

# Funktionale Charakterisierung von murinen *gimap* Genen

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

vorgelegt von  
Markus Epe  
aus Olpe

Oktober 2004

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

Referent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.2004





*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“*

Sir Isaac Newton



1.0	Einleitung	1
1.1	Malaria in Altertum und Moderne	1
1.2	Lebenszyklus des Malaria-Erregers	3
1.3	Mausmodelle und Immunologie	3
1.3.1	Genomsequenzierungen von Parasit und Wirt	3
1.3.2	Die Mausmodelle als Studienobjekt für Plasmodieninfektionen des Menschen	4
1.3.3	Angeborene Immunantworten	7
1.4	Die <i>gimap</i> Genfamilie in Maus und Mensch	8
1.4.1	Die <i>gimap</i> Genfamilie in Maus und Ratte	10
1.4.2	Die <i>gimap</i> Gene des Menschen	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2.0	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien und Enzyme	14
2.2	Lösungen und Puffer	15
2.3	Synthetische Oligonukleotide	17
2.4	Versuchstiere	18
2.5	<i>Plasmodium chabaudi</i> Infektionen	18
2.6	Kompetente Zellen	19
2.7	Vektoren	19
2.8	Antikörper	19
2.9	Probenvorbereitung	19
2.9.1	Organentnahme und Zellisolation	19
2.9.2	Isolation von Milzzellen	20
2.10	Molekularbiologische Methoden	20
2.10.1	Isolation von Gesamt-RNA: Saure Phenol/Chloroform Extraktion	20
2.10.2	Isolation von Gesamt-RNA mittels Trizol	21
2.10.3	Isolation von Poly(A) <sup>+</sup> RNA	21
2.10.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.10.5	Auftrennung von RNA im Glyoxalgel	21
2.10.6	Transfer von RNA auf Membranen und Hybridisierung: 'Northern Blot'	22
2.10.7	Hybridisierung eines Maus-Poly(A) <sup>+</sup> 'Northern Blots'	22
2.10.8	Isolation von Plasmid-DNA	23
2.10.9	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	23
2.10.10	Elution von DNA aus Agarosegelen	23
2.10.11	Klonierung von PCR-Produkten	23
2.10.12	Klonierungen mit dem TOPO <sup>®</sup> TA Vektorsystem	23
2.10.13	'Southern Blot': Transfer von DNA auf Membranen und Hybridisierung	24
2.10.14	Alternative 'Southern Blot'-Methode: Alkalische Gel-Elektrophorese, DNA-Transfer und Hybridisierung	24

---

2.10.15	Radioaktive Markierung von DNA	25
2.10.16	Densiometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCRs	25
2.10.17	DNA-Sequenzanalyse	25
2.10.18	Computeranalyse von Sequenzdaten	26
2.10.19	Semiquantitative RT-PCR mit dem Eppendorf cMaster-RT-System	26
2.10.20	Genomische PCR	27
2.11	Zellbiologische Methoden	28
2.11.1	Immortalisierte Zellen	28
2.11.2	Kultivierung von Säugerzellen	28
2.11.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien	28
2.11.4	Transfektion von kultivierten Säugerzellen mit FuGENE6	29
2.11.5	Herstellung von stabil transfizierten Zellen	29
2.11.6	Probenvorbereitung zur subzellulären Lokalisation	29
2.11.7	Färbung von Zellkompartimenten	30
2.11.8	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	31
2.11.9	Reporter-gen Assay mit dem pblue-TOPO System	31
2.12	Proteinanalytik	33
2.12.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen: SDS-Page	33
2.12.2	Färbung von Proteinen nach Gelelektrophorese	33
2.12.3	'Western Blot': Transfer von Proteinen auf eine Membran	34
2.12.4	Immunodetektion von geblotteten Proteinen	34
3.0	Ergebnisse:	35
3.1	Entdeckung neuer Vertreter der <i>mgimap</i> Genfamilie	35
3.2	Molekulare Charakterisierung von <i>mgimap8</i>	36
3.2.1	Genomische Organisation von <i>mgimap8</i>	36
3.2.2	Analyse der Intron-/ Exonstruktur von <i>mgimap8</i>	37
3.2.3	Verwandtschaft zu anderen <i>mgimap</i> Genen in der Maus	41
3.2.4	Expressionsanalysen von murinen <i>gimap</i> Genen	46
3.2.5	Quantitative Expressionsanalyse von murinen <i>gimap</i> Genen	46
3.2.6	Heterologe Expression von <i>mgimap8</i> in CHO-KI-Zellen	50
3.3	Die Struktur von <i>mgimap10</i> - eine Variante von <i>mgimap8</i> ?	51
3.4	Analyse der Sequenzregion vor dem <i>mgimap1</i> Gen	52
3.4.1	Genomische Organisation von <i>mgimap1</i>	52
3.4.2	Analyse einer putativen 5'-flankierenden Sequenzregion von <i>mgimap1</i>	53
3.4.3	Transfektion und Messungen von <i>mgimap1</i> Reporter-gen-Konstrukten in verschiedenen Säugerzelllinien	56
3.5	Einfluß von <i>mgimap8</i> auf Apoptose	59
3.5.1	Untersuchungen mit dem pCaspase3-Sensor-System	60
3.5.2	Künstliche Apoptose-Auslösung in Säugerzellen	60

---

4.0	Diskussion	64
4.1	Neue Vertreter der <i>gimap</i> Genfamilie	64
4.2	Die <i>gimap</i> Gene werden gewebespezifisch exprimiert	65
4.3	Mehrere Datenbankeinträge beinhalten die Sequenz von <i>mgimap8</i>	67
4.3.1	Das mGIMAP8-Protein als besonderer Vertreter der GIMAP-Proteinfamilie	67
4.3.2	Die <i>gimap</i> Genfamilie und die Kontrolle von Apoptose-Prozessen	69
4.3.3	Das <i>mgimap10</i> Gen zeigt Merkmale eines Pseudogens	71
4.4	Aktivität und Kontrolle der <i>mgimap1</i> Expression	72
4.5	Ausblick	74
5.0	Zusammenfassung	75
6.0	Literatur	76
7.0	Abkürzungsverzeichnis	90
8.0	Danksagung	92
9.0	Lebenslauf	93



## 1.0 Einleitung

### 1.1 Malaria in Antiquität und Moderne

Es klingt paradox. Im Zeitalter der modernen Medizin verursacht ein kleiner Einzeller eine Krankheit, gegen die der Mensch des 21. Jahrhunderts noch keinen ausreichend wirksamen Schutz entwickeln konnte. Die Rede ist von Einzellern der Gattung *Plasmodium*, die für eine Malaria-Infektion verantwortlich sind. Schon seit 2700 v. Chr. bis ins 19. Jh. existieren Aufzeichnungen über das durch Plasmodien verursachte periodische Fieber (Cox, 2002). Der griechische Arzt Hippokrates beschrieb detailliert die Regelmäßigkeit der durch Malaria verursachten Fieberschübe und differenzierte zwischen Drei- und Viertages-Fieber sowie zwischen unterschiedlich starken pathologischen Auswirkungen wie z.B. einer vergrößerten Milz. Hippokrates gelang es, erstmals einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der Nähe von Sumpfgebieten herzustellen, jedoch brachte er die Malaria nicht mit den Mücken als Überträger in Zusammenhang, sondern schrieb das Wechselfieber einem Ungleichgewicht der Körpersäfte Blut, Schleim, schwarzer und gelber Galle zu. (Berenbaum, 1997).

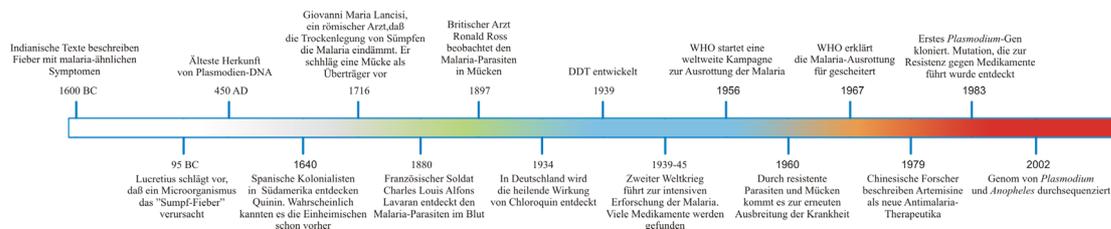


Abbildung 1 : Zeitgeschichte der Malaria. Auf einem Zeitstrahl sind bedeutende Erfolge in Erforschung und Bekämpfung der Malaria dargestellt. Die Zeitachse ist dabei nicht maßstäblich dargestellt (modifiziert nach Whitfield, 2002).

Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts begann man die wissenschaftlichen Grundlagen der Krankheit zu verstehen. Der britische Militärarzt Charles L.A. Laveran löste 1880 die Frage nach dem Erreger (Abbildung 1). Laveran wurde für diese Entdeckungen im Jahr 1907 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Im Jahre 1897 beobachtete Ronald Ross Oocysten im Darm eines weiblichen Mosquitos, konnte aber nicht deren weitere Entwicklung verfolgen (Ross, 1897). Im gleichen Jahr jedoch konnten die Italiener Grassi, Bignami und Bastianelli die Entwicklungsstadien des Parasiten in Anophelinen beobachten und ein Jahr später wurden die noch unvollständigen Zyklen von *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. malariae* beschrieben (Grassi, 1900).

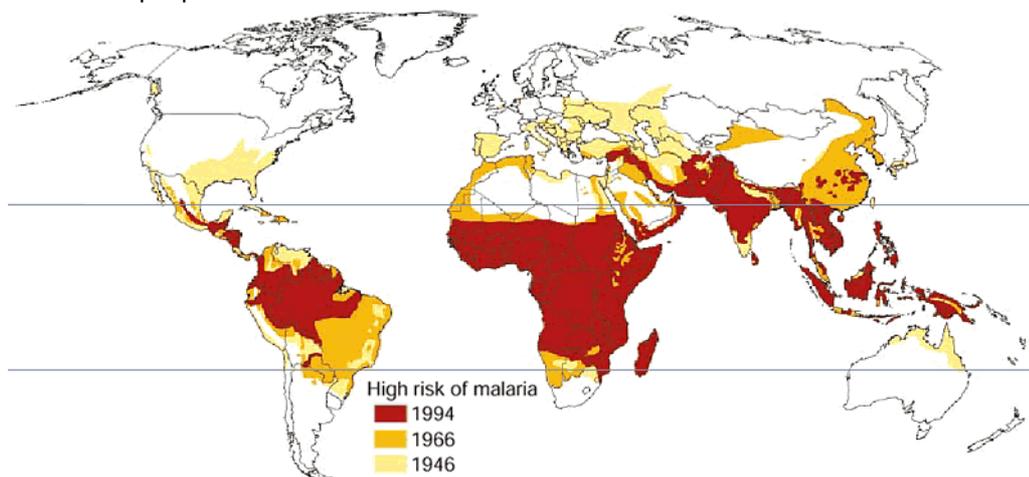
In den folgenden 50 Jahren blieb der vollständige Weg des Erregers unbekannt. Niemand wusste, was in den ersten 10 Tagen nach einer Infektion geschah, wenn der Erreger noch nicht im Blut nachweisbar ist. 1947 konnten Henry Shortt und Cyril Granham eine Vermehrung des Parasiten in der Leber nachweisen auf die eine Vermehrung im Blut folgte (Shortt *et al.*, 1948). Die Vervollständigung des Entwicklungszyklus erreichte Wojciech Krostoski erst im Jahr 1982 mit der Erkenntnis, daß Stadien von *P. vivax* in der Leber für mehrere Monate überdauern konnten (Krostoski, 1982).

Die Infektion ist heute immer noch aktuell. Im hochtechnisierten Deutschland gibt es pro Jahr ca. 800-1000 Fälle einer importierten Malaria-Infektion, die für 15-28 Personen tödlich endet (Robert-Koch-Institut, 2000). Alle 30 Sekunden stirbt ein Kind in Afrika an den Folgen einer Malariainfektion. Pro Tag sind das ca. 3000 Kinder und pro Jahr bis zu 2 Millionen Menschen weltweit (WHO, 2003). Mehr als 300 Millionen Menschen infizieren sich jährlich neu durch den Stich der Anophelesmücke (Heymann, 2000; Schönfelder, 2002). Nicht nur gesundheitlich bedeutet diese Infektion eine enorme Belastung, sondern auch wirtschaftlich ist der Schaden immens. Nach aktuellen

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) belaufen sich die wirtschaftlichen Schäden alleine in Afrika auf 12 Milliarden US\$ pro Jahr (Clarke, 2003).

Für die Zukunft sieht es nicht unbedingt besser aus. In vielen Regionen der Erde hat sich die Malariasituation in den letzten Jahren verschlechtert. Der Erreger ist zunehmend in Gebiete eingedrungen, die bisher nicht oder nur sporadisch betroffen waren, wie z.B. Siedlungsgebiete großer Städte oder Höhenregionen über 1500 m (medizin.de Info Service, 2002). Die sich ausbreitende Resistenzentwicklung bereitet zusätzliche Sorgen und veranlaßte die WHO zusammen mit anderen, weltweit tätigen Organisationen schon 1998, eine Bekämpfungskampagne unter dem Titel 'Roll Back Malaria' zu starten, die sich zum Ziel gesetzt hat, bis 2010 die Zahl der Malaria-Erkrankungen zu halbieren. Jährlich sind dazu Ausgaben von 100 Millionen US\$ vorgesehen, was angesichts eines von der WHO errechneten Bedarfs von 2,5 Milliarden Dollar pro Jahr bis zum Jahr 2007 ungeheuer wenig ist (Sachs & Malaney, 2002). Es bedarf aber nicht allein des Geldes, sondern vielmehr wohlüberlegter Strategien, um dieses Ziel zu erreichen, bemängelt die Organisation 'Ärzte ohne Grenzen'. Die Kritik wurde formuliert, da die Bekämpfung immer noch mit alten, durch Resistenzen unwirksamen Präparaten geführt wird, ohne die neuen, effizienteren, aus mehreren Wirkstoffen bestehenden Kombinationspräparate einzusetzen (Frankish, 2003).

Abbildung 2 :  
Verbreitung der Malaria  
weltweit: geographische  
Veränderung des Malaria-  
Verbreitungsgebietes von  
1946 bis 1994. Die  
waagerechten Linien  
geben den nördlichen  
und südlichen  
Wendekreis an.  
(nach Sachs und  
Malaney, 2002)



Die Sorge der Mediziner ist nicht unbegründet. Schon einmal war eine WHO-Kampagne zur Malaria-Ausrottung gescheitert. In den 50er Jahren hatte sich die Organisation das ehrgeizige Ziel gesetzt, die Seuche durch einen gleichzeitigen Angriff gegen den Parasiten (mit Chloroquin) und den Überträger (mit DDT) auszurotten.

War die Kampagne der WHO anfangs erfolgreich (Abbildung 2), so kam es in den 70er Jahren zu einem massiven Einbruch. In Indien wurden nach zunächst erfolgreicher DDT-Bekämpfung 1971 1,3 Mio., 1977 jedoch schon 30 Mio. Malariafälle gemeldet (Edmundson, 1992). In anderen Ländern der 3. Welt ging es ähnlich zu. Die Krankheit war wieder auf dem Vormarsch. Zur Rückkehr der Malaria trug vorallem die zunehmende Resistenzentwicklung der Anophelesmücken gegen Insektizide bei. Gab es 1956 erst fünf gegen DDT resistente Anopheles-Arten, so waren es 1985 bereits 50, die eine Resistenz gegen mindestens ein Insektizid entwickelt hatten (WHO, 1989).

Die Absicht der WHO, die Malaria auszurotten, konnte daher als gescheitert angesehen werden. Heute ist die Krankheit wieder weltweit über Asien, Afrika, den indischen Subkontinent und Südamerika verbreitet (Abbildung 2).

## 1.2 Lebenszyklus des Malaria-Erregers

Ausgelöst wird die Malaria durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*, die zum Stamm der Apikomplexa (syn. Sporozoa) gehören. Beim Menschen sind vier Malaria-Erreger bekannt: *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium falciparum*, von denen letzterer der virulenteste ist. Endwirt der Säugerparasitierenden Plasmodien sind Stechmücken der Gattung *Anopheles*, während der Mensch als Zwischenwirt fungiert. Von den etwa 400 *Anopheles*-Arten sind allerdings nur 60 als Vektoren unter natürlichen Bedingungen für den Erreger geeignet und von diesen nur 30 von größerer Bedeutung. Abgesehen von einigen Affenarten gibt es kein tierisches Erregerreservoir für *Plasmodium falciparum* (Butcher, 1996).

Der Lebenszyklus des Erregers, der streng wirtsspezifisch ist, umfaßt einen obligatorischen Wirtswechsel und läßt sich in drei Phasen gliedern: Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie. Die weiblichen Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen pro Blutmahlzeit etwa 10-100 Sporozoiten, die mit dem Stich über den Speichel der Mücke in die Blutbahn des Zwischenwirtes gelangen (Rosenberg *et al.*, 1990). Innerhalb von 30 Sekunden dringen die Sporozoiten in Leberzellen ein und wachsen dort, intrazellulär, zu einem Schizonten heran (prä-erythrozytäre Schizogonie). Aus einem Schizonten können sich bei *P. vivax* bis 10.000, bei *P. falciparum* sogar bis zu 40.000 Merozoiten entwickeln (Cohen & Lambert, 1982). Nach 6-9 Tagen werden die Merozoiten (~ 1,2 µm Länge) freigesetzt und befallen die Erythrozyten (erythrozytäre Schizogonie). In den Erythrozyten wachsen die Merozoiten zu Schizonten heran, die nach dem Platzen freigesetzt werden und neue rote Blutkörperchen befallen. Einige der in die Erythrozyten eingedrungenen Merozoiten entwickeln sich zu Mikro- und Makrogamonten, die bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke wieder aufgenommen werden. Im Darm der Mücke werden die Parasiten frei, und der Makrogamont entwickelt sich zum Makrogameten, während sich der Mikrogamont unter Bildung von 4-8 Mikrogameten teilt. Mikrogamet und Makrogamet verschmelzen zum beweglichen Ookineten (Gamogonie). Dieser wandert durch die peritrophische Membran und das Darmepithel, entwickelt sich zwischen Epithel und Basal-Membran zur Oozyste und durchläuft hier die Sporogonie. Im Inneren der Oocyste entstehen durch Reduktionsteilungen die Sporozoiten. Jede Oozyste setzt ca. 1000 Sporozoiten frei, die durch die Leibeshöhle in die Speicheldrüse wandern. Von dort werden sie beim nächsten Stich in den Zwischenwirt injiziert, womit sich der Zyklus schließt (Najera & Hempel, 1996).

## 1.3 Mausmodelle und Immunologie

### 1.3.1 Genomsequenzierungen von Parasit und Wirt

Die Genome von Maus, Mensch und zahlreichen Parasiten konnten entschlüsselt und in großen Datenbanken zusammengestellt werden. Jüngst wurden die großen Sequenzprojekte von Maus (Waterston *et al.*, 2002), Wanderratte (Gibbs *et al.*, 2004), Mensch (Venter *et al.*, 2001), *Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002) und verschiedenen Plasmodien-Spezies abgeschlossen (Carlton *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2002).

**Tabelle 1: Genomgrößen und Genanzahl verschiedener Organismen**

Organismus	Genomgröße in Mbp	Chromosomenzahl	geschätzte Gene
<i>Plasmodium falciparum</i>	25-30	14	5000
<i>Plasmodium yoelii</i>	23,1	14	5878
<i>Plasmodium chabaudi</i>	25-30	14	k.A.
<i>Anopheles gambiae</i>	278	3	13683
<i>Mus musculus</i>	2500	21	19655
<i>Rattus norvegicus</i>	2750	21	20973
<i>Homo sapiens</i>	2900	23	ca. 30000

Tabelle 1 zeigt die Genomgrößen einiger Plasmodium-Arten, dem Malariavektor *Anopheles gambiae*, sowie von Mensch, Maus (*Mus musculus*) und Wanderratte (*Rattus norvegicus*). Nun gilt es die verfügbaren Informationen mit Hilfe von Computerprogrammen zu entschlüsseln und nutzbar zu machen, denn die Sequenz zu kennen, heißt noch lange nicht die Funktionen der einzelnen Gene und die Interaktionen zwischen verschiedenen Genen zu verstehen. Sequenzvergleiche auf DNA- und Protein-Ebene sind mit Hilfe geeigneter Programme zwischen verschiedenen Spezies möglich, wodurch neue Stoffwechselwege, z.B. im Apikoplasten des Parasiten, aufgezeigt wurden. Diese sind charakteristisch für den Erreger und lassen sich durch geeignete Wirkstoffe blockieren (Rosenthal, 2003, Cowman und Crabb, 2003). Jomaa *et al.* (1999) entdeckten auf diesem Wege, daß das Antibiotikum Fosmidomycin in den Isoprenoid-Stoffwechsel eingreift, der im Apikoplasten des Parasiten abläuft und für zelluläre Funktionen des Parasiten von Bedeutung ist (Jomaa *et al.*, 1999; Missinou *et al.*, 2002; Lell *et al.*, 2003).

Zusätzlich bieten die Methoden der modernen Biologie, wie z.B. DNA-Chips oder RNA-Interferenz-Studien die Möglichkeit, grundlegende Regulationsmechanismen des Parasiten zu erkennen und daraus Ansätze zur erfolgreichen Bekämpfung zu gewinnen. Bei Plasmodien konnten z.B. stadienspezifische Protein-Expressionsmuster analysiert werden, in denen sich u.a. zeigte, daß sich das Sporozoiten-Proteom stark von der Proteinexpression anderer Stadien unterscheidet und damit einen Angriffspunkt zur Bekämpfung bietet (Florens, 2002).

### 1.3.2 Die Mausmodelle als Studienobjekt für Plasmodieninfektionen des Menschen

Neben dem Menschen können auch Nager von Plasmodien befallen werden. Mausmodelle werden zu Studien von immunologischen Interaktionen zwischen dem Wirt und verschiedenen Parasitenstadien benutzt. Die Infektionen können, je nach Maustamm und Parasit, erheblich in Virulenz und Ausgang der Infektion variieren. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über verschiedene Mausmodelle für Malariainfektionen und deren unterschiedliche Verwendung. Die Kombination aus Maustamm und Parasiten sind dafür verantwortlich, ob eine Malariainfektion selbstheilend verläuft und langanhaltende, schützende Immunantworten ausgebildet werden oder ob sie tödlich endet (Li *et al.*, 2001). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht möglicher Parasit-Wirt Kombinationen in der Maus.

Tabelle 2: Parasit-Wirt Kombinationen in der Maus (Quelle: Li *et al.*, 2001)

Parasit	Stamm	Maus-Stamm	Letalität	Experimentelle Verwendung
<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>		CBA		
		C57BL/6	nicht letal (nl)	Immunmechanismen
		BALB/c		Malaria-assoziierte klinische Symptome
	AS	129sv		
		A/J	letal (l)	Pathogenität
		DBA/2		Chemotherapie, Resistenz und Suszeptibilität
	CB	CBA		Immunmechanismen
		C57BL/6		
<i>Plasmodium chabaudi adami</i>		BALB/c	nl	Immunmechanismen
		C57/BL6		
<i>Plasmodium berghei</i>	ANKA	BALB/c	l	Pathogenität
		C57BL/6		experimentelle cerebrale Malaria (ECM)
		CBA		
	K173	BALB/c	l	Pathogenität
		CBA		ECM
<i>Plasmodium yoelii</i>		DBA		
		C57BL/6		
	17XL	CBA	l	Immunmechanismen
		BALB/c		
		C57BL/6		
		DBA		
		Swiss	l	Pathogenität, ECM
		CBA		
	YM	BALB/c	l	Vakzinen
		C57BL/6		Pathogenität
		DBA		Hypoglykämie
	17XNL	CBA	nl	Immunantworten
		BALB/c		Vakzinierung
		C57BL/6		Immunmechanismen
<i>Plasmodium vinkei vinkei</i>		DBA		
		BALB/c	l	Chemotherapie
				Pathogenität
				Malaria-assoziierte klinische Symptome, Sequestrierung
<i>Plasmodium vinkei petteri</i>	CR	C56BL/6	nl	Immunmechanismen
		BALB/c		

Weiterhin konnte beobachtet werden, daß das Geschlecht eine Rolle bei Virulenz und Parasitämie spielt. Männliche Tiere weisen eine erhöhte Suszeptibilität auf, die auf das männliche Geschlechtshormon Testosteron zurückzuführen ist. Werden nämlich weibliche Mäuse mit Testosteron behandelt, reagieren sie empfindlicher auf eine Infektion mit Plasmodien als unbehandelte Kontrollmäuse. Umgekehrt werden männliche Mäuse nach einer Kastration resistenter gegenüber *P. chabaudi* Infektionen (Wunderlich *et al.*, 1988; Schmitt-Wrede *et al.*, 1991; Mossmann *et al.*, 1997). Der genaue Mechanismus der Wirkung ist noch unklar. Die Wirkung beruht offenbar nicht auf einer direkten Interaktion zwischen Testosteron und dem Parasiten (Wunderlich *et al.*, 1988). Vielmehr spielen u.a. eine Malaria-spezifische T-Zell- und Nicht-T-Zell-Suppression (Benten *et al.*, 1991), eine erhöhte Expression von Proteinen in Nicht-T-Zellen in der Milz (Schmitt-Wrede *et al.*, 1991) und eine erhöhte Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Benten *et al.*, 1991) eine Rolle.

Für den Ausgang einer Infektion sind jedoch nicht nur immunologische Faktoren von Bedeutung. Auf DNA-Ebene konnten im Genom der Maus einige Gene innerhalb eines chromosomalen Bereiches identifiziert werden, der als 'char locus' bezeichnet wurde

und deren Vorhandensein auf eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer *Plasmodium chabaudi* Malariainfektion hindeutet (Burt *et al.*, 2002).

Die in Tabelle 2 aufgeführten Parasit-Wirt Kombinationen zeigen, daß das Überleben einer Malariainfektion im Mausmodell mit der Fähigkeit verbunden ist, die erythrozytäre Phase der Infektion innerhalb der ersten 7-14 Tagen zu kontrollieren.

Im Maus-Modell einer nicht-letalen Malariainfektion steigt nach der Infektion von C57BL/10 Mäusen mit *Plasmodium chabaudi chabaudi* die Zahl der infizierten Erythrozyten bis zum Höhepunkt am Tag 9 oder 10 an ('Pre-Crisis') und sinkt bis zum Tag 20 wieder ab ('Crisis'). Es kommt danach erneut zu einem leichten Anstieg der Parasitämie und zur völligen Klärung der Infektion am Tag 30-35 (Achtmann *et al.*, 2003).

Während einer *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infektion in C57BL/6 Mäusen findet bereits vor dem Erreichen des ersten Parasitämiemaximums eine Kontrolle der akuten Phase der Infektion statt, noch bevor nachweisbare Produktionen spezifischer IgG Antikörper erfolgen. Für diese frühe Kontrolle ist eine schnelle und ausgedehnte Produktion von IFN- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen notwendig, die mindestens bis zum Tag 14 nach der Infektion anhält (Langhorne *et al.*, 1989; Meding *et al.*, 1990). Eine Hauptaufgabe von IFN- $\gamma$  ist die Aktivierung von Makrophagen und damit die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 sowie löslichen Mediatoren wie NO oder anderen reaktiven Sauerstoffarten. IFN- $\gamma$  kann zusätzlich die Cytokin-Produktion von Dendritischen Zellen steigern, die in Kontakt mit Parasiten waren (Li *et al.*, 2001). Dendritische Zellen, aber auch Makrophagen, produzieren das für die Ausheilung der Infektion wichtige pro-inflammatorische Cytokin IL-12, das sowohl Quantität als auch die Qualität von Antikörper-Antworten auf Blutstadien von *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infektionen steuert (Su *et al.*, 2002).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen unterscheiden. Beide Zelltypen produzieren unterschiedliche Cytokine. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren IL-2, IFN- $\gamma$  und LT- $\alpha$  und initiieren zell-vermittelte Immunantworten durch Aktivierung von Makrophagen. IFN- $\gamma$  reguliert zusätzlich die Produktion von opsonierenden IgG2a Antikörpern in der Maus (Coffman *et al.*, 1993). T<sub>H</sub>2-Zellen produzieren die Cytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13, die B-Zell-vermittelte Antworten regulieren. T<sub>H</sub>2-Zellen produzieren auch IL-10, welches zu anti-inflammatorischen Antworten führt und antagonistisch auf die T<sub>H</sub>1-vermittelte Makrophagenaktivierung wirkt (Moore *et al.*, 1993).

Für den Verlauf der Immunantwort spielen außerdem T<sub>H</sub>3-Zellen eine Rolle. Sie sekretieren den 'Transforming growth factor  $\beta$ ' (TGF- $\beta$ ), der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Cytokinantworten regulieren kann. Eine TGF- $\beta$ -Produktion ist mit einer Klärung von *Plasmodium chabaudi* und *Plasmodium yoelii* Infektionen assoziiert (Behr *et al.*, 1996). Entscheidend dafür ist jedoch der Zeitpunkt der TGF- $\beta$  Produktion. Wenn in murinen Malariainfektionen eine TGF- $\beta$  Produktion am ersten Parasitämiepeak in niedrigen Dosen erfolgt, unterstützt dies die Ausheilung der Infektion. Gibt man Mäusen im frühen Infektionsstadium eine hohe Dosis TGF- $\beta$ , führt dies zur einer Unterdrückung der frühen inflammatorischen Antwort von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und damit zum tödlichen Ausgang der Infektion (Omer *et al.*, 2003).

In nicht-letalen *Plasmodium chabaudi* Mausmodellen konnte gezeigt werden, daß für die Ausheilung einer Malariainfektion sowohl T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>2-Zellen nötig sind. Der Zeitpunkt des Wechsels von einer T<sub>H</sub>1- auf eine T<sub>H</sub>2-Antwort ist für die Ausbildung protektiver Immunität kritisch (Langhorne *et al.*, 1989a; Langhorne *et al.*, 1989b; Stevenson *et al.*, 1993). Obwohl ältere Studien zeigen, daß die Kontrolle der Parasitämie nach dem Parasitämiemaximum hauptsächlich von T<sub>H</sub>2-Zellen abhängt (Shear *et al.*, 1989), zeigen neue Studien, daß eine T<sub>H</sub>1-Antwort nicht nur in der akuten

Phase der Infektion zur Induktion von Zell-vermittelten Immunantworten, sondern auch während der chronischen Phase für die Induktion von Antikörpern benötigt wird (Su *et al.*, 2002).

Studien in *Plasmodium yoelii* zeigen, daß in letalen Infektionen große Mengen IFN- $\gamma$  und IL-10 produziert werden, wobei IL-10 in nicht-letalen Infektionen nicht nachweisbar ist (Kobayashi *et al.*, 1996). Dabei sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptquelle für IL-10, was zeigt, daß auch in letalen Infektionen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen aktiviert sind (Kobayashi *et al.*, 1996). Von der Weid *et al.* (1993, 1996) konnten gezeigt werden, daß ohne B-Zellen oder Antikörper-produktionen eine Malariainfektion im Mausmodell nicht ausgeheilt werden kann. Mäuse die durch 'knock-out' keine B-Zellen mehr besitzen, können *Plasmodium yoelii* und *Plasmodium chabaudi chabaudi* sowie *Plasmodium yoelii adami* Infektionen nicht klären. In einigen Fällen kommt es zum tödlichen Verlauf (von der Weid *et al.*, 1996). Die Klärung der Infektion durch Antikörper kann dabei über Agglutinierung, Komplement-abhängige Lyse, Neutralisation, Inhibierung der Erythrozyteninvasion oder Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität bzw. Inhibierung (ADCC oder ADCI) erfolgen (Bouharoun *et al.*, 1995). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar. Obwohl Antikörper bei der Ausheilung der Malaria eine Rolle zu spielen scheinen, entwickelt sich erst nach wiederholter Infektion eine Immunität, und diese ist nicht von langer Dauer (Früh *et al.*, 1991; Giha *et al.*, 1999).

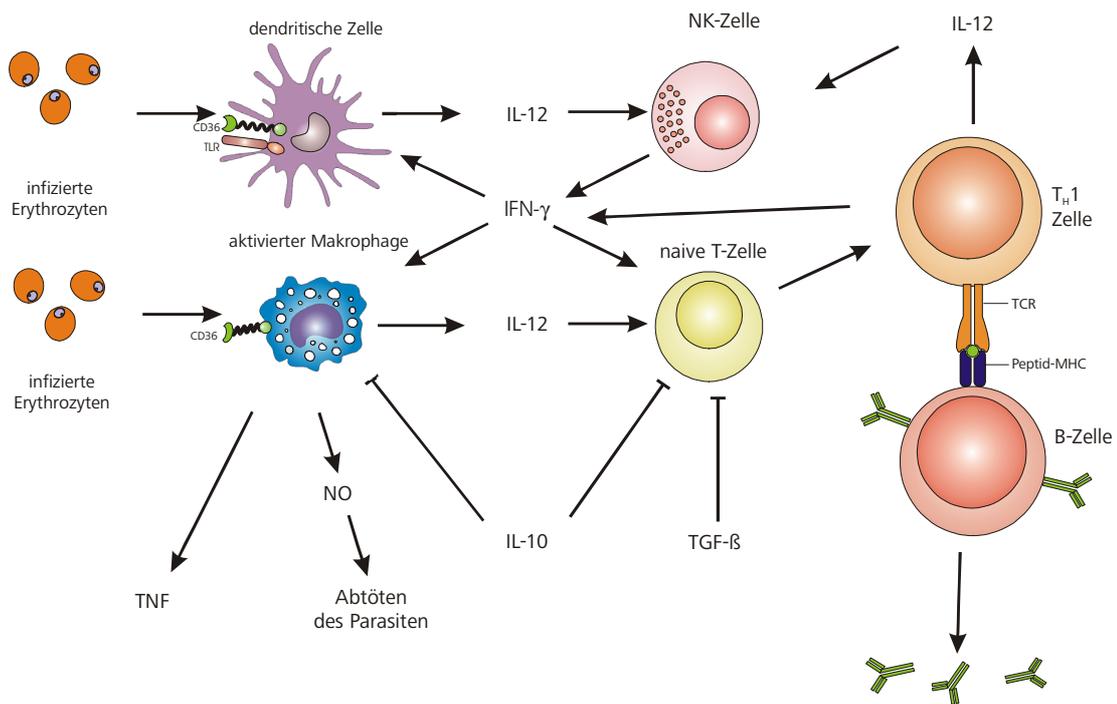
### 1.3.3 Angeborene Immunantworten

Neben der erworbenen Immunantwort ('acquired immune response') spielt auch die angeborene Immunantwort ('innate immune response') für den Ausgang einer Malariainfektion eine wichtige Rolle. Dabei ist entscheidend, welche Zellen Antigene präsentieren und so T-Zellen, speziell CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zur IFN- $\gamma$  Produktion stimulieren, die den Wechsel zu den schützenden, spezifischen Antikörpern der Klassen IgG und der Isotypen 2a und 2b vollziehen (Su *et al.*, 2002, Shear *et al.*, 1989). Es konnte gezeigt werden, daß Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen aus immunen Mäusen Plasmodien-Antigene präsentieren und somit T-Zellen aktivieren können (Quin *et al.*, 2001).

Ergänzend zur Antigenpräsentation von Makrophagen, belegen Studien von angeborenen Immunantworten eine wichtige Funktion für mononukleäre Phagozyten, die infizierte Erythrozyten ohne die Anwesenheit Malaria-spezifischer Antikörper phagozytieren können (Serghides *et al.*, 2003). Weiterhin dienen Makrophagen als Effektorzellen, die während der Ausbildung der erworbenen Immunantwort antiparasitäre Moleküle wie z.B. NO produzieren (Good *et al.*, 1999, 2001).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), wahrscheinlich auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen, produzieren in der frühen Phase der Infektion Interferon- $\gamma$ , welches sich positiv auf den Infektionsverlauf auswirkt, während ein Ausbleiben dieser frühen Reaktion zu letalem Verlauf führt (Mohan *et al.*, 1997, de Souza *et al.*, 1997). Diese NK-Zell-Antworten sind IL-12 abhängig (Mohan *et al.*, 1997; Stevenson *et al.*, 2001). IL-12 wiederum sorgt für die Interaktion von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen und tritt im Plasma *Plasmodium chabaudi* infizierter Mäuse bereits zwei Tage nach der Infektion auf (Mohan *et al.*, 1998).

Abbildung 3 :  
Verknüpfung von  
angeborener und  
erworbener Immunität  
gegen Blutstadien einer  
Malaria Infektion  
(modifiziert nach  
Stevenson und Riley,  
2004)



Als antigenpräsentierende Zellen vernetzen Dendritische Zellen angeborene und adaptive Immunantworten (Sher *et al.*, 2003). Die Aktivierung von DCs und Makrophagen gehört zu den ersten Reaktionen einer Malariainfektion durch den Kontakt mit dem Parasiten (Li *et al.*, 2001). Darauf erfolgt die Produktion von IL-12, das wiederum die Entwicklung von naiven  $CD4^+$  T-Zellen zu  $T_H1$ -Zellen induziert (Macatonia *et al.*, 1995), sowie die Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD40 und CD86 bewirkt (Li *et al.*, 2001). Dabei benötigen Dendritische Zellen kein zweites aktivierendes Signal.

T-Zellen mit dem  $\gamma\delta$ -Rezeptor machen nur etwa 5% der Gesamt-T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Menschen aus (Kwiatkowski *et al.*, 1993).  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen nicht-peptidische Antigene ohne MHC-Präsentation (Lou *et al.*, 1997). Die Aktivierung erfolgt in der frühen Phase der Infektion. Entgegen bisheriger Annahmen steht die frühe Aktivierung nicht im Zusammenhang mit der Induktion von T-Helferzellen bei der Ausbildung protektiver Immunität mittels bestrahlter Sporozoitien (McKenna *et al.*, 2000). Vielmehr konnte gezeigt werden, daß durch die direkte, MHC-unabhängige Erkennung von Antigenen, Sporozoitien im Blut erkannt und inaktiviert werden können (McKenna *et al.*, 2000). Weiterhin spekulieren McKenna *et al.* (2000) auf eine mögliche Bekämpfung der infizierten Hepatocyten durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Neben der Kontrolle der akuten Parasitämie von *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infektionen, spielen  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Regulation von  $CD4^+$  T-Zellen eine Rolle (Seixas *et al.*, 2002). Weitere Experimente im Mausmodell werden nötig sein, um ein Gesamtbild der komplexen Interaktionen T-Zell-vermittelter Mechanismen bei der Parasitenabwehr zu bekommen.

#### 1.4 Die *gimap* Genfamilie in Maus und Mensch

Die *gimap* Gene (G-protein-immune-associated-protein) bilden eine große Familie, die sich aus 9 Genen in der Maus, aus 8 Genen des Menschen und mindestens drei Genen in der Ratte zusammensetzt. Die Gene werden im Zusammenhang mit Malaria und Immunerkrankungen, wie z.B. Diabetes, untersucht. Alle Gene haben als charakteristisches Merkmal eine GTP-bindende Domäne mit unbekannter Funktion, die stark konserviert und stark homolog mit der des verwandten Proteins AIG1 in

*Arabidopsis thaliana* ist. *AI1* wird bei Infektionen durch das Bakterium *Pseudomonas syringae* in Pflanzen induziert (Reuber und Ausubel, 1996).

In der Literatur wurden die Gene zunächst, in Anlehnung an das zuerst entdeckte *imap38*, als *IAN*-Gene ("immune associated nucleotide") oder (*h*)*imap*-Gene bezeichnet, wobei ein vorangestelltes 'h' das jeweilige Gen im menschlichen Genom bezeichnet. Jedoch sind die Bezeichnungen für die einzelnen Gene höchst verwirrend. So bezeichnen einige Autoren *IAN4* als *Ian5* (Hornum *et al.*, 2002; Daheron *et al.*, 2001) oder *imap38* (Krücken *et al.*, 1999) wird synonym mit *mIAN2* verwendet (Poirier *et al.*, 1999; MacMurray *et al.*, 2002). Daher wurde von unserer Arbeitsgruppe sowohl für die Gene der Maus als auch für die des Menschen eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen und die Gene im folgenden nur noch als *gimap* Gene bezeichnet (Krücken *et al.*, 2004). Die Namensgebung der Gene lehnt sich an das zuerst entdeckte *imap38*-Gen an. Eine Übersicht über die neuen Bezeichnungen, die in der Literatur verwendeten Synonyme sowie die Datenbank-Nummern für Maus und Mensch finden sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3: Nomenklatur der *gimap* Genfamilie**

Neue <i>gimap</i> Nomenklatur	Synonym Maus	'Accession' Nummer Maus	Synonym Mensch	'Accession' Nummer Mensch
<i>gimap1</i>	<i>iap38</i> <sup>a</sup> <i>imap38</i> <sup>b</sup> <i>mIAN2</i> <sup>c,e</sup>	NM_008376, NM_175860, AJ133125, Y08026	<i>himap1</i> <sup>d</sup> , <i>hIAN2</i> <sup>e</sup>	AJ306287, NM_130759, BC040736, AK091818
<i>gimap2</i>	nicht im Mausgenom vertreten	nicht verfügbar	<i>himap2</i> <sup>d</sup> , <i>hIAN12</i> <sup>e</sup>	AL110151, BC013934, BC032345, XM_055586
<i>gimap3</i>	<i>mIAN4</i> <sup>f</sup> (funktionelles Gen)	AF337052	<i>hIAN4</i> <sup>e</sup> (Pseudogen)	NM_018384
<i>gimap4</i>	<i>mIAN1</i> <sup>f</sup>	NM_174990	<i>himap4</i> <sup>d</sup> , FLJ111110, <i>hIAN1</i> <sup>c,e</sup> , MSTP062	AK001972
<i>gimap5</i>	<i>mIAN5</i> <sup>e</sup>	NM_175035, AK052694	<i>himap3</i> <sup>d</sup> , <i>hIAN5</i> <sup>e,g,h,i</sup> , <i>IAN4L1</i> <sup>j</sup> , <i>Irod</i> <sup>g</sup> , <i>FLJ11296</i>	Spleiß Variante 1: AK002158, BC011732; Spleiß Variante 2: AK055568
<i>gimap6</i>	<i>mIAN6</i> <sup>e</sup>	NM_153175	<i>hIAN6</i> <sup>e</sup> , <i>hIAN2</i> <sup>k</sup>	Spleiß Variante 1: NM_024711 Spleiß Variante 2: AK074044
<i>gimap7</i>	<i>mIAN7</i> <sup>e</sup>	NM_174960	<i>hIAN7</i> <sup>e,k</sup>	NM_153236
<i>gimap8</i>	<i>mIAN11</i> , <i>mIAN10</i> , <i>mIAN9</i> <sup>e</sup>	XM_144696	<i>hIAN11</i> , <i>hIAN10</i> , <i>hIAN9</i> <sup>e</sup> , <i>hIAN4</i> , <i>hIAN3</i> , <i>hIAN6</i> <sup>k</sup>	AL834361
<i>gimap9</i>	<i>mIAN3</i> <sup>c,d,e</sup>	NM_146167, BC026200, AK040029	nicht im menschlichen Genom vorhanden	nicht verfügbar
<i>gimap10</i>	<i>mIAN8</i> <sup>e</sup> (Pseudogen)	NT_039943	nicht im menschlichen Genom vorhanden	nicht verfügbar

a Krücken *et al.*, 1997

b Krücken *et al.*, 1999

c Poirier *et al.*, 1999

d Stamm *et al.*, 2002

e MacMurray *et al.*, 2002

f Daheron *et al.*, 2001

g Sandal *et al.*, 2003

h Zenz *et al.*, 1004

i Pandarpurkar *et al.*, 2003

j Payne *et al.*, 2004

k Cambot *et al.*, 2002

### 1.4.1 Die *gimap* Genfamilie in Maus und Ratte

In mit *Plasmodium chabaudi* infizierten Mäusen wurde bei Untersuchungen einer cDNA-Bank das Gen *mgimap1* gefunden, das bei immunen Mäusen des Stammes C57BL/10 hauptsächlich in der Milz exprimiert wird. In Niere und Herz ließ sich nur eine schwache Expression feststellen (Krücken *et al.*, 1997). Die Expression von *mgimap1* ist dabei abhängig von der Infektion und dem Immunstatus der Mäuse. In nicht infizierten Mäusen läßt sich nur eine sehr geringe Expression feststellen (Krücken *et al.*, 1997).

'Northern-Blot'-Analysen ergaben in der Milz eine 50-fach höhere Expression in immunen gegenüber nicht mit *Plasmodium chabaudi* infizierten Mäusen. Das hohe Expressionsniveau blieb sogar noch 13 Wochen nach der Infektion erhalten, wenn auch die Parasiten seit mehr als 8 Wochen nicht mehr nachweisbar waren (Krücken *et al.*, 1997). Soeben publizierte Ergebnisse von Choong *et al.* (2004) zeigen eine 20-fache Überexpression in CAFC-Zellen ('coubblestone area-forming cells'), einer Subklasse hematopoetischer Zellen, gegenüber nicht differenzierten hematopoetischen Zellen.

Verschiedene Mausstämme mit einem C57BL/10 und einem C57BL/6 Hintergrund exprimieren *mgimap1*-mRNA auf niedrigem Niveau. Infektionen mit *Plasmodium chabaudi* führten 7 Tage nach der Infektion zu einem starken Anstieg der Expressionsrate unabhängig vom *H-2*-Komplex und dem Geschlecht. Im Vergleich dazu exprimieren Mäuse mit einem genetischen BALB und DBA Hintergrund *mgimap1* nur sehr niedrig am Tag 7 nach der Infektion. Dieses korreliert mit dem Vorhandensein von Resistenzgenen im C57BL-'non-*H-2*-background' (Krücken *et al.*, 1999). Diese Gene werden für die Ausbildung protektiver Immunantworten benötigt.

Krücken *et al.* (1997, 1999) beschreiben ein genomisches Fragment von 4552 bp, mit einem GC-Gehalt von 51,4 %, welches das komplette *mgimap1* enthält. In der kodierenden Region beträgt der GC-Gehalt 63,1 %. Es gibt drei Transkriptionsstarts an Position 1731, 1790 und 1823. Position 1731 wurde als +1 definiert. Das längste Transkript besteht aus 1900 Nukleotiden. Das offene Leseraster (ORF) startet an Position 632 mit dem achten AUG-Codon der mRNA und kodiert für ein 277 Aminosäuren langes Polypeptid (mGIMAP1) mit einem Molekulargewicht von 38 kDa (Krücken *et al.*, 1999).

In Transfektionsversuchen in CHO-K1 Zellen konnte mGIMAP1 mittels konfokaler Lasermikroskopie in den Kernen der Zellen lokalisiert werden (Krücken, *et al.* 1999). Der ORF zeigt eine große Homologie zu *mgimap4*. Bei PSI-Blast-Analysen wurde entdeckt, daß die GIMAP-ähnlichen Proteine für putative GDP/GTP-bindende Proteine kodieren. Auf Proteinebene finden sich Homologien zum Protein AIG1 aus *Arabidopsis thaliana*, das bei bakteriellen Infektionen induziert wird (Reuber *et al.*, 1996). Hohe Expressionsraten des GIMAP4-Proteins wurden in T-Zellen gefunden, während sich in B-Zellen nur wenig, in Peritoneal-Makrophagen jedoch keine Expression detektieren ließ. Es liegt der Schluß nahe, daß es sich bei *mgimap4* um das T-Zell-spezifische, paraloge Protein zu mGIMAP1 handelt, das überwiegend in B-Zellen und Makrophagen, jedoch nicht in T-Zellen exprimiert wird (Poirier *et al.*, 1999).

*mgimap3* ist ein murines Gen, das, wie *mgimap1*, auf Chromosom 6 der Maus lokalisiert ist. Das Transkript ist 2,1 kb groß und die mRNA besteht aus zwei offenen Leserastern von 67 (uORF) und 301 Aminosäuren mit einer GTP-/ATP-Bindungsstelle am N-Terminus und einem hydrophoben Bereich am C-Terminus. Das zweite offene Leseraster weist Ähnlichkeiten mit *mgimap4* auf. Das Gen wird in hematopoetischen 32D-Vorläuferzellen exprimiert, die mit *BCR/ABL* transfiziert wurden. *BCR/ABL* ist ein Onkogen, das chronische, myelogene Leukämie auslöst und auf eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 zurückgeht. Diese Translokation resultiert in einer

Fusion aus der 'Cluster'-Region (breakpoint cluster region) mit Sequenzen des *c-abl* Genes, einem zellulären Homolog des transformierenden Gens des Abelson Murinen Leukämie Virus (Clark *et al.*, 1988). Niedrige Level von *mgimap3* können auch in der murinen Milz, nicht aber in Thymus, Leber und Niere nachgewiesen werden.

Der zweite ORF von *mgimap3* weist eine starke Homologie zu einem Gen des Menschen, das als *gimap5* bezeichnet wurde, sowie zu *gimap1* auf (Daheron *et al.*, 2001). Experimente zur Lokalisation zeigten, daß mGIMAP3 als Typ II Membranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, wobei die GTP-bindende Domäne ins Cytosol gerichtet ist. Maßgeblich verantwortlich für die Lage an der äußeren Mitochondrien-Membran ist der C-terminale Anker aus 22 Aminosäuren (Daheron *et al.*, 2001).

Das *gimap5* Gen wird zunehmend mit Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Die 'Diabetes-Prone BB (BioBreeding)' Ratte (DP-BB) entwickelt eine Lympho(zyto)penie, eine Verminderung der Lymphozytenzahl im Blut, und eine spontane, insulinabhängige Diabetes, während die 'DR-BB Ratte (Diabetes-Resistant)' weder Diabetes noch Lymphopenie entwickelt. Als Kennzeichen von Lymphopenie gilt die Verminderung der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut, eine noch deutlichere Verminderung der peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie ein fast völliges Fehlen von RT6<sup>+</sup> T-Zellen (Greiner *et al.*, 1986). Als Ursache konnte auf dem Chromosom 4 der Ratte ein Gen mit der Bezeichnung *iddm1* bzw. *lyp* identifiziert werden. Eine genauere Lokalisation des Gens im Genom der Ratte zeigte, daß es sich um *gimap5* handelte und Homologe in Mensch und Maus existieren (Hornum *et al.*, 2002). RACE-Techniken ergaben zwei sich am 5'-Ende unterscheidende Transkripte von 1245 bp und 1310 bp, die für zwei offene Leseraster von 304 und 308 Aminosäuren kodierte. Eine Analyse der Expressionsmuster ergab unterschiedliche Ergebnisse für beide Rattentypen. Bei DR-BB Ratten findet sich das GIMAP5 Protein in der Milz und über den gesamten Thymus verteilt, während es in DP-BB Ratten in Milz und Thymus nur sehr niedrige Expressionslevel aufweist (Hornum *et al.*, 2002). Der Unterschied ließ sich auf eine Mutation zurückführen, die in einer Verschiebung des Leserasters resultiert. Dem daraus deduzierten Protein fehlen die letzten 205 Aminosäuren am C-Terminus, was dazu führt, daß es nicht mehr in der äußeren Mitochondrienmembran verankert werden kann. Die genaue Funktion von *rgimap5* in der Ratte konnte noch nicht aufgeklärt werden. Bisherige Erkenntnisse sprechen aber für eine Rolle in der Regulation von Apoptosevorgängen während der Thymocytenentwicklung (Hornum *et al.*, 2002). Dafür spricht insbesondere seine Lokalisation in der Mitochondrienmembran, denn dieses Organell gilt als wichtige Kontrollinstanz für die Regulation des programmierten Zelltods (Lam *et al.*, 2001). GIMAP5 ist ein GTP-bindendes Protein und diese Proteine konnten in Drosophila und Reis mit Apoptosevorgängen in Zusammenhang gebracht werden (Lam *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen, die an Diabetes-Ratten durchgeführt wurden, konnten zeigen, daß GIMAP5 in der Mitochondrienmembran für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich ist. Ein Verlust des Membranpotentials zählt zu den frühen Ereignissen, die zur spontanen Apoptose in *gimap5*-knock-out T-Zellen führen. Auf molekularer Ebene wird diese Regulation vermutlich durch Interaktionen mit bestimmten Poren in der Membran vermittelt, wobei GIMAP5 nach bisherigen Erkenntnissen die Regulation der Permeabilität der Poren übernimmt (Pandarpurkar *et al.*, 2003).

Damit übernimmt *gimap5* eine ähnliche Funktion wie Gene der *Bcl-2* Familie (z.B. *Bax*, *Bak*), die als Schlüsselstelle der Apoptose-Induzierung durch Cytochrom C gelten. Die Gene der *Bcl-2* Familie werden in drei Gruppen unterteilt je nach Anzahl der sogenannten BH-Motive, von denen es insgesamt vier verschiedene Typen gibt. Die

Oligomerisierung der BAX/BAK Proteine führt zur Formation einer Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom C ins Cytosol gelangt und an Apaf1 bindet, was zur Bildung eines Apoptosoms und damit zum Zelltod führt (Krauss, 2003).

#### 1.4.2 Die *gimap* Gene des Menschen

Orthologe *gimap* Gene zu denen in Maus und Ratte finden sich im menschlichen Genom. Sie sind dort auf dem Chromosom 7q32-36 lokalisiert, einer Region mit hoher Synthenie zum Maus-Lokus auf Chromosom 6 (Stamm *et al.*, 2002). Wie schon die *mgimap* Gene in der Maus enthalten die *hgimap*-Sequenzen verschiedene konservierte GTP-Bindemotive die sich ebenfalls im *AIG1*-Gen von *Arabidopsis thaliana* finden lassen.

Das *hgimap1* Gen besteht aus drei Exons, von denen das erste nicht kodierende Sequenzen enthält, das zweite 14 AS und das letzte Exon 95 % der Sequenz kodiert. Das resultierende Protein mit einem Molekulargewicht von 34,3 kDa weist 64 % Identität und 75 % Ähnlichkeit zu mGIMAP1 auf. Das *hgimap1* Gen wird in verschiedenen Geweben des Menschen, vor allem aber in der Milz und auf geringerem Level in den Lymphknoten exprimiert. Subzelluläre Lokalisationen zeigen, daß das Genprodukt, wie auch mGIMAP1, am ER lokalisiert ist. Die Proteinsequenzen weisen zusätzlich zum ER-Lokalisationssignal ein GTP-Bindemotiv auf, jedoch konnte bisher nur für *hgimap1*, nicht aber für *mgimap1* die Bindung von GTP nachgewiesen werden (Stamm *et al.*, 2002).

TBLAST-Analysen führten zur Entdeckung weiterer *hgimap* Gene, die alle auf Chromosom 7q32-36 des Menschen liegen, aber nur zum Teil Orthologe im Maus-Genom haben (Stamm *et al.*, 2002, Krücken *et al.*, 2004). Eine Übersicht findet sich in Tabelle 3. Die Proteinsequenzen von hGIMAP2, hGIMAP5 und hGIMAP4 zeigen 43 % Identität (62 % Ähnlichkeit), 46 % Identität (62% Ähnlichkeit) und 44 % Identität (65 % Ähnlichkeit) zu hGIMAP1 (Stamm *et al.*, 2002).

Das *hgimap4* Gen kodiert für ein 38 kDa Protein und wird in hematopoetischen Zellen und dort vor allem in T- und B-Zellen sowie in der Milz auf hohem Level exprimiert. Die Expression wird auf posttranskriptionalem Niveau während der T- und B-Zell Aktivierung reguliert. Niedrigere Expressionslevel finden sich in Thymus, Colon und Ovarien. Untersuchungen in BaF3-Zellen, die normalerweise bei Entzug von IL-3 in der G1-Phase des Zell-Zyklus innehalten, konnten zeigen, daß eine Expression von *hgimap4* zu einem Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase führt. Diese Daten lassen die Vermutung zu, daß hGIMAP4 in Regulationsmechanismen am G<sub>1</sub>-Kontrollpunkt im Zellzyklus von T- und B-Lymphozyten involviert ist (Cambot *et al.*, 2002).

*hgimap5*, das menschliche orthologe Gen zu rIAN4/5 der Diabetes-Ratte, besteht aus drei Exons (inklusive eines nicht kodierenden 5' Exons) und kodiert für ein 35 kDa Protein, welches, wie das mGIMAP4, in der äußeren Mitochondrienmembran vergleichbar zum Bcl-2-Protein lokalisiert ist (Zenz *et al.*, 2004). In einer zuvor erschienenen Publikation von Sandal *et al.* (2003) konnten jedoch das identische Irod/Ian5 Protein in der centrosomalen Region sowie am Golgi und am ER, aber nicht an der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden. Zenz *et al.* (2004) konnten für diese gegensätzlichen Ergebnisse keine Erklärung liefern. In der Proteinsequenz finden sich weiterhin N-Glykosylierungsstellen, eine Tyrosin-Kinase- und Protein-Kinase C-Phosphorylierungs-stelle sowie drei N-Myristillierungs-Motive. Das hGIMAP5-Protein enthält zwei 'coiled-coil' Domänen. Der C-Terminus läßt durch hohe Ähnlichkeiten zu den G-Motiven (G-2 bis G-4, Valencia *et al.*, 1991) und zu der vielen GIMAP-Proteinen eigenen Transmembrandomäne, funktionelle Ähnlichkeiten zu anderen Mitgliedern der *gimap*-Familie erkennen. *hgimap5* läßt sich in allen Geweben außer im ZNS

nachweisen, während sich hohe Expressionslevel in lymphoiden Geweben, hier vor allem in Lymphknoten, Milz, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Monozyten nachweisen lassen. In B-Lymphozyten läßt sich unter normalen Bedingungen keine Expression nachweisen. Lediglich bei verschiedenen B-Zell-Leukämieformen konnte eine erhöhte Expressionsrate festgestellt werden (Zenz *et al.*, 2004). Die Expression des *hgimap5* und *hgimap2* Gens kann auch in reifenden T- und B-Zellen detektiert werden (Cambot *et al.*, 2002). Diese Daten deuten darauf hin, daß dieses Gen nicht nur bei der T-Zell-Entwicklung und -Funktion eine Rolle spielt, sondern auch bei B-Zell-Leukämie durch Inhibierung der Apoptose von Bedeutung ist (Zenz *et al.*, 2004). Eine ähnlich anti-apoptotische Wirkung, die jedoch wahrscheinlich nicht nur auf Immunzellen beschränkt ist, konnten auch Sandal *et al.* (2003) in ihren Untersuchungen zeigen.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß *mgimap1* nur ein Prototyp einer aus neun Genen bestehenden Familie ist und auch andere Mitglieder in der Milz exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gewebespezifische Expression einiger Vertreter dieser Genfamilie sowohl in der Milz, als auch in anderen Organen untersucht. Die untersuchten Gene *mgimap8* und *mgimap10* wurden im Hinblick auf die genomische Organisation, subzelluläre Lokalisation, Gewebeverteilung und eine mögliche Funktion in der Maus analysiert.

Den Abschluß der Untersuchungen bildete die Untersuchung eines großen 5'-UTR Bereiches des *mgimap1* Gens. Dieser Bereich wurde in Teilbereiche unterteilt und in ein geeignetes Reportergensystem kloniert. Mit Hilfe dieses Systems wurden die möglichen regulierenden Abschnitte in diesem Bereich analysiert.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

- Agarose-Gel Ladungspuffer (6x): MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
- Ammoniumperoxodisulfat (APS): MERCK, Darmstadt
- AMS Mouse Poly A<sup>+</sup> Northern Blot-12 major tissues: AMS GmbH Biotechnology Europe, Wiesbaden
- AMV Reverse Transkriptase: Roche, Mannheim
- Bacto™ Hefe Extrakt: Difco, Sparks, MD, USA
- Biotryne Membran: Pall Gelman Laboratory, Dreieich
- Biomax MS Screen: Eastman Kodak Company, New York
- Biomax MS Scientific Imaging Film: Eastman Kodak Company, New York
- BSA: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Classic 18S Primer und Competimere: Ambion, Huntingdon, U.K.
- cMaster RT<sub>plus</sub> PCR-System: Eppendorf AG, Hamburg
- Complete Protease Inhibitor, Roche, Mannheim
- Concanavalin A-Alexa Fluor 594 Konjugat: Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Concanavalin A-Rhodamin: Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
- DABCO (1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)Oktan): MERCK, Darmstadt
- DAPI: 4,6-Diamino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM): Invitrogen, Karlsruhe
- DMEM mit Glutamax I, 4500 mg/l D-Glukose, Natriumpyruvat: Invitrogen, Karlsruhe
- Dynabeads mRNA Purification Kit: Dynal Biotech GmbH, Hamburg
- ECL „Western blotting“ Detektionsreagenzien: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- Expand High Fidelity PCR System: Roche, Mannheim
- Express Hyb™ Hybridisierungslösung: Clontech, Palo Alto, USA
- Filterpapier: Whatman Ltd., Maidstone, England
- Fötales Kälberserum (FCS): PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- FuGENE6 Transfection Reagent: Roche, Mannheim
- Galacto-Star™-System: Applied Biosystem, Bedford, USA
- G418 Sulfat (Geneticin): Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA
- GelCode Blue Stain Reagent, Pierce, Rockford, USA
- Giemsa-Färbelösung, MERCK, Darmstadt
- Größenstandards:  $\lambda$  DNA (*EcoRI/HindIII*-restringiert),  $\lambda$  DNA (*HindIII*-restringiert) und pUC Mix Marker 8: MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
- Ham's F-12 Pulvermedium: Invitrogen, Leek, Niederlande
- Hefeextrakt: Difco, Sparks, MD, USA
- Hybond™-N Nylonmembranen: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- Hyperfilm™ MP ECL: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM): Invitrogen, Karlsruhe
- Invisorb RNA Kit II: Invisorb, Berlin
- Kodak Film für <sup>32</sup>P Exposition, Biomax MS™: Rochester, New York, USA
- Long Ranger® Gel Solution: Cambrex Bio Science, Rockland, USA
- LysoTracker Red DND-99: Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Megaprime™ DNA Labelling system: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- May-Grünwald-Färbelösung, MERCK, Darmstadt
- MitoTracker Red CMX Ros: Molecular Probes, Leiden, Niederlande

- Mowiol: Polyscience, Niles, USA
- Nitrozellulosemembranen; Protan BA 85: Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
- NucleoBond.PC100 Kit: Macherey Nagel, Düren
- NucleoBond PC500 EF Kit: Macherey Nagel, Düren
- NucleoSpin<sup>®</sup> Extract Kit: Macherey Nagel, Düren
- NucleoSpin<sup>®</sup> MiniPrep Kit: Macherey Nagel, Düren
- Oligonucleotide / Primer: MWG, Ebersberg
- PCR Nukleotid Mix (dNTP Mix): Roche, Mannheim
- Petrischalen für Gewebekultur und Mikrobiologie: Greiner, Solingen,
- peqGOLD TriFast: peqLAB, Erlangen
- Platinum *Pfx* DNA Polymerase: Invitrogen, Leek, Niederlande
- Propidiumjodid: Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Qiagen Plasmid-Mini Kit: Qiagen GmbH, Hilden
- Qiagen Plasmid-Midi Kit: Qiagen GmbH, Hilden
- Radiochemikalien: MP Biomedicals GmbH, Eschwege
- RPMI-Medium: Invitrogen, Karlsruhe
- Random Hexamer Primer: Perkin Elmer, Weiterstadt
- RotiLoad-Puffer (4 ×): Roth, Karlsruhe
- RotiBlock-Lösung (10 ×): Roth, Karlsruhe
- RNasin: Promega, Heidelberg
- Restriktionsenzyme und dazugehörige 10 × Puffer: MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
- Select Agar: Invitrogen, Karlsruhe
- Sterilfilter: Nunc, Wiesbaden
- Streptomycin/Penicillin Lösung: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> Kompetente Zellen: Invitrogen, Leek, Niederlande
- *Taq* DNA Polymerase in Storage Buffer A: Promega, Heidelberg
- Thermo Sequenase<sup>™</sup> Primer Cycle Sequencing Kit: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- TripleMaster PCR System: Eppendorf AG, Hamburg
- Trypton Pepton (pankreatischer Verdau von Casein): Difco, Sparks, MD, USA
- Wasser für die Molekularbiologie, filtriert mit 0,2  $\mu$ m Membranfilter, DEPC behandelt: Fluka, Neu Ulm
- weitere Chemikalien für das molekularbiologische Labor: Fluka, Neu Ulm; Roth, Karlsruhe

## 2.2 Lösungen und Puffer

Die folgende Auflistung gibt die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen wieder, die im Text nicht näher beschrieben werden.

Acrylamid Stock (AA/Bis):	29,2 % Acrylamid, 0,8 % N,N-Methylenbisacrylamid in dH <sub>2</sub> O
Agarosegel-Ladungspuffer (6 ×):	30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF in dH <sub>2</sub> O
Alkalischer Gel-Ladungspuffer (6 ×):	300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18 % (w/v) Ficoll (Typ 400, Pharmacia), 0,15 % (w/v) Bromkresolgrün, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in dH <sub>2</sub> O
Alkalischer Agarose Gel-Elektrophorese-Puffer (10 ×):	500 mM NaOH, 10 mM EDTA
Blocklösung:	1 % BSA in TST-Puffer
Blotpuffer (Western Blot):	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3 in dH <sub>2</sub> O
CPD-Puffer:	29,4 g Natriumzitatmonohydrat, 0,7 g Zitronensäure, 22,5 g Glukosemonohydrat, 1,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 1 l dH <sub>2</sub> O, pH mit 1M NaOH auf pH 7,2 einstellen
ConA (Stammlösung):	20 mg/ml ConA in 0,5 % BSA, 0,5 % FCS in PBS <sup>-</sup>
ConA Färbelösung:	0,5 % BSA, 0,5 % FCS in PBS <sup>-</sup>

DABCO (1,4-Diazabicyklo-[2,2,2]Oktan):	2 % (w/v) zu Mowiol hinzufügen
Dehnhardts (50 ×):	5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia), 5 g Polyvinylpyrrolidon, 5 g BSA (Fraktion V), ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
Denaturierungslösung „Southern Blot“:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Fixierlösung I:	0,5 % Formaldehyd in PBS <sup>-</sup>
Fixierlösung II:	99,8 % Methanol (p.a.) auf -20 °C vorgekühlt
Giemsa-Sörensen-Lösung:	5 ml Giemsa-Lösung (MERCK, Darmstadt) mit 20 ml Sörensenpuffer kruz vor Gebrauch mischen und filtrieren
Glyoxalgel-Ladungspuffer:	10 mM Natriumphosphat (pH 7,0), 50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau aus RNase-freien Stammlösungen mischen
Hybridisierungslösung:	6 × SSC, 2 × Dehnhardts, 0,1 % SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA in dH <sub>2</sub> O
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
LB-Medium:	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl mit 10 mM NaOH auf pH 7,5 einstellen ad 1 l dH <sub>2</sub> O
Long Ranger Mastermix:	6 M Harnstoff, 100 ml 5 × TBE, 60 ml „Long Ranger Gel“ Solution, ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
Lösung D1:	4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 1 % Mercaptoethanol
Mowiol-Lösung (25 ml):	2,4 g Mowiol 418, 6 g Glycerin, 6 ml dH <sub>2</sub> O 2 h bei RT schütteln, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 hinzufügen und über Nacht bei 80 °C im Wasserbad schütteln, Lagerung in 1,5 ml Aliquots bei -20 °C
Natriumacetat-Lsg. (pH 4,0):	2 M Natriumacetat mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4,0 einstellen
Natriumacetat-Lsg. (pH 5,5):	3 M Natriumacetat mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5,5 einstellen
0,2 M Natriumphosphatpuffer:	107,4 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Einstellung von pH 6,8 mit Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 1 l dH <sub>2</sub> O
0,1 M Natriumphosphatpuffer:	4,2 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Einstellung von pH 7,0 mit Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
0,05 M Natriumphosphatpuffer:	10,5 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Einstellung von pH 7,0 mit Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
0,01 M Natriumphosphatpuffer:	8,4 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Einstellung von pH 7,0 mit 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 2 l dH <sub>2</sub> O
Neutralisierungslösung für alkalische Agarose-Gele:	1 M Tris-CL (pH 7,6), 1,5 M NaCl
NZY-Medium:	5 g NaCl, 2 g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NZ-Amin, pH 7,5, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
PBS <sup>-</sup> :	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 0,15 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 1 l dH <sub>2</sub> O, pH 7,2
PBS <sup>+</sup> :	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1 g MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O, 0,1 g CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O getrennt lösen, mischen, ad 1 l dH <sub>2</sub> O, pH 7,2
Phosphatstammlösung:	0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 1 l dH <sub>2</sub> O
RIPA-Puffer:	100 mM Tris-HCL pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 % Natriumdodecylsulfat, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100 und je 10 ml eine Mini-Tablette Protease- Inhibitor (Roche),
SSC (20 ×):	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Sequenzgel-Lösung:	40 ml 'Long Ranger Mastermix', 30 µl TEMED, 250 µl APS (10 %)
SOC-Medium:	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O, 20 mM Glukose in dH <sub>2</sub> O
Sörensen-Puffer:	0,49 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
'Stripping Buffer':	50 % Formamid, 1 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
TAE (40 ×):	1,6 M Tris, 1,33 M Natriumacetat, 0,04 M EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 8,0
TBE (5 ×):	270 g Tris, 17 g EDTA, pH 8,0, 140 g Borsäure, ad 5 l dH <sub>2</sub> O
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
Terrific Broth-Medium:	15 g Bacto-Trypton (Pepton), 24 g Hefe-Extrakt, 4 ml Glycerin, ad 900 ml dH <sub>2</sub> O, autoklavieren, dann 100 ml Phosphatstammlösung hinzufügen
TST-Puffer:	0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCL, pH 7,5; 0,05 % Tween-20 in dH <sub>2</sub> O
Transferlösung:	3 M NaCl, pH 11,4-11,45 (vor Gebrauch einstellen)
Trenngelbuffer (4 ×):	1,5 M Tris-HCL, pH 8,8, 0,4 % SDS in dH <sub>2</sub> O

Trypanblau-Färbelösung:	0,25 % Trypanblau in sterilem dH <sub>2</sub> O, filtrieren
2-YT Medium:	10 g NaCl, 10 g Hefe-Extrakt, 16 g Trypton ad 1 l dH <sub>2</sub> O
Waschlösung I:	2 × SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung II:	0,1 × SSC, 0,1 % SDS

## 2.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg bezogen. Das Primer-Design erfolgte mit dem Online-Programm Primer3 ([www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).

**Tabelle 4: verwendete Oligonukleotide**

Oligobezeichnung	Sequenz 5'→3'	Länge in Bp	T <sub>m</sub> in °C	Modifikation
imap7-up-11	AACTATATTCAACTGCAGGAGGAGACGCTGGA	32	68,0	
imap7-lo-745	TGGTATCACAGGCACTGGTACAAAACCATCTC	32	68,0	
imap9-up-71	AGAAGTGCTTCCCTCTCCAGGCAGAAAGCTATG	32	66,0	
imap9-lo-616	TATCATCTCTGCCATCTTGGTGAGTTGGTTCT	32	66,0	
I7-N	AAAAGTGCAGCAGGAAAACAGC	21	57,9	5' IRD 800
I7-C	CTCACTACTGCTACACAAGTCGT	23	60,6	5' IRD 800
I7-1023 (+)	TCCAGAGATCTCATCGTGGAAAGCTTG	26	64,8	5' IRD 800
I7-1069 (-)	GATTCTTGACAGCAGACTCATCAAG	25	61,3	5' IRD 800
i1-pro-64-up	ATAGGGGATTTTCGGAGGGGAAACTAGGAAAG	32	68,2	
i1-pro-1463-up	TGCCTTTGAGGAACTGTCAGTAAACTCTGCAC	32	68,2	
i1-pro-2362-up	CTGCAAGAATAGCAAGTGTCTGAATTGATGG	32	66,9	
i1-pro-3765-up	ACAAGGGCTATGCAAGAAACCACAAAGAGTTG	32	66,9	
i1-pro-4465-up	CTGGCTGATAGAACTGTGAAATGCAGTCTCGT	32	68,2	
i1-pro-4686-up	TGGAACCCAACCCTTTTACACAGACACACATA	32	66,9	
i1-pro-4792-up	TCAAAAGAAAATCATGCAATTACTTCAACCA	32	60,5	
i1-pro-5024-up	TATGCTAGGCAAATGATTCTAGGCAAATGCTC	32	65,6	
i1-pro-5131-up	TAGAATGGGCTTCAATTTGTCATCTCCAATC	32	65,6	
i1-pro-5238-up	ACAAACAAACAACAACAACCACCACCCTACC	32	66,9	
i1-pro-5337-up	GAATAGAGTCAGCCAAGGAAGGCTCTGTTGAC	32	69,5	
i1-pro-5373-up	TTGATTCTACTAACCTTCTGGACAAACAGCC	32	66,9	
i1-pro-5443-up	GGAATGCTAAGACCACAACATACATGGAAAATG	32	65,6	
i1-pro-5552-lo	TAGAGGAAGTCGCTAGGCTGCCTGGGCTTAGAGATCA	38	73,5	
i6-7-8-up-1	ATGGCGACTTCATCCCACCAAGGAGCAGCT	30	70,9	
i6-7-8-up-961	ACCAAGGCCTTTGCATCCCACAGCAGGGTC	30	72,2	
i6-7-8-lo-1163	ATACGTTTGATGATGCTGAACACATGCTCATCA	33	65,8	
i6-7-8-lo-2067	TTTAAATGCCATAGTAATTTGGCCTAGTGTGATT	35	63,6	
i6 Sonde up	GAGTGCAACTGGGAACACTATCCT	24	62,7	
i6 Sonde lo	GATTTTAATTGACCACCCATGAA	24	57,6	
i6-Sonde-2-up	TAAACATCATCCTCTTGGGAAGGA	24	59,3	
i6-Sonde-2-lo	CCTGGTCTTACCAGTTTCTTTGT	24	61,0	
i7 Sonde up	ATTGTGATCCAGACATGACAGAG	23	60,6	
i7 Sonde lo	CTTCTCGATTTGGCTCAGTAGTTTG	25	61,3	
i8 Sonde up	AGTGATCACATGGTAACCGACAGAT	25	61,3	
i8 Sonde lo	ACTCCACTGCTTTCCATTTTTAAGG	25	59,7	
imap for	CACGCGGTGCGCTGAC	16	58	
imap rev	TCCCCAAAGCCCTTTCTGTA	20	58	
mi6q-up	AAAGCCAGAAAATTCACCAGAGACCAGT	28	63,7	
mi6q-lo	CCCTCAAACCTCTAGTCCCTTTCTGGGA	28	66,6	
mi7q-up	TTCTTGAACCAGGTCAAATTTGGTTCCTT	28	62,2	
mi7q-lo	TCTTGTAACAGCATTGGCACAAATCTT	28	62,2	
mi11-10-9q-up	TTGATGCAATTGAACTTTTGATGATGGA	28	59,3	
mi11-10-9q-lo	CCGCTGCTTCTCACTGAACTGAGTCTTA	28	66,6	
mi10-9q-up	GAGAAAGATACGCAATCTTCAACTACCG	28	63,7	
mi10-9q-lo	AGGATAGTGTTCCAGTTGCACCTCTTT	27	63,4	
mia2q-so-up	CAAGTAGCCAAGGTGGCAGAGATAG	25	64,6	
mia2q-so-lo	AGCAGGTAGATCAAGATGGCCACAC	25	64,6	
mia6q-so-up	TACTGAAGTCGGGGAACAGAGACCT	25	64,6	
mia6q-so-lo	GTCACCTGGTCGAGCGCTGATTTT	23	62,4	
mia7q-so-up	GAGATCCTGAACTCTCATTAACTGTTGC	28	63,7	
mia7q-so-lo	AGGATGGTGTGGCTGTAGCACTCT	25	64,6	
mia11-10-9q-so-lo	CCTGAGCCATATTTTGGAGCCCTTA	24	61,0	
mia11-10-9q-so-lo	AATGCTGTTTCTGCTGCACCTTTTCC	26	63,2	

Tabelle 4: verwendete Oligonukleotide

Oligobezeichnung	Sequenz 5'→3'	Länge in Bp	T <sub>m</sub> in °C	Modifikation
mi10-9-q-so-up	AGAGCCAGGTGGGCAAACACTACT	22	62,1	
mi10-9-q-so-lo	CCACTCCTTCCCAAGAGGATGA	22	62,1	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	55,0	5' IRD 800
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18	55,0	5' IRD 800
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAGT	17	55,0	5' IRD 800
M13 reverse	AACAGCTATGACCAT	15	55,0	5' IRD 800

## 2.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche Mäuse der Inzuchtstamme C57BL/10 und C57BL/6 sowie NMRI-Mäuse aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität. Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen auf Kleintierstreu gehalten und mit der Standard-Diät Nohrlin 10H10 (Nohrlin, Bad Salzuflen) und Wasser *ad libitum* ernährt. Für die Experimente wurden Mäuse im Alter zwischen 9 und 12 Wochen eingesetzt.

## 2.5 *Plasmodium chabaudi* Infektionen

Für die Infektion wurde der Malariaerreger *Plasmodium chabaudi* verwendet. Der ursprünglich vom National Institute of Research (Mill Hill, London, UK) bezogene Stamm wird in der Abteilung für Molekulare Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität durch Passage von infiziertem Blut in NMRI-Mäusen gehalten.

Die Infektion der NMRI-Mäuse mit *Plasmodium chabaudi* geschah wöchentlich. Hierzu wurden den Mäusen  $1 \times 10^6$  mit Plasmodien parasitierte Erythrozyten in 500 µl PBS-Medium intraperitoneal injiziert. Die infizierten Erythrozyten wurden aus infizierten Mäusen gewonnen, die eine Parasitämie von 20 - 40 % aufwiesen. Diese wurde anhand eines mit Giemsa und May-Grünwald gefärbten Blutausstriches bestimmt. Das Blut wurde den Mäusen aus der Schwanzspitze entnommen.

Bei der Färbung handelt es sich um eine modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Pappenheim (Romeis, 1968). Hierbei wurden die Blutausstriche zuerst für drei Minuten mit May-Grünwald Lösung überschichtet und später durch Zugabe des gleichen Volumens Sörensen-Puffer für weitere drei Minuten gefärbt. Anschließend folgte eine sieben-minütige Färbung mit Giemsa-Sörensen Färbelösung (1:4 verdünnt und filtriert). Die Färbelösung wurde daraufhin durch kräftiges Spülen mit dH<sub>2</sub>O entfernt und die Blutausstriche anschließend im Wärmeschrank luftgetrocknet.

Zur Isolation des Blutes wurden die Mäuse mit Hilfe von Diethylether narkotisiert und das Blut mit einer in CPD-Puffer gespülten Pasteurpipette aus dem Retroorbitalplexus entnommen. Das Blut wurde in CPD-Puffer aufgenommen und die Erythrozytenzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Konzentration wurde mit PBS eingestellt.

Für einige Experimente wurden immune Mäuse verwendet. Dazu wurden die Versuchstiere mit  $1 \times 10^6$  Plasmamembranen ('ghosts') parasitierter Erythrozyten in komplettem Freund's Adjuvans vakziniert (Wunderlich *et al.* 1988). Nach einer Woche wurde eine Primärinfektion mit  $1 \times 10^6$  parasitierten Erythrozyten intraperitoneal gesetzt. Tiere, die die Infektion selbständig ausheilten, wurden 9 Wochen nach Infektion als immun verwendet (Wunderlich und Helwig 1987; Wunderlich *et al.* 1992). Als nicht immune Mäuse wurden gleichaltrige, parallel gehaltene Tiere verwendet, die jedoch weder eine Vakzinierung noch eine Primärinfektion erhielten.

## 2.6 Kompetente Zellen

- *E. coli* TOPO „One Shot Chemically Competent cells“ Genotyp: F $\{lacI^q Tn10(Tet^R)\}$  *mrcA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mrcBC)$   $\phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD 139 \Delta (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG$
- 'Subcloning Efficiency'<sup>TM</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Competent *E. coli*' (Invitrogen, Leek, Niederlande) Genotyp: F $\phi 80 lacZ.M15 .(lacZYA-argF)U169 deoR recA endA hsdR17 (r_k^-, m_k^+) phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$

## 2.7 Vektoren

- pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- pcDNA3.1/V5His TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- pcDNA3.1/HisLAC TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, USA)
- pblue TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- pSEAP2 Control (Clontech, Palo Alto, USA)
- pCaspase-Sensor Vektor (Clontech, Palo Alto, USA)

## 2.8 Antikörper

Für die Immunfluoreszenz- und Westernblot-Experimente wurden die folgenden Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

<u>Primäre Antikörper:</u>	monoklonaler Maus-Anti-V5 Antikörper (Invitrogen, Leek, Niederlande)
	polyklonaler Kaninchen-Anti-Giantin Antikörper (CRP Inc., Cumberland, VA, USA)
	polyklonaler Kaninchen-Anti-Calnexin Antikörper (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada)
<u>Sekundäre Antikörper:</u>	polyklonaler Ziege-Anti-Maus IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment Konjugat-Alexa Fluor <sup>TM</sup> 488 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
	polyklonaler Ziege-Anti-Maus IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment Konjugat-Alexa Fluor <sup>TM</sup> 568 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
	polyklonaler Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment Konjugat-Alexa <sup>TM</sup> 488 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
	Kaninchen-Anti-Maus-'Horse Radish' Peroxidase- (HRP)-gekoppelt (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA)

## 2.9 Probenvorbereitung

### 2.9.1 Organentnahme und Zellisolation

Mäuse wurden, wenn nicht anders beschrieben, durch cervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, und die Organe aseptisch entnommen. Diese wurden entweder direkt nach der Entnahme in Trizol<sup>®</sup>-Reagenz im Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert oder zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Tiefgefrorene Organe wurden in vorgewärmter D1 Lösung homogenisiert und wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben behandelt.

### 2.9.2 Isolation von Milzzellen

Die Milz wurde aseptisch entnommen und durch ein Stahlsieb (Drahtgewebe: V2A 0,32 × 0,2 × 1000 mm, Draht Steinle, Freiburg) in eine Petrischale mit RPMI-Medium + 5 % FCS gedrückt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Zellen sorgfältig resuspendiert und danach in einem Zentrifugenröhrchen bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert (CPRK-Zentrifuge, Beckman, Fullerton, USA). Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Pellet in Lyse-Lösung (1 ml pro 0,1 ml Zellpellet) für eine Minute resuspendiert (Mishell *et al.* 1980). Durch Zugabe des 10-fachen Volumens RPMI + 5 % FCS wurde die Lyse gestoppt und es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten wurde die Lyse wiederholt. Die Konzentration der Leukocyten wurde durch Auszählen eines Aliquots in der Neubauerzählkammer bestimmt. Die restlichen Zellen wurden in 5 ml Trizol®-Reagenz aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1 Isolation von Gesamt-RNA: Saure Phenol/Chloroform Extraktion

Um eine Degradation der zu isolierenden RNA durch exogene Ribonukleasen an Gerätschaften oder in Lösungen vorzubeugen, wurden alle verwendeten Geräte und Lösungen zunächst für mindestens 2 h mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Durch anschließendes Autoklavieren für 20 min bei 120 °C und einem Druck von 2 bar wurde das DEPC inaktiviert, da es sonst zu Modifikationen der RNA kommt. Vor und während der RNA-Isolation inhibieren hohe Konzentrationen an Guanidiniumisothiocyanat in Verbindung mit Sulfhydryl-Reagenzien (z.B. β-Mercaptoethanol) die endogenen RNasen.

RNA wurde aus Organen durch differenzielle Extraktion mit saurem Phenol isoliert. Die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) wurde dabei leicht modifiziert. Das Gewebe wurde in Lösung D1 mit dem Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze N-Lauryl-Sarcosin (0,5 % (w/v)) und 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4,0) wurde das Homogenat durch Invertieren gemischt. Es folgte die Zugabe von 1 Volumen wassergesättigtem Phenol und 0,2 Volumen Chloroform, dazwischen wurde das Homogenat kräftig geschüttelt und am Schluss 15 s auf dem Vortex (Typ VF2, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 5.000 rpm und 4 °C in der Untertischzentrifuge (Heraeus Multifuge 3<sub>L-R</sub>, Langenselbold) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein RNase-freies JA-20 Röhrchen überführt, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C für 1 h im Beckman JS 13.1 Rotor (Beckmann JS 21 Zentrifuge: Fullerton, USA) wurde der Überstand dekantiert, das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 1 Volumen Isopropanol erfolgte eine erneute Fällung bei -20 °C über Nacht. Die RNA wurde in der Eppendorf Kühlzentrifuge bei 14.000 rpm und 4 °C für 1 h sedimentiert, das Pellet mit 1 ml 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geringen Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde photometrisch bestimmt (Beckmann Spektrophotometer DU 640) (siehe Kapitel 2.10.4).

### 2.10.2 Isolation von Gesamt-RNA mittels Trizol

Die Isolation der RNA erfolgte mittels des Trizol<sup>®</sup>-Reagenzes. Das Reagenz, eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, stellt eine Weiterentwicklung der RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi (1987) dar.

Pro  $5-10 \times 10^6$  Zellen wird 1 ml Trizol<sup>®</sup>-Reagenz benötigt. Die Zellen wurden mit dem Reagenz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu ermöglichen. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform pro 1 ml Trizol<sup>®</sup> wurde das Gemisch für 15 s durchmischt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden nun für 30 min bei 5000 rpm (Heraeus, Langenselbold) zentrifugiert. Während der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen, eine rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblose, obere, wässrige Phase. Die RNA befand sich ausschließlich in der wässrigen Phase, die vorsichtig abgenommen wurde. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol<sup>®</sup>-Reagenz wurde die RNA über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation für 1 h bei 4 °C bei 11000 rpm im JS 13.1 Rotor (Beckmann JS 21 Zentrifuge: Fullerton, USA) pelletiert und das Pellet anschließend mit 80%igem, RNase-freiem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung im UV-Spektrometer photometrisch (Beckmann Spektrophotometer DU 640) bestimmt (siehe Kapitel 2.10.4).

### 2.10.3 Isolation von Poly(A)<sup>+</sup> RNA

Die Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup> RNA stellt eine Anreicherung aller mRNA-Spezies dar. Dadurch wird es beispielsweise einfacher, seltene mRNA-Spezies im 'Northern Blot' nachzuweisen. Zur Gewinnung von mRNA aus zuvor isolierter Gesamt-RNA wurde das 'Dynabeads mRNA Purification Kit' (Dynal Biotech, Hamburg) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Isolationsmethode beruht auf der Basenpaarung zwischen den Poly(A)<sup>+</sup>-Schwänzen am 3'-Ende der meisten mRNAs und den Oligo(dT)-Resten, die kovalent an die Oberfläche der 'Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>' gebunden sind. Andere RNA-Spezies sowie DNA hybridisieren nicht und können leicht durch Waschen entfernt werden. Für die Waschschritte wurden die 'Dynabeads' mit einem Magneten (Dynal MPC-S, Dynal, Hamburg) an der Wand des Reaktionsgefäßes festgehalten. Es wurden je 500  $\mu$ g Gesamt-RNA pro 1 ml 'Dynabeads' eingesetzt.

### 2.10.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der Absorption bei Wellenlängen von  $\lambda=260$  nm, 280 nm und 320 nm mit einem Beckman DU 640 Spektralphotometer. DNA und RNA absorbieren im UV-Licht bei 260 nm. Für DNA gilt: eine  $A_{260}$ -Einheit entspricht 50  $\mu$ g/ml. Eine  $A_{260}$ -Einheit RNA entspricht 40  $\mu$ g/ml (Sambrook *et al.*, 2001). Der 280 nm Meßwert ist ein Maß für die Verunreinigung durch Fremdproteine, während der Messwert bei 320 nm die Streuung angibt. Die Streuung muß von der Absorption bei 260 nm und 280 nm subtrahiert werden. Aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  kann die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren abgeleitet werden. Für DNA sollte der Wert zwischen 1,7 und 1,9 und für RNA zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### 2.10.5 Auftrennung von RNA im Glyoxalgel

Die Auftrennung der RNA erfolgte nach Sambrook *et al.* (2001). Zur Denaturierung wurden die RNA-Proben zusammen mit dem zum Größenvergleich herangezogenen Standard (mit *EcoRI* und *HindIII* verdaute  $\lambda$  DNA) mit 6 M Glyoxal, DMSO und 0,1 M

Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l für 60 min in einem 50 °C Wasserbad inkubiert. Dabei bricht DMSO die Wasserstoffbrücken auf, damit Glyoxal bei neutralem pH-Wert kovalent an die Guanidinreste binden kann, wodurch eine Basenpaarung der RNA verhindert wird. Nach der Denaturierung wurden die RNA-Proben auf Eis abgekühlt und für 5 s zentrifugiert. Für die Auftrennung wurde ein 1,5%iges Agarosegel in 10 mM Natriumphosphatpuffer ohne Ethidiumbromid (EtBr) gegossen, da EtBr mit dem Glyoxal reagiert und dieses nicht mehr an die RNA bindet. Den RNA-Proben, wie auch dem Größen-Standard, wurden jeweils 4  $\mu$ l Glyoxal-Ladungspuffer zugesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei 3-4 V/cm für 1 h. Um die Ausbildung eines pH Gradienten und die damit verbundene Dissoziation des Glyoxals von der RNA (bei pH > 8) zu vermeiden, wurde der Puffer während der Auftrennung mit Hilfe eines Magnetrührers in jedem Tank durchmischt. Zur Größenabschätzung wurden 10  $\mu$ g *EcoRI/HindIII* verdauter  $\lambda$  DNA (Fermentas, St. Leon Roth) glyoxyliert und parallel zur RNA aufgetrennt. Spuren mit  $\lambda$  DNA wurden nach der Elektrophorese vom Rest des Gels abgetrennt, 20 min in 50 mM NaOH gewaschen, um das Glyoxal zu entfernen, 2  $\times$  15 min in 10 mM Natriumphosphatpuffer neutralisiert und schließlich im selben Puffer mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Spuren mit der aufgetrennten RNA wurden direkt auf eine Nylonmembran geblottet (Kapitel 2.10.6).

#### 2.10.6 Transfer von RNA auf Membranen und Hybridisierung: 'Northern Blot'

Mit Hilfe einer abwärts gerichteten Kapillarblot-Technik unter Verwendung eines alkalischen Transferpuffers (Chomczynski, 1992) wurde die RNA auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond-N, Amersham, Freiburg) geblottet. Die Membran wurde 15 min in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 neutralisiert. Schließlich wurde die RNA durch UV-Crosslinking (E=120 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Membran immobilisiert. Zur Prähybridisierung wurde die Membran für 2 h bei 65 °C in der Hybridisierungslösung 'Express-Easy-Hyb' (Clontech, Palo Alto) vorinkubiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer durch 'Random Priming' radioaktiv markierten Sonde (50 ng Sonde) (siehe Kapitel 2.10.15) und wurde bei 65 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 20 min bei 65 °C mit der Waschlösung I sowie zweimal für je 1 h bei 65 °C mit Waschlösung II gewaschen. Die Membran wurde mit einem Kodak Biomax Röntgenfilm und einer Kodak Verstärkerfolie für mehrere Stunden oder Tage bei -80 °C in einer speziellen Kassette exponiert.

#### 2.10.7 Hybridisierung eines Maus-Poly(A)<sup>+</sup> 'Northern Blots'

Expressionsanalysen von *gimap* Genen erfolgten mittels eines Maus-Poly(A)<sup>+</sup> 'Northern Blots' mit 12 Geweben (Clontech, USA) von BALB/c Mäusen beiderlei Geschlechts im Alter von 6-8 Wochen. Die Membran wurde abweichend vom Herstellerprotokoll mit der Express-Easy-Hyb-Lösung (Clontech, USA) zunächst 2 Stunden prähybridisiert. Währenddessen wurden 80 ng *gimap8*-Sonde (Tabelle 5) radioaktiv markiert, wie im Kapitel 2.10.15, für DNA-Sonden beschrieben. Die Hybridisierung des Blots erfolgte, in Folie eingeschweißt, bei 65 °C im Schüttel-Wasserbad über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit Waschlösung I bei 65 °C für je 20 min und anschließend zweimal mit Waschlösung II für je 1 h bei 65 °C gewaschen. Die Membran wurde darauf mit einem Kodak Biomax Röntgenfilm und einer Kodak Verstärkerfolie für mehrere Stunden oder Tage bei -80 °C in einer speziellen Kassette exponiert.

### 2.10.8 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmide wurden in den unter Kapitel 2.6 beschriebenen *E.coli*-Stämmen in 2YT- oder TB-Medium für eine Isolation angereichert. Die Flüssigkultur mit einem Antibiotikum (10 µg/ml) zur Selektion wurde über Nacht bei 37 °C und 280 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Für Mini-DNA-Präparationen wurden 2 ml einer 5 ml Kultur mit Hilfe des 'NucleoSpin® Prep' Kits (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Für eine Midi- bzw. Maxi-DNA-Präparation wurden 50 ml Kultur mit Hilfe des 'NucleoBond PC100' Kits (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Endotoxinfreie Maxi-DNA-Präparationen wurden aus 100 ml Kultur nach Angaben des Herstellers mit dem 'NucleoBond PC500 EF' Kit durchgeführt. Alternativ wurden die Präparationen von Qiagen (Hilden) verwendet, wobei zur Aufreinigung gemäß den Angaben des Herstellers gearbeitet wurde.

### 2.10.9 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden in horizontalen Flachbettkammern Agarosegele gegossen (Sambrook *et. al.*, 2001). Als Gel- und Kammerpuffer diente 1 × TBE. Die DNA-Proben (in einem Volumen von 25 µl) wurden mit 6 × Agarosegel-Ladungspuffer (Fermentas, St. Leon Roth) versetzt und in Gelen mit 1 % bis 2 % Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei einer elektrischen Feldstärke von 0,8 V/cm bis 5 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard diente parallel aufgetrennte, *EcoRI/HindIII* restringierte λ DNA bzw. *HindIII* restringierte λ DNA (1 µg) oder bei kleineren Fragmenten pUC-Mix-Marker (1 µg) (alle Fermentas, St. Leon Roth).

### 2.10.10 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA erfolgte in TBE-Agarosegelen (Kapitel 2.10.9). Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des 'NucleoSpin® Extract' Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers eluiert. Die eluierte DNA wurde in TBE-Puffer oder dH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.10.11 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die mit dem TripleMaster™ PCR System (Eppendorf AG, Hamburg) amplifiziert wurden, konnten direkt, wie in Kapitel 2.10.12 beschrieben, in TOPO Vektoren kloniert werden. PCR Produkte, die mit der *Pfx*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Leiden) amplifiziert wurden, mußten, um überhängende Adenosin-Nukleotide zu bekommen, die dann in die TOPO® TA Vektoren (Invitrogen, Leiden, Niederlande) mit Thymidin-Überhang kloniert werden können, bei 72 °C in Gegenwart von Taq-Polymerase und dATP für 30 min inkubiert werden. Anschließend wurde, wie in Kapitel 2.10.12 beschrieben, verfahren

### 2.10.12 Klonierungen mit dem TOPO® TA Vektorsystem

Bei Klonierungen von PCR-Produkten in die Vektoren des TOPO® TA Klonierungssystems wird die Eigenschaft vieler thermostabiler DNA-Polymerasen, an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenutzt. PCR-Produkte können direkt in die TOPO® TA Vektoren kloniert werden, da diese kompatible Desoxythymidinüberhänge am 3'-Ende besitzen.

Das zu klonierende Fragment wurde mit Hilfe des 'NucleoSpin® Extract' Kits aus dem Agarosegel aufgereinigt (Kapitel 2.10.10). 4 µl der aufgereinigten DNA wurden zu 1 µl

TOPO® TA Vektor und 1 µl Salz-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation des Plasmides in kompetente Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu kompetenten *E. coli* TOP10 F'-Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s in einem 42 °C Wasserbad. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis kamen 250 µl SOC-Medium hinzu. Die *E. coli*-Zellen wurden dann für 1 h bei 280 rpm im 37 °C Schüttler inkubiert, auf vorgewärmten LB<sup>amp</sup>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der restliche Ligationsansatz wurde bei -20 °C gelagert und eventuell für weitere Transformation verwendet.

### 2.10.13 'Southern Blot': Transfer von DNA auf Membranen und Hybridisierung

DNA wurde, wie in Kapitel 2.10.9 beschrieben, in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in mehreren Volumen 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH 45 min denaturiert. Danach erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham, Freiburg) nach der Methode des 'Downward Alkaline Capillary Transfer' (Chomczynsky, 1992) Der Kapillartransfer erfolgte über einen Zeitraum von 2 Stunden. Die Membran wurde danach 15 min in 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) neutralisiert und die Nukleinsäuren durch UV-Licht immobilisiert (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für 2 h in frisch angesetzter und auf 65 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung. Die radioaktive Markierung erfolgte wie in Kapitel 2.10.15 beschrieben.

Nach der über Nacht erfolgten Hybridisierung wurde die Membran zweimal für je 20 min bei 65 °C mit Waschlösung I gewaschen. Darauf folgte ein zweiter Waschschrift mit Waschlösung II für zweimal 1 h. Die Membran wurde mit einem Kodak Biomax Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie je nach Anwendung für mehrere Stunden oder Tage bei -80 °C exponiert. Für eine quantitative Auswertung wurde der Röntgenfilm eingescannt und densitometrisch mit dem Programm 'Quantiscan' (Biosoft, England) ausgewertet oder ein 'Phosphorimager-Screen' aufgelegt (BAS-IP MS 2025, Fuji, Japan) und die Daten nach entsprechender Exposition im 'Phosphorimager' (BAS-1500, Fuji, Japan) ausgelesen.

### 2.10.14 Alternative 'Southern Blot'-Methode: Alkalische Gel-Elektrophorese, DNA-Transfer und Hybridisierung

Eine Variante des 'Southern Blot' stellt die alkalische Gel-Elektrophorese dar. Für die Auftrennung von DNA in einem alkalischen Agarosegel wurde zunächst die Agarose in Wasser gelöst, weil die direkte Hinzugabe von NaOH zu einer heißen Agarosegel-Lösung zur Hydrolyse des Polysaccharids führt. Nach Abkühlung auf 55 °C wurde 0,1 Volumen des 10 × alkalischen Agarose-Gel-Puffers hinzugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 0,5 M EDTA (pH 8,0) bis zu einer Endkonzentration von 10 mM versetzt, um das Magnesium aus dem PCR-Puffer zu komplexieren, das bei hohem pH-Wert unlösliche Komplexe bildet, die zusammen mit der DNA ausfallen. Anschließend wurden 0,2 Volumen 6 × alkalischer Ladungspuffer hinzugegeben und die Proben zusammen mit einem Größenstandard auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Die Proben liefen zunächst bei < 3.5 V/cm in 1 × alkalischem Agarose-Gel-Puffer bis das im Ladungspuffer enthaltene Bromkresolgrün 0,5-1 cm eingelaufen war. Danach wurde eine Glasplatte auf das Gel aufgelegt und die Elektrophorese fortgesetzt, bis das Bromkresolgrün 2/3 der Gellänge erreicht hatte.

Das Gel wurde 45 min in mehreren Volumen 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH denaturiert. Anschließend wurde das Agarose-Gel für 15 min in 3 M NaCl für den folgenden

Blotvorgang äquillibriert, bevor ließ sich die DNA nach der Methode des 'Downward Alkaline Capillary Transfer' (Chomczynsky, 1992) auf eine Nylonmembran (Biodyne, Pall Gelman Laboratory, Dreieich) übertragen wurde. Der Kapillartransfer erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde. Die Membran wurde 15 min in 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) neutralisiert und die Nukleinsäuren durch UV-Licht immobilisiert (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Die verwendeten Sonden sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die GAPDH-Sonde wurde freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. Tina Weiland zur Verfügung gestellt (Weiland, 2004).

**Tabelle 5: Sonden für *mgimap*-Hybridisierungen**

Sondenbezeichnung	Vektor	Größe in bp	eingesetzte Menge
<i>mgimap1</i>	pcDNA2.1 TOPO	150	40 ng pro Hybridisierung
<i>mgimap6</i>	pcDNA2.1 TOPO	273	40 ng pro Hybridisierung
<i>mgimap8</i>	pcDNA2.1 TOPO	118	40 ng pro Hybridisierung

### 2.10.15 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte durch 'Random Priming' in Gegenwart von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP in Anlehnung an die Methode von Feinberg und Vogelstein (1984). Die Reaktion wurde unter Verwendung des Megaprime™ DNA Labeling Kits (Amersham, Braunschweig) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je Ansatz wurden 50 ng linearisierte Plasmid-DNA (Tabelle 5) und 50  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (MP-Biomedicals, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ; spez. Akt.: 3000 Ci/mmol) eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine 'NucleoSpin® Extract' Säule (Macherey-Nagel, Düren) nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren abgetrennt. Vor der Hybridisierung wurde die Probe für 5 min bei 94 °C denaturiert und 2 min auf Eis gelagert.

### 2.10.16 Densiometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCRs

Die exponierten und anschließend entwickelten Filme wurden mittels des Programms 'Quantiscan' (Biosoft, Cambridge, UK) eingescannt und die Schwärzung der Banden erfaßt. Diese Werte wurden für jede Bande in eine Excel-Tabelle eingetragen und aus diesen Daten für jedes Gen anschließend die Mittelwerte der einzelnen Filme, sowie für alle durchgeführten Hybridisierungen ermittelt. Die Werte wurden nach Genen und Geweben unterschieden und in einem Diagramm aufgetragen.

### 2.10.17 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente wurde nach einer Variante der Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleosid-Triphosphate nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenz-Reaktion erfolgte mittels des 'Thermosequence Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit' mit 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Für den Mastermix wurden 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, aus einer Plasmidpräparation gewonnen, mit 1,5  $\mu\text{l}$  IRD800-markierten Sequenzier-Primern (Konzentration im Reaktionsansatz 0,3 pmol/ $\mu\text{l}$ ) versetzt. Das Reaktionsvolumen wurde mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 13  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. In 0,2 ml PCR-Gefäßen wurde je 3  $\mu\text{l}$  des Reaktionsgemisches aus Di-Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten (entweder A, C, G oder T) Desoxynukleotiden, Enzym und Puffer vorgelegt und 3  $\mu\text{l}$  des DNA Mastermixes hinzugegeben. Die Reaktionsansätze wurden kurz herunterzentrifugiert und mit 10  $\mu\text{l}$  Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet. Die Sequenzreaktion erfolgte in einem Thermocycler (MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf). Bei dieser, als 'cycle sequencing' bezeichneten Methode,

wurde die Plasmid-DNA 2 min bei 94 °C denaturiert. Daran schlossen sich 33 Zyklen von Primer-Bindung und Verlängerung für 1 min bei 55 °C und anschließender Denaturierung für 30 s bei 94 °C an. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl Formamid-Ladungspuffer (Bestandteil des Sequenzier-Kits) gestoppt.

1,3 µl bis 2 µl der Reaktion wurden nach dreiminütiger Denaturierung bei 72 °C und anschließender Abkühlung auf Eis auf das vorgeheizte Sequenz-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der IR-markierten DNA-Fragmente erfolgte bei 50 °C in einer 40 cm langen und 0,25 mm dicken Gelmatrix (Long Ranger Gel Solution, Calmetrix) bei 31,5 W mit einem DNA-Sequenzierer (LI-COR 4000, MWG, Ebersberg) in 1 × TBE-Puffer. Die Auswertung des IR-Signals geschah mit Hilfe des Programmes Base ImageIR Version 4.0 (LI-COR MWG, Ebersberg).

### 2.10.18 Computeranalyse von Sequenzdaten

Nukleinsäure- und deduzierte Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Programme FASTA und BLAST mit den Datenbanken GenBank™ und SwissProt verglichen (Smith and Waterman, 1981; Pearson und Lipman, 1988; Altschul *et al.*, 1990). Bekannte DNA- oder Protein-Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme 'BLAST two sequences' ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tatusova und Madden, 1999) und CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) gegeneinander abgeglichen. Die Proteinsequenzen wurden mit dem Programm GOR4 (Garnier *et al.*, 1996), PSORTII (Nakai und Horton, 1999), Coils (Lupas *et al.*, 1991), Mitoprot (Claros und Vincens, 1996) und InterProScan (Mulder *et al.*, 2003) analysiert. Die phylogenetischen Analysen wurden mit den am höchsten konservierten Regionen der AIG1-ähnlichen Proteine durchgeführt, wobei mit der ersten identischen Aminosäure begonnen und mit der letzten identischen Aminosäure aller GIMAP-Proteine (korrespondierend zu Arg<sup>29</sup> bis Leu<sup>204</sup> in hGIMAP1) geendet wurde. Die Alignments der Proteinsequenzen wurden mit CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt, wobei AIG1 ausgruppiert wurde. Alle Positionen innerhalb der Sequenzen, die eine Lücke enthielten, wurden aus dem Alignment entfernt. Das resultierende Alignment aus 21 taxonomischen Gruppen und 131 Positionen wurde für eine Maximum-Parsimony- und eine Maximum-Likelihood-Analyse benutzt (Stamm *et al.*, 2002). Für die Analysen auf DNA-Ebene wurde analog verfahren. Dazu wurden die Programme fastDNaml (Olsen *et al.*, 1994) und dnapars (Felsenstein, 1993) angewendet.

Putative Bindungsstellen für Proteine in DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm TESS (Schug & Overton, 1997) in der TRANSFAC-Datenbank ([www.cbil.upenn.edu/tess](http://www.cbil.upenn.edu/tess)) detektiert.

### 2.10.19 Semiquantitative RT-PCR mit dem Eppendorf cMaster-RT-System

Die semiquantitativen Expressions-Analysen mehrerer *gimap* Gene wurde in Ein-Schritt-RT-PCRs durchgeführt. Dazu wurde ein genspezifischer Mastermix angesetzt, der abweichend vom Hersteller-Protokoll pro Reaktion 1 µl 10 × Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (je 10 mM), 0,25 µl RT-Enzym (15 U/µl), 0,25 µl PCR-Enzym (5 U/µl), 0,25 µl RNase-Inhibitor (0,5 µg/µl) je 1 µl up- und lo-Primer (10 µM) und 3,75 µl dH<sub>2</sub>O sowie 1 µl eines in Tabelle 7 aufgeführten Verhältnisses aus 18S-Primer und Kompetitor (Ambion, USA) enthielt. Pro Reaktionsansatz wurden 9 µl Mastermix und 1 µl (25 ng) der Gesamt-RNA (Kapitel 2.10.2) hinzugegeben und die Reaktion im 'Gradient-Cycler PTC 200' der Firma MJ Research durchgeführt. Das RT-PCR Programm ist in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: RT-PCR Bedingungen für die semiquantitative Analyse von *mgimap* Genen**

Schritt	Temperatur	Zeit	Besonderheit
1.	50 °C	30 min	
2.	94 °C	2 min	
3.	94 °C	30 sec	
4.	Tabelle 7	30 sec	
5.	72 °C	1 min	
6.			Die Anzahl der Wiederholungs-Zyklen zu Schritt 2. findet sich in Tabelle 7
7.	72 °C	8 min	

Für die Quantifizierungen wurden zunächst die Bindetemperaturen der genspezifischen Primer optimiert und dann die Zyklenzahl bestimmt, in der die Zunahme des PCR-Produktes linear verläuft. Für jedes Gen mußte dieser Wert einzeln bestimmt werden. Bevor nun mit den eigentlichen Quantifizierungen begonnen werden konnte, wurden die optimalen Verhältnisse von 18S Primer zu Kompetitor unter den zuvor ermittelten Versuchsbedingungen bestimmt. Die für die semiquantitative Analyse notwendigen Werte sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

**Tabelle 7: optimierte Reaktionsbedingungen der *mgimap* RT-PCRs**

Genbezeichnung	optimale PCR-Zykluszahl	'Annealing'-Temperatur	Verhältnis von Kompetitor:18S Primer
<i>gimap1</i>	24	58 °C	3:7
<i>gimap6</i>	27	62,1 °C	4:6
<i>gimap8</i>	24	60,2 °C	4:6

### 2.10.20 Genomische PCR

Zur Amplifikation größerer DNA Fragmente, insbesondere der *mgimap1*-Promotor-Fragmente aus genomischer DNA der Maus (Niere von C57BL/6 Mäusen), wurden je 300 nM der beiden sequenzspezifischen Primer, 10 mM eines dNTP-Mixes (je 10 mM), 2,5 U der *Taq*-Polymerase (Eppendorf AG, Hamburg), sowie 90 ng genomische DNA in einem Volumen von 25 µl mit Polymerasepuffer und Wasser gemischt. Das PCR Programm ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 8: Bedingungen der genomischen PCR zur Amplifikation der *mgimap1*-Promotorfragmente**

Schritt-Nr.	Temperatur	Zeit	Besonderheit
1.	94 °C	2 min	
2.	94 °C	15 sec	
3.	Tabelle 7	45 sec	
4.	72 °C	8 min	
5.			10 × nach 2.
6.	94 °C	15 sec	
7.	Tabelle 7	45 sec	
8.	72 °C	8 min	+20 sec/ Zyklus
9.			26 × nach 6.
10.	72 °C	10 min	
11.	Ende		

## 2.11 Zellbiologische Methoden

### 2.11.1 Immortalisierte Zellen

**Tabelle 9: Eigenschaften der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	ATCC Nummer	Organismus	Gewebe / Zelltyp	verwendetes Transfektionsreagenz	Medium
RAW 264.7	TIB-71	Mus musculus (BALB/C)	Monozyt, Makrophagen	FuGENE6	IMDM + 5 % FCS
CHO-K1	CCL-61	Crisetulus griseus	Ovar, Epithelzelle	FuGENE6	Ham's F12 mit 10 % FCS
IC-21	TIB-186	Mus musculus (C57BL/6)	Peritonealmakrophage		RPMI 1640 mit 20 % FCS
ANA-I	-	Mus musculus (C57BL/6)	Makrophage	FuGENE6	IMDM + 10 % FCS
NIH3T3	CRL-1658	Mus musculus	Fibroblasten	FuGENE6	DMEM mit Glutamax I, Natriumpyruvat, 4,5 mg/l Glukose und 10 % FCS

### 2.11.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung der adhärennten Zellen erfolgte in 110 mm Ø Gewebekulturschalen (Greiner, Solingen) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (NAPCO 'Series 5400 CO<sub>2</sub>Incubator'). Die für die Kultivierung verwendeten Medien finden sich in Tabelle 2.11.1. Alle 2-3 Tage wurde die Konfluenz und die generelle Morphologie der Zellen unter dem Inversmikroskop (Modell IM 35, Zeiss, Oberkochen) kontrolliert und die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zunächst 1 h bei 4 °C gelagert und dann mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschalen gelöst. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette wurden sie resuspendiert, um Zellkonglomerate aufzulösen. Das entsprechende Volumen dieser Suspension wurde mit frischem Medium wieder auf 10 ml aufgefüllt. Wenn die Zellen am folgenden Tag transfiziert werden sollten, wurden 2 × 10<sup>5</sup> Zellen (oder 0,5 ml einer 80 % konfluenten Schale) auf Glasdeckgläsern (20 × 20 mm) in 35 mm Ø Gewebekulturschalen (Greiner, Solingen) ausgesät und bis zur Transfektion erneut im Brutschrank kultiviert.

### 2.11.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien

Vor der Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst mit einem silikonisiertem Glasschaber von der Gewebekulturschale gelöst und in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Solingen) überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert (Multifuge 3L-R, Heraeus, Langenselbold) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem Gefrierschutzmix bestehend aus 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen. Die Zellen wurden in einem auf 4 °C vorgekühlten Stratacooler CRYO (Stratagene, Heidelberg) bei -80 °C über Nacht gelagert. Nach 24 h wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Ein Kryogefäß wurde stets zur Konservierungskontrolle entnommen, aufgetaut und wieder in eine Kultur überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort in ein 37 °C Wasserbad zum Auftauen gegeben. Sobald die Zellsuspension flüssig geworden war, wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner, Solingen) gefüllt und dieses mit 10 ml frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm (Beckmann CPKR Zentrifuge, Hamburg) pelletiert und erneut mit 10 ml frischem

Medium zum Entfernen des DMSOs gewaschen. Nach dem Vorgang wurden die Zellen in 10 ml frischem Kulturmedium in einer je nach Anwendung verschieden großen Gewebekulturschale (Greiner, Solingen) ausgesät.

#### 2.11.4 Transfektion von kultivierten Säugerzellen mit FuGENE6

Die am Vortag auf einem Deckglas in einer 6-'well'-Gewebekulturschale (Greiner, Solingen) ausgesäten CHO-K1 Zellen wurden nach 24 h mit Hilfe des nicht-liposomalen Reagenzes FuGENE6 (Roche, Mannheim) transfiziert. Es handelt sich dabei um eine sterilfiltrierte Mischung aus Lipiden und anderen Verbindungen in 80 % Ethanol. 3 µl FuGENE6 Reagenz wurden direkt zu 97 µl serumfreiem Medium gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Verdünnung wurde dann tropfenweise zu 1 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (in einem Volumen von 0,5-10 µl) pipettiert, sanft gemischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde schließlich tropfenweise über das Deckglas verteilt zu den Zellen in die Schalen gegeben und die Zellen bis zur Immunfärbung wieder in den Brutschrank gestellt (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relative Luftfeuchtigkeit).

#### 2.11.5 Herstellung von stabil transfizierten Zellen

Vor Versuchsbeginn wurde zunächst die optimale G418-Konzentration ermittelt. Dazu wurden NIH3T3-Zellen in 35 mm Ø Gewebekulturschalen ausgesät und nach 24 h wurde G418 in Konzentrationen von 50, 100, 250, 500 750 und 1000 µg/ml zugesetzt. Jeden Tag wurde die Morphologie der Zellen beobachtet. Es wurde schließlich die Konzentration verwendet bei der die Zellen nach einer Woche tot waren.

Zur Generierung von stabilen Linien wurden NIH3T3-Zellen, wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben, mit *PvuI*-linearisiertem *mgimap8*-pcDNA3.1/V5His TOPO-Plasmid in 35 mm Ø Gewebekulturschalen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde dem Medium zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen 500 µg/ml G418 zugesetzt. Nach einigen Tagen wurden G418-resistente Zellen auf eine 110 mm Ø Kulturschale (Greiner, Solingen) umgesetzt und dort weiter in G418-haltigem Medium kultiviert. Zur Kontrolle, ob die Zellen das gewünschte Plasmid enthielten oder ob es sich um Reversions-Mutanten handelte, wurden 'Western Blot'-Analysen durchgeführt (Kapitel 2.12).

#### 2.11.6 Probenvorbereitung zur subzellulären Lokalisation

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *mgimap8* wurde das 2067 bp große ORF mittels RT-PCR amplifiziert und in den Säuger-Expressionsvektor pcDNA3.1/V5His TOPO kloniert. Die Transfektion in CHO-K1-Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben. Nach 22 h wurden die transfizierten Zellen einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit Fixierlösung II für 10 Minuten fixiert. Die Fixierlösung II wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS<sup>-</sup> entfernt und die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,05 % Tween80 in PBS<sup>-</sup> permeabilisiert. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in einer Blocklösung aus 1 % BSA in PBS<sup>-</sup> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer für 1-2 h mit dem monoklonalen Maus-anti-V5-Antikörper (1:200 in Blocklösung verdünnt) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal gründlich mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Je nach Kolo-kalisation (siehe Kapitel 2.11.7) wurde zur Detektion des mGIMAP8-Proteins ein polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet, der entweder mit den Fluorochromen Alexa Fluor 488 (2 µg/ml) oder mit Alexa Fluor 568 (2 µg/ml) (beide Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gekoppelt ist. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 45 min bei 37 °C in der Feuchtekammer (feuchtes

Whatman Papier im Deckel einer 6-‘well’ Schale). Nach zwei abschließenden Waschschritten (PBS) wurden die Proben auf Objektträgern in Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) mit 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) als Schutz gegen Ausbleichen eingebettet. Bis zur Betrachtung der Proben am Konfokalen Lasermikroskop erfolgte die Lagerung in dunkler Umgebung bei Raumtemperatur.

### 2.11.7 Färbung von Zellkompartimenten

Zur Visualisierung des mGIMAP8-Proteins in verschiedenen Zellkompartimenten wurden das Protein sowie verschiedene Organellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und so für die konfokale Lasermikroskopie vorbereitet.

#### 2.11.7.1 Endoplasmatisches Retikulum (ER)

Die Färbung des Endoplasmatischen Retikulums erfolgte mit einem anti-Calnexin-Antikörper (Stressgen, Victoria, BC, Kanada). Calnexin ist ein 90 kDa integrales, nicht-glykosyliertes Membranprotein, das als Chaperon für die richtige Faltung der Proteine im ER sorgt. Der Antikörper wurde in einer 1:200 Verdünnung parallel zum anti-V5-Antikörper als Erst-Antikörper hinzugegeben (siehe Kapitel 2.11.5). Zur Detektion wurde als Zweitantikörper ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Molecular Probes, Göttingen) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

#### 2.11.7.2 Golgi-Apparat

Die Anfärbung des Golgi-Apparates erfolgte mit einem 1:1000 verdünnten polyklonalen Kaninchen-anti-Giantin Antikörper (CRP, Cumberland, VA, USA), der gegen den N-Terminus des humanen Giantins gerichtet ist. Giantin mit einer Masse von 376 kDa ist über den C-terminalen Membrananker an eine membranständige Komponente der *cis*- und mittleren Kompartimente des Golgi-Apparates gebunden. Der anti-Giantin-Antikörper wurde parallel zum anti-V5-Antikörper hinzugegeben. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.11.5 erläutert. Zur Detektion wurde als Zweitantikörper ein Alexa 488 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Molecular Probes, Göttingen) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

#### 2.11.7.3 Lysosomen

Zur Anfärbung der Lysosomen wurden die Zellen 22 h nach der Transfektion mit 100 nM LysoTracker<sup>TM</sup>Red DND-99 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in frischem, vorgewärmtem Medium für 2 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> (pH 7,2) wurden die Zellen zur Markierung des GIMAP8-Proteins wie in Kapitel 2.11.6 beschrieben fixiert, mit dem zur Kolokalisation geeigneten Alexa-488 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Kapitel 2.8) behandelt und eingebettet.

#### 2.11.7.4 Mitochondrien

22 h nach der Transfektion wurden die Zellen in mit 200 nM MitoTracker<sup>TM</sup>Red CMX Ros (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) versetztem, frischem, vorgewärmtem Medium für 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend wie in Kapitel 2.11.6 beschrieben fixiert, mit dem zur Kolokalisation geeigneten Alexa 488 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Kapitel 2.8) behandelt und eingebettet.

#### 2.11.7.5 Zellkern

Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit relativ geringer Membranpermeabilität, der in doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert. Nach der in Kapitel 2.11.5 beschriebenen Vorgehensweise für die Färbung des heterolog exprimierten mGIMAP8-

Proteins, wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C zum Abbau der RNA in RNase A-Lösung (0,1 µg/µl in PBS<sup>-</sup>) und ein erneutes zweimaliges Waschen mit PBS<sup>-</sup>. Danach wurden jeweils 100-120 µl Propidiumjodid-Lösung (20 µl/ml in PBS<sup>-</sup>) auf die Zellen gegeben und 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und schließlich in Mowiol (mit 2 % DABCO versetzt) eingebettet.

#### 2.11.7.6 Plasmamembran

Die Zellen wurden 22 h nach Transfektion zweimal mit PBS<sup>-</sup> und einmal mit Con A-Färbelösung gewaschen. 2 µl Con A-Rhodamin in einer Konzentration von 5 µg/µl (Verdünnt in Con A-Färbelösung) wurde auf die Zellen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Schritte sind in Kapitel 2.11.6 beschrieben.

#### 2.11.8 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Zur Betrachtung der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zellen wurde ein Leica CLSM ('Confocal Laserscanning Microscope') TCS NT, Version 1.5.451 (Leica Lasertechnik, Heidelberg), verwendet. Die Fluoreszenz des Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörpers wurde durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Dagegen erfolgte die Anregung von Alexa 568, ConA-Rhodamin, Propidiumjodid, LysoTracker<sup>TM</sup>Red DND-99 und MitoTracker<sup>TM</sup>Red TMX Ros durch einen Krypton-Laser bei einer Wellenlänge von 568 nm. Es wurden optische Schnitte durch die Zellen (in 0,5 µm Intervallen) aufgenommen, wobei eine Auflösung von 1024 × 1024 Pixel gewählt wurde (Benten *et al.*, 1999). Die Analyse der Bilder erfolgte anschließend mit Hilfe der 'AVS Software' (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, USA) und Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

#### 2.11.9 Reportergen Assay mit dem pblue-TOPO System

##### 2.11.9.1 Amplifizierung eines 5' flankierenden Bereichs des *mgimap1* Gens

Die Herstellung der Fragmente aus der 5'-flankierenden Region von *mgimap1* erfolgte durch genomische PCRs (Kapitel 2.10.20). Die entsprechenden Primerpaare finden sich in Tabelle 10, wobei sich die Sequenzen auf die in der Datenbank unter der Bezeichnung NW\_000250 hinterlegte Sequenzregion beziehen. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden wie in Kapitel 2.10.12 beschrieben in den pblue TOPO-Vektor (Invitrogen, Leiden, Niederlande), ein Plasmid das die Sequenz für das *LacZ*-Gen enthielt, kloniert. Mit Plasmid-Präparationen und entsprechenden Restriktionen bzw. Sequenzierungen wurde die Orientierung der einzelnen Fragmente im Vektor überprüft.

**Tabelle 10: Übersicht über die *mgimap1*-Reportergen-Konstrukte**

verwendete Primer	'Annealing'-Temperatur	Klon-Bezeichnung	Fragment-Bezeichnung	Größe der amplifizierten Region in bp
i1-pro-64-up i1-pro-5552-lo	65 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment1	-5485pblue/+10	5495
i1-pro-2362-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment3	-3188pblue/+10	3198
i1-pro-3765-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment4	-1785pblue/+10	1795
i1-pro-4465-up i1-pro-5552-lo	55 °C (+ Q-Solution)	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment5	-1065pblue/+10	1075
i1-pro-4686-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment6	-864pblue/+10	874
i1-pro-4792-up i1-pro-5552-lo	55 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment7	-758pblue/+10	768
i1-pro-5024-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment8	-526pblue/+10	536

Tabelle 10: Übersicht über die *mgimap1*-Reporter-Gen-Konstrukte

verwendete Primer	'Annealing'-Temperatur	Klon-Bezeichnung	Fragment-Bezeichnung	Größe der amplifizierten Region in bp
i1-pro-5337-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment11	-213pblue/+10	223
i1-pro-5373-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment12	-177pblue/+10	187
i1-pro-5443-up i1-pro-5552-lo	60 °C	<i>mgimap1</i> -Promotor-Fragment13	-107pblue/+10	117

### 2.11.9.2 Transfektion der Zellen

0,5 × 10<sup>4</sup> Zellen der in Tabelle 2.11.1 aufgeführten Zelllinien wurden 24 h vor der Transfektion in einer 96-‘well’ Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit FuGENE6 transfiziert (Tabelle 2.11.1). Für Transfektionen mit FuGENE6 wurden 0,05 µg Plasmid-DNA/‘well’ und 0,15 µl FuGENE6/‘well’ verwendet. Zwecks einfacherer Handhabung wurde ein Mastermix bestehend aus Medium und entsprechender Menge FuGENE6 hergestellt. Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben, jedoch abweichend davon in einem optimierten Endvolumen von 10 µl/‘well’.

### 2.11.9.3 Messung der β-Galaktosidase-Aktivität

Die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde 48 h nach der Transfektion mit dem Galacto-Star-System (Applied Biosystems, Bedford, USA) vorgenommen. Dieses System arbeitet mit einem chemilumineszente 1,2 Dioxetan, das gegenüber o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG) 20-100 mal sensitiver ist (Beale *et al.*, 1992; Jain and Magrath, 1991). Für die Messungen wurde das Medium entfernt und die Zellen im ‘well’ zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 10 µl Lyse-Lösung in die ‘wells’ gegeben, und die Lyse nach 10 min durch Zugabe von 100 µl Reaktionslösung gestoppt. Die Reaktionslösung wurde zuvor aus Lumineszenz-Substrat und Reaktionspuffer im Verhältnis 1:50 hergestellt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in einem Platten-Luminometer (Fluoroscan Ascent, Labsystems, Wien) und mit dem Programm Ascent Software Version 2.4 elektronisch aufgenommen. Alternativ wurden die Messungen in einem ‘Tube’-Luminometer (Lumant LB 9507, Berthold Technologies, Wildbad) vorgenommen und die Daten in einer Excel-Tabelle aufgenommen. Da jede Zelllinie eine andere Transfektionseffizienz zeigte, wurden für die visuelle Kontrolle der Transfektionseffizienz bei jeder Messung je ein Ansatz der Zelllinie mit dem pEGFP-C1-Plasmid (Clontec, Palo Alto, USA) transfiziert.

### 2.11.9.4 Messung der SEAP-Aktivität in Zellkultur-Überständen

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem pSEAPBasic-Plasmid (Clontec, Palo Alto, USA) transfiziert. Die Aussaat und Transfektion der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.11.9.2 beschrieben. Nach 48 h wurde, vor der Messung der β-Galaktosidasaktivität, die Aktivität des SEAP-Reportergens im Zellkulturüberstand gemessen (Berger *et al.*, 1988). In einem Chemilumineszenz-Assay (Phospha-Light, Tropix, Weiterstadt) wurden 100 µl des Überstandes verwendet. Endogene alkalische Phosphatasen wurden durch Inkubation für 30 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Im verwendeten Assay setzt die alkalische Phosphatase das Substrat CSPD um. Es entsteht ein metastabiles Zwischenprodukt, das sich spontan unter Lichtemission umlagert (Vant Erve *et al.*, 1993). Die Lichtentwicklung ist über einen Zeitraum von wenigstens 50 min konstant (Yang *et al.*, 1997). Der SEAP-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die Messung der Chemilumineszenz erfolgte wie in Kapitel 2.11.9.3 beschrieben.

### 2.11.9.5 Apoptose-Auslösung in Säugerzellen

In 35 mm Gewebekulturschalen wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen auf einem Deckglas ausgesät. Nach 24 h Stunden wurden die Zellen mit FuGENE6 wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben transfiziert. Dabei wurden zwei 'wells' nur mit dem pCaspase3-Sensor-Plasmid als Kontrolle (+pcDNA3.1/V5His Topo) sowie zwei 'wells' mit dem pCaspase3-Sensor-Vektor und dem *gimap8*-pcDNA3.1/V5His TOPO-Vektor transfiziert.

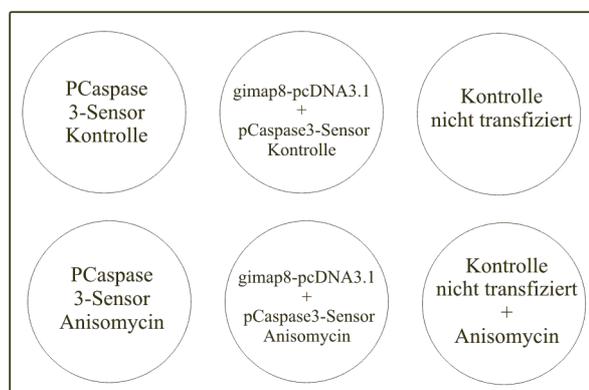


Abbildung 4 :  
Transfektionsschema für  
die Apoptose-  
Induzierung in NIH3T3-  
und CHO-K1-Zellen.  
Belegung einer  
Zellschale zur  
Apoptose-Auslösung

24 h nach der Transfektion wurden  $33 \mu\text{g/ml}$  Anisomycin (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA) als Auslöser von Apoptose zu den NIH3T3-Zellen, bzw.  $66 \mu\text{g/ml}$  zu den CHO-K1-Zellen gegeben unter Beobachtung im Brutschrank inkubiert. Die optimalen Inkubationsdauer unter Anisomycin lag für CHO-K1-Zellen bei 5 h und für NIH3T3-Zellen bei 3,5 h. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Methanol für 5 min. Zur Entfernung des Methanols wurden die Proben dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Abschließend wurde die DNA des Zellkerns mit  $300 \mu\text{l}$  DAPI (300 nM) für 5 min in Dunkelheit gefärbt. Die Zellen wurden zur Entfernung des überschüssigen Färbereagenzes fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend in Mowiol (mit 2 % DABCO) eingebettet.

## 2.12 Proteinanalytik

### 2.12.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen: SDS-Page

Die Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (1970). Dazu wurde die 'Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell' Apparatur (BioRad, München) benutzt. Die Gelgröße betrug in diesem System  $8 \times 10 \text{ cm}$ . Es wurden Trenngele mit 10 % Polyacrylamid verwendet. Die Konzentration der Sammelgele betrug einheitlich 4,5 % Polyacrylamid. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V (40 mA) für ca. 1-1,5 h. Als Molekulargewichtsstandard wurde der SDS-7B 'Molecular Weight Marker' Mix (Sigma, Deisenhofen) mit Proteinbanden zwischen 180 kDa und 26,6 kDa verwendet.

### 2.12.2 Färbung von Proteinen nach Gelelektrophorese

Die Anfärbung der in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine (Kapitel 2.12.1) erfolgte mit Hilfe des GelCode<sup>®</sup> Blue Stain Reagent (Pierce, USA). Dazu wurde das Gel nach dem Lauf vorsichtig von den Glasplatten abgehoben und, um das SDS zu entfernen, 3-5 min in 100-200 ml Millipore-Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte in

20 ml des GelCode® Blue Stain Reagenz für maximal 1 h. Nach der Färbung wurde das Gel, zwischen zwei Folien eingespannt, vorsichtig getrocknet und aufbewahrt.

### 2.12.3 'Western Blot': Transfer von Proteinen auf eine Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 2.12.1) wurden die Proteine nach der 'Semi-Dry'-Methode auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet (Kyhse-Anderson, 1984). Zwischen zwei Kohlenstoffplatten (Biometra Fast Blot, Göttingen) wird dabei ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, welches bei hohen Feldstärken zu einem effektiven Transfer der Proteine auf die Membran führt. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte zwischen mehreren, in 'Blotting'-Puffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) bei einer Stromstärke von 60 mA ( $\sim 1 \text{ mA/cm}^2$ ) für 2 h. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran durch eine dreiminütige Inkubation in Ponceau S-Lösung (0,2 % Ponceau S in 3%iger Trichloressigsäure) reversibel angefärbt, um die Bloteffizienz zu beurteilen. Die anschließende Entfärbung erfolgte durch leichtes Schütteln in Leitungswasser.

### 2.12.4 Immunodetektion von geblotteten Proteinen

Nach der Überprüfung des Proteintransfers durch Anfärbung mit Ponceau S (Kapitel 2.12.3) wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (monoklonaler Anti-V5-Antikörper, Invitrogen (1:1000 Verdünnung in TST-Puffer, siehe Kapitel 2.8) für 1 h bei Raumtemperatur. Im Anschluß daran wurde die Membran  $5 \times 5$  min in TST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus IgG; 'Horse Radish' Peroxidase (HRP)-gekoppelt, 1:2000 in TST-Puffer, siehe Kapitel 2.8) erfolgte danach für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend erneut  $5 \times 5$  min in TST-Puffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nun durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des 'ECL Western Blotting Detektionssystems' (Amersham Pharmacia, Freiburg) in Anlehnung an Roswell und White (1978). Gleiche Volumina der Detektionsreagenzien 1 und 2 wurden dazu gemischt und auf die Membran gegeben ( $0,125 \text{ ml/cm}^2$ ). Nach 1 min wurde das Reagenz von der Membran entfernt und diese luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien gelegt. Die Exposition erfolgte auf einem ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 5-25 min bei Raumtemperatur.

### 3.0 Ergebnisse:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *mgimap8* und *mgimap10* funktional charakterisiert. Die Arbeiten umfaßten, neben Analysen auf DNA-Ebene, auch die heterologe Expression der cDNA in Säugerzellen, um Aussagen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation und der damit verbundenen Funktion treffen zu können. Dazu wurde der Zusammenhang zwischen der Überexpression von *mgimap8* und Apoptose untersucht, da einige *gimap* Gene bei Autoimmunerkrankungen mit Apoptose in Zusammenhang gebracht werden konnten (Kapitel 1.4.1).

Das Gen *mgimap1* wurde als erster Vertreter der *gimap*-Familie schon in vorangegangenen Arbeiten (Krücken *et al.*, 1997,1999; Stamm, 2001) näher untersucht, doch beschränkten sich die Analysen auf die genomische Organisation und die Expression in verschiedenen Geweben. Aus den vollständigen Sequenzdaten des Mausgenoms ergab sich eine Neuorganisation des *mgimap1* Gens. Es konnten zwei Spleiß-Varianten unterschieden werden, die sich deutlich von der publizierten Sequenz unterschieden. Angesichts der damals gemessenen starken Hochregulierung durch eine Malariainfektion (Krücken *et al.*, 1999) wurde in dieser Arbeit versucht, regulierende Sequenzen im distalen 5'-UTR-Bereich zu finden und deren Einfluß auf die Expression in verschiedenen Zelllinien zu analysieren.

### 3.1 Entdeckung neuer Vertreter der *mgimap* Genfamilie

Vergleiche der *mgimap1*-Nukleotidsequenz mit der Datenbank (GenBank™) führten zu weiteren *mgimap1*-ähnlichen Sequenzen. Die Fragmente in der Datenbank waren zunächst 628 bp und 753 bp groß und wurden, gemäß der neuen Nomenklatur, als *mgimap8* und *mgimap10* bezeichnet. Mit den Primern *imap7-up-11* und *imap-lo-745* konnte ein kleiner Sequenzbereich von *mgimap8* aus Milz-RNA von immunen B10-Mäusen mittels RT-PCR (Kapitel 2.10.19) amplifiziert werden. Für die Amplifikation einer Sequenz von *mgimap10* wurden die Primer *imap9-up-71* und *imap9-lo-616* verwendet (Epe, 2001).

Die amplifizierten Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (Kapitel 2.10.10) und, wie in Kapitel 2.11 beschrieben, in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert. Durch Plasmid-Mini-Präparationen und anschließende Restriktionsanalysen konnten Klone mit dem gewünschten Fragment identifiziert werden. Von diesen Klonen wurde eine Plasmid-Midi-Präparation gemacht. Sequenzierungen dieser beider Gene (Kapitel 2.10.17) und BLAST-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) mit Einträgen in der NCBI-Datenbank (Kapitel 2.10.18) ergaben, daß es sich bei den amplifizierten Fragmente um die gewünschten *mgimap8*- und *mgimap10*-Sequenzen handelte.

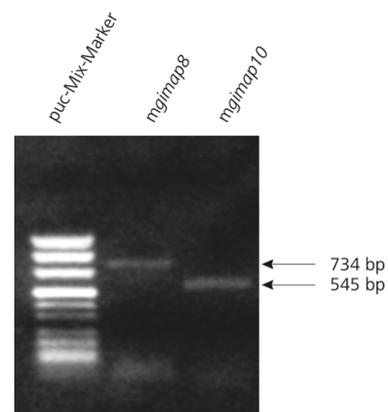


Abbildung 5 : RT-PCR-Amplifikation eines *mgimap8*- und *mgimap10*-Fragmentes aus Milz-RNA von B10-Mäusen.

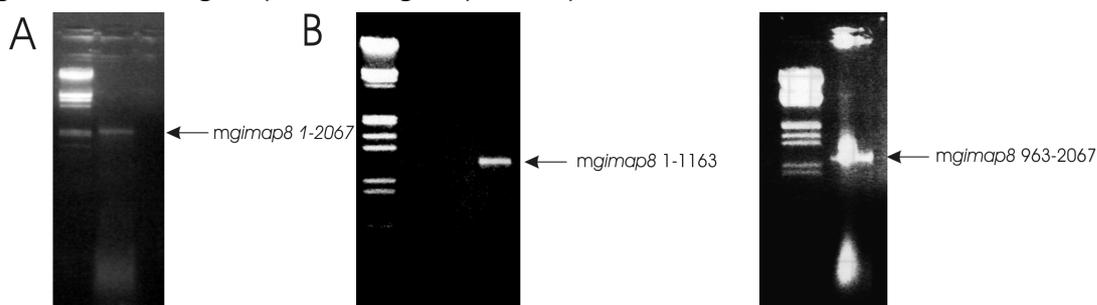
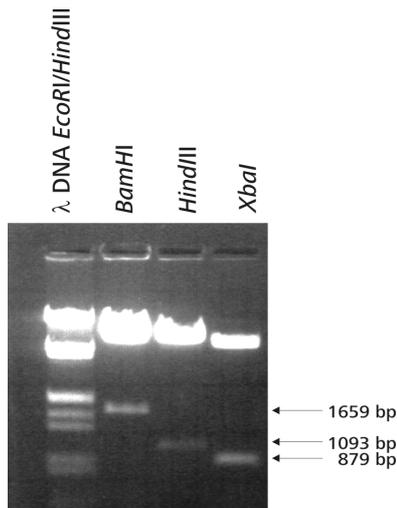


Abbildung 6 : Amplifikation von *mgimap8* Fragmenten **A)** RT-PCR des gesamten offenen Leserasters von *mgimap8* mit den Primern *i6-7-8-up-1* und *i6-7-8-lo-2067*. **B)** RT-PCR der Teilfragmente von *mgimap8*

Die vollständige Sequenz der kodierenden Region von *mgimap8* konnte mit den Primern i6-7-8-up-1 und i6-7-8-2067-lo amplifiziert werden (Abbildung 6), jedoch konnte das Fragment aufgrund der geringen Menge nicht erfolgreich kloniert werden. Daher wurden zwei einzelne Fragmente mit den Primern *mgimap8*-1-1163 und *mgimap8*-963-2067 amplifiziert und nach der Auftrennung in einem Agarosegel aufgereinigt. Beide Fragmente wurden in den Vektor pcDNA3.1/V5His Topo kloniert. Nach Plasmidpräparationen im präparativen Maßstab ('Maxi-Präp') wurde das *mgimap8*-1-1163 und das *mgimap8*-963-2067 Fragment mit *Hind*III restringiert. Durch diese Restriktion konnte einerseits die *mgimap8*-1-1163 Sequenz aus dem Vektor herausgeschnitten werden und andererseits das Plasmid mit dem *mgimap8*-963-2067 Fragment so restringiert werden, daß sich die *mgimap8*-1-1163 Sequenz in das *mgimap8*-963-2067 Fragment klonieren ließ.

Abbildung 7 : Kontrollrestriktionen von *mgimap8* nach erfolgreicher Klonierung in den pcDNA3.1/V5His TOPO-Vektor. Das Plasmid mit der *mgimap8*-Sequenz wurde mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und zusammen mit einem Größenstandard auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetragen.



Durch Restriktionsanalysen wurde die erfolgreiche Klonierung überprüft. Dazu wurde das Plasmid mit der nun kompletten Sequenz von *mgimap8* mit *Bam*HI, *Hind*III und *Xba*I für zwei Stunden bei 37 °C restringiert und die Proben auf einem 0,7%igem Agarosegel aufgetragen. Abbildung 7 zeigt das Gel mit den entsprechenden Fragmenten. Dabei sollten sich für die *Bam*HI Restriktion Fragmente von 5931 bp und 1659 bp, für die *Hind*III-Restriktion Fragmente von 6497 bp und 1093 bp sowie für den Verdau mit *Xba*I zwei Fragmente von 6711 bp und 879 bp ergeben. Zusätzlich zu den Restriktionen wurde das Konstrukt ansequenziert und mit dem Programm 'BLAST two sequences' mit der in

GenBank™ hinterlegten Sequenz (XM\_144696, Abbildung 10) verglichen.

## 3.2 Molekulare Charakterisierung von *mgimap8*

### 3.2.1 Genomische Organisation von *mgimap8*

In der Einleitung wurde die Familie der *mgimap* Gene der Maus bereits vorgestellt (Kapitel 1.4.1). GenBank™/EBI-Analysen konnten zeigen, daß alle *mgimap* Gene in einem Cluster auf Chromosom 6B der Maus lokalisiert sind, der sich über einen Bereich von 125 kb erstreckt. Abbildung 8 zeigt die genomische Organisation des *mgimap* Gen-Clusters der Maus und das benachbarte Gen-Cluster L8/hClast1 (am rechten Rand der Abbildung 8). Dabei geben die rot markierten senkrechten Striche die Exons und die dazwischen liegenden, schwarzen Striche die Introns wieder. Die darunter dargestellten grün markierten senkrechten Linien geben die AIG-Domänen an, während die Pfeile darunter die Orientierung der Exons zeigen. Die meisten Exons innerhalb des 'Genclusters' weisen die gleiche Orientierung auf. Ausnahmen bilden die Exons von *mgimap10*, *mgimap6* und *mgimap3*. In dieser Arbeit wurden *mgimap8* und *mgimap10* (in Abbildung 8 zwischen *mgimap8* und *mgimap7* gelegen) näher charakterisiert. Die Nummerierung der Gene ergibt sich aus der in der Einleitung beschriebenen Nomenklatur (Kapitel 1.4).

## Maus Chromosom 6B

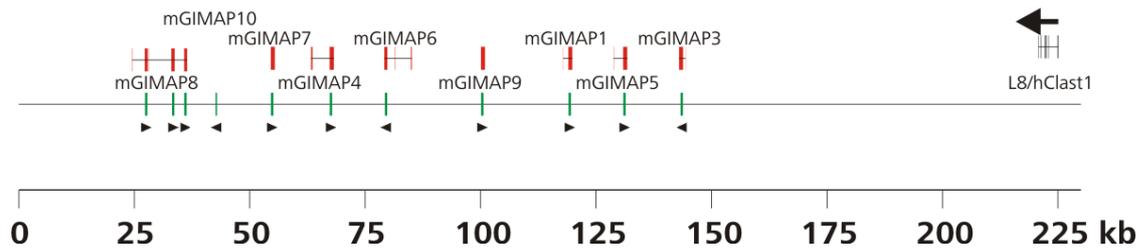


Abbildung 8 : Genomische Organisation des *mgimap* Gen-Clusters auf dem Mauschromosom 6B. Die Abstände sind maßstäblich dargestellt. Die Exons sind mit roten senkrechten Strichen gekennzeichnet, wobei die Dicke der Striche die Größe des Exons repräsentiert. Die schwarzen Striche, welche die Exons verbinden entsprechen den Introns. Die grünen senkrechten Striche stellen die AIG1-Domäne dar, während die schwarzen Pfeile die Orientierung der AIG1-Domänen korrelierenden Bereiche angeben.

### 3.2.2 Analyse der Intron-/ Exonstruktur von *mgimap8*

Das *mgimap8* Gen erstreckt sich im Mausgenom über einen Bereich von 11933 bp. Der genaue Transkriptionsstart ist derzeit nicht bekannt. Der bisher bekannte kodierende Bereich des ersten Exons beginnt an dem in Abbildung 9 mit einem Pfeil markierten Translationsstart. Abbildung 10 zeigt die bislang bekannte kodierende Sequenz. Die bisher bekannte Sequenz des *mgimap8* Gens besteht aus zwei kleinen Exons von 47 bp und 92 bp und drei großen Exons von 627 bp, 647 bp und 658 bp. An das erste Exon schließt sich eine Intronsequenz von 2657 bp bis zum zweiten Exon an. Zwischen dem zweiten Exon und dem dritten Exon liegt ein lediglich 216 bp großes Intron, während zwischen dem dritten und dem vierten Exon ein Bereich von 4939 bp keine Proteinrelevante Information enthält. Das letzte Exon befindet sich 2054 bp von Exon 4 entfernt.

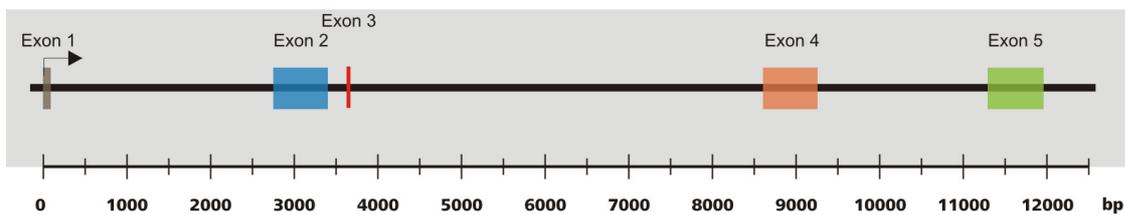


Abbildung 9 : Intron-/Exonstruktur des kodierenden Bereichs von *mgimap8* (XM\_144696.1) mit den flankierenden Nukleotiden. Die Abstände der Exons entsprechen im Verhältnis den Abständen im Genom. Der Translationsstart ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die durchschnittliche Anzahl der Exons von *mgimap8* liegt geringfügig höher als der für Gene der Maus berechnete Durchschnittswert von 4,4. Die durchschnittliche Zahl der Introns liegt genau zwischen der durchschnittlichen Intronanzahl der Maus (3,1) und dem für Menschen und Pflanze (*Arabidopsis thaliana*) ermittelten Wert von 5 (Deutsch und Long, 1999). In anderen Organismen wie z.B. bei Ratten und Hühnern verhalten sich die Zahlen so wie im Mausgenom. Für Invertebraten lässt sich kein Trend angeben, da die durchschnittliche Anzahl der Exons je nach untersuchtem Organismus zwischen 3,5 und 5,2 und die Intronanzahl zwischen 2,5 und 4,2 schwankt (Deutsch und Long, 1999).

Die Exongrößen vom *mgimap8* liegen mit ca. 200 AS/Exon, zumindest bei den großen Exons 2, 4 und 5, mehr als deutlich über dem Durchschnitt von Säugetieren, der bei etwa 50 AS/Exon liegt. Lediglich *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* und *Aspergillus* kommen auf einen Wert über 100 AS/Exon (Deutsch und Long, 1999).

Exons von Eukaryoten können in drei Klassen unterteilt werden: 3N, 3N+1 und 3N+2. Das erste Exon von *mgimap8* gehört zur Klasse der 3N+2 Exons, deren Nukleotidanzahl durch zwei teilbar ist. Diese sind mit einer Häufigkeit von 28 % im Mausgenom vertreten (Tomita *et al.*, 1996, Kriventseva und Gelfand, 1999). Je nach Art des Exon-Intron Überganges können dann nochmal jeweils drei Subklassen unterschieden werden. Danach weisen Exons vom Typ 00 sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende keine unterbrochenen Kodons auf. Typ 11 Exons beginnen mit der ersten Base eines Kodons

und enden nach der ersten Base des Kodons. Nach dieser Klassifizierung sind demnach maximal 9 Typen von 00 bis 22 möglich (Tomita *et al.*, 1996). Beim ersten Exon von *mgimap8* handelt es sich um ein Typ 02 Exon. Das zweite Exon gehört zu den 3N+1 Exons vom Typ 20, deren Basenzahl durch eins teilbar ist und die mit der dritten Base im Kondon beginnen. Exon 3 gehört, wie das vorhergehende schon, zur Klasse der 3N+1 Exons, unterscheidet sich aber von zweiten Exon in Größe und Typ (Typ 12). Das vierte Exon gehört zur Klasse der 3N Exons (Typ 22), deren Nukleotidanzahl durch drei teilbar ist und die in Nagern am häufigsten vertreten sind (Tomita *et al.*, 1996). Exon 5, das zweitgrößte Exon der kodierenden Region von *mgimap8*, gehört, wie schon Exon 1, zur Klasse der 3N+2 Exons, lässt sich aber als zum Typ 10 gehörend klassifizieren. Die Exon-Klassen 3N+1 und 3N+2 sind in Nagern wie auch bei Primaten gleichhäufig (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Prozentuale Häufigkeiten der einzelnen Exonklassen in Eukaryoten (nach Tomita *et al.*, 1996, Kriventseva und Gelfand, 1999)**

	3N	3N+1	3N+2
Primaten	47 %	27 %	26 %
Nager	44 %	28 %	28 %
Säuger	56 %	25 %	19 %
<i>Homo sapiens</i>	45 %	29 %	27 %
Vertebraten	46 %	27 %	27 %
Invertebraten	40 %	32 %	28 %
<i>Drosophila melanogaster</i>	37 %	30 %	33 %
Pflanzen	44 %	26 %	30 %
<i>Arabidopsis thaliana</i>	49 %	25 %	26 %

Das Spleißen der Prä-mRNA ist ein komplexer Prozess, der von Spleißosomen, einer kleinen Anordnungen aus Proteinen und RNA-Molekülen, ausgeführt wird. Diese Enzyme erkennen Signale im RNA-Primärtranskript, die Spleißstellen markieren (Lodish *et al.*, 2004). Die Bereiche am Übergang zwischen Exon und Intron beinhalten kurze, hochkonservierte Konsensussequenzen. Am 5'-Ende des Introns ist das die Basenfolge 'GU' (bzw. 'GT'), während sich am 3'-Ende an einen Bereich aus 12 Pyrimidinen die Basenfolge 'AG' als Konsensussequenz anschließt. Tabelle 12 zeigt die Intron-/Exonübergänge von *mgimap8*.

**Tabelle 12: Intron-/Exon-Übergänge innerhalb der kodierenden Region von *mgimap8***

Intron	Exon 5'→3'	Intron
	AUGGCGN <sub>80</sub> ACCGAG	guaugu.....
..uuuuguc <u>caacag</u>	UGCGAGN <sub>646</sub> GUCCAG	guagga.....
..cuuuuuuuuu <u>cuag</u>	GGUUGTN <sub>31</sub> UGUGUG	guaagu.....
..uuccuuguc <u>cauag</u>	GUUCAAN <sub>615</sub> AGAAAG	guaagg.....
..uuccuc <u>gcaacag</u>	AACUUUN <sub>635</sub> AAAUGA	

Nach dem Spleißen entsteht eine kodierende mRNA-Sequenz von mindestens 2067 bp mit einem durchgehenden Leseraster (ORF). Start- und Stop-Codon sind in Abbildung 10 gekennzeichnet. Das resultierende Protein besteht aus 688 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von insgesamt 76,8 kDa. Die Proteinsequenz ist in Abbildung 10 über der cDNA-Sequenz aufgeführt.

Die meisten eukaryotischen mRNAs enthalten eine kurze Erkennungssequenz (Kozak-Sequenz), die die Bindung der mRNA an die kleine 40S-Untereinheit des Ribosoms und damit die Translation initiiert (Kozak, 1989). Der für den Translationsstart wichtige Sequenzkontext sollte an der Position -3 eine Guanin-Base enthalten. Alternativ kann hier auch ein Adenin stehen, während an der Position +4 ein G häufig zu finden ist (Kozak, 1989). Im Vergleich zur Position -3 ist die Position +4 aber weniger bedeutend (Kozak, 1997). Die in Abbildung 10 aufgeführte kodierende Sequenz von *mgimap8*

enthält sowohl an der Position -3 als auch an der Position +4 eine Guanin-Base. Damit ist der Translationsstart in eine Kozak-Sequenz eingebettet.

```

1  CAGAGATGGC GACTTCATCC CACCAAGGAG CAGCTGCAGG AAGCCAGGCA GAGCACAGAA
      M A T S S H Q G A A A G S Q A E H R
61  GCTGTGAAGC ATCAGTAGGA CAGGGGGAAA GACCAGGTGC CAGCCAGGGT CAGGAGGGCA
      S C E A S V G Q G E R P S A S Q G Q E G
121 ACTTCAAGCA GAACCAGGGA ACGTCCACAC TCGGCTCCTT CCTGCTAGGG AAACAGGGCG
      N F K Q N Q G T S T L R L L L L G K Q G
181 CAGGCAAAAG TGCCACAGGA AACACCATTC TGGGCAAAGC CGTGTTCGAG TCCAAGTTCA
      A G K S A T G N T I L G K A V F E S K F
241 GTGATCACAT GGTAAACGAC AGATGCCAGA GCGAGAGTGT GTCAGTAAGA GGGAAACAGG
      S D H M V T D R C Q S E S V S V R G K Q
301 TCATTGTTCAT CGATACCCCA GATCTTTTCT CCTCACTGAG CTGTTTCAGAG GTTAGGCAGC
      V I V I D T P D L F S S L S C S E V R Q
361 AGAACCTGAA GCAGTGCTTG GCGCTCTTAG CTGATGATCA CTGTGTGCTG CTCCTGGTCA
      Q N L K Q C L E L L A D D H C V L L L V
421 CTCCCATTGG CCACTATACA GAGGAGGACA GGGAGACCAT TGAAGGCATC TGGGGTAAAA
      T P I G H Y T E E D R E T I E G I W G K
481 TTGGCCCTAA AGCCTACAGA CACATGATTG TGGTCTTCAC TCGGGAAGAT GAGCTGGATG
      I G P K A Y R H M I V V F T R E D E L D
541 AAGACTCCCT GTGGAACCTAC ATTGAGAGCA AGGAGTCTCT GAAGGAGTTG ATTAATAACA
      E D S L W N Y I E S K E S L K E L I K N
601 TTGGAAGTCG ACGATGTTGT ACTTTCAACA ACAAGGCAGA CAAGAAGCAG CGGGAAGTGC
      I G S R R C C T F N N K A D K K Q R E L
661 AGGTGTTCAA GCTGCTTGAT GCAATTGAAC TTTTGATGAT GGAAAGCCCT GAGCCATATT
      Q V F K L L D A I E L L M M E S P E P Y
721 TTGAGCCCTT AAAAATGGAA AGCAGTGGAG TCCAGGGTTG TGGGAATGGA GTGACATATG
      F E P L K M E S S G V Q G C G N G V T Y
781 AAGGGACAC TCTGTGTGGT TCAAAGAAGA GGCAGCCTCA GATCACAGGA CCCCGATTGTG
      E G D T L C G S K K R Q P Q I T G P D C
841 ATCCAGACAT GCCAGAGCTG AGGGTCTCTC TGATGGGGAA GCGTGGTGTG GGGAAAAGTG
      D P D M P E L R V L L M G K R G V G K S
901 CAGCAGGAAA CAGCATTCTG GGAAGCAGG TCTTTAAGAC TCAGTTCAGT GAGAAGCAGC
      A A G N S I L G K Q V F K T Q F S E K Q
961 GGGTCAACCA GGCCTTTGCA TCCACAGCA GGGTCTGGCA AGGGAAGAAA GTTCTGATTA
      R V T K A F A S H S R V W Q G K K V L I
1021 TAGATTCTCC AGAGATCTCA TCGTGGAAAG TTGATGAGTC TGCTGTCAAG AATCACACCT
      I D S P E I S S W K L D E S A V K N H T
1081 TTCCAGGTCC CCATGCCTTT CTGCTGGTGA CACCACTGGG TTCTTCTTTA AAGAGTGATG
      R T L D W Q D V V V L L V T P L G S S L K S D
1141 ACGATGTGTT CAGCATCATC AAACGTATTT TTGGAGAAAA ATTCACCAAG TTCACAATTG
      D D V F S I I K R I F G E K F T K F T I
1201 TTCTCTTTAC CAGGAAAGAA GATTTTGAGG ATCAGGCTCT AGATAAGGTT ATAAGGAAA
      V L F T R K E D F E D Q A L D K V I K E
1261 ATGATGCTCT CTATAATCTC ACCCAGAAAT TTGGAGAAAG ATACGCAATC TTCAACTACC
      N D A L Y N L T Q K F G E R Y A I F N Y
1321 GGGCATCTGT GGAGGAGGAG CAGAGCCAGG TGGGCAAAC TACTGAGCAA ATCGAGAAGA
      R A S V E E E Q S Q V G K L L S Q I E K
1381 TGGTGCAGTG CCACAGCAAC AAGCCTTGCG TCATCAGAGA GAAAGAACTT TTAACATCA
      M V Q C H S N K P C V I R E K E L L N I
1441 TCCTCTTGGG AAGGAGTGGG GCTGGAAAGA GTGCAACTGG GAACACTATC CTGGGGAGAT
      I L L G R S G A G K S A T G N T I L G R
1501 CTGCCTTCTT CTCCAGCTC AGAGCTCAGC CGGTCACCAG TAGCAGCCAG AGTGGTAAGA
      S A F F S Q L R A Q P V T S S S Q S G K
1561 GGACACTGGA CTGGCAGGAT GTTGTGGTTG TGGACACTCC ATCATTTCATC CAGACGCCTG
      R T L D W Q D V V V V D T P S F I Q T P
1621 GCACTGAAAA GGATCCCTCC AGGTTAAAGG AGGAGATCCA TCACTGTTTG AGTCTCTGCG
      G T E K D P S R L K E E I H H C L S L C
1681 AAGAAGGCAT GAAGATTTTT GTCCTGGTTC TCCAGTTGGG ACGGTTCCACC CAGGAAGATG
      E E G M K I F V L V L Q L G R F T Q E D
1741 AGGTGGTGGT GGAGCAACTG GAGGCCAGTT TTGAGGAAAA CATTATGAAA TATATGATTG
      E V V V E Q L E A S F E E N I M K Y M I
1801 TGCTGTTTAC ACGGAAGGAA GACCTAGGGG ATGGGGACCT TCATGATTAT ACTAACAACA
      V L F T R K E D L G D G D L H D Y T N N
1861 CAAAGAACAA AGCCCTTAAA AAAATACTTA AAAAGTGCAA TGGGCGAGTT TGTGCTTTTA
      T K N K A L K K I L K K C N G R V C A F
1921 ATAACAAAGA AACTGGTGAA GACCAGGAGA CCCAGGTGAA AGGTCTGTTG AAAATAGCCA
      N N K E T G E D Q E T Q V K G L L K I A
1981 ATAGTCTCAA AAAGAACTAT GATGAGCATT CAAATTCATG GGTGGGTCAA TTAATAACAA
      N S L K K N Y D E H S N S W V G Q L K S
2041 CACTAGGCCA AATTACTATG GCATTTAAAT GAGCTCA
      T L G Q I T M A F K -

```

Abbildung 10 : kodierende cDNA- und Proteinsequenz von *mgimap8* mit den flankierenden, nicht kodierenden Basen. Die 2067 bp große kodierende cDNA-Region von *mgimap8* (XM\_144696.1) beginnt mit dem blau markierten Startcodon und endet mit dem rot markierten Stopcodon. Es ergibt sich ein durchgehendes Leseraster, das zu einem Protein aus 688 Aminosäuren führt. Über der cDNA-Sequenz ist die Proteinsequenz aufgeführt. Mögliche GTP-Bindungsstellen sind grün markiert, während mögliche Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen pink und N-Myristylierungsstellen braun markiert sind.

In der in Abbildung 10 dargestellten Sequenz konnten drei P-Loops von GTP-Bindungsstellen identifiziert werden, die grün markiert sind. Damit zeigt *mgimap8* starke Ähnlichkeiten zum *AIG1*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und zu anderen *gimap* Genen. Ungewöhnlich ist jedoch die Anzahl der Bindestellen, da sich in den Sequenzen der bisher beschriebenen *gimap* Gene jeweils nur eine Bindestelle nachweisen ließ. N-Myristillierungsstellen sind in der cDNA-Sequenz mit brauner Markierung versehen. Diese bieten eine Möglichkeit der Verankerung zwischen Proteinen und Lipiden, z.B. zur Verankerung eines Proteins auf der protoplasmatischen Seite (P-Seite) einer Membran. Dabei verknüpft eine Amidbindung einen N-terminalen Glycinrest mit der Myristinsäure, einer langkettigen Fettsäure. Solche Verknüpfungen findet man z.B. bei Retroviren oder bei der  $\alpha$ -Untereinheit trimerer G-Proteine (Kleinig, 1999).

Neben den bisher beschriebenen Erkennungssequenzen weist die Aminosäuresequenz zahlreiche Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen auf, die in Abbildung 10 pink markiert sind. Diese ubiquitär vorkommende Kinase kann Kalzium-Ionen binden und ist dadurch an G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Krauss, 2003).

Neben der in Abbildung 10 aufgeführten Sequenz von *mgimap8* (XM\_144696.1) existiert eine Variante, die mit der Bezeichnung 'XM\_144696.2' versehen wurde und deren Sequenz sich durch Neuzusammensetzung der Sequenzdaten der Maus mit Hilfe von Computern ergab. Diese Variante zeigt gegenüber der in dieser Arbeit als *mgimap8* bezeichneten Sequenz eine Erweiterung um 74 Bp am 5' Ende und eine Erweiterung von 219 Bp am 3' Ende der in Abbildung 10 gezeigten Sequenz. Dadurch erweitert sich die kodierende Region des mGIMAP8-Proteins um 73 AS. Bisher konnte diese Sequenz jedoch nicht experimentell bestätigt werden.

Jüngste Vergleiche der in Abbildung 10 dargestellten kodierenden cDNA-Sequenz von *mgimap8* mit GenBank™ führten zu zwei Treffern mit hoher Identität. Die GenBank™-Einträge mit der Bezeichnung '*Mus musculus* Gene model 457' (NM\_212486.1) und '*Mus musculus* IAN9 mRNA' (AB178029.1) weisen nahezu 100% Identität mit der untersuchten Sequenz auf (Abbildung 10). Beide Treffer wiederum sind identisch untereinander und nur von verschiedenen Arbeitsgruppen unter unterschiedlichen Bezeichnungen in der Datenbank abgelegt. Es handelt sich um 2921 bp lange cDNAs, die sich gegenüber der in Abbildung 10 dargestellten cDNA von *mgimap8* am 5'-Ende um 76 bp und am 3'-Ende um 778 bp unterscheidet. Der neu hinzugekommene Bereich schließt sich auf genomischer Ebene 6,5 kb in 'downstream' hinter dem fünften Exon an (Abbildung 9). Die kodierende Region bleibt gegenüber der in Abbildung 10 dargestellten Sequenz unverändert. Die Bezeichnung 'IAN9' ist der alten Nomenklatur der *gimap* Gene entnommen (Kapitel 1.4). Die in Abbildung 10 dargestellte Sequenz konnte im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden und kennzeichnet die kodierende Region des *mgimap8* Gens. Die neueren Einträge in der Datenbank sind nicht das Ergebnis funktioneller Untersuchungen. Vielmehr handelt es sich um mit Computerhilfe neu zusammengesetzte Sequenzen aus dem Maus-Genomprojekt. Die Einträge der am 5'- und 3'-Ende erweiterten Sequenz von *mgimap8* sind das Ergebnis einer japanischen Arbeitsgruppe (Nitta *et al.*, 2004). Da bisher nicht mehr als die erweiterte Sequenz von *mgimap8* publiziert ist, bezieht sich im folgenden die Bezeichnung *mgimap8* immer auf die in Abbildung 10 dargestellte Sequenz.

### 3.2.3 Verwandtschaft zu anderen *mgimap* Genen in der Maus

Ein multiples 'Alignment' dient dem parallelen Vergleich mehrerer DNA- oder Proteinsequenzen. Solche Analysen geben Aufschluß über konservierte Bereiche auf DNA- oder Proteinebene und bieten auch die Grundlage für phylogenetische Analysen, d.h. die Suche nach der Herkunft der Sequenzen. Multiple 'Alignments' lassen sich nach der Art ihrer Berechnung in zwei Klassen zusammenfassen: globale multiple 'Alignments' und lokale multiple 'Alignments'. Das globale multiple 'Alignment' faßt die Sequenzen in einem Block unter Einführung von Lücken ('gaps') zusammen, während das lokale 'Alignment' in Sequenzen nach Blöcken größerer Ähnlichkeit sucht und dann blockweise multiple 'Alignments' ohne Lücken erstellt (Hansen, 2001). Für die Analysen der Proteinsequenzen der mGIMAP-Proteine und der Proteinsequenz von AIG1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde das Programm 'CLUSTALW' (Thompson *et al.*, 1994) verwendet, mit dessen Hilfe die Sequenzen paarweise miteinander verglichen und so die Ähnlichkeiten berechnet wurden. Als Konsensussequenz wurde die Aminosäuresequenz von AIG1 zugrundegelegt und grün unterlegt.

Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Sequenzen der murinen GIMAP-Proteine. Die Sequenz von mGIMAP8 wurde dabei in drei Teile unterteilt und jeder Bereich für sich mit den Sequenzen der übrigen mGIMAP-Proteinen verglichen. Diese Dreiteilung ergab sich durch den besonderen Aufbau aus drei AIG1-ähnlichen Domänen. Die grün gekennzeichneten Bereiche stehen für eine Übereinstimmung einzelner GIMAP-Proteinsequenzen mit der Konsensussequenz des AIG1-Proteins, während die rot unterlegten Bereiche eine Konservierung innerhalb aller GIMAP-Proteine aufzeigen. Dabei zeigt sich, daß alle drei Teile von mGIMAP8 Übereinstimmungen mit der AIG1 Konsensus-Sequenz und einigen anderen mGIMAP-Proteinen zeigen (grün dargestellt). Weiterhin zeigen sich in allen GIMAP-Proteinen gegenüber AIG1 hochkonservierte Bereiche (rot markiert).

Abbildung 11 : Multiples, globales Alignment aller mGIMAP-Proteine und AIG1. Die AIG1-Sequenz ist als Konsensus-Sequenz grün unterlegt. Einzelne Übereinstimmungen mit dieser Sequenz sind ebenfalls grün unterlegt. Bereiche, die in allen Sequenzen konserviert sind, sind rot markiert.

```

mGIMAP8_1_233 -----MATSSHQGAAAGS-----
mGIMAP6 MDWLYRKTLGSIGSCSIETFFPWPFFYSFFQRIYISTPPGKPENSPETSATEVGEQRPSCLS
mGIMAP3 -----
mGIMAP1 -----
mGIMAP7 -----
mGIMAP5 -----
mGIMAP9 -----
mGIMAP4 -----
mGIMAP8_464_688 -----
mGIMAP8_234_463 -----SPEPY
AIG1 -----

mGIMAP8_1_233 -----QAEHRSCAEASVQGGERPSASQGGEGNFK---QNQGTSTLRLLLLGKQGAGKS
mGIMAP6 ASPVVEEEECHEHPEKNPTRQWPLDSGQGLTKGLKE---KKLTPKRLQLLLVGKTFSGKS
mGIMAP3 -----METLQNVVTTGGKGGCTSGSRP-----LRLLVGKSGCGKS
mGIMAP1 -----MGGRKMARDEEDAYGSEDSRAPQMP---Q-----LRLLVGRTGTGKS
mGIMAP7 -----MAGQGDTE-----GRILLVGKTGNGKS
mGIMAP5 -----MAGQGDTE-----GRILLVGKTGNGKS
mGIMAP9 -----MAEFSDNS-----LRIVLVGKTGSGKS
mGIMAP4 ---MEVQCGGAGFIPESRRSSHELGNQDQGIPO-----LRIVLLGKTGAGKS
mGIMAP8_464_688 -----SNKPCVIREKE-----LLNTILLGRSGAGKS
mGIMAP8_234_463 FEPLKMESSGVQCGNGVTYEGDTLCGSKKRQPQITGPDGDPDMPELRVLLMGKRGVGKS
AIG1 ----MANDQKNSSESFPKEDHKDDAAAPAEVDHKDEFASQPHPPVENIVLVGRTGNGKS

mGIMAP8_1_233 ATGNTILGKAVFESKFSDHM-VTDRCSSESVSVRGKQIVIDTDFLSSSLSC-SEVR--Q
mGIMAP6 ATGNSILGRQAFESKISARP-VTTTFQKGTREFEGKELEVIDTDFIFSPQNQ-PEAT--A
mGIMAP3 ATGNSLLRRPAFESRLRGQS-VTRTSQAETGTWEGRSILVVDTPPIFESKAQNQD-M--D
mGIMAP1 ATGNSILGQKCFLSRLGAVP-VTRSCTLASRMWAGWQVEVVDTPDIFSEIPIRTDPG--C
mGIMAP7 ATANTILARRQFDSKICANA-VTKTCQRAYREWKGNLTVVDTPGLFDTKET-MKTT--C
mGIMAP5 ATANTILARRQFDSKICANA-VTKTCQRAYREWKGNLTVVDTPGLFDTKET-MKTT--C
mGIMAP9 ATAN-ILGQKRFVSRRIAPHA-VTQNCQSDSRRWKERD-LLVDTPGLFDTKVK-LETT--C
mGIMAP4 STGNSILGEKVFNSGICAKS-ITKVCEKRVSTWDGKELVVVDTPGIFDTEVP-DADT--Q
mGIMAP8_464_688 ATGNTILGRSAFSQLRAQP-VTSSSQSGKRTLWDQDVVVDTPSFIQTPGTEKDP SRLK
mGIMAP8_234_463 AAGNSILGKQVFKTQFSEKQRTKAFASHSRVWQGKKVLIIDSPEISSWKLDES AVKN--
AIG1 ATGNSIVRSKVFKSKTKSSSGVTMECHAVKAVTPEGPILNVIDTDFGLFDLSVSAEFIG---

mGIMAP8_1_233 QNLKQCLELLADDDHCVLLVTPIG-HYTEEDRETIEGIWGIKPKAYRHMIVVFTREDEL
mGIMAP6 K--KICDLLASPGPHAVLLVIQVG-RYTAEDQAVARCLQEIFGNTILAYTILVFTRKEDL
mGIMAP3 KDIGDCYLLCAPGPHVLLVLTQLG-RFTAEDVMAVRMVKVFGVGMVHMIVLFTRKEDL
mGIMAP1 VETARCFVLSAPGPHALLVLTQLG-RFTMQDSQALAAVKRLFGKQVMARTVVVFTRQEDL
mGIMAP7 FEISRCLVLYSCPAPHAILLVLRDL-RYTEEEQKTVALIKGLFGEAALKYMIILFTHKEDL
mGIMAP5 FEISRCLVLYSCPAPHAILLVLRDL-RYTEEEQKTVALIKGLFGEAALKYMIILFTHKEDL
mGIMAP9 LEISRCLVLYSCPAPHAILLVLRDL-RFTVVEEQTIVIRIKAIFGEEVMKYMIIVLFTRKDDL
mGIMAP4 REITRYVALTSPGPHALLVLTQLG-RYTVBEHKATQKILDMFGKQARRFMILLLTKRDDL
mGIMAP8_464_688 EEIHHCLSLCEE@MKIFVLTQLG-RFTQDEEVVVEQLEASFEENIMKYMIIVLFTRKEDL
mGIMAP8_234_463 -----HTFP@PHAFLLVLTPLG-SSLKSDDDVFSIIKRIFGEKFTKFTIVLFTRKEDF
AIG1 KEIVKCLTLADGGLHAVLLVLSVRTRISQEEEMVLSLTLQVLFSGKIVDYLVVFTGGDVL

mGIMAP8_1_233 DED--SLWNYIESKES-LKELIKNIGSRCCFTFNKADKKQR-ELQVFKLLDAIELLMME
mGIMAP6 AEG--SLEEYIQENNNKSLDVLVACERRHCGFNKAQGDQ-EAQLKLMEEVELILWE
mGIMAP3 AEK--SLEEFVTHDNRSLRSLVQECGRYCAFNNRASGEEQ-QGQLAELMALVRRLEQE
mGIMAP1 AGD--SLQDYVHCTDNRALRDLVAECGGRVCALNRRATGSEER-EAQAEQLGMVAQLVRE
mGIMAP7 EDQ--SLDNFVSDAG-EKLNNIISQCGKRYLAFNKAALDEQ-ENQVQQLIELTEKMVAQ
mGIMAP5 EDQ--SLDNFVSDAG-EKLNNIISQCGKRYLAFNKAALDEQ-ENQVQQLIELTEKMVAQ
mGIMAP9 EDQ--SLDFIADSD-TNLKSIKCCGNRCLAINNKAERAER-ETQVQELMGLVETLVQN
mGIMAP4 EDT--DIHEYLEKAP-KFFQEVMEHFQNR YCLFNNRASGAEK-EEQKMQLT-LVQSMVRE
mGIMAP8_464_688 GDG--DLHDYTNNTKNKALKKILKCCNGRVCAFNKKTGEDQ-ETQVKGLLKIANSLKKN
mGIMAP8_234_463 EDQ--ALDKVIKEND--ALYNLTQKFER YAFNYRASVEE-ESQVVKLLSQIEKMQVC
AIG1 EDDGMTLEDYLDGNMMPDLKRVLLILCGQRMLIFDNKTKDDEKTKQVHELKLLKLDLVRKQ

```

Die Sequenzanalyse einer Gruppe von Genen ermöglicht die Ermittlung des Verwandtschaftsgrades der Gene. Die Analyse eines globalen 'Alignments' mit CLUSTALW zeigt gemeinsame Sequenzen auf, gibt aber keine Auskunft über den Ursprung der Genfamilie. Phylogenetische Analysen dagegen zeigen Beziehungen zwischen verschiedenen Organismen mit Hilfe mathematischer Methoden auf. Die Ergebnisse werden in Form eines 'Evolutionstammbaumes' dargestellt. Als 'Bäume' werden in der Informatik Formen eines Diagrammes aus Knoten (abstrakte Punkte) bezeichnet, die durch Kanten ( Linie zwischen zwei Knoten) miteinander verbunden sind. Ein Pfad von einem Punkt zum anderen ist eine Reihe aufeinanderfolgender Kanten, die an einem Punkt beginnen und an einem anderen enden. Als zusammenhängend bezeichnet man einen Graph, in dem es zwischen zwei beliebigen Knoten stets mindestens einen Pfad gibt. Damit läßt sich ein Baum in der Informatik als

zusammenhängender Graph bezeichnen, in dem es zwischen zwei beliebigen Punkten stets einen Pfad gibt (Lesk, 2003). Dabei kann zwischen gewurzelten Bäumen und solchen ohne Wurzel unterschieden werden. Zusätzlich können bei phylogenetischen Stammbäumen noch die Längen der Kanten als ein Maß für den evolutionären Abstand der Gene bzw. Organismen miteinbezogen werden. Zur Berechnung phylogenetischer Bäume unterscheidet man zwei Verfahren: das phanetische (Ähnlichkeit) und das kladistische Verfahren. Das modernere, kladistische Verfahren berücksichtigt neben dem evolutionären Abstand auch mögliche Evolutionswege. An jedem Knoten wird auf die Eigenschaften der Vorfahren geschlossen und danach der optimale Stammbaum errechnet. Für diese Berechnung eines Baumes nach dem kladistischen Verfahren unterscheidet man zwischen zwei Methoden: der Maximum-Parsimony-Methode, die den Stammbaum anhand der geringsten Anzahl an Mutationen errechnet und der Maximum-Likelihood-Methode, die nicht nur die Mutationsereignisse zählt, sondern ihnen auch eine Wahrscheinlichkeit zuordnet. Wie beim Maximum-Parsimony-Prinzip werden die Vorfahren an allen Knoten des Stammbaumes rekonstruiert. Darüber hinaus wird den Kanten eine Länge zugeordnet, die der Wahrscheinlichkeit des postulierten Mutationsereignisses entspricht. Die dabei unterstellten Austauschraten der Basen oder Aminosäuren werden für jede mögliche Topologie des Baumes solange variiert, bis die Parameter gefunden wurden, die mit der größten Wahrscheinlichkeit die beobachteten Daten erzeugen (Lesk, 2003).

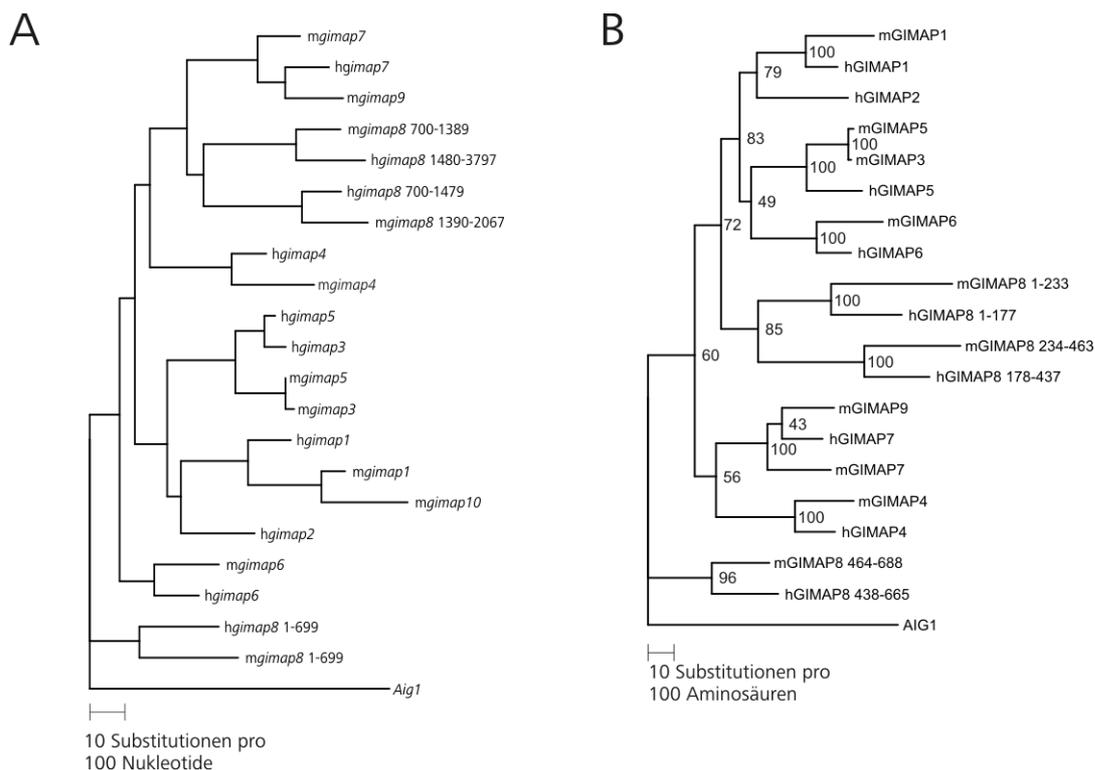


Abbildung 12 : Phylogramme zur Darstellung der Abstammungsverhältnisse der *mgimap* Gene bzw. mGIMAP-Proteine und AIG1. Aus den in Abbildung 11 dargestellten Sequenzvergleichen wurden die Stammbäume konstruiert: (A) DNA-Stammbaum (B) Protein-Stammbaum Die Zahlen an den Knoten geben die 'Bootstrap' Wahrscheinlichkeit an. Die Zahlen hinter den *gimap8* Genen geben die Nukleotidanzahl an, da sich die *gimap8* Gene aus drei AIG1-ähnlichen Domänen zusammensetzen. Entsprechendes gilt für die Proteine. Die Austauschrate der Nukleotide bzw. Aminosäuren ist unter den Bäumchen angegeben.

Die schon im 'CLUSTALW-Alignment' beobachteten Unterschiede (Abbildung 11) spiegeln sich auch in der phylogenetischen Analyse der Sequenzen wieder. Die phylogenetischen Analysen wurden aus den Daten des mit CLUSTALW berechneten multiplen globalen 'Alignments' (Kapitel 2.10.18) gewonnen.

Abbildung 12 zeigt ein Phylogramm der Nukleotid- und Proteinsequenzen von *mgimap* Genen. Das *mgimap8* Gen wurde entsprechend der Zusammensetzung aus drei GTP-bindenden Domänen sowohl auf Nukleotid-, wie auch auf Proteinebene geteilt und die einzelnen Teile, wie auch schon im multiplen globalen 'Alignment' (Abbildung 11), mit den übrigen Sequenzen verglichen. In die Vergleiche auf Proteinebene wurde

*mgimap10* nicht miteinbezogen, da die Sequenz nur für kurze Peptidfragmente kodiert (Abbildung 19).

Abbildung 12A zeigt die phylogenetische Analyse der *gimap* Gene auf DNA-Ebene. Die murinen Vertreter sind gemäß der neuen Nomenklatur (Kapitel 1.4) mit einem „m“ bzw. die humanen Mitglieder der Genfamilie entsprechend mit einem vorangestellten „h“ markiert. Die Zahlen hinter den *gimap8* Genen stehen für die Nukleotidnummer, da sich die humanen und murinen Vertreter aus je drei AIG1-ähnlichen Domänen zusammensetzen. Die humanen und murinen Gene sind in den meisten Fällen zueinander ortholog. Es gibt jedoch auch Ausnahmen. Das humane *gimap5* Gen zeigt größere Ähnlichkeit zu *hgimap3* als zu dem murinen *gimap5* Gen, das wiederum größere Ähnlichkeit zu *mgimap3* zeigt. Eine ähnliche Abweichung ergibt sich bei dem Vergleich der einzelnen AIG1-ähnlichen Bereich von *gimap8*. Dort zeigt sich, daß der mittlere Bereich des *mgimap8* Gens (*mgimap8* 700-1389) ortholog zur letzten AIG1-Domäne des *hgimap8* Gens (*hgimap8* 1480-3797) ist und nicht, wie erwartet, zur mittleren AIG-Domäne. Die Sequenz des *mgimap10* Gens zeigt eine starke Ähnlichkeit zur Sequenz des murinen *gimap1* Gens, welches als im Gegensatz zu *mgimap10* (Kapitel 3.3) funktionell herausgestellt werden konnte.

Abbildung 12B zeigt die phylogenetischen Analysen der kodierenden Regionen der GIMAP-Proteine in Maus und Mensch und weist Unterschiede zur phylogenetischen Analyse auf DNA-Ebene auf. Das mGIMAP8 Protein wurde, wie schon für die Analysen auf Nukleotidebene, nach seiner Gliederung in drei AIG1-Domänen in drei Teile unterteilt und diese einzeln mit den anderen mGIMAP-Proteinen verglichen.

Die schon für die Gene *gimap3* und *gimap5* beobachteten Unterschiede ließen sich durch den Vergleich der kodierenden Regionen erneut feststellen. So zeigte mGIMAP5 eine größere Ähnlichkeit zu mGIMAP3 als zu hGIMAP5. Das hGIMAP3 Protein wurde in den Vergleich nicht miteinbezogen, da es sich um ein Pseudogen handelt. Die unterschiedlichen Homologien, wie sie für die einzelnen Bereiche von *mgimap8* auf DNA-Ebene gezeigt werden konnten, ließen sich innerhalb der kodierenden Region nicht feststellen. Dort waren die Teile des mGIMAP8 Proteins auch ortholog zum jeweiligen Teil des humanen GIMAP8 Proteins. Allerdings zeigten die beiden ersten AIG1-Domänen der GIMAP8 Proteine stärkere Ähnlichkeit zueinander als diese Sequenzen auf DNA-Ebene. Auf DNA-Ebene ergaben sich dagegen größere Ähnlichkeiten zwischen den mittleren und letzten Sequenzbereichen.

Durch den Vergleich aller mGIMAP-Proteinsequenzen bezüglich der Aminosäureabfolge ließen sich die in Abbildung 13 aufgeführten Gemeinsamkeiten der mGIMAP-Proteine zusammenstellen. Das mGIMAP8-Protein enthält als gemeinsames Merkmal mit anderen GIMAP-Proteinen drei, nach dem Gen aus *Arabidopsis thaliana* bezeichnete, AIG1-Domänen (GTPase Domänen). Sie enthalten, wie alle anderen GTPasen, sogenannte G1- bis G5-Motive sowie eine stark konservierte Sequenz ('conserved box') zwischen dem G3- und G4-Motiv. Als weiteres Strukturmerkmal finden sich drei 'coiled coil'-Domänen, die ebenso wie die AIG1-Domänen, dreimal auftreten. Während die am Aminoende des Proteins gelegene 'coiled-coil'-Domäne nur 16 Aminosäuren umfaßt, sind die am carboxyterminalen Ende gelegenen mit 20 bzw. 25 Aminosäuren deutlich länger. Außer mGIMAP1 und mGIMAP6 hat jedes Protein der mGIMAP-Familie mindestens zwei dieser Strukturen.

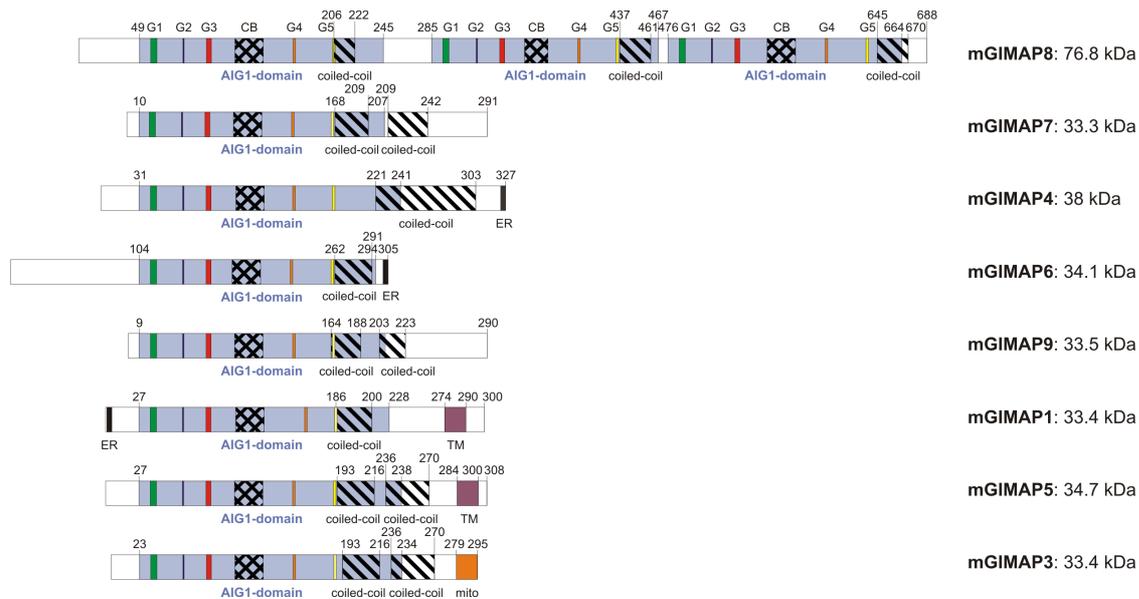


Abbildung 13 : struktureller Vergleich der mGIMAP-Proteine der Maus. Die AIG1-Domäne (blau) enthält fünf G1 bis G5 Motive, die für alle GTPasen charakteristisch sind, sowie eine „Conserved Box“ (CB), die charakteristisch für AIG1-Domänen GTPasen ist. Regionen, die Ähnlichkeiten zu bekannten ER- (ER) oder mitochondrialen Lokalisationssignalen (mito), putativen „coiled-coil“ Transmembranregionen (TM) enthalten, sind entsprechend gekennzeichnet. Die Zahlen bezeichnen die Position innerhalb der jeweiligen Proteinssequenz.

mGIMAP8 hat im Vergleich zu den anderen vergleichbaren Proteinen der Maus mit 76,8 kDa ein hohes Molekulargewicht und ist damit mehr als doppelt so groß wie die anderen mGIMAP-Proteine, deren Molekulargewichte in einem Bereich zwischen 30 und 34 kDa liegen. Eine Analyse der Proteinsequenz mit PSORTII (Kapitel 2.10.18) ergab kein Lokalisationssignal, welches innerhalb der murinen GIMAP-Proteine nur noch bei mGIMAP5, mGIMAP7 und mGIMAP9 fehlt. Solche topogenen Signale sind Sequenzen in Proteinen, die deren Bestimmungsort in der Zelle festlegen. Sie ermöglichen damit das richtige 'Adressieren' der Proteine an ihrem Entstehungsort (Lodish *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, daß das Lokalisationssignal am C-Terminus von mGIMAP3 für den Transport in die äußere Mitochondrienmembran verantwortlich ist (Daheron *et al.*, 2001). In den Aminosäuresequenzen von mGIMAP1, mGIMAP4 und mGIMAP6 konnte ein ER-Lokalisationssignal nachgewiesen werden.

Sequenzvergleiche von *mgimap8* mit dem menschlichen Genom und dem Genom der Ratte ergaben zudem orthologe Gene in beiden Organismen. In der Ratte existieren zwei Gene, die auf Proteinebene Ähnlichkeit zu mGIMAP8 zeigen. Eine der cDNAs des *rgimap8* Gens (XM\_237128) ist 972 bp lang und kodiert für ein aus 304 AS bestehendes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 33,7 kDa. Zudem existiert noch eine zweite cDNA (NM\_237130), die für ein 1025 bp langes und aus 295 AS bestehendes Protein kodiert. Auf DNA-Ebene sind beide cDNAs zueinander nicht identisch und zeigen auch zu *mgimap8* kaum Übereinstimmungen. Beide Proteine jedoch zeigen 45 % Identität und 68 % Ähnlichkeit (für XM\_237128) bzw. 41% Identität und 56% Ähnlichkeit (für XM\_237130) zur Proteinsequenz von mGIMAP8.

Das menschliche orthologe Gen *hgimap8* (NM\_175571) wurde bereits im Zusammenhang mit anderen orthologen Vertretern im menschlichen Genom erwähnt, aber noch nicht näher charakterisiert (Krücken *et al.*, 2004). *hgimap8* kodiert für ein mit 665 AS ähnlich großes Protein wie mGIMAP8. BLASTx-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) ergaben 54 % identische und 69 % ähnliche Aminosäuren im Vergleich mit mGIMAP8.

Weitere Sequenz-Vergleiche auf Proteinebene ergaben identische Aminosäuresequenzen zwischen 37 % und 39 % für verschiedene Spleiß-Varianten von GIMAP4, die auch in der Wanderratte und Mensch vorkamen. Der phylogenetisch weit entfernte Zebrafisch (*Danio regio*) wies ebenso ein GIMAP-ähnliches Protein (36 % Identität, 58 % Ähnlichkeit) auf wie Reis (*Oryza sativa*) und *Arabidopsis thaliana* (35 % Identität bei 54 % Ähnlichkeit).

### 3.2.4 Expressionsanalysen von murinen *gimap* Genen

#### 3.2.4.1 Qualitative Expressionsanalyse von *mgimap8*

Für die Untersuchung der gewebespezifischen Verteilung von *mgimap8* wurde ein 'Northern Blot' (AMS Biotechnology GmbH Europe, Wiesbaden) mit Poly A<sup>+</sup> RNA (2 µg pro Spur) aus zwölf verschiedenen Geweben von BALB/c Mäusen beiderlei Geschlechts, mit 80 ng *mgimap8*-Sonde hybridisiert. Als Sonde wurde die komplette 2067 bp große *mgimap8*-Sequenz verwendet (Abbildung 10).

Abbildung 14 :  
Gewebeverteilung der  
*mgimap8*-Expression  
A Gesamtdarstellung  
des Maus 'Poly(A)<sup>+</sup>-  
Northern Blot', der mit  
einer *mgimap8*-Sonde  
hybridisiert wurde (2 h  
Exposition).  
B Ausschnitt des in A  
dargestellten 'Blots'  
nach Expositionszeiten  
von 2 h und 24 h. Zur  
Kontrolle erfolgte nach  
dem 'Strippen' eine  
Hybridisierung des  
gleichen 'Blots' mit  
einer GAPDH-Sonde.

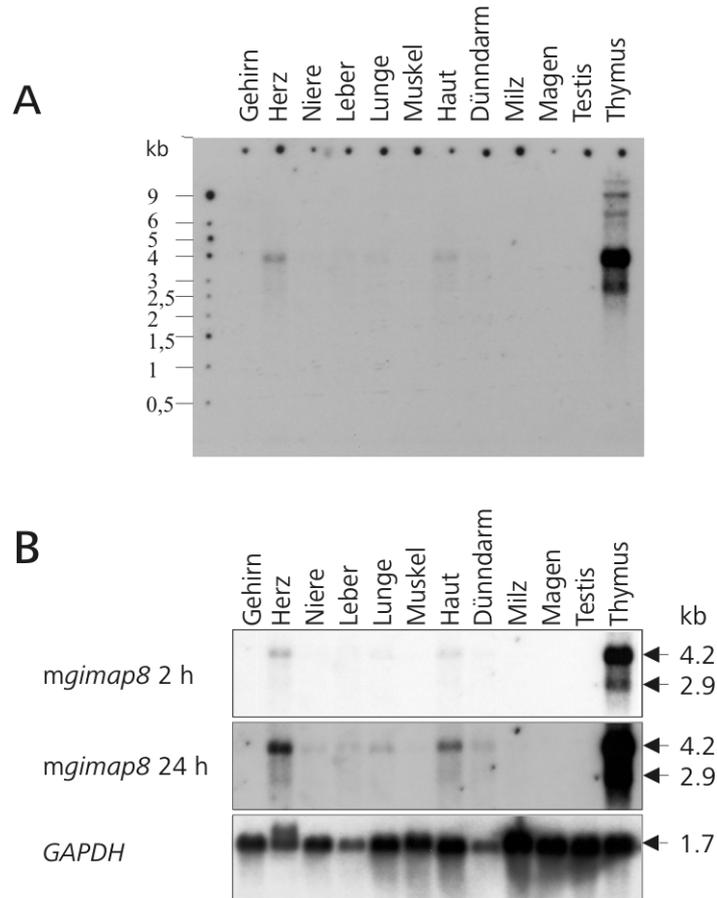


Abbildung 14 zeigt den hybridisierten 'Northern Blot' nach Expositionszeiten von 2 h und 24 h. Bereits nach 2 h zeigten sich zwei sehr starke Signale im Thymus und schwächere Signale in Herz, Haut und Lunge. Nach 22 weiteren Stunden Exposition zeigten sich zusätzlich schwache Signale in Niere, Leber und Dünndarm. In Milz, Gehirn, Magen und Testis ließ sich keine Expression nachweisen. Auffallend war jedoch, daß sowohl im Thymus als auch, nach längerer Exposition, im Herzgewebe, zwei Signale für *mgimap8* sichtbar waren. Dabei handelte es sich um ein 4,2 kB großes Fragment, das in allen Geweben zu detektieren war. Zusätzlich zeigte sich ein mit 2,9 kB deutlich kleineres Fragment, das nur im Thymus und sehr schwach auch in Herz und Haut (nach 24 h) nachgewiesen werden konnte. Die GAPDH-Kontrolle zeigte eine relativ gleichmäßige Verteilung über alle Gewebe.

### 3.2.5 Quantitative Expressionsanalyse von murinen *gimap* Genen

#### 3.2.5.1 Gewinnung von Gesamt-RNA und Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Versuche aus Kapitel 3.2.4.1 beschreiben die Expressionsverteilung von *mgimap8* in verschiedenen Geweben der Maus, geben jedoch keine Auskunft über die quantitative

Expression als Folge einer Malariainfektion. Da beim *mgimap1* Gen eine Induktion durch eine Malariainfektion beobachtet werden konnte (Krücken *et al.*, 1997,1999), wurde Gesamt-RNA aus Mausgewebe gewonnen (Kapitel 2.10.2). Für die Amplifikation der einzelnen Gene wurden genspezifische Primer bestellt und für diese eine möglichst optimale Amplifikation, die ideale 'Annealing'-Temperatur, in einem Temperaturgradienten bestimmt.

Die optimierten Primerbindungs-Temperaturen finden sich in Tabelle 7. Nach der Optimierung der Bindungstemperatur mußte die Zyklenzahl optimiert werden. Da nicht in jeder Phase der PCR ein Produktvergleich möglich ist, galt es die Phase zu finden, bei der ein lineares Verhältnis zwischen Zyklenzahl und Produktmenge besteht (grau dargestellter Bereich in Abbildung 15).

Nur während dieser Phase ist ein Vergleich zweier oder mehrerer PCR-Produkte möglich. Für diese Untersuchungen wurden RT-PCRs mit der zuvor optimierten Temperatur durchgeführt und zwischen Zyklus 15 und 33 alle drei Zyklen eine Probe entnommen. Die Proben wurden auf einem alkalischen Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert (Kapitel 2.10.14).

Für jedes Gen wurden spezifische Sonden über PCRs amplifiziert und in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert. Die Plasmid-DNA wurde im präparativen Maßstab (Kapitel 2.10.8) gewonnen, mit *NcoI* linearisiert und ohne weitere Aufreinigung in der radioaktiven Hybridisierung eingesetzt (Kapitel 2.10.15).

Um Variationen durch die RNA-Qualität der einzelnen Gewebe und durch Effizienzschwankungen der RT-PCR zu minimieren, wurde bei diesen Quantifizierungen *18S* rRNA als interner Standard verwendet. Ribosomale RNA als internen Standard zu verwenden bietet sich an, da diese nur minimale Expressionsschwankungen in den einzelnen Geweben aufweist und somit die Werte der zu detektierenden mRNA auf *18S* rRNA normiert werden können. Damit eine annähernd gleiche Amplifikations-Effizienz zwischen der häufig vorkommenden *18S* rRNA-Spezies und der zu detektierenden, selteneren mRNA-Spezies gewährleistet ist, muß zur quantitativen Analyse der *18S* rRNA ein Kompetitor hinzugefügt werden. Zuvor mußte jedoch für jedes zu quantifizierende Gen das optimale Verhältnis zwischen *18S* rRNA und Kompetitor zusammen mit den genspezifischen Primern (Tabelle 4) ermittelt werden. Dazu wurden die RT-PCRs bei den schon zuvor optimierten Temperaturen mit vier verschiedenen Verhältnissen Kompetitor:*18S* rRNA (1:9, 2:8, 3:7 und 4:6) durchgeführt. Die Proben wurden auf einem Gel aufgetragen, geblottet und hybridisiert. Die ermittelten Verhältnisse sind in Tabelle 7 zu finden.

### 3.2.5.2 Gewebespezifische Induktion von *mgimap* Genen der Maus

Nach diesen Vorversuchen konnte mit der eigentlichen Quantifizierung begonnen werden. Es wurde die gewebespezifische Induktion von *mgimap1*, *mgimap6* und *mgimap8* durch eine Malariainfektion untersucht. Dazu wurden jeweils 250 ng Gesamt-RNA der verschiedenen Gewebe und verschiedenen Infektionszustände in semiquantitativen RT-PCRs analysiert (Kapitel 2.10.19). Die RT-PCR-Produkte für jedes Gen wurden dabei auf alkalische Agarose-Gelen aufgetrennt und mit geeigneten Sonden hybridisiert (Kapitel 2.10.14).

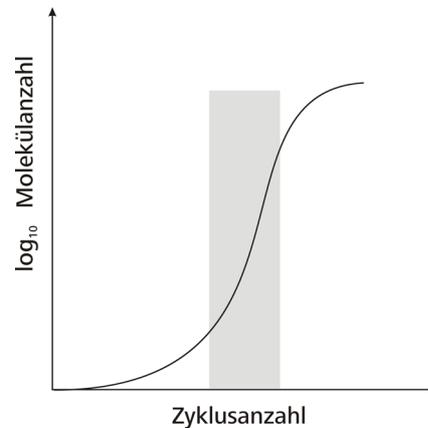


Abbildung 15 : Schematischer Verlauf einer PCR-Reaktion. Das Schaubild zeigt grob schematisch die Akkumulierung an PCR-Produkt in Abhängigkeit von der Zykluszahl. Nur während der grau unterlegten Phase besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Zykluszahl und Produktmenge und ermöglicht die Quantifizierung.

Abbildung 16 :  
 semiquantitative  
 'Southern-Analyse'  
 verschiedener *mgimap*  
 Gene. RNAs aus  
 unterschiedlichen  
 Gewebe wurden in  
 Multiplex-RT-PCRs  
 amplifiziert, auf  
 alkalischen  
 Agarosegelen  
 aufgetrennt und  
 gebloftet. Die PCR-  
 Fragmente wurden  
 radioaktiv detektiert.

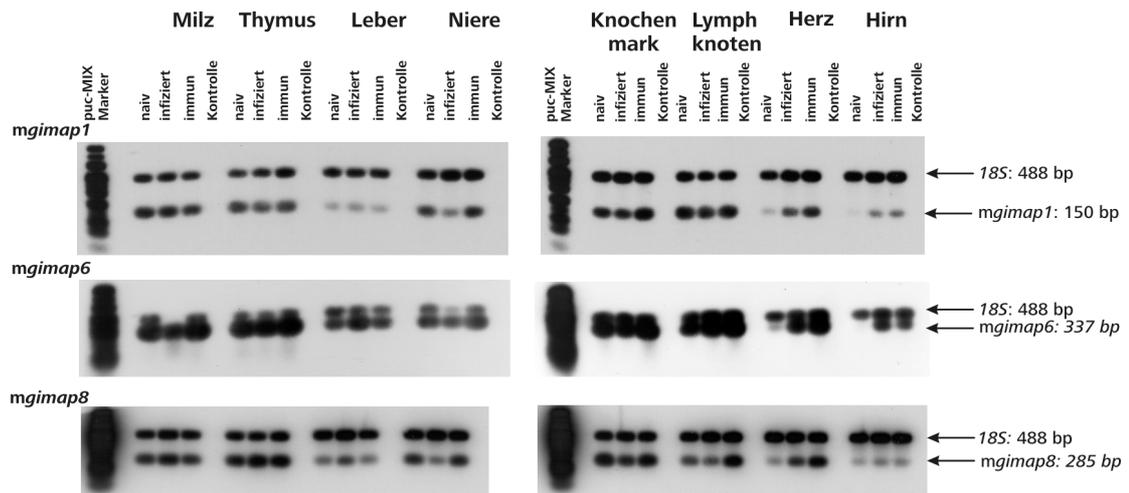


Abbildung 16 zeigt eine Auswahl der Ergebnisse der radioaktiven Hybridisierungen. Es wurde die Expression von drei *mgimap* Genen in acht verschiedenen Geweben zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion mit *Plasmodium chabaudi* untersucht. Dabei bezeichnet 'naiv' den Tag 0, 'infiziert' den Tag 7 und 'immun' den Tag 35 nach Infektion. Die Größe der Banden ist durch Pfeile markiert. Um eine ausreichende Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen, wurden alle Reaktionen mehrmals, unabhängig voneinander durchgeführt. Die Filme wurden eingescannt und densitometrisch ausgewertet (Kapitel 2.10.16). Dabei wurden die Werte für das jeweilige Gen und die 18S rRNA getrennt aufgeführt. Alle genspezifischen Daten wurden zunächst auf 18S rRNA abgeglichen und später diese Werte auf die Expressionsrate der naiven Milz normiert. Die in Abbildung 16 dargestellten Blots zeigten für *mgimap1* eine für einige Gewebe unterschiedliche Expression, während die Expression der 18S-Kontrolle, wie erwartet, nahezu konstant blieb. In Milz, Thymus, Knochenmark und Lymphknoten liegen zu allen drei Zeitpunkten nahezu identische Mengen *mgimap1* vor, während sich in der Leber eine sehr schwache Expression nachweisen lässt, die unabhängig vom Infektionszustand ist. In Niere, Herz und Hirn dagegen lassen sich, je nach Infektionsstatus, leichte Schwankungen in der Genexpression feststellen.

Von Knochenmark und Lymphknoten einmal abgesehen, zeigt *mgimap6* Schwankungen der Genexpression in den anderen Geweben. Während in Herz und Hirn von naiven zu immunen Tieren eine Induktion zu beobachten ist, findet in der Niere eine Herabsetzung des Expressionsniveaus in infiziertem Gewebe statt. In immunem Gewebe ist die Expression wieder gleich hoch wie in naivem Gewebe. Auffällig ist, daß in dem dargestellten Blot kein Signal für 18S in der infizierten Milz zu detektieren ist. Das ist in diesem Fall auf den hier dargestellten Blot beschränkt. Bei Wiederholungen des Versuches konnte ein 18S-Signal in Milzgewebe infizierter Mäuse detektiert werden. Das gleiche gilt für die Expression von *mgimap6* im Hirngewebe naiver Tiere.

Die Analyse von *mgimap8* zeigt eine besonders gleichmäßige Expression der 18S rRNA über alle Gewebe. Das Expressionsniveau von *mgimap8* schwankt nur in Niere, Lymphknoten und Herz, während sich für die anderen Gewebe sehr geringe infektionsbedingte Schwankungen auf mRNA-Niveau ergeben.

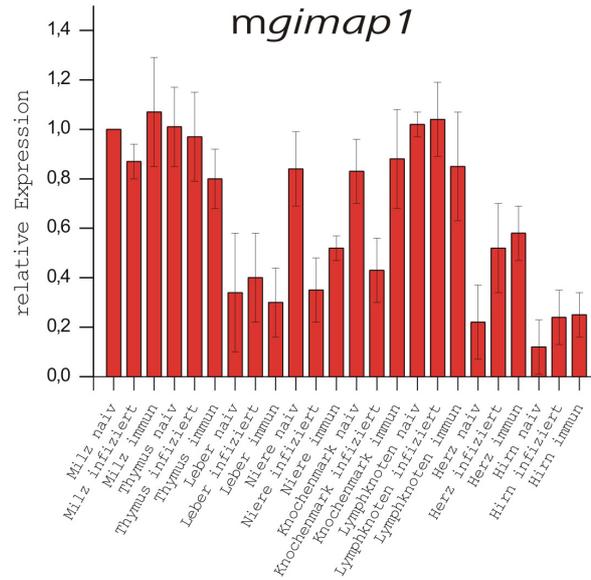
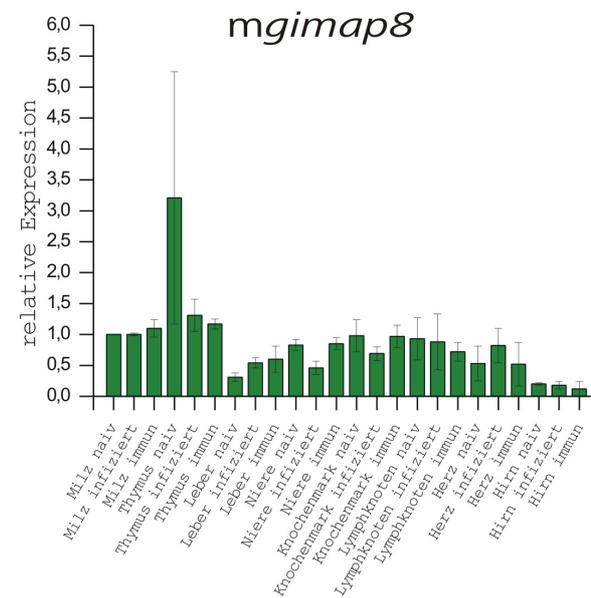
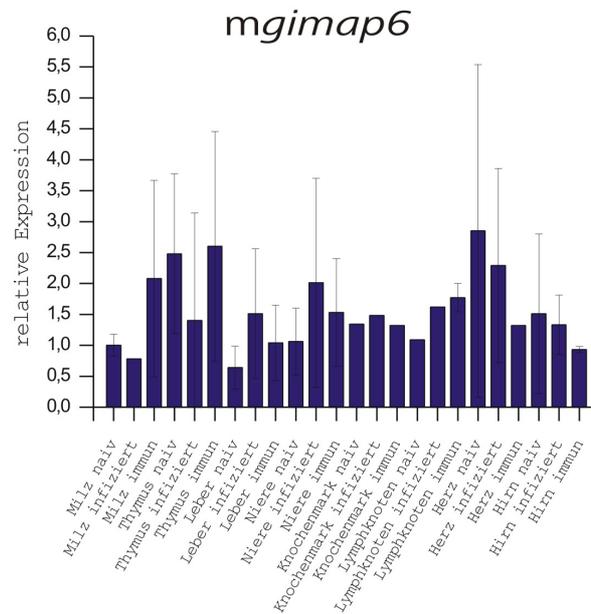


Abbildung 17 :  
Graphische Auswertung  
aller semiquantitativer  
RT-PCRs vom *mgimap*  
Genen.  
Die Werte wurden auf  
18S rRNA und naives  
Milzgewebe normiert.  
Die Expressionsmuster  
sind nach Gewebe und  
Infektionszustand  
gegliedert.



Eine detaillierte graphische Auswertung aller semiquantitativer RT-PCRs ist in Abbildung 17 aufgeführt. Alle Werte sind auf 18S rRNA sowie naives Milzgewebe normiert. Die dargestellten Werte lassen sich nicht direkt mit den Ergebnissen aus Abbildung 16 vergleichen, da diese für jedes Gen nur beispielhaft einen 'Blot' zeigt, während die in Abbildung 17 aufgeführten Werte sich auf alle durchgeführten 'Southern Blots' beziehen und außerdem die Expression auf 18S RNA und die naive Milz normiert wurde. Die Expressionsniveaus für *mgimap1* und *mgimap8* unterliegen in den untersuchten Geweben geringen Schwankungen. *mgimap1* (rot markiert) ist in allen Geweben detektierbar, doch zeigen die Werte nur geringe Veränderungen infolge einer Malariainfektion. Eine deutliche Induktion, wie von Krücken *et al.* (1997,1999) beschrieben, findet sich in keinem der untersuchten Gewebe. Die Expression ist in lymphoiden Geweben generell stärker als in den übrigen Geweben, bewegt sich aber im Bereich der mRNA-Mengen in der Milz. Vergleicht man die Expressionslevel von *mgimap1* in den anderen Geweben, so weisen die ermittelten Werte eher auf eine Supremierung der *mgimap1*-Expression durch eine Malariainfektion hin. Am stärksten sichtbar wird diese Tatsache in der Niere, wo sich deutliche Unterschiede zwischen naivem und infiziertem Zustand erkennen lassen.

Das *mgimap8* Gen (grün markiert) zeigt, vom Thymus einmal abgesehen, eine ähnliche Expressionsverteilung wie *mgimap1*. Im Thymus (vergleiche auch Abbildung 14) zeigt sich eine deutliche Supremierung der Expression von *mgimap8* in infizierten und immunen gegenüber naiven Mäusen. Die mRNA-Mengen von *mgimap8* in den übrigen Geweben liegen unter denen der Milz und unterliegen nur äußerst geringen Schwankungen aufgrund einer Malariainfektion. Die Expression von *mgimap8* in Herz und Hirn ist äußerst gering im Vergleich zur Milz.

Das untersuchte *mgimap6* Gen (blau) zeigt erheblich größere Schwankungen auf Transkriptionsniveau als die zuvor beschriebenen, allerdings ist auch die Schwankungsbreite der Messwerte erheblich höher. Für dieses Gen gilt ähnliches, was schon für *mgimap1* und *mgimap8* entdeckt werden konnte: die Expression findet vermehrt in lymphoiden Geweben statt. In der Milz immuner Mäuse wird *mgimap6* doppelt so stark exprimiert wie in naiven Tieren. Im Thymus, der schon im naiven Zustand höhere Expressionslevel von *mgimap6* zeigt, besteht während des Infektionsverlaufs eine ähnliche Tendenz, allerdings weisen die Werte eine wesentlich höhere Standardabweichung auf. In Knochenmark und Lymphknoten lassen sich leichte Induktionen von *mgimap6* durch eine Malariainfektion detektieren. Die Höhe der Expression liegt in etwa auf Milzniveau.

### 3.2.6 Heterologe Expression von *mgimap8* in CHO-KI-Zellen

In der cDNA-Sequenz von *mgimap8* (Abbildung 10) konnten im Gegensatz zu *mgimap5*, *mgimap7* und *mgimap9* (Abbildung 13) am N- oder C-Terminus keine Lokalisationssignale gefunden werden. Daher sollte ein heterologes Expressionssystem Klarheit über die Lokalisation des mGIMAP8 Proteins bringen.

Dazu wurde die kodierende Region des *mgimap8* Gens (Abbildung 10) in das pcDNA3.1V5/His TOPO Expressionsplasmid kloniert (Kapitel 3.1). An den C-Terminus des Proteins wurde ein V5-Epitop und ein Poly-Histidin-Tag für eine Detektion angehängt. Das Fusionsprotein vergrößert sich dadurch um ca. 5 kDa, so daß das in der Zelle detektierte Protein eine Gesamt-Masse von 81,8 kDa hat.

Ein heterologes und gut charakterisiertes System für die Studie von Lokalisationen bietet die transiente Transfektion und Expression in CHO-KI-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert und die Expression des mGIMAP8 Proteins mittels spezieller Antikörper (Kapitel 2.11.7) sichtbar gemacht.

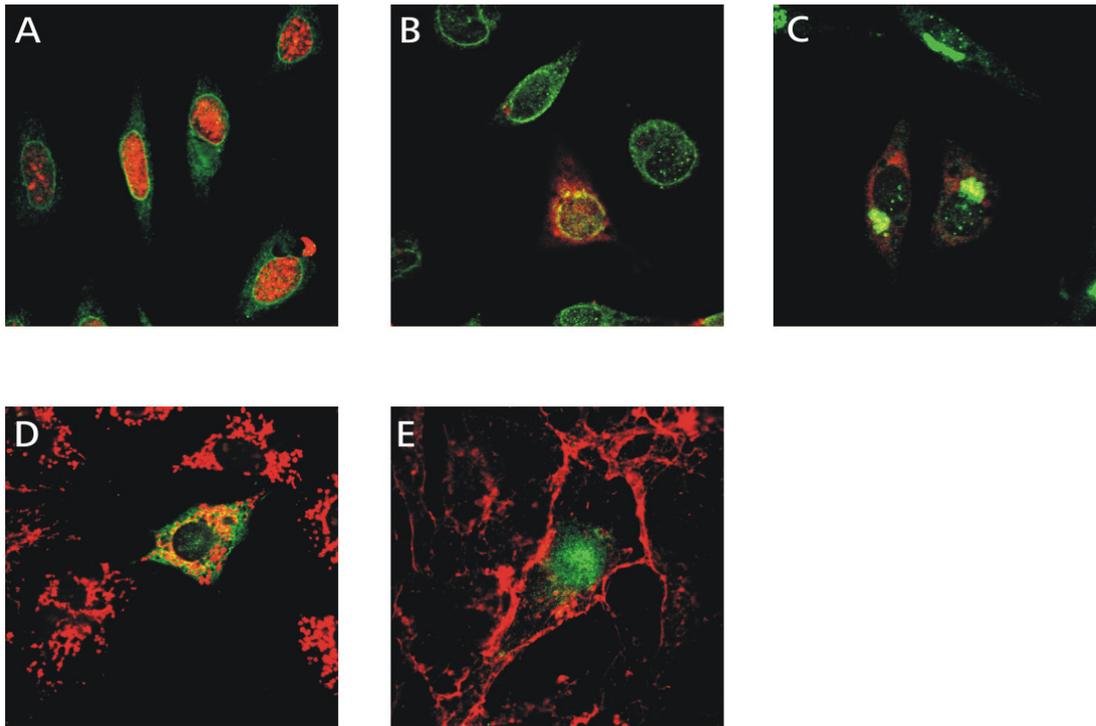


Abbildung 18 : Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP8 in CHO-K1-Zellen. CHO-K1-Zellen wurden transient mit dem *mgimap8*-pcDNA3.1/V5His TOPO Plasmid transfiziert und die Expression mittels Antikörperfärbung nachgewiesen.  
**A)** Propidiumjodidfärbung des Zellkerns (rot) und mGIMAP8 (grün)  
**B)** Färbung von ER (grün) und mGIMAP8 (rot)  
**C)** Färbung von Golgi (grün) und mGIMAP8 (rot)  
**D)** Färbung der Mitochondrien (rot) und mGIMAP8 (grün)  
**E)** Färbung der Zellmembran (rot) und mGIMAP8 (grün)

Abbildung 18 zeigt die Expression von mGIMAP8 in CHO-K1 Zellen und die Kolokalisation des Proteins mit verschiedenen Zellkompartimenten (Kapitel 2.11.7). Abbildung 18 A zeigt die Färbung des Zellkerns mit Propidiumjodid. mGIMAP8 ist dabei nicht kernlokalisiert, sondern bildet einen schmalen Saum um den Kern und ist z.T. fein im Cytoplasma verteilt. Die Färbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Abbildung 18B) zeigt, daß mGIMAP8 (rot) am ER (grün) exprimiert wird, während sich am Golgi-Apparat (Abbildung 18C) oder in den Mitochondrien (Abbildung 18D) keine Expression detektieren ließ. Eine Färbung der Zellmembran mit ConA-Rhodamin (Abbildung 18E) zeigt, daß mGIMAP8 auch nicht an der Zellmembran assoziiert ist, sondern sich auf den inneren Bereich der Zelle konzentriert (Abbildung 18E).

### 3.3 Die Struktur von *mgimap10* - eine Variante von *mgimap8*?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von *mgimap10*. TBLAST-Analysen, die im Zusammenhang mit der Untersuchung von *mgimap1* durchgeführt wurden, führten zur Identifizierung der in Abbildung 19 dargestellten *mgimap10*-Sequenz. Mit den aus dieser Sequenz erstellten Primern *imap9-up-71* und *imap9-lo-616* (Tabelle 4) konnte ein vorläufiges Fragment amplifiziert werden (Abbildung 5). Das amplifizierte Fragment diente später in 'Northern-Analysen' als Sonde. Dazu wurde Gesamt-RNA aus der Milz naiver, infizierter und immuner C57BL/6 Mäuse, wie in Kapitel 2.10.5 bis Kapitel 2.10.7 beschrieben, aufgetrennt, geblottet und hybridisiert. Ein Transkript von *mgimap10* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Das *mgimap10* Gen liegt zusammen mit den übrigen *mgimap* Genen auf Chromosom 6B der Maus zwischen *mgimap8* und *mgimap7* (Abbildung 8). Es enthält analog den anderen *mgimap* Genen ein Sequenzmotiv, dessen translatierte Sequenz Ähnlichkeit zu einer AIG1-Domäne besitzt, die aber, wie auch bei *mgimap3* und *mgimap6* eine andere Orientierung gegen über den übrigen *mgimap* Genen hat. Die vollständige Sequenz aus GenBank™ ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Start-Codons sind grün, die Stop-Codons sind rot unterlegt. Es wurden alle drei Leseraster auf mögliche kodierende Proteine untersucht, doch ergaben sich nur sehr kleine Peptidfragmente von wenigen

Abbildung 19 :  
DNA- und translatierte  
Sequenz von *mgimap10*  
Die DNA-Sequenz und  
alle drei Leseraster sind  
dargestellt. Die Start-  
Codons sind grün  
markiert, während die  
Stop-Codons rot  
eingefärbt sind.

```

1   CAGCTGAAGT TCATCCTGGT GGGCAGCACC TGGACAGGCA AGAGTGCCAC TGGCAACAGC ATCCTGGGCC AGAAGTGCTT
81  CCTCTCCAGG CAGAAAGCTA TGCCAGTCAC CAGAACCTGC GCCAGAACCT AGAAGGTGGG CCAGCTGGCA CGTGGAGGTG
      m p v t r t c a r t - k v g q l a r g g
161 GTGAAACACAC TGACATCCTC AGCTCTGAGG CCTCCCTGCC CGCTGCTTCG TGCTCAGTGC CCAGGGCACA CATGCTATTG
      g e h t d i l s s e a s l p a a s c s v p r a h m l l
241 CTGGTCACCC AGTTGTGTGC CTTCACCAAG TAGGAGCTCC AAGCACTGGC CATGGTGAAG AGGTGTTGGG GAGCGGGCAA
      l v t q l c r f t t - e l q a l a m v k r c w g a g
321 TGGCGTAATG GTGTACATGT GCAAGAAGGG AATTACCTGG ATGGCGATTI CCGCTGTATT TCGTGCATTG CAGGGACAAC
      n g v m v y m c k k g i t w m a i s a v f r a l q g q
401 AGTGCACCTGA GGGAGCTGGT AGCCGAGTGT GGGATTGAGT GTGCACTCTG GACAACCCCTG TCACAGGCAG TGAGCACGGG
      q c t e g a g s r v w d - v c t l d n p v t g s e h g
481 GCACGGGATG AGCAATTACT GGGCCTACTC CCAAGCCTTG TGAGGGAGTT CAGCAGGGTT GGGGTGGGAA ACTTACTACT
      a r d e q l l g l l p s l v r e f s r v g v g n l l
      m s n y w a y s q a l -
561 CCAACGACGT GTATGAGTTG GTGCAGAACC AACTCACCAA GATGGCAGAG ATGATAGAGG CATGCATGCA GAGGCCACTG
      l q r r v - v g a e p t h q d g r d d r g m h a e a t
      m a e m i e a c m q r p l
      m s w c r t n s p r w q r - -
641 GCACCAGGCT GCTAGCCAA GTTGTGGGAG TGGCAGAAAC CCCTAGGACC TCTCTGAAAT TAGGTGTGGC TTTCCTGCTA
      g t r l l a q v v g v a e t p r t s l k l g v a f l l
      a p g c -
721 GGGTCTCCC TGCTGTTCTA GTCCCTGCCC TAC
      g s s l l f -

```

Aminosäuren, aber kein größeres Protein. Vergleicht man die in *Abbildung 19* dargestellte Sequenz von *mgimap10* mit der GenBank™ mittels eines BLASTn, so erhält man mehrere Treffer. Der erste Treffer, mit der größten Übereinstimmung ist in der Datenbank unter der Nummer XM\_144696.2 hinterlegt und entspricht dem zuvor beschriebenen kodierenden Region des *mgimap8* Gens (*Abbildung 10*), nur daß im 3'-UTR-Bereich ein Teil der Sequenz von *mgimap10* hinzugefügt wurde (vergleiche auch Kapitel 3.2.2).

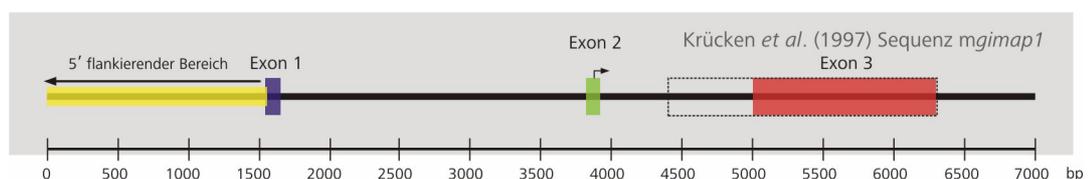
Phylogenetische Analysen konnten auf Nukleinsäureebene Gemeinsamkeiten mit *mgimap1* aufzeigen. Beide Nukleinsäuresequenzen ließen sich auf eine gemeinsame Vorläufersequenz zurückführen (*Abbildung 12*).

### 3.4 Analyse der Sequenzregion vor dem *mgimap1* Gen

#### 3.4.1 Genomische Organisation von *mgimap1*

In der Datenbank werden, neben der von Krücken *et al.* (1999) publizierten Sequenz, aktuell zwei verschiedene mRNA-Varianten von *mgimap1* mit 1524 bzw. 1518 bp Länge verzeichnet (Tabelle 3), die sich lediglich im 5'-UTR-Bereich voneinander unterscheiden. Die Unterschiede gegenüber dem von Krücken *et al.* (1997) publiziertem 1900 bp Fragment liegen vor allem im 5'-UTR-Bereich. Der 5'-Bereich des von Krücken *et al.* (1997) beschriebenen Gens ist deutlich größer und hat sich im Laufe der Sequenzierung des Mausgenoms als Intron herausgestellt. In GenBank™ finden sich, neben der von Krücken *et al.* (1997, 1999) publizierten, die 1518 bp und 1524 bp großen cDNAs. Beide *mgimap1*-Varianten unterscheiden sich in einem kleinen Bereich im 5'-Bereich von Exon 2. Der genaue Transkriptionsstart ist bisher nicht untersucht worden.

Abbildung 20 :  
genomische Organisation  
des *mgimap1* Gens  
(NM\_008376). Die Exons  
sind farbig markiert. Der  
untersuchte 5'-  
flankierende Bereich  
schließt sich in  
Pfeilrichtung an das erste  
Exon an. Der gestrichelte  
Bereich kennzeichnet die  
Lage der von Krücken *et al.*, (1999) publizierten  
Sequenz. Der  
Translationsstart liegt im  
zweiten Exon und ist mit  
einem Pfeil  
gekennzeichnet.



Auf genomischer Ebene setzt sich *mgimap1* (NM\_008376) aus drei Exons zusammen. Das erste Exon besteht aus 109 bp und ist 2162 bp vom zweiten Exon entfernt, das eine Länge von 100 bp hat. Nach 1080 bp folgt das dritte und letzte Exon mit einer Länge von 1297 bp. Der Translationsstart liegt im zweiten Exon. In einer früheren Publikation konnte für das *mgimap1* Gen eine starke Regulierung in der Milz beobachtet werden (Krücken *et al.*, 1999). Auch wenn sich diese 50-fache Induktion von *mgimap1* in neueren Versuchen nicht reproduzieren ließ, zeigte sich in den durchgeführten RT-PCR-Analysen (Kapitel 3.2.5), daß *mgimap1* zumindest in lymphoiden Geweben einer geringen Regulation infolge einer Malariainfektion unterliegt (Abbildung 17). Zudem weißt *mgimap1* eine stark gewebespezifische Expression auf.

### 3.4.2 Analyse einer putativen 5'-flankierenden Sequenzregion von *mgimap1*

In eukaryotischen Genomen ist es durchaus nicht ungewöhnlich, daß auch Sequenzen bis zu 50000 bp vor dem Transkriptionsstart, als spezifische Bindungsstellen für genregulierende Elemente dienen können (Adhya, 1989; Serfling *et al.*, 1985). Der in dieser Arbeit untersuchte 5'-flankierende Bereich (AC: NM\_000250) umfaßt einen weit stromaufwärts gelegenen Bereich vor dem ersten Exon von *mgimap1* (Abbildung 20). Die Zahlenangaben beziehen sich auf die erste Base des ersten Exons im 5'-UTR-Bereich des *mgimap1* Gens (NM\_008376). Mit Hilfe des Programms TESS (Schug und Overton, 1997) konnten in der TRANSFAC-Datenbank putative Bindungsstellen von regulierenden Elementen identifiziert werden. Die Faktoren, die für eine Induktion des Gens in verschiedenen Geweben der Maus verantwortlich sind, werden in Abbildung 21 aufgeführt.

```

- 5485 TAGGGGATTTTTCGGAGGGGAAACTAGGAAAAGGGGATTAACATTTGAAATGTAAATAAAGA
- 5425 AAATATCTAATAAAAAAGGAAACAATAAATCAAATAAAGAGGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAA
      GATA-3                               PU.1
- 5365 AAAGAAAAATGTCAGGATCCATCTGCCTGAACCCTGATCCAAGTCTCACAATGTGACTT
- 5305 TCATCTGTAGGTCTTGCTACTCTTTGCTTCTTTGACAATCTGAGAGCTTCTTGCTGCCA
- 5245 CTTGCCTTGGGGGATAACCACAGAGAGAGCTCAACAGCTAAGAGCACTTGATGCTCTGAGC
- 5185 TACCAAATGGTAACATAATGAGCTAAACCTCTGGCAAATGGTTCCTTTACCAACTCACC
- 5125 TCCATCTTGTTTAGTAAGAAATACTGATGTCATACTAAGGACACCCACTATTAACATTCCT
- 5065 CCTAGATATTATCTATAATAAGCTAACAGAAGAATCTAGAAGTTTGTFTTTCGAAGTTCAA
      GATA-1
- 5005 AATCACCAGATGAGCTGCTCATCATTTGAGCCTAACAGGTGTACCTCTATCAATCCACAG
- 4945 CAAAGTATCTACCAGCAAAACAAAGACGTTGGCAGTAAATGTGTAAGATGGACATCAATA
- 4885 AATAGGCATTGTTCTTTAACTTATTAATAATGATTGAGCTACATCTACATTAAGTAACTTG
- 4825 TATGAAAATAGCAAGGAAAAATTACCTATTATATTCATAAATATAGCCTGGTGAATGAA
      NF-ATc
- 4765 GATTTGAGAAAAGCTAACATTAGTAAGGTGGTAATCAAATGTATTTGCTAATGTTTCTAT
- 4705 TGTAATCTGCGTAATCCTTACGCAACTTATAAGTGCAGGTATCAATTGTTTGCCTGATTCT
- 4645 CCATGAAGAAGTCAACTTAGACAACCTGAGTCACCTGTTTATCCATTATAAGTCATTCCTAA
- 4585 AACCTGAGGACATTAATAAATTTAATACTACTCATAGTTTATGTTGGGAACTCAGACAAA
- 4525 GCCCAGTGGGTACAACCTGAGCTCCGATGGGCCTCAGCAGGAGTGGCTCGAATGACTGGAT
- 4465 ACCAGAGAATTAATAAAGGGGACACACCTGAGCTTCTTGCTGTCACCTGTTGCTCAGTCC
- 4405 TCTGAGGTGCACCTGTGGAGGCAGGAGTGGGACTTCCACACCTTCCCAACCATTTCCCC
      Ik-1

```

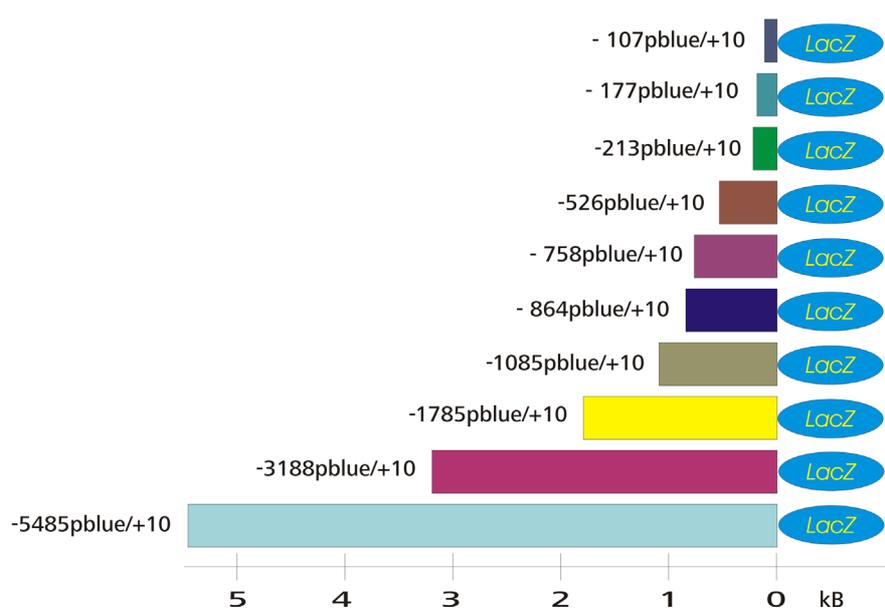
Abbildung 21 :  
Untersuchte  
Promotorregion vor  
dem Transkriptionsstart  
von *mgimap1* mit  
putativen  
Bindungsstellen von  
Transkriptionsfaktoren  
Die aufgeführte  
Sequenz wurde mit  
Hilfe der TRANSFAC-  
Datenbank auf putative  
Bindungsstellen von  
Transkriptionsfaktoren  
untersucht. Die  
Erkennungssequenzen  
sind unterstrichen. Die  
Zahlen geben den  
Abstand von der ersten  
Base des ersten Exons  
an (Abbildung 20). Die  
fett markierten Basen  
kennzeichnen den  
Beginn des ersten  
Exons.

- 4345 CGGGTGAATGTGCTCCCCAGCTCTACCAGAGTCTATAAAAGTCAGAGGAGTCTAAAGGTAG  
AP-2alphaA
- 4285 TGCTGGTCAGCTCTGTTTATTGAGAAAATAACAGGGGAAGGCAATTCTATGTGA
- 4225 GACTCCAAGTTCACAGATGTGGAAAGGCCTCATTATAATAGTCCATTTTATTGTTACAGC
- 4165 AGCTCGGCCATGTCCACTCACCGAAGCAACAGCTCTGAATATGTTCAAAGAGCACTTAAA
- 4105 GAAGCATTCCAATCCATGTGCCTTTGAGGAACTGTCAGTAAACTCTGCACATAGAGCCCT  
PU.1
- 4045 TGATGGGGCTCTGGCCCACTCATATCTTATCAAACCTTCTCCATTCCCAAAACACTGT  
PU.1 Ik-1
- 3985 TGTTCAAAGCAGAGGTCTCCCTTGTTCTGAATAGAACACATCTAATGTAAAGCTACATAG  
TFIID
- 3925 CAAAATGCCAGATTGAAAAGACCTACATCATAATCTTAAGGAAGGAAGCCATTGTTGTAT
- 3865 CCTTGGCTTTTTTGCAAAGCCCAGTAATTCATCCAAACACCTCTAAAGGGCTCTCAAGC
- 3805 AACTCTAACACATATCCAGAGTCTCTATTAAGTATAATATTAAGATAAAAGTTAAATGT  
GATA-1
- 3745 CAATCTAACAGTTTACCACCTAACCTTTCATTAGATGGACACTAAATTTGTAAGTAGGTAAT
- 3685 GTCATGAGTGCCTTCCATCTTTCTACTACGTCTCTGTGAACATTCAGAAAAATAGATTCA  
TFIID
- 3625 AAAGCTGGGCGTGATGGCGCACGCCTTTAATCCCAGCACTTGAGCACTTGGGAAGCAGAG
- 3565 GCAGGCAGATTTCTGAGTTCGAAGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCA
- 3505 AGGCTATACAGAGAAACCTGTCTCGAAAAACAAAGACAAAAACAAAAACAAAA
- 3445 AAAAAGAGAGAGAGAGAAAAGAAAATAAATTCATCACAAGAGTGGGTTTATATGACGATG
- 3385 GCATCACATTAATTCACCAATGAAGAGTTTTTATGCATGAGCAGTTAGCATACATGTATA
- 3325 CATGTATGTATGCATACCACATGCATGCCTGGTACCCTTGGAGGCCAGAAGAGGGCACTG
- 3265 GATCCCCTGGAATTGGAGTTGTGAATTGATGGGGTCTGAGCCATCATGTGGGTGCTGGG  
IK-1
- 3205 AATTGAACCCAGCTCTTCTGCAAGAATAGCAAGTGCTCTGAATTGATGGGCCATCACTCC
- 3145 AGCTCCTAATCCACAACCTTTAAAAAGGACCACTTAAAGATTCATTTATCTACACTTTAGCG
- 3085 TGCATTTAAAAAGAGGTTTTGGGGTGAGAAGGAGGGGGTGTCTGTGGAGTATGAGGGGGACA  
PU.1 SP-1
- 3025 CATTGGAGCTTGACATGGCACTATACAGTCCATGATTTGATCCAAGGAAGTGGCCACTGC
- 2965 CTTTATATCCCGCACTTGACCCTCCAGAAAAAGACAGAGACTTACACTTGACACCACAGA
- 2905 TGGGAACTCACAGGAGACACATCTCTGTGCTGTGTGTGCTGACAGCACCCACCTCCCAG
- 2845 GAATGTCACCTCTGGTCTCACAATTCGCTTGGAGGAGACTTGACTTTGCCCTTGTCTGCTC
- 2785 TGTGGAATTTTACAGCCAGCTACATGCTGTCCCATGTGTTCTTAGGAAACCATTTTAC
- 2725 TTCCAGTGTGAAAAGGGGAATTCTCAGGATTTGAAAACAACTTAGTGGACATGAGCTC
- 2665 GGGACGGTATCTTTTTCAGAAAAGAGCAGGGGGATGACTATGTTTCGTTTCGCATCATCCTC
- 2605 CTGATCACAGGATGAGGAACTGTCTTTGCGGAGTGTACAGCCACCAGGCTTCTGTGGAAT  
PU.1
- 2545 GATGTGGGGAAGTTTTGATTGTAAGCAATTTATAGCAAACGATCTAGTTATGAGAGTTTG
- 2485 GGTGTTTGTATCCAGGTTAAATTTCCGCTTCACTCATAATCATTGCAAAGAGTCGACGAC
- 2425 TTCTGACAAAGCACAGCAGGGAAATTAAGCTTGCAAGAGGCCACTGTAAAACCTTGCCAGG
- 2365 ACCACACTTCTCCACTACAGCTGGGGATTTTACAAAAATATTAATCCATTTGCATTTTC
- 2305 TGCTCTGCAGTTTTACACATCTTTATCTGTGCTCTTTCCCTCACAAAACCATAGAATTC  
CAC-binding-protein
- 2245 TGTATCATCTTGCTAAAAAGTATGCCTTAGCCAAGCCTGGGGATTCAGACCTGTAATACC  
AP-1
- 2185 AGCTACCTGGGGAGGCTGAGGCAGGAAGACGGCAAGTTC AAGGCATGCCTCAGCTACAGA  
PU.1
- 2125 GCAAAATTC AAGGCTAGCTTAGATAACTTAGTGAGACATTTGCTTTAAAATAAGAGGCAAA  
GATA-1
- 2065 CAGAGGGCCAGAGATAAAACCTTGTATGCCACAGTACACCCATGTGCTAGGAACAGGGCTCC  
GATA-1
- 2005 ATCCTCAGTACTGAAAAATAAAGAGGAGAAAGAAAAATAAATACCATGACTACAGGTATGAT  
PU.1
- 1945 AGCTACAGGCCACATGGATGCAATATTCAATCATATGAACTTAAATATACAGCTTAGTCT
- 1885 CCCCATCACTCCAACCACAATGCAAAGTTCATAGCCTTGGGAGCCCTGGGAACATTTGCT  
AP-2alphaA
- 1825 GTCATCACAGAATCTTTGATTAAGCAGAAGCACTTTGCAAACAAGGGCTATGCAAGAAAC  
GATA-4
- 1765 CACAAAGAGTTGTCAACGATTTCTTAATATGTCTGTGGTCTGAAGCATTTCCCACAATTT  
core-binding-factor Ik-1

- 1705 CTTCAAACCTGCAAGAGTAAAATGAATTATTGTGCATCCAGATATTTGCAGTAAGCCCTGC  
GATA-3
- 1645 TCGTTCATGTTAGCTGGAGCCTGTTCCCTTCTTCCTCACTTTGGTCCTGTATCTGGTGACT  
PU.1
- 1585 TCTATGGTCCACACGTGTGGTGGTAAGTAGGGCAGTGGGGAGATGTTCCCTTCTAAGGTTGG  
NP-III AP-2alphaA
- 1525 TGTTCGCAAAGGCAAGAGTGGAGAGGGTAGGCTAAGAAGAAGCTTTCTTGAGGAGATTCCC  
NF-κB
- 1465 ACCCTCTCTAGTGAGGATTGAACCTAGGGCTTCCCACATGTTGTATCCTCAGGCCCACTT  
Ik-1
- 1405 TCAGTTATTTTGA AACAGAGCCTTAACTTACGATCCTCCTGCCTCCATCTCCCTAGAGT
- 1345 TGGACATGCCCTGCCTTTGGGGGACATATGTAAAACCATATTGACACATCTCTTCAAATGG
- 1285 CTCAGATAATGAAGCAAGAGAGATTCTATCAGCATGCCAACATGCAGCAGCAGCACAGCC  
GATA-1
- 1225 TCTCCCTCCAGCTGACCAGGAGTGCAGCCAACCTGGCAGTACCCACTGTCTGACTATCACC
- 1165 CTTGCCCGGAGGTTGGCATCTGCTGAAGAGCGATGCCTCTAGGTTAAGTGTCTTCTCCAG
- 1105 TGGAAGTTTACATCCAATAACTGGCTGATAGA ACTGTGAAATGCAGTCTCGTCACTTCC  
GATA-1
- 1045 ATCTCAAGGTCTACGCAAACCTGTAGAATTCCCTGTGGAGTCAGCATTGTTGTGACTGAC  
AP-1
- 985 TCAATCTTATCCTTATCCAATACCGTCTTCTTTCCCTCCTCTCTCAGGTGTAAATCCCAA  
MyoD AP-1 IK-1
- 925 GGCTACTCCCTCATAGCTTCTTTTCCAGCACCAGATATCTCCACCTCAATAGTCCATATGCC  
GATA-3
- 865 TTGGAACCCAACCCTTTTACACAGACACACATACACATGTGCGTGCAAGTATACAAACAC
- 805 TTACATAAAATATACTTACATAGAAACATAGTTTACAATATTAATAGATCAAAAGAAAAAT
- 745 CATGCAATTACTTCAACCATTTAAAAGACATTTTAAAGTAACTCACATTTCCAATCAAAG
- 685 CCTTTATTTAGTAAAATAGGAATGAACAAAATATGCATGCACTAATTTAAAGATTAATCA
- 625 CTAATAGCCAATATCAGTCTTAGTGATATTAGATATTCTATTCTTTGTAAATTTTCTTT  
GATA-3
- 585 TTTGTTTTCTTTGGTACTGGATAGACCCTAGGACTTTGTATATGCTAGGCAAATGATTCT  
GATA-3
- 505 AGGCAAATGCTCTATCAATAAGCTAAACCCTGAGCCTTTGGTGTGTTGTTTTGTTTGAAG  
TFIID
- 445 TGGGGTCTTAAAAGATTAGTAGCCTAGAATGGGCTTCAATTTGTCATCCTCCAATCTC
- 385 AATTGGAGGCTATTTTGTAGTAAGAGAAATCCTTAAAGAGAAAAATGGAAACAAAATAA
- 325 TAAAAATAAAACAACAACAACAACAACAACCACCACCACCACCACCACAAA
- 265 CACACACACACACACACACACACACACCGGAAGATTACCTGTAGCCAATTCTAGAATAGAG
- 205 TCAGCCAAGGAAGGCTCTGTTGACATGTTTGATTCTACTAACCTTCTGGACAAACAGCC
- 145 TTTAGTCAAGAGAAGATAGAGTGCCTGATTTCATAGAGGAATGCTAAGACCACA ACTAC  
AP-1 PU.1 PU.1
- 85 ATGGAAAATGTTTCTGTCTCTTTAAGCCATCATCATCCGGCCTTTCTCTCAGTTTCTGA  
NF-Atp GKLF
- 25 TCTCTAAGACCCAGGCAGCCTAGCGACTTCCTCTA  
myogenin PU.1

Der in Abbildung 21 dargestellte Bereich wurde in 10 Deletionsklone unterteilt, die vom 5'-Ende zum 3'-Ende verkürzt wurden. Die Sequenzfragmente wurden mit den in Tabelle 10 aufgeführten Primern amplifiziert (Kapitel 2.11.9.1) und auf mögliche regulierende Abschnitte hin untersucht. Die so erhaltenen Teilstücke der möglichen Promotorregion wurden in ein  $\beta$ -Galaktosidase-Reportersystem (pblue TOPO, Invitrogen, Leiden) kloniert (Abbildung 22) und diese DNA-Abschnitte in verschiedenen Zelllinien auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription überprüft.

Abbildung 22 :  
Aufbau der *mgimap1*-  
Promotorkonstrukte.  
Die Zahlen an den  
Fragmenten geben den  
Sequenzbereich in  
Abbildung 21 wieder.



Der pblue TOPO-Vektor ist ein Reportergensystem für Expressionsanalysen in Säugerzellen. Er enthält das Gen für eine modifizierte  $\beta$ -Galaktosidase aus *E.coli*, die neben dem natürlichen Substrat Laktose, auch synthetische Analoga wie z.B. o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid (OPNG) umsetzen kann. Das für diesen Versuch eingesetzte chemilumineszente Substrat (1,2, dioxetan) ist etwa 20-1000 fach sensitiver als OPNG-basierte Assays (Jain and Magrath, 1991; Beale *et al.*, 1992). Die mit diesem System zu detektierenden Mengen an  $\beta$ -Galaktosidase liegen zwischen 2 fg und 20 ng (Martin *et al.*, 1997). Zur Selektion in Säugerzellen enthält der Vektor ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40-Promotors sowie zur Selektion des Vektors in *E.coli* eine Ampicillin-Resistenz. Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden vor das Startkodon des *lacZ*-Gens kloniert. Die richtige Orientierung der Fragmente wurde entweder durch Restriktionen oder durch Sequenzierung überprüft. Von den Klonen mit richtiger Orientierung wurden endotoxinfreie Maxi-Präparationen erstellt, die, nach Kontrolle der DNA-Qualität, für die Transfektionen verwendet wurden.

### 3.4.3 Transfektion und Messungen von *mgimap1* Reporter-Gen-Konstrukten in verschiedenen Säugerezelllinien

Fremd-DNA in Säugerzellen zu bringen erfordert ein ausgewogenes Zusammenspiel von Zelldichte, DNA-Qualität und dem für die jeweilige Zelllinie geeigneten Transfektionsreagenz. Als besonders gut zu transfizierende Zellen haben sich CHO-K1 Zellen erwiesen. Diese Zellen wurden daher zunächst für die Etablierung des Promotor-Assays herangezogen, bevor die Aktivität der Konstrukte in einigen Maus-Zelllinien untersucht wurde. Es galt zunächst, die Zellzahl auf die Versuchsbedingungen abzustimmen. Dazu wurden unterschiedliche Zelldichten ausgesät und über den für diesen Versuch ausgewählten Inkubationszeitraum von 72 h hinsichtlich ihres Wachstums beobachtet. Weiterhin wurden verschiedene Verhältnisse von DNA zu Transfektionsreagenz in verschiedenen Transfektionsvolumina untersucht. Die Versuche wurden in 96-'well'-Kulturplatten durchgeführt, da diese die gleichzeitige Messung mehrerer Konstrukte mit entsprechenden Kontrollen und Mehrfachbestimmungen erlauben. Diese Optimierungen führten zu den im Kapitel 2.11.9 beschriebenen Bedingungen, die auch auf die anderen verwendeten Zelllinien übertragbar waren.

Nach diesen Vorversuchen konnten die in Tabelle 10 aufgeführten Konstrukte in CHO-K1-, ANA-I-, NIH3T3- und RAW 264.7-Zellen transfiziert (Kapitel 2.11.4) und hinsichtlich

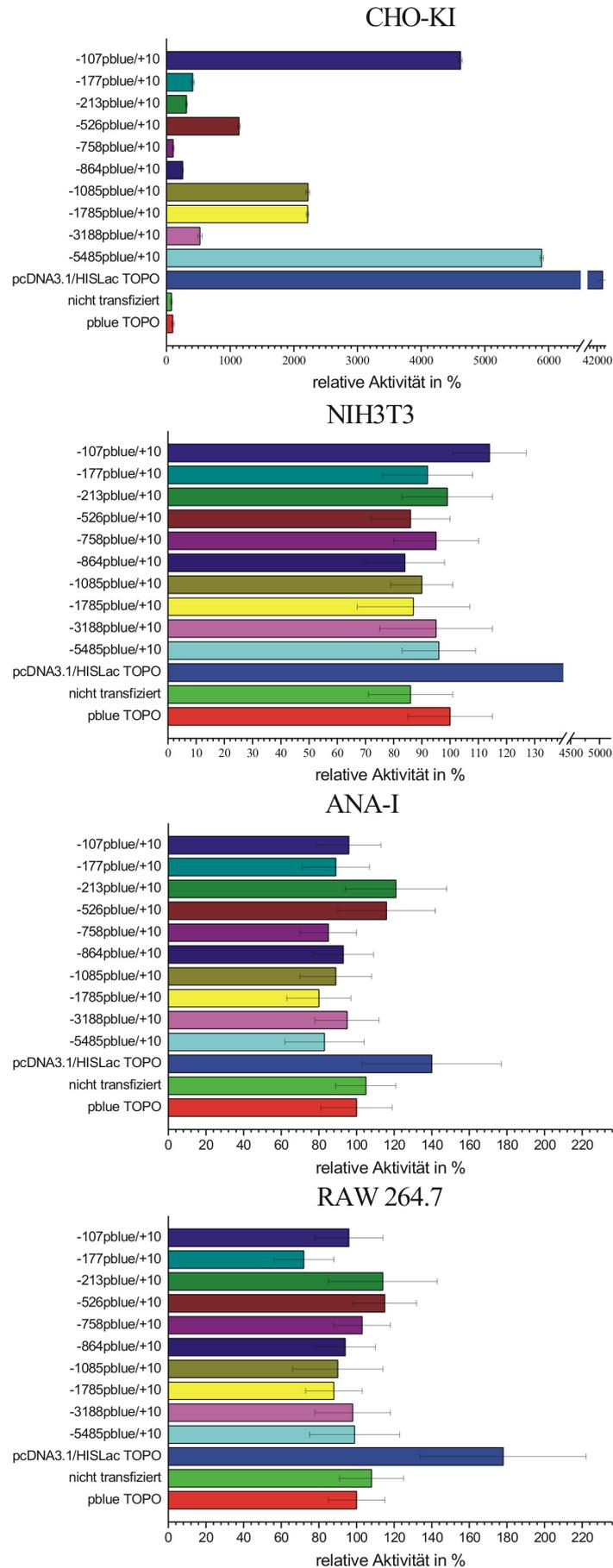
ihres Einflusses auf die Transkription des Reportergens untersucht werden. Als zusätzliche Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zu jedem Promotor-Konstrukt jeweils die gleiche Menge pSEAP2-Basic-Plasmid kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde zunächst ein Teil des Mediums für die pSEAP-Aktivitätsbestimmung abgenommen und die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, wie in Kapitel 2.11.9 beschrieben, gemessen. Neben Vierfach-Bestimmungen der einzelnen Proben, wurden die Messungen aller Zelllinien mehrfach wiederholt. Die Messungen wurden in einem 'Tube'-Luminometer durchgeführt. Dieses Gerät gibt die Licht-Emission der jeweiligen Proben als 'relative light units' (RLU) an, die ein Maß für die Substratumsetzung durch die  $\beta$ -Galaktosidase ist. Das heißt, je stärker aktivierend ein Fragment ist, desto mehr  $\beta$ -Galaktosidase wird gebildet und desto höher ist der gemessene RLU-Wert. Die in einer Messung ermittelten Werte wurden für jede Zelllinie in eine eigene Excel-Tabelle übertragen und von den vier Einzelmessungen eines Fragmentes der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittels errechnet. Die Werte wurden auf die Meßergebnisse des pblue TOPO-Vektors normiert und als prozentuale Abweichung von diesem dargestellt (Abbildung 23). Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen gemessen, während das pcDNA3.1/HisLACZ TOPO-Plasmid als Positivkontrolle diente. Für jede Messreihe wurden Mittelwert und Standardabweichung aller Messungen ermittelt und daraus die in Abbildung 23 dargestellten Diagramme erstellt. Auf der Ordinatenachse sind die Deletionsklone aufgetragen, wobei die Zahlen die Entfernung zur ersten bekannten Base der cDNA angeben. Auf der Abszisse ist die relative Aktivität in 'relative light units' bezogen auf den pblue TOPO-Vektor dargestellt.

Abbildung 23 zeigt die graphische Auswertung der Meßergebnisse. Die Fragmente eines bestimmten Deletionsklons sind jeweils in den verschiedenen Zelllinien in gleicher Farbe markiert. Die Meßdaten der einzelnen Zelllinien zeigen erhebliche Unterschiede und machen unterschiedliche Skalierungen der Abszisse notwendig. Die unteren drei Balken jedes Diagramms bilden die Kontrollwerte für den leeren Vektor ohne inkloniertes Fragment (pblue TOPO), die Negativkontrolle (nicht-transfizierte Zellen) und die Positiv-Kontrolle (pcDNA3.1/HISLac TOPO).

Die Positivkontrollen für die NIH3T3-, RAW 264.7-Zellen und ANA-I-Zellen zeigten, daß in diesen Zelllinien keine aussagekräftige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden konnte. Die Werte für die Negativkontrolle lagen fast auf dem Niveau der Positivkontrolle.

Einzig in CHO-K1-Zellen zeigten die untersuchten Fragmente eine differenzierte Aktivität. Besonders hohe Werte ergaben sich für das größte (-5485pblue/+10) und das kleinste Fragment (-107pblue/+10). Die Aktivität der Negativkontrolle lag deutlich unter der des leeren pblue TOPO-Vektors. Die Schwankungsbreite der Messungen war sehr gering und fiel angesichts der Höhe der Aktivitäten nicht ins Gewicht. Vergleiche mit der untersuchten Sequenzregion (Abbildung 21) zeigten, daß in dem gesamten untersuchten Sequenzbereich mehrere Bindestellen von Transkriptionsfaktoren liegen. Dies sind vor allem Bindestellen für Faktoren der GATA-Familie, aber auch für PU.1 und NF-ATc. Diese Transkriptionsfaktoren sind charakteristisch für eine spezifische Induktion der Genexpression in B- und T-Lymphozyten (Ko *et al.*, 1991; Joulin *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1993).

Abbildung 23 :  
 Aktivität von *mgimap1*-  
 Promotordeletionsklonen  
 Die hergestellten  
 Konstrukte wurden in  
 vier verschiedene  
 Zelllinien transfiziert. Die  
 Balken geben die relative  
 Aktivität (RLU) der  
 jeweiligen  
 Sequenzbereiche wieder.  
 Fragmente des gleichen  
 Klons sind in den  
 verschiedenen Zelllinie  
 in gleicher Farbe  
 dargestellt.



Die Deletionsklone -1085pblue/+10 und -1785pblue/+10 zeigten ebenfalls eine deutlich höhere Aktivität als der Kontroll-Vektor. Mit zunehmender Verkürzung der Sequenz am 5'Ende wurden die gemessene Aktivität geringer.

Die dem Transkriptionsstart am nächsten gelegene Sequenz (-107pblue/+10) zeigte, ähnlich wie das Fragment -5485pblue/+10, eine leicht transkriptionsfördernde Wirkung in CHO-KI-Zellen. Wiederum ließ sich dieser Effekt nur in diesen Zellen beobachten. In den übrigen Zelllinien lagen die Werte in der Größenordnung der Negativkontrolle.

In CHO-KI-Zellen zeigte sich für die Fragmente -213pblue/+10 und -316pblue/+10 gegenüber dem Deletionsklon -177pblue/+10 eine 20-fache Induzierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. In den untersuchten Sequenzen konnten mit Hilfe der TRANSFAC-Datenbank Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie und PU.1 nachgewiesen werden, die auch schon in Deletionsklonen -5485pblue/+10 und -107pblue/+10 vorkommen. Außerdem befinden sich in der untersuchten Sequenzregion von -526pblue/+10 Bindungsstellen für AP-1 und AP-2alphaA, die für eine gewebespezifische Genexpression verantwortlich sind (Mermod *et al.*, 1988). NF- $\kappa$ B, das im Sequenz-Bereich -526pblue/+10 eine putative Bindungsstelle aufweist, ist an Entzündungsreaktionen und immunologischen Prozessen beteiligt und könnte damit für die Expression während einer Malariainfektion von Bedeutung sein (Shimizu *et al.*, 1990; Leonard *et al.*, 1989). In der Sequenzregion zwischen -5485pblue/+10 und -3188pblue/+10 befindet sich offensichtlich ein 'Silencer'-Element, was den Aktivitätsabfall beim Übergang von Deletionsklon -5485pblue/+10 zu -3188pblue/+10 und den Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität innerhalb der Sequenzregion der Deletionsklone -1785pblue/+10 und -1085pblue/+10 erklärt. Ein noch stärkerer Abfall der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression läßt sich durch Deletion der Sequenzregion zwischen -1095pblue/+10 und -768pblue/+10 beobachten, was für eine noch stärkere Herunterregulierung der Expression spricht und auf ein die Transkription reprimierendes Element hindeutet. Die relative Aktivität des Deletionsklons -758pblue/+10 liegt etwa auf dem Niveau des pblue-Vektors. In der TRANSFAC-Datenbank konnten jedoch keine Elemente gefunden werden, die in diesem Bereich an die DNA binden und für diese Regulation verantwortlich sind.

### 3.5 Einfluß von *mgimap8* auf Apoptose

Die Apoptose ist ein streng regulierter Prozess, der zum programmierten Tod einer Zelle führt. Diese Vorgänge können zur Erhaltung der Zellzahl eines Organismus während der Entwicklung, Differenzierung, bei immunologischen Vorgängen oder bei DNA-Schäden notwendig werden. Eine zentrale Rolle im Apoptoseprogramm einer Zelle spielt eine Familie von Cystein-abhängigen-Aspartat-spezifischen Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Diese sind an der Initiierung und Ausführung apoptotischer Prozesse innerhalb einer Zelle beteiligt, wobei die Aktivierung auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen kann. Der intrinsische Weg erfolgt über die Mitochondrien durch zellinterne Signale, Stress-Signale, DNA-Schäden oder Störungen der Signaltransduktionskaskaden. Über den zweiten, extrinsischen Weg werden Signale von Rezeptoren auf der Zelloberfläche (TNF $\alpha$ -Rezeptor, FAS) über unterschiedliche Caspase-Kaskaden aktiviert, die zum Zelltod führen. Dieser Weg wird vornehmlich von immunologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen aktiviert (Krauss, 2003). Eine zentrale Rolle dabei spielt die Caspase-Proteinfamilie. Bisher sind in Säugetieren 14 Caspasen bekannt, die sich in zwei Subfamilien gliedern läßt. Die erste Subfamilie besteht aus den initiierenden Caspasen (Caspase-8 und -9) und den ausführenden

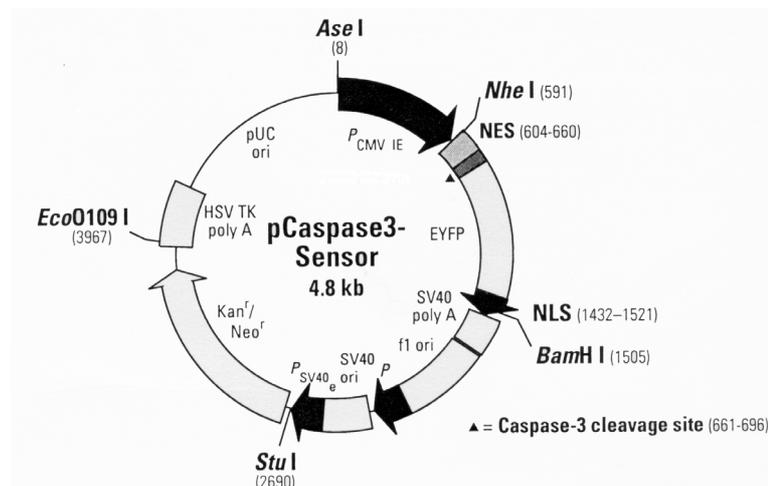
Caspasen (Caspase-3 -6 und -7), während die zweite Subfamilie an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (Krauss, 2003).

### 3.5.1 Untersuchungen mit dem pCaspase3-Sensor-System

Die Caspase-3 spielt eine Schlüsselrolle bei Apoptose-Prozessen, indem sie die Signale aus intrinsischen und extrinsischen Signalwegen koordiniert. Untersuchungen am *p53* Gen und dessen Rolle in Apoptose-Vorgängen ergaben auch eine Beteiligung für *mgimap1*, dessen Expression um das 20-fache erhöht wird (Kannan *et al.*, 2001). Außer für *mgimap1* wurde auch für *gimap5* eine Beteiligung am Apoptose-Programm der Zelle gefunden. In der äußeren Mitochondrienmembran ist *gimap5* für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich (Pandarpurkar *et al.*, 2003). Damit übernimmt das Gen eine ähnliche Rolle, wie Gene der *Bcl-2*-Familie, die über den mitochondrialen Weg Apoptose auslösen können (Krauss, 2003). Im Rahmen der Charakterisierung von *mgimap8* wurde daher auch dessen mögliche Rolle in pro- oder anti-apoptischen Prozessen untersucht.

Für diese Experimente wurde der pCaspase3-Sensor-Vektor verwendet, der zur Detektion der Caspase-3-Aktivität in Säugerzellen benutzt werden kann. Der Vektor kodiert für die gelb-grün fluoreszierende Proteinvariante (EYFP) des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria*, das am 3'-Ende mit drei Kopien des SV40-T-Antigen-Kernlokalisationssignals (NLS) fusioniert wurde. Am 5'-Ende des EYFP wurde eine Signal-Sequenz des Kernexportsignals der Map-Kinase-Kinase angefügt (NES), die vom EYFP durch eine 36 bp Region getrennt ist, welche eine Erkennungssequenz für die Caspase-3 enthält.

Abbildung 24 :  
pCaspase3-Sensor-  
Vektorkarte  
NES: nukleäres  
Exportsignal  
EYFP: gelb-grün  
fluoreszierendes Protein  
NLS: nukleäres  
Lokalisationsignal  
P<sub>CMV</sub>: Promotor des  
Cauliflower Mosaic Virus  
Kan<sup>r</sup>/Neo<sup>r</sup>: Resistenzgen  
für Kanamycin bzw.  
Neomycin  
Die Caspase-3-  
Schnittstelle ist mit  
einem schwarzen  
Dreieck gekennzeichnet.



Bei nicht-aktivierter Caspase-3 dominiert das Kernexportsignal der MAP-Kinase-Kinase die Kernlokalisationssequenz und das komplette EYFP-Fusionsprotein befindet sich im Cytosol. Bei aktivierter Caspase-3 wird die NES-Sequenz vom Fusionsprotein getrennt und das resultierende EYFP-Fusionsprotein findet sich nur noch im Zellkern. Es kann somit eine Verlagerung der Fluoreszenz in den Zellkern infolge von Apoptose beobachtet werden.

### 3.5.2 Künstliche Apoptose-Auslösung in Säugerzellen

Der pCaspase3-Sensor-Vektor wurde zusammen mit dem schon für die Lokalisationen verwendeten *mgimap8*-Expressionsplasmid (*mgimap8*-pcDNA3.1/V5His TOPO-Vektor, Kapitel 3.2.6) in CHO-K1- und NIH3T3-Zellen transfiziert. Als Apoptose-Auslöser wurde Anisomycin verwendet, das die Proteinbiosynthese hemmt (Grollman, 1967).

Die notwendigen Konzentrationen, die erforderlich sind, um Apoptose in den verwendeten Zellen auszulösen, wurden in Vorversuchen ermittelt (Kapitel 2.11.9.5). Nach dem Aussäen der Zellen, wurden die Zellen nach dem in Abbildung 4 dargestellten Schema transfiziert und 24 h später mit, je nach Zelllinie, verschiedenen Konzentrationen an Anisomycin versetzt. In Abständen von mehreren Stunden wurden die Zustände der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Für die NIH3T3-Zellen wurden 33  $\mu\text{g/ml}$  Anisomycin und für die CHO-K1-Zellen 66  $\mu\text{g/ml}$  Anisomycin eingesetzt. Nach 3,5 h (NIH3T3-Zellen) bzw. 5 h (für die CHO-K1-Zellen) wurden die Zellen, unter dem Invers-Mikroskop (Zeiss, Jena) beobachtet. Sofern keine Veränderungen mehr auftraten, wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, fixiert und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden die Zellzahlen in Tabelle 13 zusammengestellt.

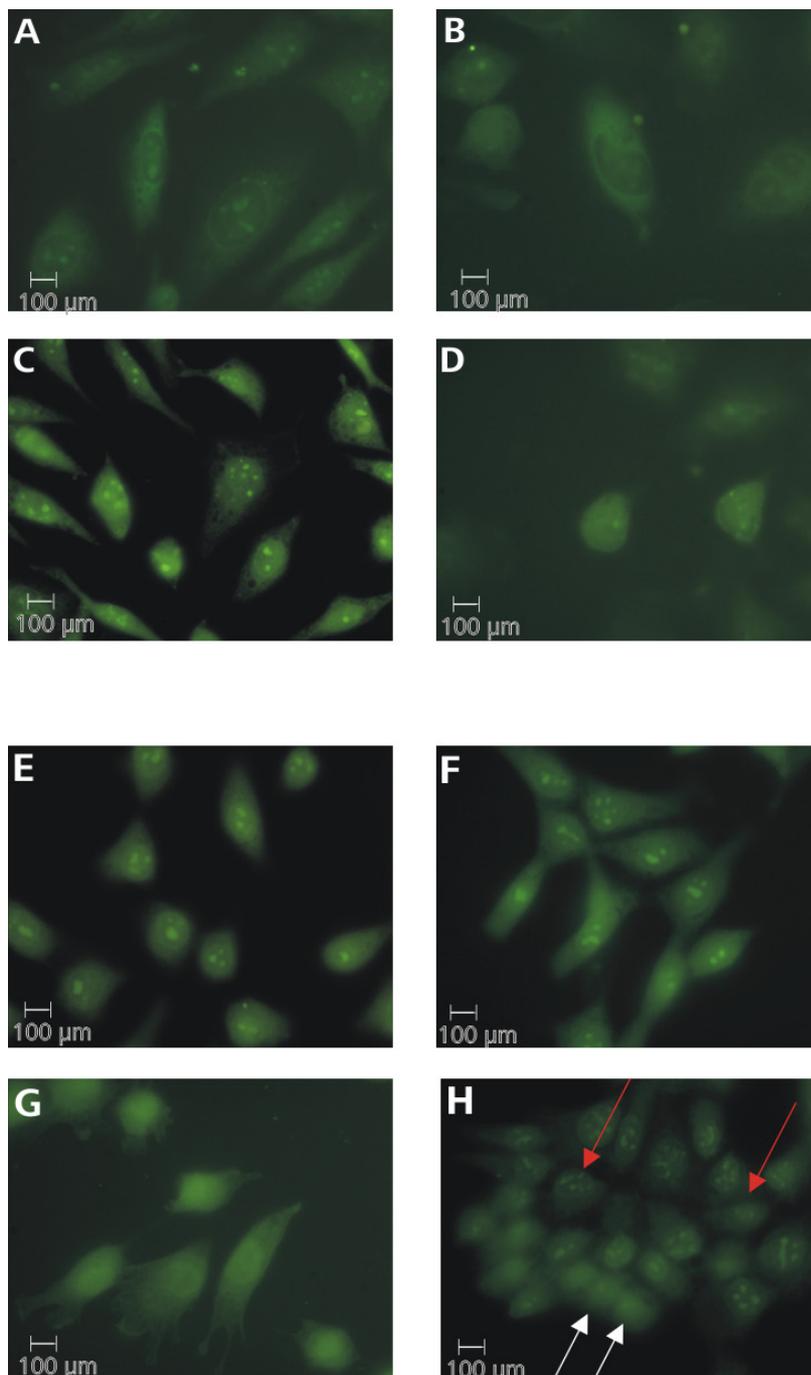


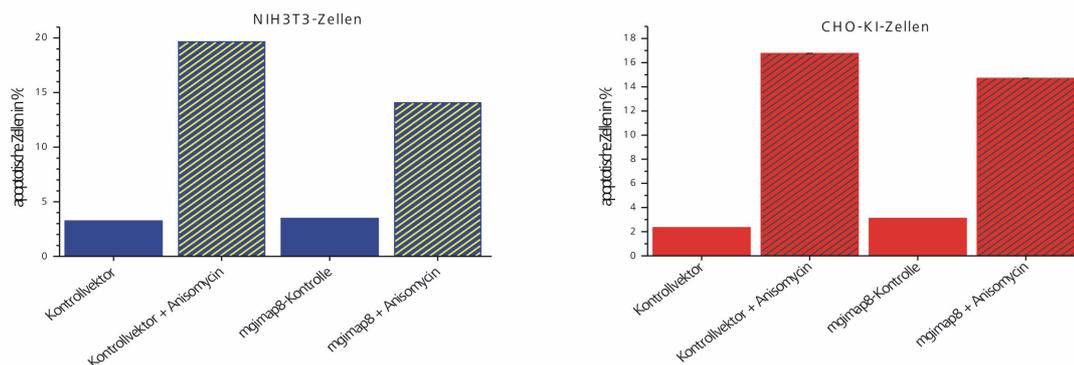
Abbildung 25 :  
fluoreszenz-  
mikroskopische  
Aufnahmen von CHO-K1-  
(A-D) und NIH3T3-Zellen  
(E-H)  
A) CHO-K1 mit pCaspase  
ohne Anisomycin  
B) CHO-K1 mit pCaspase-  
Plasmid und *mgimap8*-  
Plasmid ohne Anisomycin  
C) CHO-K1 mit pCaspase-  
Plasmid mit Anisomycin  
D) CHO-K1 mit pCaspase-  
und *mgimap8*-Plasmid  
mit Anisomycin  
E) NIH3T3, sonst wie A)  
F) NIH3T3, sonst wie B)  
G) NIH3T3, sonst wie C)  
H) NIH3T3, sonst wie D)  
Die weißen Pfeile  
kennzeichnen  
beispielhaft apoptotische  
NIH3T3-Zellen. Die roten  
Pfeile kennzeichnen  
beispielhaft nicht-  
apoptotische NIH3T3-  
Zellen. Die weiße  
Markierung in den  
Abbildungen entspricht  
100  $\mu\text{m}$

Die Abbildung 25 zeigt eine Auswahl der aufgenommenen Fluoreszenzbilder von CHO-KI- (A bis D) und NIH3T3-Zellen (F bis H), die mit dem pCaspase3-Sensor-Vektor und dem *mgimap8*-Expressionsplasmid (kodierende Sequenz aus Abbildung 10 im pcDNA3.1/V5HIS TOPO-Vektor) transfiziert wurden. Während in den Kontrollen (Abbildung 25 A,B,E,F), die nur das pCaspase-Sensor-Plasmid enthielten, die Fluoreszenz überwiegend im Cytoplasma verteilt war, zeigte der Zellkern der Zellen, die mit Anisomycin behandelt wurden, eine stärkere Fluoreszenz als das Cytoplasma (Abbildung 25 C, D, G, H). Diese Verlagerung der Fluoreszenz diente als Kennzeichen von Apoptose. Die Zellkerne der NIH3T3- als auch der CHO-KI-Zellen zeigten aber auch, unabhängig von der Behandlung mit Anisomycin, grün angefärbte Nukleoli (Abbildung 25 A und C). Bei diesen Färbungen, die nach Rücksprache mit der Herstellerfirma des pCaspase-Vektors auf unspezifische Bindungen des EYFP-Fusionsproteins zurückzuführen waren, handelte es sich nicht um apoptotische Zellen. In der folgenden Tabelle sind die ausgezählten Zellzahlen der in Abbildung 25 gezeigten Proben aufgeführt.

**Tabelle 13: Einfluß von *mgimap8* auf Apoptose**

Zelltyp	Probenbezeichnung	Gesamtzellen	lebende Zellen	apoptotische Zellen	% apoptotisch
NIH3T3	Kontrollvektor	3196	3092	104 ± 57	3,25 ± 0,02
	Kontrollvektor + Anisomycin	4064	3265	799 ± 64	19,66 ± 0,02
	<i>mgimap8</i> -Kontrolle	3776	3644	132 ± 62	3,50 ± 0,02
	<i>mgimap8</i> + Anisomycin	3053	2623	430 ± 55	14,09 ± 0,02
CHO-KI	Kontrollvektor	2903	2835	68 ± 54	2,34 ± 0,02
	Kontrollvektor + Anisomycin	2708	2254	454 ± 52	16,77 ± 0,02
	<i>mgimap8</i> -Kontrolle	3728	3612	116 ± 63	3,11 ± 0,02
	<i>mgimap8</i> + Anisomycin	2243	1913	330 ± 47	14,71 ± 0,02

Abbildung 26 : Apoptose-Verhalten von *mgimap8* Die in Tabelle 13 aufgeführten apoptotischen Zellen wurden in einem Diagramm aufgetragen. Die Standardabweichung wurde als schmaler Balken über den Säulen aufgeführt.



Die Zellzahlen aus Tabelle 13 wurden in Abbildung 26 in einem Balkendiagramm aufgetragen. Während in NIH3T3- und CHO-KI-Zellen in den Kontrollen, die nur das pCaspase-Sensor-Plasmid zusammen mit leeren pcDNA3.1/V5/HisTOPO-Vektor enthielten (Kontrollvektor), nur ein geringer Prozentsatz von 2,5 % bzw. 3,3 % apoptotisch war, stiegen diese Werte nach Zugabe von Anisomycin in Bereiche zwischen 15 % und 20 % an. In Zellen, die neben dem pCaspase3-Sensor-Plasmid auch mit dem *mgimap8*-Expressionsplasmid transfiziert wurden, war die Zahl der apoptotischen Zellen dort zwischen 2 % und 5 % geringer (Proben: *mgimap8*+Anisomycin). Die Unterschiede, die für *mgimap8* in NIH3T3-Zellen

beobachtet werden konnten, waren höchst signifikant ( $p \leq 0,01$ ). Die für CHO-KI-Zellen beobachteten Effekte durch mGIMAP8 unterschieden sich leicht von den Ergebnissen in den Mausfibroblastenzellen, und konnten noch als signifikant bezeichnet werden (Irrtumswahrscheinlichkeit für die Verhinderung der Apoptose  $p=0,05$  %).

Damit konnte gezeigt werden, daß mGIMAP8 in beiden Zelllinien eine anti-apoptotische Wirkung ausübt, die in der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3 signifikanter als in den CHO-KI-Zellen war. Worauf die genaue Wirkung dieser beobachteten Phänomene beruht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## 4.0 Diskussion

Einige Untersuchungen der letzten Zeit beschäftigten sich mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen im Tiermodell, wie z.B. Diabetes (Hornum *et al.*, 2002; Payne *et al.*, 2004; MacMurray *et al.*, 2002), bei denen auch *gimap* Gene eine Rolle spielen (Kapitel 1.4). Die *gimap* Gene gehören zu einer Familie von Genen, die in vielen Organismen vorkommen. Einige Vertreter sind zwar aufgrund ihrer Sequenz identifiziert worden (Daheron *et al.*, 2001), doch beschränkten sich die Untersuchungen überwiegend auf die *gimap* Gene des Menschen (Daheron *et al.*, 2001; Stamm *et al.*, 2001; Krücken *et al.*, 2004). Durch die vorliegende Arbeit konnten zwei neue Vertreter in der Maus charakterisiert werden. Die Vielzahl der Gene machte zunächst die Einführung einer neuen Nomenklatur notwendig, auf die eingangs schon verwiesen wurde (Kapitel 1.4).

In der Maus setzen sich die *gimap* Gene aus 8 Vertretern zusammen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Gene *mgimap8* und *mgimap10* identifiziert und näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Expressionsmuster von *mgimap8* mit homologen *gimap* Genen in anderen Organismen verglichen. Zudem konnten zwei zu *mgimap8* homologe Gene in der Ratte identifiziert werden. Funktionelle Untersuchungen zeigten; daß das zugehörige mGIMAP8-Protein in einem heterologen Expressionssystem innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Weitere Untersuchungen zeigten, daß *mgimap8* *in vitro* künstlich induzierte Apoptose verhindern kann.

Infolge der Sequenzierung des Mausgenoms wurde in dieser Arbeit die überarbeitete genomische Organisation des bereits von Krücken *et al.* (1997) funktionell beschriebenen *mgimap1* Gens vorgestellt. Frühere Versuche konnten für *mgimap1* eine starke gewebespezifische Induktion feststellen (Krücken *et al.*, 1999). Um die Ursachen hierfür näher zu untersuchen, wurde eine 5'-flankierende Region vor dem Beginn des ersten Exons (Abbildung 20) kloniert und in einem Reporter-gen-System untersucht. So konnte einige Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die für eine gewebespezifische Expression verantwortlich sind.

### 4.1 Neue Vertreter der *gimap* Genfamilie

Mit den Genen *mgimap8* und *mgimap10* konnten in dieser Arbeit zwei weitere Mitglieder der *gimap* Genfamilie charakterisiert werden, die in Vertebraten und höheren Pflanzen weit verbreitet ist. Beide Gene liegen innerhalb einer Cluster-Region auf dem Chromosom 6B der Maus (Abbildung 4), die einen Bereich von 125 kb umfaßt. Ein synthener Bereich befindet sich auf dem Chromosom 7q36.1 des Menschen und erstreckt sich dort über 280 kb. Die Anordnung und Orientierung entspricht der in Abbildung 4 dargestellten Region des Mausgenoms. Auf dem Chromosom 4 der Ratte existiert eine Region, die ebenfalls eine Gruppierung von *gimap* Genen zeigt. Bisher ließen sich allerdings erst homologe Vertreter zu *mgimap3*, *mgimap4*, *mgimap5* und *mgimap8* identifizieren. Im Genom der Ratte konnten von *rgimap3* 9 Spleißvarianten identifiziert werden, die in der GenBank™ mit zusätzlichen Buchstaben zur Genbezeichnung gekennzeichnet sind (Andersen *et al.*, 2004). Im Genom der Wanderratte existieren zwei *gimap8*-Spleißvarianten von 972 bp und 1025 bp (XM\_231728 und XM\_231730). Im Genom des Menschen existiert ein homologes Gen (NM\_175571) zu *mgimap8*, das, mit einer noch längeren cDNA-Sequenz (3797 bp) als in der Maus, für das bisher größte Protein der *gimap* Genfamilie kodiert.

Die Analysen in dieser Arbeit beschränkten sich auf *mgimap8* und *mgimap10* in der Maus. Im Genom des Nagers wurden zunächst 11 Gene innerhalb einer geclusterten

Region beschrieben (MacMurray *et al.*, 2002). Nähere Untersuchungen führten dann aber zu der Erkenntnis, daß es tatsächlich im Mausgenom nur 8 funktionelle Gene der *gimap*-Familie gibt. Bei den von MacMurray *et al.* (2002) beschriebenen Genen wurden die als *ian9*, *10* und *11* bezeichneten Gene ursprünglich als eigenständig beschrieben (Tabelle 3). Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten jedoch zeigen, daß es sich nur um ein einziges Gen handelt, das aber eine Dreiteilung in drei AIG1-Domänen erkennen ließ und nach der neuen Nomenklatur als *mgimap8* bezeichnet wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß es sich bei der als *mgimap10* bezeichneten Sequenz offensichtlich nicht um ein funktionelles Gen handelt (Kapitel 3.3). Damit ergibt sich eine Parallele zu der *gimap* Genfamilie im menschlichen Genom, die ebenfalls ein Pseudogen aufweist.

Das *mgimap8* Gen erstreckt sich über einen Bereich von ca. 12 kB im Mausgenom. Die Introns und Exons sind dabei im Genom über einen großen Bereich verteilt, der mehr als zweimal so viele Basen umfaßt wie die Region des *mgimap1* Gens, dessen Exons und Introns sich über einen Abschnitt von ca. 4,5 kB erstrecken. *mgimap8* umfaßt zwei kleine und drei große Exons, die mehr als doppelt so groß sind wie ein durchschnittliches Exon der Maus (Deutsch und Long, 1999). Außer den überdurchschnittlichen Exonlängen finden sich auch überdurchschnittlich lange Intronbereiche, wobei der Abstand zwischen Exon 3 und Exon 4 besonders groß ist (Abbildung 9). Die Exon-/ Introngrößen können innerhalb des Genoms einer Art, aber auch zwischen den Spezies variieren, aber eine Kombination aus großen Exons zusammen mit großen Introns ist eher selten (Hawkins, 1988; Doolittle *et al.*, 1990; Petrov *et al.*, 1998). In höheren Eukaryoten findet man üblicherweise kleine Exons und große Introns, während bei niederen Eukaryoten ein eher umgekehrter Zusammenhang besteht (Sterner *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe um Berget (Sterner *et al.*, 1996) konnte zeigen, daß transkribierte Prä-mRNAs über Interaktionen mit verschiedenen Faktoren, welche die Spleißstellen erkennen, prozessiert werden. Dieser Mechanismus funktioniert aber nur bei einer Kombination von kleinen Exons und großen Introns (und umgekehrt), jedoch nur unzureichend bei langen Exons in Kombination mit langen Intronsequenzen. Schon bei Exongrößen von mehr als 500 Nukleotiden wird eine Erkennung der Spleißstellen merklich ineffizienter (Sterner *et al.*, 1996). Am Ende der Prozessierung einer Prä-mRNA werden die Introns entfernt und die Exons zusammenligiert. Der Mechanismus entspricht zwei Transesterifikations-Reaktionen, bei denen enzymatisch das Intron zwischen zwei Exons herausgeschnitten wird.

Damit eine Prä-mRNA in höheren Eukaryoten, trotz überdurchschnittlich großer Introns und Exons, richtig prozessiert werden kann, existiert ein zusätzlicher, erweiterter Spleißmechanismus, der dafür sorgt, daß auch große Exons, wie im Fall von *mgimap8*, einer Prä-mRNA zu einer fehlerfreien mRNA prozessiert werden können. Dazu sind zusätzliche RNA-bindende Proteine nötig, die als Serin-Arginin-reiche RNA-bindende Proteine (SR-Proteine) bezeichnet werden und die mit bestimmten Exon-Sequenzen, den Exon-Spleiß-Enhancern (ESE), interagieren. Die SR-Proteine enthalten mehrere RNA-Bindedomänen und Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die den Spleißprozeß vermitteln. Diese Mechanismen dürften im Fall von *mgimap8* nötig sein, um eine Prozessierung der großen Prä-mRNA zu ermöglichen.

## 4.2 Die *gimap* Gene werden gewebespezifisch exprimiert

Expressionsanalysen zeigten eine gewebespezifische Expression für *mgimap1*, *mgimap6* und *mgimap8*. Durch 'Northern-Analysen' konnte darüber hinaus für *mgimap8* nachgewiesen werden, daß es, ähnlich wie bei *mgimap1* (J. Krücken, persönliche Mitteilung) und *hgimap5* (Sandal *et al.*, 2003), zwei Spleiß-Varianten (4,2 und 2,9 kB)

gibt, die in den Organen unterschiedlich verteilt sind (Abbildung 14). In Thymus, Herz und Haut findet sich neben dem großen 4,2 kb auch das kleine Transkript von 2,9 kb. Es tritt aber nur in Kombination mit dem 4,2 kb großen Transkript auf. In Leber, Lunge und Dünndarm konnte nur das 4,2 kb große Fragment nachgewiesen werden. Allerdings könnte es sich bei den beiden detektierten murinen Fragmente von *mgimap8* auch um die gleiche Sequenz mit unterschiedlichen 5' und 3' Enden handeln.

Das orthologe *hgimap8* Gen des Menschen zeigte bei Hybridisierungen ebenfalls zwei Transkripte unterschiedlicher Größe (4,7 kb und 4,2 kb), allerdings war der Größenunterschied geringer, aber auch hier trat das kleinere Transkript nur im Kombination mit dem großen auf. Das große Transkript von 4,7 kb trat bei *hgimap8* in Milz, Plazenta, Dünndarm, Leber, Niere, Muskel, Herz und Dickdarm auf, während sich das kleine 4,2 kb Fragment zusätzlich in Lunge, Plazenta, Niere, Muskel und Herz nachweisen ließ (Krücken *et al.*, 2004). *hgimap8* wurde im Gegensatz zu *mgimap8* nicht im Thymus exprimiert.

Die stärkste Expression von *hgimap8* fand sich im Herzgewebe, während *mgimap8* im Herzgewebe der Maus nur am zweitstärksten exprimiert wurde (Krücken *et al.*, 2004). Über die Expression der *rgimap* Gene aus der Ratte ist bisher noch nichts bekannt. Da sich bisher zwischen den *gimap* Genen der Maus und des Menschen Parallelen gezeigt haben, liegt die Vermutung nahe, daß auch die *rgimap* Gene gewebespezifisch exprimiert werden, zumal sie ähnlich wie in Mensch und Maus in enger Anordnung auf einem Chromosom liegen.

Die Sequenzierung des Mausgenoms ergab eine andere Organisation des *mgimap1* Gens (Abbildung 20). Neben einer Induktion von *mgimap1* durch eine Malariainfektion (Krücken *et al.* 1999) zeigte sich zudem auch ein gewebespezifische Expression (Abbildung 17). In diesem Zusammenhang wurde das Expressionsmuster von *mgimap1*, zusammen mit *mgimap6* und *mgimap8* näher untersucht. Alle drei untersuchten Gene zeigten keine Induktion infolge einer Infektion. Bei *mgimap1* und *mgimap6* konnte lediglich in einigen Organen eine Verdopplung der Expressionsrate beobachtet werden (Abbildung 17), aber keinesfalls eine starke Induktion wie sie zuvor für *mgimap1* beschrieben wurde. Eine Überexpression konnte durch eine andere Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit Untersuchungen des *p53*-Gens festgestellt werden (Kannan *et al.*, 2004).

Die *mgimap8*-Expressionsraten sind kaum infektionsreguliert, sondern schwanken je nach untersuchtem Gewebe. Wie schon in den 'Northern-Analysen', konnten auch im naivem Thymusgewebe eine starke Expression der *mgimap8*-mRNA beobachtet werden (Abbildung 14). Die im Northern-Blot beobachteten hohen *mgimap8*-Expressionsraten in Herzgewebe der Maus konnten in den infektionsspezifischen Analysen nicht beobachtet werden (Abbildung 17); dort zeigte sich nur ein schwaches Signal. Während die 'Southern-Analysen' einen Nachweis der *mgimap8*-Transkripte auch in Milz und Hirngewebe ermöglichte, zeigte der Gewebebplot kein Signal in diesen Organen. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Mausstämme zurückführen aus denen die RNA gewonnen wurde. Das Gewebe für den Northern Blot stammte aus naiven BALB/c Mäusen, während das Gewebe für die qPCR-Analysen aus C57BL/6 Mäusen stammte. Der für das Herzgewebe beobachtete Unterschied kann auch dadurch erklärt werden, daß für die 'Northern-Analysen' Poly(A)<sup>+</sup>-RNA benutzt wurde, die eine Anreicherung verschiedener seltener mRNA-Spezies ermöglicht, während hingegen für die 'Southern-Analysen' aus Gesamt-RNA hergestellte cDNA benutzt wurde. Dadurch lassen sich aber nicht die Unterschiede der Signale in Milz und Hirn erklären.

### 4.3 Mehrere Datenbankeinträge beinhalten die Sequenz von *mgimap8*

Derzeit existieren in GenBank™ drei verschiedene Einträge der cDNA-Sequenz von *mgimap8*. Der älteste Eintrag (XM\_144696.1) mit einer Gesamtlänge von 2067 bp enthält die in Abbildung 10 dargestellte kodierende Sequenz von *mgimap8*, die in dieser Arbeit erstmals experimentell bestätigt werden konnte. Daneben existiert noch ein überarbeiteter Eintrag dieser Sequenz (XM\_144696.2), der gegenüber der kodierenden Sequenz am 5'-Ende eine Erweiterung um 73 bp und am 3'-Ende eine Erweiterung um 219 bp enthält. Somit ergibt sich eine Gesamtlänge von 2360 bp. Bei den hinzugefügten Basen am 3'-Ende handelt es sich um einen Teil der in Abbildung 19 dargestellten DNA-Sequenz des *mgimap10*-Pseudogens. Die kodierende Region wurde um 73 Aminosäuren erweitert.

Die dritte Variante der in der GenBank™ hinterlegten *mgimap8*-Sequenz umfaßt eine Gesamtlänge von 2921 bp und wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe unter der Bezeichnung 'IAN9' (NM\_212486) abgelegt (Nitta *et al.*, 2004). Die kodierende Region entspricht der in Abbildung 10 aufgeführten Sequenz. Am 5'-Ende ist die Sequenz um 76 Bp und am 3'-Ende um 778 bp erweitert, was nicht zu einer Erweiterung der kodierenden Region führte, wie sie für die in der Datenbank hinterlegte Variante XM\_144696.2 gezeigt werden konnte. Zur Bewertung dieses Sachverhaltes muß festgehalten werden, daß es sich bei beiden Varianten um ausschließlich mit Hilfe von Computern zusammengesetzte Sequenzen handelt, deren Produkt nicht das Ergebnis experimenteller Arbeiten ist. Somit konnte bisher nur die in dieser Arbeit vorgestellte Sequenz (Abbildung 10) der kodierenden Region als funktionell dargestellt werden, wobei jedoch sicherlich am 5'- und 3'-Ende nicht kodierende Sequenzbereiche existieren.

**Tabelle 14: Eigenschaften der *gimap8* Gene in verschiedenen Organismen**

Genbezeichnung	AC-Nummer	Länge in Bp	Anzahl der AS	Molekulargewicht in kDa
<i>mgimap8</i>	XM_144696.1	2067	688	76,8
Variante 1	XM_144696.2	2360	761	84,9
Variante 2	NM_212486	2921	688	76,8
<i>hgimap8</i>	AL834361	3797	655	74,8
<i>rgimap8-1</i>	XM_231728	972	304	33,7
<i>rgimap8-2</i>	XM_231730	1025	295	32,8

#### 4.3.1 Das mGIMAP8-Protein als besonderer Vertreter der GIMAP-Proteinfamilie

mGIMAP8 hat unter den GIMAP-Proteinen eine Sonderstellung inne: es kodiert für das bisher größte Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 76,8 kDa. Nur das orthologe Protein hGIMAP8 des Menschen hat mit 74,8 kDa ein ähnlich hohes Molekulargewicht. Die beiden homologen Proteine der Ratte (XM\_231728, XM\_231730) haben ein den übrigen mGIMAP-Proteine entsprechendes Molekulargewicht zwischen 33 und 34 kDa.

Alle bisher beschriebenen GIMAP-Proteine weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Dazu gehört die AIG1-Domäne sowie 'coiled-coil'-Strukturen. Das hier untersuchte mGIMAP8, aber auch das orthologe Protein des Menschen, zeigt gegenüber den anderen auch strukturelle Unterschiede. Es weist eine deutliche Dreiteilung auf, da es drei hintereinander gelegene AIG1-Domänen sowie drei 'coiled-coil'-Strukturen enthält, während die übrigen Proteine nur jeweils eine AIG1-Domäne enthalten. Bis auf mGIMAP1, mGIMAP4 und mGIMAP6 enthalten alle Proteine zwei 'coiled-coil'-Domänen.

Tabelle 15: Eigenschaften der bisher beschriebenen murinen *gimap* Gene

Name des Gens	Anzahl der AS	Molekulargewicht in kDa	Lokalisation	mögliche Funktion	gewebespezifische Expression	Referenz
<i>mgimap1</i>	300	38	ER/Golgi	Zellproliferation und Apoptose, in p53-Signalwege involviert	Milz	Kannan <i>et al.</i> , 2002 Stamm <i>et al.</i> , 2002
<i>mgimap3</i>	295	33,4	äußere mitochondriale Membran	im Zusammenhang mit Krebs-Entstehung		Daheron <i>et al.</i> , 2001; Pandarpurkar <i>et al.</i> , 2001; Payne <i>et al.</i> , 2003
<i>mgimap4</i>	328	38	ER/Golgi Plasmamembran	Einfluß auf Selektion von T-Zellen während der Entwicklung im Thymus	überwiegend in lymphoiden Geweben exprimiert	Wünsche, 2004
<i>mgimap5</i>	291	34,7	Mitochondrien	involviert in Apoptose-Prozesse; wichtig für das Überleben von T-Zellen		MacMurray <i>et al.</i> , 2002
<i>mgimap6</i>	305	34,1	ER/Golgi	-	alle Gewebe bis auf Magen und Testis	
<i>mgimap7</i>	291	33,3	ER/Golgi	-	Dünndarm, Milz	
<i>mgimap8</i>	688	76,8	ER	anti-apoptotische Funktion	Thymus, schwache Signale in Herz, Haut und Lunge	
<i>mgimap9</i>	293	33,8	ER/Golgi Mitochondrien Plasmamembran	-	Thymus, Dünndarm, Milz, Lunge	Wünsche, 2004
<i>mgimap10</i>	-	-	-	-	Pseudogen	

Proteine mit hohem Molekulargewicht und GTP-Bindedomäne sind eher selten im Vergleich zu kleinen, GTP-bindenden Proteinen (Nigam, 1990). Im Proteom von *Arabidopsis thaliana* konnten jedoch mehrere große, membrangebundene, dynamin-ähnliche Proteine identifiziert werden, die ein ähnlich hohes Molekulargewicht wie mGIMAP8 oder hGIMPA8 aufweisen (Jin *et al.*, 2001, 2003). Dynamin selbst ist ein GTP-bindendes Protein mit hohem Molekulargewicht und in Endocytose-Prozesse im Gehirn von Ratten involviert (Obar *et al.*, 1990, Shpetner and Vallae, 1989). Diese Proteine mit der Bezeichnung ADL (für *Arabidopsis*-Dynamin-Like Protein) spielen eine kritische Rolle während der strukturellen Organisation von Mitochondrien (Jin *et al.*, 2003) oder sind, wie im Fall von ADL6 an Transport-Prozessen im *trans*-Golgi-Netzwerk beteiligt (Jin *et al.*, 2001).

Das mGIMAP8 Protein ist vor allem durch seine drei GTP-Bindemotive bisher einzigartig. Nur in Mitochondrien konnten bisher kleine atypische Rho-GTPasen lokalisiert werden, die zwei GTP-Bindedomänen aufwiesen. Diese Miro-Gene (mitochondriales Rho-Gen) zeigen neben dem üblichen GTP-bindenden Motiv eine zweite GTP-Bindedomäne und ein mögliches kalzium-bindendes Motiv. Eine Überexpression dieser Miro-Gene führt zur Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks und verstärkter Apoptose (Fransson *et al.*, 2003).

Ein weiteres Protein, das Gemeinsamkeiten zu mGIMAP8 aufweist, stammt aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das *VPS1*-Gen kodiert für ein 80 kDa-Protein bestehend aus drei GTP-Bindedomänen und einer funktionellen Zweiteilung. Während der aminoternale Bereich eine Homologie zu ADL6, Dynamin und Mx (*Drosophila melanogaster*) zeigt und die GTP-Bindung sowie Hydrolyse katalysiert, sorgt der carboxyterminale Bereich zusammen mit einer noch unbekanntem Komponente für die vakuoläre Protein-Sortierung (Vater *et al.*, 1992). Ähnlich ADL6 ist auch VPS1p mit dem Golgi-Apparat assoziiert. Bisher wurde, außer bei *mgimap1* (Stamm *et al.*, 2001) und

*mgimap3* (Daheron *et al.*, 2001), für keines der mGIMAP-Proteine die Funktionalität der GTP-bindenden Domäne untersucht und Analysen bezüglich der Kinetik durchgeführt. Die oben beschriebenen Beispiele aus der Literatur zeigen jedoch, daß selbst große GTP-bindende Proteine exprimiert werden und z.T. Schlüsselstellen innerhalb der Zelle besetzen. Einige GIMAP-Proteine konnten am ER und/oder am Golgi-Apparat lokalisiert werden (Krücken *et al.*, 2004). Immunhistochemische Experimente zeigten für mGIMAP8 ebenfalls eine Lokalisation am ER, nicht aber am Golgi-Apparat (Abbildung 18). Am ER konnten zudem eine Reihe von GTPasen lokalisiert werden, die durch IFN- $\gamma$ , z.B. infolge einer bakteriellen Infektion, induzierbar sind (Boehm *et al.*, 1998, Taylor *et al.*, 1997 Zerrahn *et al.*, 2002). Neben der Lokalisation am ER fanden sich einige dieser Proteine auch am Golgi-Apparat. Bisher umfaßt diese Familie insgesamt 6 Proteine, deren genaue Funktion, ähnlich der vieler GIMAP-Proteine, noch unklar ist. Die bisherigen experimentellen Daten weisen auf eine Rolle bei der Abwehr von meist intrazellulären Pathogenen hin und zeigen damit Parallelen zu *AIG1* in *Arabidopsis* (Zerrahn *et al.*, 2002). Das zuletzt entdeckte *IIGTP*-Gen wird schon wenige Tage nach einer Infektion induziert und weist damit auf eine Rolle in frühen, unspezifischen Immunabwehr-Reaktionen hin (Zerrahn *et al.*, 2002). Dabei wird das Protein überwiegend in der Milz exprimiert, was Parallelen zu frühen Publikationen über *mgimap1* zeigt (Krücken *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten für keines der untersuchten GIMAP-Proteine (mGIMAP1, mGIMAP6 und mGIMAP8) in einem einzelnen Organ, z.B. in der Milz, eine herausgehobene Expression nachweisen, wenngleich die Expressionsanalysen eine besonders starke Expression von *mgimap8* im Thymus zeigten (Kapitel 3.2.4.1, Kapitel 3.2.5). Taylor *et al.* (2000) konnten IGTP am ER lokalisieren und zeigen, daß eine Expression nicht alleine auf Immunzellen beschränkt war. Die Autoren vermuteten daher, daß IGTP aufgrund der Lokalisation den Vesikel-Transport innerhalb der Zelle reguliert und so zur Klärung einer *Toxoplasma gondii* Infektion beiträgt (Taylor *et al.*, 2000).

Expressionsuntersuchungen von *mgimap* Genen in dieser Arbeit konnten somit zeigen, daß diese nicht durch eine Infektion induzierbar sind. Dabei muß jedoch hervorgehoben werden, daß sich die Arbeiten auf Malaria-Infektionen beschränkten und andere Parasiteninfektionen oder bakterielle Infektionen nicht untersucht wurden. Wohl aber zeigte sich eine unterschiedliche Transkriptverteilung in den einzelnen Geweben, was auf eine spezifische Regulation deutet.

#### 4.3.2 Die *gimap* Genfamilie und die Kontrolle von Apoptose-Prozessen

Das Apoptose-Programm einer Zelle kann durch interne und externe Signale ausgelöst werden. Die Aktivierung kann zum einen als Antwort auf externe Signale durch Transmembranrezeptoren der TNF-R Klasse (Baud and Karin, 2001) und zum anderen über zellinterne Signalwege der Mitochondrien oder das ER wahrgenommen werden. Der extrinsische Weg über TNF- $\alpha$ -Transmembranrezeptoren erfolgt während entwicklungsbiologischer Prozesse und in Zellen des Immunsystems (Krammer, 2000; Rathmell and Thompson, 2002).

Der mitochondriale Weg wird über pro-apoptotische Proteine der Bax-Familie eingeleitet, die bei Aktivierung vom Cytosol in die äußere Mitochondrienmembran wandern und dort die Freisetzung von Proteinen veranlassen, die normalerweise im Intermembranraum lokalisiert sind (Parone *et al.*, 2002). Cytochrom c ist eines dieser Proteine und wird vermutlich durch eine Pore freigesetzt, die aus oligomerisierten Bax/Bak-Proteinen gebildet wird (Breckenridge *et al.*, 2003). Cytochrom c bindet dann an einen Komplex aus Apaf1 und Procaspase-9, wodurch letztere aktiviert wird, was

wiederum zur Caspase-Kaskade-Aktivierung aktiviert, und letztendlich die Apoptose einleitet (Kapitel 3.5.1). Die Freisetzung von Cytochrom c kann jedoch durch die Heterodimerisierung der antiapoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-X<sub>L</sub> mit Bax/Bak verhindert werden.

Die *gimap* Gene können bisher hinsichtlich ihrer Lokalisation in zwei Gruppen unterteilt werden: solche die am ER/Golgi und solche, die an den Mitochondrien lokalisiert sind. Einige von ihnen scheinen auch in Apoptose-Signalwege einzugreifen und Apoptoseprozesse, ähnlich wie BCL-2, verhindern zu können.

Die Gene *mgimap3* (Daheron *et al.*, 2001), *rgimap4*, *rgimap5* (Hornum *et al.*, 2002; Pandarpurkar *et al.*, 2003), und *hgimap5* (Zenz *et al.*, 2004) konnten in den Mitochondrien lokalisiert werden (Daheron *et al.*, 2001, Hornum *et al.*, 2002). Dabei ist *mgimap5* dort für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials zuständig, dessen Verlust zu den frühen Ereignissen zählt, die zur Auslösung von Apoptose führen (Pandarpurkar *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2001). Eine ebensolche Rolle spielt das orthologe *rgimap4* in der Diabetes-Ratte (Hornum *et al.*, 2002). Das mGIMAP4 Protein scheint ebenfalls Teil eines Signalweges zu sein, der Apoptose-Prozesse verhindern kann. In *mgimap4*<sup>-/-</sup> T-Zellen konnte durch Caspase-Inhibitoren gezeigt werden, daß die Abwesenheit eines *mgimap4*-abhängigen Signals in den Mitochondrien von T-Zellen zur Apoptose über den intrinsischen Weg führt (Pandarpurkar *et al.*, 2003).

Eine um das zwanzigfache verstärkte Expression von *mgimap1* konnte in *p53*-vermittelten Apoptose-Prozessen in Maus-Leukämiezellen LTR6 (Yonish-Rouach *et al.*, 1993) beobachtet werden (Kannan *et al.*, 2001). Das *p53*-Gen wird durch DNA-Schäden aktiviert und kann durch Signalübertragung via Bax-Proteine eine Mitochondrien-vermittelte Apoptose auslösen. Untersuchungen zu *mgimap8* sollten zeigen, ob es, ähnlich den schon aufgezeigten Eigenschaften anderer *mgimap* Gene, auch eine mögliche Rolle in Apoptose-Signalwegen gibt. Dazu wurde das bereits in Kapitel 3.5 beschriebene pCaspase-System benutzt. Die Untersuchungen konnten zeigen, daß *mgimap8* in der untersuchten Mauszeile höchst signifikant Apoptoseprozesse verhindern kann (Abbildung 26). Weiterhin ergaben sich Unterschiede im Vergleich zu den ebenfalls getesteten CHO-K1-Zellen. In diesen Zellen zeigte mGIMAP8 auch eine antiapoptotische Wirkung, aber der Effekt war etwas geringer als bei den NIH3T3-Zellen (Abbildung 26). Bisher ist noch unklar auf welchem Mechanismus der beobachtete antiapoptotische Effekt von mGIMAP8 beruht, d.h. über welchen Regulationsmechanismus das Protein in die Signalwege eingreift und die Zelle vor dem Zelltod bewahrt. Proteine, die am ER lokalisiert sind, konnten jedoch in Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen gebracht werden (Breckenridge *et al.*, 2003).

Das ER überwacht die korrekte Faltung von Proteinen. Aufgrund von Überlastung kann die Überwachung aller Proteine nicht mehr gewährleistet werden und es kommt zu einer hoch konservierten UPR-Antwort (unfolded protein response) (Traver *et al.*, 2000), um dem ER die Möglichkeit zu geben, die Faltungsprozesse wieder zu kontrollieren (Patil and Walter, 2001). Ist die Schädigung jedoch schon zu weit fortgeschritten oder geschieht die Wiederherstellung der ER-Funktion nicht in einem gewissen Zeitfenster, kommt es zur Auslösung von Apoptose. Diese Antwort ist analog der *p53*-Antwort auf genotoxischen Stress (Breckenridge *et al.*, 2003). Die Auslösung der Apoptose-Signalkette geschieht dabei über die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> und die damit verbundene Aktivierung der Caspase-12 (Nakagawa and Yuan, 2000), die zur Aktivierung der Caspase-9 führt und in der Aktivierung der Effektor-Caspasen resultiert.

Eine Erhöhung der cytosolischen Kalzium-Konzentration aktiviert die Proteine Bak/Bax und ist damit mit der mitochondrialen Apoptose-Auslösung verknüpft (Breckenridge *et*

*al.*, 2003). In einigen Zelltypen konnten die Proteine Bak/Bax als Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie neben den Mitochondrien auch am ER lokalisiert werden (Nutt *et al.*, 2001). Mitglieder dieser Proteinfamilie können die stressinduzierte Apoptose verhindern, indem sie die Kalzium-Aufnahme durch die Mitochondrien blockieren (McCormick *et al.*, 1997; Hacki *et al.*, 2000; McCullough *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2001). Aufgrund der Lokalisation am ER und der gezeigten anti-apoptotischen Wirkung ist es vorstellbar, daß mGIMAP8 möglicherweise mit Proteinen der BCL-2 Familie interagiert und so die Apoptoseauslösung verhindert. Andererseits wäre auch vorstellbar, daß mGIMAP8 zum einen durch die Lage am ER, zum anderen durch die GTP-bindenden Domänen einen Einfluß auf Signale ausübt, die zur Kalzium-Freisetzung führen und diese blockiert. Dadurch käme es schon sehr früh zu einem Eingriff in den Regelkreis, und die Auslösung der weiteren Schritte, die zum Tod der Zelle führen, wäre verhindert. Ein GTP-bindendes Protein der Ras-Superfamilie, cdc42, kontrolliert neben dem Zellzyklus, auch einige Signalwege, die zur Apoptose führen. Das cdc42-Protein und das verwandte Protein Rac können mit Hilfe eines noch unbekanntem Interaktionspartners die Auslösung von Apoptose verhindern (Tang *et al.*, 2000, Schurmann *et al.*, 2000). Damit ist gezeigt, daß GTP-bindende Proteine neben Apoptose-Signalwegen auch den Zellzyklus koordinieren. Eine Beteiligung von mGIMAP8 an anderen Prozessen innerhalb der Zelle kann durch die Suche von Interaktionspartnern gezeigt werden, auf die sich nachfolgende Untersuchungen konzentrieren sollten.

#### 4.3.3 Das *mgimap10* Gen zeigt Merkmale eines Pseudogens

Die Sequenz von *mgimap10* liegt im Genom der Maus zwischen dem *mgimap8* Gen und dem *mgimap7* Gen innerhalb des gleichen Lokus wie die übrigen *mgimap* Gene auf Chromosom 6B der Maus. Die Orientierung der AIG1-Domäne ist der von *mgimap8* entgegengesetzt (Abbildung 8). Die *mgimap10*-Sequenz (Abbildung 19) weist ähnlich wie *mgimap8* und die übrigen *gimap* Gene die charakteristische AIG1-Domäne auf. In den Untersuchungen konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden. Dazu kommt, daß die Sequenz (Abbildung 19) offenbar nicht für ein funktionelles Protein kodieren kann, da mehrere Stop-Kodons in allen Leserastern auftreten. Im Vergleich mit den anderen *gimap* Genen ist die Sequenz von *mgimap10* zudem außergewöhnlich kurz (Tabelle 15). Der Frage, ob es sich trotz der geschilderten Zusammenhänge um ein Exon eines anderen Gens, um ein funktionelles, eigenständiges Gen oder ein Pseudogen handelt, gehen offenbar auch andere Arbeitsgruppen nach. Pseudogene treten in vielen Organismen auf. Im Mausgenom sind etwa 14000 nicht funktionelle Gene zu beobachten (Waterson *et al.*, 2002), während im menschlichen Genom bisher etwa 20000 Pseudogene identifiziert werden konnten (Torrents *et al.*, 2003). Während in dieser Arbeit aufgrund der AIG1-Domäne und deren inverser Orientierung (Abbildung 8) davon ausgegangen wird, daß es sich um ein eigenständiges, aber nicht funktionelles Gen handelt, sehen andere Arbeitsgruppen die Sequenz als ein Exon von *mgimap8* (Nitta *et al.*, 2004), ohne allerdings bisher einen funktionellen Beweis zu liefern. Unter der als 'IAN9' in der Datenbank hinterlegten Sequenz (Nitta *et al.*, 2004) handelt es sich nach Ansicht der Autoren um ein nicht kodierendes Exon von *mgimap8*, das durch ein etwa 5,7 kB großes Intron von Exon 5 getrennt ist (Abbildung 9). Angesichts der schon in Kapitel 3.2 aufgezeigten überdurchschnittlich großen Introns von *mgimap8* ist das zwar vorstellbar, aber die Orientierung der Sequenz, die gegensätzlich zu den anderen Exons ist, spricht eher dagegen. Zudem wurde die als 'IAN9' bezeichnete Sequenz nur aufgrund von Computerdaten zusammengesetzt.

Phylogenetische Analysen auf DNA-Ebene (Abbildung 12) konnten zeigen, daß die Sequenz von *mgimap10* eine stärkere Ähnlichkeit zu *mgimap1* als zu *mgimap8* aufweist. Da aber auch die einzelnen AIG1-Domänen von *mgimap8* untereinander nicht alle starke Ähnlichkeit zueinander zeigen, spricht das weder für die Eigenständigkeit noch dagegen. Allerdings liegt aufgrund der Herkunftsanalyse mittels der Maximum-Likelihood-Methode (Abbildung 12) der Schluß nahe, daß *mgimap10* durch Duplikation von *mgimap1* entstanden sein könnte, nur daß im Laufe der Evolution durch Insertionen von einigen Nukleotiden das Leseraster unterbrochen wurde (Zhang *et al.*, 2003).

Ein Pseudogen konnte auch innerhalb der homologen *hgimap* Genfamilie des Menschen identifiziert werden. Das als *hgimap3* bezeichnete Gen wies ein unterbrochenes Leseraster auf und zeigte zusätzlich, ähnlich wie *mgimap10*, eine andere Orientierung der AIG1-Domäne. Das Gen wurde daher als Pseudogen klassifiziert, während sich das orthologe *mgimap3* hingegen als funktionell erwies (Krücken *et al.*, 2004; Daheron *et al.*, 2000).

#### 4.4 Aktivität und Kontrolle der *mgimap1* Expression

Die Regulation der Transkription von *gimap* Genen ist bisher nur unzureichend untersucht. Regulierende Sequenzen, die als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren dienen können, und für eine erfolgreiche Transkription durch die RNA-Polymerase II notwendig sind, liegen etwa 200 bp 'stromaufwärts' des Transkriptionsstarts (Young *et al.*, 1991). Bindestellen für den RNA-Polymerase II Komplex und Transkriptionsfaktoren werden als Promotor bezeichnet. Enhancer, regulierende Sequenzen die bis zu mehreren 1000 Basen sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung von der Kern-Promotorregion entfernt liegen (Lewin, 2003), können auch über diese Entfernung die Transkription beeinflussen. Das Ziel der Untersuchung der Transkriptionskontrolle von *mgimap1* war, neben dem Sequenzbereich in der Nähe des ersten Exons, auch die Analyse von Regionen, die mehrere Kilobasen von dieser Position entfernt lagen (Merika and Thanos, 2001).

Die Aktivität von regulativen Elementen innerhalb der 5'-flankierenden Region des *mgimap1* Gens wurde in CHO-KI-Zellen und drei verschiedenen Mauszelllinien untersucht. Das größte Reportergenkonstrukt umfaßte einen Bereich von 5495 Basen, der neben der 5'-flankierenden Region auch die ersten zehn Basen des bisher bekannten 5'-UTR-Bereiches (NM\_008376) beinhaltete. Dieser Bereich wurde mittels einer Verkürzung des 5'-Bereiches (Abbildung 22) in mehrere Abschnitte unterteilt und diese in einem Reportergensystem analysiert. In einer der vier untersuchten Zelllinien zeigten sich spezifische Unterschiede zwischen den einzelnen Fragmenten. In den CHO-KI-Zellen waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Deletionsklonen meßbar, während sich in den Mauszelllinien NIH3T3, RAW 264.7 und ANA-I keine oder allenfalls sehr schwache Aktivitäten nachweisen ließen. In den CHO-KI-Zellen zeigte das Plasmid mit dem größten Konstrukt die höchste Aktivität aller Fragmente, während das nächstkleinere Fragment schon deutlich weniger aktivierende Wirkung zeigte. Vergleiche der Sequenz mit den in der TRANSFAC-Datenbank hinterlegten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ergaben zahlreiche mögliche Bindestellen für Proteine der GATA-Familie sowie PU.1. Bindestellen für den letztgenannten Transkriptionsfaktor fanden sich auch in dem kleinsten Deletionsklon (-107pblue/+10), der die zweithöchste Aktivität der in CHO-KI-Zellen untersuchten Bereiche aufwies (Abbildung 23). Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie kontrollieren diverse Entwicklungsprozesse in Vertebraten (Molkentin *et al.*, 2000; Patient and McGhee, 2002; Weiss and Orkin,

1995). GATA-1 wird in der Maus vor allem in Testis-Gewebe (Pevny *et al.*, 1991; Rylski *et al.*, 2003) exprimiert und aktiviert dort mehrere Promotoren (Ito *et al.*, 1993; Cairns *et al.*, 1994). Das Protein enthält eine C-terminale Zink-Finger-Struktur, die essentiell für die DNA-Bindung ist (Martin and Orkin, 1990) und eine Interaktion mit dem Faktor SP1 ermöglicht (Merika and Orkin 1995), sowie eine N-terminale Zink-Finger-Struktur, die die DNA-Bindung stabilisiert. GATA-3, dessen mögliche Bindestelle sich ebenfalls innerhalb der untersuchten Sequenz identifizieren ließ, wirkt aktivierend auf die Produktion von zellspezifischen T<sub>H</sub>2-Cytokinen, wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-13 (Zhang *et al.*, 1999), sowie auf die Entwicklung von Lymphozyten (Oosterwegel *et al.*, 1992). Dabei kann GATA-3 inhibierend auf die Entwicklung zu T<sub>H</sub>1-Zellen wirken (Ouyang *et al.*, 1998).

PU.1-Konsensus-Bindemotive finden sich sowohl zwischen den Sequenz-Regionen -5485pblue/+10 und -3188pblue/+10, als auch innerhalb der Region, die der Deletionsklon -5485/+10 repräsentiert (Abbildung 21). Pu.1 ist ein in B-Zellen und in myeloiden Zellen exprimiertes Protein, daß vor allem in Erythro-Leukämie-Zelllinien auf hohem Niveau exprimiert wird (Rao *et al.*, 1997; Moreau-Gachelin *et al.*, 1996). Außerdem kann dieser Faktor die GATA-1 Funktion durch direkte Protein-Protein-Interaktionen blockieren (Zhang *et al.*, 2000).

Im Bereich der Sequenzregionen zwischen den Positionen -5485 und -3188 (Abbildung 21) konnten neben den schon beschriebenen PU.1-Konsensusmotiven auch putative Bindestellen für AP-1 und NF- $\kappa$ B identifiziert werden. Diese beiden Faktoren nehmen durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren *c-jun* und *c-Fos* Einfluß auf aktivierte T-Zellen (McCaffrey *et al.*, 1993) sowie auf die Expression in Thymus und Milz (Northrop *et al.*, 1994). Hohe Expressionsraten des *mgimap1* Gens konnten in eben diesen Geweben beobachtet werden (J. Krücken, persönliche Mitteilung), was eine Übereinstimmung mit den TRANSFAC-Ergebnissen zeigt und auf die regulative Funktion dieser Sequenz-Region hindeutet.

Gegenüber den bisher beschriebenen, eher aktivierenden Bereichen am äußersten 5' und 3'-Ende der untersuchten Sequenz, fand sich vor allem im mittleren Bereich, der durch die Klone -213pblue/+10 bis -864pblue/+10 erfaßt wurde, eine deutliche Inhibierung der Transkription. Die gemessenen Aktivitäten gingen bis auf das Niveau des Kontrollvektors herunter (vgl. Klon -1085pblue/+10 und Klon -768pblue/+10 in Abbildung 23). Dieser Sequenzbereich enthält offenbar 'Silencer'-Sequenzen, die einen reprimierenden Einfluß auf die Transkription ausüben können. In diesem Bereich konnten jedoch lediglich die schon beschriebenen GATA-Bindestellen gefunden werden. GATA-1 z.B. kann zelltypspezifisch auch reprimierend wirken. Dieses wurde bisher u.a. in Lunge, Niere, Herz, T-Zellen und Fibroblasten beobachtet (Ito *et al.*, 1993). Da der Reporter-gen-Assay in den untersuchten Maus-Fibroblasten nicht funktionierte, konnten in dieser Hinsicht auch keine Aussagen dazu getroffen werden, ob die GATA-Bindestellen in diesem Gewebe den beschriebenen Einfluß auf die Transkription ausüben.

Die in den Maus-Zelllinien ANA-I und RAW 264.7 gemessenen RLU-Werte der Positivkontrolle ergaben, daß die Zellen nicht oder nur unzureichend mit den Reporter-gen-plasmiden transfiziert waren, um Aussagen über die Aktivität der einzelnen Deletionsklone zu treffen. Nähere Aussagen, ob *mgimap1* in diesen Zellen einer Regulation unterliegt, konnten daher nicht getroffen werden. Vorher müssen geeignete Methoden gefunden werden, um diese Zellen effizient zu transfizieren. Weiterhin sollten die Konstrukte in anderen Mauszellen untersucht werden.

Untersuchungen einer Sequenz-Region vor dem Transkriptionsstart des homologen *hgimap1* Gens konnten zeigen, daß *hgimap1* offensichtlich eine gewebespezifische Expression zeigt.

Eine erhöhte Aktivität des Promotors konnte dabei vor allem in immunologisch relevanten Zellen festgestellt werden, wobei vor allem in Makrophagenzellen eine Aktivierung über Artgrenzen hinweg gezeigt werden konnte (Stamm, 2001).

## 4.5 Ausblick

Die Untersuchungen zur Charakterisierung von *mgimap8* haben gezeigt, daß die Expression, ähnlich der anderer *gimap* Gene, verstärkt in lymphoiden Geweben auftritt. In der Sequenz konnten drei putative GTP-Bindungsstellen identifiziert werden. Um zu zeigen, daß alle drei Bindungsstellen auch funktionell sind, muß die GTP-Bindung nachgewiesen werden. Bisher wurde eine GTP-Bindung bereits für *mgimap3*, *hgimap1* und *hgimap4* nachgewiesen (Daheron *et al.*, 2001; Stamm *et al.*, 2001; Cambot *et al.*, 2002).

Dem mGIMAP8-Protein konnte eine Rolle in Apoptoseprozessen in CHO-KI-Zellen zugewiesen werden. Untersuchungen in anderen als den bisher untersuchten Mauszelllinien können zusammen mit Proteinmutanten zur genaueren Charakterisierung des Proteins beitragen, das innerhalb der Zelle am ER lokalisiert ist. Bindungsstudien könnten dazu beitragen, die Interaktionspartner in der Signalkette zu finden, die zur Inhibierung der Apoptose führen. Möglicherweise kann so auch auf Funktionen anderer, bisher nicht näher charakterisierter, *gimap* Gene geschlossen werden.

Die Analysen der 5'-flankierenden Region von *mgimap1* konnten aktivierende Sequenzen nachweisen, die für die in dieser Arbeit gezeigte, gewebespezifische Expression verantwortlich sein könnten. Allerdings konnten die Deletionsklone bisher nur in CHO-KI-Zellen untersucht werden, da die übrigen untersuchten Zelllinien sich nicht transfizieren ließen. Für eine genaue Identifikation der Sequenzen in CHO-KI-Zellen ist zum einen eine weitere Eingrenzung der aktivierenden oder reprimierenden Regionen nötig, zum anderen gilt es, die Interaktion dieser Sequenzen mit den zugehörigen Regulationsproteinen nachzuweisen. Die Messung der Deletionsklone in weiteren Mauszelllinien geben dabei vielleicht Aufschluß über bisher noch nicht gefundene Regulationssequenzen. Da auch *mgimap1* einer gewebespezifischen Expression unterliegt, müssen geeignete Transfektionsmethoden gefunden werden (z.B. GeneGun), um die Reporterplasmide in verschiedene Mausgewebe-Zelllinien zu transfizieren. Diese Ergebnisse können so zu einem grundlegenden Verständnis der Expressionsregulierung innerhalb der *gimap* Gene beitragen.

## 5.0 Zusammenfassung

Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals ein Gen identifizieren, dessen Expression gewebespezifisch durch Malaria reguliert wird. Dieses Gen erwies sich als Mitglied einer größeren Genfamilie, die nur in Vertebraten und höheren Pflanzen vorkommen und für neuartige GTPasen kodieren. Diese Gene sind offenbar für den Ausgang verschiedener Krankheiten wichtig. In der Maus existieren 9 Gene in einem 'Cluster' auf Chromosom 6B. In dieser Arbeit sollte ein 5'-flankierender Bereich von *mgimap1*, sowie die Gene *mgimap8* und *mgimap10* als weitere Vertreter dieser Genfamilie näher charakterisiert werden.

Die Untersuchungen einer 5'-flankierenden Region des *mgimap1* Gens konnte mögliche regulative Sequenzen in CHO-KI-Zellen nachweisen. In diesen Zellen konnten sowohl die Transkription aktivierende, als auch mögliche reprimierende Sequenzen nachgewiesen werden, in denen sich Motive für putative Bindestellen für Proteine der GATA-Familie und Pu.1 fanden. Diese sind für eine gewebespezifische Induzierung der Genexpression in zahlreichen Organismen verantwortlich. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich solche regulativen Elemente auch in den 5'-flankierenden Bereichen anderer *mgimap* Gene nachweisen lassen. Möglicherweise sind diese Elemente auch für die gezeigte gewebespezifische Regulation anderer *mgimap* Gene verantwortlich.

Die kodierende Region des *mgimap8* Gens besteht aus 5 Exons, wobei der genaue 5'- und 3'-UTR-Bereich bisher nicht bekannt ist. Das Gen erstreckt sich im Genom über einen Bereich von 11,9 kB. Die kodierende cDNA umfaßt 2067 bp und kodiert für ein Protein aus 688 Aminosäuren. Datenbank-Recherchen ergaben zwei weitere Sequenzvarianten. Während die erste Variante (XM\_144696.2) neben der Erweiterung des 5'- und 3'-Endes auch eine Erweiterung des Leserasters um 73 Aminosäuren aufweist, zeigte die zweite Variante (AB178029.1) lediglich einen erweiterten 5'- und 3'-UTR Bereich. Beide Varianten wurden jedoch mit der Hilfe von Computern erstellt und konnten nicht experimentell bestätigt werden.

Eine Expression der 2067 bp umfassenden kodierenden Region konnte zeigen, daß das mGIMAP8-Protein am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und damit Gemeinsamkeiten mit anderen GIMAP-Proteinen zeigt. Die Untersuchung der Proteinstruktur ergab die für GIMAP-Proteine ungewöhnlich hohe Anzahl von drei AIG1-Domänen. Ebenso tritt die allen GIMAP-Proteinen gemeinsame 'coiled-coil'-Domäne dreimal auf. Das *mgimap8* Gen wird vermehrt in lymphoiden Organen, vor allem aber im Thymus, exprimiert. Eine Überexpression von *mgimap8* in einer Mausfibroblasten-Zelllinie und CHO-KI-Zellen konnte künstlich ausgelöste Apoptose signifikant reduzieren und zeigte damit Parallelen zu anderen GIMAP-Proteinen, die eine Rolle in der Verhinderung des programmierten Zelltods in Zellen des Immunsystems spielen.

Die Analyse der *mgimap10*-Sequenz ergab mehrere Stop-Codons in allen drei möglichen Leserastern. 'Northern-Analysen' konnten zudem keinen Nachweis für ein Transkript erbringen und zeigten damit, daß es sich um ein Pseudogen handelte. Auf DNA-Ebene konnten starke Ähnlichkeiten zur Sequenz des *mgimap1* Gens nachgewiesen werden. Somit könnte *mgimap10* durch eine Duplikation des *mgimap1* Gens entstanden sein und durch Mutationen seine Funktion eingebüßt haben. Damit zeigen sich Parallelen zur humanen *gimap* Genfamilie, in der sich eines von neun Genen als Pseudogen herausstellte.

Diese Arbeit konnte somit zwei völlig neue Vertreter der *gimap* Genfamilie charakterisieren und, neben der besonderen Struktur von *mgimap8*, auch dessen Beteiligung an Apoptoseprozessen nachweisen.

## 6.0 Literatur

- Achtman, A.H., Khan, M., MacLennan, I.C. and Langhorne, J. (2003) *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J. Immunol.* 171, 317-324.
- Adhya S. Multipartite genetic control elements: communication by DNA looping. *Science* 245, 371-378. 1989.
- Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J. and Rabbege, J. (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites - moving junction between erythrocyte and parasite. *Journal of Cell Biology* 77, 72-82.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Altschul, S.F. and Lipman, D.J. (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 5509-5513.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Altschul, S.F. and Koonin, E.V. (1998) Iterated profile searches with PSI-BLAST - a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem. Sci.* 23, 444-447.
- Andersen, U.N., Markholst, H. and Hornum, L. The anti-apoptotic gene lan411 in the rat: genomic organisation and promotor characterisation. unpublished . 2004.
- Baud, V. and Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 11, 372-377.
- Beale, E.G., Deeb, E.A., Handley, R.S., Akhavan-Tafti, H. and Schaap, A.P. (1992) A rapid and simple chemiluminescent assay for *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Biotechniques* 12, 320-323.
- Behr, C. (1996) [Immunopathology of malaria: emergence of a new T-lymphocyte reactivity]. *C R. Seances Soc. Biol. Fil.* 190, 357-368.
- Benten, W.P.M., Bettenhaeuser, U., Wunderlich, F., Vanvliet, E. and Mossmann, H. (1991) Testosterone-induced abrogation of self-healing of *Plasmodium chabaudi* malaria in B10 Mice - Mediation by Spleen-Cells. *Infection and Immunity* 59, 4486-4490.
- Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z.Y. and Wunderlich, F. (1999) Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Molecular Biology of the Cell* 10, 3113-3123.
- Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H. and Wunderlich, F. (1999) Functional testosterone receptors in plasma membranes of T-cells. *Faseb Journal* 13, 123-133.
- Berenbaum, M. R. Blutsauger, Staatsgründer, Seidenfabrikanten. 1997. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R. and Cullen, B.R. (1988) Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66, 1-10.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Fütterer, A., Pfeffer, K. and Howard, J.C. (1998) Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN- $\gamma$ . *Journal of Immunology* 161, 6715-6723.
- Bouharoun-Tayoun, H., Oeuvray, C., Lunel, F. and Druilhe, P. (1995) Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood Stages. *Journal of Experimental Medicine* 182, 409-418.

- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M. and Shore, G.C. (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608-8618.
- Burt, R.A., Marshall, V.M., Wagglan, J., Rodda, F.R., Senyschen, D., Baldwin, T.M., Buckingham, L.A. and Foote, S.J. (2002) Mice that are congenic for the *char2* locus are susceptible to malaria. *Infection and Immunity* 70, 4750-4753.
- Butcher, G.A. (1996) Models for malaria: Nature knows best. *Parasitology Today* 12, 378-382.
- Cambot, M., Aresta, S., Kahn-Perles, B., de Gunzburg, J. and Romeo, P.H. (2002) *Human Immune Associated Nucleotide 1*: a member of a new guanosine triphosphatase family expressed in resting T and B cells. *Blood* 99, 3293-3301.
- Carlo, T., Sterner, D.A. and Berget, S.M. (1996) An intron splicing enhancer containing a G-rich repeat facilitates inclusion of a vertebrate micro-exon. *RNA-A Publication of the RNA Society* 2, 342-353.
- Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Pertea, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., Koo, H.L., Peterson, J.D., Pop, M., Kosack, D.S., Shumway, M.F., Bidwell, S.L., Shallom, S.J., van Aken, S.E., Riedmuller, S.B., Feldblyum, T.V., Cho, J.K., Quackenbush, J., Sedegah, M., Shoaibi, A., Cummings, L.M., Florens, L., Yates, J.R., Raine, J.D., Sinden, R.E., Harris, M.A., Cunningham, D.A., Preiser, P.R., Bergman, L.W., Vaidya, A.B., Van Lin, L.H., Janse, C.J., Waters, A.P., Smith, H.O., White, O.R., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Fraser, C.M., Hoffman, S.L., Gardner, M.J. and Carucci, D.J. (2002) Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 419, 512-519.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate Phenol Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Chomczynski, P. (1992) One-Hour Downward Alkaline Capillary Transfer for Blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry* 201, 134-139.
- Choong, M.L., Luo, B. and Lodish, H.F. (2004) Microenvironment-driven changes in the expression profile of hematopoietic cobblestone area-forming cells. *Annals of Hematology* 83, 160-169.
- Clark, S.S., McLaughlin, J., Timmons, M., Pendergast, A.M., Ben Neriah, Y., Dow, L.W., Crist, W., Rovera, G., Smith, S.D. and Witte, O.N. (1988) Expression of a distinctive *BCR-ABL* oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science* 239, 775-777.
- Clarke, T. Malaria is killing one African child every 30 seconds. 2003. Nature Science update.
- Claros, M.G. and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry* 241, 779-786.
- Clyde, D.F. (1989) Epidemiologic significance of immunity in vivax malaria. *Epidemiol. Rev.* 11, 109-125.
- Clyde, D.F. (1990) Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bull. World Health Organ* 68 Suppl, 9-12.
- Coffman, R.L., Leberman, D.A. and Rothman, P. (1993) Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol.* 54, 229-270.
- Cohen, S. and Lambert P.H. (1982) *Immunology of parasitic infections*. Oxford, GB: Blackwell Science Publications.
- Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2003) Functional genomics: identifying drug targets for parasitic diseases. *Trends in Parasitology* 19, 538-543.
- Cox, F.E. (2002) History of human parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 595-612.
- Daheron, L., Zenz, T., Siracusa, L.D., Brenner, C. and Calabretta, B. (2001) Molecular cloning of *Ian4*: a *BCR/ABL*-induced gene that encodes an outer membrane mitochondrial protein with GTP-binding activity. *Nucleic Acids Research* 29, 1308-1316.

- De Souza, J.B., Williamson, K.H., Otani, T. and Playfair, J.H.L. (1997) Early gamma interferon responses in lethal and non-lethal murine blood-stage malaria. *Infection and Immunity* 65, 1593-1598.
- Deutsch, M. and Long, M. (1999) Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res.* 27, 3219-3228.
- Doolittle, W.F. (1990) In *Intervening Sequences in Evolution and Development* ed. Stone, E.M. and Schwartz, R.J. pp. 43-62. Oxford University Press.
- Dvorak, J.A., Miller, L.H., Whitehouse, W.C. and Shiroishi, T. (1975) Invasion of Erythrocytes by Malaria Merozoites. *Science* 187, 748-750.
- Epe, M. Regulation des *Plasmodium chabaudi* induzierbaren *imap38*: Analysen mittels quantitativer PCR. 2001. Diplomarbeit.
- Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3.5c. Distributet by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle . 1993.
- Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y.M., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R. and Carucci, D.J. (2002) A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419, 520-526.
- Frankish, H. (2003) Money being wasted in fight against malaria, says MSF. *Lancet* 361, 1530.
- Fransson, A., Ruusala, A. and Aspenstrom, P. (2003) Atypical Rho-GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6495-6502.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
- Garnier, J., Gibrat, J.F. and Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* 266, 540-553.
- Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K.C., Burch, P.E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., Holt, R.A., Adams, M.D., Amanatides, P.G., Baden-Tillson, H., Barnstead, M., Chin, S., Evans, C.A., Ferriera, S., Fosler, C., Glodek, A., Gu, Z.P., Jennings, D., Kraft, C.L., Nguyen, T., Pfannkoch, C.M., Sitter, C., Sutton, G.G., Venter, J.C., Woodage, T., Smith, D., Lee, H.M., Gustafson, E., Cahill, P., Kana, A., Doucette-Stamm, L., Weinstock, K., Fechtel, K., Weiss, R.B., Dunn, D.M., Green, E.D., Blakesley, R.W., Bouffard, G.G., de Jong, J., Osoegawa, K., Zhu, B.L., Marra, M., Schein, J., Bosdet, I., Fjell, C., Jones, S., Krzywinski, M., Mathewson, C., Siddiqui, A., Wye, N., McPherson, J., Zhao, S.Y., Fraser, C.M., Shetty, J., Shatsman, S., Geer, K., Chen, Y.X., Abramzon, S., Nierman, W.C., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Havlak, P.H., Chen, R., Durbin, K.J., Egan, A., Ren, Y.R., Song, X.Z., Li, B.S., Liu, Y., Qin, X., Cawley, S., Weinstock, G.M., Worley, K.C., Cooney, A.J., Gibbs, R.A., D'Souza, L.M., Martin, K., Wu, J.Q., Gonzalez-Garay, M.L., Jackson, A.R., Kalafus, K.J., Mcleod, M.P., Milosavljevic, A., Virk, D., Volkov, A., Wheeler, D.A., Zhang, Z.D., Bailey, J.A., Eichler, E.E., Tuzun, E., Birney, E., Mongin, E., Ureta-Vidal, A., Woodwark, C., Zdobnov, E., Bork, P., Suyama, M., Torrents, D., Alexandersson, M., Trask, B.J., Young, J.M., Smith, D., Huang, H., Fechtel, K., Wang, H.J., Xing, H.M., Weinstock, K., Daniels, S., Gietzen, D., Schmidt, J., Stevens, K., Vitt, U., Wingrove, J., Camara, F., Schmidt, J., Stevens, K., Vitt, U., Wingrove, J., Camara, F., Alba, M.M., Abril, J.F., Guigo, R., Smit, A., Dubchak, I., Rubin, E.M., Couronne, O., Poliakov, A., Hubner, N., Ganten, D., Goesele, C., Hummel, O., Kreitler, T., Lee, Y.A., Monti, J., Schulz, H., Zimdahl, H., Himmelbauer, H., Lehrach, H., Jacob, H.J., Bromberg, S., Gullings-Handley, J., Jensen-Seaman,

- M.I., Kwitek, A.E., Lazar, J., Pasko, D., Tonellato, P.J., Twigger, S., Ponting, P., Duarte, J.M., Rice, S., Goodstadt, L., Beatson, S.A., Emes, R.D., Winter, E.E., Webber, C., Brandt, P., Nyakatura, G., Adetobi, M., Chiaromonte, F., Elnitski, L., Esvara, P., Hardison, R.C., Hou, M.M., Kolbe, D., Makova, K., Miller, W., Nekrutenko, A., Riemer, C., Schwartz, S., Taylor, J., Yang, S., Zhang, Y., Lindpaintner, K., Andrews, T.D., Caccamo, M., Clamp, M., Clarke, L., Curwen, V., Durbin, R., Eyraas, E., Searle, S.M., Cooper, G.M., Batzoglou, S., Brudno, M., Sidow, A., Stone, E.A., Venter, J.C., Payseur, B.A., Bourque, G., Lopez-Otin, C., Puente, X.S., Chakrabarti, K., Chatterji, S., Dewey, C., Pachter, L., Bray, N., Yap, V.B., Caspi, A., Tesler, G., Pevzner, P.A., Haussler, D., Roskin, K.M., Baertsch, R., Clawson, H., Furey, T.S., Hinrichs, A.S., Karolchik, D., Kent, W.J., Rosenbloom, K.R., Trumbower, H., Weirauch, M., Cooper, D.N., Stenson, P.D., Ma, B., Brent, M., Arumugam, M., Shteynberg, D., Copley, R.R., Taylor, M.S., Riethman, H., Mudunuri, U., Peterson, J., Guyer, M., Felsenfeld, A., Old, S., Mockrin, S. and Collins, F. (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428, 493-521.
- Giha, H.A., Staalsoe, T., Dodo, D., Elhassan, I. M., Roper, C., Satti, G.M., Arnot, D.E., Theander, T.G. and Hviid, L. (1999) Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect. Immun.* 67, 4092-4098.
- Good, M.F. and Doolan, D.L. (1999) Immune effector mechanisms in malaria. *Current Opinion in Immunology* 11, 412-419.
- Good, M.F. (2001) Towards a blood-stage vaccine for malaria: Are we following all the leads? *Nature Reviews Immunology* 1, 117-125.
- Grassi, B. Studi di uno zoologo sulla malaria. *Atti.Reale Accad.Lincei Mem.* 3, 299-511. 1900.
- Greenwood, B. and Alonso, P. (2002) Malaria vaccine trials. *Malaria Immunology, 2nd Edition* 80, 366-395.
- Greiner, D.L., Mordes, J.P., Handler, E.S., Nakamura, N. and Rossini, A.A. (1986) RT6<sup>+</sup> Peripheral T-cells are absent in Bb/W rats due to developmental defects. *Diabetologia* 29, A542-A543.
- Greiner, D.L., Handler, E.S., Nakano, K., Mordes, J.P. and Rossini, A.A. (1986) Absence of the RT6<sup>+</sup> T-cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J. Immunol.* 136, 148-151.
- Grollman, A. Inhibitors of protein biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 242[13], 3226-3233. 1967.
- Guindon, S. and Gascuel, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52[5], 696-704. 2003.
- Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I. and Borner, C. (2000) Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by *Bcl-2*. *Oncogene* 19, 2286-2295.
- Hansen, A. (2004) *Bioinformatik - Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler*. Birkhäuser Verlag.
- Hawkins, J.D. (1988) A Survey on Intron and Exon Lengths. *Nucleic Acids Research* 16, 9893-9908.
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A., Podkolodny, N.L. and Kolchanov, N.A. (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26, 362-367.
- Heymann, D. The Urgency of a Massive Effort against Infectious Diseases. World Health Organisation . 2000.
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.M., Wides, R., Salzberg, S.L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W.H., Rusch, D.B., Lai, Z., Kraft, C.L., Abril, J.F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Baden, H., deB.V, Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chaturverdi, K., Christophides, G.K., Chrystal, M.A., Clamp, M., Cravchik, A.,

- Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C.A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M.E., Hladun, S.L., Hogan, J.R., Hong, Y.S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J.J., Lobo, N.F., Lopez, J.R., Malek, J.A., McIntosh, T.C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S.D., O'Brochta, D.A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M.A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, V., Sitter, C.D., Shetty, J., Smith, T.J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L.Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M.F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K.J., Wortman, J.R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E.M., Zhang, H., Zhao, Q., Zhao, S., Zhu, S.C., Zhimulev, I., Coluzzi, M., della, T.A., Roth, C.W., Louis, C., Kalush, F., Mural, R.J., Myers, E.W., Adams, M.D., Smith, H.O., Broder, S., Gardner, M.J., Fraser, C.M., Birney, E., Bork, P., Brey, P.T., Venter, J.C., Weissenbach, J., Kafatos, F.C., Collins, F.H. and Hoffman, S.L. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149.
- Hornum, L., Romer, J. and Markholst, H. (2002) The diabetes-prone BB rat carries a frameshift mutation in *Ian4*, a positional candidate of *Iddm1*. *Diabetes* 51, 1972-1979.
- Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (1993) Erythroid Transcription Factor GATA-1 Is Abundantly Transcribed in Mouse Testis. *Nature* 362, 466-468.
- Jain, V.K. and Magrath, I.T. (1991) A chemiluminescent assay for quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in *lacZ*-transfected cells. *Anal. Biochem.* 199, 119-124.
- Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W. and Hwang, I. (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1511-1525.
- Jin, J.B., Bae, H.J., Kim, S.J., Jin, Y.H., Goh, C.H., Kim, D.H., Lee, Y.J., Tse, Y.C., Jiang, L.W. and Hwang, I.W. (2003) The arabidopsis dynamin-like proteins ADL1C and ADU1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis. *Plant Cell* 15, 2357-2369.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D. and Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 285, 1573-1576.
- Joulin, V., Bories, D., Eleouet, J.F., Labastie, M.C., Chretien, S., Mattei, M.G. and Romeo, P.H. (1991) A T-cell specific TCR- $\delta$  DNA-binding protein is a member of the human GATA family. *Embo Journal* 10, 1809-1816.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N. and Givol, D. (2001) DNA microarray analysis of genes involved in *p53* mediated apoptosis: activation of *Apaf-1*. *Oncogene* 20, 3449-3455.
- Kaslow, D.C., Bathurst, I.C., Lensen, T., Ponnudurai, T., Barr, P.J. and Keister, D.B. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant Pfs25 Adsorbed to Alum Elicits Antibodies That Block Transmission of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity* 62, 5576-5580.
- Kleinig and Sitte (1999) Zellbiologie. In *Zellbiologie* Gustav Fischer Verlag.
- Ko, L.J., Yamamoto, M., Leonard, M.W., George, K.M., Ting, P. and Engel, J.D. (1991) Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer. *Mol. Cell Biol.* 11, 2778-2784.
- Kobayashi, F., Morii, T., Matsui, T., Fujino, T., Watanabe, Y., Weidanz, W.P. and Tsuji, M. (1996) Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and non-lethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitology Research* 82, 385-391.
- Kozak, M. (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic messenger-RNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9, 5134-5142.

- Kozak, M. (1997) Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *Embo Journal* 16, 2482-2492.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krauss, G. (2003) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-VCH.
- Kriventseva, E.V. and Gelfand, M.S. (1999) Statistical analysis of the exon-intron structure of higher and lower eukaryote genes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 17, 281-288.
- Krotoski, W.A., Collins, W.E., Bray, R.S., Garnham, P.C., Cogswell, F.B., Gwadz, R.W., Killick-Kendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L.C. and Stanfill, P.S. (1982) Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 1291-1293.
- Krücken, J., Schmitt-Wrede, H.P., Markmann-Mulisch, U. and Wunderlich, F. (1997) Novel gene expressed in spleen cells mediating acquired testosterone-resistant immunity to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230, 167-170.
- Krücken, J., Stamm, O., Schmitt-Wrede, H.P., Mincheva, A., Lichter, P. and Wunderlich, F. (1999) Spleen-specific expression of the malaria-inducible intronless mouse gene *imap38*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24383-24391.
- Krücken, J., Schroetel, R.U.M., Müller, I.U., Saidani, N., Marinovski, P., Benten, W. P. M., Stamm, O. and Wunderlich, F. Comparative analysis of the human *gimap* gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene* 341, 291-304. 2004.
- Kwiatkowski, D., Molyneux, M.E., Stephens, S., Curtis, N., Klein, N., Pointaire, P., Smit, M., Allan, R., Brewster, D.R. and Grau, G.E. (1993) Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q. J. Med.* 86, 91-98.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10, 203-209.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Langhorne, J. (1989) The Role of CD4<sup>+</sup> T-Cells in the immune-response to *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology Today* 5, 362-364.
- Langhorne, J. and Simon, B. (1989) Limiting dilution analysis of the T-cell response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. *Parasite Immunology* 11, 545-559.
- Langhorne, J., Gillard, S., Simon, B., Slade, S. and Eichmann, K. (1989) Frequencies of CD4<sup>+</sup> T-cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 characteristics during infection. *Int. Immunol.* 1, 416-424.
- Langhorne, J., Simonhaarhaus, B. and Meding, S.J. (1990) The Role of CD4<sup>+</sup> T-Cells in the protective immune-response to *Plasmodium chabaudi* *invivo*. *Immunology Letters* 25, 101-108.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lell, B., Ruangweeraayut, R., Wiesner, J., Missinou, M.A., Schindler, A., Baranek, T., Hintz, M., Hutchinson, D., Jomaa, H. and Kremsner, P.G. (2003) Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 735-738.
- Leonard, W.J., Halden, N.F., Lenardo, M.F. and Cross, S.L. (1989) Functionally distinct NF- $\kappa$ B binding-sites in the immunoglobulin (Ig)- $\kappa$  and Interleukin-2 receptor  $\alpha$ -Chain (IL2R- $\alpha$ ) Genes. *Clinical Research* 37, A557.

- Lesk (2004) Alignments und phylogenetische Stammbäume. In *Bioinformatik* ed. Lesk, A.M. Spektrum Akademischer Verlag.
- Li, C., Seixas, E. and Langhorne, J. (2001) Rodent malaras: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical Microbiology and Immunology* 189, 115-126.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L. and Darnell, J. (2004) Molecular mechanisms of transcription activation and repression. In *Molecular Cell Biology*.
- Lou, J., Donati, Y.R., Juillard, P., Giroud, C., Vesin, C., Mili, N. and Grau, G.E. (1997) Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am. J. Pathol.* 151, 1397-1405.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M. and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of T<sub>H</sub>1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T-cells. *J. Immunol.* 154, 5071-5079.
- MacMurray, A.J., Moralejo, D.H., Kwitek, A.E., Rutledge, E.A., Van Yserloo, B., Gohlke, P., Speros, S.J., Snyder, B., Schaefer, J., Bieg, S., Jiang, J.J., Ettinger, R.A., Fuller, J., Daniels, T.L., Pettersson, A., Orlebeke, K., Birren, B., Jacob, H.J., Lander, E.S. and Lernmark, A. (2002) Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel *immune-associated nucleotide (lan)*-related gene. *Genome Research* 12, 1029-1039.
- Marsh, K., English, M., Crawley, J. and Peshu, N. (1996) The pathogenesis of severe malaria in African children. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 90, 395-402.
- Martin, D.I.K., Zon, L.I., Mutter, G. and Orkin, S.H. (1990) Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast-cell lineages. *Nature* 344, 444-447.
- McCaffrey, P.G., Luo, C., Kerppola, T.K., Jain, J., Badalian, T.M., Ho, A.M., Burgeon, E., Lane, W.S., Lambert, J.N., Curran, T., Verdine, G.L., Rao, A. and Hogan, P.G. (1993) Isolation of the cyclosporine-sensitive T-cell transcription factor NFATp. *Science* 262, 750-754.
- McCormick, T.S., Mccoll, K.S. and Distelhorst, C.W. (1997) Mouse lymphoma cells destined to undergo apoptosis in response to thapsigargin treatment fail to generate a calcium-mediated grp78/grp94 stress response. *Journal of Biological Chemistry* 272, 6087-6092.
- McCullough, C.T. and Harrison, D.J. (2001) Interferon- $\gamma$  and hepatocyte apoptosis. *Journal of Pathology* 193, 14A.
- McKenna, K.C., Tsuji, M., Sarzotti, M., Sacci, J.B., Jr., Witney, A.A. and Azad, A.F. (2000)  $\gamma\delta$ -T-cells are a component of early immunity against preerythrocytic malaria parasites. *Infect. Immun.* 68, 2224-2230.
- Meding, S.J., Cheng, S.C., Simonhaarhaus, B. and Langhorne, J. (1990) Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infection and Immunity* 58, 3671-3678.
- medizin.de. Malariatherapie ermöglicht Genomanalyse der Erreger. 2002.
- Merika, M. and Orkin, S.H. (1995) Functional Synergy and Physical Interactions of the Erythroid Transcription Factor GATA-1 with the Kruppel Family Proteins Sp1 and Eklf. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2437-2447.
- Merika, M. and Thanos, D. (2001) Enhanceosomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 205-208.
- Mermod, N., Williams, T.J. and Tjian, R. (1988) Enhancer binding factor-Ap-4 and factor-Ap-1 act in concert to activate Sv40 late transcription *in vitro*. *Nature* 332, 557-561.

- Miller, L.H., Hudson-Taylor, D., Gamain, B. and Saul, A.J. (2002) Definition of the minimal domain of CIDR1 alpha of *Plasmodium falciparum* PfEMP1 for binding CD36. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 321-323.
- Mishell, R.I., Shiigi, J.M., Mishell, B.B., Grabstein, K.H. and Shiigi, S.M. (1980) Prevention of the immunosuppressive effects of glucocorticosteroids by cell-free factors from adjuvant-activated accessory cells. *Immunopharmacology* 2, 233-245.
- Missinou, M.A., Borrmann, S., Schindler, A., Issifou, S., Adegnik, A.A., Matsiegui, P.B., Binder, R., Lell, B., Wiesner, J., Baranek, T., Jomaa, H. and Kremsner, P.G. (2002) Fosmidomycin for malaria. *Lancet* 360, 1941-1942.
- Mohan, K., Moulin, P. and Stevenson, M.M. (1997) Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* 159, 4990-4998.
- Mohan, K. and Stevenson, M.M. (1998) Interleukin-12 corrects severe anemia during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS in susceptible *A/J* mice. *Experimental Hematology* 26, 45-52.
- Molkentin, J.D., Tymitz, K.M., Richardson, J.A. and Olson, E.N. (2000) Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Molecular and Cellular Biology* 20, 5256-5260.
- Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal, M.R., Vieira, P. and Mosmann, T.R. (1993) Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165-190.
- Moralejo, D.H., Park, H.A., Speros, S.J., MacMurray, A.J., Kwitek, A.E., Jacob, H.J., Lander, E.S. and Lernmark, A. (2003) Genetic dissection of lymphopenia from autoimmunity by introgression of mutated *lan5* gene onto the F344 rat. *Journal of Autoimmunity* 21, 315-324.
- Moreau-Gachelin, F., Wendling, F., Molina, T., Denis, N., Titeux, M., Grimmer, G., Briand, P., Vainchenker, W. and Tavittian, A. (1996) Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol. Cell Biol.* 16, 2453-2463.
- Mossmann, H., Benten, W.P.M., Galanos, C., Freudenberg, M., Kuhn-Valten, W.N., Reinauer, H. and Wunderlich, F. (1997) Dietary testosterone suppresses protective responsiveness to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Life Sciences* 60, 839-848.
- Mulder, N.J., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Barrell, D., Bateman, A., Binns, D., Biswas, M., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Copley, R.R., Courcelle, E., Das, U., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Griffiths-Jones, S., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lopez, R., Letunic, I., Lonsdale, D., Silventoinen, V., Orchard, S.E., Pagni, M., Peyruc, D., Ponting, C.P., Selengut, J.D., Servant, F., Sigrist, C.J.A., Vaughan, R. and Zdobnov, E.M. (2003) The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Research* 31, 315-318.
- Najera, J. and Hempel, J. The Burden of Malaria. 1996.
- Nakagawa, T. and Yuan, J.Y. (2000) Caspase-12 mediates an ER-specific apoptosis pathway. *FASEB Journal* 14, A1586.
- Nakai, K. and Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 34-35.
- Nigam, S.K. (1990) Subcellular distribution of small GTP-binding-Proteins in pancreas - Identification of small GTP-binding-Proteins in the rough Endoplasmic Reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1296-1299.
- Nitta, T., Seike, T., Goji, A. and Takahama, Y. A novel member of the IAN family. published only in database. 2004.
- Northrop, J.P., Ho, S.N., Chen, L., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Nolan, G.P., Admon, A. and Crabtree, G.R. (1994) NF- $\kappa$ B components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497-502.

- Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. and Orton, C. (1967) Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216, 160-162.
- Nussler, A., Drapier, J.C., Renia, L., Pied, S., Miltgen, F., Gentilini, M. and Mazier, D. (1991) L-Arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to Tumor-Necrosis-Factor and/or Interleukin-6 stimulation. *European Journal of Immunology* 21, 227-230.
- Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B.L., Roth, J., McConkey, D.J. and Swisher, S.G. (2002) Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *Journal of Biological Chemistry* 277, 9219-9225.
- Obar, R.A., Collins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S. and Vallee, R.B. (1990) Molecular cloning of the Microtubule-associated mechanochemical enzyme Dynamin reveals homology with a New family of GTP-binding proteins. *Nature* 347, 256-261.
- Olsen, G.J., Matsuda, H., Hagstrom, R. and Overbeek, R. (1994) Fastdnaml - A Tool for construction of Phylogenetic trees of DNA-sequences using Maximum-Likelihood. *Computer Applications in the Biosciences* 10, 41-48.
- Omer, F.M., De Souza, J.B. and Riley, E.M. (2003) Differential induction of TGF- $\beta$  regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and non-lethal *Plasmodium yoelii* infections. *J. Immunol.* 171, 5430-5436.
- Oosterwegel, M., Timmerman, J., Leiden, J. and Clevers, H. (1992) Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis. *Dev. Immunol.* 3, 1-11.
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C. and Murphy, K.M. (1998) Inhibition of T<sub>H</sub>1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755.
- Pan, Z., Bhat, M.B., Nieminen, A.L. and Ma, J. (2001) Synergistic movements of Ca<sup>2+</sup> and Bax in cells undergoing apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32257-32263.
- Pandarpurkar, M., Wilson-Fritch, L., Corvera, S., Markholst, H., Hornum, L., Greiner, D.L., Mordes, J.P., Rossini, A.A. and Bortell, R. (2003) *lan4* is required for mitochondrial integrity and T-cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10382-10387.
- Parone, P.A., James, D. and Martinou, J.C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84, 105-111.
- Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G. and Trujillo, G. (1988) A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332, 158-161.
- Patient, R.K. and Mcghee, J.D. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 416-422.
- Patil, C. and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 349-356.
- Payne, F., Smyth, D.J., Pask, R., Barratt, B.J., Cooper, J.D., Twells, R.C.J., Walker, N.M., Lam, A.C., Smink, L.J., Nutland, S., Rance, H.E. and Todd, J.A. (2004) Haplotype tag single nucleotide polymorphism analysis of the human orthologues of the rat type 1 diabetes genes *lan4* (*Lyp/Idm1*) and *Cblb*. *Diabetes* 53, 505-509.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 2444-2448.
- Petrov, D.A. and Hartl, D.L. (1998) High rate of DNA loss in the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* species groups. *Mol. Biol. Evol.* 15, 293-302.

- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., Dagati, V., Orkin, S.H. and Costantini, F. (1991) Erythroid-differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.
- Poirier, G.M.C., Anderson, G., Huvar, A., Wagaman, P.C., Shuttleworth, J., Jenkinson, E., Jackson, M.R., Peterson, P.A. and Erlander, M.G. (1999) *Immune-associated nucleotide-1 (IAN-1)* is a thymic selection marker and defines a novel gene family conserved in plants. *Journal of Immunology* 163, 4960-4969.
- Prieur, E., Gilbert, S.C., Schneider, J., Moore, A.C., Sheu, E.G., Goonetilleke, N., Robson, K.J.H. and Hill, A.V.S. (2004) A *Plasmodium falciparum* candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 290-295.
- Quin, S.J., Seixas, E.M.G., Cross, C.A., Berg, M., Lindo, V., Stockinger, B. and Langhorne, J. (2001) Low CD4<sup>+</sup> T cell responses to the C-terminal region of the malaria merozoite surface protein-1 may be attributed to processing within distinct MHC class II pathways. *European Journal of Immunology* 31, 72-81.
- Rao, G., Rekhman, N., Cheng, G.H., Krasikov, T. and Skoultchi, A.I. (1997) Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene* 14, 123-131.
- Rathmell, J.C. and Thompson, C.B. (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109, S97-S107.
- Reuber, T.L. and Ausubel, F.M. (1996) Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the *RPS2* and *RPM1* disease resistance genes. *Plant Cell* 8, 241-249.
- Ridley, R.G. (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415, 686-693.
- Romeis, B. (1968) *Mikroskopische Technik*. München, Wien: Oldenburg Verlag.
- Rosenberg, R., Andre, R.G. and Ketrangsee, S. (1990) Seasonal Fluctuation of *Plasmodium falciparum* Gametocytaemia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 29-33.
- Rosenthal, P.J. (2003) Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J. Exp. Biol.* 206, 3735-3744.
- Ross, R. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *British medical Journal*, 1736-1788. 1897.
- Roswell, D.F. and White, E.H. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* 57, 409-423. 1978.
- Rylski, M., Welch, J.J., Chen, Y.Y., Letting, D.L., Diehl, J.A., Chodosh, L.A., Blobel, G.A. and Weiss, M.J. (2003) GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5031-5042.
- Sachs, J. and Malaney, P. (2002) The economic and social burden of malaria. *Nature* 415, 680-685.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Sandal, T., Aumo, L., Hedin, L., Gjertsen, B.T. and Doskeland, S.O. (2003) *Irod/Ian5*: An inhibitor of  $\gamma$ -radiation- and okadaic acid-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3292-3304.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.

- Schmitt-Wrede, H.P., Fiebig, S., Wunderlich, F., Benten, W.P.M., Bettenhauser, U., Boden, K. and Mossmann, H. (1991) Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria - variant protein expression in functionally changed splenic non-T-Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 76, 207-214.
- Schönfelder, U. Wettlauf mit dem Wechselfieber. 35. 2002. Die Zeit.
- Schug, J. and Overton, C. TESS: Transcription Element Search Software on the WWW'. Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0 Computational Biology and Informatics Laboratory School of Medicine . 1997. University of Pennsylvania. 1997.
- Schurmann, A., Mooney, A.F., Sanders, L.C., Sells, M.A., Wang, H.G., Reed, J.C. and Bokoch, G.M. (2000) p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist *Bad* and protects cells from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 20, 453-461.
- Seixas, E., Fonseca, L. and Langhorne, J. (2002) The influence of  $\gamma\delta$ -T-cells on the CD4<sup>+</sup> T-cells and antibody response during a primary *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Parasite Immunol.* 24, 131-140.
- Serfling E., Jasin, M. and Schaffner, W. Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends in Genetics* 1, 224-230. 1985.
- Serghides, L., Smith, T.G., Patel, S.N. and Kain, K.C. (2003) CD36 and malaria: friends or foes? *Trends in Parasitology* 19, 461-469.
- Shear, H.L., Srinivasan, R., Nolan, T. and Ng, C. (1989) Role of Ifn- $\gamma$  in lethal and non-lethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *Journal of Immunology* 143, 2038-2044.
- Sher, A., Pearce, E. and Kaye, P. (2003) Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 421-429.
- Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S. and Yamamoto, K. (1990) Involvement of A NF- $\kappa$ -b-Like transcription factor in the activation of the Interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Molecular and Cellular Biology* 10, 561-568.
- Shortt, H. E. and Garnham P.C.C. Pre-erythrocytic stages in mammalian malaria parasites. *Nature* 161, 126. 1948.
- Shpetner, H.S. and Vallee, R.B. (1989) Identification of Dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59, 421-432.
- Smith, T.F. and Waterman, M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.
- Stadler R. Süddeutsche Zeitung Magazin 25, 14-15. 2003.
- Stamm, O. Charakterisierung der homologen Gene *imap38* und *himap1* als Prototypen einer neuen Genfamilie in Maus und Mensch. 2001.
- Stamm, O., Krucken, J., Schmitt-Wrede, H.P., Benten, W.P.M. and Wunderlich, F. (2002) Human ortholog to mouse gene *imap38* encoding an ER-localizable G-protein belongs to a gene family clustered on chromosome 7q32-36. *Gene* 282, 159-167.
- Sterner, D.A., Carlo, T. and Berget, S.M. (1996) Architectural limits on split genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15081-15085.
- Stevenson, M.M. and Tam, M.F. (1993) Differential Induction of Helper T-Cell Subsets During Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* As Infection in Resistant and Susceptible Mice. *Clinical and Experimental Immunology* 92, 77-83.
- Stevenson, M.M., Su, Z., Sam, H. and Mohan, K. (2001) Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect.* 3, 49-59.

- Su, Z. and Stevenson, M.M. (2002) IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *Journal of Immunology* 168, 1348-1355.
- Tang, Y., Zhou, H.L., Chen, A., Pittman, R.N. and Field, J. (2000) The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *Journal of Biological Chemistry* 275, 9106-9109.
- Tatusova, T.A. and Madden, T.L. (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 247-250.
- Taylor, G.A., Stauber, R., Rulong, S., Hudson, E., Pei, V., Pavlakis, G.N., Resau, J.H. and VandeWoude, G.F. (1997) The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP-binding. *Journal of Biological Chemistry* 272, 10639-10645.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tomita, M., Shimizu, N. and Brutlag, D.L. (1996) Introns and reading frames: correlation between splicing sites and their codon positions. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1219-1223.
- Torrents, D., Suyama, M., Zdobnov, E. and Bork, P. (2003) A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Research* 13, 2559-2567.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S. and Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C. (1991) The Ras Protein Family - Evolutionary Tree and Role of Conserved Amino-Acids. *Biochemistry* 30, 4637-4648.
- Vater, C.A., Raymond, C.K., Ekena, K., Howaldstevenson, I. and Stevens, T.H. (1992) The Vps1 Protein, A Homolog of Dynamin Required for Vacuolar Protein Sorting in *Saccharomyces Cerevisiae*, Is A Gtpase with 2 Functionally Separable Domains. *Journal of Cell Biology* 119, 773-786.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.Q.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J.H., Miklos, G.L.G., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, C., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z.M., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W.M., Gong, F.C., Gu, Z.P., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z.X., Ketchum, K.A., Lai, Z.W., Lei, Y.D., Li, Z.Y., Li, J.Y., Liang, Y., Lin, X.Y., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B.X., Sun, J.T., Wang, Z.Y., Wang, A.H., Wang, X., Wang, J., Wei, M.H., Wides, R., Xiao, C.L., Yan, C.H., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W.Q., Zhang, H.Y., Zhao, Q., Zheng, L.S., Zhong, F., Zhong, W.Y., Zhu, S.P.C., Zhao, S.Y., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H.J., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H.Y., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D.,

- Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A.D., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X.J., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N. and Nodell, M. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1352.
- von der Weid, T. and Langhorne, J. (1993) The roles of cytokines produced in the immune response to the erythrocytic stages of mouse malaras. *Immunobiology* 189, 397-418.
- von der Weid, T. and Langhorne, J. (1993) Altered Response of CD4<sup>+</sup> T-cell Subsets to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in B-cell-deficient mice. *International Immunology* 5, 1343-1348.
- von der Weid, T., Kopf, M., Kohler, G. and Langhorne, J. (1994) The immune-response to *Plasmodium chabaudi* Malaria in Interleukin-4-deficient mice. *European Journal of Immunology* 24, 2285-2293.
- von der Weid, T., Honarvar, N. and Langhorne, J. (1996) Gene-targeted mice lacking B-cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *Journal of Immunology* 156, 2510-2516.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby, A., Kolbe, D.L., Korf, I., Kucherlapati, R.S., Kulbokas, E.J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J.P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., Mclay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Larty, E.O., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Strange-Thomann, N.S., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Vidal, A.U., Vinson, J.P., von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C. and Lander, E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.
- Weiland, T. Nicht-genomische Wirkung von Testosteron und Estradiol: Interaktionen mit dem Lipopolysaccharid- und Serum-Signalweg in Makrophagen. 2004. Diplomarbeit.
- Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1995) GATA Transcription factors - key regulators of hematopoiesis. *Experimental Hematology* 23, 99-107.
- Whitfield, J. (2002) Portrait of a serial killer. *Nature science update*.

- WHO. The urgency of a massive effort against infectious diseases. 2000. WHO.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I. and Schacherer, F. (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 28, 316-319.
- Wunderlich, F. and Helwig, M. (1987) *Plasmodium chabaudi* malaria - red-blood-cells with altered membrane-proteins in immune mice. *European Journal of Cell Biology* 43, 499-500.
- Wunderlich, F., Brenner, H.H. and Helwig, M. (1988) *Plasmodium chabaudi* malaria - protective immunization with surface-membranes of infected erythrocytes. *Infection and Immunity* 56, 3326-3328.
- Wunderlich, F., Benten, W.P.M., Bettenhaeuser, U., Schmitt-Wrede, H.P. and Mossmann, H. (1992) Testosterone unresponsiveness of existing immunity against *Plasmodium chabaudi* Malaria. *Parasite Immunology* 14, 307-320.
- Wünsche, V. Expression von GTP-bindenden GIMAP-Proteinen. 2004. Dissertation.
- Yang, T.T., Sinai, P., Kitts, P.A. and Kain, S.R. (1997) Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechniques* 23, 1110-1114.
- Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J.J., May, P. and Oren, M. (1993) p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol. Cell Biol.* 13, 1415-1423.
- Young, R.A. (1991) RNA-Polymerase II. *Annual Review of Biochemistry* 60, 689-715.
- Zenz, T., Roessner, A., Thomas, A., Frohling, S., Dohner, H., Calabretta, B. and Daheron, L. (2004) *hlan5*: the human ortholog to the rat *lan4/iddm1/lyp* is a new member of the *lan* family that is overexpressed in B-cell lymphoid malignancies. *Genes and Immunity* 5, 109-116.
- Zerrahn, J., Schaible, U.E., Brinkmann, V., Guhlich, U. and Kaufmann, S.H.E. (2002) The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *Journal of Immunology* 168, 3428-3436.
- Zhang, D.H., Yang, L.Y., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P. and Ray, A. (1999) Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11, 473-482.
- Zhang, P., Zhang, X.B., Iwama, A., Yu, C.N., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H. and Tenen, D.G. (2000) PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 96, 2641-2648.
- Zhang, Z.L. and Gerstein, M. (2003) Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes. *Nucleic Acids Research* 31, 5338-5348.

## 7.0 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	„Accession Number“: Datenbanknummer
A,C,G,T	Adenin, Cytosin, Guanin, Tyrosin
Amp	Ampicillin
AMV	„avian myeloblastosis virus“
$A_{nm}$	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BIS, Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
bzw.	beziehungsweise
CD	„Cluster of Differentiation“
cDNA	complementäre DNA (zur RNA)
cm, mm, $\mu$ m, nm	Zenti-, Milli-, Mikro-, Nanometer
d(A, C, G, T)TP	Desoxyadenosin-, Desoxycytosin-, Desoxyguanosin-, Desoxythymidin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
g	Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m/s}^2$
g, mg, $\mu$ g, ng, fg	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Femtogramm
GFP	„Green-Fluorescent-Protein“
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
His	Histidin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	Infrarot
kBq	Kilobecquerel
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
Leu	Leucin
$\mu$ Ci	Mikrocurie ( $3,7 \times 10^7$ Zerfälle pro s; $1 \mu\text{Ci} = 37 \text{ kBq}$ )
M, mM, $\mu$ M	Molarität, Milli- und Mikromolarität
MCS	„multiple cloning site“

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	„messenger“-RNA
NES	„nuclear export signal“: Kernexportsignal
NK	natürliche Killerzellen
NLS	„nuclear localisation signal“: Kernlokalisierungssignal
OD <sub>nm</sub>	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
ORF	offenes Leseraster
uORF	„upstream open reading frame“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PfEMP	„ <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane proteins“
pfu	„plaque forming unit“
p.i.	post infection: nach der Infektion
Poly A <sup>+</sup>	Polyadenylsäure
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskonstante)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEAP	sekretierte alkalische Phosphatase
spez. Akt.	spezifische Aktivität
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Tris-EDTA
TGF	‘tumor growth factor’
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle Typ 1 bzw. Typ 2
TL	Toll-like-receptor
TNF	Tumornekrosisfaktor
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit: Einheit der Enzymaktivität
UTR	„untranslated region“
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation
X-Gal	5-Bromo, 4-chloro, 3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid

## 8.0 Danksagung

Herrn Professor Dr. Frank Wunderlich danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke den Düsseldorf Entrepreneurs, für die Gewährung ihrer großzügigen finanziellen Unterstützung im Rahmen des Stipendiums.

Herrn Dr. Jürgen Krücken danke ich sehr für die ausführliche und kritische Durchsicht dieses Manuskripts und seine konstruktiven Vorschläge.

Desweiteren möchte ich Herrn Dr. Hans-Peter Schmitt-Wrede, Dr. Olaf Stamm und Frau Dipl. Biol. Meike Bartl für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts danken.

Herrn PD Dr. Peter Benten möchte ich Dank sagen für die Unterstützung bei der Aufnahme der konfokalen Bilder und die nette Atmosphäre in unserem Büro.

Ich danke ganz besonders Frau Andrea Grunwald für die unzähligen kleinen, unauffälligen, aber keineswegs unbedeutenden Arbeiten im Hintergrund, die einen reibungslosen Ablauf des Laboralltags erst möglich gemacht haben.

Herrn Predrag 'Piet' Marinovski danke ich für seine Assistenz bei Computer- und Softwarefragen und seine Versorgung mit Lebensmitteln, die eine effektive Bekämpfung des abendlichen Hungergefühls möglich gemacht haben.

Bei Vreni, Ralf und Nadine möchte ich mich besonders herzlich für die gute Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

Den übrigen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Parasitologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meine ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für ihre Förderung und Unterstützung.

---

## 9.0 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Markus Epe
Geburtsdatum	30.12.1974
Geburtsort	Olpe
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

08/1981-08/1985	Johannes von der Haardt Grundschule, Bilstein
09/1985-06/1994	Privates Gymnasium Maria Königin, Lennestadt

### Wehrdienst

07/1994-07/1995	Wehrdienst bei der Luftwaffe in Budel/NL und Erntebrück
-----------------	---

### Studium

10/1995-03/2001	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
05/2001-10/2004	Promotion in der Abteilung für Molekulare Parasitologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2002-04/2004	Stipendiat der Düsseldorf Entrepreneurs Foundation