Zelle zu überprüfen wurde der kodierende Bereich der cDNA mit PCR amplifiziert, in den Vektor pMycHisTag kloniert und anschließend transient in CHO-K1 Zellen transfiziert. Nach 24 h Expression wurde das Protein durch Immunfluoreszenz mit gegen das MycTag und 6xHisTag gerichteten Antikörpern nachgewiesen. Das endoplasmatische Reticulum wurde durch einen gegen die Signalsequenz KDEL gerichteten Antikörper sichtbar gemacht. Die Übereinanderlagerung der beiden verschiedenfarbigen Immunfluoreszenzen ergab eine deutliche Kolo-kalisation und beweist, dass HIMAP1 ein Membranprotein im endoplasmatischen Reticulum darstellt.

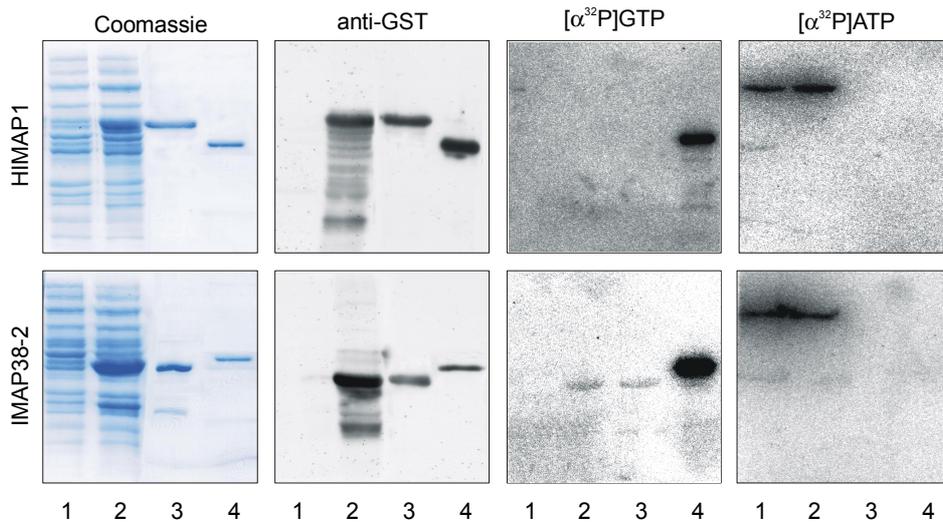
Abbildung 29

Zelluläre Lokalisation des HIMAP1 Proteins. Die Abbildung zeigt mit dem Plasmid pHIMAP-MycHisTag transient transfizierte CHO-K1 Zellen. Das HIMAP Protein wurde mit gegen das Myc Tag gerichteten Antikörper (grün) nachgewiesen. Mit Hilfe des anti KDEL Antikörpers wurden spezifisch ER lokalisierte Proteine markiert (rot). Additive Farbmischung (gelb) des roten und grünen Kanals beweist die Lokalisierung des HIMAP Proteins im ER. (Maßstabsbalken 10 µm)



3.2.5 Überprüfung einer GTP/ATP Bindung von HIMAP und IMAP

Ein Abgleich der Proteinsequenzen von HIMAP1 und IMAP38-2 mit der PROSITE Datenbank ergab unter stringenten Einstellungen der Suchparameter ein ATP/GTP Bindemotiv an der Position Aminosäure 34-41 (HIMAP1) und Position 10-18 (IMAP38-2). Dieses Motiv besteht aus einer Glycin-reichen Region, welche eine flexible Schleife zwischen einem β -Faltblatt und einer α -Helix ausbildet und demzufolge als „P-loop“ bezeichnet wird (Sarraste, Sibbald u. Wittinghofer 1990). Das ursprüngliche Motiv wurde von Walker *et al.* 1982 in den α - und β -Untereinheiten der ATP-Synthase, der Adenylatkinase und dem RecA Protein entdeckt und deswegen auch als A-Motiv bezeichnet. Das Konsensus Motiv dieser „Phosphat-Binde-Schleife“ besteht aus den Aminosäuren [AG]-x(4)-K-[ST] und kommt in vielen, aber nicht allen ATP/GTP bindenden Proteinen vor. Umgekehrt ist das Vorhandensein dieses Motivs kein zwingender Beweis für eine Nukleotidbindung, weshalb der experimentelle Nachweis bei jedem Protein neu erbracht werden muss. Zu diesem Zweck wurden HIMAP1 und IMAP38-2 exprimierende *E. coli* Rohextrakte und affinitätsge-reinigte Fusionsproteine von HIMAP und IMAP2R auf Nitrozellulosefilter transferiert und gemäß 2.30 mit radioaktiv markiertem GTP/ATP inkubiert. Als Positivkontrolle für die Funktionalität des verwendeten Testsystems diente affinitätsgereinigtes GST-Rab11 Protein (zur Verfügung gestellt von Prof. Eckel, Diabetes Institut Düsseldorf). Rab11 ist ein GTP-bindendes Protein, dass im Golgi Apparat in den gerichteten Vesikeltransport involviert ist. Die Auswertung dieser Versuche ergibt für das HIMAP1 Protein keine mit dieser Technik detektierbare GTP Bindung und für das IMAP38-2 Protein eine schwache GTP-Bindung. Diese Bindung ist um den Faktor 10 schwächer als die Bindung von Rab11 an GTP. Ein Unterschied zwischen den aufgetragenen Rohextrakten und den affinitätsgereinigten Protein ist nicht zu beobachten. Ebenso ist eine Beeinträchtigung der Nukleotidbindung durch die N-terminal fusionierte Gluthathion-S-Transferase (GST) auszuschließen, da die Positivkontrolle Rab11 auch als GST-Fusionsprotein vorliegt.

**Abbildung 30**

Nachweis einer ATP/GTP Bindung durch die Proteine HIMAP-1 und IMAP38-2. Die oberen vier Abbildungen zeigen Bindungsstudien mit dem GST-HIMAP Fusionsproteine. Die unteren vier Abbildungen beziehen sich auf das GST-IMAP38-2 Fusionsprotein.

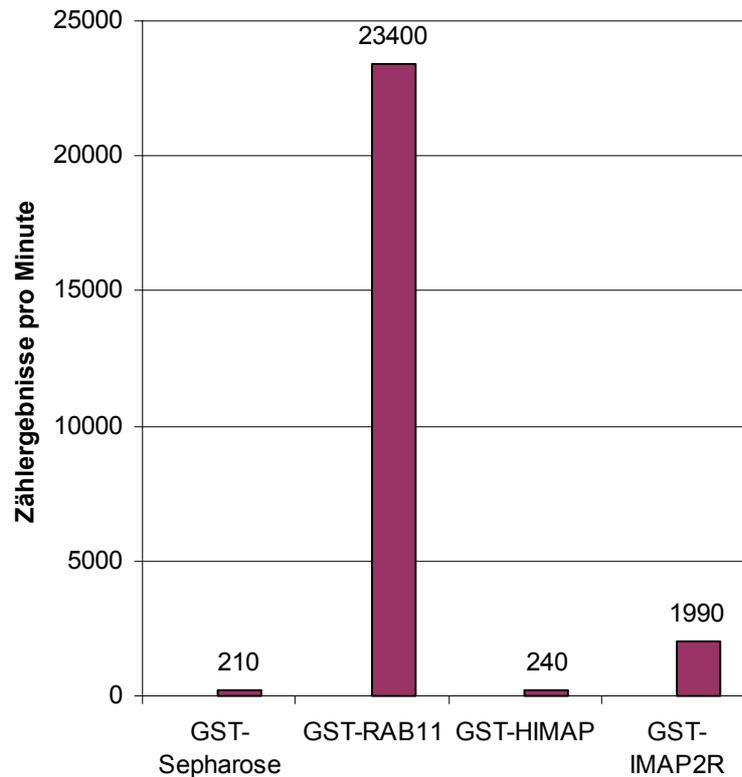
Spur 1 *E. coli* Rohextrakt vor Induktion der Proteinexpression; **Spur 2** *E. coli* Rohextrakt nach 4 h Proteinexpression; **Spur 3** affinitätsgereinigtes Fusionsprotein; **Spur 4** Kontrollprotein GST-RAB11. Abgebildet sind v. r. n. l. die Ergebnisse der Coomassie-Gesamtproteinfärbung, die die Induktion und Aufreinigung der Fusionsproteine verdeutlicht. Der Immunoblot mit anti-GST Antikörpern weist die Fusionsproteine spezifisch nach. Die Autoradiogramme zeigen die auf Nitrozellulose transferierten Fusionsproteine nach Inkubation mit radioaktiv markierten GTP und ATP (Negativkontrolle). Das IMAP38-2 Fusionsprotein zeigt sowohl im induzierten Rohextrakt, als auch im aufgereinigten Zustand eine schwache aber signifikante GTP-Bindung

Eine mögliche ATP Bindung wurde mit demselben Testsystem überprüft. Dabei ist weder bei HIMAP noch bei IMAP eine Nukleotidbindung zu erkennen. Das spezifisch GTP bindende Protein Rab11 zeigt ebenfalls keine ATP Bindung. Stattdessen ist im Bereich von 65 kDa, in allen Spuren wo *E. coli* Rohextrakte aufgetragen wurden, ein ATP bindendes Protein zu erkennen, weshalb auch diese Testbedingungen als funktional angesehen werden können. Um eine mögliche Beeinträchtigung der Proteine hinsichtlich ihrer Nukleotidbindefähigkeit durch die SDS-Gelelektrophorese auszuschließen, wurde ein Bindetest mit affinitätsgereinigtem Protein in Lösung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde affinitätsgereinigtes Protein in äquimolaren Mengen über seinen GST bzw. 6xHis Fusionsanteil an Sepharosekugeln immobilisiert. Das gebundene Protein wurde durch mehrfaches Waschen mit Bindepuffer äquilibriert und mit radioaktiv markiertem GTP inkubiert. Ungebundene Radioaktivität wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt und die gebundene Menge an GTP im Szintillationszähler quantifiziert.

Abbildung 31

GTP-Bindungsassay mit an Sepharose-beads gebundenen Fusionsproteinen.

Bei diesem Versuch wurde an Glutathion-Sepharose-beads gebundenes Fusionsprotein GST-Rab11, GST-HIMAP und GST-IMAP in Bindepuffer mit radioaktiv markierten GTP inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit Bindepuffer ohne GTP wurde die gebundene Menge an radioaktiv markiertem GTP mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.



Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt und zeigen für Rab11 eine deutliche GTP Bindung. Für das Protein HIMAP1 kann keine GTP Bindung nachgewiesen werden. Das IMAP38-2 Protein bindet ca. 8 mal mehr GTP als die Negativkontrolle. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen des Filtertests und zeigen, dass die Nukleotidbindungs-motive bei IMAP38-2 unter den getesteten Bedingungen funktionieren. Auch eine mögliche ATP Bindung wurde durch einen Overlayassay mit radioaktiv markiertem ATP getestet und für HIMAP1 und IMAP38-2 ausgeschlossen. Die Funktionalität der Testbedingungen zeigt sich in einer deutlichen Bande bei ca 80 kDa in den Spuren wo *E. coli* Rohextrakt aufgeladen wurde. Offenbar bindet hier eine ATPase oder ein bakterieller Elongationsfaktor ATP. Dieses Signal fehlt selbstverständlich in den Spuren, in denen gereinigtes Protein aufgetragen wurde.

3.2.6 Expression der *himap1* mRNA in Zelllinien und Geweben

Die *himap1* cDNA wurde aus einer Milz-cDNA Bank isoliert und der Transkriptionsstart mit der Hilfe der humanen Marathon cDNA (Clontech) bestimmt, wodurch eine basale Expression in humaner Milz bewiesen wurde. Um nun Hinweise zur Funktion von *himap1* zu erhalten wurde die Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien mit Hilfe von RT-PCR und „Northern-Blotting“ (MTE-Arrays) untersucht.

Für die RT-PCR wurde RNA aus humanem Milzgewebe, Leukozyten des peripheren Blutes eines gesunden männlichen Spenders (der Autor) und den Zelllinien RAW, HepG, THP1, U937 isoliert. Das in Abbildung 32 abgebildete Ergebnis der RT-PCR mit *himap1* spezifischen Primern zeigt keine *himap1* Expression in den negativ Kontrollen RAW 264.7 (einer Maus-Makrophagen-Vorläuferzelllinie) und Wasser. Ebenso ist keine Expression in der humanen Hepatoblasten Zelllinie HepG2 zu finden. In allen anderen untersuchten RNA Quellen, HEK293, U937, THP-1, Jurkat, sowie in der Milz und in Monozyten des peripheren Blutes, ist eine deutliche Expression des *himap1* Transkriptes nachweisbar. Diese Ergeb-

nisse korrespondieren mit den Resultaten der Promotorcharakterisierung (vgl. Abbildung 35), weil in der humanen Zelllinie (HepG2), welche so gut wie keine Aktivität des *himap1*-Promotors zulässt, auch kein *himap1* Transkript nachweisbar ist.

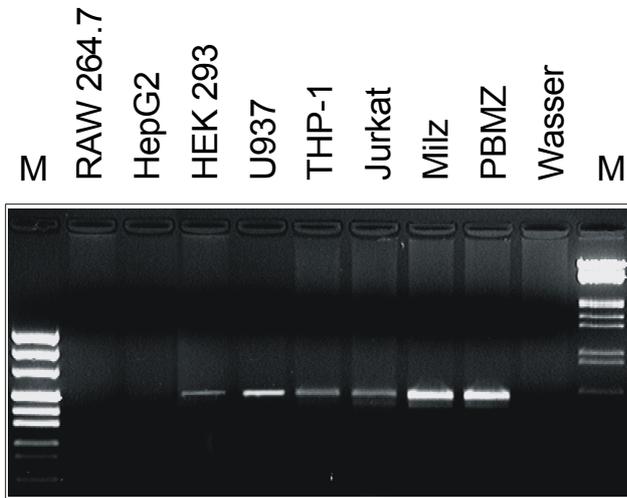


Abbildung 32

Expression der *himap1* mRNA in verschiedenen Zelllinien und Geweben. Dargestellt ist das Ergebnis der RT-PCR mit Primern aus dem ersten und dritten Exon welche ein Produkt von 518 bp amplifizieren.

Während im vorangehenden Abschnitt die Expression der *himap1* RNA in ausgewählten Zelllinien im Vordergrund stand, welche auch im Rahmen der Promotoranalyse untersucht wurden, sollte mit dem folgenden Experiment die Expression in allen bedeutsamen humanen Geweben ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde der „Multiple Expression Array“ (MTE) der Firma Clontech mit den PCR Sonden der *himap1* RNA und der identifizierten humanen homologen Gene (AK001972, AK002158, AL110151) hybridisiert. Der MTE präsentiert die immobilisierte PolyA+ RNA von 76 humanen Geweben, Tumor Zelllinien auf einer positiven geladenen Nylonmembran und ermöglicht so die Bestimmung der relativen RNA Menge in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien. Dies ist möglich, weil die aufgetragenen PolyA+ Proben auf jedem Filter durch Abgleich mit der RNA von acht Haushaltgenen normalisiert wurden (Spanakis & Brouty-Boye, 1994; Spanakis, 1993; Martino *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1993; Adams *et al.* 1995). Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe von „Phosphor-Imager“ Bildplatten und der Auswerte- und Lesesoftware Fuji-Image-Reader.

Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der gegen *himap1* gerichteten Sonde zeigen eine starke Expression in adultem und embryonalem Milzgewebe, sowie in Lymphknotengewebe. Eine schwächere, aber deutlich über dem Hintergrund wahrnehmbare Expression zeigt sich in allen Teilgeweben des Herzens, wobei Herz-Gesamt-RNA und linker Vorhof etwas stärkere Signale aufweisen. Die Gewebe des Magen -Darm-Trakts zeigen bis auf Dickdarm und Speiseröhre eine schwache Expression, wobei auch hier zwei Gewebe, Jejunum und Ileum etwas stärker hervortreten. In den Geweben der Lunge, Plazenta, Uterus, sowie embryonaler Lunge und Thymus erfolgt auch eine *himap1* Expression. Zwischen den Hybridisierungen wurden der MTE-Filter mit kochendem Wasser „gestrippt“ und durch Exposition von Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie auf Reste der alten Sonde überprüft.

Die Hybridisierung des MTE mit der gegen AK001972 gerichteten Sonde ergab enorm starke Signale in den Geweben des rechten Cerebellums, Glandula pituitaria, Magen, Duodenum, Jejunum, Niere, Milz, Thymus, Leukozyten, Lymphknoten, Knochenmark, Plazenta, Prostata, Hoden, und Nebenniere. Eine schwächere Expression ist in der embryonalen Milz und Thymusgewebe zu verzeichnen. In diesem und den weiteren Hybridisierungen mit Sonden gegen die homologen Gene zeigen die Kontrollen der humanen genomischen DNA positive Hybridisierungssignale, weil die hier verwendeten PCR Sonden aus dem dritten großen Exon dieser Gene bestehen.

Die dritte Hybridisierung erfolgte mit der gegen die cDNA AK002158 gerichteten PCR Sonde und ergab besonders starke Hybridisierungssignale in der Milz, Lymphknoten, Lunge und embryonaler Milz. Eine sehr schwache Expression ist in einigen Geweben des Herzens und Magen-Darmtraktes zu beobachten, wohingegen die Gewebe des Gehirns, Nervensystems und die Tumorzelllinien überhaupt keine Expression aufweisen.

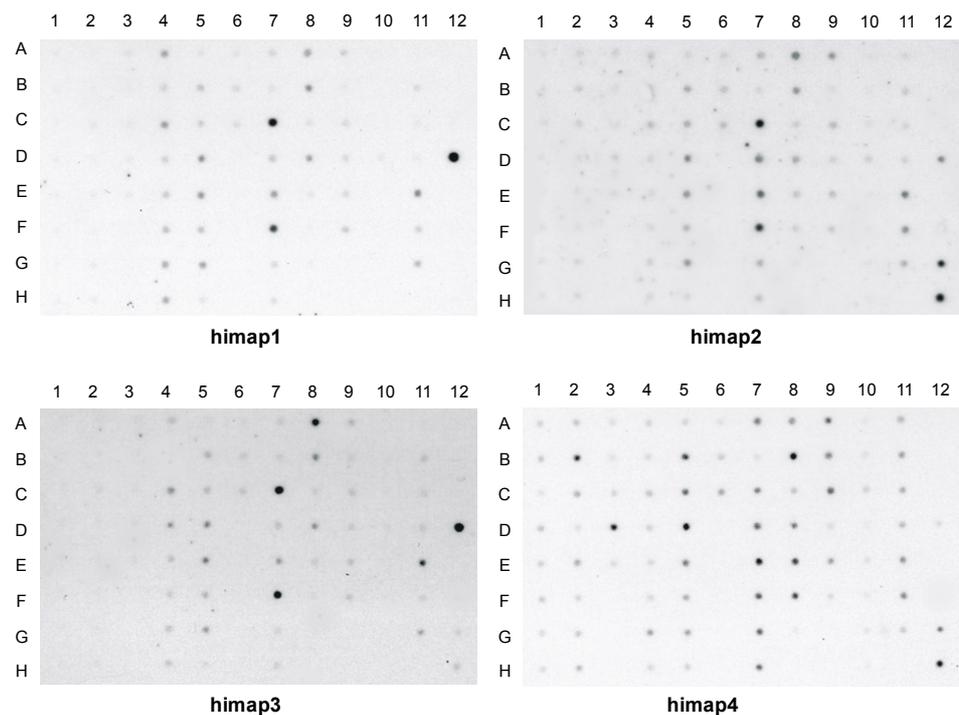
Das letzte Experiment mit dem MTE sollte die Expression der cDNA AL110151 untersuchen. Auch bestätigt sich eine starke Expression in den Geweben der Milz, Thymus, Leukozyten, Lymphknoten und Lunge. Eine schwächere Expression ist in Jejunum und Ileum, sowie in embryonaler Milz, Thymus und Lunge zu finden.

Als Ergebnis dieser Hybridisierungsexperimente ist festzuhalten, dass die cDNA's von *himap1* und den homologen Genen AK001972, AK002158 und AL110151 hauptsächlich in den immunologisch relevanten Geweben wie Milz, Thymus und Lymphknoten exprimiert werden. Diese Expression ist auch in den vergleichbaren embryonalen Geweben zu beobachten. Auffällig ist eine teilweise Expression im Magen und Darmtrakt (Jejunum und Ileum, Sitz der Peyer'schen Plaques) sowie in der Lunge, Plazenta und Herz. Keine bzw. eine sehr geringe Expression ist im Gehirn und in den Tumorzelllinien zu verzeichnen.

Abbildung 33

Expressionsmuster der RNA von *himap-1*, *himap-2* (AL110151), *himap-3* (AK02158) und *himap-4* (AK001972) in 76 humanen Geweben und Tumorzelllinien. Die Zuordnung der Signale kann über die Koordinaten der Legende entnommen werden. Als Sonde diente der kodierende Bereich cDNA (*himap-1*) bzw. ein ca. 700 bp langes genomisches PCR Amplifikat aus dem dritten Exon (*himap-2-4*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gehirn	Cerebellum sinister	Substantia nigra	Herz	Oesophagus	Colon transversum	Niere	Lunge	Leber	Leukemia HL-60	Gehirn-fötal	Hefe ges. RNA
B	Cortex	cerebellum dextra	Nucleus accumbens	Aorta	Magen	Colon descendens	Skelett Muskel	Plazenta	Pankreas	HeLa S3	Herz fötal	Hefe rRNA
C	Lobus frontalis	Corpus callosum	Thalamus	Atrium sinister	Duodenum	Rectum	Milz	Harnblase	Nebenniere	Leukemia K-562	Niere fötal	E. coli rRNA
D	Lobus parietalis	Amygdala	Glandula pituitaria	Atrium dexter	Jejunum		Thymus	Uterus	Schilddrüse	Leukemia MOLT-4a	Leber fötal	E. coli DNA
E	Lobus occipitalis	Nucleus caudatus	Medulla spinalis	Ventrikel sinister	Ileum		Leukozyten peripheres Blut	Prostata	Speicheldrüse	Burkitt's Lymphoma Raji	Milz fötal	Poly(A)
F	Lobus temporalis	Hippocampus		Ventrikel dexter	Ileoceum		Lymphknoten	Hoden	Brustdrüse	Burkitt's Lymphoma Daudi	Thymus fötal	humane c- β -1 DNA
G	Gyrus praecentralis	Medulla oblongata		inter-ventricular Septum	Appendix		Knochenmark	Ovar		Kolorektal Adenokarzinom SW480	Lunge fötal	humane DNA 100 ng
H	Pons cerebri	Putamen		Apex cordis	Colon ascendens		Luftröhre			Lungen Karzinom A549		humane DNA 500 ng



3.2.7 Analyse des *himap1* Promotors

Die Expression des *himap1* Gens wird *in vivo* offensichtlich streng reguliert. Ähnlich wie die *imap38* mRNA ist die *himap1* RNA in nur wenigen Geweben, besonders in der Milz, detektierbar. Die Expression ist also stark gewebsspezifisch reguliert. Für die beobachtbaren Unterschiede in der Expression der *himap*-mRNA können verschiedene Regulationsebenen verantwortlich sein. Diese umfassen die Transkriptionsinitiation und -elongation, Prozessierung des Primärtranskriptes, Transport der reifen mRNA ins Cytoplasma und Stabilität der mRNA im Cytoplasma. In den weitaus meisten Genen wird die Expression auf der Ebene der Transkription reguliert. Aus diesem Grund ist es sinnvoll zuerst die Promotorregion des *himap1* Gens zu definieren und hinsichtlich ihrer Aktivität zu testen. Darüber können Mechanismen identifiziert werden, die eine gewebs- bzw. zellspezifische Expression ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Bereiche, sowohl oberhalb des Transkriptionsstarts, als auch des ersten Introns hinsichtlich ihrer Promotoraktivität untersucht.

```

-1551  GAAATAAAGACAGAAACGGTTACTTTTCAATAGGAAGAAGATCCCAGAAAGCACCAGTAGGAAAGTGG
      XFD-2                IK-2                NFAT
-1481  AATGTGGGACGGGAAGGGATAGTAGCCAATGCAAGTTGCATTAATGAGCACATTACCACTGTATACGGT
      IK-2
-1411  ATGAGGATGTTCCCACTGCAGACAACCTGGGTCTCAGTCTGCTGGGACTCAGCAATTTGTATGCAGTA
      NfκB                IK-2
-1341  ATCACAGAGTTGTCTCACGTGGTGGACAACCTTGATAAGTTGTGGTGTATCCATAAGTCCCTAACTGAC
      Oct-1                GATA-1                HFH-8
-1271  TTGATTGAAATCTGCTCCTAGGATATCAGCTCTGACAACCTCAGGCTGCTGCATGCATTACCTACATAT
      Gfi-1                GATA-2                AP-4
-1201  CTTTTGTAGTCAGATAAACCTCTGCAGAGAGTTATGAGTGGCTGAAGTAAGACATCATAACATGCA
      GATA-2                C/EBPβ
-1131  GGAAACAATAAATGGCCGGAGCTGTTGAAGAGGCTCTGAAAGCGTCTTTATGAAAGGTACACGTC
      NFAT                C/EBPβ                TCF-11
-1061  ATCAAAGACTTATTCAAAGCTGATCTATGTGGCTTGGCTAGGATGAGGCTAGTGAGAAGCCCTAGGCA
      AP-1                TCF-11
-991   CTCACTCTTAAGAAAACACTCACTCCCAGGGTCACCCACCTACAAGATCTGCACCTGGGTGACCTGAGA
      IK-2                GATA-3
-921   TGAGTGCCCTCCTTAAGCTGTGTCTTAGATGCCCCACCTGCCTCACAATAGCCCCAGCCCTGCCGGTC
      AP-4                MZF-1
-851   ACTGGGAGAATGACAGGCTCCCTGTTTCAGCAATGATGAATGGAAACAGTGGACATGTCAGATATCCAG
      LYF1                C/EBPβ                NFAT
-781   AGACTCTGTGCCCCAAAAAGATGGGAAACAGTAAAAGCTGGGTCTCTTCCCTACCAGAAAAAAGTGG
      IK-1                IK-2
-652   CTGGCATGAAAGAGGTTAAAAAGCAGATCCTATCCAGTAGGTAAGACTCGGGTATTGTCTTCCCAT
      GATA-3                MZF-1
-711   TACTCCAGAAAGCCAACCTCCAGAAAGTTTAAATGAGTTAGGTGAGGTCTATAGCTGGTTAATGACCTA
      C/EBPβ                AP-1
-641   CCAGATATGCAGCCTGCTCCTCTGTAGCCTTCTTACCACCCAGTGATTCGCTTTTTTGTGACCTCATG
      OCT-1                Gfi-1                CREB
-571   TGCTCTTGAGAGAAGATAGAATAACTAGAACTGGTGATACCAACATAGACGACTAGACTAAAGCCTCCT
-501   ATAAGGCTAAATTGAAGATAGTGCGAAGGTGTTTCATCCTCAACATACCAGTTACCCTCAAGTCCTTCA
      GATA-1
-431   TAGCTGGGAAAGCCCTCCTCTCTCAGAGAATGATAAGACTTTGCCTTCAGGTTTTTCTGGCAGACTGGA
      NfκB                GATA-1
-361   CTGGGGCTGGCAGTGGCCACATGAATGTCTAATTAATGGACAGATGATGAGAACAGCTATTACGTTATT
      CAAT                Brn-2                CEBP-1
-162   GTCCGGGGCAGGAGACTCTCTGGGCCTATTTTATATGGGAAATGTCCCTATAGGGCAAAGGCAACTG
      GC-box                Brn-2                C/EBPβ                NFAT                SRF-1
-291   AGATTAGCTCAGTAATCAATTTTAGAAGTACAGTCAGGCTCAGAGACTACAACATCCCTCCCTTCTTA
      Gfi-1                AP-1                IK-2                SP-1                IK-2
-221   AGCATGGCAAGATATTTGACATCATGAGGCCCTGCTGGAGACACATAACCTCAGTCACAGCAGAAAGTA
      GATA-1                AP-1                CREB                AP-1                AP-4                NF-1
-151   AGTCGGTAGGAGAAGTATTGCCAACCCACAGCTCAATGGGAAATGTTTCTGTCTCTTTAAACATAAAC
-81    TGGGGCCACCTGAGCTTCCTGATTCTGAAGTCTGAGTGATTTCTCCGTGTGCCGAGAGGAAACAG
      GC-box                Gfi-1                Elk-1                Gfi-1                NFAT
-11    CTTCTGCACTCAGCCGAAGGAAAGCAGCAGGTTGGGGCTTCTGTGGCCAACCTTCAGAGCCTGTCA
      IK2                NFAT                AP-1
+59    CCAGGAAAGG

```

Abbildung 34

Putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *himap1* Promotor. Mit Hilfe des Programms MatInspector wurde das Promotorfragment *himap1*-1591 mit der Transfac Datenbank verglichen. Aufgeführt ist eine Auswahl der Bindungsstellen, die unterstrichen dargestellt sind. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit einem Pfeil dargestellt

Mit Hilfe des Programms MatInspector wurden in der Transfac Datenbank putative Bindungsstellen für aktivierende oder hemmende Transkriptionsfaktoren identifiziert. Eine Auswahl möglicher Bindungsstellen ist in Abbildung 34 dargestellt, wobei neben den für eine Basalaktivität wichtigen Standard-Transkriptionsfaktoren diejenigen ausgewählt wurden, die im Verlauf von Abwehrreaktionen einer Infektion induziert werden. Auch Faktoren die in vorwiegend in hämatopoetischen Zellen vorkommen wurden gesucht. Der bereits beschriebene Transkriptionsstart befindet sich in einer Umgebung von DNA-Motiven die typische für derartige Initiationsstellen sind. Die Start-Position (+1) liegt strangabwärts einer GC-Box bzw. eines GC reichen Abschnittes und unmittelbar vor einer E2F-Bindungsstelle (Thalmeier *et al.* 1989, Nevins 1992). Eine Anordnung die als typisch für TATAA-Box lose Promotoren beschrieben worden ist (Azizkhan *et al.* 1993). Einige eukaryontische Gene besitzen an Stelle der TATA-Box ein alternatives Promotorelement, das als Initiator bezeichnet wird. Die meisten natürlich vorkommenden Initiatorelemente tragen an Position -1 ein C und an Position +1 ein A (Javahery *et al.* 1994). Diese Konstellation ist auch im *himap-1* Promotor wiederzufinden. Mehrere GC- und CAAT-Boxen können eine wichtige Rolle für die Basalaktivität des Promotors spielen.

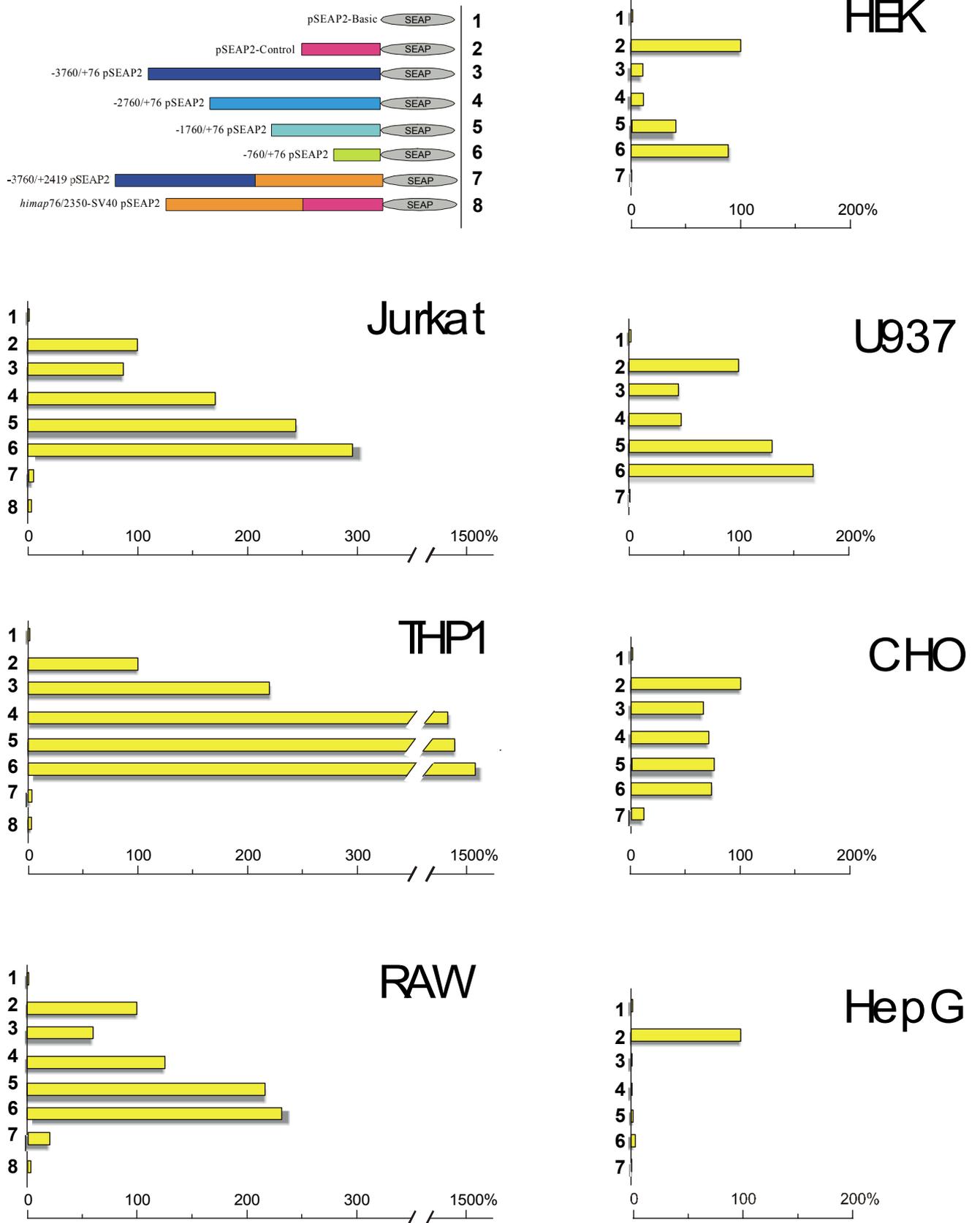
Die Transkriptionsfaktoren AP-1 (Mermod *et al.* 1988), AP-2 (Morris-Kay 1996), SRF (Treisman & Ammerer 1992) und CREB (Hai & Curran 1991) sowie der Glukokortikoid- und Estrogenrezeptor (Parker 1993, Beato *et al.* 1995) sind in vielen Zelltypen für eine induzierbare Genexpression verantwortlich. Die aktive Beteiligung bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen und Immunantworten wurde für die Faktoren NF- κ B (Grilli *et al.* 1993), STAT-1 (Horvath *et al.* 1995), C/EBP β (Alam *et al.* 1992), IRF-1 (Tanaka *et al.* 1993), Ets-1 (Macleod *et al.* 1992) und Elk-1 (Rao & Reddy 1992) gezeigt. Diese Faktoren können demnach auch für die Induktion der *himap-1* mRNA während einer Malariainfektion verantwortlich sein. Die Aufrechterhaltung einer vorwiegend milz- bzw. immunsystemspezifischen Expression kann von der Beteiligung gewebsspezifischer Transkriptionsaktivatoren abhängen. Dabei handelt es sich um Faktoren der GATA Familie (Yamamoto *et al.* 1990), Oct-1 (Rosales *et al.* 1987, Hanke *et al.* 1988), Ets-1, Elk-1 und MZF-1 (Hromas *et al.* 1996), aber auch um Transkriptioninhibitoren wie CHOP (Ron & Habener 1992), YY1 (Park & Atchinson 1991) und Gfi-1 (Zweidler-McKay *et al.* 1996).

Die Basalaktivität des *himap-1* Promotors wurde mit einem Reporter-Gen-Assay in verschiedenen Zelllinien getestet. Dazu wurden Bereiche oberhalb des Transkriptionsstartpunktes und des ersten Introns mittels genomischer PCR amplifiziert und in den Vektor pSEAP2Basic kloniert. Die daraus resultierenden Deletionsklone sind in Abbildung 35 dargestellt. Diese beginnen -3,76 kb, -2,76 kb, -1,76 kb und -0,76 kb oberhalb des Transkriptionsstarts und enden 3'seitig (+76) des ersten Exons. Um auch regulatorische Einflüsse des ersten Introns zu erfassen, wurde der Bereich von -3,76 bis +2419 ebenfalls kloniert und getestet. Hierbei war darauf zu achten, dass die Spleißstelle am Übergang vom ersten Intron zum zweiten Exon mit erfasst wurde, um so ein Herausspleißen des Introns auch im Reporter-Gen-System zu ermöglichen. Die aus den Klonierungsarbeiten resultierenden Plasmide wurden transient in verschiedene Zelllinien transfiziert. Die Aktivität des Promotors wurde durch Messung der Aktivität des Reporter-Genes SEAP im Zellkultur-Überstandes bestimmt. Da die Transfektionseffizienz bei verschiedenen Zelllinien um mehrere Größenordnungen variieren kann wurden zur besseren Vergleichbarkeit Parallelansätze mit dem Vektor pSEAP2Control durchgeführt. Bei diesem Vektor steht die Expression des Reporter-Genes unter der Kontrolle des unmittelbar frühen Promotors und Enhancers des SV40-Virus. Die relative Stärke des *himap1* Promotors wurde im Vergleich mit dem SV40/Enhancer, in derselben Zelllinie bestimmt.

Abbildung 35

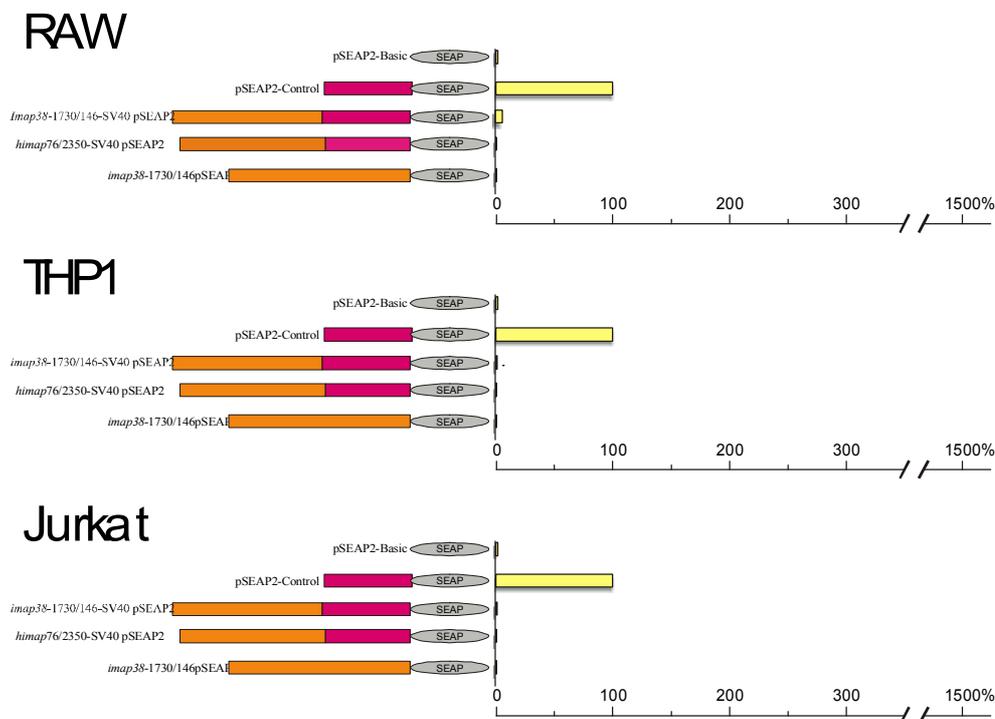
Aktivität von Deletionsklonen des *himap1* Promotors. Die Zellen wurden transient mit verschiedenen Deletionskonstrukten des *himap1* Promotors in pSEAP2Basic transfiziert. Die SEAP Aktivität im Kulturüberstand wurde nach drei Tagen bestimmt und relativ zur Aktivität des Kontrollplasmids pSEAP-Control dargestellt

Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien, aber



auch innerhalb der Deletionsklone. Die größte Promotoraktivität war in der Makrophagen-Vorläuferzelllinie THP1 zu verzeichnen. Sie betrug bis zum 15 fachen der Aktivität des SV40 Promotors bei Verwendung des kürzesten Deletionsklons (6). Allerdings zeigen auch die Deletionsklone 5 und 4 mit 1040 % und 1432 % ein Vielfaches der Aktivität des Kontrollpromotors. Auffällig ist, dass der Klon 7, der den Bereich des ersten Introns beinhaltet, mit 22 % eine sehr geringe, wenn auch deutlich messbare Aktivität aufweist. Die zweitstärkste Promotoraktivität ist in Jurkat-Zellen zu beobachten, was insofern etwas erstaunlich ist, da für das *himap-1* am nächsten verwandte Gen der Maus (*imap38*) eine Expression in T-Zellen ausgeschlossen werden konnte (vgl. Abbildung 32). Hier betragen die Aktivitäten des *himap-1* Promotors 1,7 (Klon 4) bis 3,0 (Klon 6) mal mehr als der SV40 Virus Promotor. Wiederum zeigt der Deletionsklon 7 jedoch nur eine Bruchteil der Aktivität der Kontrolle. Unwesentlich geringer (232 % bei Klon 6) ist die Aktivität der Deletionsklone in der Maus-Makrophagenzelllinie RAW, wobei auch in diesem Experiment eine Abnahme der Promotoraktivität mit der zunehmenden Länge der Deletionsklone festzuhalten ist (60 % bei Klon 3). Dieser Trend setzt sich in der Makrophagen Zelllinie U937 fort. Hier beträgt die Aktivität des Deletionsklons 6 ca. 170 % im Vergleich zur Kontrolle. In der humanen embryonalen Nierenzelllinie ist das Verhältnis der Deletionsklone untereinander vergleichbar mit den zuvor beschriebenen, jedoch beträgt die Aktivität des kürzesten Deletionsklons (6) nur noch 90 % der des SV40 Virus Promotors. In der humanen Lebertumor-Zelllinie HepG ist fast keine Aktivität (maximal 4 % bei Klon 6) festzustellen, obwohl diese immer noch deutlich messbar über der Basalaktivität liegt. Eine Besonderheit bildet die CHO-K1 Zelllinie aus Hamster-Ovarzellen. Hier ist die Aktivität vergleichbar mit der des SV40 Kontrollpromotors, jedoch zeigen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Deletionsklonen. Lediglich der Klon, welcher das Intron enthält, zeigt erneut eine nur sehr geringe Promotoraktivität.

Abbildung 36
Aktivitäten der putativen Silencerregionen im *himap1* und *imap38* Promotor. Dargestellt sind die Ergebnisse des Reporterassays, mit dem der direkte Nachweis einer negativ aktivierenden Wirkung des ersten Introns des *himap1* Promotors und des Promotorbereiches -1730/+146 von *imap38* erbracht werden sollte.



Aus den Ergebnissen der Reporter-Gen-Assays lassen sich die folgenden Kernaussagen ableiten: 1. Die Aktivität des *himap1* Promotors ist in immunologisch relevanten Zellen deutlich ausgeprägter als z.B. in Gewebe-Zelllinien. Dabei sind besonders Makrophagen zu nennen, weil hier eine starke Aktivierung über Artgrenzen hinweg zu verzeichnen ist (THP1 und RAW). 2. Zellen mit keiner oder nur einer geringen *himap1* Expression zeigen auch keine bzw. nur eine sehr geringe Promotoraktivität (HepG und HEK). 3. Die Länge der Deletionsklone hat einen eindeutigen Einfluss auf die Promotoraktivität, wobei die Länge sich im reziproken Verhältnis zur Aktivität verhält. 4. Letztendlich muss vom ersten Intron eine negative Wirkung auf die Promotoraktivität ausgehen, was in weiteren Experimenten näher untersucht werden muss.

Die Ergebnisse der Reporter-Gen-Assays zeigten nur eine sehr geringe, wenn auch deutlich messbare Aktivität des Deletionsklon 7. Diese Verringerung der Aktivität kann nicht allein mit der Plasmidgröße und der damit verbundenen schlechteren Transfektionsrate erklärt werden. Der Klon 7 enthielt die gesamte Promotorregion von -3,76 kb bis +2,41 kb, also den Bereich oberhalb des Transkriptionsstarts, das erste Exon und das erste Intron. Um eine deaktivierende Funktion des ersten Introns nachzuweisen wurde dieser Bereich unmittelbar vor die Positivkontrolle, den SV40 Virus Promotor, im Vektor pSEAP-Control kloniert. Parallel wurde die gesamte Region des verwandten *imap38* Promotors in gleicher Weise vor den SV40 Promotor kloniert. Dies geschah, weil dieser Promotor in keiner bisher transfizierten Zelllinie Aktivität gezeigt hatte (Krücken 1999). Mit diesen Konstrukten wurden die Zelllinien transfiziert, in denen der *himap-1* Promotor im Reporter-Gen-Test die größten Aktivitäten gezeigt hatte (THP1, Jurkat, RAW). Als Kontrollen wurden auch hier die Plasmide pSEAP-Basic, pSEAP-Control und der Deletionsklon des *imap38* Promotors -1730/146pSEAP2 (Krücken 1999) transfiziert. Die Aktivität wird relativ zur Stärke des SV40 Virus Promotors in derselben Zelllinie dargestellt. Wie Abbildung 36 zeigt, können sowohl die Bereiche aus dem ersten Intron des *himap1* Gens, wie die ausgewählte Promotorregion des *imap38* Gens die Aktivität des SV40 Promotor wirksam unterdrücken.

4.0 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die funktionale Charakterisierung der beiden offenen Leseraster des Gens *imap38* und die Klonierung von homologen Genen im Menschen. *Imap38* wird in der Milz von C57/BL10 Mäusen malariaspezifisch um den Faktor 40 induziert und verbleibt auch 13 Wochen nach dem Ausheilen der Infektion auf diesem hohen Niveau. Das *imap38* Gen kodiert die Information für zwei überlappende offene Leseraster IMAP38-1 und IMAP38-2, wovon letzteres eine Ähnlichkeit mit den mIAN-1 und mIAN-3 Proteinen der Maus bzw. dem AIG1 Protein aus Arabidopsis aufweist (Poirier 1999, Assubel 1996). Die mIAN Proteine werden im Verlauf der T-Lymphozyten Reifung verstärkt exprimiert, das AIG1 Protein wird bei der Abwehr von Bakterieninfektionen induziert. Die für Eukaryonten ungewöhnliche Struktur von überlappenden Leserastern wurde anhand der *imap38* mRNA im Hinblick auf eine mögliche Regulation auf der Ebene der Translation eingehend untersucht. Die *in vitro* und heterolog durchgeführten Translationsexperimente zeigten ausschließlich eine Expression des vorderen Leserasters IMAP38-1, welches im Zellkern lokalisiert werden konnte. Mit spezifischen anti-IMAP38-1 Antikörpern konnte weder in Maus-Milzzellen von infizierten/immunen noch bei naiven Tieren das IMAP38-1 Protein detektiert werden. Mit dem IMAP38-1 als „Köder“ wurde mit Hilfe des „Two-Hybrid-Systems“ die Epitheline/Granuline als mögliche Interaktionspartner identifiziert. Das IMAP38-2 Protein wurde ebenfalls heterolog exprimiert, am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und seine Fähigkeit GTP zu binden erstmals nachgewiesen.

Das zu *imap38* homologe humane Gen *himap1* wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben, und sein Expressionsmuster in verschiedenen Geweben und Zelllinien untersucht. Auf Basis dieser experimentellen Daten wurde die Definition und phylogenetische Gruppierung einer neuen Proteinfamilie, bestehend aus HIMAP1-4, IMAP38-2, IAN1-4 und AIG1 möglich. Die Expression von *himap1-4* wurde auf RNA-Ebene in 76 humanen Zelltypen und Geweben untersucht. Es zeigte sich eine eindeutige Expression in immunologisch relevanten Zelltypen und Geweben (Milz, Knochenmark). Auch wurde mit *himap-1* erstmals ein Promotor dieser neuen Genfamilie aus humaner DNA kloniert und eine starke zelltypspezifische Aktivierung in Monozyten und T-Zelllinien festgestellt. Das HIMAP-1 Protein wurde ebenfalls am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, eine GTP-Bindung konnte aber unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei IMAP38-2 nicht nachgewiesen werden. Die beschriebenen Ergebnisse werden im Hinblick auf eine Funktion dieser neuen putativen G-Proteine im Rahmen der Infektabwehr diskutiert. In diesem Zusammenhang wird zuerst auf ungewöhnliche Regulationsmechanismen, die sich aus den Expressionsdaten der *imap38* RNA ergeben haben, eingegangen.

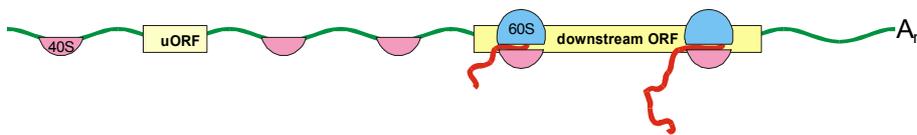
4.1 Ein Gen, zwei Proteine – überlappende Leseraster in Eukaryonten

Die Expression von Genen bzw. Genprodukten kann auf vielen Ebenen kontrolliert und reguliert werden. Diese umfassen die Transkription, das RNA-Spleißen, die Stabilität der RNA, die Translation und die post-translationalen Mechanismen wie Proteininstabilität und chemische Modifikationen. Bis heute konzentriert sich die Mehrheit der Untersuchungen auf das Verständnis der transkriptionellen Kontrollmechanismen. Die Bedeutung der post-transkriptionellen Regulationsmechanismen in Eukaryonten wird allerdings zunehmend mehr anerkannt, da mittlerweile die Variationen der Translationskontrolle auch bei einigen Krankheitsbildern von Bedeutung sind (Cazzola & Skoda 2000). Die *imap38* mRNA weist in diesem Zusammenhang einige Besonderheiten auf, die auf eine komplexe Regulation auf verschiedenen Ebenen hindeuten. Die erste Regulationsebene ist die Transkription, weil die RNA Menge im Verlauf einer Malaria-Infektion um den Faktor 40 erhöht werden kann und auch noch Wochen nach dem Abklingen der Infektion auf diesem hohen Niveau verbleibt (Krücken 1999). Diese so stark exprimierte cDNA beinhaltet, was bei Eukaryonten eher selten ist, zwei überlappende Leseraster 277 (ORF1) und 246 Aminosäuren (ORF2) und ist damit polycistronisch (Lee 1991; Szabo 1994). Den beiden langen Leserastern ist ein ebenfalls ungewöhnlich langer 5'UTR vorangestellt, eine Voraussetzung für die Bildung von RNA-Sekundärstrukturen, und er enthält drei Startkodons strangaufwärts vom Startpunkt des ersten großen Leseraster. Diese Startkodons kodieren für drei kurze Peptid-Leseraster

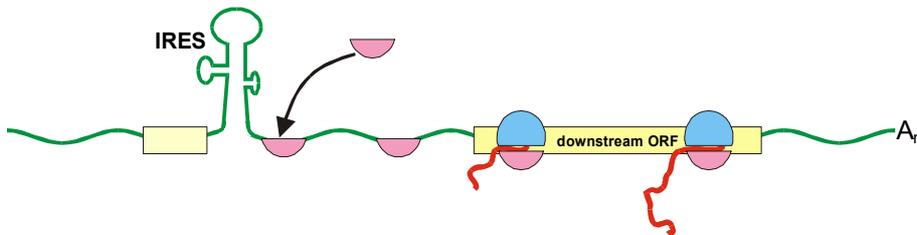
(uORF's) mit einer Länge von 5, 22 und 33 Aminosäuren. Die Bedeutung dieser ungewöhnlichen Struktur-Elemente für eine Regulation der Translations-Effizienz und der damit verbundene differentiellen Expression der beiden großen Leseraster IMAP38-1 und IMAP38-2, wird vor dem Hintergrund der aktuellen Kontroversen in der Translationsforschung diskutiert.

Die Translationsinitiation ist ein mehrstufiger komplexer Prozess, in dem neben den Ribosomen und den tRNA's nicht weniger als 25 Proteine beteiligt sind (Merrick & Hershey 1996). Zusätzliche Proteine modulieren die Aktivitäten der Hauptkomponenten der Translation. Der Translationsprozess gliedert sich dabei in drei Abschnitte: 1) den Start (Initiation) mit der Erkennung des AUG Kodons, 2) die Kettenverlängerung (Elongation) durch das Wandern des 80S Ribosoms und 3) den Abbruch der Synthese (Termination) am Stoppkodon und der Freisetzung der Polypeptidkette. Für eine Regulation bietet sich natürlich nur die Initiation an, die im Normalfall über das mittlerweile anerkannte „Cap“-abhängige Scanning-Modell erfolgt. Dabei bildet sich zuerst ein Dreierkomplex aus dem eukaryontischen Initiationsfaktor eIF-2, GTP und der mit Methionin beladenen Initiator tRNA. Einmal über das 5' Ende der RNA gebunden, wandert der 43S Komplex wahrscheinlich unter Energieverbrauch (ATP) am UTR entlang, ein Prozess der als „Scanning“ bezeichnet wird (Pain 1996). Dieses „Scanning“ endet normalerweise beim Erreichen des ersten AUG Startkodons. Nach dem Erkennen des Startkodons bewirkt eIF-5 die GTP-Hydrolyse im Dreierkomplex, die Initiationsfaktoren werden freigesetzt und die große 60S Untereinheit des Ribosoms dockt an, die Elongation der Peptidkette kann beginnen. Die minimalen Voraussetzungen einer RNA für eine Cap-abhängige Initiation erscheinen auf den ersten Blick simpel, da eine m7GpppG Kappe und ein AUG im geeigneten Kontext ausreichend erscheint. Nicht-AUG Kodons wie GUG oder CUG werden äußerst selten genutzt und sind dann auch sehr ineffizient als Initiatorcodon (Kozak 1989).

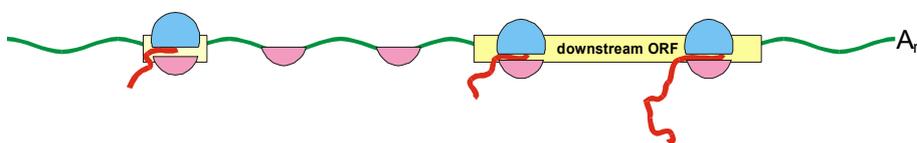
'leaky' Scanning



interne Ribosomen-Bindungsstelle



Reinitiation



Das „Scanning“-Modell wurde um drei weitere Variationen ergänzt: Das „leaky (undichte) Scanning“, die Re-Initiation und das diskontinuierliche Scanning („Hüpfen“). Das „leaky Scanning“ bezieht sich auf die Auswahl des Startkodons, d. h. die direkte Sequenzumgebung des Startkodons ist bedeutsam für die Initiation. Generell werden nahe am „5' Cap“ gelegene AUG Kodons von den Prä-Initiationskomplexen schlecht erkannt bzw. ignoriert (Sedman *et. al* 1990; Kozak 1991c). Bei den weiter strangabwärts liegenden AUG Kodons ist die Sequenzumgebung entscheidend, wobei als Konsensus-Sequenz die Abfolge GCCGCC^N °CCAUGGAU für Vertebraten definiert wurde (Kozak, 1983; 1884a,b; 1986b; 1987a; 1989b). Die wichtigsten Positionen für eine effiziente Translation (das Adenin des Startkodons gilt als Position +1) sind eine Purinbase (A/G) an Position -3 und ein G an Position +4. Sind diese Positionen nicht entsprechend besetzt, so werden die Positionen +5 und +6 wichtiger und sollten ein A oder ein C in Pos. +5 und ein U in Pos. +6 beinhalten (Boeck &

Abbildung 37

Translationsmechanismen, die inhibitorische Effekte von uAUG Kodons umgehen:

- 1) „leaky scanning“, das Ribosom passiert (übersieht) das uAUG ohne zu initiieren und startet die Translation erst am Haupt-AUG.
- 2) IRES: der Präinitiationskomplex beginnt nicht am Cap, sondern direkt innerhalb des UTR hinter besonderen Strukturen (interne Eintrittsstellen).
- 3) Reinitiation: das Ribosom translatiert den uORF, der Präinitiationskomplex verbleibt aber an der RNA und setzt den Scanning Prozess bis zum Erreichen des nächsten AUG Kodons fort, wo erneut die Initiation stattfindet.

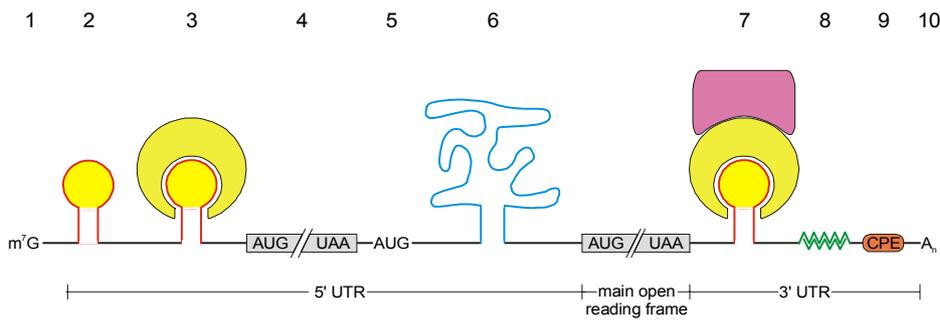
Kolakofsky 1994). Das Ergebnis einer ineffizienten Erkennung des Startkodons führt zu einer Weiter-Wanderung des 43S Komplexes strangabwärts, ein Prozess der als „leaky Scanning“ bezeichnet wird. Dass die Sequenzumgebung nicht die alleinige Voraussetzung für eine Translationsinitiation sein kann, wird auch am Beispiel der beiden *imap38* Leseraster deutlich, da sich hier kein AUG Kodon im optimalen Kontext einer „Kozak“-Sequenz sich befindet. Trotzdem konnte eine effiziente Translation in verschiedenen zellfreien und zellulären Expressionssystemen nachgewiesen werden.

Die „Reinitiation“ ist eine weitere, eher selten auftretende Variation des „Cap“-abhängigen Scanning-Mechanismus. Per Definition kann dieser Prozess nur bei bi- bzw. polycistronischen mRNA's ablaufen, weil hierbei nach der Translation eines uORF's eine zweite Initiierung erfolgt (Liu *et al.* 1984; Kozak 1984b; 1987b). Ein Beispiel dafür ist eine bicistronische mRNA aus *Drosophila*, obwohl hier das strangaufwärts liegende Leseraster nicht wie sonst für uORF's üblich, deutlich kürzer ist als das dahinter liegende „Haupt-Raster“ (Brognia & Ashburner 1997). Es wird postuliert, dass die 60S Untereinheit des Ribosoms wegdissoziiert, während die 40S Untereinheit den Scanprozess fortsetzt. In jedem Fall muss der Dreierkomplex aus eIF-2, GTP und tRNA an der mRNA verbleiben um die interne Reinitiation strangabwärts zu ermöglichen.

Als diskontinuierliches Scanning bzw. „Hüpfen“ wird ein Phänomen bezeichnet, das bei viralen mRNA's auftritt, die Sekundärstrukturen aufweisen, welche ein Scanning verhindern, aber auch keine interne Initiation zulassen (Futterer *et al.* 1993; Yeuh & Schneider; Dominguez *et al.* 1998). Der Prä-Initiationskomplex überwindet diese Strukturen mit einem noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus, indem er an den „Sperr“-Strukturen vorbeispringt (engl.: hopping, jumping, shunting). Besonders intensiv wurde dies am Beispiel der 35S RNA des Cauliflower-Mosaik-Virus untersucht. Jüngste Ergebnisse zeigten, dass hier eine Kombination aus „Jumping“ und Reinitiation vorliegt, die auf dem Zusammenwirken von RNA-Sekundärstrukturen („stem-loops“) und kleiner uORF's beruht (Ryabova & Hohn 2000).

Eine echte Alternative und keine Variation des „Cap“-abhängigen Scanning-Modells ist die „Interne Initiation“, welche auch als „Cap“-unabhängige Initiation bezeichnet wird. Sie wird durch Sekundärstrukturen des 5'UTR ausgelöst, die so genannten IRES (internal-ribosome-entry-sites) und wurden erstmals an Picornaviren entdeckt (Jackson & Kaminski 1995). Die IRES-vermittelte Translation bedarf keines freiliegenden 5'-Endes, was durch die Translation von zirkulären mRNA's bewiesen wurde (Chen & Sarnow 1995). Dieser Mechanismus ist als ein Analogon zur prokaryontischen Translation zu bewerten, wobei die IRES der Shine-Delgarno Sequenz entspricht (Pestova *et al.* 1998). Allerdings benötigt die Translation zusätzliche *in trans*-agierende Faktoren wie das „polypyrimidine tract binding protein“ (PTB) (Hellen *et al.* 1993; Kaminski *et al.* 1995) oder das „La“ Autoantigen (Meerovitch *et al.* 1993; Svitkin *et al.* 1994a). Die Aufgabe dieser Faktoren ist es, die Struktur der IRES in eine für die Translation günstige Konformation zu überführen (Svitkin *et al.* 1994b; Kaminski *et al.* 1995). Bei Eukaryonten ist allerdings bisher nur eine einzige RNA (PITSLRE) beschrieben, bei der die interne Initiation über eine echte IRES erfolgt (Kozak 2001).

Welcher dieser Initiations-Mechanismen im Falle der *imap38*-cDNA die Expression des ersten Leserasters ermöglicht bzw. die des zweiten verhindert (oder umgekehrt), hängt möglicherweise von den im 5'UTR vorhandenen Regulationselementen ab. Dass derartige Regulationsmechanismen vorhanden sind beweist an sich schon die Tatsache, dass selbst für die Translation des ersten Leserasters der Prä-Initiationskomplex drei AUG Kodons ignorieren muss, um dann an einem genauso sub-optimalen Startkodon zu beginnen, ein Prozess der dem Modell der Reinitiation entspricht. Die Länge von 423 bp UTR bis zu diesem vierten Startcodon bzw. 631 bp bis zum neunten Startkodon liegt deutlich über der durchschnittlichen Länge von 20–100 Nukleotiden bei Eukaryonten (Kozak 1987). Die Verkürzung eines UTR's auf 12 Nukleotide beeinträchtigt die Translation vom ersten AUG (Sedman *et al.* 1990, Kozak 1991c). Die Verlängerung kann die Effizienz der Translation steigern, weil zusätzliche 43S Prä-Initiationskomplexe am UTR binden können, was gelegentlich auch als „Pre-Loading“ bezeichnet wird (Kozak 1991b). Ein langer 5'UTR bietet jedenfalls mehr Möglichkeiten für regulatorische Elemente, welche im folgenden kurz beschrieben und mit der *imap38* RNA verglichen werden.

**Abbildung 38**

Formen der Translations-Regulation durch 5' und 3' Enden der mRNA. Die Regulation über den 5'UTR kann vermittelt werden durch 1) Modifikationen der „Cap“-Struktur
2) Sekundärstrukturen
3) RNA-Protein Interaktionen
4) upstream open reading frames, 5) upstream AUGs
6) IRES-Elemente
3'UTR vermittelte Regulation kann auftreten durch
7) RNA-Protein Interaktionen mit Multi-Enzym Komplexen
8) RNA-RNA Interaktionen
9) cytoplasmatische Poly-Adenylierungselemente
und 10) Veränderungen im Poly(A) Schwanz.
[Modifiziert nach Gray & Wickens 1996]

Beginnend mit den kurzen „upstream open reading frames“ uORF's, von denen drei in der *imap38* RNA kodiert werden ist die relative Lage zum Haupt-Leseraster von Bedeutung. Ist der Abstand zwischen dem Stoppcodon des uORF's und dem Startcodon des Haupt-Leserasters sehr kurz ist die inhibitorische Wirkung größer, weil die Zeit für eine erneute Re-Assemblierung des Initiationskomplexes nicht ausreicht. Im Falle der *imap38* RNA entspricht dieser Abstand von 69 bp immer noch der Länge eines „normalen“ UTR's, so dass eine Re-Initiation durchaus erfolgen kann. Auch wurde beobachtet, dass uORF's mit Startcodons in nicht-optimaler Sequenzumgebung weniger inhibitorisch wirken, wie solche mit optimaler „Kozak-Sequenz“ (Cao & Geballe 1995). Wie schon erwähnt befindet sich kein AUG-Kodon der *imap38*-RNA im optimalen Kontext. Ein Einfluss der Länge der uORF's wird vermutet, ist aber bisher nicht näher untersucht worden. Ein besonders intensiv untersuchtes Beispiele für die Regulation über vier uORF's ist die Translation der GCN4 mRNA in Hefe (Hinnebusch 1996). Bei den hier beschriebenen Einflussmöglichkeiten war die Sequenz der translatierten Peptide nicht von Bedeutung. Mutationsstudien an anderen Modellen haben ergeben, dass auch die Peptidsequenz eine Auswirkung auf die Translation von strangabwärts gelegenen Leserastern besitzen. Als Beispiel hierfür kann die Translation der S-Adenosylmethionin Decarboxylase (AdoMet) mRNA betrachtet werden. Da der Einfluss der Peptide nicht *in Trans* aktiv ist, bewirkt die entstehende Peptidsequenz, welche aber noch in Verbindung mit der mRNA steht, ein Aufhalten des Ribosoms (Hill & Morris 1993, Geballe & Morris 1994). Das solche Peptide aber auch einen stimulatorischen Effekt für die Translation haben können, indem es hilft Sekundärstrukturen zu überwinden wurde ebenfalls beim Cauliflower-Mosaik-Virus aufgedeckt (Dominguez 1998). Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Translation der *imap38*-RNA, kann nur ein geringer inhibitorischer Einfluss des 5'UTR's auf die Expression des ersten Leserasters festgestellt werden. Im *in vitro* System begünstigt das Fehlen der uORFs offenbar die Expression eines kürzeren Translationsproduktes. Bei dieser Bande handelt es sich aber um ein verkürztes Produkt des ersten Leserasters und ist vermutlich das Ergebnis eines „leaky Scanning“ Effektes, bei dem das fünfte AUG bevorzugt als Initiator-Kodon genutzt wird zumal es sich als einziges in einem günstigeren Kontext (G an Position +4) befindet. In keinem Experiment konnte durch Veränderungen im 5'UTR eine Expression des zweiten Leserasters induziert werden. Eine Regulation, welche die Expression des zweiten Leserasters unterbindet, müsste demnach auf der RNA im Bereich zwischen dem fünften und neunten AUG eingreifen. In diesem Zusammenhang wurde die mRNA auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturen untersucht. Der inhibitorische Einfluss dieser Sekundärstrukturen (meist doppelsträngige Bereiche der RNA „stem loops“) ist abhängig von der Stabilität und der Position dieser Strukturen (Pelletier & Sonenberg 1985a, Kozak 1986a, 1998) und kann durch zwei Mechanismen wirksam werden. Ein Weg ist dabei die Blockierung des 43S Prä-Initiation-Komplexes durch metastabile Strukturen nahe dem „Cap“ (Lawson *et al.* 1986). Dies funktioniert allerdings nur, wenn die Distanz zwischen der Sekundärstruktur und dem 5'Ende das Andocken des 43S Komplexes direkt verhindert. Hat dieser Komplex einmal an die mRNA gebunden, so werden weniger stabile ($\Delta G < -30$ kcal/mol) Sekundärstrukturen vom Prä-Initiationskomplex linear überwunden, d.h. beim Scanning-Prozess aufgelöst (entwunden) und i. d. R. nicht übersprungen (Kozak 1986a).

Eine zweite Möglichkeit ist die Ausbildung von sehr stabilen RNA-Sekundärstrukturen ($\Delta G = -50$ bis -61 kcal/mol) welche die Translation auch in weiter Entfernung vom „Cap“ noch blockieren können. RNase Schutzexperimente zeigten einen blockierten 43S Komplex

plex 5'seitig einer solchen Sekundärstruktur die offenbar eine unüberwindbare Barriere für den Scanning-Prozess bildete (Kozak 1989a). Die *imap38* RNA wurde mit Hilfe von bioinformatischen Programmen (M. Zucker's RNA folding website) im Hinblick auf derartige Strukturen untersucht, aber es konnten keine besonders stabilen Strukturen entdeckt werden. Weder im Bereich strangaufwärts von AUG 4 noch der Bereich zwischen AUG 4 und AUG 9 weist Strukturen auf, deren freie Energie über -20 kcal/mol liegt. Wenn diese regulatorischen Elemente fehlen, kann die Expression des zweiten Leserasters offenbar alleine durch die Expression des ersten Rasters unterdrückt werden. Das erste Leseraster entspricht so einem überlappenden uORF des zweiten Rasters und die naszierende Polypeptidkette des ersten Rasters verhindert die Bildung des Initiationskomplexes am Startkodon des zweiten Rasters. Eine zeitgleiche Expression zweier Leseraster von einer mRNA ist somit ausgeschlossen. Als Beispiel kann hier die Connexin mRNA angeführt werden (Ionasescu *et al.* 1996), bei der durch Mutation ein verlängerter uORF transkribiert wird und mit dem Startkodon des Connexin ORFs überlappt, dessen Translation dadurch blockiert ist. Wenn also eine Expression des zweiten Leserasters nicht in Gegenwart des ersten Leserasters erfolgen kann und kein struktureller Mechanismus vorliegt, der die Translation des ersten Rasters verhindert, müßte eine Regulation auf einer Ebene vor der Translation eingreifen. Dies könnte auf zweierlei Möglichkeiten geschehen:

Möglichkeit A, wäre, dass eine Region um den Translationstartpunkt des ersten Leserasters doch noch durch Spleißen entfernt würde. Denkbar wäre auch, dass der 5'UTR so verkürzt würde, dass alle AUG Kodons des ersten Leserasters eliminiert wären. Das so freigelegte zweite Leseraster könnte dann problemlos translatiert werden und die Abwesenheit des Proteinproduktes von Raster 1 wäre erklärbar. Eine solcher Mechanismus ist für das MOCS1A und MOCS1B Protein beschrieben (Gray & Nicholls 2000). Der Schwäche dieser Hypothese ist, dass ein solches Spleißereignis Milz-spezifisch ablaufen müßte, weil sonst auch in den heterologen Expressionssystem dieser Effekt aufgetreten wäre. Eine zelltypspezifische Regulation des Spleißmechanismus ist jedoch sehr selten.

Möglichkeit B wäre von vornherein zwei separate bzw. nur ein Transkript zu postulieren, deren Transkription von verschiedenen Promotoren gesteuert wird. Eine solcher Mechanismus ist für den Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor p18INK4c beschrieben worden (Phelps *et al.*). Hier wird differentiell in Abhängigkeit vom Proliferierungszustand ein 2,4 kb und ein 1,2 kb langes Transkript gebildet, wobei nur das kurze Transkript effizient translatiert wird. Offenbar bewirkt die Anwesenheit des langen 5'UTR eine Attenuierung der Translation.

Auf *imap38* bezogen, müßte eine der cDNA entsprechende vollständige mRNA transkribiert werden, deren Translationsprodukt IAMP38-1 unter der Nachweisgrenze liegt. Zusätzlich wäre der Anstieg in der Transkriptmenge mit einer großen Menge von einer verkürzten mRNA zu erklären, die das zweite Raster exprimiert.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Frage zu stellen, ob es sich bei der *imap38* mRNA überhaupt um eine funktionelle, d.h. *in vivo* translatierte mRNA handelt? Jüngste Vergleiche von einigen hundert cDNA's ergaben, dass ungewöhnliche 5'UTRs mit den Regeln der Translation-Initiation gut übereinstimmen und dass mRNAs, welche problematische 5'UTR Regionen aufweisen auch von Transkripten abstammen die nicht (mehr?) translatiert werden (Kozak 2000). Beispiele für solche nicht translatierten mRNAs sind z. B. der Transkriptionsfaktor hPSE, der nur in gesunden Prostata Epithelzellen exprimiert wird. In Tumorzellen und Prostata-Karzinomzelllinien ist die *hPSE* mRNA, aber kein Protein nachweisbar. Auch hier scheint der lange 5'UTR die Translation zu verhindern, und man vermutet, dass in normalen Zellen ein alternativer 5'UTR die Translation ermöglicht (Nozawa *et al.* 2000). Zusätzliche Beispiele wurden von Lin *et al.* 1998; Xie *et al.* 1991; Hirarhara *et al.* 2000 und Denny *et al.* 1992) beschrieben. Gegen diese Annahme sprechen natürlich die in dieser Arbeit gezeigten *in vitro* bzw. heterologen Expressiondaten. Eine Ausweg wäre eine zelltypspezifische Blockierung bzw. Modifikation der *imap38* mRNA anzunehmen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Expression des zweiten, phylogenetisch bedeutungsvolleren Leserasters, einen komplizierten und unkonventionellen Mechanismus der Translationskontrolle erfordert.

4.2 Unterschiedliche Eigenschaften der IMAP Proteine und Hinweise auf eine mögliche Funktion.

Die *imap38* RNA enthält die genetische Information für zwei Proteine von vergleichbarer Größe, aber mit sehr unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften und Bestimmungsorten in der Zelle, was auf sehr verschiedene Funktionen hindeutet. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Charakterisierung des IMAP38-1 Proteins diskutiert. Die Eigenschaften des IMAP38-2 Proteins werden im Zusammenhang mit der Untersuchung über das HIMAP1 Protein vorgestellt.

Das Protein, welches sich vom ersten Leseraster ableitet, hat ein Molekulargewicht von 25,9 kDa und seine Aminosäurezusammensetzung weist außer einem hohen Anteil an basischen Aminosäuren (pI 10,15) keine Besonderheiten auf. Die bioinformatische Auswertung ergab keine Hinweise auf besondere Strukturen oder Motive. Es fehlen Transmembrandomänen und Signalpeptide. Der hohe Anteil an basischen Aminosäuren deutete aber auf eine Lokalisation im Zellkern hin. Erste Hinweise ergaben auch Probleme bei der Präparation von Gesamtprotein aus IMAP38-1 exprimierenden Zellen. Eine milde Lyse der Zellen, mit Hilfe von Detergentien und Ultraschall, nach der unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt wurden, führte zu keinen oder nur sehr schwachen Signalen im Immunoblot. Nur wenn auf den Zentrifugationsschritt verzichtet wurde bzw. dieser erst nach der Behandlung mit Probenpuffer erfolgte, war das Protein gut nachzuweisen. Diese Schwierigkeiten traten nicht auf, wenn die Proteinpräparation mit Hilfe des Trizol-Reagenz durchgeführt wurde, bei der eine fraktionierte Separation von DNA, RNA und Proteine erfolgte. Die isolierte Aufarbeitung von Zellkernen und Cytoplasma ergab dann auch ausschließlich deutliche Signale in der Kernfraktion. Der mit Hilfe der Immunoblottechnik gewonnene Befund der Kernlokalisation von IMAP38-1 sollte und konnte in heterologen Expressionssystemen (CHO-K1 Zellen) bestätigt werden. Dies geschah mit Hilfe von kommerziellen, gegen Fusions-Anteile gerichteten Antikörpern, und direkt gegen das Protein selbst hergestellten Antikörpern. Um auch einen von Antikörpern unabhängigen Nachweis zu führen, wurde die kodierende Sequenz mit der des „Enhanced-Green-Fluorescent-Protein“ (EGFP) fusioniert. Dieses Tag wird mittlerweile in der zellbiologischen Forschung häufig eingesetzt und erlaubt, ohne Zusatz von Kofaktoren, eine direkte Verfolgung von Proteinen in der Zelle (Cubitt *et al.* 1995). Dabei stellte sich heraus, dass eine N-Terminale Fusion (EGFP-IMAP38-1) ein eindeutig im Zellkern lokalisiertes Fusionsprotein zeigte, während die C-Terminale Fusion ein diffus in der Zelle verteiltes Signal ergab. Das für die Kernlokalisation verantwortliche Signal musste sich demnach am C-Terminus des Proteins befinden, was bei vielen KLS auch der Fall ist (Boulikas 1993). Dass der Kerntransport aktiv und sehr effizient von diesem Bereich gesteuert wurde, belegt die deutliche Abgrenzung von Kern und Cytosol. Auch bei einer in diesem heterologen Expressionssystem unvermeidbaren Überexpression ist das Cytoplasma vollkommen frei und der Kern bis auf die Nucleoli angefüllt. Weil die computergestützte Auswertung, wie schon erwähnt keine Hinweise auf eine Ähnlichkeit mit bekannten Kernlokalisationssignalen ergeben hatte, wurden zuerst sukzessive Deletionsklone der kodierenden Sequenz mit dem C-Terminus des EGFP Proteins untersucht, und damit die Region des Kernlokalisationssignals grob auf die letzten 86 Aminosäuren eingegrenzt. Um einen Effekt des EGFP-Proteins oder ungerichteter Diffusionsprozesse auszuschließen, welche Proteinen bis ca. 60 kDa den Eintritt in den Zellkern ermöglichen (Nigg 1997), wurde als Kontrolle dieser C-Terminale Bereich des IMAP38-1 Proteins mit der 120 kDa großen cytoplasmatischen β -Galactosidase fusioniert. Auch dieses Fusionsprodukt wurde effizient und eindeutig in den Zellkern transportiert, weshalb das entsprechende KLS in diesem Bereich liegen muss. Von diesem Bereich wurden erneut vier überlappende, im Schnitt 26 AS lange Bereiche, mit EGFP fusioniert und deren Verteilung in der Zelle untersucht. Erstaunlicherweise war keiner dieser Teilbereiche in der Lage einen Kerntransport zu bewirken, die Fluoreszenzsignale waren diffus über die gesamte Zelle verteilt. Offenbar ist nur die Gesamtheit der Aminosäuren in dieser Region als Kernlokalisationssignal wirksam, was auf einen neuen Typ dieser Signale hindeutet. Im Folgenden werden die bisher in der Literatur beschriebenen KLS kurz beschrieben und mit der IMAP38-1 Sequenz verglichen.

Der Definition nach wird als KLS eine kurze Abfolge von Aminosäuren bezeichnet, die den Transport von Proteinen in den Zellkern vermittelt. Die Anwesenheit dieser Sequenzen kann auch nicht-Kernproteine in den Kern dirigieren, das Fehlen solcher Sequenzen verhin-

dert den Kerntransport. Zuerst wurden die KLS in zwei Kategorien eingeteilt (Dang & Lee 1989), wobei die erste die Signale beinhaltet, welche eine „Helix-brechende“ Aminosäure (Prolin, Glycin) am N-Terminus der Peptidsequenz enthält. Die zweite Gruppe enthielten das Prolin in der Mitte der Peptidsequenz. Mittlerweile werden die Kernlokalisationsignale in vier Gruppen eingeteilt (Boulikas 1993).

1) Das „Einfache KLS oder Monopartit“ besteht aus einer einfachen Abfolge von 5-6 basischen Aminosäuren und einem N-terminalen Prolin, wie im SV40 „large T“ Antigen PKKKRKV (Kalderon *et al.* 1984)

2) Das „Bipartit oder Split KLS“ besteht aus zwei Clustern von basischen Aminosäuren, die oft von 9-12 anderen Aminosäuren getrennt werden, z.B. Nucleoplasmin AVKRPAATKKAGQAKKKKLD (Dingwall & Laskey 1986, Robbins *et al.* 1991)

3) Das „Nicht-positive KLS“ enthält nur einzelne Arginin und Lysin Reste, die auch durch größere Bereiche nichtbasischer Aminosäuren getrennt sein können z. B. Rx7Kx15KIPRx3 im *Drosophila* HP1 Protein (Powers & Eissenberg 1993).

4) Die „Nucleoläre KLS“ werden als spezielle Klasse hochbasischer Peptide geführt, weil sie sowohl die Kernlokalisierung als auch die Nucleoluslokalisierung vermitteln. Die letztere verlangt auch längere Abfolgen von basischen Sequenzen als der Kerntransport. Eins der ersten Beispiele war das TAT-Protein von HIV mit der Sequenz GRKKRRQRRRP (Dang & Lee 1989).

Ein „Consensus“ KLS ist bei dieser Vielfalt an Motiven schwer zu definieren. Das Zentrum eines solchen Motivs kann sicher ein Hexapeptid mit vier oder mehr Arginin und Lysin Resten bilden, was als 4(K+R) Regel bezeichnet wird. Als „stärkstes“ Motiv hat sich in Experimenten jedoch eine Abfolge von 5-9 Arginin und Lysin Resten erwiesen, wie sie in den nucleolären KLS zu finden sind (Kalderon *et al.* 1984). Die IMAP38-1 Sequenz entspricht keinem der beschriebenen Motiven. In dem für die Kernlokalisierung verantwortlichen Bereich der C-terminalen 86 Aminosäuren befinden sich 14 Arginin Reste, aber kein einziger Lysin Rest. Die Arginin Reste häufen sich im Bereich der letzten 23 Aminosäuren, bilden aber keine Cluster, da sie immer durch mindestens eine andere Aminosäure getrennt werden. Wie bereits dargestellt, ist auch keiner der vier überlappenden C-terminalen Deletionsklone in der Lage einen Kerntransport zu vermitteln, die Gesamtheit der C-terminalen Reste dagegen schon. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass die für den Kerntransport verantwortlichen Sequenzen auch oft eine DNA Bindung ermöglichen und miteinander übereinstimmen (Cokol *et al.* 2000). Dies wurde besonders häufig bei Transkriptionsfaktoren festgestellt (LaCasse & Lefebvre 1995). Hinweise für eine mögliche Chromatin-Bindung des IMAP38-1 Proteins liefert die anfangs beschriebene Beobachtung, dass das IMAP38-1 Protein nur durch drastische Präparationsmethoden wie Trizol-Reagenz bzw. kochender Probenpuffer zu isolieren ist. Bei mildereren Methoden zeigte sich, dass das IMAP38-1 Protein offenbar mit der zerkleinerten genomischen DNA aus dem Proteinlysate entfernt werden konnte. In Verbindung mit den Literaturdaten ist eine DNA-Bindung des IMAP38-1 Proteins nicht unwahrscheinlich, und weitere Untersuchungen der Funktion sollten diesen Aspekt in Verbindung mit ungewöhnlichen Kernlokalisationsignalen berücksichtigen.

Ein weiterer Weg Hinweise auf die Funktion des IMAP38-1 Proteins zu erhalten, war die Suche nach möglichen bekannten Interaktionspartnern auf Proteinebene. Das zu diesem Zweck durchgeführte Two-Hybrid Screening führte zur Identifikation von vier identischen in unabhängigen Screeningrunden isolierten cDNAs. Diese enthalten die genetische Information für die erst seit kurzer Zeit bekannten Wachstumsfaktoren Epitheline (Shoyab *et al.* 1990) bzw. Granuline (Bateman *et al.* 1990). Granuline wurden aus den verschiedensten Quellen isoliert. Ihr theoretisches Molekulargewicht beträgt 6 kDa und ihre Struktur enthält ein hochkonserviertes Motiv aus 12 Cystein Resten. Die ersten Granuline (A,B,C,D) wurden aus humanen inflammatorischen Gewebsflüssigkeiten und aus dem Knochenmark der Ratte aufgereinigt (Bateman *et al.* 1990), was im Zusammenhang mit Untersuchungen an Peptiden geschah, die bei Entzündungsprozessen beteiligt sind. Das fünfte Granulin (F) wurde aus Urin isoliert (Sparro *et al.* 1997). Eine Verbindung von Granulinen mit hämatopoetischen Geweben ist bei allen Vertebraten zu beobachten. Allein aus der Milz und Niere des Karpfen (*Teleostea*) wurden drei weitere Formen isoliert. Trotzdem ist ihr Vorkommen nicht auf die hämatopoetischen Gewebe beschränkt, weil andere Forscher aus der Ratten-

niere identische Peptide die Epitheline, isolieren konnten (Shoyab *et al.* 1990). Später wurden Granuline auch aus Neutrophilen Granulozyten des Pferdes (Couto *et al.* 1992) und dem Goldfisch (Uesaka *et al.* 1995) isoliert. Alle bekannten Säuger Granuline werden von einem gemeinsamen 590 Aminosäuren langen Präcursor-Protein, dem Progranulin gebildet, das aus 7,5 Tandemeinheiten des Granulin/Epithelin Motivs besteht. Es gibt allerdings auch Anzeichen, dass der Präcursor eine selbstständige Aktivität ausübt. Acrogranin, ein 67 kDa Glycoprotein, wurde im acrosomalen Bereich des Spermium-Kopfes gefunden (Anakwe & Gerton 1990) und ist am N-terminalen Bereich identisch mit dem Granulin/Epithelin Präcursor. In der Tertiärstruktur zeigen sich Struktur-Ähnlichkeiten mit den Wachstumsfaktoren der TGF Familie (Parnell *et al.* 1992; Hrabal *et al.* 1996). Diese Beobachtungen decken sich auch mit denen über die biologischen Funktion der Epitheline, die ebenfalls als Wachstumsfaktoren fungieren, wie in diversen Zellkulturmodellen gezeigt wurde (He & Bateman 1999). Die Progranulin Expression verhält sich direkt proportional zur Proliferationsrate von Epithelzellen und kann Proliferation, anheftungsunabhängiges Wachstum und Tumorgenizität positiv beeinflussen. Trotz allem ist wenig über die *in vivo* Funktion bekannt. Die stärkste *in vivo* Expression ist im peripheren Immunsystem in den lymphoiden Geweben Milz, Darm und Lunge zu finden (Daniel *et al.* 2000), wobei hier die zeitliche Expression der Granulin mRNA nicht direkt proportional zur Proliferation ist, was auf ein nicht-mitogene Funktion der Granuline im Immunsystem hindeutet. In der Milz ist die mRNA besonders in den randständigen Zellen der periarteriolen lymphoiden Scheidewand (PALS) zu finden. Hier sind vorwiegend T-Lymphozyten angesiedelt. Die B-Lymphozyten im Inneren der PALS zeigen eine weniger intensive Granulin Expression. Teilweise wurde *in vitro* auch eine anti-mikrobielle Wirkung und ein möglicherweise cytoprotektive Wirkung nachgewiesen (Couto *et al.* 1992). Dieses ubiquitäre Expressionsmuster mit deutlichem Schwerpunkt im Immunsystem zeigt Ähnlichkeiten mit dem von *imap38*, die deshalb beide in einer, für das Two-Hybrid Screening verwendeten, Milz-cDNA Bank vertreten sind. Es besteht die Möglichkeit, dass die Wechselwirkung von IMAP38-1 mit Granulinen nur durch die Aufhebung der Kompartimentierung im Testsystem Hefezelle zustande kommt, was einen Artefakt bedeuten würde. Aufgrund des noch unbekanntes Wirkmechanismus der Wachstumsfaktoren kann ebenso gut eine Internalisierung der Granuline stattfinden, die wie viele andere Wachstumsfaktoren (z.B. das Peptidhormon Prolactin Rycyzyn 2000) direkt Kernproteinen (IMAP38-1) im Zellkern interagieren. Eine biochemische Überprüfung mit Fusionsproteinen bzw. eine Ko-Immunpräzipitation würden helfen, die hier im genetischen Two-Hybrid-system überhaupt erstmals beobachtete Interaktion von Granulinen mit einem anderen Protein zu untermauern.

4.3 Zelltypspezifität der *imap38* Expression

Der charakteristische Verlauf einer Malariainfektion zeigt eine starke Aktivierung aber auch eine ebenso starke Suppression des Immunsystems während verschiedener Stadien der Krankheit. Diese Immunantwort wurde am intensivsten am Tiermodell des Nager-Malaria Erregers *Plasmodium chabaudi chabaudi* untersucht, das Modell bei dem auch die Entdeckung der *imap38* RNA erfolgte. In diesem Modell beginnt die initiale zellvermittelte Immunantwort mit CD4+ TH1-Zellen abhängigen Effektorzellen wie Makrophagen, welche die Parasiten nicht spezifisch abtöten und inaktivieren. Dieser Schritt ist gefolgt von einem Umschalten auf die TH2 abhängige Cytokin Produktion und der Stimulation der Antikörper abhängigen Immunmechanismen, welche die finale Kontrolle und Vernichtung der Parasiten bewirken (Langhorne *et al.* 1989, Helmbly *et al.* 1998, Stevenson & Tam 1993, Taylor-Robinson *et al.* 1993). Splenomegalie und polyklonale B-Zellaktivierung sind übliche Begleiterscheinungen einer Malariainfektion. Die Aufgabe der Milz besteht darin, die Plasmodien und seneszenten Erythrozyten aus der Blutzirkulation zu entfernen, die dramatischen morphologischen Änderungen in der Milz sind Voraussetzung und Folge dieser Überlastung (Wyler 1983; Arese *et al.* 1991; Weiss *et al.* 1989; Yap & Stevenson 1994; Alves *et al.* 1996). Außerdem wurde beobachtet, dass protektive Immunmechanismen in Adoptivtransfer-Experimenten durch Milzzellen, T- und B-Zellen aus immunen Mäusen übertragen werden (Meding & Langhorne 1991, Taylor-Robinson & Philips 1994b, von der Weid *et al.* 1996). Wenn die *imap38*-Induktion in einem Zusammenhang mit der Ausbildung einer protektiven Immunität steht, ist zu erwarten, dass *imap38* verstärkt in den Organen und Zelltypen expri-

miert wird, die eine solche Immunität vermitteln. Die bisher mit *imap38* durchgeführten Untersuchungen waren Hybridisierungsexperimente mit Gesamt-RNA Präparationen aus verschiedenen Organen der Maus am Tag 7 nach der Infektion. Die Milzzellen wurden in adhärenz- und nicht-adhärenz- bzw. in Ig-positive und Ig-negative Zellen getrennt und die *imap38* RNA mittels Northern-Blot Technik nachgewiesen. Die *imap38* RNA wurde dabei vorwiegend in der adhärenz- und Ig-positiven, nicht jedoch in der Ig-negativen Fraktion nachgewiesen (Krücken *et al.* 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Ergebnisse gefestigt und verfeinert werden. Aufgrund methodischer Einschränkungen bei Northern-Blotting (große RNA und Zellbedarf) und bei quantitativen PCR Methoden (Kontaminationen, techn. Probleme) wurde als Alternative die *in situ* Hybridisierung an FACS-sortierten Milzsubpopulationen gewählt. Die *in situ* Hybridisierung zeigte in Übereinstimmung mit den „Northern-Blots“ eine deutliche Expression der *imap38* RNA in allen untersuchten Zelltypen (B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen) mit Ausnahme der T-Zellen. Diese Ergebnisse überraschen, da direkt verwandte Gene in der Maus *mIAN1* vorwiegend in Thymozyten und nicht in Makrophagen exprimiert werden.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Veränderung der Zellverteilung in der Milz bei malarieresistenten Tieren (5 Wochen nach der Infektion) und Kontrolltieren bestimmt. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Abnahme von B-Zellen, eine Verdoppelung der T-Zellen (sowohl α/β TCR, als auch γ/δ TCR) fast eine Verdreifachung von Granulozyten und NK-Zellen im Vergleich mit den gleichaltrigen Kontrolltieren. Die Anzahl der Makrophagen unterscheidet sich dagegen nicht. Diese Veränderungen ergeben sich übereinstimmend aus den relativen und absoluten Zellzahlen. Vergleichbare Untersuchungen wurden von Helmy *et al.* 2000 an BALB/c Mäusen durchgeführt und führten tendenziell zu konträren Ergebnissen, die sehr wahrscheinlich auf dem anderen genetischen Hintergrund der verwendeten Mäuse (BALB/c gegenüber C57BL/10) beruhen. Während C57BL/6, C57BL/10, *P. chabaudi* Infektionen ausheilen können, sind andere Stämme wie A/J, BALB/c und DBA2/J suszeptibel und überleben mit weit geringerer Häufigkeit (Wunderlich *et al.* 1988b, Langhorne *et al.* 1993, Philips *et al.* 1997). Die Fähigkeit von Mäusen, protektive Immunmechanismen auszubilden, hängt sowohl von Genen des *H2* Komplexes und Nicht-*H2*-Genen ab. Die Veränderungen in der Milzzell-Zusammensetzung von BALB/c Mäusen ergaben eine Zunahme der absoluten Zellzahl von $T\alpha/\beta$ (CD4+ und CD8+) während des Höhepunktes der Parasitämie, danach eine kurze Abnahme, mit einem Wiederanstieg nach dem Ausheilen der Infektion. Parallel zu den Zeitpunkten, an denen diese Zelltypen sich in der Milz verringerten, stiegen sie im peripheren Blut an. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine Migration der Lymphozyten ins periphere Blut (Kumaratne *et al.* 1987). Die Zahl der B-Zellen steigt ebenfalls zuerst rapide während des akuten Infektionsverlaufs an, sinkt aber nach dem Abheilen der Infektion auf das Ausgangsniveau zurück. Die absolute Zellzahl zeigt nach 30 Tagen sogar eine deutliche Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren. Wie bei den T-Zellen ist diese Entwicklung zuerst in der Milz und dann, etwas verzögert, im peripheren Blut zu beobachten. Ob diese B-Zellen im peripheren Blut aber ihren Ursprung in der Milz haben, oder ob sie direkt aus dem Knochenmark oder der Blut-Milz-Schranke (Weiss *et al.* 1986) kommen, bleibt ungeklärt. Die Anzahl der Makrophagen bleibt im peripheren Blut während der akuten Infektion unverändert, steigt aber in dieser Phase in der Milz deutlich an. Nach dem Ausheilen der Infektion geht diese Zahl aber auch in der Milz auf Ausgangsniveau bzw. auf das der Kontrolltiere zurück. Als Regulationsmechanismus für diese teilweise sehr drastischen Zellzahlveränderungen werden mittlerweile apoptotische Prozesse verantwortlich gemacht (Parijs & Abbas 1998). Die Apoptose entfernt selbstreaktive Immunzellen und begrenzt potentiell gefährliche, weil überschießende, Abwehrreaktionen. Besonders zum Zeitpunkt des Umschaltens von der TH1 auf die TH2 Antwort steigt die relative und absolute Häufigkeit der apoptotischen Zellen an, was gleichzeitig mit einer deutlichen Immunsuppression einhergeht (Taylor-Robinson 1992). Auslöser für die Apoptose sind wahrscheinlich die sogenannten „Malaria-Toxine“, Glycophosphoinositol-verankerte Antigene, die ähnlich wie Lipopolysaccharide die TNF Ausschüttung bei Makrophagen und so über diesen Weg Apoptose bewirken können (Bate & Wofford 1989). Diese auch bei anderen Parasiteninfektionen wie Schistosomen, Toxoplasmen, und Trypanosomen (Estaquier *et al.* 1997, Fallon *et al.* 1998, Kahn *et al.* 1996, Lopes *et al.* 1995) beobachtete Möglichkeit, Apoptose zu induzieren begünstigt den Parasiten und schützt den Wirt, indem zu starke inflammatorische Prozesse herunterreguliert werden. Möglicherweise helfen die hier gezeigten erhöhten Anteile von T-

Zellen, Granulozyten und Makrophagen eine erneute homologe Reinfektion so zu bewältigen, dass im peripheren Blut selten Parasitämien über 0,1 % nachgewiesen werden. Wie sich aus der später dargestellten Untersuchung des humanen homologen Gens von *imap38* ergibt, ist eine Beteiligung von *imap38* an apoptotischen Prozessen durchaus naheliegend. Es zeigte sich bei den Expressionsstudien, dass die *himap-1* RNA's nicht in Zellen exprimiert wird, die sich generell der Apoptose entzogen haben (Tumorzellen).

4.4 Genomische Organisation des *himap1* Gens

Die hier charakterisierte *himap1* cDNA stellt die erste humane homologe Sequenz zu *imap38* aus der Maus dar. *Himap1* repräsentiert dabei den Prototyp einer Gen-Familie die auf dem humanen Chromosom 7q32-34 lokalisiert ist. Dabei zeigen die *himap* Gene eine sehr ähnliche genomische Organisation mit einer hochkonservierten Exon/Intron Struktur. Von den drei Exons, enthält das erste kurze Exon keine kodierenden Bereiche. Das zweite, meist auch sehr kurze Exon enthält den Translationsstartpunkt und das dritte Exon ca. 94 % der kodierenden Sequenz. Das korrespondierende Gen der Maus wäre von der Sequenzähnlichkeit her betrachtet *imap38*, von der genomischen Organisation ausgehend aber das IAN3 Gene (Poirier *et al.* 1999, Dahéron 2001). Diese bilden auf dem syntänen Bereich auf Chromosom 6B ein Cluster aus neun Genen die sich über 200 kb ausdehnen. Es scheint fast so, dass sich die *imap38* Genstruktur von einer *himap* ähnlichen Struktur ableitet. Diese Vermutung wird von der Beobachtung gestützt, dass *imap38* zwar nur aus einem Exon besteht, aber diesem Exon Sequenzen voranstehen, die eine große Identität mit dem zweiten Exon von *himap1* aufweisen. Diese Sequenz ist Teil eines vermutlich funktionslosen Gens, welches als phylogenetisches Relikt die ersten beiden Exons des früheren Maus-Gens beinhaltet. Das Auftreten dieser Sequenz im Zusammenhang mit der Sequenzähnlichkeit und den experimentell gewonnenen Eigenschaften (z. B. Lokalisierung im ER) erlauben, *himap1* und *imap38* als nächste Verwandte Gene dieser neuen Familie zu betrachten.

4.5 Aktivität und Kontrolle des *himap1* Promotors

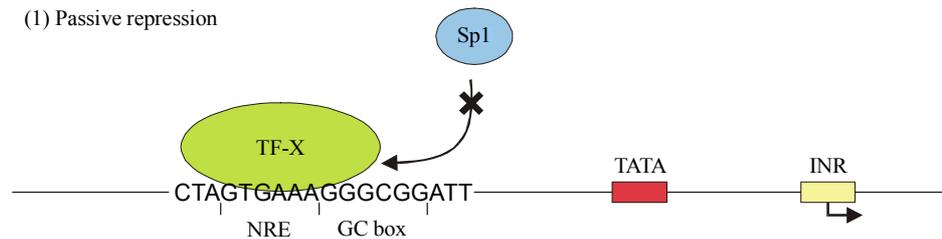
Die Aktivität des *himap1* Promotors wurde in verschiedenen humanen, murinen und anderen Zelltypen bestimmt (vgl. 3.2.7). Das größte Reportergenkonstrukt umfasst 3750 bp strangaufwärts des Transkriptionsstartpunktes und 3'seitig das erste Exon und Intron. In allen untersuchten Zelllinien zeigte dieses Konstrukt keine, oder nur eine sehr geringe Aktivität. Die deutlichste Steigerung der Aktivität erfolgte nach der Entfernung des ersten Introns, dessen Sequenz ganz offensichtlich einen Silencer enthält. Die schrittweise Verkürzung des 5' Bereiches führt ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der Promotoraktivität, weshalb der Kern-Promotor auf den Bereich der 760 bp bzw. 1760 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes eingegrenzt werden kann. In diesem Bereich befinden sich auch die für TATAA-Box-lose Promotoren beschriebenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen (Chen *et al.* 1994). Die Silencer-Wirkung des ersten Introns wurde durch Klonierung vor den starken SV40-Promotor, welcher danach ebenfalls im Reportergenassay keine Aktivität mehr aufwies, eindrucksvoll bestätigt.

Parallel hierzu wurde der, bisher als Promotorbereich bezeichnete Bereich (Krücken *et al.* 1999), des *imap38* Gens ebenfalls untersucht (vgl. Abbildung 36). Dieser Bereich war ebenfalls in der Lage, den SV40 Promotor wirksam zu unterdrücken. Die negative Beeinflussung der eukaryontischen Transkription kann auf vielerlei Weise erfolgen: Veränderung der Chromatinstruktur, Retention von Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma, Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, Veränderungen beim Spleißen von Introns, Behinderung der Assemblierung von Transkriptionsfaktoren (Clark & Docherty 1993). Trotzdem lassen sich zwei Haupt-Kategorien einteilen, die „echten Silencer-Elemente“ und die so genannten „negativ regulatorischen Elemente“ (NRE's) (Ogburne & Antalis 1998) vgl. Abbildung 39. Die „negativ regulatorischen Elemente“ sind nur in einer definierten Position und Orientierung wirksam.

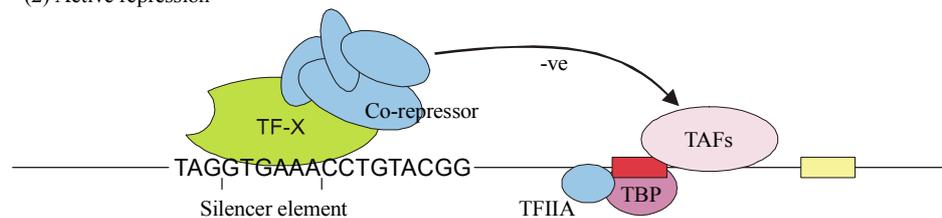
Die Silencer-Elemente umfassen, die klassischen von ihrer Position und Orientierung unabhängigen Elemente, die einen aktiven Repressions-Mechanismus steuern (Brand *et al.* 1985). Als Beispiel hierfür kann das transkriptionelle Silencing des humanen Thyrotropin- β -Promotors dienen (Kim *et al.* 1996). Die herunterregulierende Aktivität konnte dabei auf einen AT-reichen Bereich eingegrenzt werden, der -140 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegt, und der als eine Octamer-Bindungsstelle (Oct-1) fungiert. Die Aktivität dieser Region kann unabhängig von ihrer Position und ihrer Orientierung erfolgen. AT-reiche Sequenzen bilden weniger stabile Doppelstränge (Bode *et al.* 1992), und es wird vermutet, dass sie an der Entwindung der DNA Doppelhelix während der Transkriptionsinitiation beteiligt sind (Homberger 1989, Opstelten 1989). Die Untersuchung der Sequenz des ersten Introns von *himap1* ergab neben einem erhöhten Anteil von AT-Basen (57 %), eine Vielzahl von potentiellen Bindungsstellen für diesen Transkriptionsfaktor Oct-1. Das Auftreten von zwei Oct-1 Bindungsstellen im Kern-Promotor hat aber offensichtlich keinen hemmenden Einfluss auf die Promotoraktivität. Während der eukaryontischen Interphase sind die Chromosomen in Loop-artigen Domänen organisiert, die über bestimmte DNA Regionen (Matrix-Attached-Regions, MAR's) an der Kernmatrix haften (Gasser *et al.* 1989). Die MAR-bindenden Proteine binden in der kleinen Furche bzw. einem Knick in der DNA aus AT-reichen Sequenzen (Zlatanova 1992) und fungieren als wichtige Kontrollproteine für die Transkription während der Interphase. Möglicherweise ist Oct-1 ein solches MAR-bindendes Protein der Kernmatrix. Alternativ könnte eine Silencer-Funktion auch über eine Wechselwirkung mit der Helikase-Aktivität von TFIIH an AT-reichen Regionen erfolgen.

(A) Repression

(1) Passive repression



(2) Active repression



(B) Activation

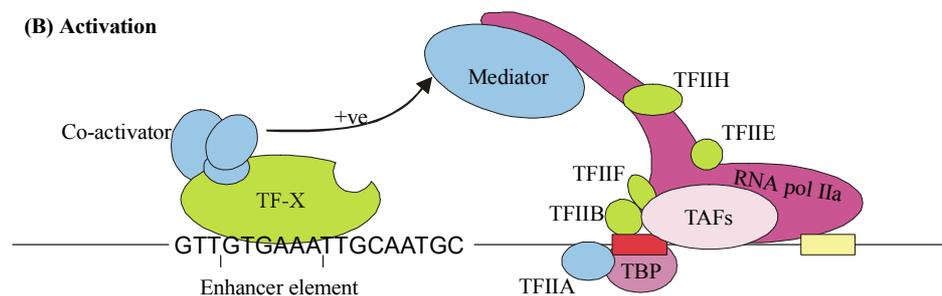


Abbildung 39

Silencer und Enhancer:

A Modell der Repression

1) Passive Repression: Ein hypothetischer Transkriptionsfaktor (TF-X) bindet an seiner Konsensussequenz (GTGAAA) und blockiert sterisch SP1 den Zugang zur GC-Box. Die Konsequenz ist eine Repression der Transkriptionsaktivität.

2) Aktive Repression: TF-X bindet ebenfalls an seine Konsensussequenz, verändert aber durch Wechselwirkung mit flankierenden Sequenzen seine Konformation und kann so mit dem CoRepressor (CoR) interagieren. Dieser Komplex verhindert die Assemblierung der GTF's (General Transcription Factors, Initiationskomplex).

B) Aktivierung: TF-X bindet an seine Konsensussequenz, interagiert mit flankierenden Sequenzen und bindet einen Co-Aktivator Komplex, was die Bildung des Initiationskomplexes unterstützt und beschleunigt [Modifiziert nach Ogburne & Antalıs 1999].

Zu beachten ist auch die Tatsache, dass der Silencer in einem Intron lokalisiert ist. Solche Intron-Silencer werden als eigenständige Gruppe klassifiziert (Ogburne & Antalis 1998). Sie können ihre Wirkung auf verschiedenen Wegen ausüben, indem sie: a) das Fortschreiten der Transkription physikalisch über die Bindung von Repressoren blockieren, b) die Erkennung von Spleiß-Stellen behindern, oder c) genau wie im 5' Bereich des Promotors angesiedelte Silencer, die Assemblierung des Transkriptionsapparates verhindern. Die genauen Wirkmechanismen vieler kürzlich entdeckter Intron-Silencer sind noch nicht entschlüsselt.

Die Möglichkeit des ersten Introns von *himap1*, auch den als Positivkontrolle verwendeten SV40 Promotor fast vollständig zu inaktivieren, erlaubt die Klassifizierung dieser Region als positions-unabhängigen (echten) Silencer, weil hier diese Wirkung aus einer 5' statt aus einer 3' Position erfolgt. Der exakte Mechanismus dieser Silencer Wirkung müsste aber durch Eingrenzung mittels weiterer Deletionsklone bzw. Bindungsstudien (EMSA) überprüft werden.

Festzuhalten ist noch die Zelltypspezifität der Promotoraktivität. Während in Zelllinien mit immunologischer Funktion (Jurkat, THP1, U937) eine besonders hohe Aktivität auch über Artgrenzen hinweg zu beobachten ist (RAW), erfolgt in immunologisch nicht relevanten Zellen, keine (HepG) oder nur eine geringe Aktivierung (CHO-K1, HEK). Diese Beobachtung deckt sich mit dem im folgenden diskutierten Expressionsmuster von *himap1*. Nur in Zellen, die eine deutlich nachweisbare Aktivität des *himap1* Promotors zeigen, ist auch das Transkript nachweisbar. Die Expression von *himap1* ist demnach differentiell in Abhängigkeit von Organ- bzw. Zelltyp reguliert.

4.6 Eigenschaften und Funktion des HIMAP Proteins ermöglichen die Gliederung einer neuen Familie GTP bindender Proteine

Die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften des HIMAP-1 Proteins lassen sich kurz zusammenfassen: Es handelt sich um ein organspezifisch und zelltypspezifisch exprimiertes Membranprotein der Klasse II welches am Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist, und das möglicherweise *in vivo* GTP bindet.

Diese Eigenschaften decken sich mit denen des nächsten verwandten Protein IMAP38-2 aus der Maus, bei dem die GTP-Bindung *in vitro* schon nachgewiesen werden konnte. Ausgedehnte Recherche in den translatierten Genomdatenbanken führten zur Entdeckung einer ganzen Gruppe von homologen Proteinen des Menschen (HIMAP1-4) und der Maus (IAN1,3,4 und IMAP38-2). Den phylogenetischen Ursprung dieser Proteinfamilie kann beim derzeitigen Kenntnisstand bei dem AIG1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* angesiedelt werden. Allen diesen Proteinen sind neben C-terminalen Transmembrandomänen besonders die GTP-Bindungsmotive gemeinsam. Die Möglichkeit der GTP Bindung wird durch eine Abfolge von stark konservierten Sequenzmotiven vermittelt, wie sie auch bei den jüngst veröffentlichten IAN Proteinen Familie auftreten. Diese erstmals von Poirier *et al.* 1999 beschriebene Proteine wurden im Rahmen von Untersuchungen zur T-Zell Reifung entdeckt. Sie werden differentiell reguliert und während des Selektionsprozesses der Thymozyten in den Organen des Immunsystems exprimiert. Dabei ist die RNA vorwiegend in T-Zellen, weniger in B-Zellen und fast nicht in peritoneal Makrophagen nachweisbar. Dieses Expressionsmuster verhält sich komplementär zur Expression der *imap38* RNA, die hauptsächlich in Makrophagen und B-Zellen vorkommt. Das IAN-1 bzw. IAN-3 Protein kann daher als das T-Zell homologe Protein zu dem putativen zweiten Genprodukt der *imap38* RNA angesehen werden.

Die IAN-Gruppe wurde kürzlich durch das IAN-4 Protein ergänzt, welches offenbar das Maus-Homolog zu dem humanen HIMAP-3 (AK002158) repräsentiert (Dahéron *et al.* 2001). Dieses Gen wird vorwiegend in 32D Zellen nachgewiesen, die das Wildtyp Allel von BCR/ABL exprimieren. Dieser Zelltyp gehört zum Krankheitsbild der CML (chronischen myelomischen Leukämien) und ist das Ergebnis eines Translokationsereignisses zwischen Chromosom 9 und 22. Aus dieser Translokation resultiert die Fusion des *bcrl* Gens (break-point cluster region gene), mit dem *c-abl* (zelluläre Homolog zum transformierenden Gen des murinen Abelschen Leukämie Virus). In Abhängigkeit von der Insertionsstelle im *bcrl*

Gen könne drei verschiedene chimäre BCR/ABL Proteinprodukte exprimiert werden (p185, p210, p230). Diese sind mit akuter und chronischer Leukämie assoziiert und zeigen eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität, eine der Voraussetzungen für die onkogene Transformation von Zellen (Lugo *et al.* 1990). Die Rolle des Onkoproteins BCR/ABL in der Pathogenese von CML kann mit verschiedenen Effektormechanismen erklärt werden: Aktivierung mitogener Signaltransduktionswege, Inhibierung von Apoptose und Differenzierungsprozessen, sowie durch Defekte in der Zell-Mobilität (Sanchez-Garcia & Grutz 1995, Cortez *et al.* 1996, Perroti *et al.* 1998). Im Zuge von Mutanten-Analysen wurde das neue IAN-4 Gen entdeckt und kloniert. Die Induktion von IAN-4 ist spezifisch für Zelllinien, die WT BCR/ABL exprimieren. Es ist kein Transkript in Zellen nachweisbar, die mit anderen Onkogenen (*v-src*, *H-ras*, *v-Abl*) transfiziert wurden. Die Expression von IAN-4 beschränkt sich auf die lymphatischen Organe, wobei in der Milz ein schwaches- und im Thymus kein Signal im Northern-Blot zu finden ist. Diese Beobachtung deckt sich mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsmuster des humanen homologen Gens *himap-3*, das in Lymphknoten und Milz stark, im Thymus aber kaum nachweisbar ist. Die genomische Lokalisation weist für *ian-4* einen Locus auf Chromosom 6 der Maus aus, der Region die in etwa der syntänen Region auf dem humanen Chromosom 7 entspricht in dem sich das homologe *himap2* Gen befindet.

Die bicistronische 2150 bp lange cDNA von *ian-4* enthält ein 67 Kodons umfassendes uORF, dessen Startkodon sich im Kontext einer echten Kozak-Konsensus Sequenz befindet. Das AUG Kodon des zweiten 301 Aminosäuren umfassenden Translationsprodukts befindet sich ebenfalls in einer günstigen Sequenzumgebung an Position 614 auf der cDNA. Diese Anordnung von uORF zum Haupt-ORF deutet sehr auf eine Translationskontrolle basierend auf dem Mechanismus der Reinitiation hin, zumal das AUG des uORF's auch im optimalen Kozak Kontext liegt und mit großer Wahrscheinlichkeit translatiert wird. *In vitro* Expressionsstudien zeigten auch eine Verringerung der IAN-4 Proteinmenge, wenn beide Leseraster von einem Plasmid exprimiert werden, was auf einen negativen Regulationsmechanismus durch das uORF hindeutet. In 32D Zellen wird dieser Blockierungsmechanismus aber offenbar durch die Anwesenheit des BCR/ABL Proteins überwunden. Das IAN-4 Protein ist im Mitochondrium lokalisiert, obwohl eine N-terminale Mitochondrien-Signalsequenz fehlt. Ähnlich wie bei HIMAP1 bzw. IMAP38-2 ist aber im IAN-4 Protein eine C-terminale 22 AS lange Transmembrandomäne für die Zielsteuerung und Verankerung in der Mitochondrienmembran verantwortlich. Als wichtigste Eigenschaft ist die *in vitro* nachgewiesene GTP-Bindung zu nennen. Das Signal der GTP-Bindung ist schwach, aber signifikant, und somit vergleichbar mit der hier für IMAP38-2 nachgewiesenen Aktivität. Möglicherweise sind *in vivo* Kofaktoren für eine effizientere GTP-Bindung verantwortlich, die in diesem experimentellen Ansatz fehlten. Von allen bekannten Proteinen mit GTP-Bindungsaktivität sind nur wenige in Mitochondrien lokalisiert (Herman & Fuller 1998, 1998). Ähnlich wie die, für Septine im Zellzyklus und der Cytokinese gezeigten Funktionen, könnten auch die IAN Proteine eine Rolle im Reifungs- und Selektionsprozess von Zellen spielen. Diese Prozesse sind sowohl bei Immunantwort, wie auch bei der Transformation von Zellen hin zur Tumorzelle von Bedeutung.

Das evolutiv ursprünglichste Mitglied der neuen HIMAP-IAN Familie ist das AIG1 Protein der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, welches von Reuber & Asubel 1996 erstmals beschrieben wurde. Die Entdeckung erfolgt im Rahmen von Untersuchung zur Wechselwirkung von Avirulenz- und Resistenz-Genen. Die Infektion einer Pflanze durch einen pathogenen Organismus, welcher ein *avr* (avirulenz) Gen besitzt, für das die Pflanze ein entsprechendes Resistenzgen bereithält, resultiert in einer schnellen Aktivierung einer Vielzahl von Abwehrreaktionen. Diese umfassen die Verstärkung der Zellwände durch Einlagerung von Lignin, die Produktion antimikrobieller Verbindungen (Phytoalexine und hydrolytische Enzyme), die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen und der Einleitung des programmierten Zelltods von befallenen Zellen (Apoptose). Die Gesamtheit dieser Reaktionen wird als Hypersensitivitäts-Reaktion (HR) bezeichnet (Lindsay *et al.* 1993). Fehlen dem infizierenden Organismus derartige *avr* Gene, kommt es zu keiner Hypersensitivitäts-Reaktion und auch die Induktion anderer Abwehrreaktionen fällt langsamer aus. Ein Liganden-Rezeptor Modell geht davon aus, das die Resistenzgene für Oberflächenrezeptoren kodieren, welche die *avr* Produkte binden und so Signaltransduktionswege aktivieren, die in einer HR münden. Das Ziel bei dem Versuchsansatz, der zur Entdeckung von *aig1* führte, war die Suche nach Genen, die

ausschließlich bei einer Abwehrreaktion von avirulenten Bakterien in einer Pflanze induziert werden. Solche Gene wären dann gute Marker für spätere Ereignisse solcher Signalkaskaden. Die Expression von AIG1 ist die Reaktion der Pflanze auf eine Infektion mit einem virulenten Erreger und das *aig1* Transkript ist erstmals ca. 9 h nach der Infektion nachweisbar. Wird die Pflanze mit einem Erreger infiziert, der avirulente (*avr*) Gene auf seiner Oberfläche exprimiert, so ist eine AIG1-Expression 6-15 h nach der Infektion nachweisbar und nimmt danach wieder deutlich ab. Vor allem aber ist die Expression von *aig1* spezifisch abhängig von der Anwesenheit des *avrRpt2* Gens in den Pseudomonaden. Andere avirulenz Gene (*avrRpm1*, *avrB*) sind nicht in Lage die *aig1* Expression zu induzieren.

Festzuhalten ist, dass neben den strukturellen Übereinstimmungen wie der sehr ähnlichen Anordnung der GTP-Bindemotive, alle hier beschriebenen zu HIMAP1 u. IMAP38-2 homologen Proteine bzw. deren Gene im Kontext von pathogenen Prozessen (Infektionen bzw. Transformationen) stehen und spezifisch induziert werden. Auch verdichten sich die Hinweise auf eine Beteiligung dieser Gene bei den Prozessen der Zellreifung bzw. der Entfernung von Zellen durch kontrollierten Zelltod (Apoptose). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Expressionsmuster der vier humanen Vertreter, die keinerlei Expression bei den untersuchten Tumorzelllinien aufwiesen, dafür aber vorwiegend in Zellen und Organen des Immunsystems zu finden waren.

Nach diesen auf strukturellen Eigenschaften bzw. auf Expressionsdaten gestützten Ähnlichkeiten gibt es auch neuere Beispiele die Proteine mit vergleichbarer Funktion beschreiben. In diesem Zusammenhang werden die Ergebnisse der IGTP Proteine dargestellt, die Ähnlichkeiten in bezug auf Aspekte wie Größe, Lokalisation und GTP-Bindung, nicht jedoch auf eine phylogenetische Verwandtschaft.

Wie schon aus dem Namen hervorgeht, handelt es sich bei IGTP Genen um durch Interferon γ induzierbare GTPasen. Diese wurden erstmals 1996 von Taylor *et al.* in RAW Makrophagen (Maus) entdeckt. Die IGTP mRNA ist in diesen Zellen bei Abwesenheit von Interferon kaum nachweisbar, nimmt aber innerhalb einer Stunde nach Exposition mit diesem Cytokin stark zu. Der Höhepunkt der Expression ist nach ca. drei Stunden erreicht und verbleibt auf diesem hohen Niveau für ca. zwei Tage. Die Expression im Organismus Maus erfolgt vorwiegend in den immunologisch relevanten Organen wie Milz, Thymus, und intestinalen Geweben. Die IGTP cDNA kodiert für ein 48 kDa großes Protein mit drei Konsensus GTP-Bindemotiven, das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert wurde. Die GTPase-Aktivität kann mit nativem und rekombinatem Protein *in vitro* bestätigt werden. Mittlerweile sind mehr als 200 Gene identifiziert, die über Interferon γ reguliert werden, wovon sechs zur Gruppe um IGTP gehören. Die jüngsten Experimente mit funktionalen Ansätzen ergaben, dass IGTP eine essentielle Komponente innerhalb von IFN γ regulierten Regulationswegen darstellt, die u.a. die Resistenz gegenüber dem Protozoen *Toxoplasma gondii* vermittelt. Die genaue Funktion ist unbekannt und es wird mittlerweile ein genereller Effekt von IGTP gegen *T. gondii* postuliert, weil IFN γ induzierte Elemente in Zellen des Immunsystems aber auch in nicht-Immunzellen für eine Resistenz benötigt werden (Yap & Sher 1999). Eine Infektion mit *L. cytomongenes* erfordert dagegen nur eine IFN γ Wirkung in Immunzellen. Als GTP-bindendes Membranprotein könnte IGTP im ER Einfluss auf den Vesikeltransport ausüben und so den Parasiten der in einer parasitophoren Vakuole heranwächst bekämpfen (Taylor *et al.* 1997).

Vergleichbare Überlegungen können auch für HIMAP1 bzw. IMAP38-2 angestellt werden, da auch hier eine Plasmodien-spezifische Aktivierung erfolgt und die Proteine, sofern sie *in vivo* auch exprimiert werden, im ER-lokalisiert sind und GTP binden können.

Die zukünftige Arbeit sollte deshalb im Hinblick auf die Funktionsaufklärung besonders die Einordnung der Proteine in Signaltransduktionskaskaden (Apoptose) fokussieren. Auch wären Daten über andere potentielle Interaktionspartner sicherlich hilfreich, wobei diese Arbeit auch von den enormen Fortschritten der Genomprojekte und der Chip-Technologie profitieren würde. Nur das genaue Verständnis der Wechselwirkung aller einzelnen Genprodukte, die an der Ausbildung einer protektiven Immunität beteiligt sind, wird dazu führen, einen in der Evolution optimierten Erreger nachhaltig zu kontrollieren aber wohl nie zu vernichten.

5.0 Zusammenfassung

In den letzten beiden Jahren wurde neben dem von unserer Arbeitsgruppe identifizierten Gen *imap38*, weitere Gene in der Maus (*mLAN1-4*) und der Pflanze Arabidopsis (*atg1*) entdeckt, deren Expression mit der Resistenz gegen Infektionen korreliert. Die *imap38* mRNA wird malariaspezifisch in der Milz von BL10 Mäusen um den Faktor 40 induziert und verbleibt auch nach dem Ausheilen der Krankheit auf diesem hohen Niveau. Ziel der Arbeit war Charakterisierung der Genprodukte der *imap38* RNA und die Identifizierung eines homologen Gens im Menschen.

Durch *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die *imap38* mRNA in B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen, nicht aber in T-Zellen exprimiert wird. Die *imap38* RNA kodiert die zwei überlappenden offenen Leseraster IMAP38-1 und IMAP38-2, von denen aber *in vitro* und in heterologen Expressionssystemen nur das erste Leseraster exprimiert wird. Das 27 kDa große hochbasische Protein IMAP38-1 hat keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen und wurde bei heterologer Expression im Zellkern lokalisiert. In Milzzellen von infizierten und immunen Mäusen wurde kein IMAP38-1 Protein detektiert. Das im C-Terminus identifizierte Kernlokalisierungssignal ist sehr lang und ungewöhnlich strukturiert. Im Two-Hybrid-System wurde eine starke Wechselwirkung mit neuartigen kleinen Wachstumsfaktoren, den Epithelinen/Granulinen entdeckt. In IMAP38-2 repräsentiert ein 30 kDa Protein, das über eine C-terminale Transmembrandomäne und fünf GTP-Bindemotive verfügt. Die Funktionalität dieser Motive konnte erstmals mit zwei verschiedenen *in vitro* Bindungsassays gezeigt werden. In heterologen Expressionssystemen wurde das IMAP38-2 Protein im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.

Erstmals gelang mit der Klonierung von *himap1* der Nachweis eines homologen Gens dieser neuen Familie im Menschen. Als Prototyp steht *himap1* stellvertretend für drei weitere durch Datenbankrecherche identifizierte Mitglieder dieser Genfamilie, die ein Cluster auf Chromosom 7q32-36 bilden. Alle *himap* Gene zeigen eine hochkonservierte Exon-Intron-Struktur, von denen das erste kleine Exon nicht kodierend ist, das Zweite den Translationsstart, und das Dritte ca. 94% der Proteininformation enthält. Korrespondierend zu *himap* bilden die neun Mitglieder der *imap* Genfamilie ebenfalls ein Cluster innerhalb von 200 kb im syntenen Locus auf dem Chromosom 6B der Maus, ihre genomische Organisation ist aber heterogener aufgebaut als die der *himap* Gene.

Das *himap1* Gen wird vorwiegend in der Milz, aber auch in Lymphknoten und im Thymus exprimiert. Diese gewebespezifische Expression ist ebenfalls charakteristisch für *himap2* und *himap3*; *himap4* wird verstärkt auch im Gehirn exprimiert. Eine Expression in Tumorzellen war für kein *himap* Gen nachweisbar und auch der *himap1* Promotor zeigte keine oder nur geringe Aktivität in transformierten Zelllinien. Die Promotoraktivierung erfolgte ebenfalls sehr stark Zelltypspezifisch und war am stärksten in Monozyten und T-Zellen, während in Hepatoblasten keine Aktivierung erfolgte. Zusätzlich wird dieser Promotor durch distale Elemente und einen starken Silencer, der im ersten Intron lokalisiert werden konnte, negativ reguliert. Das *himap1* Gen kodiert für das 34 kDa große HIMAP1 Protein, das eine Identität von 64% zum Maus-Protein IMAP38-2 aufweist. Wie alle Mitglieder der Genfamilie, verfügt auch HIMAP1 über fünf putative GTP-Bindemotive. Allerdings konnte bei HIMAP1 *in vitro* keine GTP-Bindung detektiert werden was auf mögliche nur *in vivo* vorhandene Interaktionspartner hindeutet. Das HIMAP1 Protein verfügt auch über eine C-terminale Transmembrandomäne und konnte nach heterologer Expression im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden; ein zusätzlicher Hinweis für die Homologie von HIMAP1 zu IMAP38-2. Besonders die Aspekte wie GTP-Bindung, ER-Lokalisation und die Expression in immunologisch relevanten Zellen und Geweben deuten auf eine ähnliche Funktion der HIMAP/IMAP Proteine hin, wie sie für die ebenfalls neuen G-Proteine der IGTP Familie beschrieben ist. Denn auch diese werden infektionsspezifisch exprimiert und sind in erregerspezifische Signaltransduktionskaskaden integriert.

6.0 Literatur

1. Adams, M. E., M. H. Butler, T. M. Dwyer, M. F. Peters, A. A. Murnane, and S. C. Froehner. 1993. Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* 11:531-540.
2. Adams, T. E. 1995. Differential expression of growth hormone receptor messenger RNA from a second promoter. *Mol.Cell Endocrinol.* 108:23-33.
3. Akhavan-Tafti, H., A. P. Schaap, Z. Arghavani, R. DeSilva, R. A. Eickholt, R. S. Handley, B. A. Schoenfelder, K. Sugioka, and Y. Sugioka. 1994. CCD camera imaging for the chemiluminescent detection of enzymes using new ultrasensitive reagents. *J.Biolumin.Chemilumin.* 9:155-164.
4. Alam, T., M. R. An, and J. Papaconstantinou. 1992. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J.Biol.Chem.* 267:5021-5024.
5. Alves, H. J., W. Weidanz, and L. Weiss. 1996. The spleen in murine Plasmodium chabaudi adami malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 55:370-378.
6. Anakwe, O. O. and G. L. Gerton. 1990. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol.Reprod.* 42:317-328.
7. Appel, R. D., J. C. Sanchez, A. Bairoch, O. Golaz, F. Ravier, C. Pasquali, G. J. Hughes, and D. F. Hochstrasser. 1994. The SWISS-2DPAGE database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 22:3581-3582.
8. Arese, P., F. Turrini, F. Bussolino, H. U. Lutz, D. Chiu, L. Zuo, F. Kuypers, and H. Ginsburg. 1991. Recognition signals for phagocytic removal of faveic, malaria-infected and sickled erythrocytes. *Adv.Exp.Med.Biol.* 307:317-327.
9. Azizkhan, J. C., D. E. Jensen, A. J. Pierce, and M. Wade. 1993. Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 3:229-254.
10. Barry RG. 1992. Mountain weather and climate. *London: Routledge.*
11. Bartel, P., C. T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14:920-924.
12. Bartel, P. L. and S. Fields. 1995. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* 254:241-263.
13. Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi, and R. J. Howard. 1995. Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82:77-87.
14. Bate, C. A., J. Taverne, and J. H. Playfair. 1989. Soluble malarial antigens are toxic and induce the production of tumour necrosis factor in vivo. *Immunology* 66:600-605.
15. Bateman, A., D. Belcourt, H. Bennett, C. Lazure, and S. Solomon. 1990. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 173:1161-1168.
16. Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857.
17. Benten, W. P., M. Lieberherr, O. Stamm, C. Wrehlke, Z. Guo, and F. Wunderlich. 1999. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol.Biol.Cell* 10:3113-3123.
18. Benten, W. P., M. Lieberherr, G. Giese, C. Wrehlke, O. Stamm, C. E. Sekeris, H. Mossmann, and F. Wunderlich. 1999. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.* 13:123-133.
19. Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger, and B. R. Cullen. 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66:1-10.
20. Bhullar, R. P. and H. D. Seneviratne. 1996. Characterization of human platelet GTPase activating protein for the Ral GTP-binding protein. *Biochim.Biophys.Acta* 1311:181-188.
21. Bradford, H. F. and H. K. Ward. 1976. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. *Brain Res.* 110:115-125.
22. Bradley, D. J. 1993. Human tropical diseases in a changing environment. *Ciba Found.Symp.* 175:146-162.
23. Brand, A. H., L. Breeden, J. Abraham, R. Sternglanz, and K. Nasmyth. 1985. Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* 41:41-48.
24. Brannan, L. R., C. M. Turner, and R. S. Phillips. 1994. Malaria parasites undergo antigenic variation at high rates in vivo. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 256:71-75.
25. Brogna, S. and M. Ashburner. 1997. The Adh-related gene of Drosophila melanogaster is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. *EMBO J.* 16:2023-2031.
26. Bruce-Chwatt IJ and M. I. e. Wernsdorfer WH. 1988. History of malaria from prehistory to eradication. Malaria: principles and practise of malariology. *Edinburgh: Churchill Livingstone*1-59.
27. Buckley, B. and E. Ehrenfeld. 1987. The cap-binding protein complex in uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J.Biol.Chem.* 262:13599-13606.

28. Bunnag, T., S. Sornmani, S. Pinitpongse, and C. Harinasuta. 1979. Surveillance of water-borne parasitic infections and studies on the impact of ecological changes on vector mosquitoes of malaria after dam construction. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 10:656-660.
29. Cao, J. and A. P. Geballe. 1995. Translational inhibition by a human cytomegalovirus upstream open reading frame despite inefficient utilization of its AUG codon. *J.Virol.* 69:1030-1036.
30. Carter, R. and D. Walliker. 1975. New observations on the malaria parasites of rodents of the Central African Republic. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 69:187-196.
31. Cazzola, M. and R. C. Skoda. 2000. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* 95:3280-3288.
32. Chait, B. T. and S. B. Kent. 1992. Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* 257:1885-1894.
33. Chastain, M. and I. Tinoco, Jr. 1991. Structural elements in RNA. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 41:131-177.
34. Chen, C. Y. and P. Sarnow. 1995. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 268:415-417.
35. Chen, C. Y. and P. Sarnow. 1995. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 268:415-417.
36. Chen, X., K. L. Wright, E. A. Berkowitz, J. C. Azizkhan, J. P. Ting, and D. C. Lee. 1994. Protein interactions at Sp1-like sites in the TGF alpha promoter as visualized by in vivo genomic footprinting. *Oncogene* 9:3179-3187.
37. Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:9578-9582.
38. Chomczynski, P. 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal.Biochem.* 201:134-139.
39. Clark, A. R. and K. Docherty. 1993. Negative regulation of transcription in eukaryotes. *Biochem.J.* 296 (Pt 3):521-541.
40. Clarke, L. and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. *Cell* 9:91-99.
41. Clough, B., K. Rangachari, M. Strath, P. R. Preiser, and R. J. Wilson. 1999. Antibiotic inhibitors of organelle protein synthesis in Plasmodium falciparum. *Protist.* 150:189-195.
42. Clyde, D. F., V. C. McCarthy, R. M. Miller, and R. B. Hornick. 1973. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am.J.Med.Sci.* 266:398-403.
43. Clyde, D. F., H. Most, V. C. McCarthy, and J. P. Vanderberg. 1973. Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am.J.Med.Sci.* 266:169-177.
44. Coffman, R. L., D. A. Leberman, and P. Rothman. 1993. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv.Immunol.* 54:229-270.
45. Cohen KS & Lambert PH. 1982. Malaria: Immunology of parasitic infection. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, GB.
46. Cohen, S. 1982. Progress in malaria vaccine development. *Br.Med.Bull.* 38:161-165.
47. Cokol, M., R. Nair, and B. Rost. 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* 1:411-415.
48. Coluzzi, M., A. Sabatini, V. Petrarca, and M. A. Di Deco. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 73:483-497.
49. Colwell, R., P. Epstein, D. Gubler, M. Hall, P. Reiter, J. Shukla, W. Sprigg, E. Takafuji, and J. Trtanj. 1998. Global climate change and infectious diseases. *Emerg.Infect.Dis.* 4:451-452.
50. Colwell, R. R., P. R. Epstein, D. Gubler, N. Maynard, A. J. McMichael, J. A. Patz, R. B. Sack, and R. Shope. 1998. Climate change and human health. *Science* 279:968-969.
51. Conway, D. J., D. R. Cavanagh, K. Tanabe, C. Roper, Z. S. Mikes, N. Sakihama, K. A. Bojang, A. M. Oduola, P. G. Kremsner, D. E. Arnot, B. M. Greenwood, and J. S. McBride. 2000. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat.Med.* 6:689-692.
52. Cormen, T. H. L. C. E. a. R. R. 1990. *Introduction to Algorithms.* MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
53. Cortez, D., G. Stoica, J. H. Pierce, and A. M. Pendergast. 1996. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras- dependent signaling pathway. *Oncogene* 13:2589-2594.
54. Couto, M. A., S. S. Harwig, J. S. Cullor, J. P. Hughes, and R. I. Lehrer. 1992. Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils. *Infect.Immun.* 60:3065-3071.
55. Cox, J., S. Semoff, and M. Hommel. 1987. Plasmodium chabaudi: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. *Parasite Immunol.* 9:543-561.
56. Crabb, B. S., B. M. Cooke, J. C. Reeder, R. F. Waller, S. R. Caruana, K. M. Davern, M. E. Wickham, G. V. Brown, R. L. Coppel, and A. F. Cowman. 1997. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* 89:287-296.

57. Craig, A. G., R. Pinches, S. Khan, D. J. Roberts, G. D. Turner, C. I. Newbold, and A. R. Berendt. 1997. Failure to block adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to ICAM-1 with soluble ICAM-1. *Infect.Immun.* 65:4580-4585.
58. Crane, G. 1986. Recent studies of hyperreactive malarious splenomegaly (tropical splenomegaly syndrome) in Papua New Guinea. *P.N.G.Med.J.* 29:35-40.
59. Crewther, P. E., M. L. Matthew, R. H. Flegg, and R. F. Anders. 1996. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect.Immun.* 64:3310-3317.
60. Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem.Sci.* 20:448-455.
61. Daheron, L., T. Zenz, L. D. Siracusa, C. Brenner, and B. Calabretta. 2001. Molecular cloning of Ian4: a BCR/ABL-induced gene that encodes an outer membrane mitochondrial protein with GTP-binding activity. *Nucleic Acids Res.* 29:1308-1316.
62. Dang, C. V. and W. M. Lee. 1989. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J.Biol.Chem.* 264:18019-18023.
63. Daniel, R., Z. He, K. P. Carmichael, J. Halper, and A. Bateman. 2000. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J.Histochem.Cytochem.* 48:999-1009.
64. Deitsch, K. W., E. R. Moxon, and T. E. Welles. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 61:281-293.
65. Del Giudice, G., S. Biro, A. A. Degremont, H. D. Engers, P. H. Lambert, A. Pessi, C. Tougne, A. S. Verdini, N. Weiss, and M. Tanner. 1986. Detection of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites by employing synthetic peptides. *Parassitologia* 28:107-111.
66. del Portillo, H. A., C. Fernandez-Becerra, S. Bowman, K. Oliver, M. Preuss, C. P. Sanchez, N. K. Schneider, J. M. Villalobos, M. A. Rajandream, D. Harris, L. H. da Silva, B. Barrell, and M. Lanzer. 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 410:839-842.
67. Denny, P., S. Swift, F. Connor, and A. Ashworth. 1992. An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *EMBO J.* 11:3705-3712.
68. Dingwall, C. and R. A. Laskey. 1986. Protein import into the cell nucleus. *Annu.Rev.Cell Biol.* 2:367-390.
69. Dominguez, D. I., L. A. Ryabova, M. M. Pooggin, W. Schmidt-Puchta, J. Futterer, and T. Hohn. 1998. Ribosome shunting in cauliflower mosaic virus. Identification of an essential and sufficient structural element. *J.Biol.Chem.* 273:3669-3678.
70. Doolan, D. L., R. C. Hedstrom, R. Wang, M. Sedegah, L. F. Scheller, P. Hobart, J. A. Norman, and S. L. Hoffman. 1997. DNA vaccines for malaria: the past, the present, & the future. *Indian J.Med.Res.* 106:109-119.
71. Dotto, G. P., K. Horiuchi, and N. D. Zinder. 1984. The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains. *J.Mol.Biol.* 172:507-521.
72. Downs WG, P. C. 1946. Bromelidae Malaria in Trinidad. British West Indies. *Am J Trop med Hyg* 26:47-66.
73. Drapier, J. C., J. Wietzerbin, and J. B. Hibbs, Jr. 1988. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine- dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur.J.Immunol.* 18:1587-1592.
74. Dunn, J. J. and F. W. Studier. 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J.Mol.Biol.* 166:477-535.
75. Duttweiler, H. M. 1996. A highly sensitive and non-lethal beta-galactosidase plate assay for yeast. *Trends Genet.* 12:340-341.
76. Epstein, P. R. 1998. Global warming and vector-borne disease. *Lancet* 351:1737.
77. Estaquier, J., M. Marguerite, F. Sahuc, N. Bessis, C. Auriault, and J. C. Ameisen. 1997. Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur.Cytokine Netw.* 8:153-160.
78. Falk, S., H. Protz, U. Kobrich, and H. J. Stutte. 1992. [Spontaneous splenic rupture in acute malaria tropica]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 117:854-857.
79. Fallon, P. G., P. Smith, and D. W. Dunne. 1998. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur.J.Immunol.* 28:1408-1416.
80. Felsenstein, J. 1978. The number of evolutionary trees. *Syst.Zool*27-33.
81. Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J.Mol.Evol.*368-376.
82. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*783-791.
83. Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP manual, version 3.5. University of Washington, Seattle.*
84. Fields, S. and O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
85. Figueiredo, R., W. P. Tadei, and B. D. Thatcher. 1998. The control of anopheline mosquitoes by the spraying of Deltamethrin on raffia curtains used in miners' huts in areas endemic for malaria. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* 40:107-111.

86. Fisher, R. A. 1912. The maximum-likelihood-method. *Messenger in Mathematics* 155-160.
87. Fitch, W. M. a. M. E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 279-284.
88. Fortin, A., A. Belouchi, M. F. Tam, L. Cardon, E. Skamene, M. M. Stevenson, and P. Gros. 1997. Genetic control of blood parasitaemia in mouse malaria maps to chromosome 8. *Nat.Genet.* 17:382-383.
89. Freeman, T. and M. Bradley. 1996. Temperature is predictive of severe malaria years in Zimbabwe. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 90:232.
90. Frost, J. A., S. Xu, M. R. Hutchison, S. Marcus, and M. H. Cobb. 1996. Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol.Cell Biol.* 16:3707-3713.
91. Futterer, J., Z. Kiss-Laszlo, and T. Hohn. 1993. Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Cell* 73:789-802.
92. Gasser, S. M., B. B. Amati, M. E. Cardenas, and J. F. Hofmann. 1989. Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int.Rev.Cytol.* 119:57-96.
93. Geballe, A. P. and D. R. Morris. 1994. Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem.Sci.* 19:159-164.
94. Genton, B., F. Al Yaman, R. Anders, A. Saul, G. Brown, D. Pye, D. O. Irving, W. R. Briggs, A. Mai, M. Ginny, T. Adiguma, L. Rare, A. Giddy, R. Reber-Liske, D. Stuerchler, and M. P. Alpers. 2000. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine in adults living in an endemic area of Papua New Guinea. *Vaccine* 18:2504-2511.
95. Gietz, R. D. and R. A. Woods. 2001. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* 30:816-6, 828.
96. Gilks, C. F., D. Walliker, and C. I. Newbold. 1990. Relationships between sequestration, antigenic variation and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi chabaudi*—a rodent malaria model. *Parasite Immunol.* 12:45-64.
97. Ginsburg, H. 1999. The permeability properties of the parasite cell membrane. *Nonartis.Found.Symp.* 226:99-108.
98. Good, M. F., D. C. Kaslow, and L. H. Miller. 1998. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu.Rev.Immunol.* 16:57-87.
99. Gottesdiener, K., H. M. Chung, S. D. Brown, M. G. Lee, and L. H. Van der Ploeg. 1991. Characterization of VSG gene expression site promoters and promoter-associated DNA rearrangement events. *Mol.Cell Biol.* 11:2467-2480.
100. Grau, G. E., P. F. Pigué, H. D. Engers, J. A. Louis, P. Vassalli, and P. H. Lambert. 1986. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J.Immunol.* 137:2348-2354.
101. Grau, G. E., T. E. Taylor, M. E. Molyneux, J. J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel, and P. H. Lambert. 1989. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N.Engl.J.Med.* 320:1586-1591.
102. Grau, G. E., H. Heremans, P. F. Pigué, P. Pointaire, P. H. Lambert, A. Billiau, and P. Vassalli. 1989. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:5572-5574.
103. Grilli, M., J. J. Chiu, and M. J. Lenardo. 1993. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int.Rev.Cytol.* 143:1-62.
104. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
105. Gubler, U. and B. J. Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
106. Hai, T. and T. Curran. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:3720-3724.
107. Halper, J., P. G. Parnell, B. J. Carter, P. Ren, and B. W. Scheithauer. 1992. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 66:639-645.
108. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166:557-580.
109. Hanke, J. H., N. F. Landolfi, P. W. Tucker, and J. D. Capra. 1988. Identification of murine nuclear proteins that bind to the conserved octamer sequence of the immunoglobulin promoter region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:3560-3564.
110. Hartmann, E., T. A. Rapoport, and H. F. Lodish. 1989. Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:5786-5790.
111. He, Z. and A. Bateman. 1999. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 59:3222-3229.
112. Hearn, J., N. Rayment, D. N. Landon, D. R. Katz, and J. B. de Souza. 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect.Immun.* 68:5364-5376.
113. Hellen, C. U., G. W. Witherell, M. Schmid, S. H. Shin, T. V. Pestova, A. Gil, and E. Wimmer. 1993. A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:7642-7646.
114. Helmby, H., M. Kullberg, and M. Troye-Blomberg. 1998. Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect.Immun.* 66:5167-5174.

115. Helmbly, H., M. Kullberg, and M. Troye-Blomberg. 1998. Expansion of IL-3-responsive IL-4-producing non-B non-T cells correlates with anemia and IL-3 production in mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Eur.J.Immunol.* 28:2559-2570.
116. Helmbly, H., G. Jonsson, and M. Troye-Blomberg. 2000. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect.Immun.* 68:1485-1490.
117. Hermann, G. J., J. W. Thatcher, J. P. Mills, K. G. Hales, M. T. Fuller, J. Nunnari, and J. M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J.Cell Biol.* 143:359-373.
118. Hicks, G. R., H. M. Smith, M. Shieh, and N. V. Raikhel. 1995. Three classes of nuclear import signals bind to plant nuclei. *Plant Physiol* 107:1055-1058.
119. Hill, A. V. 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 16:593-617.
120. Hill, J. R. and D. R. Morris. 1993. Cell-specific translational regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase mRNA. Dependence on translation and coding capacity of the cis-acting upstream open reading frame. *J.Biol.Chem.* 268:726-731.
121. Hirahara, Y., M. Tsuda, Y. Wada, and K. Honke. 2000. cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. *Eur.J.Biochem.* 267:1909-1917.
122. Holder, A. A., J. A. Guevara Patino, C. Uthaipibull, S. E. Syed, I. T. Ling, T. Scott-Finnigan, and M. J. Blackman. 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parasitologia* 41:409-414.
123. Holder, A. A. 1999. Malaria vaccines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:1167-1169.
124. Homberger, H. P. 1989. Bent DNA is a structural feature of scaffold-attached regions in *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. *Chromosoma* 98:99-104.
125. Hopp, T. P. and K. R. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78:3824-3828.
126. Horvath, C. M., Z. Wen, and J. E. Darnell, Jr. 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9:984-994.
127. Hrabal, R., Z. Chen, S. James, H. P. Bennett, and F. Ni. 1996. The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nat.Struct.Biol.* 3:747-752.
128. Hromas, R., S. Boswell, R. N. Shen, G. Burgess, A. Davidson, K. Cornetta, J. Sutton, and K. Robertson. 1996. Forced over-expression of the myeloid zinc finger gene MZF-1 inhibits apoptosis and promotes oncogenesis in interleukin-3-dependent FDCEP1 cells. *Leukemia* 10:1049-1050.
129. Idury, R. M. and M. S. Waterman. 1995. A new algorithm for DNA sequence assembly. *J.Comput.Biol.* 2:291-306.
130. Jackson, R. J., E. A. Campbell, P. Herbert, and T. Hunt. 1983. The preparation and properties of gel-filtered rabbit-reticulocyte lysate protein-synthesis systems. *Eur.J.Biochem.* 131:289-301.
131. Jackson, R. J. and T. Hunt. 1983. Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol.* 96:50-74.
132. James, P., B. D. Hall, S. Whelen, and E. A. Craig. 1992. Multiple protein tyrosine phosphatase-encoding genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 122:101-110.
133. Javahery, R., A. Khachi, K. Lo, B. Zenzie-Gregory, and S. T. Smale. 1994. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.* 14:116-127.
134. Kahn, S. J., M. Wleklinski, R. A. Ezekowitz, D. Coder, A. Aruffo, and A. Farr. 1996. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infect.Immun.* 64:2649-2656.
135. Kain, S. R., M. Adams, A. Kondepudi, T. T. Yang, W. W. Ward, and P. Kitts. 1995. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19:650-655.
136. Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson, and A. E. Smith. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509.
137. Kaminski, A., S. L. Hunt, J. G. Patton, and R. J. Jackson. 1995. Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *RNA*. 1:924-938.
138. Kaplan, J. E., J. W. Larrick, J. Yost, L. Farrell, H. B. Greenberg, K. L. Herrmann, A. J. Sulzer, K. W. Walls, and L. Pederson. 1980. Infectious disease patterns in the Waorani, an isolated Amerindian population. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 29:298-312.
139. Kim, M. K., L. A. Lesoon-Wood, B. D. Weintraub, and J. H. Chung. 1996. A soluble transcription factor, Oct-1, is also found in the insoluble nuclear matrix and possesses silencing activity in its alanine-rich domain. *Mol.Cell Biol.* 16:4366-4377.
140. Kirk-Davidoff DB, H. E. A. N. K. D. 1999. The effect of climate change on ozone depletion through changes in stratosphere. *Nature* 399:401.
141. Klaff, P., D. Riesner, and G. Steger. 1996. RNA structure and the regulation of gene expression. *Plant Mol.Biol.* 32:89-106.
142. Kobayashi, F., T. Morii, T. Matsui, T. Fujino, Y. Watanabe, W. P. Weidanz, and M. Tsuji. 1996. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitol.Res.* 82:385-391.

143. Kolupaeva, V. G., T. V. Pestova, C. U. Hellen, and I. N. Shatsky. 1998. Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J.Biol.Chem.* 273:18599-18604.
144. Kowanko, I. C., A. Ferrante, G. Clemente, and L. M. Kumaratilake. 1996. Tumor necrosis factor primes neutrophils to kill *Staphylococcus aureus* by an oxygen-dependent mechanism and *Plasmodium falciparum* by an oxygen-independent mechanism. *Infect.Immun.* 64:3435-3437.
145. Kozak, M. 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9:5233-5262.
146. Kozak, M. 1981. Mechanism of mRNA recognition by eukaryotic ribosomes during initiation of protein synthesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 93:81-123.
147. Kozak, M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol.Rev.* 47:1-45.
148. Kozak, M. 1984. Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res.* 12:3873-3893.
149. Kozak, M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 12:857-872.
150. Kozak, M. 1986. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell* 47:481-483.
151. Kozak, M. 1986. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2850-2854.
152. Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
153. Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15:8125-8148.
154. Kozak, M. 1987. Effects of intergenic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol.Cell Biol.* 7:3438-3445.
155. Kozak, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J.Mol.Biol.* 196:947-950.
156. Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol.Cell Biol.* 9:5134-5142.
157. Kozak, M. 1989. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol.Cell Biol.* 9:5073-5080.
158. Kozak, M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J.Cell Biol.* 108:229-241.
159. Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J.Cell Biol.* 115:887-903.
160. Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J.Biol.Chem.* 266:19867-19870.
161. Kozak, M. 1991. Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr.* 1:117-125.
162. Kozak, M. 1991. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr.* 1:111-115.
163. Kozak, M. 1996. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm.Genome* 7:563-574.
164. Kozak, M. 1996. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm.Genome* 7:563-574.
165. Kozak, M. 2001. New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol.Cell Biol.* 21:1899-1907.
166. Köster, H. 1999. GFP- as a fusion vector to investigate intracellular distribution of proteins. *GIT*.
167. Krampe, S., O. Stamm, C. P. Hollenberg, and E. Boles. 1998. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* 441:343-347.
168. Kreyszig. 1975. *Statistische Methoden und ihre Anwendung, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 5 edition.*
169. Krucken, J., H. P. Schmitt-Wrede, U. Markmann-Mulisch, and F. Wunderlich. 1997. Novel gene expressed in spleen cells mediating acquired testosterone-resistant immunity to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 230:167-170.
170. Krucken, J., O. Stamm, H. P. Schmitt-Wrede, A. Mincheva, P. Lichter, and F. Wunderlich. 1999. Spleen-specific expression of the malaria-inducible intronless mouse gene *imap38*. *J.Biol.Chem.* 274:24383-24391.
171. Kumararatne, D. S., R. S. Phillips, D. Sinclair, M. V. Parrott, and J. B. Forrester. 1987. Lymphocyte migration in murine malaria during the primary patent parasitaemia of *Plasmodium chabaudi* infections. *Clin.Exp.Immunol.* 68:65-77.
172. Kwiatkowski, D. 1993. TNF-inducing malaria toxin: a sheep in wolf's clothing? *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 87:613-616.
173. Kwiatkowski, D. and K. Marsh. 1997. Development of a malaria vaccine. *Lancet* 350:1696-1701.
174. Kyhse-Andersen, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* 10:203-209.

175. Kyhse-Andersen, J. 1984. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* 10:203-209.
176. LaCasse, E. C. and Y. A. Lefebvre. 1995. Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 23:1647-1656.
177. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
178. Langhorne, J., C. B. Evans, R. Asofsky, and D. W. Taylor. 1984. Immunoglobulin isotype distribution of malaria-specific antibodies produced during infection with *Plasmodium chabaudi adami* and *Plasmodium yoelii*. *Cell Immunol.* 87:452-461.
179. Langhorne, J., K. J. Kim, and R. Asofsky. 1985. Distribution of immunoglobulin isotypes in the non-specific B-cell response induced by infection with *Plasmodium chabaudi adami* and *Plasmodium yoelii*. *Cell Immunol.* 90:251-257.
180. Langhorne, J., S. J. Meding, K. Eichmann, and S. S. Gillard. 1989. The response of CD4+ T cells to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Immunol.Rev.* 112:71-94.
181. Langhorne, J., S. Pells, and K. Eichmann. 1993. Phenotypic characterization of splenic T cells from mice infected with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Scand.J.Immunol.* 38:521-528.
182. Langhorne, J., C. Cross, E. Seixas, C. Li, and W. T. von der. 1998. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:1730-1734.
183. Launois, P., J. A. Louis, and G. Milon. 1997. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. *Parasitology* 115 Suppl:S25-S32.
184. Lawson, T. G., B. K. Ray, J. T. Dodds, J. A. Grifo, R. D. Abramson, W. C. Merrick, D. F. Betsch, H. L. Weith, and R. E. Thach. 1986. Influence of 5' proximal secondary structure on the translational efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors. *J.Biol.Chem.* 261:13979-13989.
185. Li, B. and S. Fields. 1993. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* 7:957-963.
186. Li, C., I. Corraliza, and J. Langhorne. 1999. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect.Immun.* 67:4435-4442.
187. Li, C., E. Seixas, and J. Langhorne. 2001. Rodent malaria: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol.Immunol.(Berl)* 189:115-126.
188. Liebig, H. D., E. Ziegler, R. Yan, K. Hartmuth, H. Klump, H. Kowalski, D. Blaas, W. Sommergruber, L. Frasel, B. Lamphear, and . 1993. Purification of two picornaviral 2A proteinases: interaction with eIF-4 gamma and influence on in vitro translation. *Biochemistry* 32:7581-7588.
189. Lihme, A., C. Schafer-Nielsen, K. P. Larsen, K. G. Muller, and T. C. Bog-Hansen. 1986. Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins. *J.Chromatogr.* 376:299-305.
190. Lin, C. L., L. A. Bristol, L. Jin, M. Dykes-Hoberg, T. Crawford, L. Clawson, and J. D. Rothstein. 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589-602.
191. Lindsay, S. W. and M. H. Birley. 1996. Climate change and malaria transmission. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 90:573-588.
192. Lindsay, S. W. and W. J. Martens. 1998. Malaria in the African highlands: past, present and future. *Bull.World Health Organ* 76:33-45.
193. Lindsay, W. P., C. J. Lamb, and R. A. Dixon. 1993. Microbial recognition and activation of plant defense systems. *Trends Microbiol.* 1:181-187.
194. Liu, C. C., C. C. Simonsen, and A. D. Levinson. 1984. Initiation of translation at internal AUG codons in mammalian cells. *Nature* 309:82-85.
195. Loevinsohn, M. E. 1994. Climatic warming and increased malaria incidence in Rwanda. *Lancet* 343:714-718.
196. Lopes, M. F., V. F. da Veiga, A. R. Santos, M. E. Fonseca, and G. A. DosReis. 1995. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J.Immunol.* 154:744-752.
197. Loria, P., S. Miller, M. Foley, and L. Tilley. 1999. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem.J.* 339 (Pt 2):363-370.
198. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
199. Luban, J. and S. P. Goff. 1995. The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr.Opin.Biotechnol.* 6:59-64.
200. Lugo, T. G., A. M. Pendergast, A. J. Muller, and O. N. Witte. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247:1079-1082.
201. Macleod, K., D. Leprince, and D. Stehelin. 1992. The ets gene family. *Trends Biochem.Sci.* 17:251-256.
202. Malakooti, M. A., K. Biomndo, and G. D. Shanks. 1998. Reemergence of epidemic malaria in the highlands of western Kenya. *Emerg.Infect.Dis.* 4:671-676.

203. Marsh, K., D. Forster, C. Waruiru, I. Mwangi, M. Winstanley, V. Marsh, C. Newton, P. Winstanley, P. Warn, N. Peshu, and . 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N.Engl.J.Med.* 332:1399-1404.
204. MartensWJM, R. J. N. L. and T. Bilthoven. 1994. Climate change and malaria risk: an integrated modelling approach. *Netherlands: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieubygiene* 1994.
205. Martino, T. A., M. J. Sole, L. Z. Penn, C. C. Liew, and P. Liu. 1993. Quantitation of enteroviral RNA by competitive polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 31:2634-2640.
206. Mathews, D. H., J. Sabina, M. Zuker, and D. H. Turner. 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol.Biol.* 288:911-940.
207. McCaldon, P. and P. Argos. 1988. Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins* 4:99-122.
208. McFadden, G. I. and D. S. Roos. 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol.* 7:328-333.
209. McKie, J. H., K. T. Douglas, C. Chan, S. A. Roser, R. Yates, M. Read, J. E. Hyde, M. J. Dascombe, Y. Yuthavong, and W. Sirawaraporn. 1998. Rational drug design approach for overcoming drug resistance: application to pyrimethamine resistance in malaria. *J.Med.Chem.* 41:1367-1370.
210. Meding, S. J., S. C. Cheng, B. Simon-Haarhaus, and J. Langhorne. 1990. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infect.Immun.* 58:3671-3678.
211. Meerovitch, K., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, F. Lejbkowitz, D. J. Kenan, E. K. Chan, V. I. Agol, J. D. Keene, and N. Sonenberg. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J.Virol.* 67:3798-3807.
212. Mehlhorn & Walldorf. 1988. Life Cycles. (ed.). *Parasitology in focus Mehlhorn H.(ed.)*.
213. Mermod, N., T. J. Williams, and R. Tjian. 1988. Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* 332:557-561.
214. Mohan, K. and M. M. Stevenson. 1998. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. *Br.J.Haematol.* 103:942-949.
215. Mohan, K., P. Moulin, and M. M. Stevenson. 1997. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol.* 159:4990-4998.
216. Mons B, S. R. 1990. Laboratory models for research *in vivo* and *in vitro* on malaria parasites of mammals. Current status: . *Parasitology Today*3-7.
217. Morris-Kay GM. Craniofacial defects in AP-2 null mutant mice. 18, 785-788. 2001. Bioessays. Ref Type: Generic
218. Mossmann, H., W. P. Bente, C. Galanos, M. Freudenberg, W. N. Kuhn-Velten, H. Reinauer, and F. Wunderlich. 1997. Dietary testosterone suppresses protective responsiveness to *Plasmodium chabaudi* malaria. *LIFE Sci.* 60:839-848.
219. Nevins, J. R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424-429.
220. Nigg, E. A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386:779-787.
221. Nozawa, M., K. Yomogida, N. Kanno, N. Nonomura, T. Miki, A. Okuyama, Y. Nishimune, and M. Nozaki. 2000. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 60:1348-1352.
222. Ogbourne, S. and T. M. Antalis. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem.J.* 331 (Pt 1):1-14.
223. Ohlmann, T., M. Rau, V. M. Pain, and S. J. Morley. 1996. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.* 15:1371-1382.
224. Olliaro, P. L. and Y. Yuthavong. 1999. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery. *Pharmacol.Ther.* 81:91-110.
225. Opstelten, R. J., J. M. Clement, and F. Wanka. 1989. Direct repeats at nuclear matrix-associated DNA regions and their putative control function in the replicating eukaryotic genome. *Chromosoma* 98:422-427.
226. Ottmann, T. a. W. P. 193. *Algorithmen und Datenstrukturen. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim.*
227. Paavonen, T. 1994. Hormonal regulation of immune responses. *Ann.Med* 26:255-258.
228. Parker, M. G. 1993. Steroid and related receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5:499-504.
229. Patz, J. A., T. K. Graczyk, N. Geller, and A. Y. Vittor. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int.J.Parasitol.* 30:1395-1405.
230. Pause, A., N. Methot, Y. Svitkin, W. C. Merrick, and N. Sonenberg. 1994. Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J.* 13:1205-1215.
231. Pelham, H. R. and R. J. Jackson. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur.J.Biochem.* 67:247-256.
232. Pelletier, J. and N. Sonenberg. 1985. Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eucaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol.Cell Biol.* 5:3222-3230.

233. Perrotti, D., S. Bonatti, R. Trotta, R. Martinez, T. Skorski, P. Salomoni, E. Grassilli, R. V. Lozzo, D. R. Cooper, and B. Calabretta. 1998. TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *EMBO J.* 17:4442-4455.
234. Pestova, T. V., S. I. Borukhov, and C. U. Hellen. 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394:854-859.
235. Phelps, D. E., K. M. Hsiao, Y. Li, N. Hu, D. S. Franklin, E. Westphal, E. Y. Lee, and Y. Xiong. 1998. Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c expression during myogenesis. *Mol. Cell Biol.* 18:2334-2343.
236. Phillips, R. S., K. E. Mathers, and A. W. Taylor-Robinson. 1994. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathways of protection. *Res. Immunol.* 145:406-412.
237. Phillips, S. 1994. Effector mechanisms against asexual erythrocytic stages of *Plasmodium*. *Immunol. Lett.* 41:109-114.
238. Playfair, J. H., J. Taverne, C. A. Bate, and J. B. de Souza. 1990. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol. Today* 11:25-27.
239. Poirier, G. M., G. Anderson, A. Huvar, P. C. Wagaman, J. Shuttleworth, E. Jenkinson, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and M. G. Erlander. 1999. Immune-associated nucleotide-1 (IAN-1) is a thymic selection marker and defines a novel gene family conserved in plants. *J. Immunol.* 163:4960-4969.
240. Pongubala, J. M. and M. L. Atchison. 1991. Functional characterization of the developmentally controlled immunoglobulin kappa 3' enhancer: regulation by Id, a repressor of helix-loop-helix transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 11:1040-1047.
241. Potocnjak, P., N. Yoshida, R. S. Nussenzweig, and V. Nussenzweig. 1980. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J. Exp. Med.* 151:1504-1513.
242. Powers, J. A. and J. C. Eissenberg. 1993. Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding. *J. Cell Biol.* 120:291-299.
243. Quelle, D. E., F. Zindy, R. A. Ashmun, and C. J. Sherr. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83:993-1000.
244. Rao, V. N. and E. S. Reddy. 1992. A divergent ets-related protein, elk-1, recognizes similar c-ets-1 proto-oncogene target sequences and acts as a transcriptional activator. *Oncogene* 7:65-70.
245. Reuber, T. L. and F. M. Ausubel. 1996. Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. *Plant Cell* 8:241-249.
246. Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey, and C. Dingwall. 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64:615-623.
247. Roberts, D. J., A. G. Craig, A. R. Berendt, R. Pinches, G. Nash, K. Marsh, and C. I. Newbold. 1992. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 357:689-692.
248. Rogers, J. S. and D. L. Swofford. 1999. Multiple local maxima for likelihoods of phylogenetic trees: a simulation study. *Mol. Biol. Evol.* 16:1079-1085.
249. Ron, D. and J. F. Habener. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6:439-453.
250. Ropelewski CF, H. M. 1987. Global and regional scale precipitation patterns associated with the El Nino southern ocean oscillation. *Weather Rev* 1987,517-528.
251. Rowe, J. A., J. M. Moulds, C. I. Newbold, and L. H. Miller. 1997. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 388:292-295.
252. Rudin, W., N. Favre, G. Bordmann, and B. Ryffel. 1997. Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria. *Eur. J. Immunol.* 27:810-815.
253. Ryabova, L. A. and T. Hohn. 2000. Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev.* 14:817-829.
254. Rycyzyn, M. A., S. C. Reilly, K. O'Malley, and C. V. Clevenger. 2000. Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol. Endocrinol.* 14:1175-1186.
255. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
256. Sambrook J., F. E. F. a. M. T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, CSHL-press Cold Spring Harbour, NY.
257. Sanchez-Garcia, I. and G. Grutz. 1995. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92:5287-5291.
258. Sanchez, G. I., D. J. Carucci, J. Sacci, Jr., J. H. Resau, W. O. Rogers, N. Kumar, and S. L. Hoffman. 1999. *Plasmodium yoelii*: cloning and characterization of the gene encoding for the mitochondrial heat shock protein 60. *Exp. Parasitol.* 93:181-190.
259. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74:5463-5467.

260. Saraste, M., P. R. Sibbald, and A. Wittinghofer. 1990. The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem.Sci.* 15:430-434.
261. Chofield, L. and F. Hackett. 1993. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J.Exp.Med.* 177:145-153.
262. Schmitt-Wrede, H. P., S. Fiebig, F. Wunderlich, W. P. Bente, U. Bettenhauser, K. Boden, and H. Mossmann. 1991. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: variant protein expression in functionally changed splenic non-T cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 76:207-214.
263. Schofield, L., S. Novakovic, P. Gerold, R. T. Schwarz, M. J. McConville, and S. D. Tachado. 1996. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J.Immunol.* 156:1886-1896.
264. Sedman, S. A., G. W. Gelembiuk, and J. E. Mertz. 1990. Translation initiation at a downstream AUG occurs with increased efficiency when the upstream AUG is located very close to the 5' cap. *J.Virol.* 64:453-457.
265. Shapiro, Y., D. Moran, and Y. Epstein. 1998. Acclimatization strategies—preparing for exercise in the heat. *Int.J.Sports Med.* 19 Suppl 2:S161-S163.
266. Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge, and W. D. Huse. 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16:7583-7600.
267. Short, J. M. and J. A. Sorge. 1992. In vivo excision properties of bacteriophage lambda ZAP expression vectors. *Methods Enzymol.* 216:495-508.
268. Shoyab, M., V. L. McDonald, C. Byles, G. J. Todaro, and G. D. Plowman. 1990. Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:7912-7916.
269. Sirawaraporn, W. and Churchill Livingstone. 1998. Dihydrofolate reductase and antifolate resistance in malaria. *Drug Resistance Update* 1:379-406.
270. Sloan, J., J. R. Kinghorn, and S. E. Unkles. 1999. The two subunits of human molybdopterin synthase: evidence for a bicistronic messenger RNA with overlapping reading frames. *Nucleic Acids Res.* 27:854-858.
271. Smith, J. D., C. E. Chitnis, A. G. Craig, D. J. Roberts, D. E. Hudson-Taylor, D. S. Peterson, R. Pinches, C. I. Newbold, and L. H. Miller. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82:101-110.
272. Smith, J. D., G. Subramanian, B. Gamain, D. I. Baruch, and L. H. Miller. 2000. Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol.Biochem.Parasitol.* 110:293-310.
273. Spanakis, E. 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res.* 21:3809-3819.
274. Sparro, G., G. Galdenzi, A. M. Eleuteri, M. Angeletti, W. Schroeder, and E. Fioretti. 1997. Isolation and N-terminal sequence of multiple forms of granulins in human urine. *Protein Expr.Purif.* 10:169-174.
275. Stevenson, M., S. Lemieux, and E. Skamene. 1984. Genetic control of resistance to murine malaria. *J.Cell Biochem.* 24:91-102.
276. Stevenson, M. M., J. J. Lyanga, and E. Skamene. 1982. Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. *Infect.Immun.* 38:80-88.
277. Stevenson, M. M. and E. Ghadirian. 1989. Human recombinant tumor necrosis factor alpha protects susceptible A/J mice against lethal *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect.Immun.* 57:3936-3939.
278. Stevenson, M. M., E. Ghadirian, N. C. Phillips, D. Rae, and J. E. Podoba. 1989. Role of mononuclear phagocytes in elimination of *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol.* 11:529-544.
279. Stevenson, M. M. and E. Ghadirian. 1989. Human recombinant tumor necrosis factor alpha protects susceptible A/J mice against lethal *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect.Immun.* 57:3936-3939.
280. Stevenson, M. M., E. Ghadirian, N. C. Phillips, D. Rae, and J. E. Podoba. 1989. Role of mononuclear phagocytes in elimination of *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol.* 11:529-544.
281. Stevenson, M. M., M. Nowotarski, and G. Yap. 1990. Review: cytokines and malaria. *Clin.Invest Med.* 13:353-359.
282. Stevenson, M. M., M. F. Tam, and D. Rae. 1990. Dependence on cell-mediated mechanisms for the appearance of crisis forms during *Plasmodium chabaudi* AS infection in C57BL/6 mice. *Microb.Pathog.* 9:303-314.
283. Stevenson, M. M., M. F. Tam, M. Belosevic, P. H. van der Meide, and J. E. Podoba. 1990. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect.Immun.* 58:3225-3232.
284. Stevenson, M. M., M. F. Tam, and M. Nowotarski. 1990. Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to *Plasmodium chabaudi* AS. *Immunol.Lett.* 25:115-121.
285. Stevenson, M. M. and M. F. Tam. 1993. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin.Exp.Immunol.* 92:77-83.
286. Stevenson, M. M., M. F. Tam, S. F. Wolf, and A. Sher. 1995. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol.* 155:2545-2556.

287. Su, X. Z., V. M. Heatwole, S. P. Wertheimer, F. Guinet, J. A. Herrfeldt, D. S. Peterson, J. A. Ravetch, and T. E. Wellems. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82:89-100.
288. Sutherst, R. W. 1993. Arthropods as disease vectors in a changing environment. *Ciba Found.Symp.* 175:124-141.
289. Svitkin, Y. V., A. Pause, and N. Sonenberg. 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J.Virol.* 68:7001-7007.
290. Svitkin, Y. V., K. Meerovitch, H. S. Lee, J. N. Dholakia, D. J. Kenan, V. I. Agol, and N. Sonenberg. 1994. Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. *J.Virol.* 68:1544-1550.
291. Swofford, D. L. a. O. G. J. 1990. Phylogeny reconstruction. *Molecular Systematics.Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.*
292. Szabo, G., Z. Katarova, and R. Greenspan. 1994. Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. *Mol.Cell Biol.* 14:7535-7545.
293. Tachado, S. D., P. Gerold, M. J. McConville, T. Baldwin, D. Quilici, R. T. Schwarz, and L. Schofield. 1996. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J.Immunol.* 156:1897-1907.
294. Tachado, S. D., P. Gerold, R. Schwarz, S. Novakovic, M. McConville, and L. Schofield. 1997. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:4022-4027.
295. Tadei, W. P., B. D. Thatcher, J. M. Santos, V. M. Scarpassa, I. B. Rodrigues, and M. S. Rafael. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 59:325-335.
296. Tanaka, N., T. Kawakami, and T. Taniguchi. 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol.Cell Biol.* 13:4531-4538.
297. Taylor-Robinson, A. W., R. S. Phillips, A. Severn, S. Moncada, and F. Y. Liew. 1993. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 260:1931-1934.
298. Taylor-Robinson, A. W. and R. S. Phillips. 1993. Protective CD4+ T-cell lines raised against *Plasmodium chabaudi* show characteristics of either Th1 or Th2 cells. *Parasite Immunol.* 15:301-310.
299. Taylor-Robinson, A. W., R. S. Phillips, A. Severn, S. Moncada, and F. Y. Liew. 1993. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 260:1931-1934.
300. Taylor-Robinson, A. W. and R. S. Phillips. 1994. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect.Immun.* 62:2490-2498.
301. Taylor-Robinson, A. W. and R. S. Phillips. 1994. Th1 and Th2 CD4+ T cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for an unrelated antigen protect against blood stage *P. chabaudi* infection. *Eur.J.Immunol.* 24:158-164.
302. Taylor-Robinson, A. W. and R. S. Phillips. 1994. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect.Immun.* 62:2490-2498.
303. Taylor-Robinson, A. W. 1996. Glomerulonephritis and nephrotic syndrome in *Plasmodium chabaudi chabaudi*: a potential murine model of chronic *P. malariae* infection. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 90:635-637.
304. Taylor-Robinson, A. W. and R. S. Phillips. 1996. Reconstitution of B-cell-depleted mice with B cells restores Th2-type immune responses during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect.Immun.* 64:366-370.
305. Taylor-Robinson, A. W. 1997. Counter-regulation of T helper 1 cell proliferation by nitric oxide and interleukin-2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 233:14-19.
306. Taylor-Robinson, A. W. 1998. Immunoregulation of malarial infection: balancing the vices and virtues. *Int.J.Parasitol.* 28:135-148.
307. Taylor, G. A., M. Jeffers, D. A. Largaespada, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and G. F. Woude. 1996. Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J.Biol.Chem.* 271:20399-20405.
308. Taylor, G. A., R. Stauber, S. Rulong, E. Hudson, V. Pei, G. N. Pavlakis, J. H. Resau, and G. F. Woude. 1997. The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J.Biol.Chem.* 272:10639-10645.
309. Taylor, G. A., C. M. Collazo, G. S. Yap, K. Nguyen, T. A. Gregorio, L. S. Taylor, B. Eagleson, L. Secrest, E. A. Southon, S. W. Reid, L. Tessarollo, M. Bray, D. W. McVicar, K. L. Komschlies, H. A. Young, C. A. Biron, A. Sher, and G. F. Woude. 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:751-755.
310. Thalmeier, K., H. Synovzik, R. Mertz, E. L. Winnacker, and M. Lipp. 1989. Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev.* 3:527-536.
311. Thomson, M. 1998. What are guanosine triphosphate-binding proteins doing in mitochondria? *Biochim.Biophys.Acta* 1403:211-218.

312. Tonetti, M., E. Millo, L. Sturla, A. Bisso, and A. De Flora. 1997. Effects of the murine L929 and L1210 cell lines on nitric oxide and TNF- α production by RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230:636-640.
313. Touze, J. E., E. Garnotel, G. Martet, J. P. Ducourau, D. Beaute, J. C. Zimmermann, and P. Aubry. 1989. Spontaneous spleen rupture in malaria. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 83:161.
314. Treisman, R. and G. Ammerer. 1992. The SRF and MCM1 transcription factors. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2:221-226.
315. Turner, G. 1997. Cerebral malaria. *Brain Pathol.* 7:569-582.
316. Uesaka, T., K. Yano, M. Yamasaki, and M. Ando. 1995. Somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-, and granulin-like peptides isolated from intestinal extracts of goldfish, *Carassius auratus*. *Gen.Comp Endocrinol.* 99:298-306.
317. van Parijs, L. and A. K. Abbas. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243-248.
318. Vater, C. A., C. K. Raymond, K. Ekena, I. Howald-Stevenson, and T. H. Stevens. 1992. The VPS1 protein, a homolog of dynamin required for vacuolar protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, is a GTPase with two functionally separable domains. *J.Cell Biol.* 119:773-786.
319. Villeval, J. L., A. Lew, and D. Metcalf. 1990. Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. I. Erythropoietic populations. *Exp.Parasitol.* 71:364-374.
320. von der, W. T. and J. Langhorne. 1993. The roles of cytokines produced in the immune response to the erythrocytic stages of mouse malarial infections. *Immunobiology* 189:397-418.
321. von der, W. T., N. Honarvar, and J. Langhorne. 1996. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *J.Immunol.* 156:2510-2516.
322. Walker, J. E., A. Eberle, N. J. Gay, M. J. Runswick, and M. Saraste. 1982. Conservation of structure in proton-translocating ATPases of *Escherichia coli* and mitochondria. *Biochem.Soc.Trans.* 10:203-206.
323. Waterman, M. S. 1995. *Introduction to Computational Biology. Chapman and Hall, London.*
324. Weiss, L., U. Geduldig, and W. Weidanz. 1986. Mechanisms of splenic control of murine malaria: reticular cell activation and the development of a blood-spleen barrier. *Am.J.Anat.* 176:251-285.
325. Weiss, L., J. Johnson, and W. Weidanz. 1989. Mechanisms of splenic control of murine malaria: tissue culture studies of the erythropoietic interplay of spleen, bone marrow, and blood in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 41:135-143.
326. Welles, T. E., L. J. Panton, I. Y. Gluzman, R. do, V. R. W. Gwadz, A. Walker-Jonah, and D. J. Krogstad. 1990. Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* 345:253-255.
327. Wernsdorfer, W. H. and D. Payne. 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol.Ther.* 50:95-121.
328. Wilcoxon, S. C., E. Kirkman, K. C. Dowdell, and S. A. Stohlman. 2000. Gender-dependent IL-12 secretion by APC is regulated by IL-10. *J Immunol.* 164:6237-6243.
329. Winstanley, P. A. 2000. Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and the prospects. *Parasitol.Today* 16:146-153.
330. Wunderlich, F., P. Marinovski, W. P. Benten, H. P. Schmitt-Wrede, and H. Mossmann. 1991. Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite Immunol.* 13:357-367.
331. Wunderlich, F. and M. Helwig. 1987. *Plasmodium chabaudi* malaria: red blood cells with altered membrane proteins in immune mice. *Eur.J.Cell Biol.* 43:499-500.
332. Wunderlich, F., M. Helwig, G. Schillinger, V. Speth, and M. F. Wiser. 1988. Expression of the parasite protein Pc90 in plasma membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium chabaudi*. *Eur.J.Cell Biol.* 47:157-164.
333. Wunderlich, F., H. Mossmann, M. Helwig, and G. Schillinger. 1988. Resistance to *Plasmodium chabaudi* in B10 mice: influence of the H-2 complex and testosterone. *Infect.Immun.* 56:2400-2406.
334. Wunderlich, F., M. Helwig, G. Schillinger, and V. Speth. 1988. Cryptic disposition of antigenic parasite proteins in plasma membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium chabaudi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 30:55-65.
335. Wunderlich, F., H. H. Brenner, and M. Helwig. 1988. *Plasmodium chabaudi* malaria: protective immunization with surface membranes of infected erythrocytes. *Infect.Immun.* 56:3326-3328.
336. Wyler, D. J. 1979. Cellular aspects of immunoregulation in malaria. *Bull.World Health Organ* 57 Suppl 1:239-243.
337. Wyler, D. J. 1983. Splenic functions in malaria. *Lymphology* 16:121-127.
338. Wyler, D. J. 1983. The spleen in malaria. *Ciba Found.Symp.* 94:98-116.
339. Xiao, J. H., I. Davidson, M. Macchi, R. Rosales, M. Vigneron, A. Staub, and P. Chambon. 1987. In vitro binding of several cell-specific and ubiquitous nuclear proteins to the GT-I motif of the SV40 enhancer. *Genes Dev.* 1:794-807.
340. Xie, W. L., J. G. Chipman, D. L. Robertson, R. L. Erikson, and D. L. Simmons. 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2692-2696.

341. Yamamoto, M., L. J. Ko, M. W. Leonard, H. Beug, S. H. Orkin, and J. D. Engel. 1990. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF- E1 multigene family. *Genes Dev.* 4:1650-1662.
342. Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-291.
343. Yang, W. and A. G. Hinnebusch. 1996. Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol.Cell Biol.* 16:6603-6616.
344. Yap, G. S. and M. M. Stevenson. 1994. Differential requirements for an intact spleen in induction and expression of B-cell-dependent immunity to Plasmodium chabaudi AS. *Infect.Immun.* 62:4219-4225.
345. Yap, G. S., P. Jacobs, and M. M. Stevenson. 1994. Th cell regulation of host resistance to blood-stage Plasmodium chabaudi AS. *Res.Immunol.* 145:419-422.
346. Yap, G. S. and A. Sher. 1999. Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201:240-247.
347. Yoshida, N., R. S. Nussenzweig, P. Potocnjak, V. Nussenzweig, and M. Aikawa. 1980. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science* 207:71-73.
348. Yueh, A. and R. J. Schneider. 1996. Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev.* 10:1557-1567.
349. Ziegler, E., A. M. Borman, R. Kirchweger, T. Skern, and K. M. Kean. 1995. Foot-and-mouth disease virus Lb proteinase can stimulate rhinovirus and enterovirus IRES-driven translation and cleave several proteins of cellular and viral origin. *J.Virol.* 69:3465-3474.
350. Zlatanova, J. S. and K. E. van Holde. 1992. Chromatin loops and transcriptional regulation. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 2:211-224.
351. Zuker M., P. S. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research*133-148.
352. Zuker, D. H. M. T. d. H. and e. J.Barciszewski & B.F.C.Clark. 1999. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. *RNA Biochemistry and Biotechnology*11-43.
353. Zuker, M. and P. Stiegler. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* 9:133-148.
354. Zuker, M. 1989. Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol.* 180:262-288.
355. Zweidler-McKay, P. A., H. L. Grimes, M. M. Flubacher, and P. N. Tschlis. 1996. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol.Cell Biol.* 16:4024-4034.

7.0 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (amino acid')
AC	„Accession Numbe“'
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5`-Triphosphat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
β-Gal	β-Galactosidase
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
Cam	Chloramphenicol
cDNA	„copy“-DNA
cfu	„colony forming unit“'
CD	Cluster of differentiation
cm, mm, μm, nm	Zenti-, Milli-, Mikro- und Nanometer
d(A, C, G, T)TP	2'-Desoxyadenosin-, 2'-Desoxycytidin-, 2'-Desoxyguanosin-, 2'-Desoxythymidin-5-Triophosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid 5'-Triphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g, kg, mg, μg, ng	Gramm, Kilo-, Mikro-, Nanogramm
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s ²
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP	Green-Fluorescent-Protein
Glyoxal	Glyoalethandial
GPCR	„g-protein coupled receptor“'
GPI	Glykosylphosphahtidylinositol
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
h	Stunde
His	Histidin
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
LTR	long terminal repeat
μCi	Mikrocurie (3,7 x 10 ⁷ Zerfälle pro sec; 1 μCi = 37 kBq)
M, mM, μM	Molarität, Milli- und Mikromolarität
MACS	„magnetic activated cellsorting“'
MCS	„multiple cloning site“'
MHC	Haupt-Histo-Kompatibilitätskomplex
Min	Minuten
NK	natürliche Killerzellen
mRNA	„messenger“-RNA
ODnm	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
ORF	offenes Leseraster (open reading frame')
UORF	upstream open reading frame
PCR	„polymerase chain reaction“'

PEG	Polyethylenglykol
PfEMP	Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein
pfu	„plaque forming units“
Poly A+	Polyadenylsäure
Pos.	Position
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	reaktive Sauerstoff-Intermediate
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg Einheit (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	sezernierte alkalische Phosphatase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TH	T-Helfer Zellen
T _m	Schmelztemperatur für Nukleinsäure-Hybridisierung
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität
UAS	„upstream activating sequence“
UTR	„untranslated region“
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VAT	variabler Antigen Typ
VCAM	vascular adhesion molecule
WHO	World Healthy Organization
X-Gal	5-Bromo, 4-chloro, 3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Olaf Stamm
Geburtsdatum: 16.04.1969
Geburtsort: Hilden
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1975-1979 Städtische Gemeinschaftsgrundschule Düsseldorf Wersten
1979-1988 Geschwister-Scholl-Gymnasium Düsseldorf

Zivildienst

1988-1990 Werkstatt für angepasste Arbeit Düsseldorf der
Behinderten-Werkstatt der Landeshauptstadt Düsseldorf

Studium

10.1989-09.1995 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Abschluss: Diplom-Biologe
11.1995-10.2000 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung für
Molekulare Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
seit 01.2001 Bereichsleiter BSE der EUROFINS SCIENTIFIC GmbH
Standort NRW

Danksagungen:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael von Ciriacy-Wantrup für die Ermutigung eine wissenschaftliche Arbeit mit dem Ziel der Promotion aufzunehmen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich für die engagierte Betreuung und die fruchtbaren Diskussionen sowie für die großzügige finanzielle Unterstützung der experimentellen Arbeit.

Herrn Dr. Hans-Peter Schmitt-Wrede danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Denkanstöße und vor allem für seine Fähigkeit sowohl mich als auch alle anderen während „wissenschaftlicher Durststrecken“ neu zu motivieren.

Frau Andrea Grunwald danke ich für alle Arbeiten rund um die Maus, die abwechslungsreiche Gestaltung der Mittagspausen sowie für die Durchführung von ungezählten größeren und kleineren Arbeiten.

Herrn Predrag Marinovski danke ich für die spontane Bewältigung aller Computerprobleme, die Unterstützung und Unterhaltung bei radioaktiven Arbeiten und die improvisierten kulinarischen Gelage.

Herrn Steffen Tschuschke danke ich für die ständige altruistische Hilfsbereitschaft und seine Freundschaft.

Frau Andrea Waldrapp danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der Doktorarbeit, aber vor allem beim Berufsstart, sowie für die ungezählten Motivations-Capuccinos.

Herrn Dr. Peter Benten danke ich ganz besonders herzlich für die unermüdliche Unterstützung bei allen konfokalen Mikroskopiearbeiten, die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen sportlichen Erlebnisse.

Herrn Dr. Jürgen Krücken danke ich für die theoretische Unterstützung bei *imap38* relevanten Fragestellungen.

Herrn Dr. Mossmann und Herrn Dr. Uwe Müller danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung der zahlreichen Antiseren und bei der FACS Sortierung der Milzzellen.

Herrn Guo Zhiyong danke ich trotz meines Expansionsdrangs für die freundschaftliche Nachbarschaft am Labortisch und für die Gesellschaft zu unkonventionellen Arbeitszeiten. Herrn Ralf Hosse danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und den philologischen Einfluss im Laboralltag. Herrn Markus Epe danke ich für seinen unerschütterlichen Optimismus bei allen Arbeiten mit *imap38* und wünsche ihm, daß er sich diesen erhalten kann. Frau Meike Bartl danke ich für alle nicht-wissenschaftlichen Erheiterungen und Herrn Thomas Lütke für die informatischen Informationen.

Allen anderen aktiven und früheren namentlich nicht genannten Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Molekulare Parasitologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, ohne die die Arbeit überhaupt keinen Spass sondern lediglich Erkenntnisgewinn gebracht hätte.

Herrn Oliver Temme danke ich für die gnadenlose Durchsicht des Manuskripts.

Meine Freunden und Freundinnen Klaus, Martel, Borwin, Bettina, Uli und Stefan möchte ich für alle gemeinsamen Erlebnisse auf, unter und am Wasser danken, die alle dafür sorgten, die Verbindungen zum echten Leben nicht zu verlieren.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für die Unterstützung in jeder Beziehung, die Aufrechterhaltung meiner Motivation und das mehr oder weniger klaglose Erdulden meiner Launen danken.