

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. K. Pfeffer

**Identifizierung und Charakterisierung
von IFN γ -regulierten Effektormolekülen
in der antimikrobiellen Immunantwort**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Iris Abele

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Koreferent: Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Zusammenfassung

Die pro-inflammatorischen Zytokine Interferon γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) induzieren verschiedene Effektorproteine, darunter die Mitglieder mehrerer GTPasen-Familien. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Effektormoleküle der Pathogenabwehr im Maus-Modell.

Die Septine – eine Proteinfamilie, die zu den Guanylat-bindenden Proteinen (GTPasen) gehört – können nicht durch IFN γ induziert werden. Unsere Realtime PCR-Analysen (*polymerase chain reaction*) ergaben bei keinem der getesteten Septine eine vermehrte Expression in ANA-1-Makrophagen nach Stimulation mit IFN γ und TNF α . Auch durch die Toll-like-Rezeptor-Liganden Lipoteichonsäure (LTA) und Lipopolysaccharid (LPS) konnten die Septine nicht induziert werden. Vielmehr zeigten einige Septine nach Behandlung mit den oben genannten Zytokinen sogar eine verminderte Expression (nach IFN γ -Stimulation Sept1, 3, 5, 7, 8 und 9).

Ein bisher noch nicht beschriebenes Transkript mit der Accession Nummer AI451557 wurde nach Stimulation mit IFN γ vermehrt exprimiert, während TNF α , LTA oder LPS keinen Effekt hatten. Auch in den Milzen von Mäusen mit Listerieninfektion – nicht jedoch nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* – wurde AI451557 geringfügig stärker exprimiert. Jedoch zeigte sich bei der näheren Charakterisierung, dass AI451557 möglicherweise nicht zu einem funktionstüchtigen Protein translatiert wird. Warum das Transkript trotzdem reguliert wird, müssten weitergehende Untersuchungen – möglicherweise zu einer regulatorischen Funktion der AI451557-Sequenz – zeigen.

Ein weiteres Transkript – „*similar to VLIG*“ (stVLIG) – wurde aufgrund der starken Ähnlichkeit zu der IFN γ -induzierten GTPase VLIG-1 (*very large inducible gtpase*) untersucht. In Realtime PCR-Studien konnten wir zeigen, dass stVLIG in IFN γ -stimulierten Makrophagen vermehrt exprimiert wird. Jedoch war es nicht möglich, im Northern Blot ein Transkript mit der erwarteten Größe nachzuweisen. Für VLIG-1 konnten wir mittels Realtime PCR die Induktion durch IFN γ bestätigen und auch eine gesteigerte Expression in Milzen von Listerien-infizierten Mäusen nachweisen. Ob stVLIG ein funktionstüchtiges Protein ist oder der stVLIG-Lokus für eine regulatorische mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) kodiert, kann momentan noch nicht beantwortet werden.

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillatum, zweifach destilliertes Wasser
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
BMDM	aus Knochenmarkszellen gereifte Makrophagen (<i>bone marrow derived macrophages</i>)
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cc-Domäne	<i>coiled-coil</i> -Domäne
cDNS	DNS-Kopie der mRNS (complementäre DNS)
CDS	Protein-kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CT	<i>cycle threshold</i>
d	Tag (<i>day</i>)
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DCs	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribo-Nukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsRNS	doppelsträngige RNS
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten
EMCV	<i>Encephalo Myocarditis Virus</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
GBPs	<i>guanlyatbinding proteins</i>
G-Domäne	GTP-bindende-Domäne
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-bindende Proteine
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H ₂ O bidest	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inl	Internalin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRGs	<i>immunity related GTPases</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
i.p.	intrapertoneal

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
ko	knock-out
LA	langer Arm
LIF	leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
mRNS	Boten-RNS (<i>messenger RNS</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykane
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
p-loop	<i>phosphate-binding loop</i>
poly (I:C)	Polyinosin-Polycytidin-Säure
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PV	parasitophore Vakuole
RNI	Reaktive Stickstoffintermediate
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Sept/SEPT	Septin (murin/human)
siRNS	<i>small interfering RNS</i>
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat Lösung
stVLIG	<i>similar to VLIG</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
VLIG	<i>very large inducible GTPase</i>
WB	Western Blot
v/v	Volumen/Volumen
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Pathogenerkennung, Signalvermittlung und Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems.....	2
1.1.1	PAMPs und PRRs	2
1.1.2	Zytokine	5
1.1.2.1	Interferon γ	5
1.1.2.2	Die TNF/TNFR-Superfamilie.....	10
1.2	GTPasen	12
1.2.1	Die p65 GTPasen.....	14
1.2.2	Die p47-GTPasen	16
1.2.3	Die VLIGs	17
1.2.4	Die Septine	18
1.2.4.1	Septine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2.4.2	Septine in höheren Lebewesen	20
1.2.4.3	Septin-Funktion bei Erkrankungen des Menschen	24
1.3	Zielsetzung	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Bezugsquellennachweis	27
2.1.1	Chemikalien.....	27
2.1.2	Enzyme.....	29
2.1.3	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.4	Radiochemikalien.....	30
2.2	Geräte	30
2.3	Medien und Puffer.....	31
2.3.1	Stammlösungen und Puffer.....	31
2.3.2	Kulturmedien für Zellen und Bakterien	33
2.4	Antibiotika.....	33
2.5	Bakterien-, Toxoplasmenstämme und Zelllinien.....	34
2.6	Versuchstiere	35
2.7	Primer.....	35
2.8	Plasmidvektoren.....	37
2.8.1	Ausgangsvektoren.....	37

2.8.2	Erstelltes Plasmid.....	37
2.9	Tierversuche.....	37
2.10	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	38
2.10.1	Kultivierung von Zelllinien.....	38
2.10.2	Transfektion von 293T Zellen mittels Kalzium-Phosphat	38
2.10.3	Stimulation von Zellen	38
2.11	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	38
2.11.1	Isolierung von Plasmid-DNS.....	38
2.11.2	Agarosegelelektrophorese.....	39
2.11.3	Restriktionsverdau von DNS.....	40
2.11.4	Dephosphorylierung von DNS.....	40
2.11.5	Ligation von DNS-Molekülen	40
2.11.6	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien.....	41
2.11.7	Isolierung gesamtzellulärer RNS.....	41
2.11.8	Northern Blot-Analyse	41
2.11.9	cDNS Synthese aus gesamtzellulärer RNS.....	43
2.11.10	Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR.....	44
2.11.11	Realtime PCR.....	45
2.12	Computerprogramme.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Septine	47
3.1.1	Etablierung einer Realtime PCR für die Genfamilie der Septine	47
3.1.2	Induzierbarkeit der Septine in ANA-1-Makrophagen.....	48
3.2	AI451557	50
3.2.1	Charakterisierung von AI451557 und Etablierung der Realtime PCR.....	50
3.2.2	Induzierbarkeit von AI451557 in ANA-1-Makrophagen.....	51
3.2.3	<i>In vivo</i> Expression von AI451557 nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> und <i>Toxoplasma gondii</i>	52
3.2.4	Subzelluläre Lokalisation von AI451557 und Sequenzanalysen.....	54
3.3	VLIG-1 und „similar to VLIG“	57
3.3.1	Charakterisierung von „similar to VLIG“	57
3.3.2	Induzierbarkeit von VLIG-1 und „similar to VLIG“ in ANA-1-Makrophagen	57
3.3.3	<i>In vivo</i> Expression von VLIG-1 nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	61

4	Diskussion	63
4.1	Septine in der Pathogenabwehr.....	63
4.2	AI451557 – ein Pseudogen?.....	66
4.3	VLIG-1 und „ <i>similar to VLIG</i> “	68
4.4	Schlussfolgerungen.....	71
5	Literaturverzeichnis	73

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Aktivierung der IFN γ -Produktion.	6
Abb. 1.2: JAK-STAT Signalweg des IFN γ -Rezeptors.	7
Abb. 1.3: TNF/TNFR1 Signalweg.	11
Abb. 1.4: Motive der G-Domäne.	13
Abb. 1.5: Domänenstruktur der humanen Dynamin-Superfamilie.	14
Abb. 1.6: Primärstruktur der Septine.	19
Abb. 1.7: Domänenstruktur humaner und muriner Septine.	21
Abb. 3.1: Realtime-Analyse der Expression der murinen Septine.	49
Abb. 3.2: Sequenzanalyse der mRNS-Sequenz von AI451557.	51
Abb. 3.3: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von AI451557 in ANA-1-Makrophagen.	52
Abb. 3.4: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von AI451557 in a) Milz und b) Leber von mit <i>L. monocytogenes</i> infizierten Mäusen.	53
Abb. 3.5: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von AI451557 in der Milz von mit <i>T. gondii</i> infizierten Mäusen.	53
Abb. 3.6: Fusionsprotein AI451557-GFP.	54
Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Lokalisation von AI451557.	55
Abb. 3.8: Analyse der korrigierten Sequenz des ORF von AI451557.	55
Abb. 3.9: Schematische Darstellung der homologen Sequenzbereiche von VLIG und stVLIG.	57
Abb. 3.10: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von VLIG-1 und stVLIG in ANA-1-Makrophagen.	58
Abb. 3.11: PCR-Produkte der zwischen VLIG-1 und stVLIG differenzierenden PCR.	59
Abb. 3.12: Sequenzierung von VLIG-1 und stVLIG.	59
Abb. 3.13: Semiquantitative PCR-Analyse der Expression von stVLIG in ANA-1-Makrophagen.	60
Abb. 3.14: Größenbestimmung von stVLIG im Northern Blot.	61
Abb. 3.15: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von VLIG-1 in der Milz von mit <i>L. monocytogenes</i> infizierten Mäusen.	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Toll-like Rezeptoren und bekannte Liganden.....	4
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	33
Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika.....	34
Tabelle 2.3: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme.	34
Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien.	34
Tabelle 2.5: Oligonukleotide für die differenzierende PCR VLIG/ stVLIG.	35
Tabelle 2.6: Oligonukleotide für GFP-Konstrukt.	35
Tabelle 2.7: Oligonukleotide für Realtime PCR-Analysen.....	35
Tabelle 2.8: Ausgangsvektoren.	37
Tabelle 2.9: Erstelltes Plasmid.....	37

1 Einleitung

Während Millionen von Jahren der Ko-Existenz von pathogenen Organismen und ihren jeweiligen Wirten haben Letztere evolutionär ein hochkomplexes System der Pathogenabwehr entwickelt. Bei den Säugetieren besteht dieses System heute aus einer Vielzahl von Mechanismen, die es dem Organismus ermöglichen die verschiedensten Pathogene, seien es Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten, abzuwehren. Dazu müssen die Erreger zunächst erkannt und anschließend in ihrer Vermehrung gehemmt oder abgetötet werden. Dringt ein Krankheitserreger in einen Wirt ein, löst dieser eine Immunantwort durch spezialisierten Zellen, Zytokinen, Rezeptoren und Effektormechanismen aus. Hierbei kann man eine schnelle, unspezifische Abwehr durch das angeborene Immunsystem von der spezifischen Abwehr durch die erworbene Immunität unterscheiden. Die Voraussetzung für die letztere ist ein dem Organismus bekannter Erreger, sodass beim ersten Kontakt mit einem Pathogen (Erstinfektion) der Wirt zunächst unspezifisch reagieren muss. Dies erfolgt zum einen über die Aktivierung des Komplementsystems. Das Komplementsystem besteht aus mindestens 20 verschiedenen Plasmaproteinen, die sich als spezifische Proteasen kaskadenartig gegenseitig aktivieren. Das Endprodukt der Kaskade ist der lytische Komplex, der fremde Zellen durch Porenbildung abtöten kann. Andere Spaltprodukte der Komplementproteine markieren (opsonisieren) fremde Moleküle, sodass sie von Phagozyten besser erkannt werden. Außerdem lösen Bestandteile des Komplementsystems eine lokale Entzündungsreaktion aus. Das entsprechende Gebiet wird besser durchblutet, die Gefäßpermeabilität erhöht und Immunzellen angelockt. Der zweite Pfeiler der angeborenen Immunität sind spezialisierte Zellen, die körperfremde Partikel phagozytieren und/oder zerstören können. Dazu zählen Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen (DCs) und neutrophile Granulozyten. Makrophagen und DCs sind zudem in der Lage, Bestandteile der aufgenommenen Partikel (Antigene) auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und damit die Zellen des spezifischen Immunsystems (B- und T-Lymphozyten) zu aktivieren. Lymphozyten besitzen hochspezifische Rezeptoren, mit denen sie jeweils ein bestimmtes Antigen erkennen können. Wird ihnen dieses bestimmte Antigen präsentiert, vermehren sich die entsprechenden Zellen klonal und differenzieren aus. B-Lymphozyten bilden Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren. Diese Immunglobuline können an das bestimmte Antigen binden und damit dessen Phagozytose erleichtern oder das

Komplementsystem aktivieren (Opsonisierung). Zusätzlich bilden die B-Lymphozyten auch Gedächtniszellen, sodass bei einem erneuten Antigen-Kontakt das adaptive Immunsystem schneller reagieren kann. T-Lymphozyten können in verschiedene Effektorzellen differenzieren. Zytotoxische T-Zellen erkennen virusinfizierte, aber auch entartete Zellen und zerstören diese mittels zytotoxischer Proteine. T-Helferzellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen, die die zelluläre (T_H1) und humorale (T_H2) Immunantwort verstärken können. Zytokine sind lösliche Proteine, die Signale zwischen den Effektorzellen des Immunsystems vermitteln.

Durch dieses System kann der Organismus den Großteil der Pathogene, die ihn bedrohen, selbstständig abwehren. Dennoch bleiben immer Fälle, in denen die körpereigene Abwehr nicht ausreicht. Heute bestehen für viele Infektionserkrankungen wirksame Therapien mit Antibiotika, die jedoch laufend verbessert und erweitert werden müssen. Eine genaue Kenntnis der im Immunsystem wirkenden Signalwege und Effektormoleküle ist Voraussetzung für die Entwicklung von neuen wirksamen anti-infektiven Therapien.

1.1 Pathogenerkennung, Signalvermittlung und Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems

1.1.1 PAMPs und PRRs

Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es primär, Erreger zu erkennen und deren Beseitigung einzuleiten. Fremde Organismen erkennt das Immunsystem anhand von hochkonservierten Strukturmotiven oder Molekülen, den PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) (Janeway und Medzhitov, 2002). Um PAMPs zu erkennen, werden spezielle Rezeptoren benötigt, die an Teile dieser Muster binden können. Diese PRRs (*pattern recognition receptors*) sind ebenfalls genomisch konserviert und können auf Zelloberflächen oder intrazellulär vorkommen, sowie auch sezerniert werden (Medzhitov und Janeway, 1997). Zu den sezernierten PRRs gehören vor allem die sogenannten Akute-Phase-Proteine, die in der Leber gebildet werden. Das sind zum Beispiel das C-reaktive Protein (CRP), Serum-Amyloid-A und Mannan-bindendes Lektin. Sie können Bakterien für die Phagozytose opsonisieren und das Komplementsystem aktivieren (Agrawal et al., 2001; Fraser et al., 1998; Gewurz et al., 1982; Schwalbe et al. 1992). Zum Schutz vor intrazellulären Erregern agieren auch im Zytoplasma PRRs. Diese erkennen zumeist virale und/oder bakterielle Nukleinsäuren. Im Falle der Protein-

kinase R (PKR) führt die Interaktion mit einem intrazellulären Pathogen über die Aktivierung des NF- κ B- und MAP-Kinase-Signalwegs zur Bildung von antiviralen Typ I Interferonen und schließlich zum Abbruch der viralen und zellulären Proteinbiosynthese (Clemens und Elia, 1997; Williams, 1999). Kontakt mit doppelsträngiger viraler RNS aktiviert den 2'-5'-Oligoadenylat-Synthase-Signalweg (OAS), welcher zum Abbau von viraler und zellulärer RNS führt (Kumar und Carmichael, 1998). Die intrazellulären NOD-Proteine (*nucleotide-binding oligomerization domain*-Proteine) dagegen, werden durch Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane (PGN) stimuliert, was ebenfalls zur Aktivierung des NF- κ B- und MAP-Kinase-Signalwegs führt (Inohara et al., 2001; Ogura et al., 2001; Strober et al., 2006). Membranständige PRRs kommen vor allem auf Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen vor. Entsprechend der Funktion dieser Zellen führt die Bindung dieser PRRs an ihre Liganden zur Phagozytose der jeweiligen Pathogene. Zu den membranständigen PRRs gehören unter anderen der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (verschiedene Bakterien und Pilze) (Fraser et al., 1998), die Scavenger-Rezeptoren (breite Spezifität für polyanionische Liganden) (Pearson, 1996) und CD14. Letzteres bindet PGN und LPS und dient als Ko-Rezeptor für eine besonders wichtige Gruppe von PRRs, die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die neben ihrer membrangebundenen Form auch intrazellulär vorkommen. Die TLRs sind eine Gruppe von elf Proteinen, die zu dem Toll-Rezeptor der Taufliege *Drosophila* homolog sind. Der *Drosophila*-Toll-Rezeptor (dToll) wurde zunächst in seiner Funktion bei der Embryonalentwicklung der Taufliege beschrieben (Hashimoto et al., 1988). Die Ähnlichkeit der Signalwege von dToll und dem mammalischen Interleukin 1 (IL-1) führte bald zu der Annahme, dass der Toll-Rezeptor auch Funktionen im Immunsystem der Fliege haben könnte (Belvin und Anderson, 1996). Tatsächlich sind dToll-negative Individuen hochgradig suszeptibel gegenüber fungalen Infektionen (Lemaitre et al., 1996). Die TLRs interagieren mit Hilfe ihrer extrazellulären LRR-Domäne (*leucin-rich-repeats*-Domäne) mit einer Vielzahl verschiedener PAMPs, wie dem Lipopolysaccharid (LPS) von Gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäure (LTA) aus Gram-positiven Bakterien oder Nukleinsäuren von Bakterien und Viren (Akira und Takeda, 2004; Janeway und Medzhitov, 2002). In Tabelle 1.1 sind die TLR mit ihren bisher bekannten Liganden beschrieben.

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

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

Zytoplasmatisch besitzen die TLRs eine hochkonservierte Domäne, die auch dToll und der IL-1 Rezeptor zur Signalweiterleitung nutzen. Diese wird deshalb als TIR-Domäne (Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne) bezeichnet. Die Signalweiterleitung durch TIR erfolgt bei den verschiedenen TLRs entweder über das Adaptorprotein MyD88 (*myeloid*

differentiation primary-response protein) oder auch MyD88-unabhängig. Beide Varianten führen zu einer Aktivierung der immunologisch wichtigen JNK- (JUN N-terminale Kinase) und NF- κ B-Signalwege. Die Aktivierung über den MyD88-unabhängigen Weg erfolgt jedoch verlangsamt. Dafür kann zusätzlich noch der Transkriptionsfaktor IRF-3 (*interferon regulatory factor*) aktiviert und damit die Expression von Typ I Interferon induziert werden (Akira und Takeda, 2004; Kawai et al., 1999; Takeda et al., 2003). Der TIR-Signalweg hat große immunologische Bedeutung, da neben der Einleitung der Phagozytose auch die Expression einer großen Anzahl an Proteinen induziert wird. Einerseits werden direkt antimikrobielle Effektormechanismen durch reaktive Stickstoffintermediate (RNI), Defensine und antimikrobielle Peptide (AMP) aktiviert. Andererseits trägt die Induktion der verschiedensten Zytokine entscheidend zur Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort bei (Lehrer und Ganz, 2002; Takeda et al., 2003; Thoma-Uszynski et al., 2001). So bilden Makrophagen nach der Erkennung von Pathogenen über TLRs IL-12 und Chemokine. In den angelockten NK-Zellen wird dann durch IL-12 die Sekretion von IFN γ stimuliert (Schroder et al., 2004), welches seinerseits den weiteren Verlauf der Immunantwort entscheidend prägt. Des Weiteren werden DCs über TLRs zur Reifung angeregt. Diese reifen DCs wandern dann in die regionären Lymphknoten, wo sie naive T-Zellen durch Antigenpräsentation aktivieren und die adaptive Immunantwort auslösen (Banchereau und Steinman, 1998).

1.1.2 Zytokine

1.1.2.1 Interferon γ

Für die weitere Aktivierung des Immunsystems nach Kontakt von PRRs mit Pathogenen ist ein kompliziertes Zusammenspiel einer Vielzahl an Zytokinen verantwortlich. Besonders wichtige Funktionen üben hierbei die Interferone aus. Interferone (IFN) werden in zwei, strukturell nicht miteinander verwandte, Gruppen klassifiziert: IFN Typ I und II. Während zu den Typ I Interferonen vor allem IFN α und IFN β gehören, ist IFN γ der einzige Vertreter der Typ II Interferone. Beide Interferon-Klassen wurden als zelleigene Substanzen entdeckt, die die virale Replikation inhibieren können. Voraussetzung für die antivirale Aktivität der Zellen war die vorherige Inkubation mit Hitzeinaktivierten Influenza-Viren oder die Anwesenheit von stimulierten Leukozyten. Aber Interferone interagierten nicht selbst mit dem Pathogen, sondern bestimmte Proteine die unter Interferon-Einfluss exprimiert werden (Isaacs und Lindenmann, 1957;

IFNGR-1 mit JAK-1 und IFNGR-2 mit JAK-2. Bindet IFN γ an die beiden IFNGR-1-Ketten, dimerisieren diese, was über eine Konformitätsänderung die Assoziation mit den IFNGR-2-Ketten auslöst. Auf diese Weise werden die JAKs in räumliche Nähe gebracht, sodass zunächst JAK-2 durch Autophosphorylierung aktiviert wird und anschließend JAK-1 transphosphoryliert. Das aktivierte JAK-1 phosphoryliert nun spezifische Tyrosinreste der IFNGR-1-Ketten, und erzeugt damit gegenüberliegende Bindungsstellen für STAT-1-Moleküle (*signal transducers and activators of transcription*). Nach Bindung werden die beiden STAT-1-Moleküle von JAK-2 phosphoryliert. Anschließend dissoziieren diese vom Rezeptor und bilden Homodimere, die auch als GAFs (*gamma-interferon activation factor*) bezeichnet werden. Nach Translokation in den Nukleus binden die GAFs an spezifische GAS- (*gamma activated site*) und ISRE- (*interferon stimulated response element*) Konsensussequenzen (JAK-STAT-Signalweg siehe Abb. 1.2) (Schroder et al., 2004).

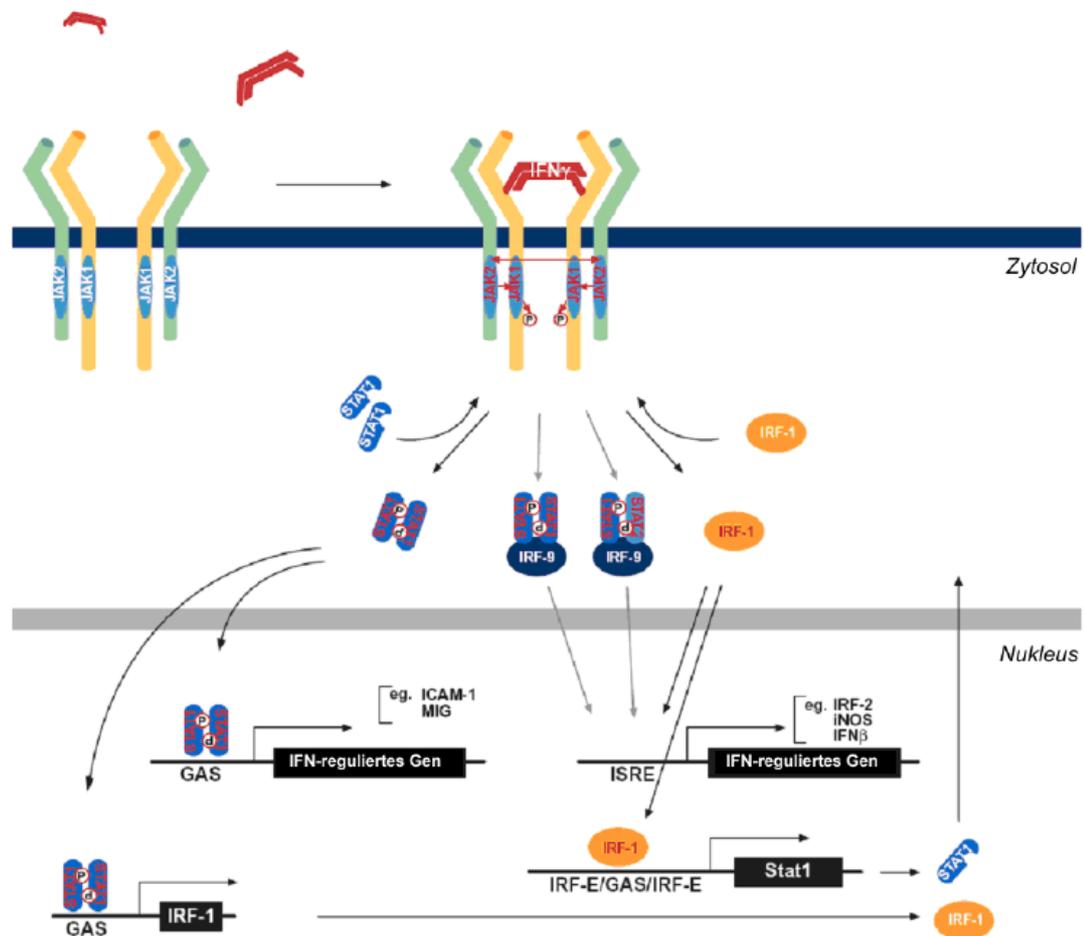


Abb. 1.2: JAK-STAT Signalweg des IFN γ -Rezeptors. Abbildung nach Schroder et al., 2004.

Dadurch sind sie in der Lage die Transkription einer Vielzahl von Genen zu regulieren (Schroder et al., 2004). Die auf diese Weise durch GAF direkt induzierten Gene werden als primär-responsiv bezeichnet. Sekundär-responsive Gene benötigen die Stimulation durch einen weiteren Transkriptionsfaktor, wie zum Beispiel das primär-responsive Protein IRF-1 (Kerr und Stark, 1991). Der JAK-STAT-Signalweg wird in modifizierter Form von mehr als 50 Mitgliedern der Zytokin-Superfamilie genutzt (Ihle, 1996). Im Signalweg der Typ I Interferone wird dabei statt der GAFs ein heterotrimerer Transkriptionsfaktor aus STAT-1, STAT-2 und IRF-9 gebildet, der ISGF-3 (*interferon stimulated gene factor*) genannt wird. ISGF-3 wird jedoch in beschränktem Umfang auch durch IFN γ -Stimulation gebildet. Umgekehrt entstehen auch nach Aktivierung des IFN α Rezeptors STAT-1-Homodimere. Diese Verschränkung der Interferon-Signalwege erklärt den überlappenden Effekt den Typ I und Typ II Interferon in der Pathogenabwehr zeigen (Matsumoto et al., 1999).

Sowohl die Bildung von IFN γ , als auch dessen Wirkung, unterliegen einer Negativ-Regulation um überschießende Immunantworten zu vermeiden. IL-4, IL-10, TGF- β (*transforming growth factor*) sowie Glucokortikoide inhibieren die Bildung von IFN γ (Boehm et al., 1997). Um die IFN γ -vermittelte Signalkaskade zu unterbrechen, existieren verschiedene Mechanismen. Zum einen wird nach Bindung des Liganden der IFNGR/IFN γ -Komplex internalisiert und degradiert. Wird dabei nur der Ligand abgebaut, kann der Rezeptor anschließend wieder zur Membran transloziert werden. Wird jedoch der komplette Rezeptor degradiert, führt der quantitative Rückgang von membranständigen IFNGRs zu einer verminderten Responsivität der Zelle gegenüber IFN γ (Celada und Schreiber, 1987; Farrar und Schreiber, 1993; Schroder et al., 2004). Weiterhin werden durch IFN γ selbst verschiedene Proteine aktiviert, die die Signalweiterleitung hemmen. SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) assoziieren mit den JAKs und blockieren die Weiterleitung des Signals (Zhang et al., 1999). Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 (*SH2-domain-containing tyrosine phosphatase*) und SHP-2 dephosphorylieren den IFNGR und die JAKs, wodurch diese wieder inaktiviert werden (Haque et al., 1997; You et al., 1999). Und schließlich werden durch IFN γ auch sekundäre Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel IRF-2) induziert, die als kompetitive Antagonisten für IRF-1 und ISGF-3 fungieren (Harada et al., 1994).

Da IFN γ , als eines der zentralen Moleküle der Immunabwehr, wahrscheinlich die Expression von mehreren hundert Proteinen beeinflusst, sind seine zellulären Effekte

äußerst komplex. Dabei sind wichtige Funktionen sowohl der angeborenen, als auch der erworbenen Immunität von IFN γ abhängig. IFN γ koordiniert unter anderem den Übergang zur spezifischen Immunität. Es reguliert die Expression verschiedener Chemokine, verbessert die Antigenpräsentation durch MHC Klasse I und II, verschiebt die CD4 $^+$ T-Zellimmunität in Richtung proinflammatorischer T $_H$ 1-Antwort und vermittelt den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG zur Etablierung einer bleibende Immunität (Schroder et al., 2004). Des Weiteren fördert IFN γ auch antivirale Resistenzprogramme, indem es die intrazellulären PRRs PKR und OAS induziert, sowie über die dsRNA-spezifische Adenosin-Deaminase die Synthese funktioneller viraler Proteine verhindert (Boehm et al., 1997). Auch die IFN γ -induzierten guanylatbindenden Proteine (siehe unten) haben antivirale Wirkung (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). In Makrophagen induziert IFN γ vielfältige antimikrobielle Effektormechanismen. Aktivierte Makrophagen zeigen verbesserte Antigenpräsentation, exprimieren vermehrt Rezeptoren, die die Phagozytose von Pathogenen vermitteln und reagieren verstärkt auf andere proinflammatorische Zytokine wie TNF α . Durch erhöhte mikrobizide Aktivität können Erreger schneller abgetötet werden. Hierzu erleichtert IFN γ einerseits die Fusion der Phagosomen mit Lysosomen, deren Enzyme Mikroben abtöten können. Andererseits werden durch Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und der NADPH-Oxidase Phox (**Phagozyten-Oxidase**) vermehrt reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate (ROI und RNI) synthetisiert. ROI und RNI sind aggressive chemische Moleküle, die zur schnellen und effektiven Zerstörung des Pathogens führen. Im Zuge einer lokalen Gewebedestruktion können durch ROI und RNI auch größere Erreger, wie z. B. Parasiten, zerstört werden, deren Phagozytose unmöglich ist (Janeway et al., 2005; Nathan und Shiloh, 2000). Beide Moleküle sind für die Erregerabwehr von großer Bedeutung. Mäuse, denen sowohl iNOS als auch Phox fehlen, erliegen spontanen Infektionen durch fakultativ-pathogene Mikroorganismen. Dagegen entwickeln Tiere, die nur den Defekt eines Systems aufweisen, nur selten spontane Infektionen, sind aber für verschiedene nicht-kommensale Erreger empfindlich (Nathan und Shiloh, 2000). Die iNOS hat wichtige Funktionen bei der Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* und einigen Viren. Dagegen erliegen Mäuse mit Defekten der Phox Infektionen mit *Salmonella typhimurium* und *Staphylococcus aureus*. Bei der Abwehr von *Listeria monocytogenes* werden sowohl iNOS als auch Phox aktiviert (Bogdan et al., 2000; Jackson et al., 1995; Nathan, 1997; Nathan und Shiloh, 2000). Ein weiteres IFN γ -

induziertes antimikrobielles Effektorsystem stellt die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) dar. Expression der IDO führt zur Tryptophan-Depletion, was ebenfalls antibakterielle und antiparasitäre Wirkung hat. Dazu gehört die Abwehr von *T. gondii*, *C. pneumoniae* und β -hämolisierenden Streptokokken (Däubener und MacKenzie, 1999).

1.1.2.2 Die TNF/TNFR-Superfamilie

Der Tumornekrosefaktor α (TNF α) ist ein weiteres wichtiges proinflammatorisches Zytokin. Es gehört zu einer großen Gruppe von verwandten Proteinen, die TNF-Superfamilie genannt wird. Diese Zytokine sind in der Regel membranständige Homotrimere, die aber teilweise auch in einer löslichen Form vorliegen können (Idriss und Naismith, 2000; Peschon et al., 1998). Die Zytokine der TNF-Superfamilie binden an eine Gruppe von membranständigen, löslichen oder sogar intrazellulären Rezeptor-Proteinen – die Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-Superfamilie) (Hehlgans und Mannel, 2002; Seitz et al., 2001; Smith et al., 1994). Das charakteristische Sequenzmotiv dieser Gruppe sind die Cystein-reichen Domänen, die bei den verschiedenen Rezeptoren in unterschiedlicher Menge vorliegen (Smith et al., 1994). Die meisten Mitglieder der TNF-Superfamilie interagieren mit mehreren Rezeptoren, wobei fast jedes Ligand-Rezeptor-Paar der TNF/TNFR-Superfamilie eigene, nicht-redundante Funktionen ausübt (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Die TNFR lassen sich, entsprechend ihres Signalwegs, in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe (der unter anderem FAS und TNFR1 angehören) enthält sogenannte *death domains* (DD), die nach Liganden-Bindung intrazelluläre Adaptorproteine rekrutieren. Diese Adaptorproteine – zum Beispiel FADD (*FAS-associated death domain*) oder TRADD (*TNFR-associated death domain*) – aktivieren die Kaspase-Kaskade, welche die Apoptose der Zelle auslöst (Chinnaiyan et al., 1996; Kischkel et al., 2000). TRADD interagiert allerdings gleichzeitig mit TRAF-Proteinen (*TNFR-associated factor*) und RIP (*receptor interacting protein*), was zur Aktivierung der NF κ B- und JNK-Signalwege und damit der Induktion von Apoptose-inhibierenden Genen führt (siehe Abb. 1.3). TNFR1 induziert somit nur bei fehlender Proteinsynthese Apoptose (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Die zweite Gruppe der TNFR (unter anderem TNFR2) rekrutiert nach Aktivierung TRAF-Proteine mittels eines TRAF-interagierenden Motivs (TIM), die dann die NF κ B-, JNK-, p38-, ERK- (*extracellular signal-related kinase*) und PI3K- (*phosphoinositide-3-kinase*) Signalwege aktivieren (Dempsey et al., 2003). Die letzte Gruppe induziert keinen Signalweg, sondern

konkurriert mit den Signal-transduzierenden Rezeptoren um deren Liganden und reguliert so deren Aktivität (Hehlgans und Pfeffer, 2005).

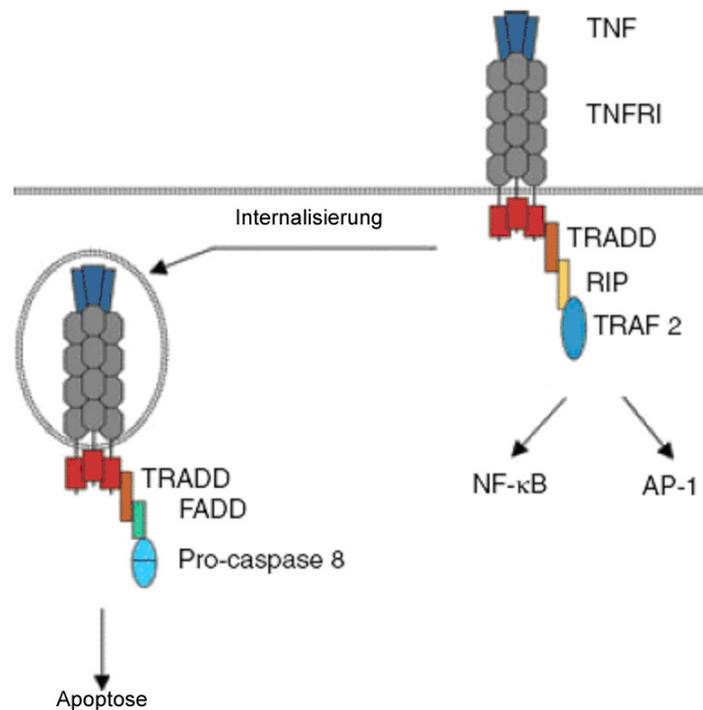


Abb. 1.3: TNF/TNFR1 Signalweg. Abbildung nach Hehlgans und Pfeffer, 2005.

Die TNF/TNFR-Superfamilie hat herausragende Bedeutung bei Entzündungsreaktionen und Immunität sowie in der Organogenese lymphatischer Gewebe. Dieser Einfluss ist in der Regel für den Organismus vorteilhaft. Einzelne Mitglieder der Superfamilie sind allerdings auch an überschießenden Immunreaktionen im Rahmen von Sepsis und Autoimmunerkrankungen beteiligt (Hehlgans und Pfeffer, 2005). TNF α war einer der ersten Liganden der TNF/TNFR-Superfamilie, der beschrieben wurde, und bindet TNFR1 und TNFR2. Defekte im TNF α -Signalweg haben gravierende Folgen für die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. TNFR1-defiziente Mäuse sind hochsuszeptibel gegenüber Infektionen mit intrazellulären Erregern wie *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *M. avium* und *S. typhimurium* (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Diese Tiere sind trotz funktioneller iNOS und Phox nicht in der Lage, die intrazelluläre Vermehrung von *L. monocytogenes* in Phagozyten zu kontrollieren (Endres et al., 1997). Von besonderer klinischer Bedeutung ist die anti-mykobakterielle Wirkung von TNF α , da die Behandlung von Autoimmunerkrankungen mittels TNF α -Blockern das Risiko erhöht, an Tuberkulose zu erkranken. TNF α fördert sowohl die Differenzierung von T-Lymphozyten zu proinflammatorischen T_H1-Zellen, als auch die Bildung von Granu-

lomen (Ehlers, 2003). Für letzteres ist zunächst die Induktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen von Bedeutung, die die Einwanderung von Immunzellen, vor allem Makrophagen, bewirken (Roach et al., 2002). Des Weiteren entwickeln diese, insbesondere bei gemeinsamer Aktivierung durch TNF α und INF γ , deutlich gesteigerte Phagozytoseaktivität und Mykobakterizidie (Bekker et al., 2001). Auch für die antiparasitäre Immunität ist TNF α von Bedeutung. TNFR1-defiziente Mäuse zeigen erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit *L. major*, *Trypanosoma cruzi* oder *T. gondii* (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Wie bereits erwähnt, ist TNF α auch an der Einleitung von Entzündungsreaktionen beteiligt. Es gilt als einer der bedeutendsten inflammatorischen Mediatoren und initiiert durch Induktion von Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren Effektormechanismen der unspezifischen Immunität (Idriss und Naismith, 2000). Neben den positiven Effekten auf die Pathogenabwehr führt diese proinflammatorische Wirkung auch zu überschießenden und damit schädlichen Reaktionen des Immunsystems. Bisher konnte TNF α mit autoimmunologischen Phänomenen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie der Entstehung von Sepsis und Fieber in Verbindung gebracht werden (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Im Falle der Autoimmunerkrankungen werden TNF α -Blocker dementsprechend als Therapeutika eingesetzt. Experimentell konnte bei Affen durch die Gabe von TNF α -Antikörpern eine Sepsis durch Infusion von *Escherichia coli* und LPS verhindert werden (Tracey et al., 1987).

1.2 GTPasen

Zu den IFN-abhängigen Proteinen gehören auch einige GTPasen-Familien. Guanosin-5'-Triphosphat-bindende Proteine (GTPasen) können zyklisch GTP binden und hydrolysieren, wodurch sich ihr Aktivitätszustand ändert. Bei den meisten GTPasen verläuft dieser Zyklus wie folgt: Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP ist das Protein inaktiviert. Dieser Vorgang wird durch GAPs (*GTPase activating proteins*) beschleunigt. Der anschließende Austausch von GDP mit GTP führt hingegen zur Aktivierung und wird durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) gefördert (Bourne, 1995; Bourne et al., 1991). Die konservierte GTP-bindende Domäne (G-Domäne) der Gruppe enthält fünf typische Motive (G1–G5, Abb. 1.4). Das G1 Motiv (GxxxxGKS) bildet den sogenannten „p-loop“ (*phosphate-binding loop*), der mit den α - und β -Phosphaten der Nukleotide interagiert. Das G2 Motiv (ein konserviertes Threonin) koordiniert die Bindung an Mg $^{2+}$

und bindet die γ -Phosphate. Es ist nur in einzelnen Untergruppen der p-loop GTPasen konserviert. G3 besteht aus mehreren hydrophoben Aminosäuren (AS), die von einem DxxG Konsensus gefolgt werden. Dieses Motiv bindet Mg^{2+} und interagiert mit den β - und γ -Phosphaten von GTP. G2 und G3 sind sogenannte „Schalter“, die in Folge der Hydrolyse von GTP Konformationsänderungen bewirken. Das G4 Motiv (N/TKxD) ist wichtig für die Spezifität der GTP-Bindung und findet sich wie das G5 Motiv (SAL/K) nicht bei allen Mitgliedern der p-loop GTPasen-Familie. G5 interagiert mit dem Guanin (Bourne et al., 1991; Saraste et al., 1990).

	G1 (P-loop)	G3 und Schalter II	G4
Dynamamin1	I A V V G G Q S A G K E S V L E N F V G	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
DLP1	I V V V G T Q S S G K E S V L E S L V G	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
MxA	I A V I G D Q S S G K E S V L E A L S G	L I D L P G I T R V	I L T K P D L
OPA1	V V V V G D Q S A G K E S V L E M I A Q	L V D L P G V I N T	V L T K V D L
Mitofusin1	V A F F G R T S S G K E S V I N A M L W	L V D S P G T D V T	L N N R W D A
GBP1	V A I V G L Y R T G K E Y L M N K L A G	L L D T E G L G D V	V W T L R D F
Atlastin1	V S V A G A F R K G K E F L M D F M L R	L M D T Q G T F D S	I F L V R D W
IIGP1	V A V T G E T G S G K E S F I N T L R G	F W D L P G I G S T	V R T K V D S
p21 Ras	L V V V G A G G V G K E A L T I Q L I Q	I L D T A G Q E E	V G N K C D L
SEPT2	L M V V G E S G L G K E T L I N S L F L	V V D T P G Y G D A	V I A K A D T
Konsensus	GxxxxGKS T	DxxG	NKxD T A

Abb. 1.4: Motive der G-Domäne. Abbildung bearbeitet nach Praefke und McMahon, 2004.

Leipe et al. entwickelten 2002 eine heute gängige Klassifikation der p-loop GTPasen. Die Gruppe setzt sich demnach aus zwei Untergruppen zusammen: die TRAFAC (*translation factors*) und die SIMIBI (*signal recognition particle, MInD, BioD*). Strukturell zeigen die TRAFAC ein sechssträngiges β -Faltblatt mit einem antiparallelen zweiten Strang, während das der SIMIBI siebensträngig und rein parallel angeordnet ist (Leipe et al., 2002). Die Nukleotidaffinität ist bei den meisten TRAFAC-GTPasen eher hoch (pico- bis nanomolare Dissoziationskonstante), bei den SIMIBI niedrig (micromolare Dissoziationskonstante) (Gasper et al., 2008). Zu den TRAFAC gehören, neben den in dieser Arbeit untersuchten Septinen, auch die Ras-Superfamilie, die α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine, die Dynamamin-Superfamilie, die p47 GTPasen – auch IRGs (*immunity related GTPases*) genannt – und die ATPasen Myosin und Kinesin (Leipe et al., 2002).

1.2.1 Die p65 GTPasen

Die Interferon-induzierten p65 GTPasen – auch Guanlylatbindenden Proteine (GBPs) genannt – gehören zur Dynamin-Superfamilie (Praefcke und McMahon, 2004). Die Dynamine werden, zur Abgrenzung von den kleinen Ras-ähnlichen GTPasen, große GTPasen genannt. Von den fünf typischen Motiven der G-Domäne, finden sich bei den Dynaminen G1–G4, wobei G4 bei den GBPs nur teilweise konserviert ist (RD statt N/TKxD). Darüber hinaus finden sich bei den GBPs und Mx-Proteinen noch eine mittlere Domäne, die eine Rolle bei der Selbstassemblierung spielt, sowie eine konservierte GTPase-Effektor-Domäne (Praefcke und McMahon, 2004). In Abb. 1.5 ist die Domänenstruktur der humanen Dynamine dargestellt.

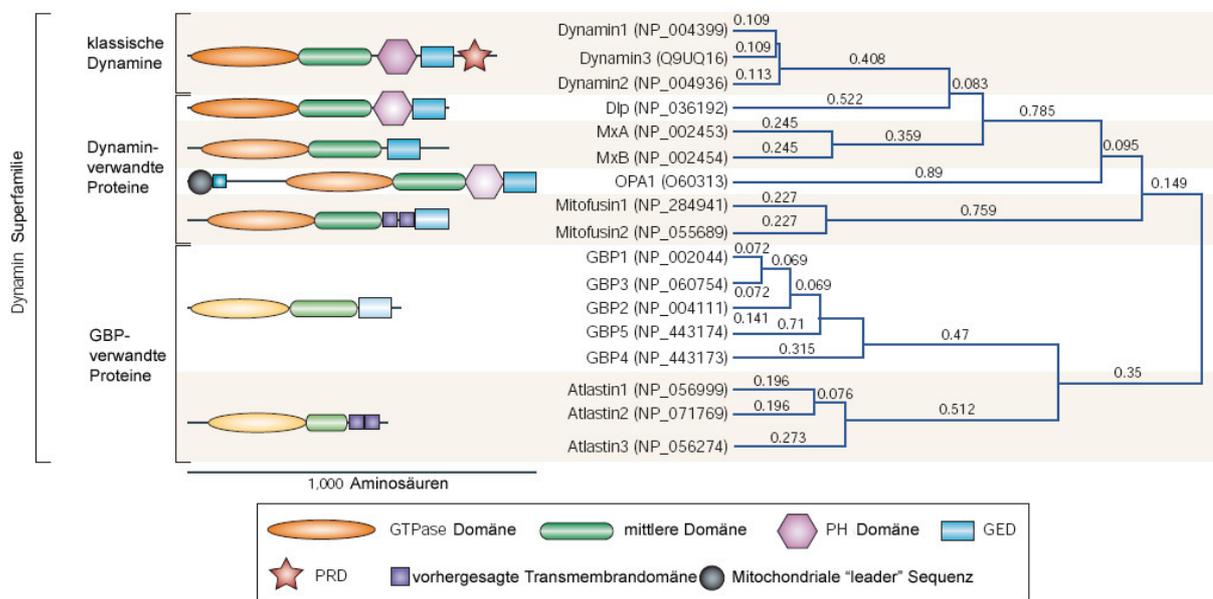


Abb. 1.5: Domänenstruktur der humanen Dynamin-Superfamilie. GED = GTPase-Effektor-Domäne, PH-Domäne =pleckstrin homology-Domänen, PRD = Prolin-reiche Domäne. Bearbeitet nach Praefcke und McMahon, 2004.

Die Dynamine weisen, im Gegensatz zu den anderen TRAFAC GTPasen, eine niedrige Nukleotidaffinität auf. Die relativ hohe Hydrolyserate wird durch Oligomerisierung noch gesteigert, wodurch die Dynamine keine GAPs benötigen (Tuma und Collins, 1994). Die Hydrolyse von GTP bewirkt eine Konformitätsänderung der GTPase, woraufhin diese mechano-chemisch auf ihren Interaktionspartner einwirkt (Danino und Hinshaw, 2001; Warnock und Schmid, 1996).

Die GBPs gehören zu den ersten Proteinen, die in IFN γ -stimulierten Fibroblasten identifiziert wurden (Gupta et al., 1979). Von den in verschiedenen Säugetierspezies konservierten Proteinen sind mittlerweile 7 humane (hGBPs) und 11 murine GBPs

(mGBPs) bekannt (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008; Olszewski et al., 2006). Die G-Domäne enthält die Motive G1 und G3, sowie G4 in modifizierter Form mit dem nicht-kanonischen Motiv RD. Dies führt womöglich zu einer veränderten Struktur der G-Domäne, sodass die GBPs die einzigen bisher bekannten GTPasen sind, die nicht nur GTP zu GDP hydrolysieren können, sondern auch GDP zu GMP. Dabei binden sie alle Guanin-Nukleotide mit nahezu identischer Affinität (Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1985; Cheng et al., 1991; Praefcke et al., 1999; Schwemmle und Staeheli, 1994). Neben den weiteren typischen Dynamin-Domänen findet sich C-terminal bei manchen GBPs ein Isoprenylierungsmotiv (CaaX-Sequenz), das für die subzelluläre Lokalisation entscheidend ist. mGBP2, welches post-translational isoprenyliert wurde, bildet im Gegensatz zu nicht-isoprenyliertem vesikuläre, zytoplasmatische Strukturen (Han et al., 1998; Vestal et al., 2000). Alle GBPs werden besonders stark durch IFN γ , teilweise auch durch Typ I IFN induziert (Degrandi et al., 2007). Die Induktion durch IFN γ erfolgt zumindest bei einigen GBPs IRF-1 abhängig als sekundäre Antwort (Briken et al., 1995). Andere GBPs (z. B. mGBP7) werden primär-responsiv induziert (Degrandi et al., 2007). Die TLR-Liganden LPS und LTA führen nur bei mGBP6/10 (LPS und LTA) und mGBP2 (nur LPS) zur gesteigerten Expression (Degrandi et al., 2007).

Die GBPs haben offensichtlich wichtige immunologische Funktionen bei der Abwehr von pathogenen Viren, Bakterien und Protozoen. So konnte bisher gezeigt werden, dass hGBP1 und mGBP2 antivirale Resistenz gegen VSV (*vesicular stomatitis virus*) und EMCV (*encephalomyocarditis virus*) vermitteln (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Hinweise auf eine antibakterielle Aktivität finden sich bei Expressionsstudien in Milz- und Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen. Hier waren alle untersuchten mGBPs 24 h p.i. (*post infection*) verstärkt exprimiert. Auch nach Infektion mit *T. gondii* konnte in Lungengewebe eine Induktion von mGBPs nachgewiesen werden. *In vitro* ko-lokalisieren die meisten mGBPs nach Infektion der Zellen mit *T. gondii* mit der parasitophoren Vakuole (PV) (Degrandi et al., 2007). Weiterhin zeigen Studien an einzelnen GBPs einen regulierenden Einfluss auf die Zellproliferation. So führt Überexpression von hGBP1 in humanen Endothelzellen – wie deren Stimulation mit IFN γ , TNF α oder IL-1 β – zur Inhibition des Zellwachstums (Guenzi et al., 2001). mGBP2 dagegen induziert in murinen Fibroblasten – ebenfalls analog zur Wirkung von IFN γ – eine gesteigerter Proliferation (Gorbacheva et al., 2002). Nicht für alle Funktionen ist die Guanylat-Bindung Voraussetzung. So inhibiert hGBP1 unabhängig von seiner Fähigkeit

zur GTP-Bindung die Zellproliferation (Guenzi et al., 2001). Die antiviralen und proliferativen Funktionen dagegen erfolgen in Abhängigkeit von der GTP-Bindung (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005; Gorbacheva et al., 2002).

1.2.2 Die p47-GTPasen

Auch die IRGs gehören zu den IFN γ -induzierten GTPasen. Dass auch Typ I Interferone und LPS leichte Expressionssteigerung bewirken, beruht wahrscheinlich auf einer sekundären Induktion durch gesteigerte IFN γ Produktion (Lapaque et al., 2006; Zerrahn et al., 2002). Bisher konnten 23 funktionale murine IRGs mit einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa identifiziert werden, von denen 6 bereits näher beschrieben wurden. Obwohl die IRGs in anderen Vertebraten ebenfalls weit verbreitet sind, fehlen sie fast gänzlich bei Primaten. Es existiert ein humanes Protein, das allerdings nicht IFN γ -induzierbar ist (Bekpen et al., 2005). Die IRGs besitzen die G-Domänen-Motive G1, G3 und G4, wobei bei drei Mitgliedern der Proteinfamilie (LRG-47/Irgm1, GTPI/Irgm2 und IGTP/Irgm3) G1 modifiziert ist (GxxxxGMS statt GxxxxGKS) (Boehm et al., 1998). Dennoch zeigen beide Subfamilien GTPase-Aktivität (Carlow et al., 1998; Taylor et al., 1996). Die IRGs lokalisieren an unterschiedlichen zellulären Membransystemen, wie dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum (Martens und Howard, 2006). Nach Infektion mit intrazellulären Erregern können die IRGs jedoch zu den pathogenhaltigen Strukturen rekrutiert werden. So gelangen alle IRGs (außer LRG-47) in mit *T. gondii* infizierten Zellen zur PV (Martens et al., 2005). LRG-47 dagegen transloziert in Makrophagen zu mykobakterienhaltigen Phagosomen (MacMicking et al., 2003). Dementsprechend zeigen die IRGs diverse Funktionen bei der Pathogenabwehr. Mäuse, denen IGTP, LRG-47 oder IRG-47 fehlt, sind verstärkt suszeptibel gegenüber einer Infektion mit *T. gondii*. Zusätzlich verlieren LRG-47 defiziente Mäuse ihre Resistenz gegenüber den Bakterien *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *L. monocytogenes* und *S. typhimurium*, sowie den Protozoen *L. major* und *T. cruzi* (MacMicking, 2005; Martens und Howard, 2006; Taylor et al., 2004). Antivirale Aktivität konnte bisher nur in geringem Ausmaß für IGTP/Irgb6 und GTPI gezeigt werden. Überexprimierende Zellen zeigen eine verbesserte Resistenz gegenüber VSV und Coxsackie Viren (Carlow et al., 1998; Zhang et al., 2003).

1.2.3 Die VLIGs

Die VLIGs (*very large inducible GTPases*) ist die bisher zuletzt beschriebene Familie der IFN-induzierbaren GTPasen. In der Maus konnten bisher mindestens neun exprimierte Gene identifiziert werden, von denen das längste eine mRNA-Sequenz von fast 9 kb aufweist. Dieses Protein wurde als Prototyp der Familie bereits genauer charakterisiert und wird als VLIG-1/Klon-A bezeichnet. VLIG-1 hat ein Molekulargewicht von 280 kDa und enthält die kanonischen GTP-Bindungsmotive G1, G3 und G4 (Klamp et al., 2003). Dies ist jedoch die einzige Homologie zu den anderen GTPasen-Familien. In der 5'-flankierenden Sequenz von VLIG-1 Exon 1 befinden sich mehrere Promotormotive, die potenziell von IFN γ -abhängigen Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Es existieren vermutlich mehrere Isoformen von VLIG-1, die eine identische CDS, jedoch unterschiedliche 5'- und/oder 3'-UTRs besitzen. Auch in anderen Vertebraten einschließlich des Menschen konnten zu VLIG-1 sequenzverwandte Gene identifiziert werden. Die möglichen Transkripte sind typischerweise ebenfalls sehr groß und enthalten die GTP-Bindungsmotive (Klamp et al., 2003). VLIG-1 wird in Lebergewebe von Listerien-infizierten Wt-Mäusen massiv induziert, während die Induktion in infizierten IFNGR $^{-/-}$ -knockout-Mäusen ausbleibt. Dementsprechend zeigte sich auch bei Expressionsanalysen mit ANA-1-Makrophagen eine ausgeprägte Hochregulation nach Stimulation mit IFN γ . Durch TNF α wird die VLIG-1 Expression nur äußerst gering induziert. Dabei kann VLIG-1 als gemischtes IFN γ -Antwortgen klassifiziert werden, das sowohl von primären, als auch von sekundären Transkriptionsfaktoren induziert werden kann. Im Gegensatz dazu erscheinen die weiteren bisher identifizierten VLIGs nicht durch IFN γ induzierbar (Klamp et al., 2003). VLIG-1 zeigt eine Bindungspräferenz für GDP, gefolgt von GTP und GMP. In Western Blot-Analysen konnten, vor allem nach Stimulation mit IFN γ , durch zwei verschiedene Antiseren (VLIG-1/B: AS 270–541; VLIG-1/218: AS 9–24 + 1036–1050) auch andere Polypeptide (mit einem zum Teil deutlich kleineren Molekulargewicht) identifiziert werden. Teilweise stellen diese wohl Abbauprodukte von VLIG-1 dar. Es wurde aber auch vermutet, dass es sich um kleinere Proteine handelt („VLIG-ähnlich“), die ebenfalls von den Antiseren detektiert werden. Subzellulär lokalisieren VLIG-1 sowie ein VLIG-ähnliches Protein überwiegend im Zytoplasma mit abnehmender Intensität vom Nukleus zur Zellmembran, können jedoch bei starker Überexpression auch nukleär lokalisiert sein. In beiden Fällen bildet VLIG-1 kleine granuläre Strukturen (Klamp et al., 2003).

1.2.4 Die Septine

Die Septine sind eine Gruppe konservierter GTP-bindender Proteine, die zuerst in der Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* als Teil des Septums zwischen sich teilenden Zellen beschrieben wurden (Hartwell, 1971). Sie sind jedoch auch im Genom vieler höherer Spezies erhalten – von Insekten und Würmern bis zu den Säugetieren (Kinoshita, 2003). Septine bilden parallele Filamente, die sich anschließend zu Ringen oder Manschetten zusammenlagern (Byers und Goetsch, 1976; Fares et al., 1995; Frazier et al., 1998; Kinoshita et al., 1997). Diese Filamente assoziieren mit Anteilen des Zytoskeletts (Finger, 2002; Kinoshita et al., 1997; Nagata et al., 2003; Surka et al., 2002) und haben Funktionen während der Zytokinese (Gladfelter et al., 2001; Hartwell et al., 1974; Kinoshita et al., 1997; Kinoshita und Noda, 2001), der Aufrechterhaltung der Zellpolarität (Barral et al., 2000; Drees et al., 2001; Faty et al., 2002; Irazoqui und Lew, 2004), der Zellmigration (Finger et al., 2003), des Vesikel-Transports (Hsu et al., 1998), der Exozytose (Beites et al., 1999) und der Apoptose (Larisch et al., 2000). Die humanen Septine spielen nach heutigen Erkenntnissen eine Rolle in der Tumorentstehung (Borkhardt et al., 2001; Kalikin et al., 2000; Osaka et al., 1999; Russell et al., 2000), bei neurodegenerativen Erkrankungen (Ihara et al., 2003; Kinoshita et al., 1998; Zhang et al., 2000) sowie bei Infektionen durch intrazelluläre Erreger (Huang et al., 2008; Mostowy et al., 2009a).

Die Primärstruktur der Septine ist in allen Eukaryonten hochkonserviert (Kinoshita, 2003). Die G-Domäne enthält auch bei den Septinen die Motive G1, G3 und G4 (Bourne et al., 1991) (siehe Abb. 1.4). Als weitere konservierte Sequenzbereiche finden sich N-terminal der G-Domäne eine polybasische Sequenz, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) bindet (Zhang et al., 1999), sowie C-terminal, eine für die Septine typische, einzigartige Sequenz, deren Funktion bislang nicht bekannt ist (Versele und Thorner, 2007). Ferner besitzen die meisten Septine nahe des C-Terminus eine „*coiled-coil*“-Domäne (cc-Domäne), die für einen Teil der Septin-Septin Interaktionen verantwortlich ist. Der N-Terminus der Septine ist in Länge und Sequenz äußerst variabel (Versele et al., 2004). Die konservierte Primärstruktur der Septine ist in Abb. 1.6 dargestellt.

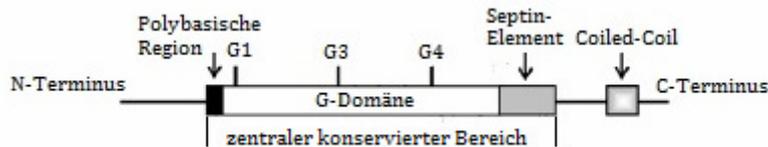


Abb. 1.6: Primärstruktur der Septine. Abbildung bearbeitet nach Pan et al., 2007.

1.2.4.1 Septine in *Saccharomyces cerevisiae*

Die ersten Daten zur Entdeckung der Septine veröffentlichten Hartwell et al. 1971. Sie untersuchten temperatursensitive Mutanten von *S. cerevisiae*, die Defekte des Zellzykluses (*cell division cycle*; CDC) zeigten. Unter den in diesen Zellen identifizierten Genen waren die ersten beschriebenen Septine (CDC3, CDC10, CDC11 und CDC12). Mutationen in irgendeinem dieser Gene führten zum Ausbleiben der Zellteilung, während Knospenbildung, DNS-Synthese und Kernteilung unvermindert fortschritten, sodass sich große, mehrkernige Zellen mit multiplen, verlängerten Teilungsknospen bildeten (Hartwell, 1971; Hartwell et al., 1974). Die Septinfilamente lagern sich ringförmig um den Hals der Sprossknospe (Byers und Goetsch, 1976; Field und Kellogg, 1999; Haarer und Pringle, 1987; Kim et al., 1991; Longtine et al., 1996) und bilden eine Manschette aus seitlich aneinandergelagerten Filamenten mit periodischen Quervernetzungen (Field et al., 1996; Frazier et al., 1998; Vrabioiu und Mitchison, 2006). Gegen Ende der Teilung von Mutter- und Tochter-Zelle drehen sich die Filamente um 90° und bilden zwei Ringe, zwischen denen sich das Septum formiert (Vrabioiu und Mitchison, 2006). Für die korrekte Lokalisation der Septine an der Sprosstelle ist Phosphatidylinositol-4-Phosphat nötig. An dieses Membran-Phospholipid bindet Cdc11 mittels der kurzen polybasischen Region N-terminal der G-Domäne (Casamayor und Snyder, 2003). Während der Sprossung haben die Septin-Polymere verschiedene Funktionen. So dienen sie verschiedenen anderen Proteinen als eine Art Gerüst, das deren korrekte Lokalisation und Assoziation regelt (Carroll et al., 1998; Holly und Blumer, 1999; Lee et al., 1999), da der Septin-Ring schon kurz vor dem Beginn der Zellteilung den Ort markiert, an dem sich kurz darauf die Knospe bildet (Faty et al., 2002; Irazoqui und Lew, 2004). Mittlerweile sind mindestens 21 solcher Proteine bekannt, deren Lokalisation durch Septine beeinflusst wird (Versele und Thorner, 2007). Die Rekrutierung der Septine zur designierten Sprosstelle wird durch die kleine GTPase Cdc42p mittels mehrerer Zyklen der GTP-Bindung und Hydrolyse reguliert. Cdc42p bewirkt durch Aktin-Polarisation und Aktivierung der Transkription die Einleitung der Zellteilung (Gladfelter et al., 2002).

Eine weitere Funktion der Hefe-Septine ist offensichtlich die Aufrechterhaltung einer Diffusionsbarriere zwischen Mutter- und Tochter-Zelle. Diese verhindert, dass bestimmte membran-assoziierte Proteine (z. B. der Exozyst- und der Polarisom-Komplex (Finger und Novick, 1997), die ihre spezifischen Funktionen nur in der Knopse erfüllen sollen, in den Kortex der Mutterzelle zurückwandern (Barral et al., 2000). Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 benötigen die GTP-Bindung für die korrekte Lokalisation und Komplex-Bildung (Nagaraj et al., 2008).

1.2.4.2 Septine in höheren Lebewesen

Obwohl sich die Zytokinese tierischer Zellen deutlich von der Sprossung bei Hefen unterscheidet, übernehmen Septine auch in Metazoen Funktionen bei der Zellvermehrung und lokalisieren an der Teilungsfurche (Longtine et al., 1996; Neufeld und Rubin, 1994; Nguyen et al., 2000). Auch hier liegen die Septine als Filamente vor (Fares et al., 1995; Finger et al., 2003). Das erste in *Drosophila melanogaster* entdeckte Septin wurde „Pnut“ genannt. Von den fünf bekannten Septinen der Fruchtfliege (Pnut, Sep1, Sep2, Sep4, und Sep5 [Fares et al., 1995; Field et al., 1996; Field und Kellogg, 1999; Kinoshita, 2003; Longtine et al., 1996; Neufeld und Rubin, 1994]) befinden sich Pnut und Sep1 während der Anaphase ebenfalls an der Teilungsfurche, lokalisieren aber auch in Neuronen, dem embryonalen Cortex und im Leitsaum der Epithelzellen während der Zellmigration (Fares et al., 1995; Neufeld und Rubin, 1994). *In vitro* bilden auch die *Drosophila*-Septine Filamente, die aus Heterotrimeren von Homodimeren (je zweimal Pnut, Sep1 und Sep2) bestehen. Diese Komplexe hydrolysieren GTP (Field et al., 1996). In Säugetieren haben die Septin-Gen-Familien zum Teil ein Vielfaches an verschiedenen Mitgliedern. Dieser Umstand beruht wahrscheinlich auf Genduplikation und massivem alternativem Splicing (Hall und Russell, 2004). Zu Beginn der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren zwölf murine Septine mit etlichen Spleißvarianten bekannt. Mittlerweile konnten zwei weitere Mitglieder der Gruppe identifiziert werden (Hall et al., 2005; Peterson et al., 2007). Macara et al. ordneten 2002 die Nomenklatur der Säugetier-Septine. Die Genloci und die korrespondierenden Proteine der humanen Septinen erhielten die Bezeichnung *SEPT1-14/SEPT1-14*, während die murinen Genloci/Proteine mit *Sept1-14/Sept1-14* bezeichnet werden. Spleißvarianten wird der Zusatz *_v1* angehängt, wobei mit 1 die längste Isoform bezeichnet wird (Macara et al., 2002). In dieser Arbeit wird ausschließlich diese Nomenklatur verwendet. Strukturell sind die Septine hochkonserviert, sodass die humanen Septine eine ähnliche Domänen-

Struktur zeigen wie in *S. cerevisiae*. Die Säugetier-Septine lassen sich an Hand ihrer N- und C-Termini in Gruppen einteilen, deren Funktion allerdings noch nicht vollständig charakterisiert ist (Abb. 1.7). Gruppe I (SEPT3, 9, 12) fehlt die cc-Domäne, Gruppe II (SEPT6, 8, 10, 11) zeichnet sich durch einen verlängerten C-Terminus mit ebenfalls langer cc-Domäne aus, während alle Mitglieder der Gruppe III (SEPT1, 2, 4, 5, 7, 13) einen hochhomologen C-Terminus mit kurzer cc-Domäne besitzen (Kartmann und Roth, 2001).

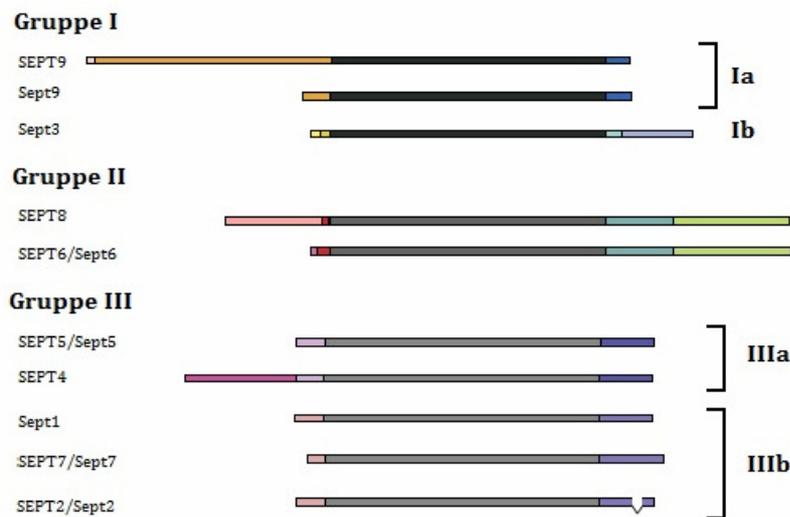


Abb. 1.7: Domänenstruktur humaner (SEPT) und muriner (Sept) Septine. Subgruppen werden auf Grund der Homologien im C-/N-Terminus unterteilt. Die graue/schwarze Box stellt den zentralen konservierten Domänenbereich dar (siehe Abb. 1.6). Homologe Bereiche werden durch ähnliche Farben dargestellt. Abbildung bearbeitet nach Kartmann und Roth, 2001.

Auch in Säugetierzellen bilden Septine GTP-abhängig faserartige Strukturen. Die Septin-Filamente können aus heteromeren Polymeren bestehen. So bilden SEPT2, 6 und 7 einen Komplex, wobei SEPT6 und 7 mittels ihrer cc-Domänen interagieren und der C-Terminus von SEPT2 an den C-Terminus von SEPT6 bindet (Low und Macara, 2006). Im Komplex aus SEPT7, 9 und 11 bindet SEPT9 mangels einer cc-Domäne mit spezifischen Sequenzen des N-Terminus an SEPT7 (Nagata et al., 2004). Die Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse beeinflusst bei Sept4 die Lokalisation an der Plasmamembran. Sept4 bindet an das Membran-Phospholipid PIP₂. Die Bindungsstelle ist eine kurze polybasische Sequenz direkt neben der GTP-bindenden Domäne. Die Bindung von GDP statt GTP begünstigt die Bindung von PIP₂ (Zhang et al., 1999). Mangel an PIP₂ führt zu gravierenden Defekten bei der Septin- und Aktin-Verteilung (Rodriguez-Escudero et al.,

2004). Funktionelle Analysen ergaben, dass das murine Sept2 während der Zytokinese am kontraktilen Ring lokalisiert und sein Verlust zu Defekten der Teilung führt (Kinoshita et al., 1997). Wie in *S. cerevisiae* können Säugetier-Septine in der Interphase auch mit Aktin-Stressfasern und fokalen Adhäsionsstellen ko-lokalisieren. Dabei ist die Bindung an Stressfasern Voraussetzung für die korrekte Form der Septin-Filamente (Kinoshita et al., 1997). Umgekehrt scheint Sept2 auch für die Bildung von Stressfasern notwendig zu sein (Kinoshita et al., 2002). Sept9 ko-lokalisiert während der Interphase ebenfalls mit Stressfasern und Sept2, aber auch mit Microtubuli. Während der Mitose bindet Sept9 allerdings vorrangig an die Microtubuli der Mitosespindel und reduziert deren Stabilität, was für den normalen Ablauf der Mitose essentiell ist (Kremer et al., 2005; Surka et al., 2002). Wie Sept2 für die Stressfasern, ist auch Sept9 für die richtige Lokalisation der Mikrotubuli bedeutsam (Nagata et al., 2003). Es zeichnet sich ab, dass die Säugetier-Septine wie ihre Verwandten in der Hefe für den koordinierten Ablauf der Zellteilung nötig sind. Hierbei übernehmen sie, wie auch bei dem Einzeller, die Funktion eines Gerüsts, das für die korrekte Lokalisation anderer Proteine sorgt. In Spermien bildet Sept4 einen Ring (den Annulus) zwischen dem Mittelteil und dem Schwanz. *Sept4*-knockout-Mäuse entwickeln sich normal und unauffällig, bilden allerdings deformierte und unbewegliche Spermatozoen. Umgekehrt wurden auch bei Patienten mit Asthenozoospermie Defekte des Septin-Rings nachgewiesen (Ihara et al., 2005). In den Spermatozoen zeigt sich vermutlich eine weitere Funktion der Septine beim Säugetier. Fehlt Sept4, ist die Struktur der Zellmembran im Bereich des Annulus geschädigt und der intraflagellare Transport in diesem Bereich stagniert (Ihara et al., 2005). Als Ursache kommt eine Rolle der Septine bei der Steuerung des Vesikel-Transports in Frage (Spiliotis und Nelson, 2006). Kwitny et al. konnten zudem zeigen, dass Sept4 in der Plasmamembran eine Diffusionsbarriere erhält (Kwitny et al., 2009), wie es auch von Septinen in *S. cerevisiae* bekannt ist. Ebenfalls für eine Funktion bei der Vesikel-Steuerung spricht die Interaktion der humanen SEPT2 und 5 mit Syntaxin. Dieses ist als SNARE-Protein (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) an der synaptischen Vesikel-Exozytose beteiligt. SEPT5 inhibiert diesen Vorgang (Beites et al., 1999). Auch in Maus-Thrombozyten bildet Sept5 einen Komplex mit Syntaxin-4 (Dent et al., 2002), und in Rattenhirnen hat ein Komplex aus Septinen und SEC6/8 ebenfalls wichtige Funktionen bei der Exozytose (Hsu et al., 1998). Einige Septine kommen ubiquitär in nahezu allen Geweben vor (SEPT2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11). SEPT3, 4, 5, 7, 8 und 11 werden in besonders hohem Level im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert,

während bei SEPT1, 6 und 9 die Expression in lymphatischem Gewebe dominiert. SEPT12 zeigt starke Expression in Hodengewebe (Hall et al., 2005).

1.2.4.3 Septin-Funktion bei Erkrankungen des Menschen

Die humanen Septine scheinen in eine Vielzahl von pathologischen Prozessen involviert zu sein. Zum einen konnten Septine schon mehrfach mit Krebserkrankungen assoziiert werden. Dieser Zusammenhang liegt auf Grund der vielfältigen Funktionen dieser Proteine während des Zellzyklus nahe, da dieser bei Tumorerkrankungen typischerweise gestört ist. Sept5, 6, 9 und 11 können als Fusionspartner bei der Translokation des MLL-Gens (*mixed lineage leukemia*) fungieren (Kojima et al., 2004; Osaka et al., 1999; Slater et al., 2002; Tatsumi et al., 2001). Translokationen dieses Gens finden sich häufig bei Patienten mit akuter myeloischer oder lymphatischer Leukämie. In humanen und murinen Mamma-Carcinom-Zelllinien wird Sept9 überexprimiert. Außerdem werden in Zellen mit erhöhtem Level von Sept9 die Apoptose-induzierenden Proteine Bax und Thsp1 vermindert exprimiert. Diese Ergebnisse legen für Sept9 eine Rolle in der Onkogenese von Brustkrebs nahe (Montagna et al., 2003). Andere Studien postulieren für Sept9 eher eine Funktion als Tumor-Suppressor-Gen. So konnten Russell et al. zeigen, dass Ovarial-Carcinom-Zellen häufig negativ für Sept9 sind (Russell et al., 2000). Da einige Septine eine besonders ausgeprägte Expression in Nervengewebe zeigen (Hall et al., 2005), wundert es nicht, dass sie auch mit Tumoren des ZNS in Verbindung gebracht werden können. Die Überexpression eines Sept2-Proteins ohne GTPase-Aktivität führt zu Anomalien des Dendritenwachstums in Nervenzellen (Vega und Hsu, 2003). Dementsprechend zeigt die U373-Astrozytom-Zelllinie eine vermehrte Expression von Sept2 (Sakai et al., 2002). Auch in anderen Erkrankungen des ZNS scheinen Septine eine Rolle zu spielen. So wurden SEPT1, 2 und 4 in den für Morbus Alzheimer pathognomonischen Neurofibrillen nachgewiesen. Dort assoziieren sie mit den τ -basierten Filamenten (Kinoshita et al., 1998). Außerdem akkumuliert SEPT5 in Nervengewebe von Patienten mit autosomal-rezessivem juvenilem Parkinsonismus (Ihara et al., 2003). Bei der Infektion von Zellen durch intrazelluläre Erreger konnten ebenfalls Funktionen von Septinen identifiziert werden. So scheinen SEPT2, 9 und 11 am Internalin-B-vermittelten (InlB) Eindringen von *L. monocytogenes* in Zellen beteiligt zu sein. InlA und InlB sind Oberflächenproteine dieses fakultativ intrazellulären Bakteriums, die dessen Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen induzieren können. Dazu benutzen sie spezifische Transmembranproteine, die als Rezeptoren fungieren, wie c-Met (der *Hepatocyte-Growth-Factor-Receptor*). Dieser stimuliert unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pizarro-Cerdá et al., 2002). Wie bereits erwähnt

können Septine an Phospholipide binden, sodass dieser Mechanismus für die Rekrutierung der Septine an die Invasionsstelle verantwortlich sein könnte (Mostowy et al., 2009a). Die Septine werden zusammen mit Aktin zur Invasionsstelle rekrutiert, bilden dort allerdings eigene, ringförmige Strukturen. Die Inaktivierung von SEPT2 durch siRNA vermindert die Aufnahme von *L. monocytogenes* in die betroffenen Zellen (Mostowy et al., 2009a). SEPT9 ist kein typischer Bestandteil der Phagosomen-Membran, sondern lässt sich nur in InlB-induzierten Phagosomen nachweisen (Pizarro-Cerdá et al., 2002). Neuere Studien zeigen dagegen, dass die Inaktivierung von SEPT11 die Aufnahme der Bakterien sogar erhöht (Mostowy et al., 2009b). SEPT2 und 11 sind anscheinend auch bei der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose beteiligt. Professionelle Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) können mittels dieser Rezeptoren mit IgG markierte Pathogene erkennen und deren Phagozytose einleiten. Der Fc γ -Rezeptor induziert eine Veränderung des submembranösen Aktinskeletts und damit letztendlich die Bildung des Phagosoms. Auch die oben genannten Septine akkumulieren vorübergehend an der Phagozytose-Stelle. Das Fehlen von SEPT2 oder 11 beeinträchtigt die Phagozytose, nicht jedoch die Bildung des Aktin-Skeletts (Huang et al., 2008). Ein weiterer wichtiger Vorgang während der Immunantwort mit einer möglichen Beteiligung der Septine ist die Chemotaxis von Immunzellen. Werden Effektorzellen des Immunsystems von Chemokinen angelockt, können sie sich mittels Zellmigration zum Ort der Infektion bewegen. Zellmigration ist ein komplexer Vorgang, der Veränderungen des Zytoskeletts und der Plasmamembran beinhaltet. Aktin-Fibrillen werden in Bewegungsrichtung verlängert und Membranvesikel entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert und eingebaut. Dadurch entstehen Zellfortsätze (Filopodien und Lamellipodien), die eine gerichtete Bewegung ermöglichen. Am Ende der Filopodien sorgen die fokalen Adhäsionsstellen für den Kontakt mit der extrazellulären Matrix (Le Clainche und Carlier, 2008). Septine konnten bisher mit allen drei Mechanismen in Verbindung gebracht werden. Sie werden mit dem Aktin-Skelett und den Mikrotubuli assoziiert (Kinoshita et al., 1997; Surka et al., 2002), haben Funktionen während des Vesikeltransports und der Exozytose (Beites et al., 1999) und ko-lokalisieren mit fokalen Adhäsionsstellen (Kinoshita et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich Septine während der Zellmigration im Rahmen der Embryonalentwicklung von *Drosophila* am epithelialen Leitsaum finden (Fares et al., 1995). Im Hinblick auf diese vielfältigen Funktionen stellte sich uns die Frage, ob Septine als Mitglieder der Familie der p-loop GTPasen – analog zu den p47 GTPasen, den p65

GBPs, den Mx-Proteinen und den VLIGs – einen Teil der IFN γ -induzierten Immunantwort darstellen.

1.3 Zielsetzung

Das Immunsystem der höheren Wirbeltiere ist äußerst komplex aufgebaut. Obwohl bereits eine Vielzahl an Mechanismen der Pathogenabwehr beschrieben sind, geben Forschungsergebnisse immer wieder Hinweise auf weitere Bestandteile des Systems. Durch genauere Kenntnis dieser Mechanismen können sich auch Möglichkeiten eröffnen, diese medizinisch zu nutzen. Zum einen bei der Behandlung angeborener oder erworbener Erkrankungen des Immunsystems, zum anderen in der Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten. Die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α spielen bei der Immunabwehr eine zentrale Rolle. Als Effektorproteine dieser Zytokine werden in Makrophagen offensichtlich eine große Anzahl an Genen induziert, die erst teilweise charakterisiert sind. Ziel dieser Arbeit war es daher, mögliche weitere IFN γ -induzierbare Gene zu identifizieren und gegebenenfalls zu charakterisieren. *In silico* wurde nach weiteren Mitgliedern der IFN γ -regulierten GTPasen-Familien gesucht, wobei auf Grund ihrer Domänenstruktur die Septine ins Blickfeld kamen. Zunächst sollte ermittelt werden, ob die Septin-Genfamilie, die wie andere IFN γ -regulierte GTPasen zu den p-loop GTPasen gehört, ebenfalls gesteigerte Expression unter Einfluss von IFN γ zeigt. Durch Microarray Transkriptomanalysen, bei denen ANA-1-Makrophagen mit IFN γ oder TNF α sowie einer Kombination von IFN γ /TNF α stimuliert wurden, konnte zusätzlich ein weiteres Gen identifiziert werden, das unter IFN γ -Einfluss vermehrt exprimiert wird (Degrandi et al., 2009). Dies war ein kleines, bioinformatisch vorausgesagtes Protein, das unter der Accession-Nummer AI451557 zu finden war, und bisher nicht genauer charakterisiert wurde. Außerdem wurde im Zuge der Recherche in Datenbanken eine mRNA-Sequenz gefunden, die auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit VLIG-1 als „*similar to VLIG*“ bezeichnet wurde, und bei NCBI unter der Accession-Nummer AK018585 geführt wurde. Für beide Transkripte sollten Expressionsanalysen mittels Realtime PCR erstellt werden, sowie gegebenenfalls eine weitere Charakterisierung des translatierten Proteins erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hamburg
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bactoagar	BD Biosciences, Heidelberg
BES	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxyribonucleotide	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Dextransulfat	Amersham Biosciences, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium	Gibco, Eggenstein
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
ExpressHyb Hybridisierungslösung	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll® 400	Amersham, Braunschweig
FKS (Fötale Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
FKS (Fötale Kälberserum) low Endotoxin	Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg

Chemikalie	Bezugsquelle
IMDM Medium	BioWhittaker, Lonza, Belgien
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
LTA (<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC 43251)	Thomas Hartung, Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS <i>E. coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Marker 1kb DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
MassRuler™ DNS-Leiter	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
mIFN γ	R&D Systems, Mainz
mTNF α	R&D Systems, Mainz
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
RPMI Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
TRIZOL Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Ultrapure H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
VLE RPMI-CLICKS 1640 Medium	Biochrom, Berlin

2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	NEB, Frankfurt a. M.
DNS T4 Ligase	NEB, Frankfurt a. M. MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DNS Polymerase, AccuPrime™ Pfx	Invitrogen, Karlsruhe
DNS Polymerase, Expand Long Template	Roche, Mannheim
DNS Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RNase, DNase frei	Roche, Mannheim
RNase out	Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/μL)	GE Healthcare, München

2.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien	Bezugsquelle
Filtermate A 1205-401	Perkin Elmer, Finnland
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Dassel
Ladderman™ Labeling Kit	TaKaRa, Shiga, Japan
MicroSpin™ S-200 HR Säulen	Amersham Biosciences, Braunschweig
Nylonmembran, Hybond N+	Amersham, Braunschweig
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
PCR-Aufreinigungskit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden BD Falcon, Heidelberg Eppendorf, Hamburg
Plasmid Isolierungskits	Macherey-Nagel, Düren
qPCR MasterMix No ROX	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Radiochemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP redivue wurde von der Firma GE Healthcare (München) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit ($T_{1/2} = 14,262 \text{ d}$) verwendet.

2.2 Geräte

Gerät/Bezeichnung	Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Brutschrank, BBD6220	Heraeus, Hanau
Counter, 120S Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügelshiem
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophorese von DNS/RNS	Biometra, Göttingen
Entwicklermaschine, Curix 60	Agfa, Köln
Geldokumentationssystem, BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Heizofen, OV3	Biometra, Göttingen
Harvester, Basic 96 Harvester	Satron Instruments, Tampere, Finnland
Kühlzentrifugen, Sorvall® RC26 PLUS	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Konfokalmikroskop, LSM510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Mikroskope, Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
TE2000	Nikon, Düsseldorf
PCR Maschine, Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Realtime PCR Maschine, iCycler IQ5	Biorad, München
Phosphoimager	FLA-3000, FujiFilm, Düsseldorf
Photometer, GeneQuant II	Pharmacia, Braunschweig
Spannungsquelle, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PS 500 XT	HIS, San Francisco, USA
Sterilbank, HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
Thermoblöcke, Termomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen, Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau
Wasserbad, WNB22	Memert, Schwabach
Zellkulturschüttler, 3015	GFL, Burgwedel

2.3 Medien und Puffer

2.3.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung	
BBS (2 x)	280 mM	NaCl
	50 mM	BES
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	pH = 6,96	
5 x DNS Auftragspuffer	15 %	Ficoll Typ 400
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
10 x DNS Auftragspuffer	1 mg/ml	Orange G
	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	30 %	Gelatine
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
Minimal-TE	1 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,01 mM	EDTA
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH = 7,4	
10 x PCR Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	10–25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung	
RNS Elektrophoresepuffer	1 x MESA-Puffer	
2 x RNS Auftragspuffer	48,0 %	Formamid
	10,0 %	10 x MOPS-Puffer
	17,3 %	Formaldehyd
	14,0 %	DEPC-H ₂ O
	5,3 %	Glyzerin
	5,3 %	Bromphenolblau
10 x MOPS-Puffer	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat·3H ₂ O
	10 mM	EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O
	pH = 7,2	
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
50 x TAE Elektrophoresepuffer	2 M	Tris, pH 8,0
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA
TE Puffer	10 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
Waschlösung I (Northern)	2 x	SSC
	0,05 %	SDS
Waschlösung II (Northern)	0,1 x	SSC
	0,1 %	SDS

2.3.2 Kulturmedien für Zellen und Bakterien

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Zelltyp	Grundmedium	FKS*	Penicillin	Streptomycin	β -ME	L-Glutamin
ANA-1-Makrophagen	RPMI 1640 VLE	10 %			0,05 mM	2 mM
EF Zellen	DMEM hohe Glukose	5 %	100 U/ml	100 μ g/ml	0,05 mM	2 mM
RAW 264.7 Makrophagen	RPMI 1640 VLE	10 %	100 U/ml	100 μ g/ml	0,05 mM	2 mM
293T Zellen	DMEM hohe Glukose	10 %	100 U/ml	100 μ g/ml		2 mM

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

Bakterienkulturmedium

LB-Medium

10 g Caseinhydrolysat
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 ad 1 l H₂O_{dest}
 pH 7,2

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

2.4 Antibiotika

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

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika.

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

2.5 Bakterien-, Toxoplasmenstämme und Zelllinien

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

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	(Hanahan, 1983)
<i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251
<i>T. gondii</i> ME49, Gruppe II	obligat intrazellulär replizierende Protozoa	(Parmley et al., 1994)

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellen unter Angabe der Eigenschaften und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien.

Zellen	Eigenschaften	Referenz
ANA-1	Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6- Mäusen, immortalisiert mittels J2 Retrovirus	(Cox et al., 1989)
EF Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14,5 p.c. aus CD1 Embryonen, frisch isoliert	(Klein et al., 1993)
264.7 RAW	murine Monozyten/Makrophagenzelllinie aus BALB/c Mäusen, ursprünglich aus Peritoneum	(Raschke et al., 1978)

2.6 Versuchstiere

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

2.7 Primer

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

Für die differenzierende PCR VLIG/stVLIG wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 2.5: Oligonukleotide für die differenzierende PCR VLIG/ stVLIG.

Primername	Sequenz (5'→3')
VLIG/stVLIG fwd	AGG CTT GGG ACA AGT TAA TGC
VLIG rev	TTA CCT CAT AGC CAT GAG TGC
stVLIG rev	CTT CAT AGC CAT AAG TTG CAA G

Für die Klonierung des AI451557-pEGFP-Fusionskonstruktes wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 2.6: Oligonukleotide für GFP-Konstrukt.

Primername	Sequenz (5'→3')
pEGFP-Monomer-N1-AI451557 fwd	AAA CTC GAG ACC ATG GAG AAG GAA CAC C
pEGFP-Monomer-N1-AI451557 rev	AAA GTC GAC GCG GGA TCG TGA CAG G

Für die Realtime PCR-Analysen wurden folgende Primer und Sonden verwendet:

Tabelle 2.7: Oligonukleotide für Realtime PCR-Analysen.

Primername	Sequenz (5'→3')	Sonde
β-Actin fwd	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	CTCTGGCT
β-Actin rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	
GTP-BP1 fwd	GGT GCA GAG CAA AGA TGA TG	CAGCCTCC
GTP-BP1 rev	ATC TGG AAT ATC GGG CAC AT	
VLIG fwd	GCT GGG TTC TGA TGA TGG A	CAGAGGCT

Primername	Sequenz (5'→3')	Sonde
VLIG rev	CTG GGC TCA AAA GGA AGA TG	
stVLIG fwd	CCT GAC ATT GAG GAA ATT CTC	TGTGGCTG
stVLIG rev	GAC CGC TGG AGA TAC AAA TAC	
AI451557 fwd	CCT GCG TCC CAG TCA TTC	CAGAGCCA
AI451557 rev	CTG CTG GTC AGT GAT GGA GA	
mSeptin 1 fwd	TGG GGA CTC TGT GGA CTT CT	GCT GCC TG
mSeptin 1 rev	TTG CTC AAA CTG CTC CTC AA	
mSeptin 2 fwd	TTC ACT ATG AAA ACT TCC GTT CTG	GGC TGA AG
mSeptin 2 rev	TCA TGT CCT CAT TCT CTA CTT TCC T	
mSeptin 3 fwd	GGA TTT GGA GGA CAA GAC AGA	GGC AGG AG
mSeptin 3 rev	CTT GTC ACT CCC CAC CAC A	
mSeptin 4 fwd	ACT GAC TTG TAC CGG GAT CG	TGC TGG GC
mSeptin 4 rev	TCT CCA CGG TTT GCA TGA T	
mSeptin 5 fwd	ATC GCC AAA GCT GAC TGC	GTG CCC AG
mSeptin 5 rev	TTG TCG ATC TCC TCA CGT ATT C	
mSeptin 6 fwd	AAC GCC TTC AAG CAG AGA AA	GCT CAC AG
mSeptin 6 rev	ACA GCT GCT GAA GAC AAG GTT	
mSeptin 7 fwd	TCG GTC AGT GCG AGA TCC	GGA GAG GA
mSeptin 7 rev	TCA AGG TTC TTC GGT TGA GC	
mSeptin 8 fwd	TCA GCT CCT TAG GCA CTT CG	AGC CTC TG
mSeptin 8 rev	GAG TCA CAT GTC CAG CAT ATT GTA	
mSeptin 9 fwd	CCC ATA TCG GAA CCA GGA A	TCC CAG CT
mSeptin 9 rev	CTC TAG GGT TGT CAG CCG TGT	
mSeptin 10 fwd	CAG AGA ACA AGC CCC TCA GT	CAG AGG AA
mSeptin 10 rev	CAA ACA TCT GCT TCA TCT GCT C	
mSeptin 11 fwd	AGC AGC CAG TGT CGG TAA AG	CAG AGC CA
mSeptin 11 rev	GAT AAG TTT CGC AGC TCT TCA TT	
mSeptin 12 fwd	TCA ATG ACA GAC TTC TCA ACA GTA AG	GGG AGC AG
mSeptin 12 rev	CCC ATT CAC TAT GTG CTC TCG	

Alle Sonden sind Teil der Universal Probe Library der Firma Roche, Mannheim und beinhalten LNAs (*locked nucleoid acid*), sodass kurze Sondensequenzen benutzt werden können. Alle Sonden sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert.

2.8 Plasmidvektoren

2.8.1 Ausgangsvektoren

Tabelle 2.8: Ausgangsvektoren.

Name	Eigenschaften	Referenz
pCR II-TOPO	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten, Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ α -Fragment	Invitrogen
pEGFP-N1	Expressionsvektor für C-terminales EGFP-Fusionsprotein, Kozak-deleted, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pCR II	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten, Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ α -Fragment	Invitrogen

2.8.2 Erstelltes Plasmid

Tabelle 2.9: Erstelltes Plasmid.

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
AI451557-EGFP-N1	EGFP-N1	AI451557 ORF	Für subzelluläre Lokalisation

2.9 Tierversuche

Die Tierversuche wurden in unserem Institut von einer Person mit Tierversuchsschein durchgeführt. Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 50.05-230-60/06 am 05.09.2006 genehmigt. Die aus den Organen gewonnene RNS für die cDNS-Synthese wurde für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.10 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.10.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken (Lamina AIR Flow) mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 8% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. ANA-1 und 264.7 RAW Makrophagen wurden mit komplettem Medium unter Verwendung von Plastikpipetten von der Kulturschale abgespült und dann verdünnt umgesetzt. 293T Zellen wurden alle zwei Tage mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in Medium verdünnt auf neue Platten ausplattiert.

2.10.2 Transfektion von 293T Zellen mittels Kalzium-Phosphat

Zur transienten Transfektion von Zellen (293T) wurden am Vortag 1 x 10⁶ Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Nach 16 h wurden in einem sterilen Röhrchen (Falcon) 16 µg Expressionsvektor und 80 µl CaCl₂ gemischt und mit A. bidest. auf 400 µl aufgefüllt. Unter kontinuierlichem Mischen wurden tropfenweise 400 µl 2 x BBS zugegeben, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. 16 h später wurde das Medium gewechselt. Der Erfolg der Transfektion konnte nach weiteren 24 h am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.10.3 Stimulation von Zellen

Die Stimulation der verschiedenen primären Zellen und Zelllinien erfolgte in den in Abschnitt 2.3.2 angegebenen Nährmedien, wobei die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte eine ca. 75%ige Konfluenz erreicht hatten. Folgende Zytokine und Chemikalien wurden zur Stimulation eingesetzt: IFN γ (10 ng/ml), TNF α (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml) und Listeria LTA (1 µg/ml). Die Stimulation der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe der entsprechenden Substanzmenge zum Nährmedium.

2.11 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.11.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Plasmid-DNS Isolierung erfolgte mit Hilfe eines Kits von Macherey-Nagel. Je nach benötigter DNS-Menge wurden Mini- oder Maxi-Säulen verwendet. Um bei einer

Transfektion von Zelllinien eine Kontamination mit Endotoxinen zu verhindern, wurde das Endofree Maxi Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11.2 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNS-Fragmenten verwendet. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus des Molekulargewichtes invers proportional ist. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid im Gel fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht. Das Muster kann photographisch festgehalten und analysiert werden. 0,8–2% (w/v) Agarose wurden in TAE Puffer aufgekocht bis eine klare, homogene Lösung entstand. Nach Abkühlung der Agarose wurde Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugeben und in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämmen gegeben. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE Puffer überschichtet. Die 1:5 mit Auftragspuffer vermischten DNS-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese je nach Gelgröße bei 80–150 Volt durchgeführt. Das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoreszierte bei UV-Bestrahlung (Transilluminator, 280 nm) und das Bandenmuster konnte photographisch dokumentiert werden.

Präparative Agarosegelelektrophorese

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

Bestimmung von Fragmentgrößen

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

2.11.3 Restriktionsverdau von DNS

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

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

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

2.11.4 Dephosphorylierung von DNS

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

2.11.5 Ligation von DNS-Molekülen

T4-Ligase

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

TOPO TA Cloning® Kit

Bei Klonierungen von PCR-Produkten in den Vektor pCR II-TOPO (Abschnitt 2.8.1) wird die Eigenschaft thermostabiler DNS-Polymerasen, an alle doppelsträngigen DNS-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenutzt. PCR-Produkte können so direkt in den Vektor kloniert werden, da sie die kompatiblen Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzen. Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11.6 Transformation von *E. coli* Bakterien

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

2.11.7 Isolierung gesamtzellulärer RNS

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

2.11.8 Northern Blot-Analyse

Diese Methode kann zum Nachweis spezieller RNS-Fragmente unter einer großen Anzahl elektrophoretisch aufgetrennter RNS-Moleküle dienen (Alwine et al. 1977). Durch DNS/RNS-Hybridisierung mit einer komplementären Sonde können die gesuchten RNS-Sequenzen markiert und anschließend detektiert werden. Dabei wird gesamtzelluläre RNS in einem denaturierenden Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und fixiert. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde kann die mRNS der Probe anhand der Größe und Stärke der Bande qualitativ und quantitativ analysiert werden. Die Elektrophorese der

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

Durchführung:

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

Anschließend wurde das Gel dann 2 x 5 min in H₂O geschwenkt. Mittels eines Kapillarblots werden die Fragmente auf eine positive Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) transferiert, sodass ein Abbild des Fragmentmusters des Agarosegels auf der Membran entsteht. Als Blotlösung wurde 10 x SSC verwendet.

Aufbau des Kapillarblots:

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

- Glasplatte mit Gewicht

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

Radioaktive Markierung der Sonde

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

DNS/RNS Hybridisierung

Die DNS/RNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären nachzuweisenden mRNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen, doppelsträngigen DNS/RNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybrid-Moleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde die Membran mind. 1 h bei 60°C in 10 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyb, BD) prähybridisiert und dann die markierte, hitzedenaturierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 60°C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 10 min bei RT mit Lösung I und 1 x 15 min bei 50°C mit Lösung II gewaschen. Spezifisch gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers (FujiFilm) detektiert.

2.11.9 cDNS Synthese aus gesamtzellulärer RNS

Bei der cDNS Synthese wird mRNS von Zellen oder Gewebeproben in DNS enzymatisch umgeschrieben. Hierbei werden die molekularen Verhältnisse der Transkripte nicht verändert, weswegen die entstehende cDNS zur Expressionsquantifizierung mittels semiquantitativer PCR oder Realtime PCR eingesetzt werden kann.

Ansatz: 1 µg RNS in 10 µl DEPC-H₂O
 + 1 µl Oligo-dT Primer 10 µM (Invitrogen)

Inkubation des Ansatzes für 2 Minuten bei 70°C und anschließend Abkühlung auf Eis.

+ 1 µl RNaseOut
+ 4 µl 5x First-Strand Buffer (Invitrogen)
+ 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
+ 1 µl dNTP Mix 10 mM
+ 2 µl M-MLV RT (Invitrogen)

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 95°C inaktiviert. Abschließend wurden 80 µl H₂O zum Ansatz zugegeben.

2.11.10 Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen, einzelsträngige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu verwenden, um so Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz zu produzieren. Die doppelsträngige DNS wird durch Hitze denaturiert. Anschließend können durch Abkühlung spezifische Primer an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Fragments hybridisieren. Durch Erhitzen auf 72°C kann nun die thermostabile Polymerase den Komplementärstrang synthetisieren. Eine zyklische Wiederholung der Temperaturänderungen führt zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration des gewünschten Fragments.

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

Reaktionsansatz: ca. 100 ng DNS
 1 µl Primer 1 (20 pmol)
 1 µl Primer 2 (20 pmol)
 5 µl 10 x Puffer
 1 µl dNTP Mix (10 mM)
 1 µl Polymerase (5 Einheiten/µl)
 ad 50 µl H₂O_{bidest}

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

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

Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch 30–35x wiederholt.

2.11.11 Realtime PCR

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

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

Reaktionsansatz:	5 µl	1:10/1:2 verdünnte cDNS
	0,3 µl	Primer 1
	0,3 µl	Primer 2
	12,5 µl	qPCR Mastermix-No ROX
	6,4 µl	H ₂ O _{bidest}
	0,5 µl	Sonde

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

1. DNS Denaturierung	95°C	10 min
2. DNS Denaturierung	94°C	20 sec
3. Primerhybridisierung und -verlängerung	60°C	1 min
4. Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	unendlich

Die Schritte 2 bis 3 wurden zyklisch 40-mal wiederholt. Unmittelbar nach jedem 3. Schritt wurde die Fluoreszenz gemessen. Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme wurde in CT-Werten (*cycle threshold*) dargestellt und damit die verschiedenen cDNS Proben und Gene verglichen. Der CT-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

2.12 Computerprogramme

Klonierungsstrategien

Strategien zum Klonieren von Expressions- und Rekombinationsvektoren wurden mit Hilfe des Programms Gene Construction Kit 2 von TEXTCO Company New Hampshire, U.S.A erstellt.

Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm SeqMen von DNASTar durchgeführt.

Realtime PCR

Für die Auswertung der Realtime PCR Daten wurden die CT Werte mit Hilfe der iQ5 Software von der Firma Biorad ermittelt. Die $\Delta\Delta CT$ Methode wurde zur Ermittlung der Expressionszunahme der einzelnen Gene zugrunde gelegt (Pfaffl, 2001). Für die statistische Auswertung und die Darstellung der Realtime Daten wurde das Programm GraphPad Prism 4 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Septine

3.1.1 Etablierung einer Realtime PCR für die Genfamilie der Septine

Viele Mitglieder der p-loop GTPasen-Familie zeigen eine ausgeprägte Hochregulation unter Einfluss von IFN γ und üben folglich wahrscheinlich wichtige immunologische Funktionen aus (Boehm et al., 1998; Klamp et al., 2003; Degrandi et al., 2007). Um zu testen, ob auch die Septine als Effektorproteine von IFN γ in Frage kommen, sollte zunächst ein Expressionsprofil für alle bis dato beschriebenen murinen Septine (Sept1–11) mittels Realtime PCR erstellt werden. Dazu wurde die Universal Probe Library (<https://qpcr1.probefinder.com/roche2.html>) nach passenden Sonden und Primern für die jeweiligen mRNS-Sequenzen der einzelnen Septine durchsucht. Die Sonden sind kurze Taqman-Sonden (mit Fluorophor und Quencher) mit 8–9 Nukleotiden (nt). Die höhere Thermostabilität der klassischen Taqman-Sonden (25–30 nt) wird auch mit der geringen Länge erreicht, indem stabile DNS Analoga – sogenannte LNAs (*locked nucleic acids*) – eingebaut werden. Um geeignete Primer-Paare zu finden, wurden entweder die Accession Nummern oder die mRNS-Sequenzen der Septine eingegeben. Aus den unterschiedlichen Vorschlägen wurden nach verschiedenen Kriterien die besten ausgesucht. Um die Amplifikation und Detektion von genomischer DNS zu verhindern, wurden bevorzugt Intron-überspannende Primer-Paare ausgesucht. Außerdem wurden Primer mit ähnlicher Annealing-Temperatur ausgewählt, um alle Assays parallel durchführen zu können. Anschließend wurden die Primer-Sequenzen durch Vergleich mit den cDNS-Sequenzen der anderen Septine auf Spezifität für das jeweilige Gen untersucht (MegAlign, DNASTar, ClustalW Methode). Für Sept10 konnte auf Grund der hohen Sequenz-Homologie mit Sept6 kein spezifisches Primer-Paar gefunden werden. Deshalb sollte dieses Gen vorerst nicht getestet werden. Für Sept4 ließ sich auch nach multiplen Versuchen mit unterschiedlichen Primern kein funktionierender Assay erstellen. Auf Grund der Ergebnisse der Testung aller übrigen Septine, wurde letztendlich auf eine anderweitige Untersuchung dieser beiden Septine verzichtet. Für die übrigen Septine und β -Aktin als Housekeeping-Gen konnte ein spezifischer Realtime PCR-Assay mit einer Annealingtemperatur von 60°C gefunden werden.

3.1.2 Induzierbarkeit der Septine in ANA-1-Makrophagen

Mittels Realtime PCR sollte nun ermittelt werden, inwieweit sich die Expression der einzelnen Septine unter Einfluss von IFN γ verändert. Außerdem wurde parallel getestet, ob die Septin-Expression durch TNF α und TLR-Liganden stimulierbar ist. Zur Erstellung des Templates wurden ANA-1-Makrophagen mit IFN γ (10 ng/ml entsprechend 100 U/ml), TNF α (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml) und Listerien-LTA (1 μ g/ml) stimuliert. 16 h nach Zugabe der Stimulanzien wurden die Zellen geerntet und aus der aufgereinigten mRNA cDNA synthetisiert. Die Induzierbarkeit der einzelnen Gene wurde ermittelt, indem jeweils die Ratio zwischen stimulierter und unstimulierter Probe berechnet wurde. Dazu wurde die $\Delta\Delta$ CT-Methode verwendet (Pfaffl, 2001). Hierbei werden die jeweiligen CT-Werte der Gene auf das Housekeeping-Gen β -Aktin normalisiert (Δ CT) und dann die Ratio ($2^{-\Delta\Delta$ CT) berechnet. Als Positiv-Kontrolle wurde die IFN γ -induzierbare GTPase mGBP1 verwendet (Degrandi et al., 2007). In Abb. 3.1 sind die relativen Expressionsunterschiede von Sept1–11 sowie mGBP1 dargestellt. Keines der Septine zeigt auf mRNA-Ebene eine Hochregulation nach IFN γ -Stimulation. Sept1, 3, 5, 7, 8 und 9 werden sogar vermindert transkribiert, während sich bei Sept2, 6, und 11 keine signifikanten Expressionsunterschiede zeigen. Für mGBP1 dagegen konnten wie erwartet nach IFN γ -Stimulation deutlich erhöhte mRNA-Mengen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit den übrigen Substanzen bewirkte ebenfalls für keines der Septine eine vermehrte Expressionsrate. Nach TNF α -Stimulation zeigten Sept5 und 9 verminderte Expression, während lediglich für Sept3 eine äußerst geringe Steigerung der Expressionsrate nachgewiesen werden konnte. Unter Einfluss von LTA wurde Sept3, 5, 6, 7 und 9 vermindert exprimiert. Im Falle der Stimulation mit LPS traf dies für alle Septine außer Sept7 und 11 zu.

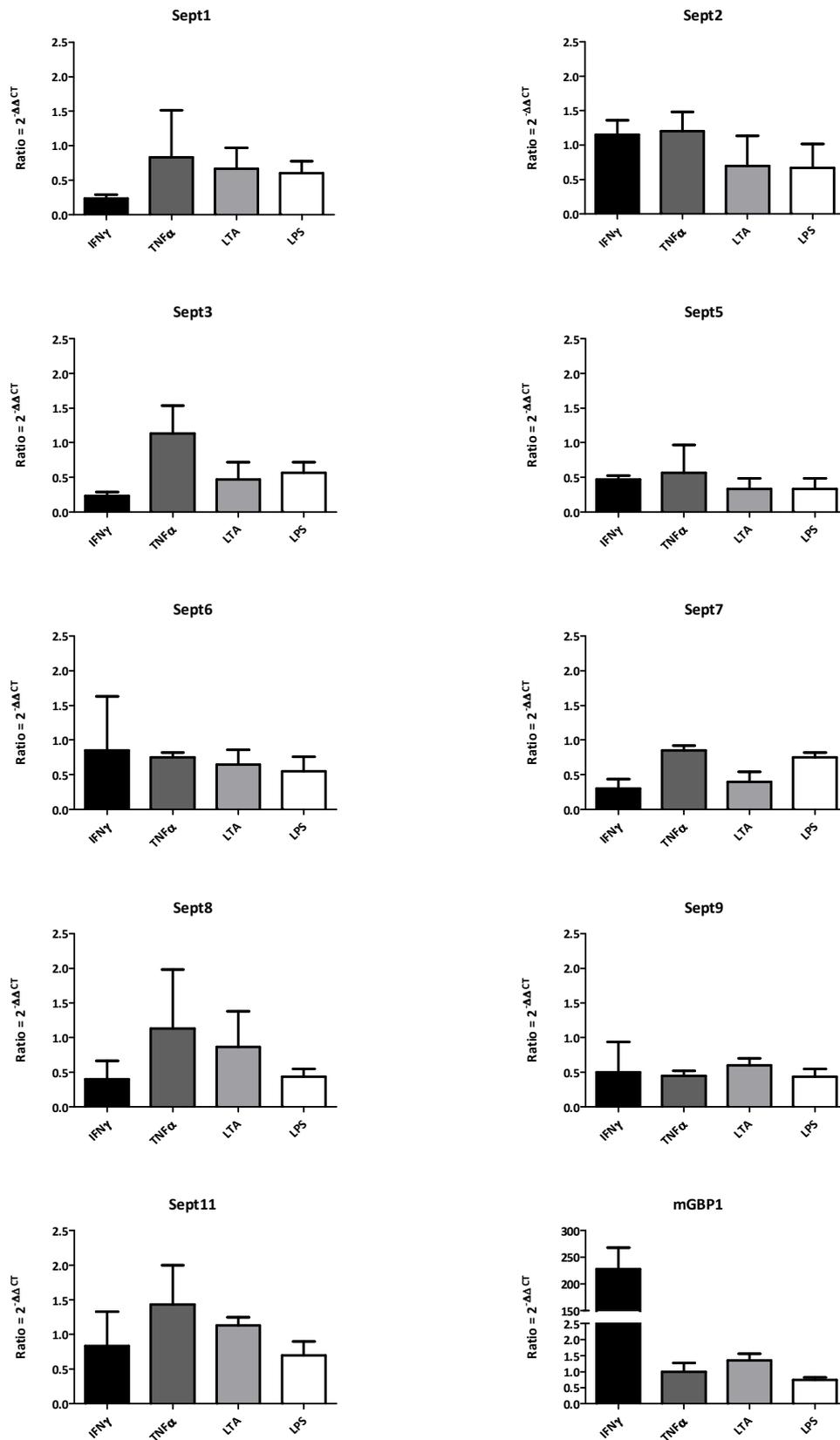


Abb. 3.1: Realtime-Analyse der Expression der murinen Septine sowie mGBP1 als Positiv-Kontrolle in ANA-1-Makrophagen nach 16 h Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und TLR-Liganden. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta CT}$) für jedes Gen.

Aus diesen Ergebnissen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die getesteten Septine nicht zu den IFN γ -induzierbaren GTPasen gehören. Wie schon erläutert, wurde auf Grund der bisherigen Ergebnisse darauf verzichtet Sept4 und Sept10 mit deutlich aufwändigeren Methoden zu testen. Vor dem Hintergrund der Erforschung von IFN γ -Effektorproteinen war die weitere Arbeit mit den Septinen nicht zielführend. Falls einzelne Septine – wie die Ergebnisse nahelegen – tatsächlich unter Einfluss von IFN γ , TNF α oder verschiedener TLR-Liganden vermindert exprimiert werden, könnte dies jedoch auch Hinweise auf deren Rolle im Immunsystem geben.

3.2 AI451557

3.2.1 Charakterisierung von AI451557 und Etablierung der Realtime PCR

Ein bisher nicht näher beschriebenes Transkript, das sich bei der initialen Transkriptomanalyse als IFN γ -induziert gezeigt hat, ist AI451557 (Degrandi et al., 2009). Nach IFN γ -Stimulation wies AI451557 eine Expressionssteigerung von 4,2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf. Eine vergleichbare Steigerung zeigte sich auch nach simultaner Stimulation mit IFN γ und TNF α , sodass angenommen werden kann, dass diese beiden Zytokine auf die Expression von AI451557 keine synergistische Wirkung haben, wie das zum Beispiel für die meisten GBPs der Fall ist (Degrandi et al., 2007). Über AI451557 waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur die Informationen bekannt, welche in der NCBI Nukleotid Datenbank unter der Accession Nummer AI451557 hinterlegt waren. Dort wurde es als 1723 nt lange sequenzierte mRNS-Sequenz beschrieben. An den Nukleotid-Positionen 1693–1698 befindet sich das Poly(A)-Signal (AATAAA), welches für die Anheftung eines sogenannten Poly(A)-Schwanzes (Polyadenylierung) verantwortlich ist. AI451557 ist auf Chromosom 8 des Mausgenoms lokalisiert und besteht aus zwei Exons. Die Sequenz-Analyse (Windows 32 EditSeq 5.02 © 1989–2001 DNASTAR) ergab einen offenen Leserahmen (ORF) von 417 nt (Nukleotide 270–686). Dies entspricht einem Protein von 139 AS Länge. Der Sequenzvergleich mittels BLAST N (Nukleotid-Sequenz, nr-Datenbank des NCBI-Servers) erbrachte keine verwandten Sequenzen in anderen Spezies – insbesondere nicht im humanen Genom. Abb. 3.2 zeigt die mRNS-Sequenz von AI451557.

```

1  gtatgattat acccttgtgt ggggtggggg gtggtacaga agggaccctc atcctgaaca
61  agcccagagg ttactggaat attcctgcct cccagaaatt tgtccagggt cttggaacac
121 tgtcccaaac tggctctgag gccctaccaa gcttagtgct tcccatgctc tagccttag
181 actttctact gtcccagtgg gagtcagaga cctctgctaa gtgctggtag taggggggaa
241 aggtgacttt gtcttgctg ggataggaca tggagaagga acaccccctc ccctgcctcc
301 agcctcgctt gcctctatct ccctcttgcc ctgccactgt ccactgcaaa gcttggagtg
361 gaaccggatc acagcacgtg gagcccaact cctggctcaa gggctgggtc agggatcctg
421 cgtcccagtc attcgctctt ggaacaaccc cattcttaac gatgtggccc agagtctgca
481 gagccaggaa cccaggctgg acttctccat cactgaccag cagactctt gaggaacca
541 acggacttct caagacttat gagtcagtc cagtgcagc cacatcacc accaggagag
601 ggggctcaga agaacctctg ttgggtgcca gcctcctacg aatgccccag gaggaagaa
661 cacatcttct ctgtcacgat ccctagggag cgcattctta gggactgaga gctttgtttg
721 accaaaagag ggccatata catatcat acatgacata tgttaccaat ggggcattga
781 cattatgaga gtattatgag gttatatata caggaaaggc tgtgtatggt gcactatgac
841 cccttgacat ggaaggctc tactcagagt aggtcaaag tagaattaca tggaaactgt
901 ggcattgacac ctggctcatag cctcttagca ctgtaattgg aaatacacat gatcaggaat
961 ccacttatga catgatgtcc atatcacatg acacacaact tgacagggga ccacagataa
1021 gtccaagacc taattatta ttattttaa aaacatgaag ttaggctaag ggtataggct
1081 atgttatatg aacagcctt tagctgttca ggaatctgag gcagacagat cgcaagttca
1141 aggtcaatct aggtaattha gtaagatcct gtctcaaaag gtcagaaagg gctggggata
1201 tggctcaatg ctagagtgtc tcttagcatg tgtaaagccc taagctcaat gctcgggtgct
1261 tttttttttt ttaagtatt tataagcacc ttctggagaa actttttgtc ttgtgctagg
1321 agagggagtt aagaattgag tggcccaatg gtccggggtc tgggacatgc caaggactta
1381 gcatgaagtc ccctcctgcc agagcctcaa gtctctctc tgttaatcgt gttcttccaa
1441 ggacttccag cccaggctta ggagttaac tgacctggg agagtctgca ctcatctctt
1501 ctttctggt ttaagggaca aagccgagct acaggtttag ggataagtac ttccaggata
1561 ataggcaaga ccactaggtc tagcctacac actacctcag caggattcag aaaccacttg
1621 aaactccatg gtgttttgct ttgttttgca acttccaaag gctaaactca caacactcca
1681 tatcaaatga tcaataaacg cagatgtaac tgggtgctga tg

```

Abb. 3.2: Sequenzanalyse der mRNA-Sequenz von AI451557 (wie in der NCBI-Datenbank hinterlegt). Grün unterstrichen ATG und Stopp-Codon des längsten ORF, rot unterstrichen Poly(A)-Signal.

3.2.2 Induzierbarkeit von AI451557 in ANA-1-Makrophagen

Das nächste Ziel war die Verifizierung der Array-Daten, wonach AI451557 unter IFN γ -Stimulation vermehrt exprimiert wird. Wie bereits bei der Untersuchung der Septine beschrieben, wurde auch hierfür ein spezifischer Realtime PCR-Assay erstellt und die Expressionsanalyse mit denselben cDNS-Proben durchgeführt. In Abb. 3.3 sind die relativen Expressionsunterschiede von AI451557 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die AI451557 mRNA nach IFN γ -Stimulation deutlich hochreguliert wird – wenn auch nicht in der gleichen Größenordnung wie mGBP1 (siehe Abb. 3.1). Die Behandlung der Makrophagen mit TNF α , LTA oder LPS hatte keinen Effekt auf die Expression von AI451557 in den Zellen. Somit konnten die Ergebnisse der Microarray-Untersuchung bestätigt werden.

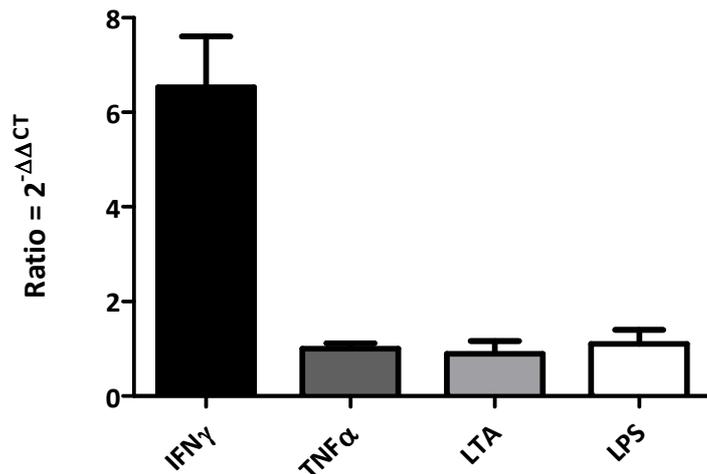


Abb. 3.3: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von AI451557 in ANA-1-Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und TLR-Liganden. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

3.2.3 *In vivo* Expression von AI451557 nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* und *Toxoplasma gondii*

Die Induktion der Expression von AI451557 durch IFN γ konnte *in vitro* eindeutig gezeigt werden. Da IFN γ bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt, sollte nun untersucht werden, ob die Expression von AI451557 *in vivo* durch Infektion mit den Modellorganismen *L. monocytogenes* und *T. gondii* beeinflusst wird. C57BL/6-Mäuse wurden *intraperitoneal* (i.p.) mit Listerien infiziert. Nach 8, 24 und 48 h wurden die Organe entnommen und aus Milz und Leber RNS aufbereitet. Nicht infizierte Tiere unter gleichen Haltungsbedingungen dienten als uninfizierte Kontrollen. Aus der RNS wurde cDNS synthetisiert und damit die Realtime PCR-Assays durchgeführt. Wieder wurden die relativen Expressionsunterschiede nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet. Diese sind in Abb. 3.4 dargestellt. Während die Transkriptmenge in Milzen von infizierten Mäusen 8 h p.i. noch unverändert war, wurde AI451557 24 h p.i. um den Faktor 2,5 stärker exprimiert als in uninfizierten Mäusen. Nach 48 h konnte keine weitere Steigerung der Expression nachgewiesen werden. In der Leber konnte keine Expressionsteigerung durch die Infektion mit Listerien nachgewiesen werden. Da die Expressionssteigerungen zwar messbar, aber eher gering sind, ließen sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Hypothesen bezüglich der Rolle von AI451557 bei der Abwehr von *L. monocytogenes* erstellen.

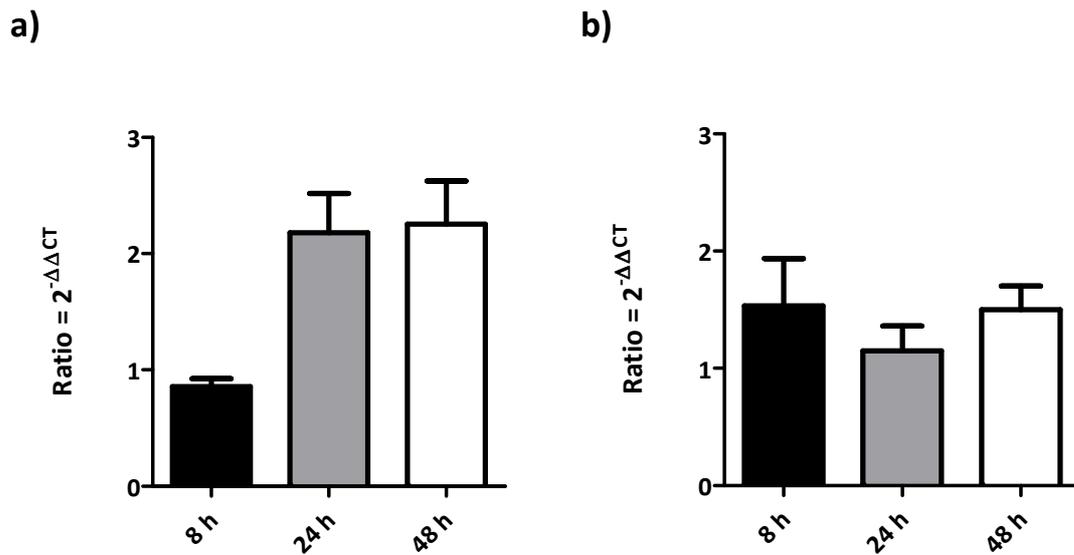


Abb. 3.4: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von AI451557 in a) Milz und b) Leber von mit *L. monocytogenes* infizierten Mäusen. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 8, 24 und 48 Stunden p.i.

In einem weiteren Infektionsmodell wurde die Expression von AI451557 in Milzen von C57BL/6-Mäuse untersucht, die mit dem obligat intrazellulären Parasiten *T. gondii* infiziert waren. Die hierfür benötigte RNS wurde zu cDNS umgeschrieben und damit die Realtime PCR durchgeführt. Wie in Abb. 3.5 dargestellt, bewirkte die akute Infektion mit *T. gondii* zu den Zeitpunkten 5 und 7 d p.i. keine Induktion von AI451557, während die Expression nach 12 d sogar gesunken ist.

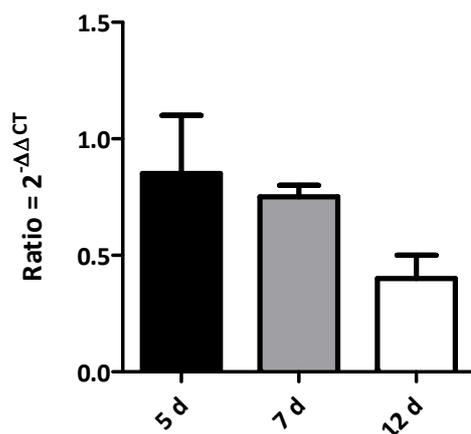


Abb. 3.5: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von AI451557 in der Milz von mit *T. gondii* infizierten Mäusen. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 5, 7 und 12 Tage p.i.

Nach diesen Ergebnissen scheint AI451557 nach Infektion mit intrazellulären Parasiten nicht induziert zu werden.

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation von AI451557 und Sequenzanalysen

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion von AI451557 zu erlangen, sollte nun die intrazelluläre Lokalisation des Proteins untersucht werden. Dazu wurde ein Expressionskonstrukt erstellt, bei dem am 3'-Ende der AI451557-Sequenz die cDNS für GFP (*green fluorescent protein*) angefügt wurde. So wird ohne zwischengeschaltetes Stopcodon ein Fusionsprotein translatiert, bei dem AI451557 mit dem N-Terminus von GFP fusioniert ist (AI451557-GFP, Abb. 3.6).



Abb. 3.6: Fusionsprotein AI451557-GFP, erstellt durch Klonierung des AI451557-ORF in die MCS des pEGFP-N1-Expressionsvektors (Kozak-deleted, CMV-Promotor, Kan^R, Neo^R)

Dieses wurde anschließend mittels Kalzium-Phosphat transient in 293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Expression des Fusionsproteins in den Zellen konnte es mit Licht spezifischer Wellenlänge (488 nm) angeregt und im Fluoreszenzmikroskop bei 507 nm detektiert werden. Nach Transfektion wurden im Doppelansatz zwei Klone (AI451557-GFP Klon 1 und 2) untersucht. Wie in Abb. 3.7 gezeigt, konnte bei beiden Klonen im Vergleich zum GFP-N1-Leervektor keine Lokalisationsunterschiede festgestellt werden. Wie in den dargestellten Aufnahmen war in allen Versuchen, sowohl bei GFP allein, als auch beim Fusionsprotein, die komplette Zelle eingefärbt.

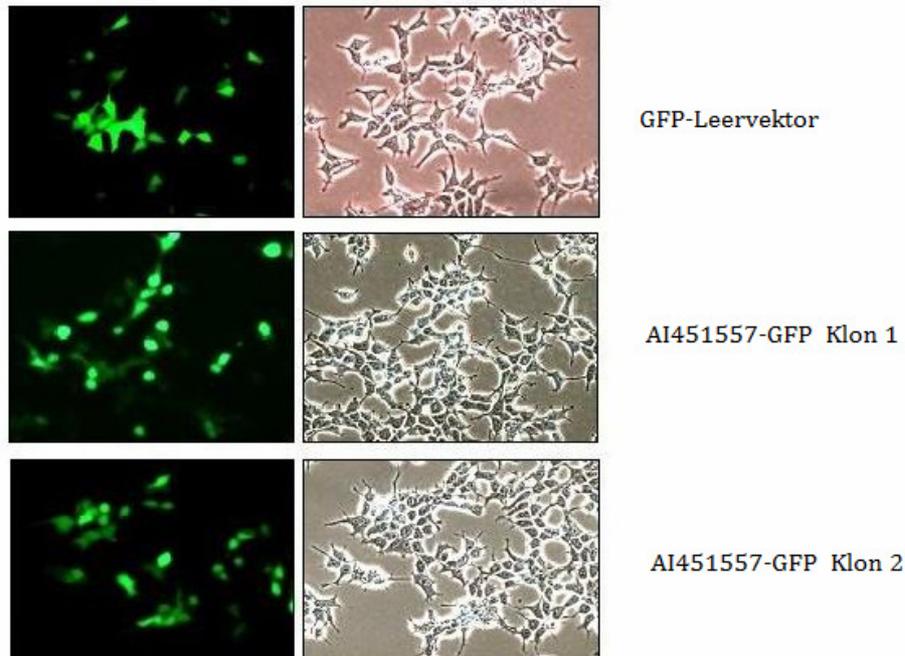


Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Lokalisation von AI451557. 293T-Zellen nach Transfektion mit zwei Klonen des Fusionsproteins AI451557-GFP sowie dem GFP-N1-Leervektor. In der rechten Spalte ist die Differential-Kontrastaufnahme des entsprechenden Zellverbandes dargestellt.

Um zu testen, ob tatsächlich ein Fusionsprotein vorliegt, wurden die Klone mehrfach vollständig sequenziert. Bei diesen Sequenzanalysen zeigte sich, dass im Vergleich zur Sequenz, die in der NCBI Nukleotid Datenbank hinterlegt war, bei allen untersuchten Klonen ein Baseneinschub von zwei Nukleotiden im ORF vorlag (Abb. 3.8, roter Kasten).

```

181 actttctact gtcccagtgg gagtcagaga cctctgctaa gtgctggtag taggggggaa
241 aggtgacttt gtcttgccctg ggatagga ATG GAG AAG GAA CAC CCC CTC
291 CCC TGC CTC CAG CCT C ac GCT TGC CTC TAT TTC CCT CTT GCC CTG CCA CTG TCC
343 ACT GCA AAG CTT GGA GTG GAA CCG GAT CAC AGC ACG TGG AGC CCA ACT CCT GGC
397 TCA AGG GCT GGT CCA GGG ATC CTG CGT CCC AGT CAT TCG CCT CTG GAA CAA CCC
451 CAT TCT TAA CG ATG TGG CCC AGA GTC TGC AGA GCC AGG AAC CCA GGC TGG ACT
504 TCT CCA TCA CTG ACC AGC AGA CTC TTT GAG GAA CCC AAC GGA CTT CTC AAG ACT
558 TAT GAG TCC AGT CCA GTG ACA GCC ACA TCA CCC ACC AGG AGA GGG GGC TCA GAA
612 GAA CCT CTG TTG GTG CCC AGC ATC CTA CGA ATG CCC CAG GAG GAA AGA ACA CAT
666 TTT TCC TGT CAC GAT CCC TAG gag cgcattctta gggactgaga gctttgtttg accaaaagag
730 ggccatatat catatatcat acatgacata

```

Abb. 3.8: Analyse der korrigierten Sequenz des ORF von AI451557. Es sind zwei zusätzliche Basen eingefügt (roter Kasten), die einen vorzeitigen Stop verursachen (rot unterstrichen). Ein weiteres ATG (grün unterstrichen) liegt im Vektor *in frame* mit GFP. Beginn und Ende des ursprünglich angenommenen ORF sind in Kästchen dargestellt.

Um diesen Sequenzunterschied zu verifizieren, wurde daraufhin die AI451557-Sequenz aus verschiedenen Zelllinien und Organen untersucht. In ANA-1-Makrophagen, RAW264.7-Makrophagen, murinen embryonalen Fibroblasten (mEF) aus CD1-Mäusen sowie Milz-cDNS aus C57BL/6-Mäusen lag jeweils der gleiche Sequenzfehler vor. Durch den Baseneinschub bricht die Translation bei nt 456 vorzeitig ab (Abb. 3.7, Stopcodon rot unterstrichen). Weiter N-terminal liegt jedoch ein weiteres ATG (Abb. 3.8, grün unterstrichen) *in frame* mit dem Leseraster von GFP. In den mit einem Fusionskonstrukt transfizierten Zellen wurde also entweder ein verkürztes Fusionsprotein oder nur GFP exprimiert. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde unabhängig von unseren Ergebnissen auch in der NCBI Datenbank der Vermerk hinzugefügt, dass die Sequenz eventuell nicht translatiert wird. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass für die Sequenz von AI451557, die wir untersuchten, möglicherweise kein funktionstüchtiges Protein existiert. Da nicht klar war, welche Sequenz translatiert wird, wurde im Rahmen dieser Dissertation die Analyse von AI451557 nicht weiter verfolgt.

3.3 VLIG-1 und „similar to VLIG“

3.3.1 Charakterisierung von „similar to VLIG“

Außer AI451557 sollte auch noch ein weiteres Transkript untersucht werden, das während der Datenbank-Recherchen auf Grund der Bezeichnung (*similar to VLIG*) auffiel. Dabei handelt es sich um eine cDNS-Sequenz mit der Accession Nummer AK018585. In der NCBI Nukleotid Datenbank wurde AK018585 auf Grund von 97% Sequenzhomologie zu VLIG-1 als „*similar to VLIG*“ (stVLIG) bezeichnet. Allerdings ist die mRNA-Sequenz im Vergleich zu VLIG-1 deutlich kürzer. Während VLIG-1 9040 nt lang ist, umfasst die stVLIG-mRNA nur 2133 nt. stVLIG ist homolog zu den Nukleotiden 6470–8604 von VLIG-1. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz ist in diesem Bereich zu 92% identisch mit dem VLIG-1-Protein. stVLIG ist allerdings keine GTPase, da der p-loop von VLIG-1 außerhalb dieses Bereichs liegt. Der längste ORF umfasst 1062 nt (nt 54–1115) und liegt *in frame* mit dem VLIG-1-ORF. Ein Poly(A)-Signal findet sich bei nt 2115–2120. stVLIG liegt im Mausgenom auf Chromosom 7. Mehr Informationen über stVLIG lagen zu Beginn der Untersuchungen nicht vor. Abb. 3.9 zeigt schematisch die Sequenzhomologien von VLIG-1 und „similar to VLIG“.

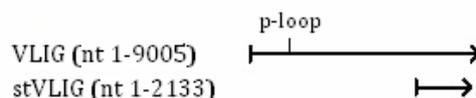


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der homologen Sequenzbereiche von VLIG und stVLIG. Senkrechter Strich = Beginn der mRNA-Sequenz, Pfeil = Ende der mRNA-Sequenz.

Von VLIG-1 war bereits bekannt, dass diese durch $\text{IFN}\gamma$ induziert wird. Die im Northern Blot gemessene Expressionsrate war nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation 100–200-mal so hoch wie in unstimulierten Zellen (Klamp et al., 2003). Die Induzierbarkeit wurde auch durch die Transkriptomanalyse bestätigt. Dort war die Expression von VLIG-1 jedoch nur 5,9-fach erhöht. Es zeigte sich kein Synergismus von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$.

3.3.2 Induzierbarkeit von VLIG-1 und „similar to VLIG“ in ANA-1-Makrophagen

Um die bisherigen Ergebnisse zur Induzierbarkeit der beiden Gene zu validieren, wurde wie bereits oben beschrieben ein spezifischer Realtime PCR-Assay erstellt. Um

spezifische Assays für die hoch-homologen Gene zu erstellen, wurde zunächst für VLIG-1 ein Amplicon gewählt, das in dem Teil der Sequenz liegt, der bei stVLIG fehlt. Für das Amplicon von stVLIG wurde dann ein Bereich mit möglichst vielen Sequenzunterschieden ausgesucht. Obwohl sich der Forward-Primer nur in einem Nukleotid von der VLIG-1-Sequenz unterscheidet, konnte über den Reverse-Primer (~50% unterschiedliche Nukleotide) doch eine ausreichende Spezifität erreicht werden. Wie in Abb. 3.10 dargestellt, konnte die Realtime PCR die vorhergegangenen Ergebnisse bezüglich der IFN γ -Induzierbarkeit von VLIG-1 zumindest qualitativ bestätigen. Der Faktor, um den die Expression gesteigert wurde, lag mit ca. 15 zwischen den Ergebnissen, die Northern Blot (Klamp et al., 2003) und Microarray (Degrandi et al., 2009) zuvor erbracht hatten. Auch für stVLIG ergab sich eine leichte Steigerung der Expression. Die Behandlung der Makrophagen mit TNF α , LTA oder LPS hatte keinen Effekt auf die Expression der beiden Gene.

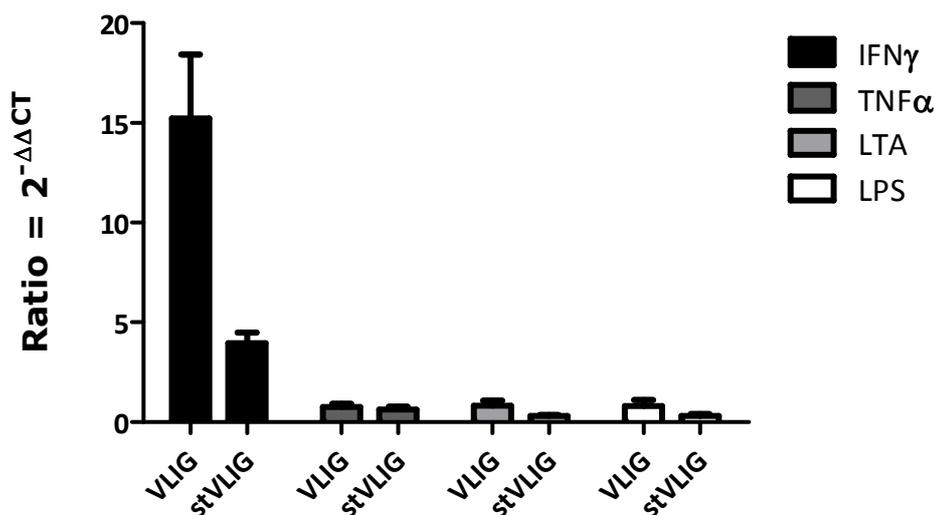


Abb. 3.10: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von VLIG-1 und stVLIG in ANA-1-Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und TLR-Liganden. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta CT}$) der beiden Gene. Verdünnung des cDNS-Templates für VLIG-1 1:10, für stVLIG 1:2.

Da stVLIG jedoch insgesamt deutlich schwächer exprimiert war als VLIG-1, musste die fünffache Menge an cDNS eingesetzt werden, um überhaupt eine Detektion zu ermöglichen. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass auch mit dem stVLIG-Assay VLIG-1 detektiert wird – mit deutlich geringerer Effektivität auf Grund des schlechteren Primer Matchings. Um zu zeigen, dass tatsächlich auch stVLIG-mRNS im Template vorliegt, entwarfen wir eine differenzierende, konventionelle PCR. Hierzu wurde erneut in einem möglichst wenig homologen Bereich ein identischer Forward-Primer mit

differenzierenden Reverse-Primern gepaart. Auch die Amplicons wiesen spezifische Sequenzunterschiede auf, waren jedoch gleich lang. So konnten die beiden PCR-Ansätze nach IFN γ -Stimulation von ANA-1-Makrophagen unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Beide Ansätze erbrachten, wie in Abb. 3.11 dargestellt, ein Produkt, wobei das stVLIG-Amplicon wieder in deutlich geringerer Konzentration vorlag.

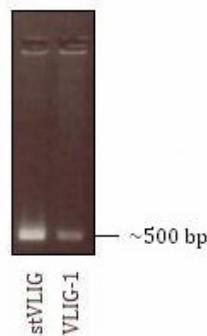


Abb. 3.11: PCR-Produkte der zwischen VLIG-1 und stVLIG differenzierenden PCR. Der Ansatz wurde mit einem identischen Forward-Primer und differenzierenden Reverse-Primern durchgeführt.

Durch Klonierung mittels des pCR II-Vektors und Sequenzierung mehrerer PCR-Ansätze konnten wir jedoch zeigen, dass die PCR-Ansätze spezifisch unterschiedliche Amplicons vervielfältigten – also zwischen den Genen differenzierten (Abb. 3.12). Daraus folgt, dass stVLIG nach IFN γ -Stimulation in geringer Rate transkribiert wird.

VLIG-1 NCBI	ATTAGTATAGAA TAGAGAATAGATGATTCTCCAGTATAGCTGAACAAGACTACAAAAAT
VLIG-1 PCR-Produkt	ATTAGTATAGAA TAGAGAATAGATGATTCTCCAGTATAGCTGAACAAGACTACAAAAAT
stVLIG NCBI	ATTAGTATAGAA TAGAGAATAGATGATTATCCAGTCTTGCTGAACAAGACTTCAAAAAAT
stVLIG PCR-Produkt	ATTAGTATAGAA TAGAGAATAGATGATTATCCAGTCTTGCTGAACAAGACTTCAAAAAAT
VLIG-1 NCBI	AAGATGTAAGAGAGATTGTTCTTCGTAAATACAGATTGATCACCATCTAAGCATATGG
VLIG-1 PCR-Produkt	AAGATGTAAGAGAGATTGTTCTTCGTAAATACAGATTGATCACCATCTAAGCATATGG
stVLIG NCBI	AAGATGTAAGAGGGATTGTTTCTTTGTAAATACAGATTGATCATCATCTAAGCATATGG
stVLIG PCR-Produkt	AAGATGTAAGAGGGATTGTTTCTTTGTAAATACAGATTGATCATCATCTAAGCATATGG
VLIG-1 NCBI	AAAACCTGCTACTGTAGACTTGGCTTGCTTAAACATTGTTAATCAATAACAAAAAATT
VLIG-1 PCR-Produkt	AAAACCTGCTACTGTAGACTTGGCTTGCTTAAACATTGTTAATCAATAACAAAAAATT
stVLIG NCBI	AAAACCTCGCTACTGTAGACTTGGCTTGCTTAAACATTGTTAATCAATAACAAAAAAGAGT
stVLIG PCR-Produkt	AAAACCTCGCTACTGTAGACTTGGCTTGCTTAAACATTGTTAATCAATAACAAAAAAGAGT
VLIG-1 NCBI	ATAGCTTTAGGTTTGCTATGGAGAAAAAGATGAGAGAACGTTAGATGAGAAATGCTTAG
VLIG-1 PCR-Produkt	ATAGCTTTAGGTTTGCTATGGAGAAAAAGATGAGAGAACGTTAGATGAGAAATGCTTAG
stVLIG NCBI	ATGGCTTTAGGTTTGCTATGGAGAAAAAGATGAGAGAACGTTAGATGAGAAATGCTTAG
stVLIG PCR-Produkt	ATGGCTTTAGGTTTGCTATGGAGAAAAAGATGAGAGAACGTTAGATGAGAAATGCTTAG
VLIG-1 NCBI	GTATGAGTTTCAAAGAGAAATACACAATCAATGCTCCTGTTGTAAT---CTCTTGTGT
VLIG-1 PCR-Produkt	GTATGAGTTTCAAAGAGAAATACACAATCAATGCTCCTGTTGTAAT---CTCTTGTGT
stVLIG NCBI	GTATGAGTTTCAAAGAGAAATACACAATCAATACTCCTGTTGTAATCTCCTCTTGTGT
stVLIG PCR-Produkt	GTATGAGTTTCAAAGAGAAATACACAATCAATACTCCTGTTGTAATCTCCTCTTGTGT

Abb. 3.12: Sequenzierung der Amplicons von VLIG-1 und stVLIG aus der differenzierenden PCR. Vergleich mit den entsprechenden bei NCBI hinterlegten Sequenzen. Dargestellt sind die nt 8156–8450 von VLIG-1 (294 von 514 bp des PCR-Amplicons). Rot markiert sind Sequenzunterschiede zwischen VLIG-1 und stVLIG.

Um eine verlässliche Aussage bezüglich des Verhaltens der stVLIG-Expression nach Stimulation mit IFN γ zu erhalten, wurde jetzt mit oben beschriebenem PCR-Ansatz eine semiquantitative PCR mit GAPDH als Housekeeping-Gen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente VLIG-1. Die semiquantitative PCR zeigte eine leicht erhöhte Expression von stVLIG in ANA-1-Makrophagen, die mit IFN γ stimuliert wurden (Abb. 3.13).

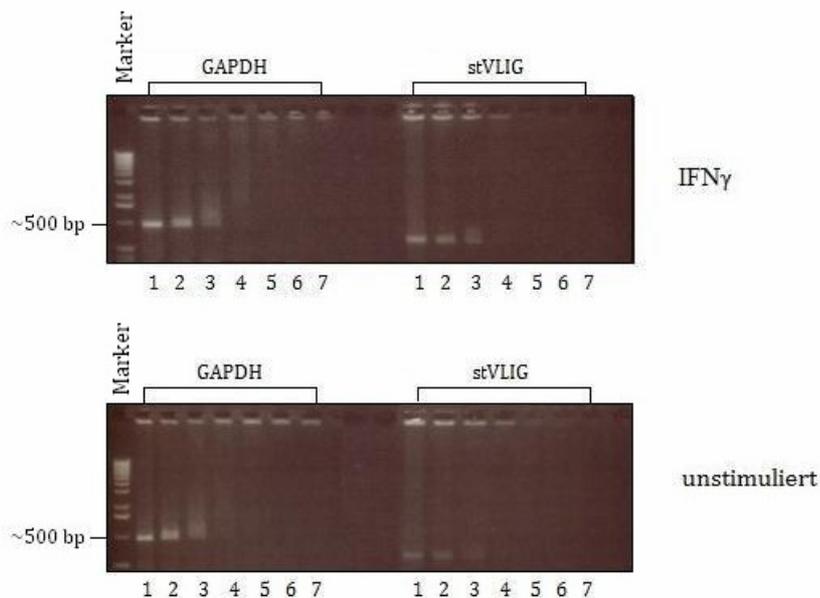


Abb. 3.13: Semiquantitative PCR-Analyse der Expression von stVLIG in ANA-1-Makrophagen mit und ohne Stimulation durch IFN γ . Mit 1-7 sind die Verdünnungsschritte (je 1:3) bezeichnet. Als Marker wurde die 1 kb-Leiter genutzt.

Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse wurde anschließend noch ein Northern Blot angefertigt. ANA-1-Makrophagen, Wt mEFs und IRF-1 $^{-/-}$ -mEFs wurden jeweils 16 h mit IFN γ stimuliert und anschließend die RNS aus stimulierten und unstimulierten Zellen isoliert. Als Grundlage für die Sonde diente das Amplicon der differenzierenden PCR (Sequenzvergleich siehe Abb. 3.12). Bei der Hybridisierung mit 60°C zeigte sich nur eine Bande bei circa 9000 Nukleotiden, die wir VLIG-1 zuordneten (Abb. 3.14), da auch die Northern Blot-Sonde zu 96% homolog zu VLIG-1 war. Wie nach den bisherigen Ergebnissen erwartet, zeigte sich im Blot eine deutliche Induktion der detektierten mRNA durch IFN γ . In den unstimulierten Zellen konnten wir keine Hybridisierung nachweisen. Im Vergleich mit den Wt-mEFs, fiel die Bande für die IRF-1 $^{-/-}$ -mEFs nach IFN γ -Stimulation deutlich schwächer aus. Das deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor IRF-1 eine Rolle bei der Induktion des von uns detektierten Gens spielt. Auch

durch Absenken der Hybridisierungstemperatur auf 56°C konnte kein Produkt detektiert werden, das in seiner Größe der stVLIG-mRNS entsprochen hätte.

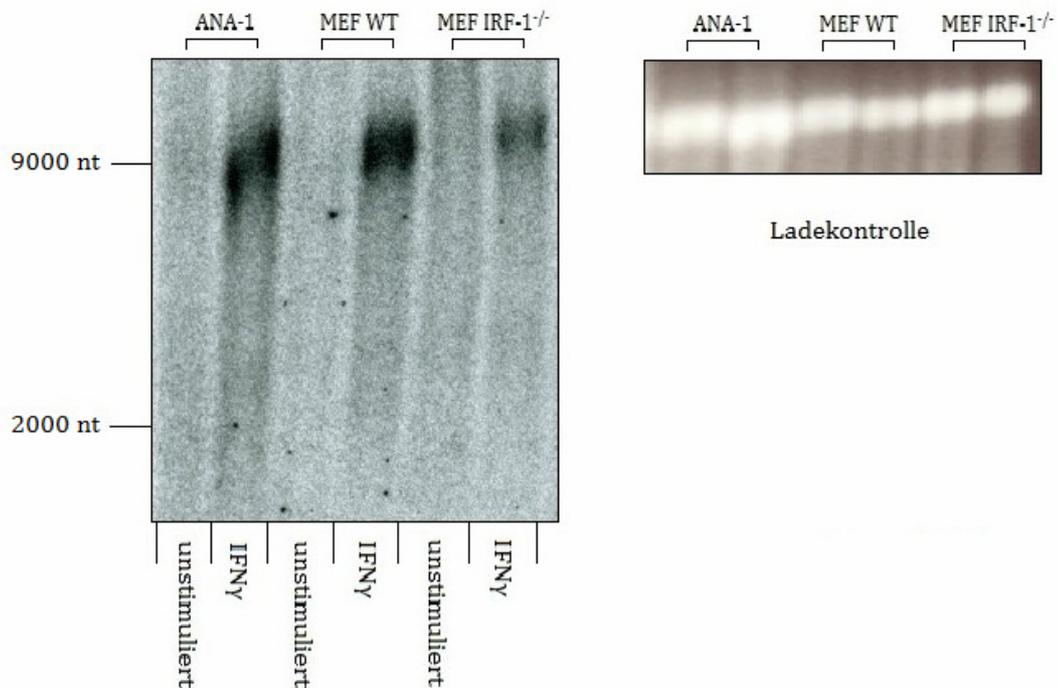


Abb. 3.14: Größenbestimmung von stVLIG im Northern Blot. ANA-1-Makrophagen, Wt und IRF-1^{-/-}-mEF wurden 16 h mit IFN γ stimuliert. Die Gesamt-RNS wurde aus den Zellen gewonnen und je 20 μ g aufgetragen. Die VLIG-1-mRNS wird bei 9000 nt erwartet, die stVLIG-mRNS bei 2000 nt.

3.3.3 *In vivo* Expression von VLIG-1 nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Wir konnten mittels unseres Realtime PCR-Assays bisherige Untersuchungen bestätigen, nach denen VLIG-1 *in vitro* durch IFN γ induziert wird (siehe Abb. 3.10). *In vivo*, nach Infektion mit *L. monocytogenes*, wurden bisher sowohl im Northern Blot als auch im Western Blot massive Expressionssteigerungen gezeigt (Klamp et al., 2003). Diese Ergebnisse sollten nun ebenfalls durch den getesteten Realtime PCR-Assay bestätigt und quantifiziert werden. RNS aus Milzen von Listerien-infizierten C57BL/6-Mäusen wurde in cDNS umgeschrieben und in der Realtime PCR gemessen. Anschließend wurden die gemessenen Expressionsunterschiede mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet. Den bisherigen Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten entsprechend, konnte auch in der Realtime PCR eine Expressionssteigerung nach Infektion mit *L. monocytogenes* nachgewiesen

werden. Die Transkription von VLIG-1 war nach 24 h 5-fach und nach 48 h 10-fach höher als in den uninfizierten Kontrollen (Abb. 3.15).

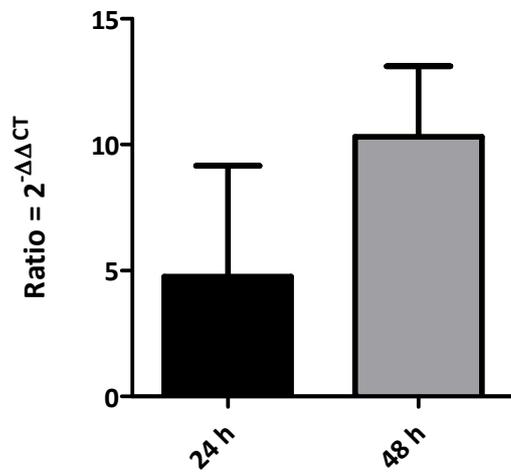


Abb. 3.15: Realtime-Analyse der Expressionssteigerung von VLIG-1 in der Milz von mit *L. monocytogenes* infizierten Mäusen. Dargestellt ist die Ratio ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 24 und 48 Stunden p.i.

4 Diskussion

4.1 Septine in der Pathogenabwehr

Die Expression mehrerer GTPasen-Familien wird im Rahmen der Immunantwort durch IFN γ induziert (Degrandi et al., 2007; Klamp et al., 2003; Lapaque et al., 2006; Zerrahn et al., 2002). Für einige dieser Proteine konnte auch schon in weiterführenden Untersuchungen eine Rolle bei der Pathogenabwehr nachgewiesen werden. So gelangen alle IRGs (außer LRG-47), wie auch die GBPs, in mit *T. gondii* infizierten Zellen zur parasitophoren Vakuole (PV) (Degrandi et al., 2007; Martens et al., 2005), während LRG-47 in Makrophagen zu mykobakterienhaltigen Phagosomen transloziert (MacMicking et al., 2003). Mäuse mit Defekten der p47-GTPasen sind verstärkt suszeptibel gegenüber Infektionen mit Parasiten und Bakterien (MacMicking, 2005; Martens und Howard, 2006; Taylor et al., 2004). Einen weiteren Hinweis auf eine Funktion von GBPs in der antibakteriellen Immunantwort liefern Expressionsstudien in Milz- und Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen. Hier waren alle mGBPs 24h p.i. verstärkt exprimiert (Degrandi et al., 2007).

Auf der Suche nach weiteren Effektorproteinen der IFN γ -vermittelten Pathogenabwehr, wurden neben den umfangreichen Transkriptomanalysen im Rahmen dieser Dissertation auch weitere GTPasen-Familien untersucht. Auf Grund der Struktur ihrer GTP-bindenden Domäne wurden hierbei die ebenfalls zu den p-loop GTPasen gehörenden Septine identifiziert (Leipe et al., 2002). Da die Funktion der GTPasen von einer funktionellen GTP-Bindungsdomäne abhängt (Bourne et al., 1991; Bourne, 1995), könnte die strukturelle Verwandtschaft der Septine mit den p65- und p47-GTPasen sowie den VLIGs auf ähnliche biochemische Eigenschaften oder Funktionsweisen der Proteine hindeuten. In umfangreichen Literaturrecherchen zeigte sich, dass die humanen Septine bereits mit Infektionen durch *L. monocytogenes* und Vorgängen während der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht wurden (Huang et al., 2008; Mostowy et al., 2009a; Mostowy et al., 2009b; Pizarro-Cerdá et al., 2002). Außerdem werden einige Septine vorwiegend in lymphatischem Gewebe exprimiert (Hall et al., 2005), was ebenfalls auf eine Funktion während der Immunreaktion hindeuten könnte. Während der Zellmigration von Immunzellen (vor allem Makrophagen) nach chemotaktischer Anlockung, werden Aktin-Fibrillen in Bewegungsrichtung verlängert und Membranvesikel entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert und

eingebaut. Fokale Adhäsionsstellen sorgen für den Kontakt mit der extrazellulären Matrix (Le Clainche und Carlier, 2008). Septine assoziieren mit dem Aktin-Skelett und den Mikrotubuli (Kinoshita et al., 1997; Surka et al., 2002), haben Funktionen während des Vesikeltransports und der Exozytose (Beites et al., 1999) und ko-lokalisieren mit fokalen Adhäsionsstellen (Kinoshita et al., 1997). Damit ist eine Beteiligung eines oder mehrerer Septine bei der Zellmigration wahrscheinlich. TNF α induziert die Bildung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen im Rahmen dieser Chemotaxis (Roach et al., 2002), könnte also auch einen Effekt auf die Expression der daran beteiligten Septine ausüben. Keines der von uns untersuchten Septine ließ sich jedoch nach Stimulation von Makrophagen mit TNF α vermehrt nachweisen. SEPT2 und 11 sind anscheinend bei der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose durch professionelle Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) beteiligt, da sie an der Phagozytose-Stelle akkumulieren und die Phagozytose durch ihr Fehlen beeinträchtigt wird (Huang et al., 2008). Unklar bleibt, ob eine vermehrte Expression der Septine diese Vorgänge verbessert. Die Phagozytose wird unter anderem durch die TLR-Liganden LTA und LPS induziert (Takeda et al., 2003). Die IFN γ -vermittelte Aktivierung der Makrophagen verstärkt deren Phagozytoseaktivität und verbessert das Verschmelzen der Phagosomen mit Lysosomen (Janeway et al., 2005). Vor diesem Hintergrund wäre eine Induktion der Septine durch IFN γ oder TLR-Liganden denkbar. Wir konnten jedoch für die meisten murinen Septine – darunter Sept2 und 11 – zeigen, dass in ANA-1-Makrophagen eher eine Reduktion der Expression durch IFN γ , LTA oder LPS erfolgt. Dies schließt jedoch eine fördernde Beteiligung der Septine bei oben genanntem Vorgang nicht aus. Ein Komplex aus den humanen SEPT2, 9 und 11 scheint am InlB-vermittelten Eindringen von *L. monocytogenes* in Zellen beteiligt zu sein. Allerdings zeigten Mostowy et al. diesbezüglich eher eine pro-infektiöse Funktion von SEPT2, da dessen Inaktivierung durch siRNA zu verringerter *L. monocytogenes*-Invasion führt (Pizarro-Cerdá et al., 2002; Mostowy et al., 2009a). Unsere Untersuchungen lassen nach Stimulation mit IFN γ eine verminderte Expression des murinen Sept9 – und anderer Septine – vermuten. Dies könnte einen Mechanismus der Immunabwehr aufzeigen, der unter Einfluss von IFN γ die Invasion von intrazellulären Bakterien erschwert. Hierzu müssten weiterführende Studien zeigen, ob Sept9 tatsächlich nach Stimulation mit IFN γ oder *in vivo* nach Infektion mit *L. monocytogenes* vermindert exprimiert wird. In der Folge wäre dann interessant, ob durch die verminderte Transkription von Sept9 auch die Invasion von Bakterien erschwert wird. Dies ist nicht notwendigerweise zu erwarten, da gezeigt

werden konnte, dass die Inaktivierung von SEPT11 die Aufnahme von Listerien sogar verbessert (Mostowy et al., 2009b). Allerdings beruhen die meisten bisher bekannten Fakten zu den Septinen auf Untersuchungen der humanen Proteine. Es ist unbekannt, ob die murinen Septine jeweils wie die homologen Proteine im Menschen zu behandeln sind. Die übrigen IFN γ -induzierbaren GTPasen-Familien scheinen in ihrer Funktion bei verschiedenen Säugetier-Familien eher wenig konserviert zu sein (Bekpen et al., 2005; Boehm et al., 1998; Klamp et al., 2003). Das könnte an der schnellen evolutionären Entwicklung zur Anpassung an sich stetig verändernde Pathogene liegen (Bekpen et al., 2005).

Während der Expressionsstudien an den verschiedenen murinen Septinen ergaben sich bei zwei der bis dato bekannten Septine Schwierigkeiten im Assay-Design. Für Sept10 konnte auf Grund der hohen Sequenz-Homologie mit Sept6 kein spezifisches Primer-Paar gefunden werden, während sich für Sept4 auch nach multiplen Versuchen mit unterschiedlichen Primern kein funktionierender Assay erstellen ließ. Hall et al. wiesen das humane SEPT4 – und hier vor allem die Spleiß-Varianten 1 und 3 – deutlich vermehrt in Hirn-Gewebe nach. Insgesamt jedoch zeigte sich eine ubiquitäre Expression in allen getesteten Geweben (Hall et al., 2005). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass Sept4 – zumindest in der getesteten Spleiß-Variante – in ANA-1-Makrophagen nur in äußerst geringen Mengen exprimiert wird. Hier wäre also eine Testung bei geringerer Verdünnung des cDNS-Templates zielführend. Alternativ könnte auch die Induzierbarkeit von Sept4 in anderen Zelltypen untersucht werden, die möglicherweise eine höhere Expression als ANA-1-Makrophagen aufweisen. Für Sept10 hätte die Möglichkeit bestanden, die Expression im Northern Blot zu messen, oder auf die Universal Probe Library zu verzichten und klassische Taqman-Sonden und passende Primer zu erstellen. Diese aufwändigeren Methoden wurden zunächst zurückgestellt, während für die übrigen murinen Septine Realtime PCR-Assays durchgeführt wurden. Da sich bei keinem der getesteten Septine ein Induktion durch IFN γ , TNF α , LTA oder LPS ergab, ist es wenig wahrscheinlich, dass Sept4 und 10 in relevantem Maß beeinflusst werden. Deshalb verzichteten wir auf weitere Untersuchungen. Bei zwei anderen IFN γ -induzierbaren GTPasen-Familien (IRGs und GBPs) werden typischerweise alle bisher beschriebenen Mitglieder mehr oder weniger nach IFN γ -Stimulation hochreguliert (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007). Lediglich bei den noch wenig charakterisierten VLIGs konnte bisher nur für VLIG-1 eine Hochregulation durch IFN γ nachgewiesen werden (Klamp et

al., 2003). Es wäre also möglich, dass Sept4 und/oder 10 die einzigen Septine sind, die unter Einfluss von IFN γ vermehrt exprimiert werden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür schätzten wir jedoch eher gering ein, da Sept4 und 10 nur in eher geringem Maß in lymphatischem Gewebe exprimiert werden (Hall et al., 2005), und bisher eher mit Neoplasien in Verbindung gebracht wurden. Aus oben genanntem Grund haben wir auch nicht alle möglichen Spleißvarianten der Septine untersucht, sondern jeweils nur die längste Isoform. Allerdings wäre auch hier eine unterschiedliche Induzierbarkeit der verschiedenen Spleißvarianten möglich, da diese auch in ihren Expressionsprofilen differieren (Hall et al., 2005).

4.2 AI451557 – ein Pseudogen?

Auf der Suche nach weiteren IFN γ -Effektorproteinen, wurde im zweiten Abschnitt dieser Arbeit eine Microarray Transkriptomanalyse ausgewertet. Hierfür waren ANA-1-Makrophagen mit IFN γ oder TNF α sowie einer Kombination von IFN γ und TNF α stimuliert worden. So konnten verschiedene weitere Gene identifiziert werden, die unter IFN γ -Einfluss vermehrt exprimiert werden (Degrandi et al., 2009). Darunter war auch eine kurze exprimierte Sequenz mit der Accession Nummer AI451557. Laut der GeneChip-Analyse sollte das Gen nach Stimulation mit IFN γ 4,2-fach stärker exprimiert werden. Eine Ko-Stimulation mit IFN γ und TNF α brachte keine weitere Steigerung der Expression. Unsere Ergebnisse bestätigen grundsätzlich die Transkriptomanalyse, zeigen aber eine geringfügig stärkere Expressionssteigerung auf das 6,3-fache des Ausgangswertes. Dies deckt sich mit bisherigen Erfahrungen, nach denen die Ergebnisse von Array Hybridisierungen zwar qualitativ meist mit denen sensitiverer Untersuchungen übereinstimmen, quantitativ aber durchaus abweichen können (Rajeevan et al., 2001). Im Mikroarray wirkte die alleinige Stimulation mit TNF α nicht expressionssteigernd auf AI451557. Die Stimulation mit IFN γ + TNF α verursachte lediglich eine Hochregulation ähnlich der durch IFN γ allein (Degrandi et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte für TNF α allein ebenfalls kein Effekt auf die Expression von AI451557 nachgewiesen werden. Auch über den TLR-Signalweg (Stimulation mit LPS und LTA) erfolgte keine Induktion der Transkription. Um zu zeigen, dass AI451557 auch *in vivo* während der Pathogenabwehr verstärkt exprimiert wird, wurden Mäuse mit *L. monocytogenes* sowie *T. gondii* (Stamm ME49) infiziert. Diese beiden Erreger dienten hierbei als Modellorganismen für intrazellulär replizierende Bakterien und

Parasiten. Nach der intraperitonealen Infektion mit Listerien finden sich die ersten Infektionsherde in der Milz und Leber (Hof et al., 1997). Zunächst wird hier die Replikation der Bakterien durch das angeborene Immunsystem eingedämmt. Hierbei dominieren in den infektiösen Foci neutrophile Granulozyten (Conlan, 1999). Erst nach zwei Tagen findet in der Milz eine verstärkte Einwanderung von Makrophagen und damit die Aktivierung der adaptiven Immunantwort statt (Mandel und Cheers, 1980). In den Milzen der infizierten Tiere konnten wir nach 24 h eine leichte Hochregulation von AI451557 nachweisen. Nach 48 h war die Expression nicht mehr signifikant gestiegen. Dies bedeutet, dass die Expression von AI451557 zwar *in vitro* in ANA-1-Makrophagen stimuliert werden kann, aber *in vivo* die Einwanderung von Makrophagen in das infizierte Gewebe nicht zu einer vermehrten Expression des Transkripts führt. Die leicht gesteigerte Transkription wäre dann vor allem auf eine vermehrte Expression in Granulozyten oder anderen Zellen zurückzuführen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das AI451557-Transkript zum späteren Zeitpunkt bereits teilweise degradiert ist. In diesem Fall könnte die vermehrte Expression durch Einwanderung der Makrophagen durch gleichzeitigen Abbau ausgeglichen werden. Bei anderem Ergebnis der weiteren Untersuchung hätte man hier noch ausführlichere Expressionsstudien durchführen können. Interessant wäre zum Beispiel, inwieweit andere Zelltypen außer Makrophagen (etwa Granulozyten) AI451557 exprimieren und ob sich diese Expressionsmuster durch Infektionen oder Stimulation mit Zytokinen beeinflussen lassen. Insgesamt spricht aber die recht niedrige Expressionssteigerung (unter 2,5-fach) eher dafür, dass AI451557 während einer Listerien-Infektion nicht an der Immunabwehr beteiligt ist.

Um weitere Hinweise auf die Funktion von AI451557 zu erlangen, wurde als nächstes ein Fusionsprotein kloniert, um die subzelluläre Lokalisation des Proteins darzustellen. Falls AI451557 tatsächlich bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielt, würde man eine Ko-Lokalisation mit den entsprechenden Pathogenen erwarten. Dazu wurde der ORF von AI451557 mit dem N-Terminus von GFP fusioniert und in 293T-Zellen kloniert. Da das AI451557-GFP-Konstrukt jedoch die gleiche ubiquitäre subzelluläre Verteilung aufwies wie GFP alleine, schien dieses Fusionsprotein nicht zielführend. Eine weitere Möglichkeit ist die Fusion des Zielgens mit dem C-Terminus des fluoreszierenden Proteins. Dadurch wird vermieden, eventuelle Signalsequenzen am C-Terminus des Zielproteins zu verdecken. Als wir jedoch das Konstrukt sequenzieren ließen, um nachzuweisen, dass in den transfizierten Makrophagen tatsächlich ein Fusionsprotein

vorliegt, fiel bei allen untersuchten Klonen ein Sequenzunterschied im Vergleich zur Datenbank auf. Durch den Baseneinschub bricht der ORF vorzeitig ab, sodass sich kein funktionstüchtiges Protein ergibt. Ob in den transfizierten Zellen nur GFP oder ein verkürztes Fusionsprotein mit einem alternativen ATG exprimiert wurde, blieb unklar. Auf einen Nachweis des Fusionsproteins im Western Blot wurde verzichtet, da sich dieser Baseneinschub in verschiedenen Zelltypen und Mauslinien reproduzieren ließ. Entweder der NCBI-Sequenz liegt ein Klonierungsfehler zu Grunde, oder es existiert ein Polymorphismus und das Gen liegt in NOD-Mäusen (*non-obese diabetic mouse*), von denen die NCBI-Sequenz stammt, tatsächlich in dieser Form vor. Zwischenzeitlich wurden jedoch die Sequenzinformationen in der Datenbank mit einem Hinweis versehen, dass bisher nur das Transkript, nicht aber das Protein nachgewiesen werden konnte. Wir verzichteten auf Grund der Informationen aus der Datenbank darauf, die Expressions des Proteins mittels Western Blot zu untersuchen. Möglicherweise handelt es sich bei der exprimierten Sequenz AI451557 um ein Pseudogen oder um eine regulatorische RNS-Sequenz.

4.3 VLIG-1 und „similar to VLIG“

VLIG-1 ist ein bereits genauer charakterisiertes Protein aus einer neuen Familie der GTPasen. Expressionsanalysen mittels Northern Blotting zeigen in ANA-1-Makrophagen eine ausgeprägte Hochregulation nach Stimulation mit IFN γ (100–200-fach), während durch TNF α die Expression nur geringfügig stimuliert wird (Klamp et al., 2003). Auch in der Array Analyse wurde VLIG-1 durch IFN γ hochreguliert – hier um den Faktor 5,8. TNF α -stimulierte Zellen zeigten hier keine Expressionssteigerung (Degrandi et al., 2009). Dies deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen unserer Arbeit. In den Realtime PCR-Assays war die Expression nach Stimulation mit IFN γ 15-fach stärker als in unstimulierten Zellen, sodass das von uns gemessene Ausmaß der Hochregulation zwischen den Ergebnissen von Northern Blot und Microarray liegt. Dabei gilt die Realtime PCR als sensitivste Methode zur Quantifizierung von Transkripten (Streit et al., 2009). Eine Ursache für die erheblichen Unterschiede in der Expression könnte die unterschiedliche Expositionsdauer von IFN γ während der Stimulation sein. In der vorliegenden Untersuchung sowie für die Transkriptomanalyse wurden die ANA-1-Makrophagen maximal 16 h stimuliert, wohingegen die Zellen für den Northern Blot bis zu 24 h stimuliert wurden. Allerdings zeigte die Induktionskinetik dort zwischen 12 h

und 24 h nur noch einen leichten Anstieg der Expression (Klamp et al., 2003). Dementsprechend dürfte eine Stimulationsdauer von 16 h nur eine geringfügig niedrigere Expressionssteigerung verursachen.

Es war bereits bekannt, dass VLIG-1 massiv in Lebergewebe von Listerien-infizierten C57BL/6-Mäusen induziert wird, während die Induktion in IFN γ -knockout-Mäusen ausbleibt (Klamp et al., 2003). Wir konnten jetzt zeigen, dass VLIG-1 auch in der Milz von infizierten C57BL/6-Mäusen deutlich hochreguliert wird. Die Expression lag hier nach 24 h beim 5-fachen und nach 48 h beim 10-fachen des Ausgangswertes. Dieser deutliche Anstieg im Verlauf der Infektion unterstützt die bisherigen Untersuchungen, die eine Funktion von VLIG-1 bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene vermuten lassen. Schon während der Charakterisierung von VLIG-1 konnten im Western Blot auch andere Polypeptide (mit einem zum Teil deutlich kleineren Molekulargewicht) identifiziert werden, die ebenfalls durch IFN γ induzierbar waren. Dabei könnte es sich um Abbau-Produkte oder missgefaltete VLIG-1 Proteine handeln. Eine andere Möglichkeit, die in Betracht gezogen wurde, waren kleinere "VLIG-ähnliche" Proteine, deren Sequenz so homolog zu VLIG-1 ist, dass sie ebenfalls durch die Antiseren detektiert wurden (Klamp et al., 2003). Während unserer Datenbank-Analysen der Microarray-Ergebnisse fiel ein vorhergesagtes Protein (*similar to VLIG*) auf, das womöglich zu diesen "VLIG-ähnlichen" Polypeptiden gehört. Allerdings dürfte dieses spezielle Protein nicht durch die verwendeten Antiseren (VLIG-1/B: AS 270–541; VLIG-1/218: AS 9–24 + 1036–1050) detektiert werden, da es zum C-Terminus von VLIG-1 (AS 2060–2427) homolog ist. Damit ist stVLIG keine GTPase, da der p-loop von VLIG-1 weiter N-terminal liegt. Für den Fall, dass stVLIG tatsächlich in ein funktionstüchtiges Protein translatiert würde, wäre es interessant zu wissen, wie sich diese Verkürzung der Sequenz auf die Funktionalität auswirkt. stVLIG ist in ANA-1-Makrophagen offensichtlich sehr schwach exprimiert. Dies trifft auch auf die in der Literatur beschriebenen "VLIG-ähnlichen" Polypeptide zu, die im Western Blot ein deutlich schwächeres Signal lieferten als VLIG-1 (Klamp et al., 2003). Deshalb, und auf Grund der hohen Sequenzhomologie, blieb während unserer Expressionsstudien zunächst unklar, ob stVLIG tatsächlich exprimiert wird. Es bestand die Möglichkeit, dass in der Realtime PCR unspezifisch VLIG-1 detektiert wird. Mittels einer konventionellen PCR konnten wir jedoch nachweisen, dass beide Sequenzen transkribiert und in unserem Ansatz spezifisch amplifiziert werden. Die semiquantitative PCR bestätigte

dann die leichte Hochregulation von stVLIG nach Stimulation mit IFN γ . Wir konnten im Northern Blot allerdings kein stVLIG-Transkript mit der bisher postulierten Länge nachweisen. Es zeigte sich lediglich ein etwa 9000 bp großes Transkript. Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass es sich hierbei um eine Detektion von VLIG-1 handelt, da auch die Northern Blot-Sonde eine hohe Homologie aufweist. Möglicherweise bindet die Sonde auf Grund der um ein Vielfaches höheren Konzentration an VLIG-1-Transkripten verstärkt an diese, sodass die geringe Menge stVLIG-mRNS nicht detektiert wird. Es könnte aber auch sein, dass die stVLIG-Sequenz viel länger ist, als in der NCBI-Datenbank hinterlegt wurde. Diese Frage könnten zukünftige Untersuchungen mittels RACE-PCR klären. Das von uns detektierte Transkript zeigte eine deutliche Induktion durch IFN γ . Handelte es sich dabei um eine Kreuz-Hybridisierung mit VLIG-1, würde das bisherige Ergebnisse aus dieser und anderen Untersuchungen bestätigen (Klamp et al., 2003). Im anderen Fall würde die These bestätigt, dass es neben VLIG-1 mindestens ein weiteres „VLIG-ähnliches“ Transkript gibt, das durch IFN γ induziert wird. Wie groß dieses jedoch ist, ob es auch in ein funktionstüchtiges Protein translatiert wird oder ob es sich dabei nur um ein Pseudogen handelt, kann nach den bisherigen Erkenntnissen nicht endgültig beantwortet werden. Eine Möglichkeit wäre auch, dass die stVLIG-mRNS regulatorische Funktionen im Hinblick auf VLIG-1 (oder ein anderes Mitglied der VLIG-Familie) ausübt. Diese Funktion von Pseudogenen konnte bereits anhand des Tumorsuppressor-Gens PTEN gezeigt werden, dessen Expression durch das Pseudogen PTENP1 reguliert wird. Wahrscheinlich bindet das Pseudogen dazu inhibitorische miRNS (*micro* RNS) (Poliseno et al., 2010). Diese Funktion könnte auch erklären, warum stVLIG ebenfalls durch IFN γ induziert werden kann. Ob die Anwesenheit der stVLIG-mRNS tatsächlich Auswirkungen auf die Expression von VLIG-1 hat, müssten zukünftige Studien klären.

Unsere Northern Blot-Untersuchung zeigte außerdem eine deutlich geringere Expression des detektierten Transkripts in murinen Zellen, die defizient für den Transkriptionsfaktor IRF-1 sind. Das entsprechende Gen wäre demnach teilweise sekundär-responsiv. Klamp et al. klassifizierten VLIG-1 in Folge einer Expressionsstudie mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid als gemischtes IFN γ -Antwortgen. Allerdings zeigte sich VLIG-1 in deren Untersuchung in IRF-1^{-/-}-Mäusen nur geringfügig geringer exprimiert. Da zudem in 129/sv Mäusen – aus denen die IRF-1^{-/-}-mEFs stammten – auf Grund des VLIG-1-Polymorphismus nur ein VLIG-ähnliches Gen

detektiert werden konnten, resultiert die schwächere Bande wahrscheinlich eher aus einer geringeren Hybridisierungsrate (Klamp et al., 2003). Möglicherweise lässt sich der Expressionsunterschied in unserer Untersuchung ebenfalls auf diesen Polymorphismus zurückführen, da die Wt mEFs aus CD1-Mäusen isoliert wurden, während die IRF-1-defizienten Zellen aus C57BL/6-Hintergrund stammen. Inwieweit VLIG-1 in CD1-Mäusen erhalten ist, ist bisher nicht bekannt (Klamp et al., 2003).

4.4 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit analysiert die Regulation von GTPasen (Septine, VLIGs) und einem bisher unbekanntem Transkript (AI451557), die möglicherweise eine Rolle bei der Immunantwort haben könnten.

Die Expression der Septine wird, trotz ihrer Verwandtschaft mit IFN γ -induzierbaren GTPasen, durch die von uns getesteten Zytokine nicht stimuliert. Einige der Septine wurden sogar nach Stimulation – z. B. mit IFN γ – vermindert transkribiert. Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass die Septine nicht zu den Effektormolekülen der IFN γ -regulierten Immunantwort gehören. Möglicherweise sind einzelne Septine dennoch bei Infektionen mit intrazellulären Erregern von Bedeutung, indem sie z. B. am Eindringen der Pathogene in Wirtszellen beteiligt sind. Dann würde eine verminderte Expression dieser Septine in aktivierten Makrophagen die Immunabwehr unterstützen.

Das bisher unbekanntes Transkript AI451557 wird, wie auch bereits in Transkriptomanalysen nachgewiesen wurde, durch IFN γ induziert. Allerdings bleibt unbekannt, ob die Sequenz auch translatiert wird. Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass es sich nicht um ein funktionstüchtiges Protein handelt. Da jedoch die Transkription durch IFN γ reguliert wird, könnte es sein, dass die mRNA regulatorische Funktionen ausübt.

In dieser Arbeit konnten auch bisherige Erkenntnisse zur IFN γ -induzierbaren GTPase VLIG-1 bestätigt werden. Auch unsere Realtime-Analysen ergaben eine deutliche Regulation der VLIG-1-Expression durch IFN γ . Auch ein weiteres, zu VLIG-1 hochhomologes, Transkript – stVLIG – wird durch IFN γ induziert. Ob stVLIG ein neues Mitglied der VLIG-Familie ist oder das IFN γ -regulierte Transkript regulatorische Funktionen ausübt, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich lediglich um ein Pseudogen handelt.

Insgesamt zeigt diese Arbeit die Notwendigkeit, Transkriptom-Analysen mittels Array-Technologie durch spezifischere Verfahren zu überprüfen. Auch wenn sich hierbei die Regulation bestätigen lässt, können noch keine Rückschlüsse über die Funktion der betreffenden Gene gezogen werden. Die Transkriptomanalyse kann also lediglich einen ersten Anhalt bieten.

5 Literaturverzeichnis

- Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, Volanakis JE (2001): Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* 166:3998-4004.
- Akira S, Takeda K (2004): Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5350-5354.
- Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L, Rubin BY (1999): Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256:8-14.
- Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Barral Y, Mermall V, Mooseker MS, Snyder M (2000): Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* 5:841-851.
- Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS (1999): The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nature Neurosci* 2:434-439.
- Bekker LG, Freeman S, Murray PJ, Ryffel B, Kaplan G (2001): TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J Immunol* 166:6728-6734.
- Bekpen C, Hunn JP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, Glowalla E, Leptin M, Howard JC (2005): The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol* 6:R92.
- Belvin MP, Anderson KV (1996): A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:393-416.
- Boehm U, Guethlein L, Klamp T, Ozbek K, Schaub A, Fütterer A, Pfeffer K, Howard JC (1998): Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-g. *J Immunol* 161:6715-6723.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997): Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A (2000): Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64-76.
- Borkhardt A, Teigler-Schlegel A, Fuchs U, Keller C, König M, Harbott J, Haas OA (2001): An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2. *Genes, Chromosomes & Cancer* 32:82-88.

- Bourne H (1995): GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:283-289.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117-127.
- Briken V, Ruffner H, Schultz U, Schwarz A, Reis LF, Strehlow I, Decker T, Staeheli P (1995): Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol Cell Biol* 15:975-982.
- Byers B, Goetsch L (1976): A highly-ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* 69: 717-721.
- Carlow DA, Teh SJ, Teh HS (1998): Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J Immunol* 161:2348-2355.
- Carroll CW, Altman R, Schieltz D, Yates JR, Kellogg D (1998): The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *J Cell Biol* 143:709-717.
- Carter CC, Gorbacheva VY, Vestal DJ (2005): Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch Virol* 150:1213-1220.
- Casamayor A, Snyder M (2003): Molecular dissection of a yeast septin: Distinct domains are required for septin interaction, localization and function. *Mol Cell Biol* 23: 2762-2777.
- Celada A, Schreiber RD (1987): Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J Immunol* 139:147-153.
- Cheng YS, Becker-Manley MF, Chow TP, Horan DC (1985): Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J Biol Chem* 260:15834-15839.
- Cheng YS, Colonno RJ, Yin FH (1983): Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 258:7746-7750.
- Cheng YS, Patterson CE, Staeheli P (1991): Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* 11:4717-4725.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996): FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:4961-4965.
- Clemens MJ, Elia A (1997): The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17:503-524.
- Conlan JW (1999): Early host-pathogen interactions in the liver and spleen during systemic murine listeriosis: an overview. *Immunobiology* 201:178-187.

- Cox GW, Mathieson BJ, Gandino L, Blasi E, Radzioch D, Varesio L (1989): Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver. *J Natl Cancer Inst* 81:1492-1496.
- Danino D, Hinshaw JE (2001): Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* 13:454-460.
- Däubener W, MacKenzie CR (1999): IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol* 467:517-524.
- Degrandi D, Konermann C, Beuter-Gunia C, Kresse A, Würthner J, Kurig S, Beer S, Pfeffer K (2007): Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* 179:7729-7740.
- Degrandi D, Hoffmann R, Beuter-Gunia C, Pfeffer K (2009): The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J Interferon Cytokine Res* 29(1):55-67.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G (2003): The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:193-209.
- Dent J, Kato K, Peng XR, Martinez C, Cattaneo M, Poujol C, Nurden P, Nurden A, Trimble WS, Ware J (2002): A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3064-3069.
- Drees BL, Sundin B, Brazeau E, Caviston JP, Chen GC, Guo W, Kozminski KG, Lau MW, Moskow JJ, Tong A, Schenkman LR, McKenzie A 3rd, Brennwald P, Longtine M, Bi E, Chan C, Novick P, Boone C, Pringle JR, Davis TN, Fields S, Drubin DG (2001): A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol* 154:549-571.
- Ehlers S (2003): Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2:ii37-ii42.
- Endres R, Luz A, Schulze H, Neubauer H, Futterer A, Holland SM, Wagner H, Pfeffer K (1997): Listeriosis in p47 (phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity* 7:419-432.
- Fares H, Peifer M, Pringle JR (1995): Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Mol Biol Cell* 6:1843-1859.
- Farrar MA, Schreiber RD (1993): The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11:571-611.
- Faty M, Fink M, Barral Y (2002): Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet* 41:123-131.
- Field CM, Al-Awar O, Rosenblatt J, Wong ML, Alberts B, Mitchison TJ (1996): A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Bio*. 133:605-616.

- Field CM, Kellogg D (1999): Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? Trends Cell Biol 9:387-394.
- Finger FP (2002): One ring to bind them. Septins and actin assembly. Dev Cell 3:761-763.
- Finger FP, Kopish KR, White JG (2003): A role for septins in cellular and axonal migration in *C elegans*. Dev Biol 261:220-234.
- Finger FP, Novick P (1997): Sec3p is involved in secretion and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 8:647-662.
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA (1998): The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Semin Immunol 10:363-372.
- Frazier JA, Wong ML, Lontine MS, Pringle JR, Mann M, Mitchison TJ, Field C (1998): Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. J Cell Biol 143:737-749.
- Gasper R, Meyer S, Wittinghofer A (2008): Lob der Zweisamkeit: Neue Mechanismen der GTPase-Aktivierung. BioSpektrum 14:128-133.
- Gewurz H, Mold C, Siegel J, Fiedel B (1982): C-reactive protein and the acute phase response. Adv Intern Med 27:345-372.
- Gladfelter AS, Bose I, Zyla TR, Bardes ESG, Lew DJ (2002): Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. J Cell Biol 156:315-326.
- Gladfelter AS, Pringle JR, Lew DJ (2001): The septin cortex at the yeast mother-bud neck. Curr Opin Microbiol 4:681-689.
- Gorbacheva VY, Lindner D, Sen GC, Vestal DJ (2002): The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. J Biol Chem 277:6080-6087.
- Guenzi E, Topolt K, Cornali E, Lubeseder-Martellato C, Jorg A, Matzen K, Zietz C, Kremmer E, Nappi F, Schwemmler M, Hohenadl C, Barillari G, Tschachler E, Monini P, Ensoli B, Sturzl M (2001): The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. EMBO J 20:5568-5577.
- Gupta SL, Rubin BY, Holmes SL (1979): Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. Proc Natl Acad Sci USA 76:4817-4821.
- Haarer BK and Pringle JR (1987): Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. Mol Cell Biol 7:3678-3687.
- Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SHE (2005): Expression profiling the human septin gene family. J Pathol 206:269-278.

- Hall PA, Russell SHE (2004): The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* 204:489-505.
- Han BH, Park DJ, Lim RW, Im JH, Kim HD (1998): Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochim Biophys Acta* 1384:373-386.
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Haque SJ, Wu Q, Kammer W, Friedrich K, Smith JM, Kerr IM, Stark GR, Williams BR (1997): Receptor-associated constitutive protein tyrosine phosphatase activity controls the kinase function of JAK1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8563-8568
- Harada H, Takahashi E, Itoh S, Harada K, Hori TA, Taniguchi T (1994): Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for agene network in the interferon system. *Mol Cell Biol* 14:1500-1509.
- Hartwell LH (1971): Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 69:265-276.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974): Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46-51.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
- Hehlgans T, Mannel DN (2002): The TNF-TNF receptor system. *Biol Chem* 383:1581-1585.
- Hehlgans T, Pfeffer K (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20.
- Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M (1997): Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-357.
- Holly SP, Blumer KJ (1999): PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 147:845-856.
- Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J, Scheller RH (1998): Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* 20:1111-1122.
- Huang Y, Yan M, Collins RF, DiCiccio JE, Grinstein S, Trimble WS (2008): Mammalian septins are required for phagosome formation. *Mol Biol Cell* 19:1717-1726.
- Idriss HT, Naismith JH (2000): TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50:184-195.

- Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K, Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C, Itohara S, Nishimune Y, Noda M, Kinoshita M (2005): Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for the structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell* 8:343-352.
- Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, Shibasaki H, Noda M, Kinoshita M (2003): Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J Biol Chem* 278:24095-24102.
- Ihle JN (1996): STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84:331-334.
- Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G (2001): Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 276:2551-2554.
- Iraoqui JE, Lew DJ (2004): Polarity establishment in yeast. *J Cell Sci* 117:2169-2171.
- Isaacs A, Lindenmann J (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc London Ser B* 47:258-267.
- Jackson SH, Gallin JI, Holland SM (1995): The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 182:751-758
- Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2005): *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th Edition. (New York and London: Garland Science).
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Kalikin LM, Sims HL, Petty EM (2000): Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MFS) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* 63:165-172.
- Kartmann B, Roth D (2001): Novel roles for mammalian septins: from vesicle-trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci* 114:839-844.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115-122.
- Kerr IM, Stark GR (1991): The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett* 285:194-198.
- Kim HB, Harrer BK, Pringle JR (1991): Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol* 112: 535-544.
- Kinoshita A, Kinoshita M, Akiyama H, Tomimoto H, Kumar S, Noda M, Kimura J (1998): Identification of septins in the neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 15:1551-1560.

- Kinoshita M (2003): The septins. *Genom Biol* 4:236-243.
- Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ (2002): Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Dev Cell* 3:761-763.
- Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M (1997): Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* 11:1535-1547.
- Kinoshita M, Noda M (2001) Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Struct Funct* 26:667-670.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000): Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12:611-620.
- Klamp T, Boehm U, Schenk D, Pfeffer K, Howard JC (2003): A giant GTPase, VLI-1, is inducible by interferons. *J Immunol* 171:1255-1265.
- Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL, Barbacid M (1993): Targeted disruption of the *trkB* neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75:113-122.
- Kojima K, Sakai I, Hasegawa A, Niiya H, Azuma T, Matsuo Y, Fujii N, Tanimoto M, Fujita S (2004): FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 18:998-1005.
- Kremer BE, Haystead T, Macara IG (2005): Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding-protein MAP4. *Mol Biol Cell* 16:4648-4659.
- Kresse A, Konermann C, Degrandi D, Beuter-Gunia C, Wuerthner J, Pfeffer K, Beer S (2008): Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics* 9:158.
- Kumar M, Carmichael GG (1998): Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1415-1434.
- Kwitny S, Klaus AV, Hunnicutt GR (2010): The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis. *Biol Reprod* 82(4):669-678.
- Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, Howard JC, Gorvel JP (2006): Differential inductions of TNF-alpha and IIGP, IIGP by structurally diverse classic and nonclassic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* 8:401-413.
- Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony Parks W, Gottfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danielpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Duckett CS, Lechleider RJ, Steller H, Orly J, Kim SJ, Roberts AB (2000): A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its p-loop motif. *Nature Cell Biol* 2:915-921.

- Le Clainche C, Carlier MF (2008): Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88:489-513.
- Lee KS, Song S, Erikson RL (1999): The polo-box-dependent induction of ectopic septal structures by a mammalian polo kinase, *plk*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14360-14365.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751.
- Lehrer RI, Ganz T (2002): Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14:96-102.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002): Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* 317:41-72.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Longtine MS, DeMarini DJ, Valencik ML, Al-Awar OS, Fares H, De Virgilio C, Pringle JR (1996): The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* 8:106-119.
- Low C, Macara IG (2006): Structural analysis of septin 2, 6 and 7 complexes. *J Biol Chem* 281:30697-30706.
- Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu SC, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison TJ, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SE, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS, Ware J, Zeleznik-Le NJ, Zieger B (2002): Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell* 13:4111-4113.
- MacMicking JD (2005): Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr Opin Microbiol* 8:74-82.
- MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD (2003): Immune control of tuberculosis by IFN γ -inducible LRG-47. *Science* 302:654-659.
- Mandel TE and Cheers C (1980): Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect Immun* 30:851-861.
- Martens S, Howard J (2006): The interferon-inducible GTPases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:559-589.
- Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, Reichmann G, Howard JC (2005): Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog* 1:e24.

- Matsumoto M, Tanaka N, Harada H, Kimura T, Yokochi T, Kitagawa M, Schindler C, Taniguchi T (1999): Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol Chem* 380:699-703.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
- Montagna C, Lyu MS, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, Ried T (2003): The septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 63:2179-2187.
- Mostowy S, Danckaert A, Nam Tham T, Machu C, Guadagnini S, Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2009): Septin 11 restricts InlB-mediated invasion by *Listeria*. *J Biol Chem* 284:11613-11621.
- Mostowy S, Nam Tham T, Danckaert A, Guadagnini S, Boisson-Dupuis S, Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2009): Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS ONE* 4:e4196.
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M (1998): Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187:2103-2108.
- Nagaraj S, Rajendran A, Jackson CE, Longtine MS (2008): Role of nucleotide binding in septin-septin interactions and septin localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 28:5120-5138.
- Nagata K, Asano T, Nozawa Y, Inagaki M (2004): Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *J Biol Chem* 279:55895-55904.
- Nagata K, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T, Saitoh N, Izawa I, Kiyono T, Itoh TJ, Hotani H, Inagaki M (2003): Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J Biol Chem* 278:18 538-18 543.
- Nathan C (1997): Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100:2417-2423.
- Nathan C, Shiloh MU (2000): Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8841-8848.
- Neufeld TP, Rubin GM (1994): The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* 77:371-379.
- Nguyen TQ, Sawa H, Okano H, White JG (2000): The *C elegans* septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J Cell Sci* 113:3825-3837.

- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G (2001): Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276:4812-4818.
- Ohteki T, Fukao T, Suzue K, Maki C, Ito M, Nakamura M, Koyasu S (1999): Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med* 189:1981-1986.
- Olszewski MA, Gray J, Vestal DJ (2006): In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J Interferon Cytokine Res* 26:328-352.
- Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1999): MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Nat. Acad Sci USA* 96:6428-6433.
- Pan F, Malmberg RL, Momany M (2007): Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology* 7:103.
- Parmley SF, Yang S, Harth G, Sibley LD, Sucharczuk A, Remington JS (1994): Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol Biochem Parasitol* 66: 283-296.
- Pearson AM (1996): Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8:20-28.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
- Peterson EA, Kalikin LM, Steels JD, Estey MP, Trimble WS, Petty EM (2007): Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. *Mamm Genome* 18(11):796-807.
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pizarro-Cerdá J, Jonquières R, Gouin E, Vandekerckhove J, Garin J, Cossart P (2002): Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InlA- or InlB-phagosomes. *Cell Microbiol* 4:101-115.
- Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP (2010): A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465(7301):1033-1038.
- Praefcke GJ, Geyer M, Schwemmler M, Robert KH, Herrmann C (1999): Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol* 292:321-232.
- Praefcke GJ, McMahon HAT (2004): The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:133-147.

- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER (2001): Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 3: 26-31.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978): Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15:261-267.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ (2002): TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168:4620-4627.
- Rodriguez-Escudero I, Roelants FM, Thorner J, Nombela C, Molina M, Cid VJ (2005): Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem J* 390:613-623.
- Russell SE, McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Petty EM, Kalikin LM, Church SW, McIlroy S, Harkin DP, Keilty GW, Cranston AN, Weissenbach J, Hickey L, Johnston PG (2000): Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 60:4729-4734.
- Sakai K, Kurimoto M, Tsugu A, Hubbard SL, Trimble WS, Rutka JT (2002): Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *J Neurooncol* 57:169-177.
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A (1990): The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15:430-434.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189
- Schwalbe RA, Dahlback B, Coe JE, Nelsestuen GL (1992): Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* 31:4907-4915.
- Schwemmler M, Staeheli P (1994): The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem* 269:11299-11305.
- Seitz C, Muller P, Krieg RC, Mannel DN, Hehlhans T (2001): A novel p75TNF receptor isoform mediating NFkappa B activation. *J Biol Chem* 276:19390-19395.
- Slater DJ, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Shah N, Meek RG, Williams WR, Lovett BD, Osheroff N, Autar RS, Ried T, Felix CA (2002): MLL-SEPTIN6 fusion recurs in novel translocation of chromosomes 3, X, and 11 in infant acute myelomonocytic leukaemia and in t(X;11) in infant acute myeloid leukaemia, and MLL genomic breakpoint in complex MLL-SEPTIN6 rearrangement is a DNA topoisomerase II cleavage site. *Oncogene* 21:4706-4714.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-962.
- Spiliotis ET, Nelson WJ (2006): Here come the septins: Novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci* 119:4-10.

- Streit S, Michalski CW, Erkan M, Friess H, Kleeff J (2009): Confirmation of DNA microarray-derived differentially expressed genes in pancreatic cancer using quantitative RT-PCR. *Pancreatology* 9(5):577-582.
- Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T (2006): Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6:9-20.
- Surka MC, Tsang CW, Trimble WS (2002): The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol Biol Cell* 13:3532-3545.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003): Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Tatsumi K, Taki T, Taniwaki M, Nakamura H, Taguchi J, Chen QZ, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y (2001): The CDCREL1 gene fused to MLL in de novo acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q11.2) and its frequent expression in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 30:230-235.
- Taylor GA, Feng CG, Sher A (2004): p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4:100-109.
- Taylor GA, Stauber R, Rulong S, Hudson E, Pei V, Pavlakis GN, Resau JH, Vande Woude GF (1996): Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J Biol Chem* 271:20399-20405.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL (2001): Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-1547.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A (1987): Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330:662-664.
- Trinchieri G (2003): Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3(2):133-146.
- Tuma PL, Collins CA (1994): Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J Biol Chem* 269:30842-30847.
- Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR (1990): Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8:421-452.
- Vega IE, Hsu SC (2003): The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport* 14:31-37.
- Versele M, Gullbrand B, Shulewitz MJ, Cid VJ, Bahmanyar S, Chen RE, Barth P, Alber T, Thorner J (2004): Protein-protein interactions governing septin heteropentamer

- assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15:4568-4583.
- Versele M, Thorner J (2007): Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* 15:414-424.
- Vestal DJ, Gorbacheva VY, Sen GC (200): Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J Interferon Cytokine Res* 20:991-1000.
- Vrabioiu AM, Mitchison TJ (2006): Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature* 443:466-469.
- Warnock DE, Schmid SL (1996): Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *BioEssay* 18:885-893.
- Wheelock EF (1965): Interferon-like virus-inhibitor induced by phytohemagglutinin. *Science* 149:310-311.
- Williams BR (1999): PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18:6112-6120.
- Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K (1997): Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3948-3953.
- You M, Yu DH, Feng GS (1999): Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 19:2416-2424.
- Young HA (1996): Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16:563-568.
- Zerrahn J, Schaible UE, Brinkmann V, Guhlich U, Kaufmann SH (2002): The IFN inducible golgi- and endoplasmic reticulum- associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J Immunol* 168:3428-3436.
- Zhang HM, Yuan J, Cheung P, Luo H, Yanagawa B, Chau D, Stephan-Tozy N, Wong BW, Zhang J, Wilson JE, McManus BM, Yang D (2003): Overexpression of interferon-gamma inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J Biol Chem* 278:33011-33019.
- Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, Trimble WS (1999): Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol* 9:1458-1467.
- Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (1999): The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signalling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2071-2076.

Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM (2000): Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci* 97:13354-13359.

Danksagung

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

Prof. Dr. Ertan Mayatepek danke ich für, dass er das Ko-Referat für meine Arbeit übernommen hat.

Ganz lieben Dank an **Daniel Degrandi** und **Cornelia Beuter-Gunia** für die tolle Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft im Labor, sowie die geteilten Reagenzien und Laborarbeitsplätze.

Bei den Mitgliedern der **AG Pfeffer** und **AG Beer** bedanke ich mich für die Durchführung der Tierversuche und Bereitstellung der RNS.

Bei **Sonja Kropp**, **Anne Mausberg** und **Silke Stuhlsatz** bedanke ich mich herzlich für die netten Pausengespräche im Schreibraum, die das Warten auf den nächsten Versuch versüßt haben.

Meinem Ehemann **Thomas Abele** danke ich für seine Liebe und den Halt, den er mir in allen Situation gibt.

Meinen Söhnen **Rasmus** und **Erik** ganz lieben Dank für den langen Mittagsschlaf und die Geduld, wenn ich „nur mal eben noch den Absatz fertig schreiben“ wollte. Ihr zeigt mir täglich, was wirklich wichtig ist!

Auch meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern danke ich herzlich für die liebevolle Unterstützung und den ständigen Ansporn. Danke dass ihr alle da seid!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Iris Abele