

# **Expression GTP-bindender GIMAP Proteine**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der**



vorgelegt von  
Verena Wünsche  
aus Hamburg

Düsseldorf  
2004

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

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich  
Korreferent: Prof. Dr. H. Greven  
Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,  
daß die Dinge sind, wie sie sind*

*(Aristoteles)*

1.0	Einleitung	1
1.1	Malaria – Biologie	1
1.2	Faktoren, die die Ausbreitung von Malaria begünstigen	2
1.3	Pathogenese von Malaria	5
1.4	Immunität	8
1.4.1	natürliche Immunität	8
1.4.2	erworbene labile Immunität	8
1.4.3	Immunevasion	9
1.5	<i>imap</i> Gene	10
1.5.1	<i>imap38</i> – ein malariainduzierbares Gen	10
1.5.2	Homologe von <i>imap38</i>	10
1.5.3	GTP-Bindungskapazität von <i>imap</i> Genen	11
1.5.4	Apoptose und <i>imap</i> Gene	11
1.6	Zielsetzung	12
2.0	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits und weitere Materialien	13
2.1.2	Puffer und Lösungen	14
2.1.3	Medien	16
2.1.4	Oligonukleotide	17
2.1.6	Stämme und Vektoren	20
2.1.6.1	Versuchstiere	20
2.1.6.2	Parasitenstamm	20
2.1.6.3	Zellkulturlinien	21
2.1.6.4	Chemisch kompetente Bakterienstämme	21
2.1.6.5	Vektoren	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA	22
2.2.1.1	Mini-Präparation	22
2.2.1.2	Midi-Präparation	22
2.2.2	Isolation von genomischer DNA	22
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
2.2.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	23
2.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	23
2.2.6	Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.8	Chemische Transformation	24
2.2.9	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	24
2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.2.11	Bestimmung optimaler Annealingtemperatur und Zyklenzahl	27
2.2.12	Bestimmung des optimalen Verhältnisses von 18S-Primern zu 18S-Kompetitoren	27
2.2.13	Colony PCR	28
2.2.14	Organentnahme	28
2.2.15	Isolation von RNA	28
2.2.15.1	Isolation von Gesamt-RNA: Extraktion mit peqGOLD Trifast™	28
2.2.15.2	Isolation von Poly(A) <sup>+</sup> mRNA	29
2.2.16	Denaturierende Glyoxalgelelektrophorese von RNA	29
2.2.17	Alkalische Gelelektrophorese von DNA	30

2.2.18	Genomischer Southern-Blot	30
2.2.19	Transfer von DNA und RNA auf Membranen beim "Northern- bzw. Southern-Blot"	31
2.2.20	Radioaktive Markierung der Sonden	31
2.2.21	Hybridisierung der "Northern- und Southern-Blots"	32
2.2.22	Zellkultur	33
2.2.22.1	Auftauen von CHO-K1- und Jurkat-Zellen	33
2.2.22.2	Kultivierung von CHO-K1- und Jurkat-Zellen	33
2.2.22.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien	33
2.2.23	Transiente Transfektion von Säugerzellen	34
2.2.23.1	Transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen mit FuGENE®6	34
2.2.23.2	Transiente Transfektion von Jurkatzellen mit Nukleofector™	34
2.2.24	Zelluläre Lokalisation von Proteinen	34
2.2.25	Anfärbung verschiedener Zellkompartimente	35
2.2.25.1	Endoplasmatisches Retikulum (ER)	35
2.2.25.2	Golgi-Apparat	36
2.2.25.3	Zellkern	36
2.2.25.4	Plasmamembran	36
2.2.25.5	Lysosomen	36
2.2.25.6	Mitochondrien	37
2.2.26	Mikroskopie	37
2.2.26.1	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	37
2.2.27	Apoptosetests	37
3.0	Ergebnisse	38
3.1	Genomische Anordnung und Nomenklatur	38
3.1.1	Genomische Organisation der Gene für GTPasen der <i>imap</i> Genfamilie	38
3.1.2	Homologe <i>mgimap</i> Gene auf dem Chromosom 6B der Maus	40
3.1.3	mGIMAP Proteine	42
3.2	Klonierung und Verifizierung von <i>gimap</i> Homologen	43
3.2.1	Amplifikation, Klonierung und Ansequenzierung des ORF von <i>mgimap3</i>	43
3.2.2	Klonierung und Ansequenzierung von <i>mgimap4</i> und <i>mgimap9</i>	44
3.3	Gewebespezifische Expression verschiedener <i>mgimap</i> -mRNAs	44
3.3.1	Quantifizierung der <i>gimap</i> Gene 3, 4, 5 und 9 durch qPCR und "alkalischen Southern Blot"	45
3.3.1.1	Temperatur- und Zyklusoptimierung mittels RT-PCR	45
3.3.1.2	Sonden für alkalischen "Southern-Blot"	46
3.3.1.3	Quantifizierung durch internen Standard	47
3.3.1.4	Vergleich der relativen <i>mgimap</i> Expression in unterschiedlichen Geweben	49
3.3.2	<i>mgimap3</i> -, <i>mgimap4</i> - und <i>mgimap9</i> - Sondensynthese für "Northern Blot"- Analysen	50
3.3.3	Organspezifische Expression der <i>mgimap3</i> , <i>mgimap4</i> und <i>mgimap9</i> Poly (A) <sup>+</sup> RNA	50
3.3.4	Organspezifische Expression	51
3.3.5	<i>mgimap3</i> und <i>mgimap5</i> – 2 distinkte Gene?	52
3.4	Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP4 und mGIMAP9 in CHO-K1-Zellen	54

---

3.4.1	Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP4	54
3.4.2	Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP9	55
3.5	RNAi	57
3.5.1	Konstruktion des pDECAP- <i>mgimap4</i> bzw. <i>mgimap9</i> RNAi-Vektors	58
3.5.1.1	Amplifizierung invertierter <i>mgimap4</i> - und <i>mgimap9</i> -Sequenzen	58
3.5.1.2	Klonierung der <i>mgimap4</i> - und <i>mgimap9</i> -Sequenzen in den pDEAP-Vektor	59
3.5.2	RNA-Interferenz durch <i>hgimap4</i> -siRNA	60
3.5.2.1	Präparation von <i>hgimap4</i> und EGFP-silencern	60
3.5.2.2	Effizienzanalyse der siRNA	61
3.5.2.3	<i>hgimap4</i> Silencing und apoptotische Effekte	62
4.0	Diskussion	66
4.1	Datenbankanalysen von <i>gimap</i> Genen	66
4.2	<i>mgimap3</i> und <i>mgimap5</i> - ein oder mehrere Gene?	69
4.3	Expressionsanalysen von <i>mgimap</i> Genen	70
4.3.1	Gewebespezifische Expressionsanalysen	70
4.3.2	Expression in Abhängigkeit von Infektionen mit <i>Plasmodium chabaudi</i>	71
4.4	Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP4 und mGIMAP9	72
4.5	Die <i>gimap</i> Genfamilie und ihre Rolle bei apoptotischen Prozessen	73
4.5.1	Charakterisierung von <i>hgimap4</i> , <i>mgimap4</i> und <i>mgimap9</i> durch Überexpression und RNAi	74
4.6	Ausblick	77
5.0	Zusammenfassung	78
6.0	Literatur	79
7.0	Abkürzungsverzeichnis	89
8.0	Danksagung	92

## 1.0 Einleitung

### 1.1 Malaria – Biologie

Trotz intensiver Bemühungen, Malaria in den Griff zu bekommen, zählt diese Infektionskrankheit neben Aids und Tuberkulose zu den häufigsten weltweit. Jährlich erkranken 300 – 500 Millionen Menschen (1 Million Neuerkrankungen pro Tag) an Malaria (Medicines for Malaria Venture, 2003); etwa 2 Millionen dieser Fälle enden tödlich, was einer Quote von einem Malariatoten alle 30 Sekunden entspricht (Greenwood & Mutabingwa, 2002). Dabei treten 90 % der tödlichen Malariafälle in Ländern Afrikas südlich der Sahara auf, 71% sind Kleinkinder unter 5 Jahren (WHO 2003). Weitere Endemiegebiete mit hoher Erkrankungshäufigkeit (1-100 infektiöse Stiche pro Jahr) sind das nördliche Südamerika, Indien sowie die Inseln des indischen Ozeans. Menschen Mittelamerikas, Südafrika, der arabischen Welt und Südostasien werden im Durchschnitt nur einmal pro Jahr gestochen und haben so ein mittleres Risiko zu erkranken. Das bedeutet, daß mehr als 40 % der Weltbevölkerung dem ständigen Risiko einer Malariainfektion ausgesetzt sind. Aber selbst bei optimaler medizinischer Versorgung liegt die Sterblichkeitsrate bei Erstinfektionen noch um 30% (WHO, 2001).



**Abbildung 1: Weltweite Verbreitung von Malaria im Jahr 2003 (WHO, 2003)**

Malaria ist heute, wie in Abbildung 1 zu sehen, vorwiegend in den Tropen verbreitet. Im Gegensatz dazu waren vor ungefähr sechzig Jahren auch das südliche Europa, Nordafrika, Ostasien und der Südosten der USA betroffen. Im Kaukasus und im Wolgabecken wurden z.B. in den Jahren 1934 – 1936 ca. 9 Millionen Malariafälle registriert (Bruce-Chawitt, 1988). Während der ersten Jahre des 2. Weltkrieges erlagen im Pazifik mehr Soldaten den Malaria-übertragenden Mücken als den japanischen Kampftruppen (Worldwatch Institute, 2003).

Der Einsatz von DDT sowie die Trockenlegung der Brutstätten der Überträgermücken führte zwar anfänglich zu einem Rückzug aus der nördlichen Hemisphäre, doch besteht kein Zweifel, daß der Klimawandel (WHO, 1999) und DDT-Resistenzen ein Wiederaufflackern von Malaria in nicht endemischen Gebieten begünstigen. So konnten sowohl im Süden der Türkei als auch in den Staaten Osteuropas wie Aserbaidjan bereits erste Malariafälle beobachtet werden. Vor dem Hintergrund, daß diese Länder dieser Herausforderung mit ineffektiven Gesundheitssystemen gegenüber treten, bekommt der politische Begriff der "Europäischen Expansion" eine neue zusätzliche Bedeutung.

## 1.2 Faktoren, die die Ausbreitung von Malaria begünstigen

~ Klimaveränderungen:

Als Folge der globalen Klimaveränderungen stellten Forscher Ende 2003 einen Anstieg der Durchschnittstemperatur in den USA um 0,035 °C pro 10 Jahre fest (Kalnay & Cai, 2003). Diese Erwärmung, die auch auf andere Länder der Erde zutrifft, führt in erster Linie zu direkt kalkulierbaren Risiken wie Stürmen (Hurricanes), Überschwemmungen und Desertifikationen. Aber auch die Sekundärfolgen wie z.B. die Beschleunigung des hydrogeologischen Kreislaufs, El Niño, etc. sind nicht zu unterschätzen. Aus dem erwärmten Meerwasser verdunstet das Wasser schneller, warme Luft nimmt mehr Feuchtigkeit auf und das zusätzliche Wasser fällt als intensiver Niederschlag zur Erde. Für alle im Wasser lebenden Lebewesen bedeutet dies neben verbesserten Lebensbedingungen auch die Ausbreitung ihrer Habitate in die gemäßigten Klimazonen (Kirk-Davidoff *et al.*, 1999; Martens, 1998; Sutherst, 1993).

Für die Entwicklung der Stechmücken und ihrer Parasiten ist die Temperatur der kontrollierende Faktor. Während *P. falciparum* bei 20 °C 26 Tage für seine volle Entwicklung in der Mücke benötigt, genügen bei 25 °C schon 13 Tage (Lindsay & Martens, 1998). Die für die Entwicklung notwendigen Minimaltemperaturen liegen bei 18 °C für *P. falciparum* und bei 15 °C für *P. vivax* (Barry, 1992). Durch die Erderwärmung wird somit auch das Vordringen der Stechmücken in bisher geschützte höhere Regionen oberhalb 2000 m, wie z.B. in den kolumbianischen Anden, ermöglicht (Barry, 1992). Desweiteren kann das bisher mit einer Frequenz von ca. einmal alle 5 Jahren auftretende Meeresphänomen "El Niño" ebenfalls als Modell für die klimabedingte Ausbreitung von Infektionskrankheiten dienen. Während eines "El Niño" führt eine erhöhte Verdunstung des erwärmten Pazifik neben starken Regenfällen auch zu milderem Wintern in einigen nördlichen Regionen der USA und Kanadas (Ropelewski & Halpert, 1987). Als Spätfolgen eines "El Niño" treten vermehrt Dürren und Überschwemmungen auf. Somit nimmt auch die Häufigkeit von Krankheiten durch verschmutztes Wasser oder andere Überträger zu (Brown *et al.*, 1998).

~ Regionale anthropogene Veränderungen:

Veränderungen der Umwelt sind in Malarialändern vielfach auf das Bedürfnis der dort lebenden Menschen, ihre Lebensumstände zu verbessern, zurückzuführen. Paradoxerweise führen diese Absichten über eine Zunahme der Malariaerkrankungen oft, gerade bei für neue Entwicklungen aufge-

schlossenen Bevölkerungen, zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes und damit zu einer Reduzierung des Wohlstands. So schaffen etwa Bewässerungsprojekte, Staudämme, Kanäle aber auch das Abholzen von Wald in der Regel günstige Lebensbedingungen für "Anopheles"-Mücken. Beispiele für eine Koinzidenz zwischen dem Auftreten von Malaria und veränderter Landnutzung durch Stauseen gibt es in Äthiopien aber auch nach landwirtschaftlicher Nutzung in Thailand (Gomes *et al.*, 1998; Ghebreyesus *et al.*, 1999).

~ Bevölkerungsexplosion:

Gerade in den letzten 2 Jahrzehnten hat sich die Bevölkerung in vielen malariaendemischen Ländern verdoppelt (Sachs & Malaney 2002). Obwohl die Malaria in vielen Stadtzentren der Tropenregionen relativ selten auftritt, sind die Bewohner von Slums und Elendsvierteln doch in weit höherem Maße gefährdet. Einerseits schaffen die Lebensbedingungen in diesen Randregionen der Städte ideale Brutbedingungen für "Anopheles"-Mücken, andererseits verfügen die dort lebenden Menschen oft nicht über ausreichende Mittel, eine Malariaerkrankung medizinisch wirksam behandeln zu lassen. Zusätzlich erschwert wird die Situation durch den stetigen Zuzug von mit Malaria infizierten Menschen aus ländlichen Gegenden. Aber auch die durch so viele Menschen bedingten Veränderungen in der Umwelt, wie z.B. Abholzung zur Landeinnahme in Afrika (Coluzzi *et al.*, 1979), Asien (Bunnag *et al.*, 1979) und Lateinamerika (Tadei *et al.*, 1998), führen zu einem vermehrten Auftreten von Malaria.

~ Kriegerische Ereignisse und wirtschaftliche Gründe

Neben durch kriegerische Auseinandersetzungen bewirkten Flüchtlingsströmen, die zum Zusammenbruch der medizinischen Versorgung führen, tragen vor allem Wanderbewegungen aus wirtschaftlichen Gründen zu einer Verbreitung der Malaria bei (Roberts *et al.*, 2000). Wenn Menschen mit einem mangelnden Immunschutz in Malariagebiete vordringen, kann sich die Infektion rasch unter ihnen ausbreiten. Kehren sie in ihre Heimat zurück, können weitere Ansteckungen nicht ausgeschlossen werden.

~ Tourismus

Malaria ist zur Zeit in über 100 Ländern endemisch. Pro Jahr werden diese Länder von 125 Millionen Touristen besucht (WHO, 2003). Jedes Jahr werden ca. 7000 importierten Malariafälle in ganz Europa verzeichnet (Müntener *et al.*, 1999). In Deutschland traten in den vergangenen Jahren 800 – 1000 importierte Malariaerkrankungen pro Jahr auf, von denen 15-28 tödlich endeten (Robert Koch-Institut, 2000). In den letzten Jahren verringerte sich allerdings die Todesrate auf 3-8. Dies ist auf das frühere Erkennen der Malariasymptome durch Sensibilisierung der Ärzte und Reisenden zurückzuführen (Löscher, 2004).

~ Insektizidresistenz

Den anfänglich sehr erfolgreichen Kampf der WHO gegen Malaria mit dem Organochlorid DDT haben Resistenzen der "Anopheles"-Mücken 1959 vereitelt. Bis heute gibt es kein weiteres so billiges und effektiv wirksames Insektizid. Aber auch gegen deutlich teurere verwendete Insektizide wie Carbamate und Organophosphate, die das Schlüsselenzym Acetylcholinesterase im Nervensystem der Insekten angreifen, haben

Überträgermücken durch genetische Mutation eines einzigen Gens Resistenzen entwickelt (Weill *et al.*, 2003).

~ Chemotherapeutikaresistenzen und Vakzine

Das erste Mal wurden Malariasymptome von Hippokrates beschrieben. Die erste dokumentierte Therapie fand 1666 mit Hilfe der Rinde des Baumes "*Cinchona succirubra*" statt und heilte die Duchess von Chincòn (Bruce-Chawitt, 1988). Auch später galt der Einsatz von Chinin als Meilenstein in der Behandlung von Malaria, zumal der Erreger erst 1880 von dem französischen Kolonialarzt Charles Louis Alphonse Laveran entdeckt, und der Zusammenhang zwischen Stechmücke als Überträger und Erreger erst Ende des 19. Jahrhunderts aufgedeckt wurde (Laveran, 1880).

Heute existieren 3 verschiedene Antimalariawirkstoffgruppen:

Quinoline wie Chloroquin und Mefloquin (Lariam®) binden an die vom Hämoglobin freigesetzten Hämmoleküle. Hämoglobin wird von den Parasiten zur Aminosäuregewinnung abgebaut (Foote & Cowman, 1994). Normalerweise polymerisieren die freigesetzten Hämgruppen zu Hämozin und werden so für den Parasiten unschädlich. Quinoline verhindern diese Polymerisation und die jetzt toxischen Hämgruppen töten die Parasiten durch Peroxidierung ihrer Lipide (Loria *et al.*, 1999). Die Tatsache, daß in Süd- und Ostafrika 90 % Resistenzen gegen Chloroquin vorliegen und daß viele Patienten nach Behandlung äußerlich asymptomatisch werden, aber dennoch weiterhin Träger der resistenten Parasitenstämme bleiben, läßt Quinoline nicht länger als Therapeutikum der Wahl erscheinen.

Antifolate wie Pyrimethamin und Proguanil wurden lange Zeit zur Behandlung von "Malaria tropica" eingesetzt. Antifolate hemmen die Dehydrofolatreduktase (DHFR) des *P. falciparum* Enzyms Dehydrofolatreduktase-Thymidilatsynthase (PfDHFR-TS) und verhindern so die Folsäureproduktion und damit die DNA-Synthese. Aber auch hier gibt es bereits Resistenzen durch Mutationen in der DHFR oder durch Nutzung exogener Folate (McKie *et al.*, 1998).

Sequiterpene wie Artemisinin und Artesunate katalysieren die Produktion freier Radikale, welche die Parasiten bei Bindung an Malariaproteine abtöten. Artesunate haben zur Zeit die höchste und schnellste Wirksamkeit, sind aber zehnmal teurer als Quinoline und Antifolate und somit für die oft arme Bevölkerung der endemischen Gebiete unerschwinglich (Nosten & Brasseur, 2002). Da Artemisinine außerdem ausschließlich aus Pflanzen gewonnen werden, ist die weltweite Produktion zu gering, um alle malariaendemischen Gebiete der Erde zu versorgen (Molyneux & Nantulya, 2004). Vennerstrom *et al.* (2004) ist es erstmals gelungen, leicht veränderte Artemisininmoleküle synthetisch herzustellen. Da sich diese neben geringen Produktionskosten, besserer Löslichkeit und Stabilität auch durch eine sehr gute Wirksamkeit auszeichnen, sind sie die große Hoffnung im Kampf gegen resistente Plasmodium-Arten.

Kombinationstherapien aus Mefloquin und Artesunaten bzw. Atovaquon und Proguanil (Malaron®) helfen bei Malariafällen, die durch chemotherapeutikaresistente Plasmodium-Arten hervorgerufen werden, da sich der Parasit gleichzeitig gegen zwei verschiedene Wirkstoffe wehren muß (Ansah *et al.*, 2001; Löscher *et al.*, 2003).

Bis heute existieren keine Impfstoffe gegen Malaria, aber erstmals wieder Hoffnung auf einen wirksamen Schutz. Feldversuche in Mosambik mit dem Wirkstoff RTS,S/AS02A haben Malariaerkrankungen unter gut 2000 Kindern um etwa 30 % gedrosselt. Die Zahl der lebensgefährlichen Erkrankungen ging sogar um 58 % zurück (Alonso *et al.*, 2004). Ein Impfstoff muß billig, sicher, lang und schnell wirksam bei Erwachsenen und Kindern, bei allen Temperaturen lagerbar sowie am besten ohne Nadel einsetzbar sein (Levine & Sztein, 2004). Die wichtigsten Kandidaten sind Oberflächenmantelproteinantigene, die eine Infektion verhindern, Leberstadienantigene, die die pathologischen Effekte reduzieren und versteckte Antigene, die eine Retransmission des Parasiten in die Mücke unmöglich machen sollen (Dubovski, 2001).

Allerdings weisen erste Studien darauf hin, daß sich Plasmodien der Art *chabaudi*, die von einem geimpften Wirt übertragen werden, zu deutlich gefährlicheren Stämmen entwickeln (Mackinnon & Read, 2004). Daher wäre es wichtig, mit einer Vakzine die Parasiten auszuschalten, bevor sie in die Erythrocyten eindringen können und so ihre Entwicklung zu verhindern. Eine Alternative wäre auch ein Impfstoff, der das Immunsystem dabei unterstützt, sich gegen den Parasiten in verschiedenen Entwicklungsstadien zu wehren (Mackinnon & Read, 2004). Da aber Plasmodien 100 mal komplexer als Aidsviren sind, ist viel zu wenig über die Immunreaktionen bekannt (Worldwatch Institute, 2003).

Neben der Roll-Back-Malaria-Initiative, die durch die Aufklärung über prophylaktische Maßnahmen, Verteilen von insektizidbehandelten Mückennetzen und Vorantreiben der Forschung nach Insektiziden, Medikamenten und Vakzinen die Zahl der Malariatoten bis 2010 halbieren will (WHO, 2002b), werden Dutzende ostafrikanische Pflanzen, die sich im Labor als geeignet im Kampf gegen "Anopheles"-Mücken erwiesen, genauer, sowie alle bisher gefundenen Vakzinkandidaten noch einmal untersucht (Moorthy *et al.*, 2004). Als hoffnungsvollste Entwicklung zur Früherkennung einer Infektion gilt ein Kit zum Selbsttest ähnlich einem Schwangerschaftstest (Mc Manus, 2000).

### 1.3 Pathogenese von Malaria

Malaria wird durch eine Infektion mit einer der vier humanpathogenen Plasmodium-Arten ausgelöst. Während *Plasmodium vivax* (Malaria tertiana), *Plasmodium ovale* (Malariaform ähnlich M.tertiana) und *Plasmodium malariae* (Malaria quartana) einen leichten, nur sehr selten letalen Infektionsverlauf zeigen, handelt es sich bei *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica) um den bei weitem virulentesten Erreger, der in 1-3 % der Fälle zu einer tödlichen Infektion führt.

Allen *Plasmodium*-Arten gemeinsam ist ein sehr ähnlicher Entwicklungszyklus mit obligatem Wirtswechsel (Mehlhorn & Waldorf, 1988). Die weibliche "Anopheles"-Mücke ist Überträger (Vektor) und Endwirt zugleich, da in ihr die geschlechtliche Vermehrung stattfindet. Im Menschen, der als Zwischenwirt fungiert, vollzieht sich die ungeschlechtliche Vermehrung.

Beim Stich einer infizierten "Anopheles"-Mücke werden Sporozoiten mit dem Speichel in die Blutkapillaren des Menschen injiziert. Sie erreichen über die

Blutbahn in kürzester Zeit die Leber und invadieren Leberparenchymzellen. Innerhalb von 6-16 Tagen wachsen sie in einer parasitophoren Vakuole im Hepatozyten heran und durchlaufen dabei die Schizogonie. Dabei bilden sie sich zuerst zu runden oder bandförmigen Trophozoiten und schließlich zu einem die Zelle ausfüllenden vielkernigen Gewebeschizonten um, der schließlich beim Platzen der Leberparenchymzelle 10000 (*P. vivax*) – 40000 (*P. falciparum*) Merozoite freisetzt (exo- od. präerythrozytäre Phase) (Cohen & Lambert, 1982). Bei *P. vivax* und *P. ovale* entstehen parallel zur Schizogonie Dauerstadien (Hypnozoiten), die über viele Jahre hinweg immer wieder Krankheitsausbrüche verursachen können und gleichzeitig das Überleben der Parasiten in übertragungsarmen Jahreszeiten sichern. *P. falciparum* und *P. malariae* etablieren hingegen chronische Blutstadieninfektionen (Lucius & Loos-Frank, 1997).

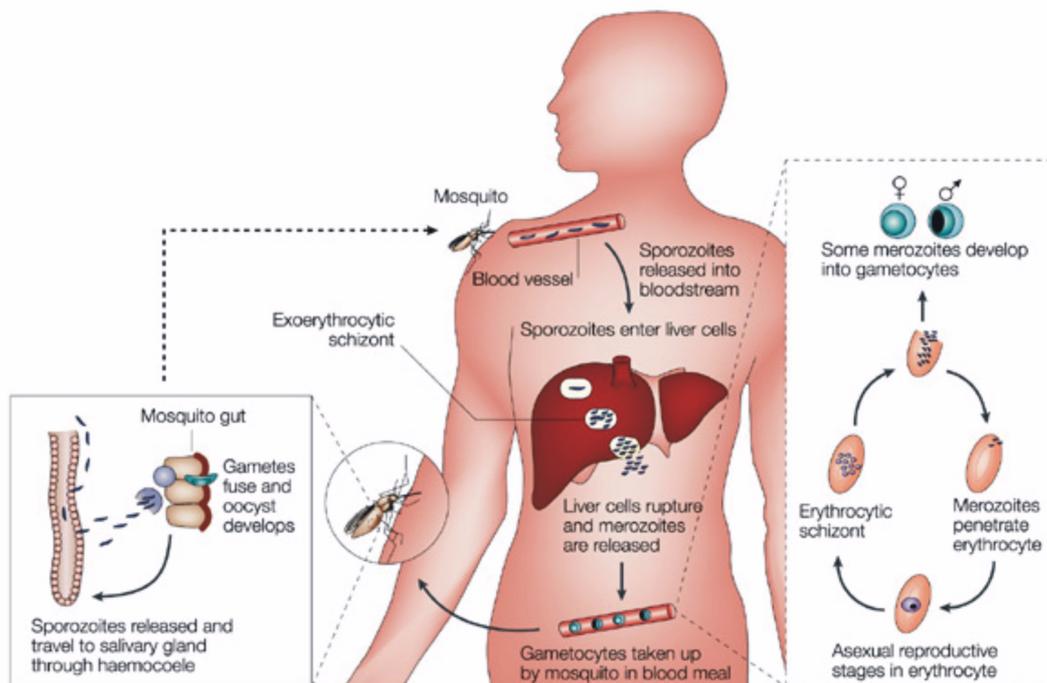
Die bei der Ruptur der Wirtszelle freiwerdenden Merozoiten dringen in sekundenschnelle in Erythrozyten ein und durchlaufen erneut eine Schizogonie, an deren Ende die Erythrozyten platzen und bis zu 20 Merozoiten freisetzen (Stevenson & Riley, 2004), die wiederum neue Erythrozyten befallen.

Ein erythrozytärer Schizogoniezyklus dauert je nach Art zwischen 48 und 72 Stunden und ist bei *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* so synchronisiert, daß sich die gesamte Parasitenpopulation zeitgleich im gleichen Entwicklungsstadium befindet (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Nach letzten Erkenntnissen ist dafür die Serotoninausschüttung des Wirtes verantwortlich, die auch die Freisetzung der Merozoiten während der Schlafphase, also der aktiven Zeit des Vektors, reguliert. Nach einigen Wochen der Infektion beginnen einzelne, der in Erythrozyten eingedrungene, Merozoiten sich zu metazyklischen Gamonten zu entwickeln. Letztere werden beim Stich der "Anopheles"-Mücke über das gesaugte Blut aufgenommen.

Im Darm der Mücke werden die Parasiten freigesetzt und reifen zu Mikro- und Makrogameten heran (Gamogonie). Dabei teilt sich der weibliche Gametenkern nicht, während aus dem männlichen Gamonten 4-8 fadenförmige Mikrogameten entstehen, die dann je einen Makrogameten befruchten (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Damit die männlichen Gamonten Flagellen ausbilden, die sie zur Fortbewegung und somit zur Zytogamie mit den weiblichen Makrogameten befähigen, ist eine calciumabhängige Proteinkinase (CDPK 4) von Nöten (Tromans, 2004). Es entsteht eine bewegliche Zygote (Ookinet), die durch die Epithelzellen des Mückenmagens wandert und sich dort zwischen Basalmembran und Epithelzellen einnistet. Der Ookinet wächst zu einer Oozyste heran, in der die Sporogonie abläuft. Nach einer Reduktionsteilung entstehen dabei etwa tausend Sporozoiten, die anschließend in die Speicheldrüsen der Mücke wandern und auf ihre Übertragung warten, wobei bei einem Stich nur 1 % der Sporozoiten übertragen werden (Beier *et al.*, 1991). Höhere Temperaturen begünstigen die Sporozoitenentwicklung (Beier *et al.*, 1998).

Die für Malaria typischen Symptome sind ausschließlich mit dem erythrozytären Schizogoniezyklus verbunden. 7-20 Tage nach einer Infektion treten die ersten Anzeichen einer Erkrankung auf: Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Schweißausbrüche (Bruce-Chawitt, 1980).

Allerdings ist nicht jeder Stich einer "Anopheles"-Mücke gefährlich. Weltweit gibt es 380 Anopheles-Arten, aber nur 60 von ihnen sind in der Lage, Malaria zu übertragen. Außerdem wird nur in 10 % der Fälle ein Malariaerreger übertragen (Bruce-Chawitt, 1980), da auch die "Anopheles"-Mücke ein ausgeklügeltes System aus Anti-Gameten-Antikörpern, Proteasen, antimikrobiellen Peptiden und Stickstoffsynthetasen hat, um sich gegen den Parasiten zu wehren (Saul, 2004). Insbesondere spielen zwei ihrer Gene (*ctl4* und *irim1*) und deren Aktivierung bzw. Deaktivierung eine große Rolle bei der Kontrolle der Parasitenentwicklung (Osta *et al.*, 2004).



**Abbildung 2: Die Entwicklung von *P. falciparum* in Mensch und Mücke (Stevenson & Riley, 2004)**

Die für Malaria typischen Fieberschübe werden durch die Freisetzung von Pyrogenen während der Ruptur parasitierter Erythrozyten verursacht und treten je nach Erregerart in unterschiedlichen repetitiven Abständen auf. Bei Malaria tertiana (Erreger *P. vivax* und *ovale*) mit einem erythrozytären Schizogoniezyklus von 48 Stunden folgt einem fieberfreien Tag ein Fiebertag. Bei Malaria quartana (Erreger *P. malariae*) kommt es alle 3 Tage zum Fieberanfall (Melhorn & Piekarski, 2002). Am häufigsten und schwersten zu diagnostizieren ist allerdings die Malaria tropica (*P. falciparum*). Ihre Symptome sind uncharakteristisch und ähneln anderen Erkrankungen wie z.B. grippalen Infekten, Bronchitis, Gastroenteritis, Hepatitis, Myokarditis oder Sepsis. Auch Mischinfektionen mit verschiedenen Plasmodium-Arten sind nur schwer zu diagnostizieren (Wunderlich & Schmitt, 1988). In komplizierten Fällen kann es zu Glomerulonephritis mit Nierenversagen, schwerer Anämie, Azidose, Atemnot bis -stillstand, Hypoglykämie und Blutungen kommen, darüberhinaus bei cerebraler Malaria, einer besonders schweren Verlaufsform, zu Krampfanfällen und Bewußtseinseintrübungen bis zu einem Koma. Häufig sind auch zahlreiche Organe gleichzeitig betroffen (Cohen & Lambert, 1982; Warell *et al.*, 1990).

## 1.4 Immunität

### 1.4.1 natürliche Immunität

Bis heute ist das exakte Zustandekommen einer Immunität gegenüber Malaria nicht verstanden. Nichtsdestotrotz läßt sich bei Menschen mit genetisch bedingten Krankheitsbildern, wie z.B. Veränderungen an Hämoglobingenen (Sichelzellenanämie, Thalassämien) oder Ovalocytosis und diversen Erythrozytenanomalien (z.B. fehlende Duffy Blutgruppenantigene) eine natürlich vorhandene Resistenz beobachten (Sherman, 2001; Clegg, 1999; Smith *et al.*, 2002). Außerdem gelten Autoimmun-erkrankungen als Schutz vor Malaria (Daniel-Ribeiro, 2000).

### 1.4.2 erworbene labile Immunität

In malariaendemischen Gebieten kommt es zu dauernden Reinfektionen mit dem Malariaerreger. Dabei werden Antikörper gegen viele stadienspezifische Antigene entwickelt, die zu einer verminderten Suszeptibilität oder einer geringen Transmissionsrate zwischen Mensch und Mücke führen. Diese labile Immunität ist allerdings stamm- und stadienspezifisch.

Insbesondere scheinen bei einer erworbenen Immunität freigesetzte Zytokine und eine zytotoxische T-Zellantwort eine Rolle zu spielen. Letztere hemmen die Entwicklung der hepatischen Schizogonie und schützen vor hohen Parasitämien (Good & Doolan, 1999).

Schwangere, besonders Erstgebärende, haben ein erhöhtes Risiko an einer kompliziert verlaufenden Malaria zu erkranken. Allerdings geben sie eine erworbene Immunität an ihren Fötus durch die Plazenta weiter. Dieser verliert jedoch nach 6-9 Monaten die schützende Immunität und ist dann besonders gefährdet (Mehlhorn, 2001).

Der selbstheilende Verlauf einer Infektion mit Blutstadien von *P. chabaudi* in der Maus und die Ausbildung protektiver Immunität wird von Genen des *H-2*-Komplexes und des "non-*H-2*-background" sowie von Testosteron reguliert, das durch Beeinträchtigung der T-Zellantwort und der Funktion von B-Lymphozyten resistenzsupprimierend wirkt (Wunderlich *et al.*, 1988 und 1991; Benten *et al.*, 1997; Mossmann *et al.*, 1997). Sobald sich jedoch einmal eine protektive Immunität ausgebildet hat, ist der Wirt resistent gegen die Wirkung von Testosteron (Wunderlich *et al.*, 1992). Notwendige Voraussetzung für diese Immunität ist, nach heute gängigen Vorstellungen, eine strukturell intakte Milz (Yap & Stevenson, 1994), da splenektomierte Mäuse eine Erstinfektion nicht überleben, während Tiere mit Milz fulminante Erstinfektionen mit Parasitämien bis zu 70 % überleben und lang andauernde Immunität ausbilden können (Alves *et al.*, 1996). Diese Immunität manifestiert sich darin, daß bei einer homologen Zweitinfektion die Parasitämie deutlich unter 1 % bleibt (Wunderlich *et al.*, 1987). Dagegen verlieren malariaimmune Tiere nach Splenektomie ihren Immunschutz (Kumar & Miller, 1990).

Für die Differenzierung der Milz zu einem anti-Malaria-Effektor ist die rote Pulpa entscheidend. In der roten Pulpa der Milz existieren extravaskuläre Mechanismen, die seneszente und Plasmodien-infizierte Erythrozyten aus

dem Kreislauf aussondern. Dieser „offene“ Kreislauf wird während des Parasitämiemaximums bei einer akuten Malariainfektion partiell geschlossen und anschließend in der Phase der „crisis“ (Abflauen der Infektion) mit erhöhter Effektivität wieder geöffnet (Alves *et al.*, 1996). Diese Veränderung des Milzblutkreislaufes geht mit morphologischen Differenzierungsprozessen in der Milz einher, infolge derer die Milz anschwillt.

### 1.4.3 Immunevasion

Der Parasit hat effiziente, bisher nur unzulänglich aufgeklärte Evasionsmechanismen entwickelt, um sich einer schützenden Immunantwort des Wirtes zu entziehen.

Antigenvariation ist einer der Tricks, den pathogene Erreger entwickelt haben, um der Immunantwort eines Vertebraten zu entkommen. Die Vorteile dieser "Methode" liegen auf der Hand: die Infektion dauert länger und somit erhöht sich die Transmissionsrate (Antia & Koella, 2004).

Recker *et al.* (2004) stellten überraschenderweise fest, daß diese Trick umso wirksamer funktioniert, je weniger stark die Antigene voneinander variieren.

Zum Beispiel tragen Erythrozyten als kernlose Zellen, im Gegensatz zu den meisten Körperzellen, keine MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II- Antigene auf ihrer Oberfläche, so daß sie der Immunüberwachung durch cytotoxische T-Lymphocyten entgehen (Lucius & Loos-Frank, 1997). Dennoch sind die Parasiten in den roten Blutkörperchen nicht geschützt. Beim Durchwandern der Milz werden normalerweise die älteren Erythrozyten durch aktivierte Makrophagen aussortiert. Um ein zu frühes Ausscheiden zu verhindern, besitzt der Parasit Adhäsionsproteine, mit deren Hilfe er sich an die Kapillarendothelien binden kann und so den Durchwanderungsprozeß verlängert (Recker *et al.*, 2004). Die Sequestration an die Epithelien erfolgt durch eine Familie von Parasitenproteinen (PfEMP1). Diese Adhäsionsproteine mit einem Molekulargewicht von 200 bis 350 kDa, die in den als "knobs" bezeichneten Ausstülpungen der Membran infizierter Erythrozyten lokalisiert sind, weisen neben einer konservierten Transmembrandomäne eine hochvariable Region auf, die als Rezeptor die Bindung an unterschiedliche Moleküle der Wirtszelloberflächen wie CD36, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin oder Thrombospondin ermöglicht (Borst *et al.*, 1995). Da diese Bindung durch Antikörperantworten des Wirtes verhindert werden kann, ändert der Parasit das Muster seiner PfEMP1-Proteine ständig durch die Aktivierung unterschiedlicher Gene. Insgesamt enthält das Genom von *P. falciparum* etwa 150 verschiedene PfEMP1- kodierende Gene (Lucius & Loos-Frank, 1997).

Eine weitere Möglichkeit zur "Irreführung" des Immunsystems ist die polyklonale Aktivierung von Lymphocyten, die zur Desorientierung und Schwächung des Immunsystems führt (Wunderlich & Schmitt, 1988). Infolge einer Erschöpfung bestimmter Lymphocytenpopulationen tritt eine deutliche Immunsuppression ein. So haben z.B. Malariapatienten nach einer akuten Attacke verminderte T-Zell-Reaktionen gegen Impfantigene. Darüber hinaus induzieren Plasmodien die Bildung großer Mengen irrelevanter Antikörper, während relevante Epitope nur schwach immunogen sind.

## 1.5 *imap* Gene

### 1.5.1 *imap38* – ein malariainduzierbares Gen

Aus einer cDNA-Bank aus Milzzellfraktionen immuner Mäuse konnte auf der Suche nach Genen, deren Expression sich mit dem Erwerben Testosteron-resistenter Immunität ändert, durch differentielles „Screening“ das Gen *imap38* (immune associated protein) identifiziert werden (Krücken *et al.*, 1997).

*imap38* ist ein auf dem Chromosom 6B lokalisiertes Gen, das nur in einer Kopie im Genom der Maus vorliegt. Es wurde berichtet, daß *imap38* aus einem einzigen Exon von 1900 bp besteht (Krücken *et al.*, 1999). Die *imap38*-cDNA enthält zwei lange, sich überlappenden Leseraster, die am vierten oder achten AUG-Kodon beginnen. Das erste Leseraster kodiert für ein 246 Aminosäuren langes, stark basisches 25,8 kDa großes Protein (IMAP38-1), das in transient transfizierten Zellen in den Zellkern transportiert wird (Krücken *et al.*, 1999). Das läßt vermuten, daß IMAP38-1 während einer Malariainfektion eine regulatorische Funktion ausübt und kein Effektor bei der Parasitenbekämpfung selbst ist (Krücken *et al.*, 1999). Das zweite kodiert ein 277 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 31 kDa (IMAP38-2) und konnte am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden (Stamm *et al.*, 2002). Eine Einbettung der beiden Startkodons in eine Kozaksequenz zur optimalen Translationsinitiation (Kozak, 1986 und 1989) fehlt gänzlich.

Die *imap38*-mRNA wird durch eine Infektion mit *P. chabaudi* Malaria ca 50-fach in der Milz erhöht und hier besonders in Makrophagen und B-Lymphozyten, nicht aber in T-Zellen. Dieses hohe Expressionsniveau bleibt auch 13 Wochen nach der Infektion erhalten. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits seit 9 Wochen keine Parasiten mehr im peripheren Blut nachweisbar (Krücken *et al.*, 1999).

Die Expression von *imap38* ist nicht spezifisch für eine *P. chabaudi*-Malaria, sondern läßt sich auch durch andere Malariaerreger der Maus wie *P. berghei*, *P. yoelii* und *P. vinkei* und – wenn auch schwächer – durch Lysate des menschlichen Erregers *P. falciparum* induzieren. Dagegen ist eine Expression des *imap38*-Gens *ex vivo* in kultivierten Milzzellen nicht möglich. Offenbar benötigt die Expression von *imap38* nicht nur Parasiten-, sondern auch Wirtssignale einer intakten Milz (Krücken *et al.*, 1999). Auffällig ist weiterhin, daß die Induzierbarkeit von *imap38* von Genen desjenigen "non-H-2-background" kontrolliert wird, der auch die Ausbildung langandauernder Immunität gegen Malaria in C57BL/10 und C57Bl/6-Mäusen kontrolliert (Krücken *et al.*, 1999).

### 1.5.2 Homologe von *imap38*

*imap38*-ähnliche Gene sind in der Maus, Ratte, dem Menschen und Pflanzen identifiziert und teilweise bereits genauer charakterisiert worden. Allerdings gibt es nur Ähnlichkeiten zu der Gensequenz, die für IMAP38-2 kodiert. IMAP38-2 gehört zu einer Familie von Proteinen, die evolutionär zwischen Vertebraten und Pflanzen liegen und an der Kontrolle der lokalen Abwehr

verschiedener pathogener Erreger beteiligt ist (Stamm *et al.*, 2002; Cambot *et al.*, 2002; Mac Murray *et al.*, 2002; Dahéron *et al.*, 2001; Poirier *et al.*, 1999; Krücken *et al.*, 1999; Reuber & Ausubel, 1996).

Es wurde postuliert, daß *imap38* zu einer Genfamilie aus 11 Mitgliedern gehört, die innerhalb einer 120 kb Region auf dem Chromosom 6B der Maus lokalisiert sind (Mac Murray *et al.*, 2002). Sie besitzen hochkonservierte GTP-Bindungsdomänen (Dahéron *et al.*, 2001) und sind homolog zu dem Protein AIG1 (*avrRpt2-induced gene*) aus der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), dessen Expression bei diversen Abwehrreaktionen auf eine Infektion mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* induziert wird (Reuber & Ausubel, 1996).

### 1.5.3 GTP-Bindungskapazität von *imap* Genen

GTPasen sind GTP-Bindungsproteine, die eine Vielzahl von verschiedenen Zellprozessen regulieren. Der überwiegende Teil dieser mehr als 100 Proteine ist in Signalwege von Wachstums- und Differenzierungsprozesse involviert. Eine Unterfamilie dieser GTPasen wächst zunehmend und ihre Mitglieder, deren Gene konserviert sind, sind unter den Abkürzungen AIG1 in höheren Pflanzen als auch unter IAP, IMAP, IAN oder IROD in Vertebraten zu finden. In einzelligen Organismen wie *Schizosaccharomyces pombe* oder Evertrebraten wie *Caenorhabditis elegans* treten sie allerdings nicht auf. Da sie vornehmlich in Zellen des Immunsystems exprimiert werden, wird ihre Rolle bei der Pathogenabwehr und dem Ausbrechen von Krankheiten vermutet. Allen IAN-GTPasen, zu denen auch *imap38* gehört, ist die sogenannte AIG1-Domäne gemeinsam. Sie enthält die für GTPasen charakteristischen 5 Motive, die als G1-G5 bezeichnet werden (Krücken *et al.*, 2004), sowie eine konservierte hydrophobe Kasette zwischen G3 und G4, die typisch für die AIG1 ähnlichen Proteine ist (Krengel *et al.*, 1990).

Die meisten IAN cDNAs kodieren für GTPasen mit einem Molekulargewicht von 33-34 kDa. Alle mIAN-GTPasen enthalten mindestens eine kleine "coiled-coil" Region, wobei ihr COOH-Terminus einen Teil der AIG1-Domäne darstellt. Da fast alle der bisher bekannten IAN-GTPasen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder am Golgiapparat exprimiert werden, kann vermutet werden, daß sie das ER und den Golgiapparat nutzen, um die Signaltransduktion zu hemmen oder zu fördern, indem sie einen noch unbekannt Interaktionspartner an sich binden (Krücken *et al.*, 2004).

### 1.5.4 Apoptose und *imap* Gene

Apoptose ist eine Form des physiologischen Zelltods, um unerwünschte Zellen zu entfernen (Vaux & Korsmeyer, 1999). Der ursprüngliche Sinn der Apoptose war die Abwehr von intrazellulären Parasiten, wie z.B. Viren. Dies erklärt auch, warum viele der Gene, die für den Zelltod verantwortlich sind, hoch konserviert sind und viele Homologe haben (Medzhitov & Janeway, 1998).

Einige der bisher bekannten IMAP-Proteine treten immer wieder in Verbindung mit anti- bzw. proapoptotischen Prozessen auf. Das IMAP38 ähnliche (30% identisch, 52% ähnlich) AIG1 korreliert mit der

Ausbildung von Abwehr- und Selbstschutzmechanismen, welche zu deutlich vermehrter Apoptose führen (Reuber & Ausubel, 1996).

Bei *imap38* können nach Infektion mit Blutstadien - *P. chabaudi* - Malaria apoptotische Phänomene beobachtet werden (Stamm *et al.*, 2002). Außerdem wird *imap38* durch das Tumorsuppressorgen p53 induziert (Kannan *et al.*, 2001).

*mIAN1* spielt eine Rolle bei der negativen Thymozytenselektion (Poirier *et al.*, 1999) und das menschliche Homolog wird in verschiedenen lymphoblastischen T-Zell-Leukämien invers zu *mTAL1*-Protoonkogenen exprimiert.

Das *mIAN4* Gen ist durch *bcr/abl* Onkogene regulierbar (Dahéron *et al.*, 2001).

Mutationen im *IAN5* Gen der Ratte führen zu T-Zell-Lymphopenie und schließlich zum Ausbruch von Diabetes (MacMurray *et al.*, 2002; Hornum *et al.*, 2002). Weiterhin löst dieses Gen in T-Zellen eine mitochondriale Dysfunktion und spontane Apoptose aus (Pandarpurkar *et al.*, 2003). Für das humane *IAN5* konnte gezeigt werden, daß seine Überexpression verschiedene Zelllinien resistent gegen einige apoptoseauslösende Stimuli macht, während die Antwort auf zahlreiche andere Apoptoseinduktoren unverändert bleibt (Sandal *et al.*, 2003).

Diese anti- und proapoptotischen Effekte auf Zellen des Immunsystems sowie das Auslösen ihrer Expression im Zuge von Infektionen machen diese Genfamilie äußerst interessant.

## 1.6 Zielsetzung

Eine Erstinfektion mit Malaria induziert die Milz, sich zu einem anti-Malaria-Effektor zu differenzieren. Diese adaptive Differenzierung korreliert mit einer massiven Expressionserhöhung des von Krücken *et al.* (1997) erstmals beschriebenen Gens *imap38*, das selbst nach Ausheilen der Infektion auf einem hohen Niveau konstitutiv exprimiert bleibt (Krücken *et al.*, 1997 und 1999).

Das Gen *imap38* ist der Prototyp einer Genfamilie, die GTPasen kodieren. Diese Genfamilie bildet ein "Cluster" auf Chromosom 6B der Maus und umfaßt 8 funktionelle Gene und 1 Pseudogen (Krücken *et al.*, 2004).

Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsmuster der Gene *IAN1*, *IAN3*, *IAN4* und *IAN5* in unterschiedlichen Mausgeweben und Infektionszuständen genauer als bisher zu untersuchen. Genomische "Southern Blot"-Analysen sollten klären, ob es sich bei *IAN4* und *IAN5* um zwei sehr ähnliche oder um ein und dasselbe Gen handelt. Aufschlüsse über die Lokalisation der jeweiligen Proteine in der Zelle sollten über heterologe Expressionssysteme gewonnen werden. Zuletzt sollte die Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber apoptoseauslösenden Agenzien und somit die Funktion der Gene *IAN1* und *IAN3* sowie des homologen humanen Gens *IAN1* durch Überexpression bzw. Suppression mittels RNAi analysiert werden.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits und weitere Materialien

Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits und weitere Materialien folgender Firmen wurden verwendet:

- Amaxa (Köln)
- Ambion (Austin, TX, USA)
- Ams (Wiesbaden)
- Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
- Biozym (Hessisch Oldendorf)
- BMA (Rockland, ME, USA)
- Biometra (Göttingen)
- Clontech (Heidelberg)
- CRP Inc. (Cumberland, VA, USA)
- Difco (Augsburg)
- Dynal Biotech GmbH (Hamburg)
- Eastman Kodak Company (New York)
- Eppendorf AG (Hamburg)
- Fluka (Ulm)
- Gibco BRL (Eggenstein)
- GFL (Burgwedel)
- Greiner (Solingen, Waldeck, Münster)
- ICN (Meckenheim)
- Invisorb (Berlin)
- Invitrogen (Leek, NL)
- Kendro (Osterode)
- Leica (Heidelberg)
- Macherey-Nagel (Düren)
- MBI Fermentas GmbH (St. Leon Rot)
- Merck (Darmstadt)
- Molecular Probes (Leiden, NL)
- MWG (Ebersberg)
- Nunc (Wiesbaden)
- PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
- peqLAB (Erlangen)
- Polyscience (Niles, IL, USA)
- Promega (Heidelberg)
- Qiagen GmbH (Hilden)
- Roche (Mannheim)
- Roth (Karlsruhe)
- Schleicher und Schuell (Dassel)
- Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
- Stratagene (Heidelberg)
- Stressgen Biotechnologies (Victoria, BC, Canada)
- Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)
- Whatman Ltd. (Maidstone, GB)
- Zeiss (Oberkochen)

Die Chemikalien besitzen jeweils mindestens den Reinheitsgrad „*pro analysis*“. Die Herstellung verschiedener Puffer und Lösungen wird unter Punkt 2.1.2 aufgeführt. Die Zugabe der verschiedenen Medienbestandteile erfolgte jeweils in w/v bei festen Substanzen und v/v bei flüssigen Substanzen.

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

6 × Agarosegel-Ladungspuffer:	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol FF in H <sub>2</sub> O
10 × alkalischer Gellaufpuffer:	500 mM NaOH 10 mM EDTA
6 × alkalischer Gelladungspuffer:	300 mM NaOH 6 mM EDTA 18 % Ficoll 0,15 % Bromcresolgrün 0,25 % Xylencyanol FF in H <sub>2</sub> O
Blocklösung:	1 % BSA in PBS <sup>-</sup>
Blockpuffer:	3 g Magermilchpulver 1 g BSA ad 100 ml TST
Blotpuffer (Western Blot):	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol, pH 8,3 in A. dest.
Con A-Verdünnungslösung:	0,5 % BSA 0,5 % FCS in PBS <sup>-</sup>
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH ad 1 l A. dest.
Denhardt's Lösung (50×):	5 g Ficoll 400 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml A. dest.
Fixierlösung 1:	1 % Formaldehyd in PBS <sup>-</sup>
Fixierlösung 2:	99,8 % Methanol (p.a.); auf -20°C vorgekühlt
Freund's Adjuvanz:	Komplettlösung (Merck, Darmstadt)
Giemsa-Sörensen-Lösung:	5 ml Giemsa (Merck, Darmstadt) 20 ml Sörensenpuffer kurz vor Gebrauch mischen und filtrieren
Glyoxalgel-Ladungspuffer: (aus RNase-freien Stamm- lösungen mischen)	10 mM Natriumphosphat (pH 7,0) 50 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau
2 × Lämmli-Ladungspuffer:	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 10 % Mercaptoethanol 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 10 % Glycerin ad 10 ml A. dest.

Lösung D:	4 M Guanidiniumthiocyanat 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 1% Mercaptoethanol
"Long Ranger gel solution":	50 % Stammlösung (BMA, Rockland, ME,USA)
"Long Ranger Mastermix":	6 M Harnstoff 100 ml 5 × TBE 60 ml "Long Ranger gel solution" ad 500 ml A. dest.
May-Grünwald:	May-Grünwald-Eosin-Methylenblau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
Natriumacetat-Lsg. (pH 5,5):	3 M Natriumacetat mit konz. 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 A. dest.
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 A. dest.
0,01 M Natriumphosphatpuffer:	8,4 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 2 l A. dest.
Neutralisationspuffer:	1 M TrisCl (pH 7,6) 1,5 M NaCl
PBS:	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 A. dest. pH 7,2
Ponceau S:	0,5 % Ponceau S 1 % Eisessig in A. dest.
Prähybridisierungslösung:	6 × SSC 2 × Denhardts 0,1 % SDS 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Heringssperma-DNA in A. dest.
Sammelgelpuffer (4x):	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS in A. dest.
20 × SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
2 × SSC/0,1 % SDS:	100 ml 20 × SSC 5 ml 20 % SDS ad 1 l A. dest. (65°C)

0,1 × SSC/0,1 % SDS:	5 ml 20 × SSC 5 ml 20 % SDS ad 1 l A. dest. (65°C)
Sequenzgel-Lösung:	40 ml "Long Ranger Mastermix" 30 µl TEMED 250 µl APS (10 %)
Sörensenpuffer:	0,49 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l A.dest.
"Stripping Buffer":	50 % Formamid 1 % SDS 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
TBE (5 ×):	270 g Tris 140 g Borsäure 17 g EDTA ad 5 l A. dest. pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
Transferlösung: (Northern/Southern)	3 M NaCl pH 11,4-11,45 (vor Gebrauch einstellen)
Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS in A. dest.
TST-Puffer (1x):	0,15 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05 % Tween-20 in A. dest.

### 2.1.3 Medien

Ham's F-12 Medium:	1 Packung Ham's F-12 Pulvermedium (Gibco) 1,176 g NaHCO <sub>3</sub> ad 1 l A. dest., pH 7 ; sterilfiltrieren
DMEM:	Gibco
LB-Medium:	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefe-Extrakt ad 1 l A. dest., pH 7,5 nach dem Autoklavieren Zugabe des entsprechenden Antibiotikums
LB <sub>amp</sub> -Platten:	1,5 % Agar in LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin
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 ad 1 l A. dest., pH 7,5

RPMI 1640-Medium: 1 Packung RPMI 1640-Pulvermedium (Gibco)  
25 mM Hepes  
0,85 g NaHCO<sub>3</sub>  
ad 1 l A. dest., pH7,2 sterilfiltrieren

SOC-Medium: 2 % Trypton  
0,5 % Hefe-Extrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O  
10 mM MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O  
20 mM Glukose  
ad 1 l A. dest.

2 × YT-Medium: 16 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
ad 1 l A. dest., pH 7,5

### 2.1.4 Oligonukleotide

In Tabelle 1 sind alle synthetischen Oligonukleotide aufgeführt, die im Verlauf der Arbeit verwendet wurden. Die Primer sollten eine Länge von 15-30 Basen aufweisen, einen GC-Gehalt von 40-60 % besitzen und weder zueinander noch zu sich selbst komplementär sein. Am 3'-Ende sollten die Primer einen GC-‘Clamp’ besitzen, um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten. Andererseits wird empfohlen keine ‘Repeats’ bzw. Purin- oder Pyrimidin-Abschnitte von mehr als 3 G’s oder C’s am 3'-Ende zu platzieren, weil sonst fehlerhybridisierende Primer stabilisiert werden (Kawasaki, 1991).

Neben der Bezeichnung der Oligonukleotide und deren Sequenz ist zusätzlich die entsprechende Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>), der GC-Anteil und der jeweilige Anwendungszweck angegeben. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur bei der die Hälfte der Nukleotide in einer Doppelhelix dissoziiert sind. Sie wird beeinflusst durch verschiedene Parameter wie den GC-Gehalt und die Konzentration an monovalenten Kationen. Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt meist 5-10°C unter der T<sub>m</sub>, sollte allerdings experimentell ermittelt werden, da noch weitere Faktoren wie die Spezifität der Sequenz eine Rolle spielen (Mülhardt, 1999).

Alle für die Amplifikation oder Gewinnung von cDNA eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Die Sequenzier-Primer (LI-COR über MWG, Ebersberg) sind an ihrem 5'-Ende IRDye™ 800-modifiziert.

**Tabelle 1: Aufstellung und Spezifikation der verwendeten Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	GC-Gehalt (%)	Anwendung
T7 Forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	55,0	40,0	Sequenzierung
BGH Reverse	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	55,0	55,6	Sequenzierung
M13 Forward	GTA AAA CGA CGG CCA G	55,0	56,3	Sequenzierung
M13 Reverse	CGA GAA ACA GCT ATG AC	55,0	47,1	Sequenzierung

**Tabelle 1: Aufstellung und Spezifikation der verwendeten Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	T <sub>m</sub> (°C)	GC-Gehalt (%)	Anwendung
IAN4-up-539	CAT GGA CTG AAC AAC TAC TGG ACT TCC CAT TG	68,2	46,9	PCR
IAN4-lo-1559	TGA GTG ATC CCA ATC CAC AAT AAA ATG CAG AG	65,6	40,6	PCR
IAN-3-3'	TGA AAA AAG ATG CCA TAT TTT CAA AAG AAC TTT	68,0	24,0	PCR
IAN-3-5'	ATG GCT GAG CCC AGT GAC AAC TCT CTG AGG	64,0	56,6	PCR
IAN-1-3'	GTC TTT CAT AAA CTG GTT GAA GAT AAA GGA AGC AAT	66,0	33,3	PCR
IAN-1-5'	ATG GAA GTC CAG TGC GGT GGT GCG GGG TTC ATC CC	61,0	61,1	PCR
mia1q-up	GTT CAT CCC AGA AAG TTC AAG GAG CAG	65,0	48,1	PCR
mia1q-lo	TTT GTG TGT CAG CAT CTG GTA CCT CAG T	65,1	46,4	PCR
mia3q-up	TTT GAA GAA GGT GTG AGA ACT CAA AGG C	63,7	42,9	PCR
mia3q-lo	TAT CAA CCA GGA GGT CTC TTT CCT TCC A	65,1	46,4	PCR
mia4q-up	CCA TTG GTA AAC AGG CAT AGT TGG ACT G	65,1	46,6	PCR
mia4q-lo	GAT GTC CTT GTC CAT GTC TTG GTT CTG	65,0	48,1	PCR
mia5q-up	ATA CCT GTA AGG GTA AAG AGG AAC CCG C	66,6	50,0	PCR
mia5q-lo	GTC TGT CTA CCA CTA GGA TGC TCC TCC C	69,5	57,1	PCR
mia1q-so-up	AGC TTG GAA ACC AAG ATC AAG GAA T	59,7	40,0	PCR
mia1q-so-lo	AGG TGT ATC CAC GAC AAC AAG CTC T	63,0	48,0	PCR
mia3q-so-up	GGA TTC CAG AGC TTC CAC GTT AAG A	63,0	48,0	PCR
mia3q-so-lo	TGC GGG AGT CAC TCT GAC AGT TCT	64,6	54,2	PCR
mia4q-so-up	CTT CAG AAT GTT GTA ACA GGC GGA AAG A	63,7	42,9	PCR
mia4q-so-lo	GGG GGT GTG TCT ACC ACT AGG AT	64,2	56,5	PCR
mi5q-so-up	ACT CGG AAG AGA ATG GAA CAC CTT CAG	65,0	48,1	PCR
mi5q-so-lo	TCC CAT GTG CCT GTC TCT GC	61,4	60,0	PCR
Mgi4Nhe122up	GCT AGC CCC AAC TGA GAA TTG TCT TAC TTG	66,8	46,7	PCR

**Tabelle 1: Aufstellung und Spezifikation der verwendeten Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	GC-Gehalt (%)	Anwendung
mg14-122up	CCC AAC TGA GAA TTG TCT TAC TTG	59,3	41,7	PCR
mg14Bcl684lo	AAT TGA TCA ACC ATT TTC CCT CAC CAT GCT CTG	67,0	42,4	PCR
Mgi4BclHindlo	TGA TCA AAG CTT ACC ATT TTC CCT CAC CAT GCT CTG	69,5	44,4	PCR
Mgi9Nhe511up	GCT AGC AGC GAC TTC ATT GCT GAC TCA GAT	68,1	50,0	PCR
mg19-up	AGC GAC TTC ATT GCT GAC TCA GAT	61,0	45,8	PCR
Mgi9Bcl1111lo	AAT TGA TCA TGG CAC TGA GCC CTG ACT CTG GTA	69,5	48,5	PCR
Mgi9BclHindlo	TGA TCA AAG CTT TGG CAC TGA GCC CTG ACT CTG GTA	71,7	50,0	PCR
mgimap3-3-up	AAA CTC ATG TAC ATC ACC ATT TCC CAC CCC TC	68,2	46,9	PCR
mgimap3-587-lo	CAA CTA TGC CTG TTT ACC AAT GGG AAG TCC AG	68,2	46,9	PCR
mgimap3-66-up	AGA TCT TGT GAG CTG GCC TTC ACC TCT TGT AG	69,5	50,0	PCR
mgimap3-567-lo	TGG GAA GTC CAG TAG TTG TTC AGT CCA TGA GT	68,2	46,9	PCR
mgimap5-1148-up	CCA TCT CAT GTC AGG GAA CCT CAG TCT TCA AT	68,2	46,9	PCR
mgimap5-1755-lo	GTT GAG GGC CTA TAA TGC TA CCA CAC AAT CT	68,2	46,9	PCR

### 2.1.5 Antikörper

Es wurden folgenden Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

**Tabelle 2: verwendete Primär- und Sekundärantikörper**

<b>Primäre Antikörper:</b>	monoklonaler Maus-anti-V5 Antikörper (Invitrogen, Leek, NL)
	polyklonaler Kaninchen-anti-Giantin Antikörper (CRP Inc., Cumberland, VA, USA)
	polyklonaler Kaninchen-anti-Calnexin Antikörper (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada)
<b>Sekundäre Antikörper:</b>	polyklonaler Ziege-anti-Maus IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment Konjugat-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 (Molecular Probes, Leiden, NL)
	polyklonaler Ziege-anti-Maus IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment Konjugat-Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 (Molecular Probes, Leiden, NL)
	polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> Fragment Konjugat-Alexa <sup>™</sup> 488 (Molecular Probes, Leiden, NL)
	polyklonaler Ziege-anti-Maus IgG HRP-Konjugat (Jackson Immuno-Research Laboratories, West-Grove, PA, USA)

## 2.1.6 Stämme und Vektoren

### 2.1.6.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche NMRI - Mäuse sowie Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/10 und C57BL/6 aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen auf Kleintierstreu gehalten und mit Spezialfutter für Nacktmäuse (ssniff NM-Z, Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Wasser *ad libitum* ernährt. In den Experimenten wurden Mäuse im Alter zwischen 9 und 12 Wochen eingesetzt.

### 2.1.6.2 Parasitenstamm

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

*Plasmodium*-Parasiten wurden wöchentlich auf naive NMRI-Mäuse übertragen (Wunderlich *et al.* 1982). Die Parasitämie der Mäuse wurde bestimmt, indem aus einem an der Schwanzspitze entnommenen Blutstropfen ein Ausstrich angefertigt wurde. Dieser wurde mit Giemsa und May-Grünwald gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt (Romeis 1968). Der getrocknete Ausstrich wurde 3 min mit May-Grünwald-Färbelösung überschichtet. Diese wurde anschließend mit etwa einem Volumen Sörensen-Puffer verdünnt. Nach abermals 3 min Inkubation wurde die Färbelösung abgeschüttet und der Ausstrich für 5 min mit Giemsa-Sörensen-Färbelösung überschichtet.

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

### 2.1.6.3 Zellkulturlinien

Es wurde mit verschiedenen immortalisierten Zellkulturlinien gearbeitet. Charakteristika der verschiedenen Zelllinien können Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3: Charakteristika verschiedener Zelllinien**

Zelllinie	ATCC bzw. DSMZ-Nummer	Organismus	Gewebe/Zelltyp
CHO-K1	ACC-116 (DSMZ)	Cricetulus griseus	Ovar/Epithelzelle
Jurkat	TIB-152 (ATCC)	Homo sapiens	T-Lymphozyt
NIH-3T3	CRL-1685 (ATCC)	Mus musculus	Embryo/Fibroblast

### 2.1.6.4 Chemisch kompetente Bakterienstämme

- *E. coli* TOP10F' "One shot chemically competent cells" (Invitrogen, Leek, NL)  
Genotyp: F'{{lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>)}} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) ÷80 lacZM15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG
- "Subcloning Efficiency™ DH5.™ Competent cells" (Invitrogen, Leek, NL)  
Genotyp: F'÷80dlacZfM15 f(lacZYA-argF)U169 deo R recA endA hsdR17(rk, mk<sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1
- SCS110 Competent Cells (Stratagene, Heidelberg)  
Genotyp: rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>F</sup>ZM15]
- Sure® 2 Supercompetent Cells (Stratagene, Heidelberg)  
Genotyp: e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>) (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC :Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB lacI<sup>F</sup>ZM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

### 2.1.6.5 Vektoren

Folgende Plasmidvektoren wurden verwendet:

- pCaspase3-Sensor (BD Biosciences Clontech, PaloAlto, USA)
- pcDNA 3.1/V5-His<sup>©</sup> TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Leek, NL)
- pCR2.1 TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Leek, NL)
- pDECAP (Toshie and Shunsuke, Japan 2003)
- pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, USA)
- pEYFP-ER (Clontech, Heidelberg)
- pEYFP-Golgi (Clontech, Heidelberg)
- pGAPDH in pBR322 (Rodrigo Bravo in Invitrogen, Leek, NL)
- psilencer™2.1-U6 hygro (Ambion Inc., Worcester, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA

Verschiedene Parameter wie Kopienzahl der Plasmide, verwendeter Wirtstamm, Kulturmedium, Kulturvolumen, Kulturdichte und zur Selektion verwendete Antibiotika beeinflussen den Erfolg einer Plasmid-DNA-Präparation hinsichtlich Ausbeute und Reinheit der DNA.

Die Isolierung von Plasmid-DNA gliedert sich in Anzucht und Lyse der Bakterien und anschließende Reinigung der freigesetzten DNA.

#### 2.2.1.1 Mini-Präparation

Eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA wird immer dann der Groß-Präparation vorgezogen, wenn für anschließende Verfahren geringe Mengen an DNA (<20 µg) ausreichend sind, z.B. wenn zunächst die für weitere Analysen interessanten Klone erst identifiziert werden sollen.

Für die Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab wurde der "NucleoSpin®Plasmid" Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Methode beruht auf dem Einsatz von Zentrifugationssäulen mit einer Silika-Membran zur selektiven Bindung von Nukleinsäuren. Die alkalische Lyse der Bakterien zu Beginn basiert auf dem von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Verfahren. Bakterielle RNA wird bereits während der alkalischen Lyse durch die im Resuspendierungspuffer (Puffer A1) enthaltene RNase A abgebaut, so daß eine separate RNA-Hydrolyse nach der erfolgten Plasmid-Präparation nicht notwendig ist.

Es wurden je 2-4 ml einer 5 ml-Kultur eingesetzt, welche über Nacht bei 37°C und 250 rpm in selektivem Nährmedium herangezogen wurde. Die Plasmid-DNA wurde nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dabei erfolgte die Elution in 50 µl A. dest..

#### 2.2.1.2 Midi-Präparation

Für Plasmid-Präparationen im größeren Maßstab (bis zu 100 µg) wurden 50 ml Übernachtskulturen (37°C, 250 rpm in Selektionsmedium) bei 5.000 rpm in der Untertischzentrifuge (Heraeus) pelletiert und die DNA über Qiagen- oder Macherey-Nagel-Säulen nach Herstellerangaben ("Qiagen Plasmid-Midi" Kit, Qiagen, Hilden bzw. "NucleoBond® PC100" Kit, Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die eluierte DNA wurde mit Isopropanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in 50 µl A. dest. resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1). Dazu wurde die DNA in TE-Puffer verdünnt.

### 2.2.2 Isolation von genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA aus der Leber (40 mg) naiver C57BL/6 Mäuseweibchen erfolgte mit Hilfe des Invisorb-Kits (Invitek). Das Kit ermöglicht eine schnelle Präparation von genomischer DNA aus Gewebe. Das mit einem Ultraturrax T25 (IKA®-Labortechnik) zerkleinerte Gewebe wurde in ein 1,5 ml konisches Reaktionsgefäß überführt und bei 52 °C unter zu Hilfenahme von 40 µl Proteinase K (vom Hersteller) in 400µl Lysepuffer G

schüttelnd lysiert. Nach dem Entfernen von RNA durch Zugabe von 40 µl RNase A (10mg/ml) und Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues konisches Reaktionsgefäß überführt, mit Bindungspuffer versetzt und auf eine Säule gegeben. Nach zwei Waschschrritten konnte die genomische DNA eluiert und ihre Konzentration im Photometer bestimmt werden.

### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von isolierten oder aufgereinigten Nukleinsäuren erfolgte photometrisch, d.h. durch UV-Absorption, mit Hilfe eines Beckman DU-600 Spektralphotometers. DNA und RNA absorbieren im UV-Bereich um 250-270 nm mit einem Maximum bei etwa 260 nm. Bei der Messung des Absorptionsspektrums wurden Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 320 nm berücksichtigt.

Nach Sambrook *et al.* (1989) ist die Absorption bei 260 nm ein Maß für die Nukleinsäure-Konzentration, während bei 280 nm Proteine durch Absorption der aromatischen Aminosäuren detektiert werden. Bei 320 nm wird die Streuung bestimmt. Dieser Wert wird von den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm abgezogen. Für hochmolekulare Nukleinsäuren gilt:

DNA:  $A_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ml

RNA:  $A_{260} = 1$  entspricht 40 µg/ml

Ein Maß für die Reinheit stellt das Verhältnis zwischen den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm ( $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$ ) dar. Dieses sollte für DNA-Proben einen Wert von 1,8 erreichen, für RNA-Proben 1,9.

### 2.2.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Um zu verifizieren, daß auch wirklich das gewünschte Fragment in Plasmidvektoren ligiert wurde, wurden jeweils 5-6 Klone mit ausgesuchten Restriktionsenzymen verdaut. Dazu wurde 1/5 oder 1/10 der DNA aus Mini-Präparationen (siehe 2.2.1.1) verwendet. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde die DNA mit dem gewählten Enzym, dem zugehörigen 10 × Puffer und A. dest. versetzt und 2-3 h bei 37°C (bzw. 55°C für Restriktionen mit *Bst*XI) inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 6 × Ladungspuffer (4 µl) versetzt und auf einem 1-2%igen Agarosegel parallel zu einem Längenstandard aufgetrennt. Die Bandengrößen wurden mit den erwarteten Werten verglichen.

### 2.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook *et al.* (1989) in horizontalen Flachbettkammern gegossen. Als Gel- und Kammerpuffer wurde 1 × TBE verwendet. Die zu analysierende DNA wurde mit 6 × Ladungspuffer (Fermentas, St. Leon Rot) versetzt und in Gelen mit 0,8-1,5 % Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Feldstärke von 0,8 bis 4 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard dienten je nach erwarteter Größe der Fragmente parallel laufende *Eco*RI/*Hind*III-restringierte λ-DNA, DNA-Ladder Mix oder pUC-Mix Marker (alle Fermentas, St. Leon Rot).

### 2.2.6 Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die gewünschten Fragmente unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des "Nucleo Spin® Extract 2 in 1 Kits" (Macherey Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde in 25-50 µl A. dest. eluiert. Mit dieser Methode können DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 10 kbp isoliert werden. Dabei wird die DNA prinzipiell unter bestimmten Salzbedingungen (chaotrope Salze) an eine Silika-Matrix gebunden und nach Waschschritten in salzfreiem Milieu wieder davon abgelöst.

### 2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Je nach anschließendem Verwendungszweck wurden über PCR amplifizierte und danach aufgereinigte Fragmente (siehe 2.2.10 und 2.2.6) mit Hilfe der entsprechenden Kits (Invitrogen, Leek, NL) in den Vektor pCR2.1-TOPO® oder in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His® TOPO® ligiert. Dabei handelt es sich um Plasmidvektoren mit einem Thymidin-Überhang, der die Effizienz einer Klonierung von PCR-Fragmenten erhöht, da viele der bei der PCR verwendeten DNA-Polymerasen (*Taq*- aber auch *Tfl*- und *Tth*-Polymerase) keine glatten Enden produzieren, sondern meist einen Überhang von einer Base (überwiegend Adenosin) erzeugen.

Für die Klonierungsreaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 6 µl 0,5-4 µl aufgereinigtes PCR-Fragment mit 1 µl "Salt Solution" und 1 µl TOPO® Vektor vermischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bis zur nachfolgenden Transformation auf Eis oder bei -20°C gelagert. Desweiteren wurde in den Vektor pDECAP, nach Linearisierung mit entsprechenden Restriktionsenzymen, über eine T4-Ligase (1000 U) (Fermentas St. Leon Rot) in 20 µl 1 × Ligasepuffer bei 16°C über Nacht ligiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert lag bei 1:3.

### 2.2.8 Chemische Transformation

Es wurden chemisch kompetente DH5λ- ( $1.0 \times 10^6$  cfu/µg DNA) oder TOP10F'- ( $1.0 \times 10^9$  cfu/µg DNA) *E. coli*-Zellen (beide Invitrogen, Leek, NL) sowie SCS110-Competent Cells ( $5,0 \times 10^6$  cfu/µg DNA) oder Sure®2-Supercompetent Cells ( $1,0 \times 10^9$  cfu/µg DNA) verwendet (beide Stratagene, Heidelberg). Die aliquotierten Zellen (25 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Klonierungsansatzes (siehe 2.2.7) versetzt, sanft gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 30 s einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und wieder auf Eis abgekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC Medium (Raumtemperatur) und das Reaktionsgefäß wurde 1 h bei 37°C und 200 rpm horizontal geschüttelt. Zwei verschiedene Volumina dieses Ansatzes wurden schließlich auf vorgewärmte LB<sub>amp</sub>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.9 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierungen wurden mit einem LI-COR DNA-"Sequencer", Modell 4000 (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg), nach

einer Variante der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1997) durchgeführt. Im Prinzip wird dabei die DNA zunächst denaturiert, mit einem fluoreszenzmarkiertem Primer hybridisiert und dieser mit einer Polymerase verlängert. Die Elongation bricht ab, wenn ein 2',3'- Didesoxynukleotid eingebaut wird, da dann aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-C-Atom kein weiteres Nukleotid angehängt werden kann. Der Einbau eines Didesoxynukleotids erfolgt mit statistischer Häufigkeit, so daß man eine größere Menge an Fragmenten unterschiedlicher Länge erhält, die alle mit dem gleichen Didesoxynukleotid enden. Man führt vier Sequenzieransätze mit jeweils einem der vier Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) durch, trennt die synthetisierten Fragmente in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Länge auf und die Sequenz wird dann durch das Sequenziergerät während der Elektrophorese, über Anregung der Fluoreszenz-markierten DNA mittels Laser, ermittelt.

Für die enzymatische Sequenzierungsreaktion wurden das "Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) und sequenzspezifische, mit dem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markierte Primer verwendet. Dabei wurden 4 parallele Reaktionsansätze erstellt, die neben dem entsprechenden Primer (0,2 µM), 2-3 µg der zu sequenzierenden Plasmid-DNA enthielten. Zu diesen Ansätzen (je 3 µl Volumen) wurden dann, in 0,2 ml PCR-Gefäßen 3 µl aus den 4 verschiedenen Nukleotid-Gemischen pipettiert, die als "A"-, "C"-, "G"- und "T"- "Reagent Mix" bezeichnet werden. Dies bezieht sich auf die verschiedenen 2',3'- Didesoxynukleotide, die neben den 4 Desoxynukleotiden in den Gemischen enthalten sind. Diese Ansätze wurden mit 10 µl Mineralöl überschichtet und in einem "Thermocycler" (PTC-200 MJ Research, Biozym, Hessisch Oldendorf) der Sequenzierungsreaktion unterzogen. Das zugrundeliegende PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen: Auf einen 3 minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C folgten 35 Zyklen mit je 30 s Primer-"Annealing" bei 55-60°C (je nach der für den Primer optimalen Temperatur), 1 min Elongation bei 72°C und 30 s Denaturierung bei 95°C. Die Reaktion wurde durch einen 5 minütigen, finalen Denaturierungsschritt (95°C), die anschließende Abkühlung auf 4°C und die Zugabe von 6 µl "Formamide loading dye" abgeschlossen.

Kurz vor Auftragen von 1,5 µl dieser Ansätze auf ein Sequenzgel wurden die Reaktionen erneut kurz denaturiert (3 min, 72°C). Zur Auftrennung (über Nacht, 50°C, 35 Watt) wurde ein 0,25 mm dünnes, 40 cm langes, 5 %iges "Long Ranger"- Polyacrylamidgel (Sequenzgel-Lösung mit "Long Ranger™ Gelsolution", Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Als Laufpuffer diente 1 × TBE. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm BASEIMAGEIR 4.0 (LI-COR, Bad Homburg).

Die ermittelten Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des Programms "Blast 2 Sequences" (Altschul *et al.*, 1990 und 1997; Gish & States, 1993; Madden *et al.*, 1996; Zhang & Madden, 1997) mit bereits vorhandenen EST-Sequenzen und mit Hilfe des Programms DIALIGN 2.2 (Morgenstern *et al.*, 1998; Morgenstern, 1999; Morgenstern, 2002) miteinander verglichen.

### 2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, *in vitro* von bestimmten Nukleotidsequenzen millionenfach Kopien enzymatisch herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang ermöglicht es, auch sehr geringe Mengen von DNA einer Analyse schnell zugänglich zu machen.

Die einzelnen Schritte während einer PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen (sog. "Primern"), einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrix. Es werden zwei Primer pro Reaktion benötigt, die an jeweils einen Strang der Matrizen-DNA hybridisieren und so gewählt werden, daß letztlich gezielt die Sequenz zwischen den beiden Primern amplifiziert wird. Der typische Ablauf einer PCR lässt sich in folgende Schritte untergliedern:

- 1) Denaturierung (90-94°C)
- 2) Primer-Hybridisierung (50-72°C)
- 3) Elongation/Amplifikation (68-72°C) durch thermostabile Polymerase

Die zu wählende Temperatur für das Primer-"Annealing" ist abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Primer, die wiederum unter anderem durch die Anzahl der Nukleotide und den GC-Gehalt beeinflusst wird.

Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird. Je nach Komplexität der Matrize genügen in den meisten Fällen 30-35 Zyklen. Mit Hilfe einer PCR-Variante, der RT-PCR, lassen sich spezifisch cDNA-Sequenzen amplifizieren. Besondere Bedeutung kommt dieser Methode zu, wenn seltene Transkripte nachgewiesen und analysiert werden sollen. Im Vergleich zu RNA-Nachweisverfahren wie der "Northern Blot"-Analyse ist die Sensitivität der RT-PCR erheblich größer.

Bei der RT-PCR erfolgt zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Bei der cDNA-Erststrangsynthese können je nach der Zielsetzung des Versuchs verschiedene Arten von Primern für die Polymerasereaktion verwendet werden. Oligo(dT)-Primer sind etwa 15 bis 20 bp lang und hybridisieren im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende eukaryotischer mRNAs. Mit ihrer Hilfe werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle (2-4 % der Gesamt-RNA) selektiv in cDNA umgeschrieben. "random"-Hexamere sind Hexanukleotide statistischer Basenzusammensetzung. Aufgrund dessen können sie an den verschiedensten Stellen eines jeden RNA-Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Spezifische Primer sind dann von Vorteil, wenn ein Transkript mit geringer Häufigkeit amplifiziert werden soll. Auf diese Weise wird schon bei der Erststrangsynthese selektiv das gewünschte Transkript in cDNA umgeschrieben und dadurch die Menge an möglichen Nebenprodukten bei der nachfolgenden PCR verringert.

In dieser Arbeit wurden nur spezifische Primer (2.1.4.) verwendet. Für die reverse Transkription fand die RNA-abhängige Polymerase (cMaster-PCR Kit, Eppendorf AG, Hamburg) Verwendung.

Pro Ansatz wurden 1 µl dNTP-Mix (10mM), 300 nM Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 250 ng Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben mit 0,25 µg RNase-Inhibitor, 2 µl 10 × Puffer RT plus, 7,5 U Master RT Enzym und 2,5 U PCR Enzym Mix versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf 50°C erhitzt und direkt weiter in einem 3-Schritt-Programm verwendet, bei dem nach dem Anfangsdenaturierungsschritt (2 min bei 94°C) 24-34 Zyklen mit je 15 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primer-Anlagerung bei 58-65 °C und 45 s Elongation bei 72°C folgten. Durch einen finalen Elongationsschritt von 8 min bei 72°C wurde die Transkription abgeschlossen.

Als Polymerase für die eigentliche PCR diente das Triple Master™ PCR System (Eppendorf AG, Hamburg). Hier wurden 1 µl dNTP-Mix (10mM), 300 nM Primer, 2,5 U Triple Master Polymerase und 2 µl 10 × Puffer mit A.dest. auf 20 µl aufgefüllt. Nach Denaturierung der Proben (2 min bei 94°C) erfolgte über 35 Zyklen ein 3- Schritt-Programm, das sich wie folgt zusammensetzte: 15 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primeranlagerung bei entsprechender primerabhängiger Temperatur und 45 s Elongation bei 72°C. Ein finaler Elongationsschritt von 8 min bei 72°C schloß die PCR ab.

### **2.2.11 Bestimmung optimaler Annealingtemperatur und Zyklenzahl**

Da bei einer nicht optimalen Annealingtemperatur zu viele Nebenprodukte auftreten können, wurden die PCR Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen im Gradientcycler durchgeführt. Über gelelektrophoretische Auftrennung konnte die Temperatur bestimmt werden, bei der die wenigsten Nebenprodukte und das meiste Amplifikat auftrat.

Aber auch die Zyklenzahl spielt eine entscheidende Rolle. Idealerweise befindet sich die Amplifikation des zu quantifizierenden Gens noch in der exponentiellen Phase. Daher wurde die gleiche PCR Reaktion in verschiedenen konischen Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt und die PCR wie oben beschrieben durchgeführt, nur daß ab dem 13. Zyklus alle zwei Zyklen ein Gefäß entnommen wurde und bis zur Auftragung und Auswertung auf einem Agarosegel auf Eis gelagert wurde.

### **2.2.12 Bestimmung des optimalen Verhältnisses von 18S-Primern zu 18S-Kompetitoren**

Zuerst wurden 4 Ansätze mit verschiedenen Verhältnissen der Primer zu Kompetitoren angesetzt: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6. Davon wurde je 1 µl zu den RT-PCR Ansätzen (Endvolumen 10µl) pipettiert. Ebenfalls wurde 1µl der genspezifischen Primer hinzupipettiert. Außerdem wurden ein konisches PCR Reaktionsgefäß nur mit genspezifischen Primern und ein Gefäß nur mit den 18S-Primern und den Kompetitoren im Verhältnis 3:7 vorbereitet. Je 250 ng RNA wurde eingesetzt und die Reaktion bei dem entsprechend optimierten Programm gestartet.

### 2.2.13 Colony PCR

Für die Amplifikation eines Fragmentes von einer plasmidhaltigen Bakterienkolonie wurden einzelne Kolonien in 15 µl A. dest. resuspendiert, wovon wiederum nur 5 µl für einen PCR-Ansatz verwendet wurden. Ein solcher PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus je 300 nM der beiden sequenzspezifischen Primer, 10 mM eines dNTP-Mixes, 2,5 U der Taq-DNA-Polymerase in 20 µl 1 × Taq-Polymerasepuffer. Die Koloniesuspension wurde 5 min bei 95°C denaturiert und dann, nach Zugabe des PCR-Ansatzes, 35 Zyklen von 15 s bei 94°C, 30 s bei der entsprechenden Anlagerungstemperatur der Primer und 45 s bei 72°C unterworfen. Eine 8-minütige „Elongation“ bei 72°C beendete die Reaktion. 1/10 eines solchen Reaktionsansatzes wurde zur Überprüfung der PCR-Fragmente in einem 1–1,5%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

### 2.2.14 Organentnahme

Mäuse wurden, wenn nicht anders beschrieben, durch cervikale Dislokation getötet, und die Organe aseptisch entnommen. Diese wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.15 Isolation von RNA

RNA ist aufgrund der zusätzlichen 2'-Hydroxylgruppe im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. RNasen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung z.B. durch Sieden oder Autoklavieren schnell wieder renaturieren (Sela *et al.*, 1957). Daher sind besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA zu treffen. Ein starker RNase-Inhibitor ist Diethylpyrokarbonat (DEPC). Es wird verwendet, um Geräte zu behandeln und RNasefreie Lösungen herzustellen. Zur DEPC-Behandlung von A. dest. oder chemischen Lösungen wurden diese mit 0,1 % DEPC versetzt und mindestens 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Da selbst Spuren von DEPC Adenylreste carboxymethylieren (Henderson *et al.*, 1973) und dadurch besonders die *in-vitro*-Translation, aber auch die Hybridisierung von RNA inhibieren, mußte DEPC anschließend quantitativ zersetzt werden. Dies geschah durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C und einem Druck von 2 bar. Dabei zerfällt die Substanz in Ethanol und Kohlendioxid.

#### 2.2.15.1 Isolation von Gesamt-RNA: Extraktion mit peqGOLD TriFast™

Das peqGOLD TriFast™-Reagenz enthält Guanidinisothiocyanat (chaotropes Salz) und Phenol in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast™-Reagenz (auf 80°C erhitzt) pro 100 mg Gewebe erfolgte die Homogenisierung während 2-minütiger Behandlung mit dem Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA - Labortechnik, Staufen). Das Homogenisat wurde dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Auflösung von Nukleoproteinkomplexen zu gewährleisten. Pro 1 ml peqGOLD TriFast™-Reagenz wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben, die Mischung kräftig geschüttelt und für weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 5.000 rpm und 4°C in der Untertischzentrifuge (Heraeus) kam es zur Bildung von drei Phasen, wobei die RNA sich

ausschließlich in der oberen, wässrigen Phase befand. Diese wurde in ein frisches Gefäß überführt und pro ml peqGOLD TriFast™-Reagenz mit 0,5 ml Isopropanol vermischt. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 30-60 min bei 9.000 rpm und 4°C im JS 13.1-Rotor zentrifugiert (Beckman JS 21), um die RNA zu präzipitieren. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und im nötigen Volumen DEPC behandeltem A. dest. resuspendiert. Für die anschließende photometrische Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit 10mM Dinatriumhydrogenphosphat verdünnt.

### **2.2.15.2 Isolation von Poly(A)<sup>+</sup> mRNA**

Die Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup> mRNA stellt eine Anreicherung aller mRNA-Spezies dar. Dadurch wird es beispielsweise einfacher, seltene mRNA-Spezies im "Northern Blot" nachzuweisen. Gleichzeitig wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine seltene mRNA zu detektieren.

Zur Gewinnung von mRNA aus zuvor isolierter Gesamt-RNA wurde das "Dynabeads® mRNA Purification Kit" (DynaL Biotech, Hamburg) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Diese Isolationsmethode beruht auf der Basenpaarung zwischen den Poly(A)<sup>+</sup>-Schwänzen am 3'-Ende der meisten mRNA's und den Oligo(dT)-Resten, die kovalent an die Oberfläche der "Dynabeads® Oligo (dT)25" gebunden sind. Andere RNA-Spezies und 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 konischen Reaktionsgefäßes festgehalten. Es wurden je 500 µg Gesamt-RNA pro 1 ml "Dynabeads®" eingesetzt.

### **2.2.16 Denaturierende Glyoxalgelelektrophorese von RNA**

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen. Durch die erhöhte Temperatur bei der Denaturierungsreaktion (50°C) und durch DMSO werden intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindungen in der RNA aufgebrochen. Dadurch werden Guanin-Reste für die kovalente Modifikation mit Glyoxal freigelegt. Durch Einsatz von Magnetrührern während des Gellaufs wurde die Bildung eines pH-Gradienten vermieden, da Glyoxal unter basischen Bedingungen (pH > 8,0) wieder von der RNA dissoziiert.

Es wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 5 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA in einem Volumen von bis zu 10 µl eingesetzt. Die RNA wurde unter Zugabe von 5,4 µl 6 M Glyoxal, 16 µl DMSO (50 %) und 3 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) für 1 h bei 50°C denaturiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 5 min auf Eis mit 4 µl Glyoxalgele- Ladungspuffer versetzt und auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen, das mit einem gleichzeitig als Laufpuffer verwendeten 0,01 M Natrium-phosphatpuffer (pH 7,0) hergestellt wurde. Zusätzlich wurden 10 µg *EcoRI/HindIII* restringierte-DNA (MBI Fermentas, St. Leon Rot) als Längenstandard aufgetragen, die genau wie die RNA-Proben vorbehandelt wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 3-4 V/cm durchgeführt. Da Glyoxal auch mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid reagiert, erfolgte die Anfärbung der Markerbanden erst nach

Abschluß des Gellaufs. Dazu wurden die zu färbenden Spuren abgetrennt und zunächst für 20 min in 50 mM NaOH geschwenkt, um das Glyoxal zu eliminieren und dem Farbstoff Ethidiumbromid die Bindung zu ermöglichen. Darauf folgten drei Waschschriffe von je 20 min in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0). In einem letzten Schritt erfolgte schließlich die Anfärbung der Markerbanden durch eine Inkubation für 20-30 min in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) im Dunkeln. Die Visualisierung der Banden wurde durch UV-Licht ermöglicht.

### **2.2.17 Alkalische Gelelektrophorese von DNA**

Bei einem alkalischen Gel wird die vorliegende doppelsträngige DNA im Gegensatz zum normalen Gel durch NaOH denaturiert und liegt demnach nur noch einzelsträngig vor. Dies erleichtert die Unterscheidung zwischen den Banden beim Auftragen von kompetitiven PCR-Produkten, da nur 2 Banden auftreten. Bei einem normalen Agarosegel würden bei der anschließenden Hybridisierung sowohl die einzelsträngigen als auch die doppelsträngigen PCR-Produkte eigene Banden ergeben. Während dies bei Ethidiumbromid gefärbten Gelen kein Problem darstellt, ermöglicht die hohe Sensitivität des "Southern-Blots" auch eine Detektion der geringen Mengen an einzelsträngigem PCR-Produkt.

Die PCR-Proben wurden mit 6 × alkalischem Gelbeladungspuffer versetzt und auf ein 1,5%iges Gel aufgetragen, das in einem alkalischen Puffer läuft und mit diesem hergestellt wurde. Durch das darin enthaltene NaOH und EDTA wird die DNA denaturiert und liegt einzelsträngig vor. Zusätzlich wurden 50ng pUC-Mix Marker (Fermentas, St.Leon Rot) als Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei weniger als 3-4 V/cm durchgeführt. Sobald die Proben 0,5 – 1 cm eingelaufen waren, wurde eine Glasplatte auf das Gel gelegt, um die Diffusion zu verlangsamen und das Gel am Flottieren zu hindern. Nachdem die Markerbanden das letzte Drittel des Gels erreicht hatten, wurde die gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (2.2.17) und mit entsprechenden Sonden hybridisiert (2.2.19).

### **2.2.18 Genomischer Southern-Blot**

Genomische DNA (10µg) aus der Leber naiver C57BL/6 Mäuseweibchen (2.2.2) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*Bst*XI, *Hind*III, *Nde*I, *Xba*I) über Nacht verdaut (2.2.4). Die Restriktionsansätze, sowie *Eco*RI/*Hind*III restringierte DNA (MBI Fermentas, St. Leon Rot) als Längenstandard, wurden auf ein 0,6%iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluß erfolgte die Anfärbung der abgetrennten Markerbande in 1 × TBE mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) unter Lichtausschluß. Das restliche Gel wurde 2 × 15 min in Denaturierungslösung und 1 × 15 min in 3 M NaCl (pH 11,4) geschwenkt, bevor die genomische DNA, wie unter 2.2.17 beschrieben, auf eine Membran übertragen und mit radioaktiv markierten Sonden (2.2.18) hybridisiert wurde (2.2.19).

### 2.2.19 Transfer von DNA und RNA auf Membranen beim "Northern- bzw. Southern-Blot"

Die in einem Agarosegel aufgetrennte DNA oder RNA wurde mittels der Methode des "Downward Alkaline Capillary Transfer" (Chomczynski, 1992) auf eine Nylonmembran (Hybond-N Amersham, Braunschweig) übertragen. Dazu wurden Gel, Membran und Whatman-Filterpapier folgendermaßen übereinander aufgebaut: Auf einen Stapel saugfähiger Papiertücher wurden 3 Lagen trockenes und 2 Lagen in Transferpuffer eingeweichtes Whatman-Papier gelegt, die der Größe des Gels entsprachen. Darauf folgte die Nylonmembran und anschließend das Gel. Den Abschluß bildeten 3 weitere in Transferpuffer eingeweichte Whatman-Papiere und eine Brücke aus ebenfalls eingeweichtem Whatman-Papier als Verbindung zum Transferpuffertank. Zum Beschweren wurde ein schwaches, gleichmäßig auf die Fläche verteilt wirkendes Gewicht (hier eine Glasplatte) aufgelegt.

Der Kapillartransfer erfolgte über einen Zeitraum von 2 h. Anschließend wurde die Membran für 15 min in 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) neutralisiert und zur Fixierung mit UV-Strahlen (1200 mJ Energie innerhalb von 20 s) im UV Stratalinker 1800 (Stratagene) behandelt, was eine kovalente Vernetzung der DNA oder RNA mit den Aminogruppen der Nylonmembran bewirkt.

### 2.2.20 Radioaktive Markierung der Sonden

Zur Gewinnung von Sonden für die "Northern- und Southern-Blot"-Analysen wurden je 20 µg Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (*EcoRI* und *NcoI* für Fragmente, die im Vektor pCR2.1 TOPO<sup>®</sup> kloniert vorlagen, *BstXI* für Fragmente im Vektor pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup>) für 3 h verdaut (*EcoRI* und *NcoI*: 37 °C, *BstXI*: 55 °C). Nach der Auftrennung in einem 0,8-1%igen Agarosegel wurde das enzymatisch herausgeschnittene "Insert" mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt und wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben aufgereinigt.

Zur Abschätzung der Konzentration wurden 1 bzw. 3 µl des aufgereinigten Eluats neben 1 µg λ DNA (*EcoRI/HindIII*-restringiert) auf ein 0,8-1%iges Gel aufgetragen und die Intensität der Banden mit denen der Markerbanden verglichen.

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit Hilfe des "Megaprime<sup>™</sup> DNA labelling systems" (Amersham, Braunschweig) durch "random priming" nach der von Feinberg und Vogelstein (1984) beschriebenen Methode. Nach Denaturierung der zu markierenden DNA wurden kurze Nukleotide statistischer Zusammensetzung als Primer hybridisiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I bei der Synthese eines neues Doppelstranges, in Gegenwart eines Desoxynukleotidgemisches sowie des radioaktiv markierten Nukleotids. Es wurden etwa 40 ng Sonde beim "Northern- und Southern-Blot" bzw. 25 ng beim alkalischen "Southern-Blot" in einem Volumen von 20 µl für eine Markierungsreaktion eingesetzt. Nach Zugabe von 10 bzw. 5 µl des "Random nonamer primer"-Gemisches erfolgte die Denaturierung für 5 min bei 95°C im Heizblock. Anschließend wurde die Probe kurz abgekühlt und mit 20 bzw.

10 µl "Labelling Buffer", 10 bzw. 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (50-100 µCi mit einer spezifischen Aktivität von 3.000 Ci/mmol; ICN, Meckenheim) und 4 bzw. 2 µl Klenow Fragment (1 U/µl) versetzt. Der Ansatz wurde auf 100 µl Volumen mit A. dest. aufgefüllt, vorsichtig gemischt und mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit katalysiert das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I die Anlagerung von Desoxynukleosid-5'-phosphaten an das 3'-OH-Ende der neu entstehenden DNA-Stränge.

Um nicht eingebaute Nukleotide vor der Hybridisierung zu entfernen, wurde die Sonde nachfolgend mit Hilfe des "NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1" Kits nach den Angaben des Herstellers (Macherey Nagel, Düren) aufgereinigt. Dieser Schritt entfiel für den alkalischen Southern, da hier ausreichend "Target" auf der Membran vorhanden ist, daß die Expositionszeit zu kurz für eine Detektion unspezifischer Signale ist. Die Probenaktivität wurde durch Messung der Cerenkow-Strahlung eines 1µl Probenaliquots in einem Szintillationszähler (Beckmann LS 6000 SC) bestimmt. Vor der Hybridisierung wurde die Probe erneut 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

### 2.2.21 Hybridisierung der "Northern- und Southern-Blots"

Es wurden selbst hergestellte "Northern-Blots" zur Hybridisierung mit *gimap*-Sonden, selbst hergestellte "Southern-Blots" und ein vorgefertigter Multiple Choice<sup>™</sup>-Northern Blot" (ams, Wiesbaden) zur Hybridisierung mit *gimap*3-, 4-, 5- und 9 - Sonden verwendet. Der letztgenannte Blot enthält auf der Membran fixierte Poly(A)<sup>+</sup> RNA aus 12 verschiedenen Geweben der Maus. Die Nylonmembran oder der Multiple Choice<sup>™</sup>-Northern Blot" mit der darauf fixierten RNA (Kapitel 2.2.19) wurde beim "Northern Blot" in Plastikfolie eingehüllt und zusammen mit vorgewärmter Express-Hyb<sup>®</sup>-Lösung (Clontech, Heidelberg) eingeschweißt. Beim "Southern-Blot" wurde die Membran zwischen Hybridisierungsnetze gelegt, die dann zusammengerollt in Hybridisierungsflaschen geschoben und mit selbst hergestellter Prähybridisierungslösung versetzt wurden. Die Prähybridisierung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte unter Schwenken im Wasserbad (GFL, Burgwedel) bzw. Drehen im Hybridisierungssofen (Hybaid, Heidelberg) für 2 h bei 65°C. Die markierte Sonde (Kapitel 2.2.20) wurde zu der Lösung in die Plastiktüten bzw. Flaschen pipettiert und die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter Schwenken bzw. Drehen bei 65°C. Am nächsten Tag wurde die Membran mit aufsteigender Stringenz gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen. Auf zwei Waschschrte mit 2 × SSC, 0,1 % SDS für je 20 min bei 65°C folgten zwei weitere Waschschrte mit 0,1 × SSC, 0,1 % SDS für je 1 h bei 65°C. Für die Autoradiographie wurden Biomax MS Röntgenfilme aufgelegt und mit einer Verstärkerfolie (Biomax MS Screen) in einer Kassette bei -80°C inkubiert.

Zur mehrfachen Verwendung der Membranen wurden diese nach erfolgter Detektion der Banden wieder von der angelagerten Sonde befreit. Dazu wurde die Membran zunächst gründlich mit Wasser gespült, 1 h bei 68°C in "Stripping Buffer" geschwenkt, erneut mit Wasser gespült, in 2 × SSC geschwenkt und schließlich bis zur nächsten Prähybridisierung in Folie eingeschweißt bei -80°C gelagert.

## 2.2.22 Zellkultur

### 2.2.22.1 Auftauen von CHO-K1- und Jurkat-Zellen

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen der immortalisierten Zelllinien CHO-K1 und Jurkat (siehe 2.1.6.3) wurden die Kryoröhrchen unmittelbar nach Entnahme in ein 37°C-Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen wurden mit einer sterilen Glaspipette in 10 ml auf 37°C vorgewärmtes Mediums transferiert, bei 400 × g in der Untertischzentrifuge (Heraeus) 10 min pelletiert und schließlich in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in eine 94,0/16 mm Gewebekulturschale (Greiner, Solingen) überführt.

### 2.2.22.2 Kultivierung von CHO-K1- und Jurkat-Zellen

Die Kultivierung der adhärennten CHO-K1-Zellen erfolgte in 94,0/16 mm Kulturschalen (Greiner, Solingen) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (NAPCO "Series 5400 CO<sub>2</sub> Incubator"). 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 1:3 bis 1:10 subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Hilfe eines Glasschabers mit Silikonschlauch vom Boden der Kulturschalen gelöst und durch Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette resuspendiert, um Zellkonglomerate aufzulösen. Das entsprechende Volumen dieser Suspension wurde mit frischem HAM's F12 Medium wieder auf 10 ml aufgefüllt.

Suspensionszellen, wie Jurkatzellen, wurden in T30-Gewebekulturflaschen kultiviert und entsprechend nach Auf- und Abpipettieren aufgeteilt und mit frischem RPMI 1640-Medium versetzt.

Wenn die Zellen am folgenden Tag transfiziert werden sollten, wurden von CHO-K1-Zellen  $2 \times 10^5$  Zellen auf Glasdeckgläser (20 x 20 mm) in 6 well - Platten (Greiner 35 mm) mit je 3 ml Medium ausgesät. Jurkatzellen wurden kurz vor Transfektion in 6 well - Platten in einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen in 3 ml Kulturmedium ausgesät.

### 2.2.22.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien

Zur Kryokonservierung wurden nur Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Sie wurden zunächst von der Gewebekulturschale gelöst (Kapitel 2.2.22.2) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4 °C für 15 min pelletiert und der Überstand verworfen. Es wurde ein Gefrierschutzmittel als Master-Mix, bestehend aus 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO hergestellt, welches in entsprechender Menge (abhängig von der Zahl einzufrierender Zellen;  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) zum Zellpellet pipettiert wurde. Es wurden Kryogefäße (Nunc, Wiesbaden) mit 1,8 ml des Gemisches aus Zellen und Gefrierschutzmittel befüllt und in einem bei 4 °C vorgekühlten „Stratacooler“ (Stratagene, Heidelberg) zuerst 2 h bei 4°C und anschließend bei -80°C über Nacht gelagert. Diese Methode soll gewährleisten, daß die Zellen langsam abkühlen (ca. 1°C/min). Nach 24 h wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff (-180°C) überführt.

### 2.2.23 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von DNA ist ein wichtiges Werkzeug zum Studium der Regulation und Funktion von Genen. In dieser Arbeit dient sie der Lokalisierung der deduzierten Proteine innerhalb von Säugerzellen, sowie der Untersuchung ihrer Funktion.

#### 2.2.23.1 Transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen mit FuGENE® 6

Die am Vortag ausgesäten CHO-K1-Zellen wurden nach 24 h mit Hilfe des nichtliposomalen, polykationischen Reagenzes FuGENE®6 (Roche, Mannheim) mit entsprechender Plasmid DNA transfiziert.

Bei dem Transfektionsreagenz handelt es sich um eine sterilfiltrierte Mischung aus Lipiden und anderen Verbindungen in 80 % Ethanol. 3 µl FuGENE®6-Reagenz wurden direkt zu 97 µl serumfreiem Medium gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dieser Verdünnung wurde 1 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (in einem Volumen von 0,5-1 µl) pipettiert, zum Mischen sanft angestoßen und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde schließlich tropfenweise über das Deckglas verteilt zu den Zellen in die 35 mm Gewebekulturschalen gegeben, und die Zellen wurden bis zur Expressionsanalyse zurück in den Brutschrank gestellt (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relative Luftfeuchtigkeit).

#### 2.2.23.2 Transiente Transfektion von Jurkatzellen mit Nucleofector™

Die Transfektion von Jurkatzellen erfolgte mittels Elektroporation mit Hilfe des Nucleofectors™ der Firma Amaxa (Köln). Zellen, die nicht älter als Passage 10 waren, wurden zwei Tage vor der Transfektion geteilt. Nach Pelletierung wurden  $2-3 \times 10^5$  Zellen in 100 µl Nucleofector™-Lösung V resuspendiert, mit 2 µg DNA vermischt und luftblasenfrei in eine für das Gerät spezielle Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde verschlossen, in den Nucleofector™ (Amaxa, Köln) gestellt und das Elektroporationsprogramm T-14 wurde gestartet. Sofort nach Beenden des Programms, wurden 500 µl vorgewärmtes Kulturmedium in die Küvette gegeben und der gesamte Inhalt wurde in ein mit 2,4 ml warmen Kulturmedium gefülltes Well einer 6 well-Platte gegeben. Die Platten wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach 24 h für weitere Versuche genutzt.

### 2.2.24 Zelluläre Lokalisation von Proteinen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *gimap4* und *gimap9* wurde das ORF der entsprechenden cDNA durch PCR amplifiziert und in die MCS des Expressionsplasmids pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> inseriert. Dieses wurde in die CHO-K1-Zellen transfiziert (siehe 2.2.23.1). 20 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und in Fixierlösung 1 oder Fixierlösung 2 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS<sup>-</sup> wurden die Zellen für 10 min in 0,5 % Tween80/PBS<sup>-</sup> inkubiert, zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend 30 min in Blocklösung inkubiert (alles bei Raumtemperatur), um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die Erstantikörperinkubation mit dem monoklonalen Maus-anti-V5 Erstantikörper (50 µg/ml, in Blocklösung verdünnt) erfolgte für 1-2 h bei RT. Um ein Austrocknen der

Antikörperlösung zu verhindern, wurde in den Deckel der 6 well-Platte, ein nasses Whatmanpapier gelegt, und die ganze Schale mit Parafilm umwickelt. Nach 3 weiteren Waschschrritten (PBS<sup>-</sup>) folgte die Inkubation mit dem Detektionsantikörper (ebenfalls in Blocklösung verdünnt) während 45 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Je nach Kolokalisation wurde zur Detektion des GIMAP-Proteins ein polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet, der entweder an Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (20 µg/ml) oder an Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 (2 µg/ml) gekoppelt ist. Nach 3 abschließenden Waschschrritten (PBS<sup>-</sup>) wurden die Proben auf Objektträgern in 20 µl Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) mit 2 % DABCO (Merck, Darmstadt) versetzt, eingebettet. Bis zur Aushärtung des Einbettmediums und somit zur Sichtung der Proben am konfokalen Laserscanning Mikroskop wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur oder 4°C, vor Licht geschützt, aufbewahrt.

### **2.2.25 Anfärbung verschiedener Zellkompartimente**

Zur Analyse möglicher Kolokalisationen der GIMAP-Proteine mit verschiedenen Zellorganellen oder der Plasmamembran wurden parallel zur Detektion der Fusionsproteine die einzelnen Organellen mit einem jeweils anderen Farbstoff markiert.

#### **2.2.25.1 Endoplasmatisches Retikulum (ER)**

Für Kolokalisationsstudien am ER wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Einerseits wurde parallel zur Transfektion des pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup>-Plasmids das ER-spezifische Expressionsplasmid pEYFP-ER (Clontech, Heidelberg) kotransfiziert. Dieses kodiert für ein gelb-grün fluoreszierendes Fusionsprotein aus EYFP ("enhanced yellow fluorescent protein"), der ER-Zielsequenz von Calreticulin (5'-Ende) und der KDEL-Sequenz (3'-Ende), die einen Rücktransport ins ER signalisiert. Es wurde 1 µg dieses Plasmids zur Transfektion eingesetzt. 20 h nach Transfektion (2.2.23.1) wurde zur Detektion des GIMAP-Proteins verfahren wie unter 2.2.24 beschrieben.

Alternativ wurde ein ER-spezifischer anti-Calnexin-Antikörper (Stressgen, Victoria, BC, Canada) eingesetzt. Calnexin ist ein nicht-glykosyliertes ER-ständiges Transmembranprotein. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, 10 min in Fixierlösung 2 inkubiert, erneut gewaschen und zuerst 10 min bei Raumtemperatur in 0,5 % Tween80/PBS<sup>-</sup> und nach zwei weiteren Waschschrritten 1 h in Blocklösung inkubiert. Anti-Calnexin wurde parallel zum anti-V5-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die restlichen Schritte wurden, wie unter 2.2.24 beschrieben, durchgeführt. Zur Detektion des GIMAP-Proteins wurde als Zweitantikörper ein Alexa<sup>™</sup> 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Molecular Probes, Göttingen) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet, zur Detektion des Calnexins ein Alexa<sup>®</sup> 568-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:1000. Die Proben wurden anschließend in einem Tropfen Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) mit 2% DABCO (Merck, Darmstadt) eingebettet.

### **2.2.25.2 Golgi-Apparat**

Für die Markierung des Golgi-Apparates gilt ähnliches wie für die des ERs. Es wurden auch hier zwei alternative Methoden angewandt, wobei bei der einen wieder ein Expressionsplasmid eingesetzt wurde, in diesem Fall pEYFP-Golgi (Clontech, Heidelberg). Dieses kodiert ebenfalls für EYFP ("enhanced yellow fluorescent protein") und zusätzlich für die 81 N-terminalen Aminosäuren der humanen 1,4-Galactosyltransferase, die das Signal für die Verankerung des Fusionsproteins in der Membran des Golgi-Apparates enthält. Die Proben wurden behandelt wie unter 2.2.25.1 für das pEYFP-Plasmid beschrieben.

In einer alternativen Methode wurde auch ein spezifischer Antikörper zur Detektion des Golgi-Apparates eingesetzt. In diesem Fall handelte es sich um einen polyklonalen Kaninchen-anti-Giantin Antikörper (CRP, Cumberland, VA, USA), der gegen den N-Terminus des humanen Giantins gerichtet ist. Giantin ist eine membranständige Komponente der *cis*- und mittleren Kompartimente des Golgi-Apparates. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.25.1 erläutert, wobei der anti-Giantin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde.

### **2.2.25.3 Zellkern**

Nach der Detektionsprozedur für das heterolog exprimierte Protein (siehe 2.2.24) wurden die transfizierten Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, für 1 h bei 37°C in RNase A-Lösung (0,1 µg/µl in PBS<sup>-</sup>) inkubiert und erneut zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Danach wurden jeweils 100-120 µl Propidiumjodid-Lösung (20 µg/ml in PBS<sup>-</sup>) zu den Zellen gegeben und 30 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der hauptsächlich in doppelsträngiger DNA interkaliert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und zur mikroskopischen Analyse in Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) mit 2 % DABCO (Merck, Darmstadt) eingebettet.

### **2.2.25.4 Plasmamembran**

Es wurden zwei alternative Reagenzien verwendet, um die Plasmamembran anzufärben.

Die Zellen wurden 20 h nach Transfektion zweimal mit PBS<sup>-</sup> und einmal mit Con A-Verdünnungslösung gewaschen. Con A-Rhodamin wurde in einer Konzentration von 200 µg/ml (verdünnt in Con A-Färbelösung) auf die Zellen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Alternativ wurde ein Con A-Alexa Fluor<sup>®</sup> 594-Konjugat (Molecular Probes, Leiden, NL) in gleicher Weise, in einer Verdünnung von 1:50 zur Anfärbung der Membranen eingesetzt. Anschließend erfolgte die Detektion des entsprechenden GIMAP-Proteins wie unter 2.2.24 beschrieben, wobei als Zweitantikörper das polyklonale Ziege-anti-Maus IgG (H+L) F (ab') Fragment-Alexa<sup>®</sup> 488-Konjugat (Molecular Probes, Göttingen) verwendet wurde.

### **2.2.25.5 Lysosomen**

Zur Anfärbung der Lysosomen wurden CHO-K1-Zellen, die auf Deckgläsern ausgebracht und transient mit einem Expressionsplasmid transfiziert worden waren, nach 20 h mit 100 nM LysoTracker<sup>™</sup>Red DND-99 (Molecular Probes, Leiden, NL) in frischem, vorgewärmtem Medium (Ham's F-12 mit 10 % FCS)

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 wie bereits in Kapitel 2.2.24 beschrieben fixiert, mit Antikörpern angefärbt und eingebettet.

### **2.2.25.6 Mitochondrien**

Zur Markierung der Mitochondrien in Kollokalisationsexperimenten mit EYFP- oder anderen Fusionsproteinen wurden transient transfizierte CHO-K1-Zellen auf Deckgläsern nach 20 h mit 200 nM MitoTracker™Red CMX Ros (Molecular Probes, Leiden, NL) in frischem, vorgewärmtem Medium (Ham's F-12 mit 10 % FCS) für 1 h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend wie unter 2.2.24 beschrieben fixiert, mit Antikörpern behandelt und eingebettet.

### **2.2.26 Mikroskopie**

Die Expression transient transfizierter Säugerzellen mit GFP oder diversen rekombinanten GFP-Fusionskonstrukten läßt sich *in vivo* nach Anregung der Fluoreszenz des GFP-Proteins bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm in einem inversen Zeiss-Mikroskop IM 35 (Zeiss, Oberkochen) betrachten.

Gleiches gilt für transient transfizierte Jurkat-Zellen, deren hineintransfiziertes Plasmid mittels Antikörperfärbung detektiert werden konnte.

#### **2.2.26.1 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 und der durch die Plasmide pEYFP-ER und pEYFP-Golgi exprimierten Proteine wurde durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Dagegen erfolgte die Anregung von Alexa® 568, ConA-Rhodamin, ConA-Alexa Fluor® 594-Konjugat, Propidiumjodid, LysoTracker™Red DND-99 und MitoTracker™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 x 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 5.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

### **2.2.27 Apoptosetests**

Nach erfolgreicher Transfektion wurden 7,5 µg/ml Anisomycin als apoptoseauslösender Stoff zu den Zellen in Kultur gegeben. Jede Stunde wurden Aliquots von 50 µl Zellsuspension abgenommen, mit 4 % Paraformaldehydlösung 30 min fixiert und nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm in 10 µl Kulturmedium resuspendiert und auf einen Objektträger ausgebracht. Nachdem die Flüssigkeit getrocknet war, wurden die Zellen mit Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) eingedeckelt. Unter dem Mikroskop konnten anschließend die sich im Laufe der Zeit einstellenden Veränderungen der Zellen, induziert durch den Apoptoseauslöser Anisomycin, beobachtet werden.

### 3.0 Ergebnisse

Ausgehend von den beschriebenen cDNA-Sequenzen von *IAN1* und *IAN3* (Poirier *et al.*, 1999) wurden Untersuchungen hinsichtlich der Funktionalität der beiden Leseraster unternommen. Die heterologe Expression in einer Säugerzelllinie diente der subzellulären Lokalisation. Desweiteren galt es, das Expressionsmuster dieser Gene sowie zweier weiterer Mitglieder dieser murinen Genfamilie (*IAN4* und *IAN5*) auf dem mRNA-Level im "Northern-Blot" zu analysieren. Einerseits wurde dabei versucht, die Induktion mit verschiedenen *Plasmodium chabaudi* Infektionszuständen zu korrelieren, andererseits wurde eine organabhängige Induktion untersucht. Desweiteren sollten genomische "Southern Blot"-Analysen klären, ob es sich bei *IAN4* und *IAN5* um 2 verschiedene oder ein und dasselbe Gen handelt, da ihre Nukleinsäuresequenz zu 90% identisch ist.

Verschiedene Publikationen (Dahéron *et al.*, 2001; Hornum *et al.*, 2002; Pandarpurkar *et al.*, 2003; Sandal *et al.*, 2003) deuteten darauf hin, daß einige Mitglieder dieser Genfamilie eine Rolle beim programmierten Zelltod spielen. Durch RNAi Versuche mit den menschlichen als auch murinen Genen *IAN1* und *IAN3* sollte in sich anschließenden Versuchen das apoptoseauslösende oder -hemmende Verhalten dieser Gene analysiert werden.

### 3.1 Genomische Anordnung und Nomenklatur

#### 3.1.1 Genomische Organisation der Gene für GTPasen der *imap*

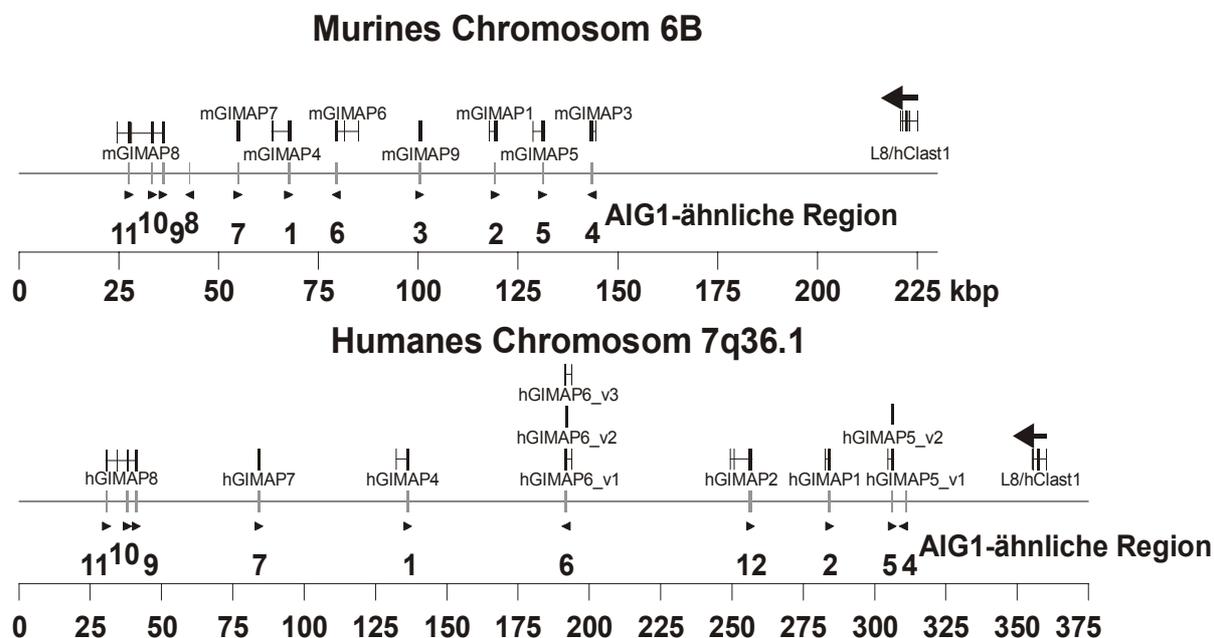
##### Genfamilie

Datenbankvergleiche (Genbank™ /EBI) sowie unsere eigenen über PCR amplifizierte und sequenzierte Klone machten es möglich, die *imap* Genfamilie genomisch anzuordnen (Abbildung 3).

Wie bereits unter 1.5 erwähnt, repräsentiert die *imap* Genfamilie eine Gruppe von Genen, die sowohl in höheren Vertebraten als auch in angiospermen Pflanzen konservierte Proteine kodieren. Diese Gene werden in der Literatur auf unterschiedlichste Weise bezeichnet (IAP, IAN, IROD, Imap). Teilweise wurde dergleiche Name für verschiedene Gene benutzt und *imap* Gene aus verschiedenen Organismen wurden gleich bezeichnet, auch wenn sie nicht ortholog zueinander waren. Um weitere Verwechslungen zu vermeiden, wird bei der aktuellen Bezeichnung dieser Gene durch eine neu aufgestellte Nomenklatur der Tatsache Rechnung getragen, daß GTP-bindende Domänen in ihren Sequenzen kodiert sind. Man spricht daher von *gimap* Genen, was für GTPase of the immunity associated protein family steht (Krücken *et al.*, 2004).

Obwohl über die meisten dieser GTPasen noch nicht viel bekannt ist, deuten die bisherigen Informationen daraufhin, daß sie bei der Abwehr von Infektionen (Krücken *et al.*, 1997 und 1999), bei Diabetes (MacMurray *et al.*, 2002; Hornum *et al.*, 2002) und Krebs (Dahéron *et al.*, 2001; Cambot *et al.*, 2002) eine Rolle spielen.

Aktuell sind 9 Gene, davon 8 funktionale, im Genom der Maus beschrieben (*mgimap*), die alle in einem Cluster von 125 kbp auf dem Chromosom 6B lokalisiert sind. Beim Menschen gibt es dagegen nur 7 funktionale *gimap* Gene und ebenfalls ein Pseudogen. Sie sind durch ein vorangestelltes „h“ gekennzeichnet und liegen innerhalb einer 300 kbp großen Region auf dem Chromosom 7q36.1 (MacMurray *et al.*, 2002).



**Abbildung 3: Genomische Organisation der *gimap*-Gencluster bei Maus und Mensch**

Jeweils die obere Leiste zeigt die Intron-/Exonstruktur der kodierenden Regionen des *gimap* Genclusters bei Maus und Mensch. AIG1-ähnliche Regionen wurden nach Mac Murray *et al.* (2002) numeriert und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Pfeilrichtung gibt die Orientierung der AIG1-Domänen korrelierenden Bereiche an.

Abbildung 3 zeigt die genomische Organisation der *gimap* Gencluster bei Maus und Mensch. Dabei gibt der obere Teil die Intron-/Exonstruktur wieder, während die Pfeile die Orientierung der Exons zeigen. Bis auf *mgimap3*, 6 und 7 weisen alle Gene die gleiche Orientierung auf. Das am proximalen Ende des *gimap* Clusters lokalisierte Gen weist 5 Exons, die über 3 AIG1-ähnliche Regionen reichen, auf. Dieses als *gimap8* bezeichnete Gen kodiert ein Protein mit 3 GTP-Bindungsdomänen. Der Vergleich der *gimap* Cluster zwischen Maus und Mensch zeigt deutlich, daß dieses drei GTPasen kodierende Gen in beiden Spezies konserviert ist. Desweiteren fällt auf, daß es zu allen *gimap* Genen der Maus ein menschliches Ortholog gibt, mit Ausnahme von *mgimap9*, welches nahe verwandt mit *mgimap6* und *hgimap6* ist, sowie dem Pseudogen *mgimap10*. Das menschliche Pseudogen *hgimap3* ist ortholog zum funktionalen *mgimap3* Gen der Maus. Außerdem enthält der menschliche Locus ein Gen (*hgimap2*), das nicht im Genom der Maus vorhanden ist.

Auch wenn die Reihenfolge und Orientierung aller konservierten *gimap* Gene bei Maus und Mensch gleich ist, unterscheiden sich die Größen der Intergenregionen deutlich voneinander, so daß das menschliche Cluster fast zweimal größer ist als das murine.

Eine genaue Übersicht über die neuen Bezeichnungen, die in der Literatur verwendeten Synonyme sowie die jeweilige Datenbanknummer für Maus und Mensch, findet sich in Tabelle 4.

**Tabelle 4: Genbezeichnungen nach neuer *gimap*-Nomenklatur**

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>d,f</sup>	NM_008376, NM_175860, AJ133125, Y08026	<i>himap1</i> <sup>c</sup> , <i>hIAN2</i> <sup>d</sup>	AJ306287, NM_130759, BC040736, AK091818
<i>gimap2</i>	nicht im Maus- genom vertreten	nicht verfügbar	<i>himap2</i> <sup>c</sup> , <i>hIAN12</i> <sup>d</sup>	AL110151, BC013934, BC032345, XM_055586
<i>gimap3</i>	<i>mIAN4</i> <sup>e</sup> (funktionelles Gen)	AF337052	<i>hIAN4</i> <sup>d</sup> (Pseudogen)	AJ580951
<i>gimap4</i>	<i>mIAN1</i> <sup>f</sup>	NM_174990	<i>himap4</i> <sup>c</sup> , FLJ111110, <i>hIAN1</i> <sup>d,g</sup> , MSTP062	AK001972
<i>gimap5</i>	<i>mIAN5</i> <sup>d</sup>	NM_175035, AK052694	<i>himap3</i> <sup>c</sup> , <i>hIAN5</i> <sup>d,h,i,k</sup> , <i>IAN4L1</i> <sup>j</sup> , <i>Irod</i> <sup>k</sup> , FLJ11296	Splice Variante 1: AK002158, BC011732; Splice Variante 2: AK055568
<i>gimap6</i>	<i>mIAN6</i> <sup>d</sup>	NM_153175	<i>hIAN6</i> <sup>d</sup> , <i>hIAN2</i> <sup>g</sup>	Splice Variante 1: NM_024711 Splice Variante 2: AK074044
<i>gimap7</i>	<i>mIAN7</i> <sup>d</sup>	NM_174960	<i>hIAN7</i> <sup>d,g</sup>	NM_153236
<i>gimap8</i>	<i>mIAN11</i> , <i>mIAN10</i> , <i>mIAN9</i> <sup>d</sup>	XM_144696	<i>hIAN11</i> , <i>hIAN10</i> , <i>hIAN9</i> <sup>d</sup> , <i>hIAN4</i> , <i>hIAN3</i> , <i>hIAN6</i> <sup>g</sup>	AL834361
<i>gimap9</i>	<i>mIAN3</i> <sup>c,d,f</sup>	NM_146167, BC026200, AK040029	nicht im menschlichen Genom vorhanden	nicht verfügbar
<i>gimap10</i>	<i>mIAN8</i> <sup>d</sup> (Pseudogen)	NT_039943	nicht im menschlichen Genom vorhanden	nicht verfügbar

a Krücken *et al.*, 1997

b Krücken *et al.*, 1999

c Stamm *et al.*, 2002

d McMurray *et al.*, 2002

e Dahéron *et al.*, 2001

f Poirier *et al.*, 1999

g Cambot *et al.*, 2002

h Zenz *et al.*, 2004

i Payne *et al.*, 2004

j Pandarpurkar *et al.*, 2003

k Sandal *et al.*, 2003

### 3.1.2 Homologe *mgimap* Gene auf dem Chromosom 6B der Maus

Das *mgimap1* Gen wurde erstmals durch differentielles „Screening“ einer cDNA-Bank aus Milzzellen *P. chabaudi*-immuner C57Bl/10 Mäusen identifiziert (Krücken *et al.*, 1997) und als „single copy“ Gen charakterisiert (Krücken *et al.*, 1999). Diese Analysen beschränkten sich auf die genomische

Organisation und die Expression in verschiedenen Geweben. Durch die Datenbankanalyse mit den vollständigen Sequenzdaten der Maus stellte sich heraus, daß *mgimap1* vollständig anders organisiert war, als von Krücken *et al.* (1997 und 1999) beschrieben. Das Gen *mgimap1* kommt in zwei Splicevarianten vor (NM\_175860 und NM\_008376), die für das gleiche 33,4 kDa Protein (NP\_032402) kodieren. Offenbar ist die zuvor beschriebene cDNA mit 2 großen ORFs (Krücken *et al.*, 1999), die für unterschiedlich große Proteine (25,8 kDa und 31 kDa) kodieren, lediglich ein PCR Artefakt. Beide Splicevarianten von *mgimap1* unterscheiden sich nur in einem 10 bp Abschnitt im 5'UTR-Bereich des Exons 2. Das Gen ist aus drei Exons aufgebaut: einem ersten nicht kodierenden (109 bp), einem zweiten mit der Translationsstartsequenz (100 bp bzw. 94 bp für Variante 2) und einem dritten 1297 bp großen Exon, das alle funktionalen Domänen enthält. Charakteristisch ist zudem ein 2162 bp bzw. 2156 bp (Splicevariante 2) großes erstes und ein 1080 bp großes zweites Intron. Sequenzabgleiche mit verschiedenen Datenbanken haben gezeigt, daß die für *gimap* Gene typische GTP-bindende Domäne am N-terminalen Ende mit dem für G-Proteine typischen Muster (Saraste *et al.*, 1990) im dritten Exon kodiert ist. Eine zusätzlich vorhandene Transmembrandomäne ist am C-terminalen Ende lokalisiert und entspricht so dem typischen Muster vieler Mitglieder der *gimap* Genfamilie. Seine intrazelluläre Lokalisation am ER läßt vermuten, daß es eine regulatorische Funktion wahrnimmt (Stamm *et al.*, 2001).

Das Gen *mgimap3* ist wie *mgimap1* auf dem Chromosom 6 der Maus lokalisiert. *mgimap3* besteht aus zwei offenen Leserastern mit einer GTP-Bindungsstelle am N-Terminus und einem hydrophoben Bereich am C-Terminus. Das zweite Leseraster weist große Ähnlichkeiten mit *mgimap4* auf sowie eine starke Homologie zum humanen *gimap5*. *mgimap3* kann in der äußeren mitochondrialen Membran detektiert werden und ist durch das Onkogen BCR/ABL induzierbar (Dahéron *et al.*, 2001).

Das *mgimap4* Gen enthält 4 Exons und ein offenes Leseraster, das für ein Protein von 38 kDa kodiert. Es wird hauptsächlich in lymphoiden Organen exprimiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der T-Zellentwicklung (Poirier *et al.*, 1999).

Ein weiteres bisher beschriebenes Homolog zu *mgimap1* und *mgimap4* ist *mgimap9*. Es kodiert ein 33,5 kDa großes Protein und seine subzelluläre Lokalisation wird im Zytoplasma vermutet (Poirier *et al.*, 1999).

Das *mgimap8* Gen kodiert für ein 76,8 kDa großes Protein mit 3 GTP Bindungsdomänen. Als weiteres Strukturmerkmal finden sich 3 „coiled-coil“-Regionen. Die deduzierte Proteinsequenz weist zahlreiche Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen auf. Proteinkinasen können Kalziumionen binden und sind so an G-Protein gekoppelten Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Krauss, 2003).

Starke Ähnlichkeiten in Ihrer Proteinsequenz zeigen mGIMAP4 und mGIMAP6. mGIMAP6 besitzt nur eine GTP Bindungs- und eine „coiled-coil“-Domäne. Seine Nukleinsäuresequenz kodiert für ein 34,1 kDa großes Protein mit einem ER-Lokalisationssignal.

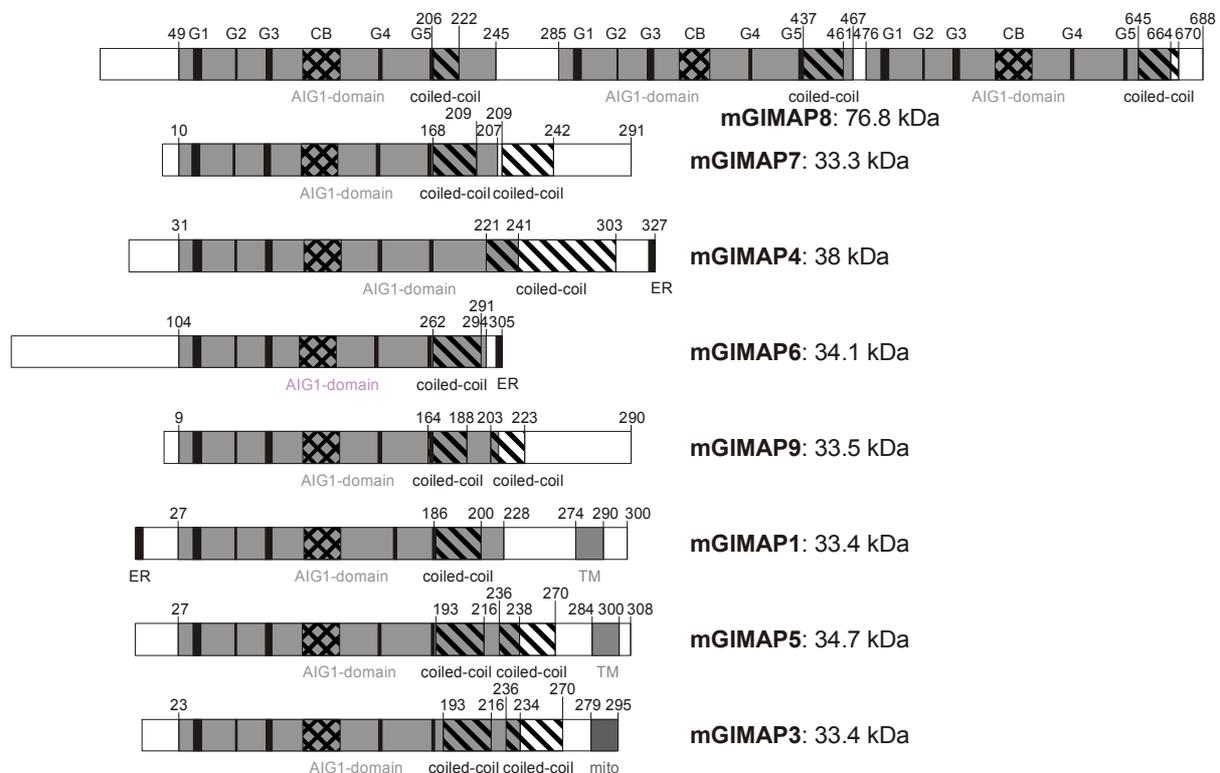
Die beiden letzten *mgimap* Gene, 5 und 7, besitzen neben ihrer eigentlichen „coiled-coil“-Region noch eine weitere „coiled-coil“-Region unmittelbar hinter der AIG1-Domäne. Während *mgimap5* für ein 34,7 kDa großes

mitochondriales Protein kodiert (Pandarpurkar *et al.*, 2003), aus 3 Exons besteht und dem orthologen *hgimap5* sehr ähnelt, kodiert *mgimap7*, das ebenfalls zwei „coiled-coil“-Regionen besitzt, für ein 33,3 kDa großes Protein.

### 3.1.3 mGIMAP Proteine

Fast alle *mgimap* cDNAs kodieren für GTPasen mit einem Molekulargewicht von 33-34 kDa. Nur mGIMAP4 und mGIMAP8 sind mit 38 bzw. 76,8 kDa größer.

Alle mGIMAP Proteine verfügen über wenigstens eine GTP bindende Domäne in einer für G-Proteine typischen einheitlichen Grundstruktur mit fünf Motiven, bezeichnet als G1-G5, wobei das erste Motiv der sogenannte „P-loop“ (G1-Box) ist (Saraste *et al.* 1990). Desweiteren besitzen sie mindestens eine kleine „coiled-coil“-Region im COOH-Terminus der AIG1 Domäne. Die Proteine mGIMAP7, mGIMAP9, mGIMAP3 und mGIMAP5 besitzen noch eine weitere „coiled-coil-Region“ unmittelbar hinter der AIG1 Domäne, die bei mGIMAP4 wesentlich länger ist. Zusätzlich gibt es zwischen dem G3- und G4-Motiv einen stark konservierten Bereich mit einem hydrophoben Kern, der hier als „conserved box“ (CB) bezeichnet wird. Die Konsensussequenz dieser CB sieht wie folgt aus:  $L_{67}S_{67}xP_{78}G_{89}P_{78}H_{89}A_{67}L_{56}L_{78}L_{100}V_{100}xQ_{56}L_{89}G_{100}R_{78}\Theta_{100}T_{100}xE_{55}\Psi_{100}$ ; wobei x für eine nicht konservierte Position steht,  $\Theta$  für eine aromatische und  $\Psi$  für eine saure Aminosäure. Die tiefgestellten Nummern geben die prozentuale Häufigkeit an, mit der die entsprechende Aminosäure an dieser Position in den mGIMAP Proteinen auftritt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der GIMAP Proteine der Maus**

Die AIG1 Domäne (grau hinterlegt) enthält die für GTPasen charakteristischen Motive G1-G5 sowie die „conserved box“ (CB). Abschnitte mit Ähnlichkeit zu bekannten ER-Lokalisationssignalen (ER), mitochondrialen Lokalisationssignalen (mito), putativen „coiled-coil“ oder Transmembran (TM)-Regionen sind ebenfalls gekennzeichnet.

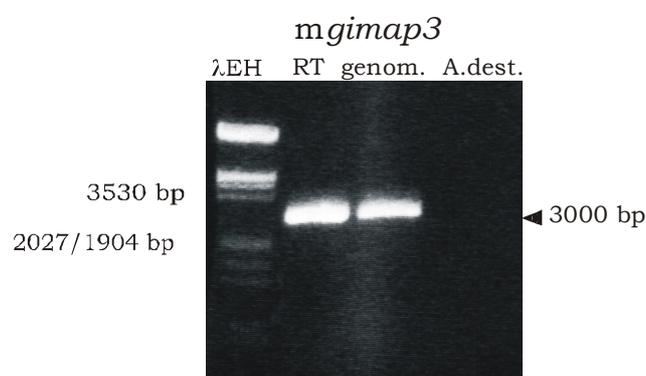
Im COOH-terminalen Bereich von mGIMAP1 und mGIMAP5 findet sich wahrscheinlich eine Transmembranhelix, wogegen der hydrophobe Bereich, der sich direkt vor dem COOH-Terminus von mGIMAP3 befindet, für den Transport des Proteins zur äußeren mitochondrialen Membran verantwortlich ist (Dahéron *et al.*, 2001). Das Programm PSORTII (Garnier *et al.*, 1996) entdeckte weiterhin Motive mit einer leichten Ähnlichkeit zu ER-Lokalisationssignalen von Transmembranproteinen am NH<sub>2</sub>-Terminus von mGIMAP1 und am COOH-Terminus von mGIMAP4 und mGIMAP6.

## 3.2 Klonierung und Verifizierung von *gimap* Homologen

### 3.2.1 Amplifikation, Klonierung und Ansequenzierung des ORF von *mgimap3*

Zur Amplifikation des gesamten ORF (1020 bp) von *mgimap3* wurden, ausgehend von der veröffentlichten Sequenz (AF337052) von *mgimap3* (Dahéron *et al.*, 2001), spezifische Primern (ian4-up539 und ian4-lo1559) synthetisiert, die in einer RT-PCR (cMaster-PCR Kit, Eppendorf AG, Hamburg) eingesetzt wurden. Als Template für die RT-Reaktion diente Gesamt-RNA aus Milzen weiblicher, naiver Mäuse der Stämme C57Bl/10. Alternativ wurde eine PCR aus genomischer DNA aus der Leber von C57Bl/6 durchgeführt.

Das immer wieder in beiden PCRs erhaltene zu große Fragment (3000 bp) enthielt ein uns bis dato unbekanntes Intron und wurde nach Aufreinigung mit anschließender Dephosphorylierung in den Vektor pCR2.1.TOPO<sup>®</sup> (3931bp) kloniert, der ein Gen für die Ampicillinresistenz zur Selektion enthält. Dieser wurde in TOP10F<sup>'</sup>-Zellen transformiert, amplifiziert und nach DNA-Präparation wurde ein Klon mit inserierter genomischer DNA von *mgimap3* mit Hilfe der Standardprimer "M13-Forward" und "M13-Reverse" ansequenziert. Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms "BLAST 2 sequences" mit der Referenzsequenz (AF337052) abgeglichen und durch das Programm "DIALIGN2.1" zusätzlich untereinander verglichen. Da die verglichenen Sequenzen identisch waren, konnte die aus dem genomischen Klon präparierte genomische DNA aus der Leber in weiteren Schritten verwendet werden.

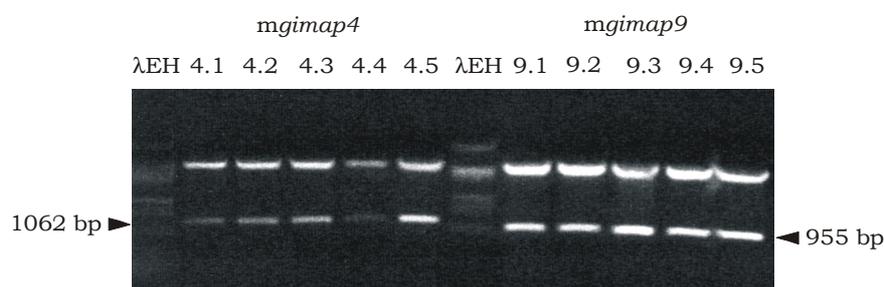


**Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR von *mgimap3***

Die in Spur 2 und 3 aufgetragenen PCR Amplifikate, zeigten sowohl in der RT-PCR (RT) als auch in der PCR aus genomischer DNA (genom.) ein viel größeres Produkt (3000 bp) als erwartet. Der letzten Spur war als Negativkontrolle nur A.dest. zugesetzt worden. Eine sich hier ergebende Bande, hätte für eine Verunreinigung der Ausgangs-DNA mit fremder DNA aus den zugesetzten Reagenzien gesprochen.

### 3.2.2 Klonierung und Ansequenzierung von *mgimap4* und *mgimap9*

Die mit den spezifischen Primern (IAN-1-5' und IAN-1-3' bzw. IAN-3-5' und IAN-3-3') amplifizierten ORFs von *mgimap4* (973 bp) und *mgimap9* (866 bp) wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> (5523bp) kloniert, der ebenfalls ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion enthält. Der Vektor besitzt außerdem einen Thymidin-Überhang, der die Effizienz einer Klonierung von PCR-Fragmenten erhöht, da viele der bei der PCR verwendeten DNA-Polymerasen (Taq-, aber auch Tfl- und Tth-Polymerase) keine glatten Enden produzieren, sondern meist einen Überhang von einer Base (meist Adenosin) erzeugen. Die Fragmente inserieren in die "TOPO<sup>®</sup> cloning site" innerhalb der MCS des Vektors, welcher im Anschluß in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und amplifiziert wurde. Bei Benutzung entsprechender Primer wird am 3'-Ende des inserierten PCR-Produktes ein V5-His-Epitop angehängt, das im Leseraster liegt und so eine Detektion des rekombinanten Proteins ermöglicht. Nach erfolgreicher DNA-Präparation folgte neben Restriktionsanalysen mit *Hind*III und *Xho*I die Sequenzierung mit Hilfe der IRD – 800 markierten "T7-Forward-" und "Bgh-Reverse-Primer". Nach Vergleich der ermittelten Sequenzen mit den Referenzsequenzen (*gimap4*: NM\_174990; *gimap9*: NM\_146167) unter Zuhilfenahme des Programms "BLAST 2 sequences" und zusätzlich des Programms "DIALIGN 2.1" zum Vergleich der Sequenzen untereinander, stellte sich heraus, daß die richtigen Fragmente kloniert wurden und die vorhandene DNA für weitere Untersuchungen eingesetzt werden konnte.



**Abbildung 6: Restriktionsanalyse von pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> + *mgimap4* bzw. *mgimap9* mit den Enzymen *Hind*III und *Xho*I**

Erwartet wurden Fragmente in den Größen 1062 bp (*mgimap4*) und 955 bp (*mgimap9*). Als Marker diente mit *Eco*RI und *Hind*III restringierte  $\lambda$ -DNA.

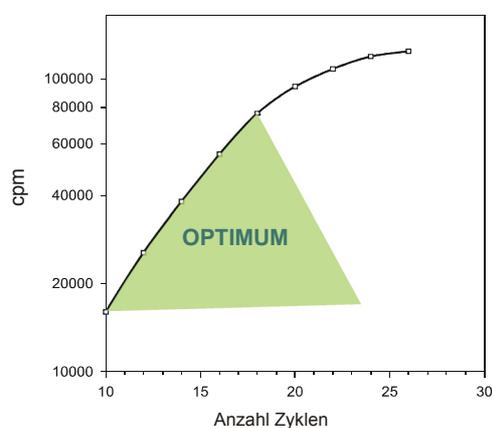
### 3.3 Gewebespezifische Expression verschiedener *mgimap*-mRNAs

Um Hinweise zur Funktion der unterschiedlichen *mgimap*-Gene zu erhalten, wurde die Expression von *mgimap*-mRNAs, vorrangig von *mgimap4*, *mgimap9* und *mgimap3* in naiven sowie *P. chabaudi* – infizierten als auch bereits immunen weiblichen C57Bl/10 und C57Bl/6 Mäusen im "Northern Blot" und mittels relativer quantitativer PCR detailliert untersucht.

### 3.3.1 Quantifizierung der *gimap* Gene 3, 4, 5 und 9 durch qPCR und "alkalischen Southern Blot"

#### 3.3.1.1 Temperatur- und Zyklusoptimierung mittels RT-PCR

Um die Transkriptionshäufigkeit neben der Expressionsverteilung der *mgimap* Gene 3, 4, 5 und 9 ermitteln zu können, wurde eine quantitative PCR (cMaster RTplus PCR System, Eppendorf AG, Hamburg) mit spezifischen Primern durchgeführt. Die zu erhaltenden Produkte hatten Größen zwischen 250 und 350 bp und gingen jeweils über ein Intron hinweg. Als Template dienten 250 ng der zu untersuchenden Milz-Gesamt-RNA aus naiven mit *P.chabaudi* infizierten und immunen C57 BL/10 Mäuseweibchen. Nachdem in einem ersten Schritt durch das Fahren eines Gradienten mit Gesamt RNA aus Milzen während der RT-PCR die optimalen Annealingtemperaturen festgestellt werden konnten, sollte die lineare Amplifikationsphase des Produktes in der PCR bestimmt werden.



**Abbildung 7: Schematischer Verlauf einer PCR-Reaktion**

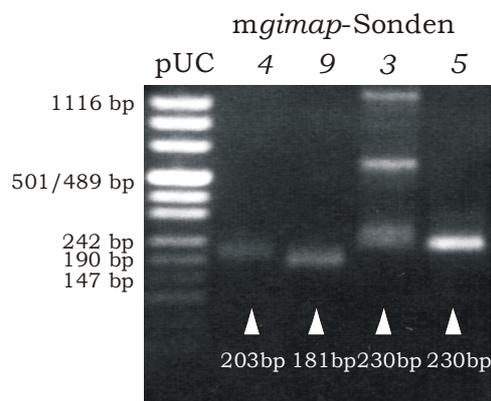
Zu sehen ist der Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und Produktmenge. Die farblich unterlegte Fläche entspricht der linearen Amplifikationsphase (nach Instruction Manual Gene Specific Relative RT-PCR Kit, Ambion, TX, USA).

Der exponentielle Bereich einer PCR ist als die Phase definiert, in der die Effizienz der Amplifikation maximal ist und über einen bestimmten Zeitraum hin konstant bleibt. Für eine relative quantitative RT-PCR ist es notwendig, daß sich alle Produkte in diesem exponentiellen Bereich befinden, da der Nachweis der Produkte in der Plateauphase der PCR in der Regel sehr ungenau ist. Dazu wurde ab Zyklus 15 alle 3 Zyklen eine Probe entnommen und auf Eis gelagert. Nach Ende des letzten Zyklus (35. Zyklus) wurden alle Proben elektrophoretisch aufgetrennt und zur besseren Auswertung (Ethidiumbromid ist nicht sensitiv genug) auf eine positive Nylonmembran (Biodyne®Plus, Pall Corporation, Dreieich) übertragen, um im "Southern Blot" mit entsprechenden Sonden (3.3.1.2) hybridisiert zu werden.

Abbildung 7 zeigt schematisch die Ermittlung des linearen Bereichs. Die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl bei der die geringste Amplifikation von Nebenprodukten und die effizienteste Vervielfachung der Produkte stattgefunden hatte, wurden in den folgenden Versuchen als optimale Bedingungen beibehalten.

### 3.3.1.2 Sonden für alkalischen "Southern-Blot"

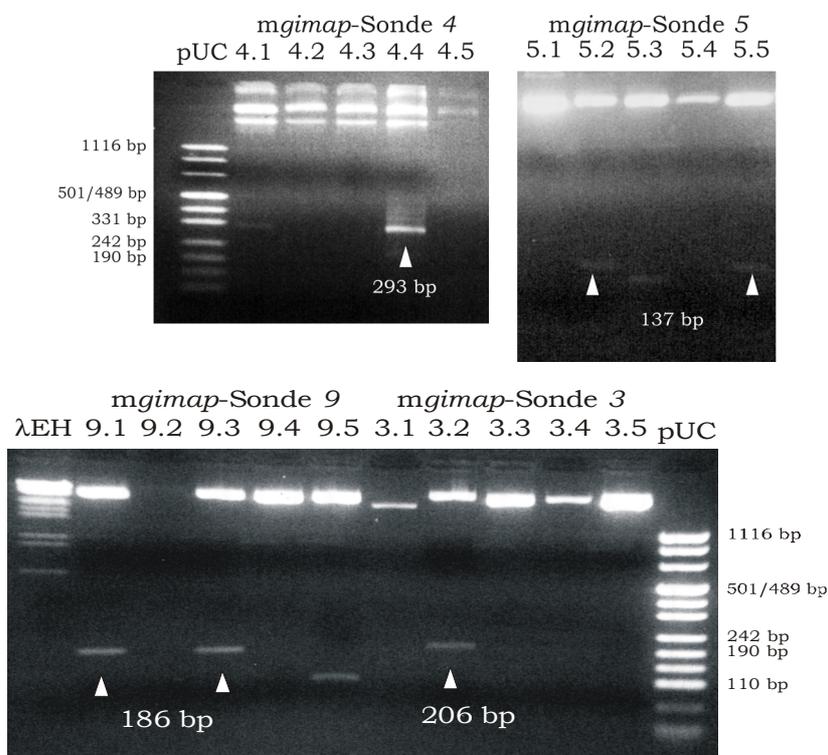
Ausgehend vom PCR-Produkt aus 3.3.1.1 wurde mit internen Sondenprimern eine PCR durchgeführt.



**Abbildung 8: Sonden für alkalischen "Southern Blot" nach RT-PCR**

Gelelektrophoretische Auftrennung der vier verschiedenen cDNA-Fragmente nach RT-PCR. Als Größenstandard wurde der pUC Mix Marker verwendet. Die Größe der erwarteten Produkte steht in der jeweiligen Spur.

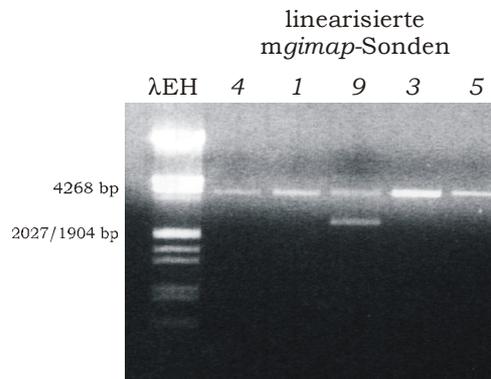
Bei *mgimap3* trat mehr als eine Bande auf. Die Bande mit der richtigen Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Klonierung in den Vektor pCR2.1 TOPO<sup>®</sup> eingesetzt. Die anderen PCR-Ansätze wurden nur aufgereinigt und ebenfalls in den Vektor kloniert. Nach der Klonierung erfolgte die Transformation und die Amplifizierung in TOP10F<sup>'</sup>-Zellen. DNA Präparation mit anschließender Restriktion kontrollierten den richtigen Einbau der Sonden in den Vektor.



**Abbildung 9: Aufgereinigte Sonden für alkalischen "Southern Blot"**

Gelelektrophoretische Auftrennung der in Abbildung 8 gezeigten Banden nach Klonierung in den Vektor pCR2.1 TOPO<sup>®</sup> mit anschließendem Herausschneiden des klonierten Fragmentes zur Kontrolle des richtigen Einbaus.

Um eine bessere Denaturierung der Sonden vor der radioaktiven Markierungsreaktion zu gewährleisten, wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *NcoI* linearisiert. Einzige Ausnahme war die *mgimap3* Sonde, da sie eine interne *NcoI*-Schnittstelle besitzt. Hier wurde zur Linearisierung das Enzym *BglII* verwendet. Die linearisierten Ansätze wurden aufgereinigt, in 25 µl eluiert und ihre Konzentration über ein Gel abgeschätzt.



**Abbildung 10: Linearisierte *mgimap*-Sonden**

Gelelektrophoretische Auftrennung des linearisierten Vektors pCR2.1 TOPO® mit dem jeweiligen einklonierten cDNA-Fragment. Die zu erwartenden Größen lagen bei ca. 4100 bp je nach Größe der einklonierten Sonde (Größen siehe Abbildung 9).

### 3.3.1.3 Quantifizierung durch internen Standard

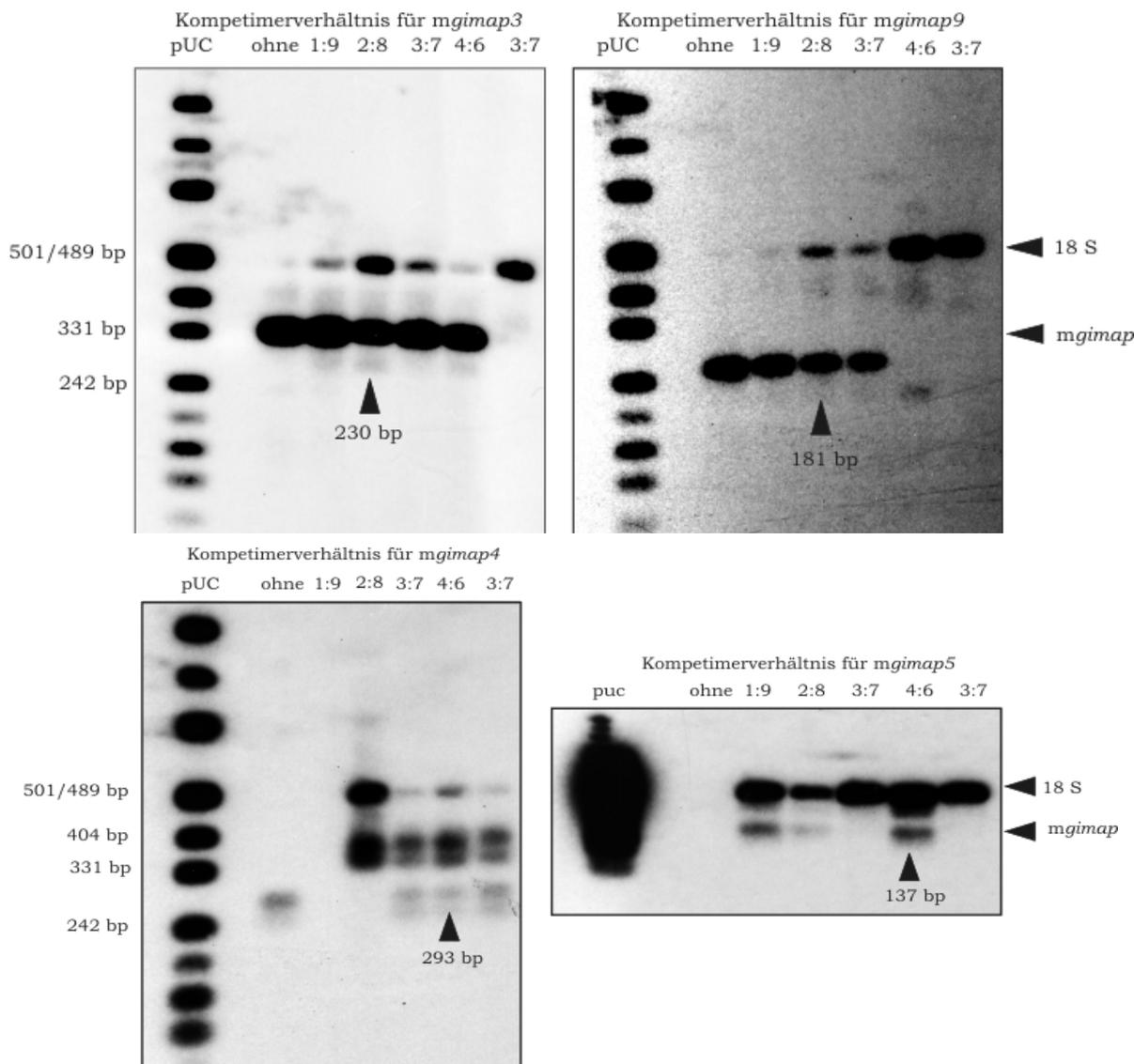
Um quantitative Aussagen über die Expression von *mgimap* Genen machen zu können, muß sichergestellt sein, daß die Variation der RNA-Qualität sowie die Effizienzschwankungen der RT-PCR minimal sind. Daher wurde eine Multiplex PCR mit 2 verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Das erste Primerpaar sollte die cDNA von Interesse amplifizieren, das zweite eine stabile interne Kontrolle. In unseren Versuchen wurde 18S-rRNA als interner Standard verwendet. 18S-rRNA bietet sich wegen ihrer kaum vorhandenen Expressionsschwankungen in unterschiedlichen Geweben an.

Zuvor mußte jedoch für jedes zu quantifizierende Gen das optimale Verhältnis zwischen 18S-rRNA Primern, Kompetimer und genspezifischen Primern ermittelt werden. Dazu wurden wiederum RT-PCRs mit unterschiedlichen Primer- und Kompetimerverhältnissen (Tabelle 5) durchgeführt (Ambion Kit, TX, USA).

**Tabelle 5: Pipettierschema zur Ermittlung des idealen 18S-rRNA Primer-, Kompetimer- und genspezifischen Primerverhältnisses**

Verhältnis 18S-rRNA Primer: Kompetimer	keine 18S-rRNA Primer + Kompetimere	1:9	2:8	3:7	4:6	3:7
Zusatz genspezifischer Primer	genspezifische Primer	genspezifische Primer	genspezifische Primer	genspezifische Primer	genspezifische Primer	kein genspezifischer Primer

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte, erfolgte das Übertragen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne®Plus, Pall Corporation, Dreieich) und ein sensibler Nachweis im alkalischen "Southern Blot". Dabei ergaben sich für *mgimap3*, *mgimap9*, *mgimap4* und *mgimap5* folgende idealen 18S-rRNA Primer- und Kompetimerverhältnisse:



**Abbildung 11: Bestimmung der idealen Kompetimerverhältnisse zwischen 18S-rRNA Primern, Kompetimer und genspezifischen Primern**

Das Verhältnis von 18S und *mgimap* cDNA, das nach radioaktiver Hybridisierung ungefähr gleich starke Signale zeigte, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurde im weiteren Versuchsablauf verwendet.

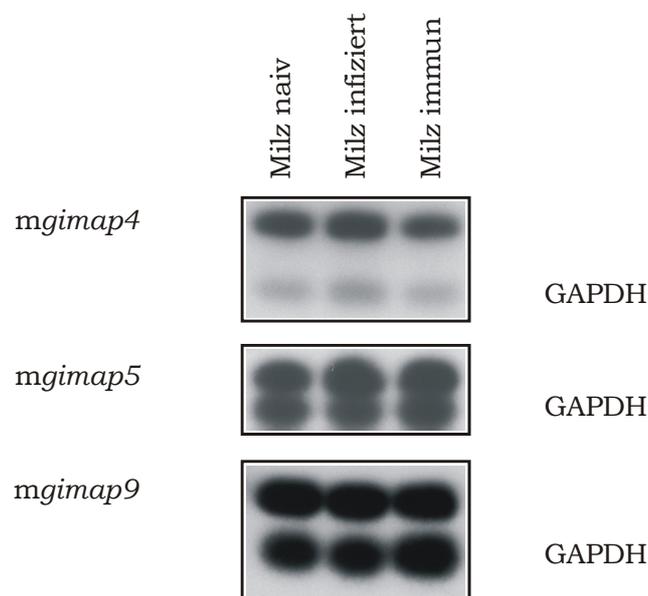
Aufgrund der Optimierungsergebnisse wurde in den nachfolgenden Versuchen folgendes RT-PCR-Programm verwendet.:

**Tabelle 6: RT-PCR-Programme nach Optimierung der Bedingungen für die quantitative PCR**

Sonde	optimale Annealingtemperatur	optimale Zykluszahl	optimales 18S-rRNA Primer und Kompetimerverhältnis
<i>mgimap3</i>	65,5° C	27	2:8
<i>mgimap4</i>	61,0° C	24	4:6
<i>mgimap5</i>	63,1° C	27	4:6
<i>mgimap9</i>	63,2° C	27	2:8

### 3.3.1.4 Vergleich der relativen *mgimap* Expression in unterschiedlichen Geweben

Nachdem alle erforderlichen Parameter für die relative quantitative PCR optimiert worden waren, konnte die Funktionalität der Methode überprüft werden. Dazu wurde eine qRT-PCR unter in Tabelle 6 genannten Bedingungen mit je 250 ng Milz-RNA von verschiedenen behandelten C57BL/10 Mäusen (2.2.15.1) durchgeführt. Die PCR-Proben wurden mit 6 × alkalischem Gelladungspuffer versetzt und auf ein Gel aufgetragen, das in einem alkalischen Puffer läuft. Durch das darin enthaltene NaOH und EDTA wird die DNA denaturiert und liegt einzelsträngig vor. Dies erleichtert bei der Auswertung die Unterscheidung zwischen 18S (488bp) und *gimap*-Banden, da nur noch 2 Banden auftreten. Bei einem normalen "Southern Blot" würden für beide Gene sowohl die doppelsträngig als auch kleine Mengen einzelsträngig vorliegender Produkte erkannt. Anschließend wird die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne®Plus, Pall Corporation, Dreieich) übertragen und mit entsprech-enden Sonden hybridisiert.



**Abbildung 12: Semiquantitative PCR Analyse verschiedener *mgimap* Gene**

Nach Amplifikation der RNA mittels RT-PCR und Auftrennung der Produkte im alkalischen Agarosegel mit anschließendem Blot wurden die PCR-Fragmente radioaktiv detektiert. Die Pfeile geben die jeweilige Größe der PCR-Fragmente und der 18S-RNA an.

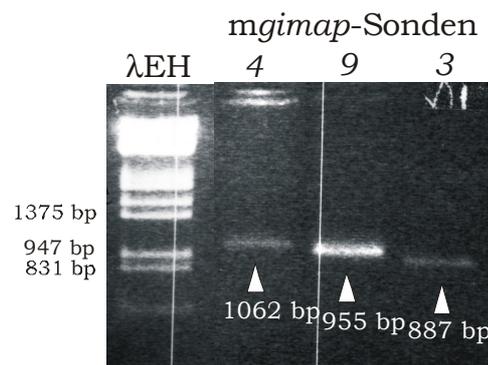
Während es für *mgimap3* aus unbekannt-ten Gründen nicht möglich war, eine vernünftige qPCR zu etablieren, konnte man für *mgimap4*, *mgimap5* und *mgimap9* keine differentielle Regulierung feststellen.

Parallelarbeiten zu anderen *mgimap* Genen (Epe, 2004) konnten ebenfalls keine differentielle Regulierung in der Milz feststellen. Angesichts früher veröffentlichter Ergebnisse von Krücken *et al.* (1997 und 1999), die besagen, daß es bei *mgimap1* in der Milz durch eine Malariainfektion zu einer ca 50-fachen Induktion kommt, traten Zweifel an der Methodik auf. Um die Aussagen der vorangegangenen Versuche zu überprüfen, wurde ein Poly A<sup>+</sup> "Northern Blot" durchgeführt. Dazu mußten zuerst die entsprechenden Sonden für die Hybridisierung hergestellt werden.

### 3.3.2 *mgimap3*-, *mgimap4*- und *mgimap9*- Sondensynthese für "Northern Blot"- Analysen

Zur Synthese von Sonden für die anschließende Hybridisierung im "Northern Blot" wurden die Plasmide pcDNA3.1/V5-His<sup>6</sup>TOPO<sup>®</sup> mit inserierter *mgimap4*- bzw. *mgimap9*-DNA sowie pCR2.1 TOPO<sup>®</sup> mit inserierter *mgimap3*-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und nach Aufreinigung aus dem Gel mit anschließender Natriumacetatfällung zur Entfernung von Waschpufferresten auf einem 1%igen Agarosegel konzentrationsmäßig abgeschätzt.

Sonden für *mgimap4* und *mgimap9* wurden mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten, Sonden für *mgimap3* mit *Bam*HI.



**Abbildung 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der drei *mgimap*-cDNA-Fragmente nach Restriktionsanalyse**

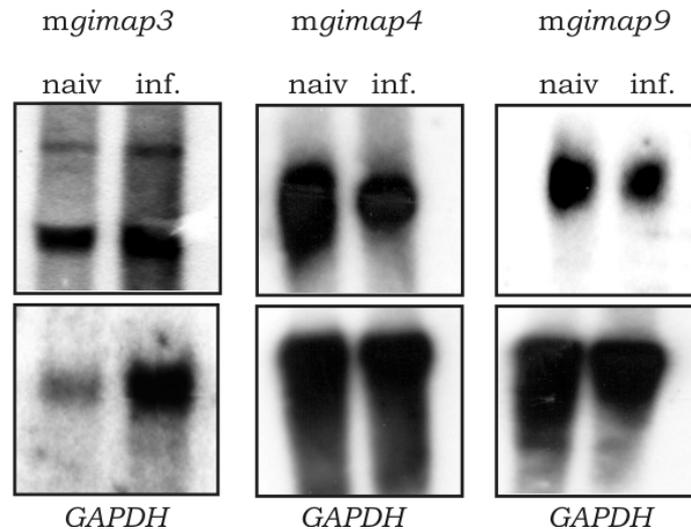
Die erwarteten Bandengrößen stehen in den entsprechenden Spuren. Als Marker diente mit *Eco*RI und *Hind*III restringierte  $\lambda$ -DNA.

### 3.3.3 Organspezifische Expression der *mgimap3*, *mgimap4* und *mgimap9* Poly (A)<sup>+</sup> RNA

Poly (A)<sup>+</sup> RNA ist messenger RNA, die aus Gesamt-RNA isoliert wird. Gesamt-RNA besteht zu 1-3 % aus mRNA, zu 80 % aus rRNA und zu 15 % aus tRNA. Die Verwendung von Poly (A)<sup>+</sup> RNA reduziert unspezifischen Hintergrund und erhöht die Selektivität.

Aus Gesamt-RNA wurde Poly (A)<sup>+</sup> RNA aufgereinigt. 5  $\mu$ g der Poly (A)<sup>+</sup> RNA wurden in einem denaturierendem Glyoxal gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran (Biodyne<sup>®</sup>Plus, Pall Corporation, Dreieich) übertragen. Letztere wurde mit radioaktiv markierten *mgimap3*-, *mgimap4*- und *mgimap9*-cDNA-Sonden (3.3.1.2) hybridisiert. Nach 48h Autoradiographie mit Röntgenfilmen konnte bei *mgimap4* und *mgimap9* kein unterschiedliches Signal von der Spur mit Milz RNA aus naiven zur Spur mit Milz RNA aus infizierten C57Bl/6 Weibchen beobachtet werden. Bei *mgimap3* traten 2 Banden auf, von denen eine das Signal für *mgimap5* sein könnte, allerdings könnte es sich auch um 2 Spleißvarianten von *mgimap3* handeln. Aber auch hier konnte kein Unterschied in der Signalstärke detektiert werden. Um genaue Aussagen über die Expressionshöhe machen zu können, muß auf jeder Spur die gleiche Menge RNA in gleicher Qualität vorliegen. Um

dies zu überprüfen wird der Blot im Anschluß nochmal mit *GAPDH*-cDNA hybridisiert. *GAPDH* ist ein sog. „housekeeping“ Gen. Es diente als Kontrolle.



**Abbildung 14: Poly (A)<sup>+</sup> RNA -"Northern Blot" der *mgimap* Gene 3, 4 und 9**

Aus Milzen verschiedener Infektionszustände von C57Bl/6 Mäuseweibchen wurde Poly (A)<sup>+</sup> RNA gewonnen und im "Northern Blot" auf unterschiedliche Expression hin untersucht. *GAPDH* diente als Kontrolle.

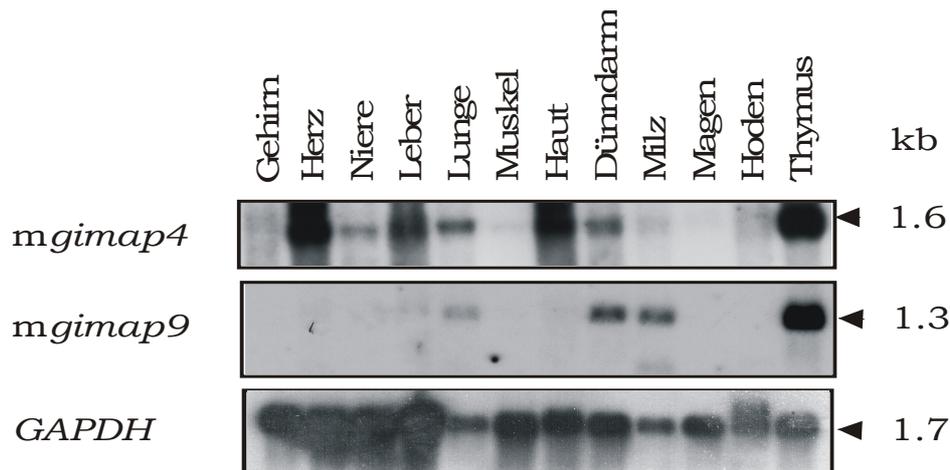
Die ungleichmäßige Expression von *GAPDH* bei *mgimap3* relativiert den Expressionsunterschied von *mgimap3* im Poly (A)<sup>+</sup> RNA Blot, so daß sich auch hier, wie in den vorangegangenen Versuchen (3.3.1.4), keine differentielle Regulierung zeigte. Dies läßt darauf schließen, daß die von Krücken *et al.* (1997 und 1999) publizierten Ergebnisse nicht reproduzierbar sind.

### 3.3.4 Organspezifische Expression

Zur weiteren Untersuchung der organspezifischen Expression wurde ein "Multiple Choice™ Northern Blot" (ams, Wiesbaden) mit cDNA-Sonden von *mgimap4* und *mgimap9* (3.3.2) hybridisiert. Der MCN – Blot enthält Poly (A)<sup>+</sup> RNA (pro Spur etwa 2 µg) aus 12 verschiedenen Geweben aus 6-8 Wochen alten gemischt geschlechtlichen (außer Hoden) Balb/c – Mäusen immobilisiert auf einer positiv geladenen Nylonmembran.

Es konnten, wie in Abbildung 9 deutlich zu erkennen, für *mgimap4* starke Signale im Thymus, im Herzen, in der Leber und in der Haut detektiert werden. Schwächere Signale traten in den Nieren, der Lunge und dem Dünndarm auf. In Milz und Hoden konnten nur sehr schwache Signale detektiert werden, wogegen im Hirn, Magen und in den Muskeln keine Regulation zu beobachten war. Die Größe der auftretenden Bande lag bei 1,6 kb.

Bei *mgimap9* zeigte sich eine Bande der Größe 1,3 kb besonders intensiv im Thymus. Etwas schwächere Signale kamen im Dünndarm und der Milz vor. In der Lunge war kaum eine Expression wahrzunehmen; im Hirn, Herzen, in der Niere, der Leber, den Muskeln, der Haut, dem Magen und den Hoden konnte keine Expression beobachtet werden.



**Abbildung 15: Organspezifische Expression von *mgimap4* und *mgimap9* im "Multiple Choice™ Northern Blot"**

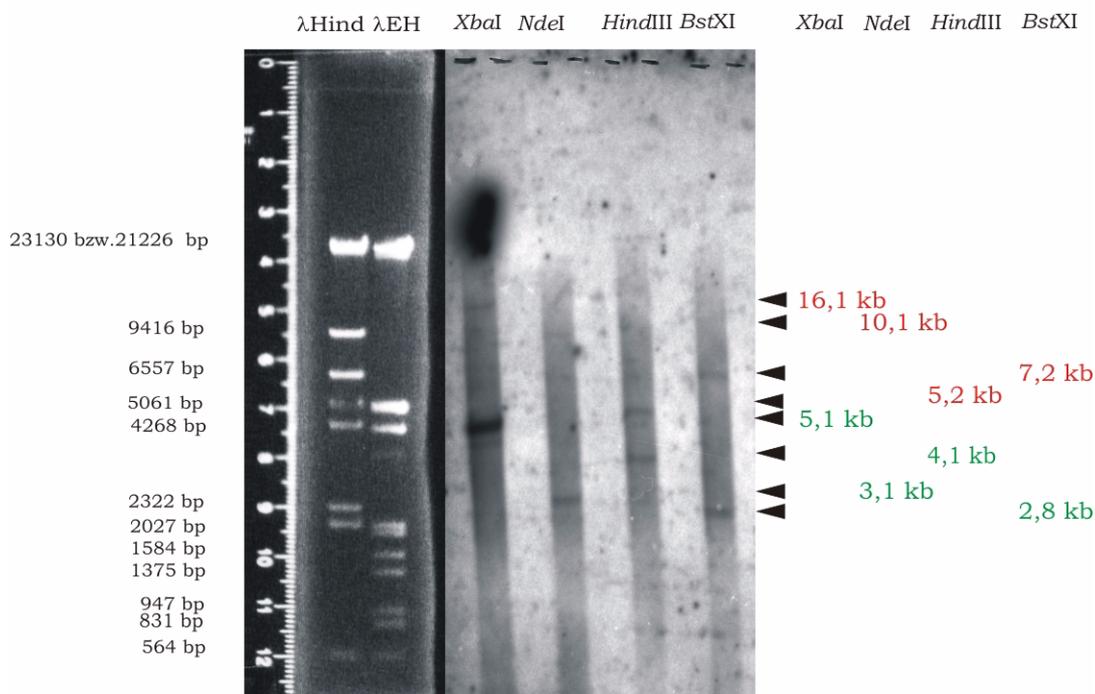
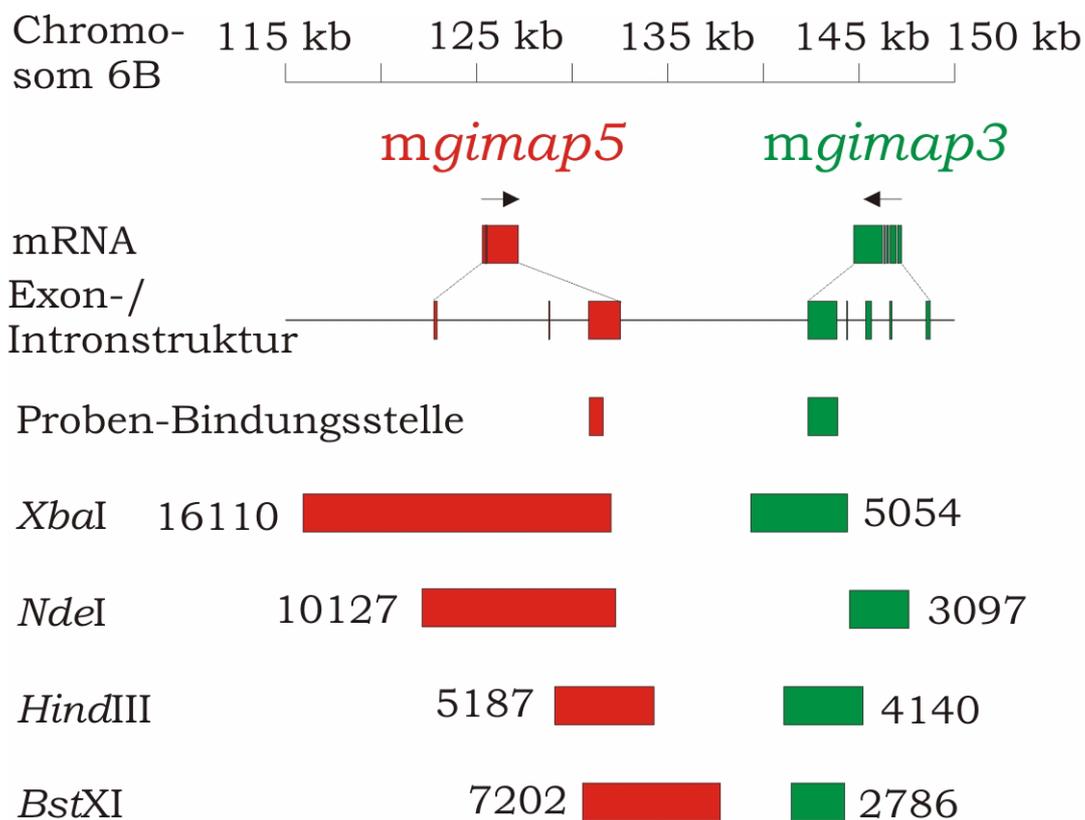
Zur Kontrolle der RNA wurde der Blot mit *GAPDH* nachhybridisiert.

### 3.3.5 *mgimap3* und *mgimap5* – 2 distinkte Gene?

*gimap3* ist ein murines Gen, dessen mRNA zwei offene Leseraster von 67 und 301 AS mit einer GTP/ATP-Bindungsstelle am N-Terminus und einem hydrophoben Bereich am C-Terminus kodiert. Der zweite ORF weist eine starke Homologie (77 % Identität auf DNA-Ebene; 61 % Identität und 75 % Ähnlichkeit auf Proteinebene) zu dem menschlichen *gimap5* (307 AS) auf (Dahéron *et al.*, 2001). *mgimap5* unterscheidet ebenfalls zwei offenen Leseraster (304 und 308 AS). Wiederum zeigt das zweite Leseraster Homologien (77 % Identität auf DNA-Ebene; 55 % Identität und 69 % Ähnlichkeit auf Proteinebene) zu *hgimap5* (Hornum *et al.*, 2002). Vergleicht man *mgimap3* mit *mgimap5* so ergibt sich, daß die kodierenden Regionen zu 80% identisch sind (MacMurray *et al.*, 2002).

Während *mgimap3* (2423 bp) in seiner proteincodierenden Region ein kleines Intron besitzt, hat *mgimap5* (1876 bp) kein Intron. Da das Mausgenom noch nicht vollständig sequenziert wurde, fehlen einige kleine Abschnitte. Die Frage, ob tatsächlich 2 sehr ähnliche Gene, *mgimap3* und *mgimap5*, vorhanden sind oder ob es sich um ein und dasselbe Gen handelt, sollte mit Hilfe eines genomischen "Southern Blot" beantwortet werden. Dazu wurde genomische DNA aus der Leber C57BL/6 Mäuseweibchen hergestellt und mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*Bst*XI, *Hind*III, *Nde*I, *Xba*I), deren Erkennungssequenzstellen in einem der jeweiligen Exons lagen, restringiert. Als Sonde diente ein *mgimap3* cDNA-Fragment, das über das Exon 3 herüberbindet. *mgimap5* würde wegen der hohen Ähnlichkeit der Gene kreuzhybridisieren.

Wie in Abbildung 16 deutlich zu erkennen, traten pro Restriktionsenzym 2 Banden auf. Pro Gen wurde eine Bande erwartet, was also ganz klar verdeutlicht, daß es sich bei *mgimap3* und *mgimap5* um 2 verschiedene, allerdings auf Nukleinsäureebene sehr ähnliche Gene handelt, die beide eine Rolle in apoptotischen Vorgängen spielen (Dahéron *et al.*, 2001; MacMurray *et al.*, 2002).



**Abbildung 16: "Southern Blot" von *mgimap3* und *mgimap5* mit Schema der in den einzelnen Restriktionen erwarteten Banden**

Das obere Schema zeigt die Exon Orientierung von *mgimap3* bzw. 5 auf dem Chromosom 6B der Maus und die zu erwartenden Banden, sowie ihre Größe und Lage. Für den "Southern Blot" (unten) wurden je 10  $\mu$ g genomische DNA aus der Leber von C57Bl/6-Weibchen mit *Bst*XI, *Hind*III, *Nde*I oder *Xba*I restringiert, im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert, die mit einer *mgimap3*-Sonde hybridisiert wurde.

### 3.4 Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP4 und mGIMAP9 in CHO-K1-Zellen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Proteine mGIMAP4 und mGIMAP9 wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> (5523bp) mit den entsprechenden cDNA transient in CHO-K1-Zellen transfiziert. Durch Klonierung in diesen Vektor wird der ORF der Gene um das V5-Epitop mit "His-tag" (4,9 kDa) verlängert, so daß ein 42,9 kDa (GIMAP4) bzw. 38,4 kDa (mGIMAP9) großes Protein exprimiert wird. Durch das Anhängen solcher "tags" ist der Nachweis des Proteins indirekt durch "tag"-spezifische Antikörper möglich.

Die subzelluläre Lokalisation des in dieser Arbeit auch untersuchten mGIMAP3 Proteins wurde durch Dahéron (2002) in der äußeren mitochondrialen Membran bestimmt. Das GIMAP5 Protein der Ratte wurde durch Hornum *et al.* (2002) und Pandarpurkar *et al.* (2003) in den Mitochondrien lokalisiert.

#### 3.4.1 Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP4

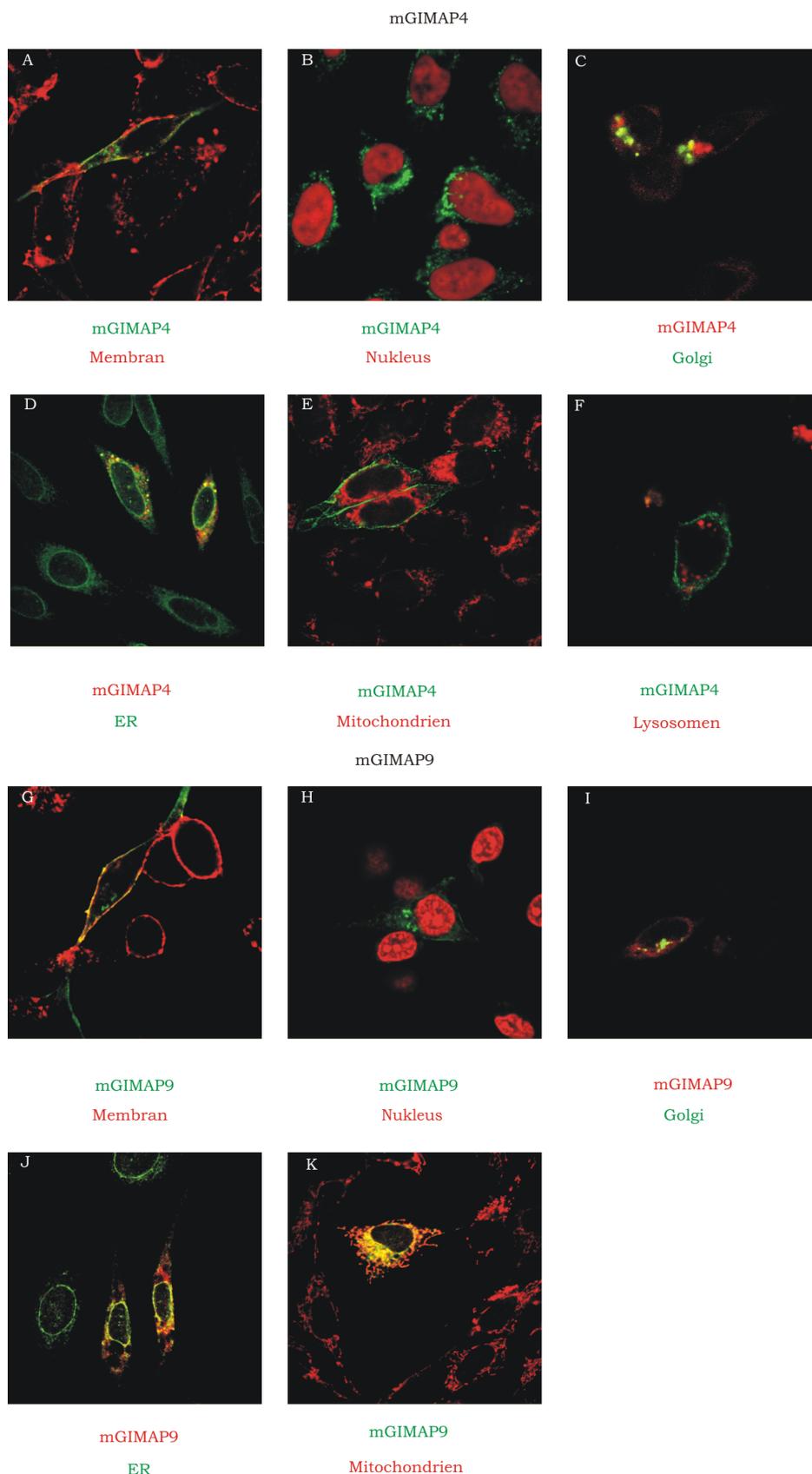
Zwanzig Stunden nach Transfektion mit FuGENE<sup>®</sup>6 und den entsprechenden Vektoren wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem korrespondierenden Erstantikörper inkubiert. Für mGIMAP4 wurde hier der monoklonalen Maus-Anti-V5-Antikörper verwendet, für die Markierung des ER bzw. des Golgi-Apparates der polyklonale Kanninchen-anti-Calnexin- bzw. – Giantin-Antikörper. Die unterschiedlichen Organismen, aus denen die Erstantikörper stammen, sind zur späteren Unterscheidung bei der Behandlung mit dem Zweitantikörper wichtig. Die Inkubation der Zellen mit dem Zweitantikörper erfolgte je nach Art der Koloalisationsfärbung (ConA-Rhodamin bzw. ConA-Alexa Fluor<sup>®</sup>594-Konjugat-Färbung der Plasmamembran, Propidiumiodidfärbung des Zellkerns; LysoTracker<sup>™</sup>Red DWD99-Färbung der Lysosomen, Mitotracker<sup>™</sup>RED CMX Ros-Färbung der Mitochondrien: rot; Antikörperdetektion von ER und Golgi-Apparat: grün) mit dem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488- oder mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 568-gekoppelten polyklonalem Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (grüne oder rote Fluoreszenz) oder mit dem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-gekoppelten polyklonalen Ziege-anti-Kanninchen-IgG-Antikörper (grüne Fluoreszenz). Die Präparate wurden anschließend auf Objektträgern in Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) eingebettet.

Bei Betrachtung der Zellen am Konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica Lasertechnik, Heidelberg) konnte festgestellt werden, daß mGIMAP4 in einem Bereich um den Zellkern herum exprimiert wird, was zur Annahme einer Lokalisation im ER und Golgi-Apparat führte. Tatsächlich konnte wiederholt eine partielle Koloalisation von mGIMAP4 mit dem Golgi-Apparat (Abbildung 17C), dem ER (Abbildung 17D) und der Plasmamembran (Abbildung 17A) nachgewiesen werden. Diese ist durch die gelbe Färbung gekennzeichnet, die durch die Überlagerung von roter und grüner Fluoreszenz entsteht. Ausgeschlossen wurde eine Lokalisation im Kern (Abbildung 17B), den Mitochondrien (Abbildung 17E) und den Lysosomen (Abbildung 17F).

---

### **3.4.2 Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP9**

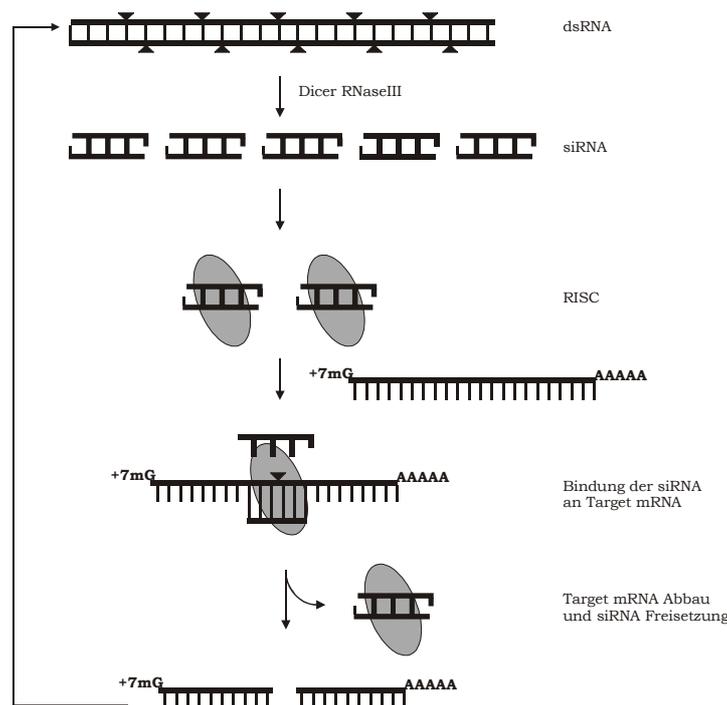
Die Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben behandelt. Die Auswertung der Präparate ergab eine partielle Kolo­kalisierung von mGIMAP9 mit dem ER (Abbildung 17J), dem Golgi-Apparat (Abbildung 17I), der Plasmamembran (Abbildung 17G) und den Mitochondrien (Abbildung 17K). Eine Lokalisation im Nukleus (Abbildung 17H) konnte ausgeschlossen werden.



**Abbildung 17: Darstellung der subzellulären Lokalisation von mGIMAP4 und mGIMAP9**  
Die Markierung der verschiedenen Zellkompartimente der CHO-K1-Zellen erfolgte 20 h nach Transfektion durch spezifische Antikörper oder den Einsatz von speziellen Farbstoffen. Die Bildunterschriften entsprechen farblich den angefärbten Proteinen bzw. Kompartimenten.

### 3.5 RNAi

Die Transfektion von doppelsträngiger RNA, korrespondierend zu spezifischen Gensequenzen, führt in vielen Organismen zur Inhibition dieser Genexpression. Das Phänomen des RNAi-Mechanismus ist bis heute nicht ganz geklärt. RNAi scheint über einen posttranskriptionellen Mechanismus zu wirken. Fire *et al.* (1999) stellten fest, daß die Injektion von dsRNA, korrespondierend zu Intron oder regulatorischen Sequenzen, zu keinem RNA-Phänotyp führt. Eine in die Zielzelle eingeschleuste dsRNA mit homologer Sequenz zu einer zelleigenen mRNA startet den Vorgang. Dicer, eine ATP-abhängige Ribonuclease, zerschneidet im ersten Schritt die dsRNA in viele kleine Stücke. Die resultierenden Schnittfragmente bestehen auf jeder Seite aus 21-23 Nukleotiden, die am 3'-Ende jeweils 2-3 Nukleotide überstehen, sog. „small interfering“ RNA (siRNA). Diese Fragmente können doppel- oder einzelsträngig vorliegen. In einem zweiten Schritt wandert die siRNA in einen weiteren Enzymkomplex, „RNA-induced-silencing-complex“, kurz RISC. Diese Endoribonuklease findet anhand der siRNA das komplementäre Stück der zelleigenen mRNA und zerschneidet sie (Ahlquist, 2002). Der Prozeß legt letztlich die Expression des Gens lahm, von der die mRNA stammt: Es wird zwar noch transkribiert, jedoch wird die mRNA durch RNAi genauso schnell wieder abgebaut.



**Abbildung 18: Schematischer Ablauf einer RNA-Interferenz**

Zum Auslösen eines selektiven sequenzspezifischen mRNA Abbaus durch RNAi muß lange dsRNA durch die RNaseIII Dicer in 21-23 Nukleotide lange dsRNA gespalten werden. Die entstandenen siRNAs werden als Einzelstränge in einen sog. RISC eingebaut. RISC ist ein großer Multiproteinkomplex, der, durch den Antisensestrang der siRNA geführt, sequenzkomplementär an die Ziel-mRNA angelagert wird. Es erfolgt die Spaltung der mRNA, wodurch wieder neue 21-23 Nukleotide lange RNA Stücke entstehen, die im Folgezyklus wieder als RNAi dienen. Dies erklärt die große Effektivität der RNAi-Reaktion.

Es wurden parallel 2 alternative Methoden zur Repression der *mgimap* Genfunktion verwendet. Bei der ersten Methode kamen murine *gimap* Gene zum Einsatz, bei der zweiten humane. Diese Vorgehensweise sollte zum einen eventuelle Unterschiede zwischen den Genfunktionen aufzeigen, zum anderen die Methode der Wahl herauskristallisieren, mit der dann in folgenden Arbeiten die anderen *gimap* Gene auf ihre Funktion hin, untersucht werden können.

### 3.5.1 Konstruktion des pDECAP-*mgimap4* bzw. *mgimap9* RNAi-Vektors

Der Gebrauch von herkömmlichen RNA-Vektoren hat sich in Säugerzellen allerdings als problematisch erwiesen. Durch die Bildung von fremder dsRNA in diesen Zellen kommt es zu einer Interferon-Antwort, die eine unspezifische Degradation von mRNA und den damit verbundenen Zelltod nach sich zieht. Außerdem spielt auch die Länge der verwendeten RNA eine wichtige Rolle. So zeigten Hammond *et al.* (2000) durch *in vitro* Experimente mit *Drosophila* Zellextrakten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Länge der verwendeten dsRNA und dem RNAi-Effekt. Der höchste Anteil an RNAi-Phenotypen wurde mit dsRNA größer als 500 bp erreicht. Unterhalb dieses Wertes nahm der Effekt deutlich ab. Daher wurde ein Vektor ausgewählt, der sich hervorragend für die Transkription spiegelsymmetrischer Inserts von dsRNA, die größer als 500 bp sind, eignet. Dieser pDECAP-Vektor (Deletion of Cap Structure and Poly[A]) (siehe Abbildung 19) besteht aus einer vom CMV-Promotor kontrollierten Ribozymkassette, welche die 5'-Cap-Struktur der transkribierten RNA entfernt. Desweiteren enthält er eine Erkennungssequenz, an die sich das Zinkfingerprotein MAZ bindet. MAZ unterbindet die Polyadenylierung, indem es die RNA-Polymerase III zum Abfallen ohne anschließende Polyadenylierung bringt (Shinagawa & Ishii, 2003). Die Deletion der 5'-Cap-Struktur und die Unterdrückung der Synthese des Poly[A]-Schwanzes verhindern den dsRNA Transport in das Zytoplasma und die Induzierung einer Interferon-Antwort.

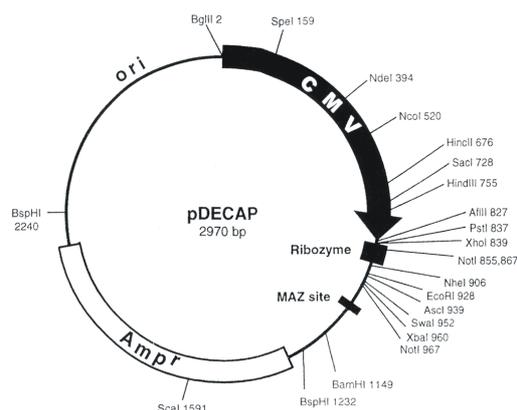
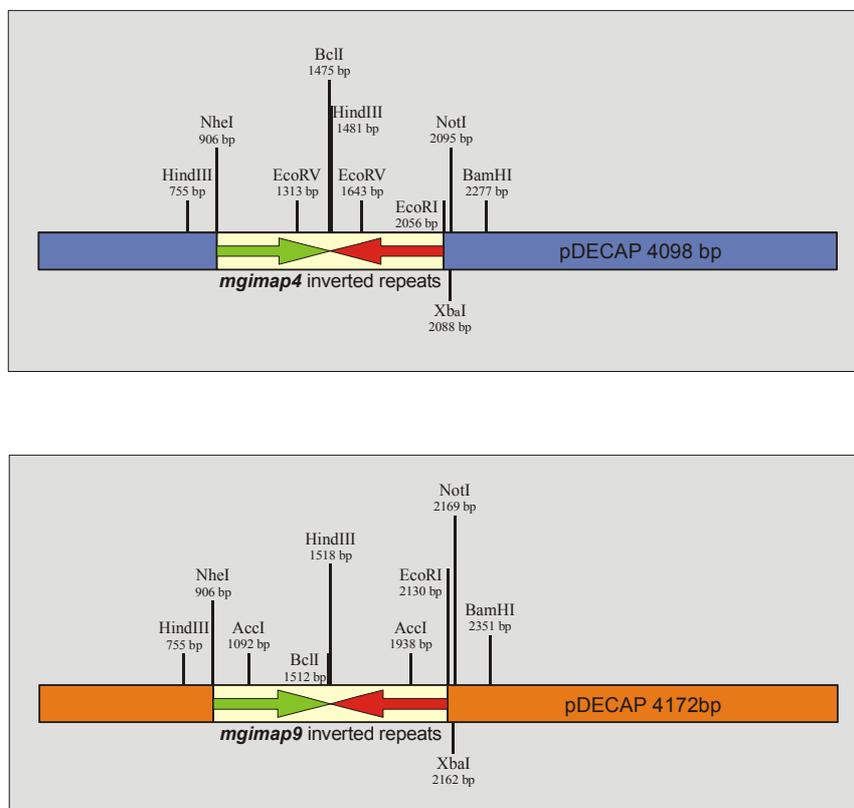


Abbildung 19: pDECAP-Vektor (Shinagawa & Ishii, 2003)

#### 3.5.1.1 Amplifizierung invertierter *mgimap4*- und *mgimap9*-Sequenzen

In einer PCR mit *mgimap4* - bzw. *mgimap9* -DNA als Templat wurden mit den entsprechenden Primern, die durch das Anhängen zusätzlicher Erkennungssequenzen für die Restriktionsnukleasen *NheI* und *BclI* modifiziert wurden, invertierte Fragmente in den Größen 564 bp für *mgimap4*

und 599 bp für *mgimap9* amplifiziert. Diese wurden in den Vektor pCR2.1 TOPO® kloniert, der wiederum in DH5α- bzw. SCS110- Zellen für die invers zu klonierende Sequenz transformiert und amplifiziert wurde. Nach DNA-Präparation erfolgte die Kontrolle der Klonierung über einen Restriktionsverdau mit *BstXI*.



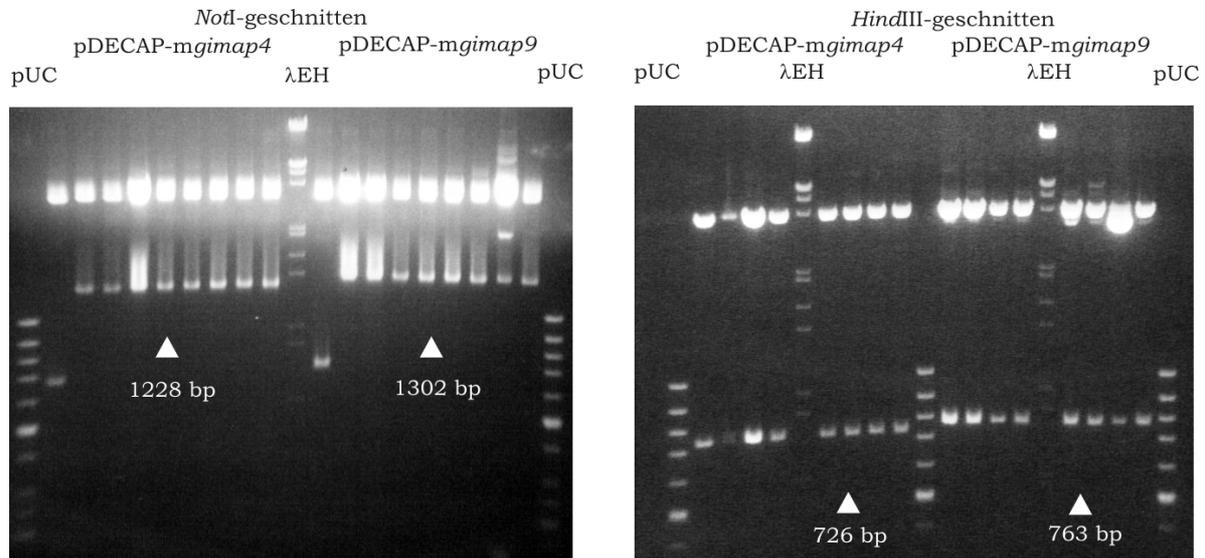
**Abbildung 20: Schema der Klonierung der inversen *mgimap4* bzw. *mgimap9* Fragmente in den pDECAP-Vektor**

Zu sehen sind sämtliche Restriktionsnuklease und ihre Schnittstellen, die für Ligationen und Restriktionsanalysen benutzt wurden

### 3.5.1.2 Klonierung der *mgimap4*- und *mgimap9*-Sequenzen in den pDECAP-Vektor

Die zu klonierenden Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen (*NheI* und *EcoRI* bzw. *BclI* und *EcoRI* für das inverse zweite Fragment) aus dem Vektor pCR2.1 TOPO® herausgeschnitten, um in den vorbereiteten Vektor pDECAP kloniert werden zu können. Dazu wurde der Ausgangsvektor pDEACP (2970bp) zuerst mit *NheI* und *EcoRI* restringiert und dephosphoryliert. Nach der Ligation der entsprechenden Fragmente erfolgte die Transformation in SCS110-Zellen, die keine Dam-/Dcm-Methylierung des Plasmides durchführen und so die Restriktion durch das methylierungs-sensitive Enzym *BclI* ermöglichen. Nach einer Restriktion der Konstrukte mit *BclI* und *EcoRI* mit anschließender Dephosphorylierung wurden die zweiten Fragmente invers hineinkloniert. Die Transformation der pDECAP-*mgimap4*- bzw. *mgimap9*-Vektoren erfolgte anschließend in SURE2® Zellen, da dieser Stamm eine akkurate Replikation der invertierten Sequenzen erlaubt und eine Deletion von unüblichen repetitiven Elementen minimiert.

Insgesamt wurden jeweils 8 Klone durch Restriktionen mit *NotI* und *Hind* III auf eine richtige Inserierung der *mgimap4* bzw. *mgimap9* invertierenden Sequenzen im pDECAP-Vektor überprüft. Durch *NotI* wurde das komplette Fragment in der Größe von 1228 bp (*mgimap4*) bzw. 1302 bp (*mgimap9*) herausgeschnitten. *Hind*III schnitt ein Fragment von 726 bp (*mgimap4*) bzw. 763 bp (*mgimap9*) heraus.



**Abbildung 21: Restriktion der RNAi-Klone mit beiden inversen Fragmenten.**

Gelelektrophoretische Auftrennung des mit *NotI* bzw. *Hind*III restringierten pDECAP-*mgimap4*- bzw. *mgimap9*-Konstruktes.

Aufgrund der Langwierigkeit und Kompliziertheit der Methodik, die in den invertierten Elementen im Vektor begründet liegt, waren keine weiteren Experimente mehr möglich. Durch die Konstruktion des Vektors ist allerdings in Zukunft eine posttranskriptionelle Abschaltung der *mgimap* Gene 4 bzw. 9 und damit eine Unterdrückung der *mgimap 4* bzw. *mgimap9* Expression für *in vitro* Untersuchungen möglich.

### 3.5.2 RNA-Interferenz durch *hgimap4*-siRNA

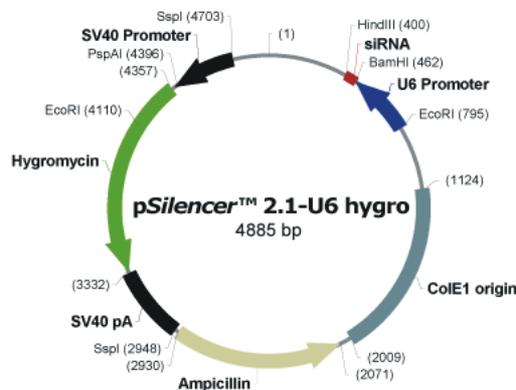
In einer alternativen Methode wurde das humane *gimap4* durch RNA-Interferenz posttranskriptionell reprimiert.

#### 3.5.2.1 Präparation von *hgimap4* und *EGFP-silencern*

Aus kompetenten *E. coli*-Zellen, die mit einem pSilencer™ Plasmid (4885 bp) transformiert wurden, das entweder eine von 3 verschiedenen Haarnadel-siRNA-Inserts von *hgimap4* oder ein Haarnadel-siRNA-Insert von *EGFP* enthielt, wurde DNA isoliert (Saïdani, 2004). Der pSilencer™2.1-U6 hygromycin Vektor (Abbildung 22) enthält einen RNA-Polymerase III (U6) und einen SV40 Promotor. Nach Ligation der einzelnen über spezifische Primer hybridisierten inversen Oligonukleotidfragmente von *hgimap4* bzw. *EGFP* in den Vektor, produziert dieser RNA, die sich zu kurzen Haarnadel-RNA-Fragmenten aus 19 bp umfaltet. Im Anschluß wandelt der Dicerkomplex diese Fragmente in 21 bp lange siRNAs um, die überhängende 3' Enden besitzen. Diese siRNAs formen den siRNA-Proteinkomplex, auch RISC genannt, der in der Lage ist, das komplementäre Stück der zelleigenen mRNA zu erkennen und zu zerschneiden. Als Negativkontrolle diente der leere Vektor. Um evt.

Veränderungen durch den Ligationvorgang auszuschließen, wurde er nur mit DNA-Hybridisierungslösung (ohne siRNAs) ligiert.

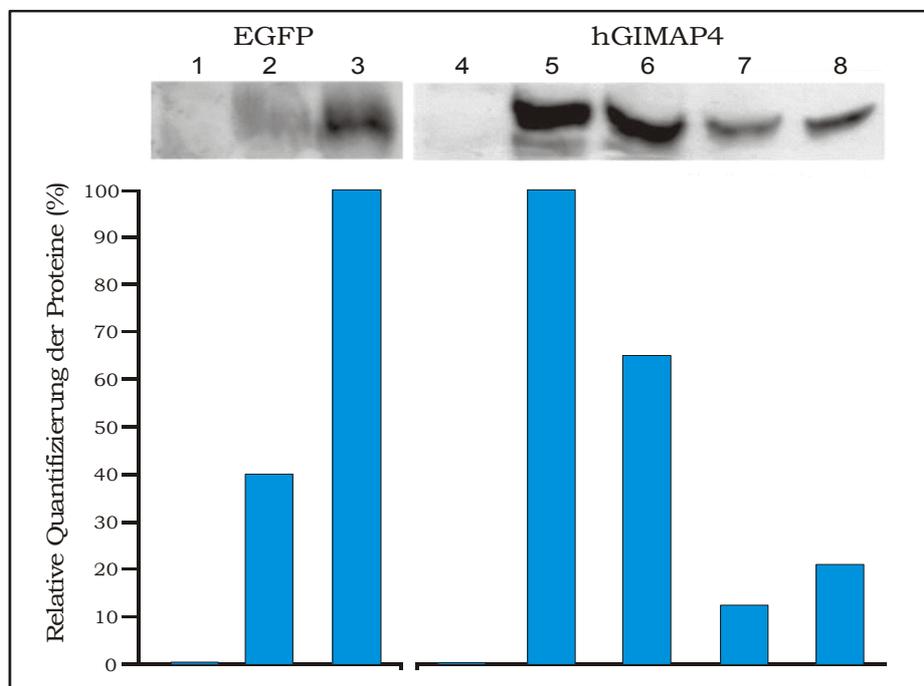
Über einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* wurden die richtigen Klone im Agarosegel bestimmt (Saïdani, 2004).



**Abbildung 22: pSilencer™ 2.1-U6 hygro Vector (Ambion Inc., Worcester, USA)**

### 3.5.2.2 Effizienzanalyse der siRNA

CHO-K1-Zellen wurden transient mit der unter 3.5.2.1 ausgewählten DNA transfiziert. Mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Antikörper (Maus-Anti-V5) wurde die siRNA auf ihre Funktionalität überprüft. Zum Vergleich dienten mit nicht reprimiertem *hgimap4*- bzw. *EGFP*-Plasmid transfizierte Zellen.



**Abbildung 23: Western Blot Analyse und Quantifizierung der Expression von EGFP (Spur 1-3) und hGIMAP4 (Spur 4-8) vor und nach RNAi in CHO-K1-Zellen**

Spur 1 und 4: untransfizierte Zellen; Spur 2: Zellen transfiziert mit pEGFP-C1, pcDNA3.1-*hgimap4* und SiEGFP.2; Spur 3 und 5: Zellen transfiziert mit pEGFP-C1, pcDNA3.1-*hgimap4* und pSilencer; Spur 6: Zellen transfiziert mit pEGFP-C1, pcDNA3.1-*hgimap4* und Si1.2.; Spur 7: Zellen transfiziert mit pEGFP-C1, pcDNA3.1-*hgimap4* und Si2.2.; Spur 8: Zellen transfiziert mit pEGFP-C1, pcDNA3.1-*hgimap4* und Si3.2.

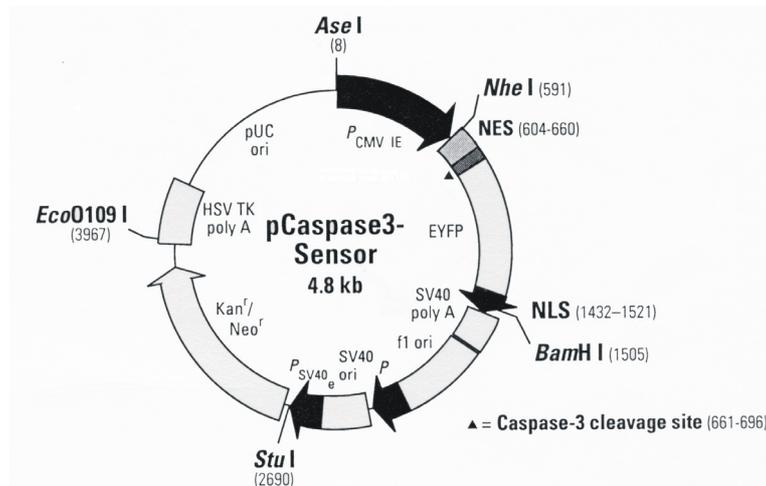
Deutlich zu erkennen ist, daß zwei der drei siRNAs von *hgimap4* (Spur 7 und 8) als auch siEGFP (Spur 2) eine Expression der transfizierten Gene einschränken. Während der knock down von EGFP zu einer 60%igen Verringerung der Expression (Spur 2) im Vergleich zu den Zellen, die mit unbehandeltem pEGFP-C<sub>1</sub> transfiziert wurden (Spur 3) führt, ließen sich bei den 3 verschiedenen *hgimap4* siRNAs unterschiedliche Beobachtungen machen. Si1.2 (Spur 6) zeigte eine 35%ige, Si2.2 eine 90%ige (Spur 7) und Si3.2 eine 80%ige (Spur 8) Repression. Diese Daten ergaben sich aus dem Vergleich zu Untersuchungen mit untransfizierten Zellen (Spur 1 und 4) sowie zu Zellen, die mit dem normalen *hgimap4* Plasmid transfiziert worden waren (Spur 5). Die beiden effizientesten siRNAs, d.h. Si 2.2 und Si 3.2, wurden in den weiteren Versuchen eingesetzt.

### 3.5.2.3 *hgimap4* Silencing und apoptotische Effekte

Apoptose ist ein streng regulierter Prozeß, der zum programmierten Zelltod führt. Eine zentrale Rolle spielt dabei eine cysteinabhängige-aspartatspezifische Familie von Proteinen, die auch als Caspasen bezeichnet werden. Sie sind an der Initiierung und Ausführung apoptotischer Prozesse innerhalb einer Zelle beteiligt. Insbesondere Caspase-3 hat in diesen Vorgängen eine Schlüsselfunktion.

Für die folgenden Experimente wurde der pCaspase3-Sensor Vektor verwendet. Er kodiert für das gelbgrün fluoreszierende EYFP. EYFP oder auch Enhanced Yellow Fluorescent Protein ist eine Variante des GFP-Gens, das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde und für ein Molekül von 238 Aminosäuren (ca 27 kDa) kodiert. Durch Methoden der Molekularbiologie wurde es derart optimiert, daß eine stärkere Fluoreszenz erreicht werden konnte (Cubitt *et al.*, 1995). Nach Expression in Zellen ist das GFP typischerweise homogen im Zytoplasma und Zellkern verteilt. Offensichtlich besitzt GFP keine Präferenz für ein bestimmtes Zellkompartiment. Hingegen bewirkt die Fusion des Moleküls an vollständige Proteine oder isolierte Signal-Peptide eine spezifische subzelluläre Lokalisierung des GFP, die ausschließlich durch das fusionierte Protein bzw. Peptid bestimmt wird (Köster & Hauser 1999). Im Falle des pCaspase3-Sensor Vektors ist das EYFP am 3'Ende mit einem nukleären Lokalisationssignal (NLS) und am 5'Ende, nach einer 36 bp langen Erkennungssequenz für Caspase-3, mit einem Kernexportsignal der Map-Kinase-Kinase (NES) fusioniert. Bei nicht aktivierter Caspase dominiert das Kernexportsignal (NES) und das EYFP Fusionsprotein ist im Zytoplasma lokalisiert. Wird Caspase-3 durch einen Apoptoseauslöser aktiviert, trennt sich die NES-Sequenz vom Fusionsprotein und das EYFP Fusionsprotein ist nur noch im Zellkern zu finden.

Über dieses System ist es relativ einfach möglich, das Auslösen von apoptotischen Vorgängen durch die veränderte zelluläre Lokalisation, d.h. die Verlagerung der Fluoreszenz vom Zytoplasma in den Zellkern, unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Heidelberg) zu beobachten.



**Abbildung 24: pCaspase3-Sensor Vektor (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA)**

NES = nukleäres Exportsignal, ▲ = Caspase-3-Schnittstelle, EYFP = gelbgrün fluoreszierendes Protein, NLS = nukleäres Lokalisationssignal

Jurkatzellen wurden über das Nukleofektorsystem (Amaxa, Köln) einerseits mit dem Leervektor des *hgimap4*-Plasmides pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup>, *hgimap4* in pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> und jeweils dem pCaspase3-Sensor Vektor kotransfiziert. Andererseits wurden sie mit den siRNAs Si2.2, Si2.3, dem Silencerleervektor pSilencer<sup>™</sup>, *hgimap4* in pSilencer<sup>™</sup> sowie jeweils mit dem pCaspase3-Sensor Vektor kotransfiziert. Während die letztgenannten Transfektionen zu einer Reprimierung von *hgimap4* führen sollten, ging es in der ersten Versuchsvariante darum, eine Überexpression von *hgimap4* mit entsprechenden Folgen zu beobachten.

Nachdem die Expression von EYFP ihr Maximum erreicht hatte (25 h später), wurden die Zellen jeweils auf 2 Schalen verteilt. Zu einer der beiden Schalen wurde 7,5 µg/ml Anisomycin gegeben. Anisomycin hemmt die Proteinbiosynthese, indem es die Bindung der tRNA an die Ribosomen verhindert (Grollmann, 1967).

Jede Stunde wurden 50 µl Zellsuspension abgenommen, fixiert, auf Objektträger übertragen und eingedeckelt (2.2.24). Danach erfolgte die Kontrolle der anti- bzw. proapoptotischen Effekte von *hgimap4* durch Mikroskopie (Leica, Heidelberg). Unter optimalen Umständen war bei beiden Versuchsreihen die DNA im Zytoplasma lokalisiert. Durch das Auslösen von Apoptose kam es zu einer Wanderung der DNA vom Zytoplasma in den Kern.

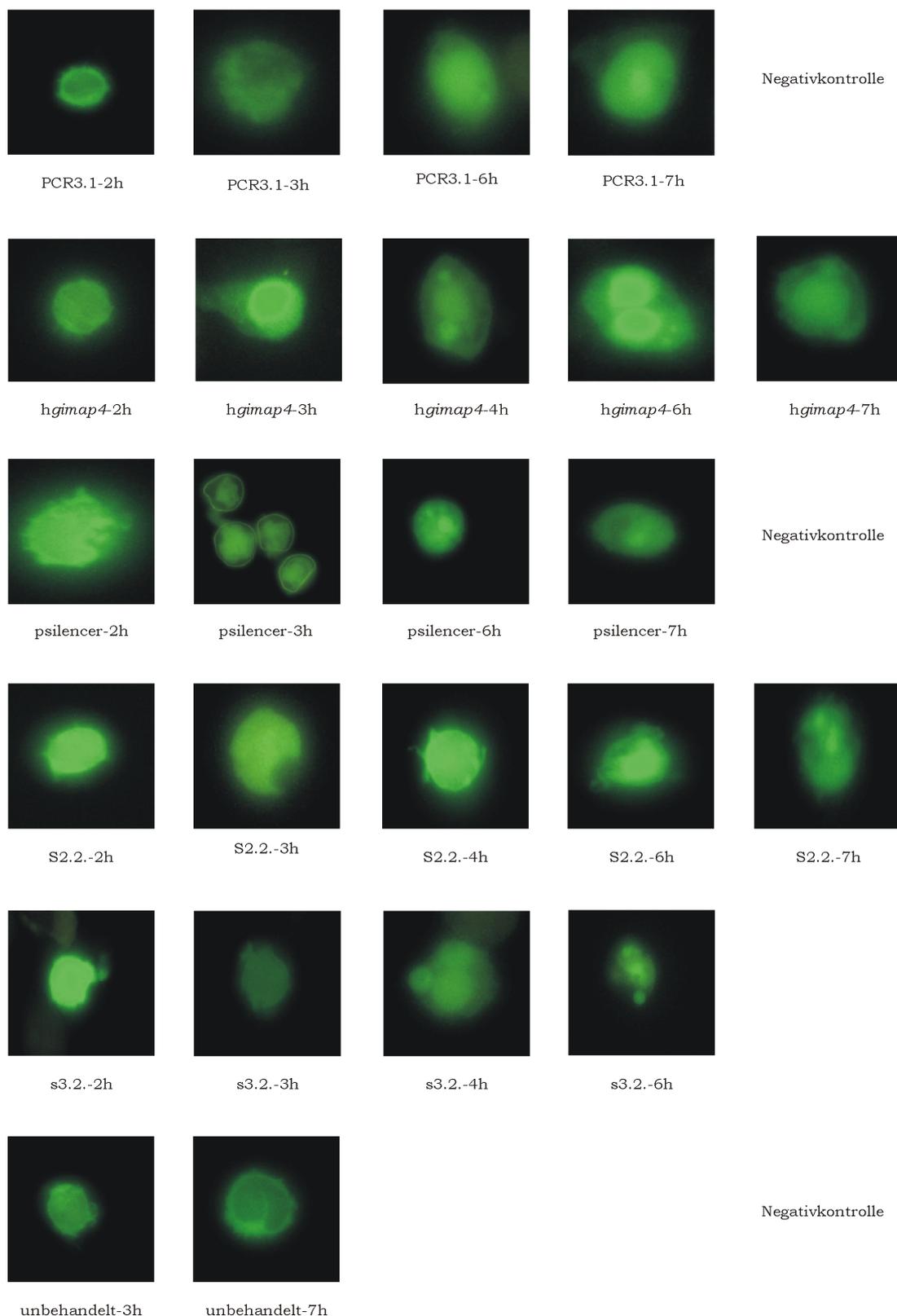
Während bei einer Überexpression von *hgimap4* beim leeren Vektor pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> bereits nach 3 h erste Apoptoseanzeichen auftraten, verzögerte die inserierte cDNA von *hgimap4* diesen Effekt um eine Stunde (Abbildung 25).

Bei der Reprimierung von *hgimap4* ließ sich Ähnliches beobachten (Abbildung 25). Die *hgimap4* siRNAs verzögern unterschiedlich lang das Auslösen von Apoptose. Dies entspricht auch den Ergebnissen in der Effizienzanalyse der siRNAs (3.5.2.2). Hier zeigten die verschiedenen konstruierten siRNAs von *hgimap4* ebenfalls ein unterschiedlich stark reprimierendes Verhalten.

---

Als Negativkontrolle wurde der Leervektor der *hgimap4* siRNA Konstrukte eingesetzt. Er zeigte bereits nach 3 h ein 100%iges Apoptoseverhalten. Theoretisch hätte er genauso reagieren müssen wie der Leervektor pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> aus der ersten Versuchsreihe. Eine Erklärung für das differentielle Verhalten könnten die unterschiedlichen Resistenzmarker der beiden Vektoren sein.

Generell läßt sich dennoch sagen, daß in beiden Versuchsreihen leichte antiapoptotischen Effekte von hGIMAP4 beobachtet werden konnten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen unsere Arbeitsgruppe im FACS von Saïdani (2004).



**Abbildung 25: zeitlicher Verlauf der apoptosauslösenden Wirkung von Anisomycin**

Die Aufnahmen in den ersten beiden Reihen zeigen die Ergebnisse der Überexpression. Hier diente der leere Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup> Topo<sup>®</sup> als Negativkontrolle. Die anderen Aufnahmen zeigen das Verhalten bei Reprimierung von *hgimap4* durch siRNA. Hier war der leere Expressionsvektor pSilencer<sup>™</sup> die Negativkontrolle. In der letzten Reihe sind unbehandelte Zellen zu sehen. Die Zahl nach dem Bindestrich entspricht der Stundenzahl nach Zugabe von Anisomycin.

## 4.0 Diskussion

Das von unserer Arbeitsgruppe erstmals beschriebene und als *imap38* bezeichnete Gen wird durch Malaria in der Milz induziert und bleibt auf hohem Niveau konstitutiv exprimiert, selbst nach Ausheilen der Infektion (Krücken et al., 1997 und 1999). Dieses Gen ist der Prototyp einer Genfamilie, die GTPasen kodieren (Poirier et al., 1999). Die Mitglieder dieser Genfamilie bilden ein 125 kb großes Cluster auf dem Chromosom 6B der Maus und umfassen 8 funktionelle Gene und 1 Pseudogen (Abbildung 3). Im Laufe der Zeit wurden immer mehr Mitglieder dieser Genfamilie von unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben und unterschiedlich benannt, was eine Vereinheitlichung der Nomenklatur notwendig machte. Auf Vorschlag des "human gene nomenclature" Komitees wurde die Bezeichnung GTPase of the immune associated protein family (GIMAP) eingeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die murinen *gimap* Gene 3, 4, 5 und 9 näher funktionell charakterisiert. Genomische "Southern Blot-" Analysen sollten klären, ob es sich bei *mgimap3* und *mgimap5* tatsächlich um 2 sehr ähnliche Gene handelt oder wie beim Menschen, um ein funktionales Gen und ein Pseudogen. Mit Hilfe von Northern Blot Analysen wurde die Expression der vorgenannten Gene in Abhängigkeit von einer *Plasmodium chabaudi* Infektion untersucht. Zuvor klonierte cDNA Fragmente dieser Gene wurden als Sonden für die Hybridisierung des Blots verwendet. Weiterhin wurde das Expressionsmuster der Gene *mgimap4* und *mgimap9* in verschiedenen murinen Geweben untersucht. Zudem konnten in einem heterologen Expressionssystem in Säugerzellen die zugehörigen Proteine mGIMAP4 und mGIMAP9 innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Im letzten Teil der Arbeit, der sich mit der Funktion der *mgimap* Gene befaßte, sollte durch Überexpression und Suppression der Gene *mgimap4* und *mgimap9* sowie des orthologen humanen *gimap4* Gens mittels RNAi untersucht werden, ob *in vitro* eine künstlich induzierte Apoptose verhindert werden kann.

### 4.1 Datenbankanalysen von *gimap* Genen

Datenbankanalysen (GeneBank/EBI) und eigene PCR-Arbeiten ergaben die genomische Organisation des murinen *gimap* Genclusters auf Chromosom 6B. Charakteristisch für alle *gimap* Gene ist eine sog. AIG1-Domäne, die aus 5 Motiven (G1-G5) besteht, die für die GTP-Bindungsstelle verantwortlich sind. Außerdem besitzen diese Gene eine konservierte Region mit hydrophober Struktur (ALLLV), die „conserved box“ (=CB) genannt wird und in einer putativen  $\beta$ -Faltblattstruktur der GTPase Domäne lokalisiert ist (Krücken et al., 2004). Diese  $\beta$ -Struktur ist nicht an der Oberfläche des Proteins lokalisiert, sondern zieht sich durch den Kern der GTPase Domäne (Krengel et al., 1990), was vermuten läßt, daß die CB nicht direkt an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist, sondern der AIG1-Domäne hilft, ihre charakteristische Struktur zu bewahren.

Zur Unterscheidung der verschiedenen Gene wurde eine einheitliche Nomenklatur eingeführt. Ein erster Versuch einer solchen Nomenklatur listete 11 sog. *IAN* (immune associated nucleotides) Gene auf dem

Chromosom 6B der Maus (MacMurray *et al.*, 2002). TBLASTN-Analysen von EST- und cDNA- Sequenzen sowie PCR Analysen unserer Arbeitsgruppe ergaben jedoch, daß es tatsächlich lediglich 8 funktionale *mgimap* Gene sowie ein Pseudogen (*mgimap10*) gibt. Am proximalen Ende dieses Clusters liegt ein sehr ungewöhnliches Gen, dessen Exons für 3 AIG1-Domänen kodieren. Dieses als mGIMAP8 bezeichnete Protein besitzt somit 3 GTP-Bindungsstellen. Vergleiche des murinen mit dem humanen Gencluster auf dem Chromosom 7q32-36 ergaben, daß dieses ungewöhnliche Gen in beiden Spezies konserviert ist (Krücken *et al.*, 2004). Außerdem gibt es zu fast jedem *mgimap* Gen ein orthologes humanes Gen. Ausnahmen sind *mgimap9* und das Pseudogen *mgimap10*. Das Ortholog zu *mgimap3* ist *hgimap3*. Es handelt sich hier jedoch um ein Pseudogen, und das trotz der Tatsache, daß die Nukleinsäuresequenz der beiden orthologen Gene eine sehr große Ähnlichkeit aufweist (Krücken *et al.*, 2004). Die *hgimap3* Sequenz weist mehrere Mutationen auf, die das offene Leseraster unterbrechen, so daß kein funktionales Protein kodiert werden kann. Andererseits enthält der menschliche Locus ein Gen namens *hgimap2*, das im Mausgenom nicht vorkommt.

Auch wenn die Intergenregionen des Cluster in ihren Größen variieren und sich somit ein ca 2 mal größeres menschliches Gencluster ergibt, ist die Anordnung und Orientierung aller *gimap* Gene von Maus und Mensch gleich.

Nachstehend eine Übersicht über die bereits beschriebenen und in dieser Arbeit auf den vorangehenden Seiten untersuchten Eigenschaften der murinen und humanen *gimap* Gene, sowie ein Vergleich mit den *gimap* Genen der Ratte.

**Tabelle 7: Eigenschaften der murinen, humanen und rat *gimap* Gene**

Name	Molekulargewicht in kDA	Gewebespezifische Expression	Subzelluläre Expression	Funktion	Referenzen
<i>mgimap1</i>	38	Milz, Makrophagen, B-Zellen	Nukleus, ER	Rolle bei Ausbildung protektiver Immunabwehr Involvierung in p53 Signalweg	Krücken <i>et al.</i> , 1997 & 1999; Kannan <i>et al.</i> , 2001; Stamm <i>et al.</i> , 2002
<i>hgimap1</i>	34,4	Milz, Lymphknoten	ER	aktiviert B- und T-Zellen	Stamm <i>et al.</i> , 2002; McMurray <i>et al.</i> , 2002
<i>rgimap1</i>					McMurray <i>et al.</i> , 2002 Moralejo <i>et al.</i> , 2003
<i>hgimap2</i>	45,5	Milz, Lymphknoten, Thymus			Stamm <i>et al.</i> , 2002; McMurray <i>et al.</i> , 2002 Krücken <i>et al.</i> , 2004

Tabelle 7: Eigenschaften der murinen, humanen und rat *gimap* Gene

Name	Molekulargewicht in kDA	Gewebespezifische Expression	Subzelluläre Expression	Funktion	Referenzen
<i>mgimap3</i>	33,4	Dünndarm, Herz, Lunge, Lymphknoten, Milz, Thymus, T- und B-Zellen	äußere mitochondriale Membran	in Zusammenhang mit Krebsentstehung verantwortlich für spezifisches Überlebenssignal der T-Zellen und so für die Mitochondrienintegrität	Dahéron <i>et al.</i> , 2001 Hornum <i>et al.</i> , 2002 Pandarpurkar <i>et al.</i> , 2003
<i>hgimap3</i>	-	-	-	Pseudogen	MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Krücken <i>et al.</i> , 2004
<i>rgimap3</i>					McMurray <i>et al.</i> , 2002; Moralejo <i>et al.</i> , 2003
<i>mgimap4</i>	38	Dünndarm, Herz, Lunge, Milz, Niere, Thymus, T-Zellen	ER, Golgiapparat, Plasmamembran	Einfluß auf T-Zellselektion während ihrer Entwicklung im Thymus antiapoptotisch	Poirier <i>et al.</i> , 1999
<i>hgimap4</i>	37,5	Milz, Lymphknoten, Thymus	ER, Golgi	Marker der T-Zelldifferenzierung antiapoptotische Wirkung	Cambot <i>et al.</i> , 2002; MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Krücken <i>et al.</i> , 2004; Stamm <i>et al.</i> , 2002
<i>rgimap4</i>	35,8	Milz, Dünndarm, Herz, Lunge, Thymus		differentiell exprimiert während T-Zellentwicklung	Hornum <i>et al.</i> , 2002;
<i>mgimap5</i>	34,7				
<i>hgimap5</i>	Var.1:34,8 Var.2:39,5	Milz, Lymphknoten, Lunge, Plazenta	ER, Golgi	antiapoptotisch	Cambot <i>et al.</i> , 2002; Krücken <i>et al.</i> , 2004; Pandarpurkar <i>et al.</i> 2003; Payne <i>et al.</i> , 2004; Stamm <i>et al.</i> , 2002; Zenz <i>et al.</i> , 2004
<i>rgimap5</i>	Var.1:35 Var.2:11	Milz, Darm, Herz, Lunge, Lymphknoten, Thymus	Mitochondrien	Regulation des Überlebens von T-Zellen Kontrolle apoptotischer Vorgänge	Hornum <i>et al.</i> , 2002; McMurray <i>et al.</i> , 2002; Michalkiewicz <i>et al.</i> , 2004; Moralejo <i>et al.</i> , 2003; Pandarpurkar <i>et al.</i> 2003; Payne <i>et al.</i> , 2004
<i>mgimap6</i>	34,1		ER		Falkenroth, 2001

**Tabelle 7: Eigenschaften der murinen, humanen und rat *gimap* Gene**

Name	Molekulargewicht in kDa	Gewebespezifische Expression	Subzelluläre Expression	Funktion	Referenzen
<i>hgimap6</i>	Var.1:32,9 Var.2:35,4 Var.3:24,1	Lunge, Milz, Niere, Plazenta	ER, Golgi		Cambot <i>et al.</i> , 2002; MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Krücken <i>et al.</i> , 2004
<i>mgimap7</i>	33,3	Dünndarm, Milz, Thymus	ER,		MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Falkenroth, 2001; Saïdani, 2004
<i>hgimap7</i>	34,5	Lymphknoten, Milz, Niere	ER, Golgi	antiapoptotisch	Cambot <i>et al.</i> , 2002; MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Krücken <i>et al.</i> , 2004
<i>mgimap8</i>	76,8	Thymus	ER	antiapoptotisch	Epe, 2004
<i>hgimap8</i>	74,9	Darm, Herz, Lunge, Lymphknoten, Milz, Plazenta			Cambot <i>et al.</i> , 2002; MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Krücken <i>et al.</i> , 2004
<i>mgimap9</i>	33,8	Dünndarm, Milz, Thymus	ER, Golgi-apparat, Plasmamembran Mitochondrien		MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Poirier <i>et al.</i> , 1999
<i>rgimap9</i>		Milz, Thymus			MacMurray <i>et al.</i> , 2002; Moralejo <i>et al.</i> , 2003
<i>mgimap10</i>	-	-	-	Pseudogen	Epe, 2004

## 4.2 *mgimap3* und *mgimap5* - ein oder mehrere Gene?

Laut Datenbankanalysen liegt hGIMAP5 in zwei Spleißvarianten vor. Die erste ist durch 2 Exons kodiert und hat ein Molekulargewicht von 34,8 kDa (307 AS), die zweite besteht nur aus einem Exon und kodiert für ein 39,5 kDa (347 AS) großes Protein. Beide Proteine enthalten eine putative Transmembrandomäne an ihrem COOH-Terminus, haben aber unterschiedliche NH<sub>2</sub>-Termini. Krücken *et al.* (2004) stellten durch RT-PCR Analysen fest, daß für *hgimap3* kein Produkt amplifiziert werden konnte, während dies für *hgimap5* mühelos gelang (Krücken *et al.*, 2004). Bei Expressionsanalysen von *hgimap5* in unterschiedlichen Geweben, mit einer Sonde aus *hgimap5* cDNA Fragmenten, die 90 % Ähnlichkeit mit einem Fragment aus *hgimap3* hat, trat nach kurzer Expositionszeit ein Transkript von 1,6 kb in Milz, Lunge, Herz, Plazenta und Muskel auf. Obwohl nach mehreren Tagen eine weitere allerdings sehr schwache Bande in der Größe von 5,5 kb auftrat, kann man sagen, daß nur *hgimap5* exprimiert wurde. Dies bekräftigt auch noch mal die Aussage, daß *hgimap3*, wie bereits unter 4.1 beschrieben, ein Pseudogen ist (Krücken *et al.*, 2004).

Diese Tatsache sollte auch auf dem Niveau der Maus untersucht werden, zumal sich *mgimap3* und *mgimap5* auf Nukleinsäureebene zu 90 % ähneln. Die Hybridisierung restringierter genomischer DNA mit einem *mgimap3* cDNA Fragment, das ebenfalls das 3. Exon von *mgimap5* bindet, detektierte im Southern Blot, pro Restriktionsenzym 2 Banden (Abbildung 16). Pro Gen wurde eine Bande erwartet, was also ganz klar verdeutlicht, daß es sich bei *mgimap3* und *mgimap5* um 2 verschiedene Gene handelt und nicht etwa um Spleißvarianten ein und desselben Gens.

Während im menschlichen Genom nur *hgimap5* funktional ist, und es sich bei *hgimap3* um ein Pseudogen handelt, sind auf dem Chromosom 6 der Maus und dem Chromosom 4 der Ratte jeweils 2 Gene beschrieben (MacMurray *et al.*, 2002; Moralejo *et al.*, 2003). In der Maus sind beide Gene funktional, bei der Ratte ist nur *rgimap5* näher charakterisiert, über *rgimap3* ist bisher nichts genaueres bekannt (MacMurray *et al.*, 2002; Moralejo *et al.*, 2003; Hornum *et al.*, 2002). Da die Ratte und die Maus relativ eng verwandte Tiere sind, kann man jedoch davon ausgehen, daß *rgimap3* wahrscheinlich ebenfalls exprimiert wird. Warum beim Menschen kleinere Punktmutationen im Gen *hgimap3* dazu geführt haben, daß dieses funktionslos wurde und seine Funktion wahrscheinlich von *hgimap5* mit übernommen wurde (Krücken *et al.*, 2004), bleibt fraglich. Eine andere Vermutung wäre, daß vielleicht auch die Maus und die Ratte nur mit einem der beiden Gene auskommen würden, da nicht nur die Nukleinsäuresequenzen sondern auch die Funktionen beider Gene, zumindest in der Maus, sehr ähnlich sind. Vielleicht ist aber auch die Funktion der beiden murinen Gene redundant; was über einen Knockout zu zeigen wäre. Sicher ist jedenfalls, daß *rgimap5* nicht redundant ist. Eine natürliche Mutation führt in der BB Ratte zum Auftreten von Lymphopenie und Diabetes, in anderen Rattenstämmen nur zu Lymphopenie (Hornum *et al.*, 2002; MacMurray *et al.*, 2002; Moralejo *et al.*, 2003). Über *rgimap3* ist, wie weiter oben im Text bereits erwähnt, noch nichts bekannt.

### 4.3 Expressionsanalysen von *mgimap* Genen

#### 4.3.1 Gewebespezifische Expressionsanalysen

Expressionsanalysen der Gene *mgimap4* und *mgimap9* konnten eine gewebespezifische Expression nachweisen. Für *mgimap4* konnten starke Signale im Thymus, im Herzen, in der Leber und der Haut detektiert werden. Schwächere Signale traten in den Nieren, der Lunge und dem Dünndarm auf. In Milz und Hoden konnten nur sehr schwache Signale entdeckt werden, wogegen im Hirn, im Magen und den Muskeln keine Regulation zu beobachten war. Die Transkriptgröße lag bei 1,6 kb. Ähnliches berichteten Poirier *et al.* (1999), die *mgimap4* erstmalig beschrieben. Nach ihren Beobachtungen handelt es sich bei *mgimap4* um ein 1,8 kb großes Transkript, das vornehmlich in der Milz, aber auch in der Lunge, der Niere und dem Herzen exprimiert wird. Die geringen Größenunterschiede der beiden Transkripte sind zu vernachlässigen, da Meßungenauigkeiten im Millimeterbereich bei der Ermittlung der Bandengröße bereits große Unterschiede ausmachen. Das orthologe *hgimap4* zeigte neben einer

Expression in immunologisch relevanten Geweben wie Milz und Lymphknoten auch eine verstärkte Expression in anderen Geweben, wie Hirn, Intestinaltrakt, Plazenta, Prostata und Hirn (Krücken *et al.*, 2004; Cambot *et al.*, 2002) und ist somit in seinem Expressionsmuster teilweise mit dem vorher beschriebenen murinen Verwandten vergleichbar.

Bei *mgimap9* zeigt sich ein Transkript der Größe 1,3 kb besonders intensiv im Thymus. Etwas schwächere Signale kamen im Dünndarm und der Milz vor. In der Lunge war nur eine äußerst schwache Expression meßbar, und im Hirn, im Herzen, der Niere, der Leber, den Muskeln, der Haut und den Hoden konnte keine Expression beobachtet werden.

Da zu *mgimap9* gar kein Ortholog im menschlichen Genom vorkommt, kann auch keine vergleichende Aussage über eine gewebespezifische Expression gemacht werden.

Bereits beschrieben sind *mgimap3* und *rgimap5*, nicht aber *rgimap3* und *mgimap5*. Erstgenanntes wird in der Milz und im Knochenmark, nicht aber im Thymus, in der Leber oder Niere exprimiert. Dabei ist die Expression auf bestimmte hämatopoetische Zellen beschränkt (Dahéron *et al.*, 2001). Sein humanes Ortholog ist als Pseudogen nicht exprimiert. *rgimap5* wird verstärkt im Thymus und in den Lymphknoten, etwas schwächer in der Milz exprimiert (MacMurray *et al.*, 2002). Dagegen ist sein humanes Ortholog hauptsächlich in der Milz und nicht-lymphatischen Organen, aber nicht im Thymus anzutreffen (Krücken *et al.*, 2004).

#### **4.3.2 Expression in Abhängigkeit von Infektionen mit *Plasmodium chabaudi***

Bei einer Infektion mit *P. chabaudi* erhöht sich das Expressionsniveau von *mgimap1* um das ca 50-fache in der Milz infizierter C57BL/10 Mäuse (Krücken *et al.*, 1999). Dagegen wird die Expression der *mgimap1* homologen Gene *mgimap6* und *mgimap7* bei einer Infektion je nach genetischem Hintergrund des Mausstammes verschieden stark herunterreguliert (Falkenroth 2001; Paunel 2002). Die Expressionsrate von *mgimap8* ist kaum infektionsreguliert, sie schwankt je nach untersuchtem Gewebe (Epe 2004). Wie die oben genannten Resultate belegen, verläuft die Regulation unterschiedlicher muriner *gimap* Gene nicht gleichartig, sondern zum Teil gegenläufig.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression von *mgimap3*, 4, 5 und 9 in der Milz von C57Bl/6 Mäusen in Abhängigkeit von einer *P. chabaudi* Infektion untersucht werden. Nach der Hybridisierung gegen mRNA als auch gegen die wesentlich sensitiveren Poly (A)<sup>+</sup> RNA konnte für keines der Gene ein unterschiedliches Expressionsmuster beobachtet werden. Somit kommen die hier untersuchten 4 Vertreter der *mgimap* Genfamilie bereits in Milzen gesunder Mäuse auf gleichem Expressionsniveau vor. Es findet also keine Regulation infolge einer *P. chabaudi* Infektion statt.

#### 4.4 Subzelluläre Lokalisation von mGIMAP4 und mGIMAP9

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von mGIMAP4 und mGIMAP9 erfolgte nach Expression in CHO-K1-Zellen durch konfokale Laserscanning Mikroskopie.

Die beiden Proteine zeigten teilweise eine recht ähnliche Lokalisation. Während sie nicht im Nukleus zu finden waren, konnte eine Kolo­kalisierung mit dem ER, dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran festgestellt werden. Außerdem wurde mGIMAP9 im Gegensatz zu mGIMAP4 wiederholt in Kolo­kalisierung mit den Mitochondrien detektiert. Was das Auftreten der Proteine in den Lysosomen angeht, kann dies für mGIMAP4 ganz klar ausgeschlossen werden. Für mGIMAP9 scheiterte dieser Lokalisationsversuch mehrfach durch die fehlende Anfärbung der Lysosomen trotz Verwendung identischer Färbetechnik.

Neuentstehende Proteine enthalten Signale, die ihren endgültigen Bestimmungsort festlegen. Ihre Synthese beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. In Eukaryoten geht die Proteinsynthese im Zytosol weiter, sofern die neuentstehende Kette nicht eine hydrophobe Signalsequenz enthält, die das Ribosom zum ER lenkt. Im Lumen des ER werden die Polypeptidketten dann modifiziert und mit Hilfe von Transfervesiklen zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie weitere Veränderungen erfahren, bevor sie, wieder über Vesikel, an ihren Zielort gelangen (Walter *et al.*, 1984). Ausnahmen sind die Proteine, die sich in den Mitochondrien und den Chloroplasten befinden. Hier erfolgt die Translation frei im Zytosol und der Transport ins Zielorganell findet posttranslational statt.

Die Spezifität dieser Proteinübertragung wird über Signalsequenzen erreicht, die durch die Aminosäuresequenz und dreidimensionale Struktur des Proteins bestimmt werden (Stryer *et al.*, 2002).

Die Mitglieder der GIMAP Familie lassen sich in zwei Subfamilien unterteilen, die entweder eine C-terminale „coiled-coil-Domäne“ oder eine Transmembrandomäne aufweisen. Allen gemeinsam sind die GTP-Bindemotive G1 („p-loop“) - G5, die essentiell für den GTP/GDP Austausch, GTP induzierte Konformationsänderungen des Proteins und GTP Hydrolyse sind.

Während *hgimap7*, *hgimap4*, *mgimap4*, *mgimap6*, *mgimap7* und *mgimap9* eine C-terminale „coiled-coil-Domäne“ aufweisen, besitzen die Mitglieder der zweiten Subfamilie, *mgimap1*, *mgimap3*, *hgimap1*, *hgimap2* und *hgimap5* eine charakteristische Transmembrandomäne am C-terminalen Ende.

Die Proteine mGIMAP4 und mGIMAP9 lassen sich wie oben erwähnt am ER und anderen Membranen lokalisieren, obwohl beide in die Subfamilie mit „coiled coil“ Domäne gehören und somit keine Transmembrandomäne aufweisen. Es muß also andere Motive geben, die dem Protein eine Bindung an die cytosolische Seite der ER-Membran ermöglichen. Dabei existieren verschiedene Möglichkeiten. Zum einen gibt es die Möglichkeit, daß das Protein eine oder mehrere Fettsäureketten (Myristin- oder Palmitinsäure) trägt, die über eine Amidbindung mit einem aminoterminalen Glycin verbunden sind. Ein auf diese Weise modifiziertes Protein wird in die Lage versetzt, mit einem Membranrezeptor oder der Membran selbst in

Wechselwirkung zu treten. Die Bedeutung dieser Modifikation für die Funktion bestimmter Proteine wird am viralen *src* Protein besonders deutlich. Wird durch eine Mutation das Anheften der Myristinsäure blockiert, verliert es seine Onkogenität (Stryer *et al.*, 2002). Zum anderen kann das Protein über Lipidketten, sog. Prenylgruppen (Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppe), die über eine Thioverbindung an C-terminale Cysteingruppen geknüpft werden, in der Membran verankert sein. Viele Proteine, die an der Signalübertragung und der Zellsteuerung von Proteinen beteiligt sind, tragen diese Modifikation. Ein Beispiel stellen die Ras Proteine dar, die zu der Familie kleiner GTPasen gehören (Kirill *et al.*, 2004).

Eine andere Erklärung für die Lokalisation an der ER-Membran können Protein-Protein-Interaktionen mittels elektrostatischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen sein. Hierbei könnte es durch Wechselwirkungen mit membranassoziierten Proteinen zu einer indirekten Bindung des Proteins an die Membran kommen (Stryer *et al.*, 2002).

Im Allgemeinen läßt sich beobachten, daß die meisten GIMAP-Proteine am ER und/oder Golgi-Apparat lokalisiert sind (Krücken *et al.*, 1997, 1999 und 2004; Sandal *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2002). Desweiteren kommen einige an der Plasmamembran vor. Nur mGIMAP3 bildet eine Ausnahme; es ist in der äußeren mitochondrialen Membran vorzufinden. mGIMAP9 ist neben ER, Golgi-Apparat und Plasmamembran ebenfalls an den Mitochondrien lokalisiert. Das murine GIMAP5 ist bisher nicht lokalisiert, sein Ortholog aus der Ratte wurde allerdings ebenfalls an den Mitochondrien gefunden (Pandarpurkar *et al.*, 2003).

Das Ableiten einer Funktion aus der Lokalisation fällt schwer, da die GIMAP Proteine z.T. in mehreren Zellkompartimenten vorzufinden sind. Vermutlich spielen sie aber größtenteils eine Rolle beim Vorgang der Apoptose. Darauf deutet ihre Lokalisation an den Mitochondrien als auch am ER. Das ER gilt als ein wichtiger Startpunkt für die Apoptose, da an ihm mehrere pro- und antiapoptotisch regulierende Proteine vorkommen (Breckenridge *et al.*, 2003). Desweiteren führt bei Zellstress eine Freisetzung von Kalziumionen durch das ER zur Aktivierung von Caspasen (Rizzuto *et al.*, 2003).

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei apoptotischen Vorgängen, da in ihrer äußeren Membran, von proapoptotischen Proteinen der BCL-2-Familie (Breckenridge *et al.*, 2003; Parone *et al.*, 2002), die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum ins Zyotosol kontrolliert wird. Cytochrom c bindet an einen Komplex aus Apaf 1 und Procaspase 9, wodurch letztere aktiviert wird und wiederum die Caspase-Kaskade aktiviert, die zur Apoptose führt (Green and Reed, 1998).

#### **4.5 Die *gimap* Genfamilie und ihre Rolle bei apoptotischen Prozessen**

Wie bereits unter 4.3 beschrieben, deutet die Lokalisation der mGIMAP Proteine am ER und in den Mitochondrien auf ihre Funktion hin. Tatsächlich konnten in den letzten Jahren immer mehr Arbeiten Zusammenhänge zwischen diesen Proteinen und diversen Krankheiten belegen. So konnten beispielsweise zwei Gruppen unabhängig voneinander zeigen, daß eine

Mutation im *rgimap5* Gen zu T-Zell Lymphopenie und letztlich zum Ausbruch von Diabetes in der BB-Ratte führt (MacMurray *et al.*, 2002; Hornum *et al.*, 2002). Im vergangenen Jahr wurde gezeigt, daß der Verlust dieses Gens in T-Zellen eine mitochondriale Dysfunktion verursacht und spontane Apoptose auslöst (Pandarpurkar *et al.*, 2003). Das *mgimap3* Gen ist durch ein Onkogen regulierbar (Dahéron *et al.*, 2001). Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß in verschiedenen humanen lymphoblastischen T-Zell-Leukämien die Expression von *hgimap4* und die des TAL-1 Protoonkogens invers korreliert sind (Cambot *et al.*, 2002) und daß *mgimap1* in hämatopoetischen Zellen durch das Tumorsuppressorgen *p53* induziert wird (Kannan *et al.*, 2001). Desweiteren wird *mgimap1* zu einem Zeitpunkt in der Milz von Malaria-infizierten Tieren induziert, bei dem es zu massiver Apoptose und starker Proliferation von Vorläuferzellen kommt (Krücken *et al.*, 1997 und 1999; Helmbly *et al.*, 1998 und 2000; Wunderlich *et al.*, in press). Ebenfalls eine antiapoptotische Wirkung konnte bei mGIMAP8 nachgewiesen werden (Epe, 2004).

Für das humane *gimap5* Gen konnte gezeigt werden, daß seine Überexpression verschiedene Zellen resistent gegen apoptoseauslösende Stimuli macht, während die Antwort auf zahlreiche andere Apoptose-induktoren unverändert bleibt (Sandal *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird hGIMAP5 hauptsächlich in CD4- und CD8-positiven T-Zellen, sowie in Monozyten exprimiert, aber nicht in normalen B-Zellen. Dagegen konnte eine hGIMAP5 Überexpression in malignen B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß dies in B-Zellen zur Apoptoseinhibierung beiträgt (Zenz *et al.*, 2004). Allerdings konnte eine hGIMAP5 Beteiligung an der Entwicklung von Diabetes Typ I im Menschen ausgeschlossen werden (Payne *et al.*, 2004). Alle sieben humanen *gimap* Gene werden in transformierten Tumorzellen gar nicht oder nur auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert wie unsere Arbeiten zeigen (Stamm *et al.*, 2002; Krücken *et al.*, 2004). Bei akuten myeloiden Leukämien ist häufig eine Region auf Chromosom 7 deletiert, innerhalb der auch das *hgimap* Gencluster liegt (Döhner *et al.*, 1998). Offenbar sind GIMAP GTPasen aber auch an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Eine IL-3 abhängige promyeloide Zelllinie (BaF3), die nach Entzug von IL-3 eine Arretierung des Zellzyklus am G1/S Kontrollpunkt zeigt, kann die gesamte S Phase durchlaufen und stoppt erst am G2/M Kontrollpunkt, wenn sie *hgimap4* überexprimiert (Cambot *et al.*, 2002).

Insgesamt vertiefen die neueren Arbeiten das Bild, welches sich bereits in älteren Arbeiten abzeichnete: GIMAP GTPasen spielen sowohl bei anti- als auch proapoptotischen Prozessen ein Rolle.

#### **4.5.1 Charakterisierung von *hgimap4*, *mgimap4* und *mgimap9* durch Überexpression und RNAi**

Untersuchungen zu *mgimap4*, seinem orthologen *hgimap4* sowie *mgimap9* sollten zeigen, ob sie, ähnlich den schon aufgezeigten Eigenschaften anderer muriner und humaner *gimap* Gene, auch eine mögliche Rolle in apoptotischen Prozessen spielen. Dazu wurde einerseits das bereits in Kapitel 3.5.2.3 beschriebene pCaspase-System benutzt, andererseits auf verschiedene RNAi Systeme (3.5.1 und 3.5.2) zurückgegriffen. Während RNA Interferenz den Vorteil hat, sequenzspezifisch mRNAs zu degradieren und damit die Genfunktion zu unterdrücken (Zamone *et al.*, 2000, Bernstein *et*

*al.*, 2001), bietet das pCaspase-System die Möglichkeit die Caspase-3 Aktivität in Säugerzellen zu detektieren. Caspase-3 spielt eine Schlüsselrolle bei Apoptoseprozessen, da bei ihr die Signale aus intrinsischen und extrinsischen Signalwegen zusammenlaufen.

Durch den Einsatz der RNAi-Technik sollten zumindest *in vitro* die Effekte einer posttranskriptionellen Abschaltung der Gene *mgimap4*, *mgimap9* bzw. *hgimap4* in Bezug auf eine vermutete pro- oder antiapoptotische Wirkung untersucht werden. Es wurden daher Jurkat-Zellen mit den entsprechenden RNAi-Plasmiden transient transfiziert, um durch apoptoseauslösende Stimulation ihr Verhalten zu beobachten.

Je ein Sequenzabschnitt aus dem *mgimap4* bzw. *mgimap9* Gen mit einer Größe von 564 bp bzw. 599 bp wurde in zwei aufeinanderfolgenden entgegengesetzt orientierten Kopien in den pDECAP-Vektor kloniert, in dem durch eine Abtrennung der 5'-Cap-Struktur und eine Inhibierung der 3'-Poly[A]-Schwanz Synthese ein Transport der transkribierten dsRNA in das Zytosol verhindert wird. Dadurch bleibt die Induktion einer zellschädigen Interferon-Antwort aus (Shinagawa & Ishii, 2003). Dieses Konstrukt ermöglicht, wie unter 3.5 ausführlich beschrieben, die Bildung von dsRNA, die dann enzymatisch in 21-23 bp lange Moleküle, sog. siRNAs, zerlegt wird. Diese siRNAs werden dann von einem Multienzymkomplex entwunden, so daß die einzelnen RNA Oligonukleotide an komplementäre Sequenzen transkribierter *mgimap4* bzw. *mgimap9* mRNA hybridisieren können und diese durch enzymatischen Abbau zerstückeln. Die Transkription der *mgimap4* bzw. *mgimap9* dsRNA steht im hier konstruierten pDECAP-Vektor weiterhin unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV Promotors, da der Vektor zunächst für *in vitro* Untersuchungen des *mgimap4* bzw. *mgimap9* Gens in RAW264.7 Makrophagen verwendet werden sollte. Murine Makrophagen waren deshalb besonders von Interesse, weil in Ihnen nach einer *Plasmodium chabaudi* Infektion eine bis zu 50 fach höhere mGIMAP1 Expression in der Milz nachgewiesen werden konnte (Krücken *et al.*, 1997). Bisher stand in gängigen RNAi-Vektorsystemen die Expression von siRNA entweder unter der Kontrolle von RNA-Polymerase III Promotoren oder von CMV Promotoren, die in den meisten Zelltypen aktiv sind. Neuerdings kann durch den Gebrauch zelltyp-spezifischer Promotoren *in vivo* eine gewebespezifische Generalabschaltung erzielt werden. Shinagawa und Ishii (2003) haben dies anhand der Verwendung eines RNA-Polymerase II abhängigen Promotors, der nur in spezifischen Zelltypen aktiviert wird, zeigen können.

Wie sich im Laufe der Versuchsanordnung herausstellte, war die gewählte Methode sehr langwierig und kompliziert, was das Inserieren der Fragmente in den Vektor anging. Dies führte dazu, daß nach Konstruktion des Vektors weitere Experimente nicht mehr durchgeführt werden konnten.

In einer alternativen, wesentlich einfacheren Methode wurde das humane *gimap4* durch RNA Interferenz posttranskriptionell reprimiert. Der pSilencer™ 2.1 U6 hygro Vektor (Ambion Inc., Worcester, USA), der invertierte *hgimap4* cDNA Fragmente enthielt, wurde transient in CHO-K1-Zellen transfiziert und auf die Fähigkeit, eine Genexpression zu unterbinden, erfolgreich getestet. Die in den Vektor inserierten Fragmente kodieren für eine kurze Haarnadel RNA, die vom RNA-Polymerase III Promotor des Vektors transkribiert wird.

Eine Transfektion des Plasmidkonstruktes in menschliche Zellen, wie z.B. Jurkat-T-Zellen, sollte zur Bildung von doppelsträngiger Haarnadel RNA führen und somit zur Abschaltung des Zielgens *hgimap4*. Durch Kotransfektion mit dem pCaspase3-Sensor Vektor (BP Biosciences Clontech, Palo Alto, USA), der für ein modifiziertes fluoreszierende EYFP kodiert, konnte wie unter 3.5.2.3 beschrieben, eine Verlagerung der Fluoreszenz aus dem Zytosol in den Zellkern infolge von apoptoseauslösenden Stimulantien und der damit verbundenden Caspase-3 Aktivierung beobachtet werden. Die Überexpression von *hgimap4* zeigte eindeutig eine antiapoptotische Wirkung. Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur die Beobachtungen in FACS-Analysen von Saïdani (2004), sondern würde auch in das bisher bekannte Bild der *gimap* Gene passen. Das Gen *rgimap5* aus der Diabetes Ratte (Hornum *et al.*, 2002) ist in den Mitochondrien lokalisiert. Es ist dort für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials zuständig, dessen Verlust zu den frühen Ereignissen zählt, die das Auslösen von Apoptose verursachen (Pandarpurkar *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2001). Das rGIMAP5 Protein scheint ebenfalls in einem Signalweg wichtig zu sein, der Apoptoseprozesse verhindert. Durch Caspaseinhibierung konnte in *rgimap5*<sup>-/-</sup> T-Zellen gezeigt werden, daß das Fehlen eines *rgimap5* abhängigen Signals in den Mitochondrien von T-Zellen zur Apoptose führt (Pandarpurkar *et al.*, 2003). Beim Menschen schützt *hgimap5*, das im ER, Golgi (Sandal *et al.*, 2003) und in der äußeren mitochondrialen Membran exprimiert wird (Pandarpurkar *et al.*, 2003; Zenz *et al.*, 2004), die Zellen vor Apoptose durch Okadainsäure und  $\gamma$ -Bestrahlung. Außerdem konnten Cambot *et al.* (2002) zeigen, daß die Genexpression von *hgimap4* während der Aktivierung von B- und T-Zellen reguliert wird. Desweiteren führt *hgimap4* unter IL-3 Mangel anfänglich zu keiner Zellzyklushemmung, was für eine kontrollierende Funktion im Zellzyklus spricht (Cambot *et al.*, 2002). Darüberhinaus wird das GTP bindende Protein mGIMAP4 in postselektionierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> doppelt positive Thymozyten 8-fach hochreguliert (Mick *et al.*, 2004). Damit bestätigen sich auch die Ergebnisse von Poirier *et al.* (1999), die über eine mGIMAP4 Hochregulation während des Selektionsprozesses von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Thymozyten berichten, und so eine Regulation von mGIMAP4 während der Thymozytenentwicklung als Voraussetzung für Ihr Überleben postulieren. Desweiteren ist mGIMAP4, wie unter 4.3 beschrieben, u.a. im ER lokalisiert. Proteine, die am ER vorkommen, konnten in Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen gebracht werden (Breckenridge *et al.*, 2003). Allerdings ist noch unklar, über welchen Regulationsmechanismus das Protein in die Signalwege der Zelle eingreift und sie vor dem Zelltod bewahrt. Möglicherweise kommt es zu einer Interaktion mit BCL-2-Proteinen, die unter anderem ebenfalls am ER lokalisiert sind. Die Funktion von BCL-2 besteht darin, einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und so die Freisetzung von Cytochrom c und apoptoseinduzierenden Faktoren zu verhindern. Dadurch werden die Zellen vor Apoptose geschützt (Krammer, 2000). Vorstellbar wäre auch ein Einfluß des Proteins auf die stressinduzierte Ca<sup>2+</sup> Antwort des ER, die eine entscheidende Rolle in vielen apoptotischen Vorgängen spielt. Dabei kann Ca<sup>2+</sup> entweder direkt die Todesfaktoren aktivieren oder die Mitochondrien für apoptotische Prozesse vorbereiten (Huang & Strasser, 2000). ER Proteine können also als Substrat für Caspasen fungieren (Lassus *et al.*, 2002; Mancini *et al.*, 2000).

## 4.6 Ausblick

Es ist in dieser Arbeit gelungen, die Expression der *mgimap* Gene 3, 4, 5 und 9 in der Milz von C57BL/6 und C57Bl/10 Mäuse in Abhängigkeit von einer Malariainfektion durch *Plasmodium chabaudi* zu untersuchen. Desweiteren konnte für *mgimap4* und *mgimap9* eine gewebespezifische Expression in Balb/c Mäusen nachgewiesen und geklärt werden, daß es sich bei *mgimap3* und *mgimap5* um zwei distinkte Gene und nicht um Spleißvarianten eines Gens handelt. Eine differentielle infektionsabhängige Expression in verschiedenen Geweben bzw. in anderen Mäusestämmen könnte die in dieser Arbeit gefunden Aussagen noch erweitern.

Subzelluläre Lokalisationen sollten u.a. Hinweise auf die Funktion der mGIMAP Proteine 4 und 9 liefern, die im Fall von mGIMAP4 bestätigt werden konnte. Es bleibt zu klären, welche molekularen Interaktionspartner bei der Lokalisation eine Rolle spielen, und auf welchem Wege (intrinsisch oder extrinsisch) die Apoptose verhindert wird. Ebenso könnten Rückschlüsse auf weitere Vertreter der meist am ER lokalisierten *mgimap* Genfamilie gezogen werden. Auch stellt sich die Frage nach der Interaktion zwischen den einzelnen Genen dieser Familie, die über Knockout Versuche zu klären wäre.

Mit Hilfe der RNAi-Technik sollten die Gene *mgimap4* und *mgimap9* funktionell charakterisiert werden. Durch den Gebrauch eines zelltypspezifischen Promotors böte sich in der Maus die Möglichkeit, gewebespezifisch hypomorphe Allele der *mgimap* Gene 4 und 9 *in vivo* zu erzeugen. *In vitro* konnte bereits für einige homologe *mgimap* Gene (*mgimap1* und *mgimap8*) eine wichtige funktionale Bedeutung während der Apoptose beschrieben werden. Die Etablierung stabiler *mgimap4*- und *mgimap9*-Expressionszelllinien, an denen eine Untersuchung apoptotischer Prozesse durch gezielte Genabschaltung mit Hilfe des *mgimap4*- bzw. *mgimap9*-pDECAP-Vektors möglich wird, wäre hilfreich.

## 5.0 Zusammenfassung

Die *gimap* Genfamilie ist in Vertebraten und höheren Pflanzen hoch konserviert und kodiert für GTP-bindende Proteine, die an immunologischen Prozessen beteiligt sind. Sie besteht bei der Maus aus 8 funktionellen Genen und einem Pseudogen und ist auf dem Chromosom 6B lokalisiert. Die menschliche Genfamilie hingegen besteht aus 7 funktionellen Genen und einem Pseudogen und ist auf dem Chromosom 7q32-36 lokalisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die murinen Gene *gimap3*, *4*, *5* und *9* näher charakterisiert. Es zeigte sich, daß die Expression dieser Gene von einer *Plasmodium chabaudi* Infektion unabhängig, aber gewebespezifisch reguliert ist. Während *mgimap4* vermehrt in Thymus, Leber, Herz, Lunge, Haut und Dünndarm exprimiert wurde, konnte *mgimap9* in Milz, Thymus und Dünndarm detektiert werden.

Genomische "Southern Blot"-Analysen stellten zudem ganz klar heraus, daß es sich bei *mgimap3* und *mgimap5* um zwei völlig verschiedene Gene handelt, die allerdings sehr große Ähnlichkeit in ihrer Nukleinsäuresequenz aufweisen. Damit ergeben sich Parallelen zu den Orthologen in Mensch und Ratte, die allerdings zum Teil ohne Funktion oder noch nicht charakterisiert sind.

Durch transiente Transfektion in CHO-K1-Zellen und konfokale Laser-scanning Mikroskopie wurden die Proteine mGIMAP4 und mGIMAP9 subzellulär lokalisiert. Dabei zeigten sie ein teilweise ähnliches Expressionsmuster. Beide wurden am ER, am Golgi-Apparat und der Plasmamembran detektiert, mGIMAP9 im Gegensatz zu mGIMAP4 zusätzlich auch in den Mitochondrien. Für mGIMAP9 konnte ein nukleäres Lokalisationssignal ausgeschlossen werden, für mGIMAP4 außerdem eine mitochondriale und lysosomale Lokalisation.

Die bereits durch mehrere andere Arbeitsgruppen bestätigte Vermutung, daß einige der Gene der *gimap* Familie eine regulatorische Funktion in der Apoptose-Signalkaskade spielen, sollte für die Gene *mgimap4* und *mgimap9* überprüft werden. Zur Klärung dieser Hypothese bot sich die RNAi Technik an, mit der die Gene auf posttranskriptioneller Ebene zunächst *in vitro* in Zelllinien ausgeschaltet werden können. Von besonderem Interesse sind diesbezüglich Makrophagen und B-Zellen, in denen in der Milz ein starke Expression des Prototyps der *gimap* Genfamilie, *mgimap1*, während einer Malariainfektion von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte. Aber auch T-Zellen, in denen viele der anderen *gimap* Vertreter exprimiert werden, sind relevant. Als Alternative zur Klärung dieser regulatorischen Funktion wurden siRNA-Konstrukte in den Vektor pSilencer™2.1 U6 hygro ligiert und transient in CHO-K1-Zellen transfiziert. Western Blot Analysen zeigten deutlich ihre Fähigkeit, die Expression des *hgimap4* Gens zu unterdrücken. Nach Kotransfektion mit einem pCaspase-Sensor Vektor, der ein Signal für das fluoreszierende GFP enthält, konnte in Jurkatzellen mikroskopisch eine antiapoptotische Wirkung von *hgimap4* nachgewiesen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten grundlegende Kenntnisse über die Expression der *gimap* Gene *3*, *4*, *5* und *9* gewonnen werden. Insbesondere für *hgimap4* konnte eine Rolle in apoptotischen Prozessen impliziert werden.

## 6.0 Literatur

- Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* **296**, 1270-1273.
- Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., Bassat, Q., Aide, P., Ofori-Anyinam, O., Navia, M. M., Corachan, S., Ceuppens, M., Dubois, M. C., Demoitie, M. A., Dubovsky, F., Menendez, C., Tornieporth, N., Ballou, W. R., Thompson, R. & Cohen, J. (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **364**, 1411-1420.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215** [3], 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- Alves, H. J., Weidanz, W., & Weiss, L. (1996). The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: Stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**, 370-378.
- Ansah, E. K., Gyapong, J. O., Agyepong, I. A. & Evans, D. B. (2001). Improving adherence to malaria treatment for children: the use of pre-packed chloroquine tablets vs. chloroquine syrup. *Tropical Medicine & International Health* **6**, 496-504.
- Antia, R. & Koella, J. (2004). Theoretical immunology - Parasitic turncoat. *Nature* **429**, 511-513.
- Barry, M. (1992). Medical considerations for international travel with infants and older children. *Infectious Disease Clinics of North America* **6**, 389-404.
- Beier, J. C., Onyango, F. K., Koros, J. K., Ramadhan, M., Ogwang, R., Wirtz, R. A., Koech, D. K. & Roberts, C. R. (1991). Quantitation of malaria sporozoites transmitted *in vitro* during salivation by wild afro-tropical Anopheles. *Medical and Veterinary Entomology* **5**, 71-79.
- Beier, J. C. (1998). Malaria parasite development in mosquitoes. *Annual Review of Entomology* **43**, 519-543.
- Benten, W. P. M., Ulrich, P., Kühn-Velten, W. N., Vohr, H. W. & Wunderlich, F. (1997). Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: Persistence after withdrawal of testosterone. *Journal of Endocrinology* **153**, 275-281.
- Benten, W. P. M., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C. E., Mossmann, H. & Wunderlich, F. (1999). Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *Faseb Journal* **13**, 123-133.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- Borst, P., Bitter, W., McCulloch, R., Vanleeuwen, F. & Rudenko, G. (1995). Antigenic Variation in Malaria. *Cell* **82**, 1-4.
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M. & Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**, 8608-8618.
- Brown, V., Abdir, I. M., Rossi, M., Barboza, P. & Paugam, A. (1998). Epidemic of malaria in north-eastern Kenya. *Lancet* **352**, 1356-1357.
- Bruce-Chawitt, L. J. (1980). Essential Malariology. *William Heinemann Medical Books*, pp.10-30; 97-124. London.
- Bruce-Chawitt, L. J. & Wernsdorfer, W. H (1988). Malaria: principles and practis of malariology. In „History of malaria from prehistory to eradication“, ed. *Churchill Livingstone*, pp. 1-59. Edinburgh.
- Bunnag, T., Sornmani, S., Pinithpongse, S. & Harinasuta, C. (1979). Surveilliance of water-borne parasitic infections and studies on the impact of ecological changes on vector mosquitoes of malaria after dam construction. *Southeast Asian J Trop.Med.Public Health* **10**, 656-660.
- Cambot, M., Aresta, S., Kahn-Perles, B., de Gunzburg, J. & 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.
- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry* **201**, 134-139.
- Clegg, J. B. (1999). Selection and common monogenic disease. In „Nature Encyclopedia of Life Sciences“ *Nature Publishing Group*, London.
- Cohen, S. & Lambert, P. H. (1982). Malaria: immunology of parasitic infection, 2 nd ed. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, GB.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V. & Di Deco, M. A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **73**, 483-497.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 448-455.
- Dahéron, L., Zenz, T., Siracusa, L. D., Brenner, C. & 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.
- Daniel-Ribeiro, C. T. (2000). Is there a role for autoimmunity in immune protection against malaria? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **95**, 199-207.
- Döhner, K., Brown, J., Hehmann, U., Hetzel, C., Stewart, J., Lowther, G., Scholl, C., Frohling, S., Cuneo, A., Tsui, L. C., Lichter, P., Scherer, S. W. & Döhner, H. (1998). Molecular cytogenetic characterization of a critical region in bands 7q35-q36 commonly deleted in malignant myeloid disorders. *Blood* **92**, 4031-4035.
- Dubovski, F. (2001). Creating a vaccine against malaria. *The malaria vaccine PATH*.

- Epe, M. (2004). Funktionale Charakterisierung von murinen *gimap* Genen. Promotionsarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Falkenroth, N. (2001) Molekulare Charakterisierung von *imap*-Genen der Maus. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal.Biochem.* **137**, 266-267.
- Foote, S. J. & Cowman, A. F. (1994). The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial-drugs. *Acta Tropica* **56**, 157-171.
- Garnier, J., Gibrat, J. F. & Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* **266**, 540-553.
- Ghebreyesus, T. A., Haile, M., Witten, K. H., Getachew, A., Yohannes, A. M., Yohannes, M., Teklehaimanot, H. D., Lindsay, S. W. & Byass, P. (1999). Incidence of malaria among children living near dams in northern Ethiopia: community based incidence survey. *British Medical Journal* **319**, 663-666.
- Gish, W. A. & States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetic* **3**, 266-272.
- Gomes, M., Linthicum, K. & Haile, M. (1998). New and Resurgent Infections, pp. 87-100. *Wiley*, Chichester, Ethiopia.
- Good, M. F. & Doolan, D. L. (1999). Immune effector mechanisms in malaria. *Current Opinion in Immunology* **11**, 412-419.
- Green, D. R. & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Greenwood, B. & Mutabingwa, T. (2002). Malaria in 2002. *Nature* **415**, 670-672.
- Grollman, A. P. (1967). Inhibitors of protein biosynthesis II. mode of action of anisomycin. *Journal of Biological Chemistry* **242**, 3226-3233.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) Antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York, Cold Spring Harbor.
- Helmby, H., Kullberg, M., & Troye-Blomberg, M. (1998). Expansion of IL-3-responsive IL-4-producing non-B non-T cells correlates with anemia and IL-3 production in mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *European Journal of Immunology* **28**, 2559-2570.
- Helmby, H., Jonsson, G. & Troye-Blomberg, M. (2000). Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect.Immun.* **68**, 1485-1490.
- Henderson, R. E., Kirkegaard, L.H. & Leonard, N. J. (1973). Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic-acid components, adenosine-containing nucleotides and dinucleoside phosphates. *Biochimica et Biophysica Acta* **294**, 356-364.
- Hornum, L., Romer, J. & Markholst, H. (2002). The diabetes-prone BB rat carries a frameshift mutation in *Ian4*, a positional candidate of *Iddm1*. *Diabetes* **51**, 1972-1979.

- Huang, D. C. S. & Strasser, A. (2000). BH3-only proteins - Essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**, 839-842.
- Kalnay, E. & Cai, M. (2003). Impact of urbanization and land-use change on climate. *Nature* **423**, 528.
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., Getz, G., Domany, E. & Givol, D. (2001). DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* **20**, 2225-2234.
- Kleinig, H., Sitte, P. & Maier, U. (1999). Zellbiologie. *Gustav Fischer Verlag* Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. **4.** Auflage
- Kirill, A., Durek, T., Goody, R. S., Niculae, A., Pylypenko, O., Rak, A., Schlichting, I., Reents, R., Waldmann, H. & Watzke, A. (2004). Strukturelle und mechanistische Aspekte der Regulation des intrazellulären vesikulären Transports. *Max-Planck-Gesellschaft (www.mpg.de)*, Tätigkeitsbericht 2004.
- Kirk-Davidoff, D. B. , Hintsä, E. J., Anderson, J. G. & Keith, D. W. (1999). The effect of climate change on ozone depletion through changes in stratospheric water vapour. *Nature* **402**, 399-401.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the aug initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Kozak, M. (1989). Context effects and inefficient initiation at non-aug codons in eukaryotic cell-free translation systems. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 5073-5080.
- Köster, M. & Hauser, K. (1999). Dynamic redistribution of STAT1 protein in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins. *Eur J Biochem* **260**,137-44.
- Krammer, P. H. (2000). Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* **97** [25], 1752-1759.
- Krengel, U., Schlichting, I., Scherer, A., Schumann, R., Frech, M., John, J., Kabsch, W., Pai, E. F. & Wittinghofer, A. (1990). 3-dimensional structures of H-Ras p21 mutants - molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* **62**, 539-548.
- Krücken, J., Schroetl, R. M. U., Müller, I. U., Saïdani, N., Marinovski, P., Benten, W. P. M., Stamm, O. & Wunderlich, F. (2004). Comparative analysis of the human *gimap* gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene* **341**, 291-304.
- Krücken, J., Schmitt-Wrede, H.-P., Markmann-Mulisch, U. & 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. & Wunderlich, F. (1999). Spleen-specific expression of the malaria-inducible intronless mouse gene *imap38*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 24383-24391.
- Kumar, S. & Miller, L. H. (1990). Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection. *Immunol.Lett.* **25**, 109-114.

- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Lam, E., Kato, N. & Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X. & Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* **297**, 1352-1354.
- Laveran, A. (1880). Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull. Acad. Natl. Med.* **9**, 1235.
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Levine, M. M. & Sztein, M. B. (2004). Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nature Immunology* **5**, 460-464.
- Lihme, A., Schäfer-Nielsen, C., Larsen, K. P., Müller, K. G. & Bog-Hansen, T. C. (1986). Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins. *J Chromatogr.* **376**, 299-305.
- Lindsay, S. W. & Martens, W. J. M. (1998). Malaria in the African highlands: past, present and future. *Bulletin of the World Health Organization* **76**, 33-45.
- Loria, P., Miller, S., Foley, M. & Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochemical Journal* **339**, 363-370.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Löscher, T., Hoelscher, M. & Nothdurft, H. P. (2003). Malaria Therapie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **128**, 1294-1296.
- Löscher, T. (2004). Dschungelfieber. *Die Zeit* Ausgabe **3** (8-1-2004).
- Lucius, R. & Loos-Frank, B. (1997). Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg/Berlin.
- Mackinnon, M. J. & Read, A. F. (2004). Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **359**, 965-986.
- 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. & 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.
- Madden, T. L., Tatusov, R. L. & Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* **266**, 131-141.
- Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A. & Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi

- complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *Journal of Cell Biology* **149**, 603-612.
- Martens, W. J. M. (1998). Health impacts of climate change and ozone depletion: An ecoepidemiologic modeling approach. *Environmental Health Perspectives* **106**, 241-251.
- Mc Manus, J. (2000). Finding A Cure. *Far Eastern Economic* **43** (23-11-2000).
- McDonell, M. W., Simon, M. N., & Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology* **110**, 119-146.
- McKie, J. H., Douglas, K. T., Chan, C., Roser, S. A., Yates, R., Read, M., Hyde, J. E., Dascombe, M. J., Yuthavong, Y. & Sirawaraporn, W. (1998). Rational drug design approach for overcoming drug resistance: application to pyrimethamine resistance in malaria. *Journal of medical chemistry* **41**, 1367-1370
- Medzhitov, R. & Janeway, C. A. (1998). An ancient system of host defense. *Current Opinion in Immunology* **10**, 12-15.
- Mehlhorn, H. (2001). Encyclopedic reference of parasitology. *Springer Verlag*, Berlin, pp. 291-324.
- Mehlhorn, H. & Piekarski, G. (2002). *Grundriss der Parasitenkunde Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart.
- Mehlhorn, H. & Walldorf, V. (1986). Life Cycles. In „Parasitology in Focus“, ed. Mehlhorn, H., *Springer-Verlag*, Berlin.
- Michalkiewicz, M., Michalkiewicz, T., Ettinger, R. A., Rutledge, E. A., Fuller, J. M., Moralejo, D. H., Van Yserloo, B., MacMurray, A. J., Kwitek, A. E., Jacob, H. J., Lander, E. S. and Lernmark, Å. (2004). Transgenic rescue demonstrates involvement of the *Ian5* gene in T cell development in the rat. *Physiological Genomics* **19**, 228-232.
- Mick, V. E., Starr, T. K., McCaughtry, T. M., McNeil, L. K. & Hogquist, K. A. (2004). The Regulated Expression of a Diverse Set of Genes during Thymocyte Positive Selection In Vivo. *J Immunol.* **173**, 5434-5444.
- MMV - Medicines for Malaria Venture (2002): Biology of malaria. Internetpräsentation des Projektes „Medicines for Malaria Venture“ [www.mmv.com](http://www.mmv.com)
- Molyneux, D. H. & Nantulya, V. M. (2004). Linking disease control programmes in rural Africa: a pro-poor strategy to reach Abuja targets and millennium development goals. *British Medical Journal* **328**, 1129-1132.
- Moorthy, V. S., Good, M. F. & Hill, A. V. S. (2004). Malaria vaccine developments. *Lancet* **363**, 150-156.
- Moralejo, D. H., Park, H. A., Speros, S. J., MacMurray, A. J., Kwitek, A. E., Jacob, H. J., Lander, E. S. and Lernmark, Å. (2003). Genetic dissection of lymphopenia from autoimmunity by introgression of mutated *Ian5* gene onto the F344 rat. *Journal of Autoimmunity* **21**, 315-324.

- Morgenstern, B., Frech, K., Dress, A. & Werner, T. (1998). DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment. *Bioinformatics*. **14**, 290-294.
- Morgenstern, B. (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics*. **15**, 211-218.
- Morgenstern, B. (2002). A simple and space-efficient fragment-chaining algorithm for alignment of DNA and protein sequences. *Appl.Math.Lett.* **15**, 11-16.
- Mossmann, H., Benten, W. P. M., Galanos, C., Freudenberg, M., Kühn-Velten, W. N., Reinauer, H. & Wunderlich, F. (1997). Dietary testosterone suppresses protective responsiveness to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Life Sciences* **60**, 839-848.
- Muentener, P., Schlagenhauf, P. & Steffen, R. (1999). Imported malaria (1985-95): trends and perspectives. *Bulletin of the World Health Organization* **77**, 560-566.
- Mühlhardt, C. (1999). Der Experimentator: Molekularbiologie *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart.
- Nosten, F. & Brasseur, P. (2002). Combination therapy for malaria - The way forward? *Drugs* **62**, 1315-1329.
- Osta, M. A., Christophides, G. K. & Kafatos, F. C. (2004). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* **303**, 2030-2032.
- Pandarpurkar, M., Wilson-Fritch, L., Corvera, S., Markholst, H., Hornum, L., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Rossini, A. A. & Bortell, R. (2003). Ian4 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. & Martinou, J. C. (2002). Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* **84**, 105-111.
- Paunel, A. (2002). Charakterisierung von *imap*-Genen aus Maus und Mensch. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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. & Todd, J. A. (2004). Haplotype tag single nucleotide polymorphism analysis of the human orthologues of the rat type 1 diabetes genes Ian4 (*Lyp/Iddm1*) and Cblb. *Diabetes* **53**, 505-509.
- Poirier, G. M. C., Anderson, G., Huvar, A., Wagaman, P. C., Shuttleworth, J., Jenkinson, E., Jackson, M. R., Peterson, P. A. & 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.
- Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R. S. & Nussenzweig, V. (1980). Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp.Med.* **151**, 1504-1513.

- Recker, M., Nee, S., Bull, P. C., Kinyanjui, S., Marsh, K., Newbold, C. & Gupta, S. (2004). Transient cross-reactive immune responses can orchestrate antigenic variation in malaria. *Nature* **429**, 555-558.
- Reuber, T. L. & 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.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhaes, P. J., Di Virgilio, F. & Pozzan, T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* **22**, 8619-8627.
- Robert-Koch-Institut (2000). Malaria. *Epidemiologisches Bulletin* **20**.
- Roberts, D. R., Manguin, S. & Mouchet, J. (2000). DDT house spraying and re-emerging malaria. *Lancet* **356**, 330-332.
- Romeis, B. (1968). Mikroskopische Technik, 5. Auflage. R. Oldenburg Verlag, München, Wien.
- Ropelewski, C. F. & Halpert, M. S. (1986). North-American precipitation and temperature patterns associated with the El Niño southern oscillation (Enso). *Monthly Weather Review* **114**, 2352-2362.
- Sachs, J. & Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680-685.
- Saidani, N. (2004). Molecular characterization of mouse and human IAN genes. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandal, T., Aumo, L., Hedin, L., Gjertsen, B. T. & 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. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **74**, 5463-5467.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990). The P-Loop - A Common Motif in Atp-Binding and Gtp-Binding Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 430-434.
- Saul, A. (2004). The mosquito's innate sting. *Nature Medicine* **10**, 455-457.
- Schmidt, G. W. & Mishkind, M. L. (1986). The transport of proteins into chloroplasts. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 879-912.
- Sela, A., Anfinsen, C. B. & Harrington, W. F. (1957). The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochem. Biophys. Acta* **26**, 502-512.
- Sherman, I. W. (2001). Nature Encyclopedia of Lifescience - *Plasmodium*. Nature Publishing Group, London.

- Shinagawa, T. & Ishii, S. (2003). Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes & Development* **17**, 1340-1345.
- Smith, T. G., Ayi, K., Serghides, L., McCallister, C. D. & Kain, K. C. (2002). Innate Immunity to malaria caused by Plasmodium falciparum. *Clinical Invest. Medicine* **25**, 262-272.
- Stamm, O. (2001) Charakterisierung der homologen Gene *imap38* und *himap1* als Prototypen einer neuen Genfamilie in Mensch und Maus. Promotionsarbeit. Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Stamm, O., Krücken, J., Schmitt-Wrede, H.-P., Benten, W. P. M. & 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.
- Stevenson, M. M. & Riley, E. M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology* **4**, 169-180.
- Stryer, L., Tymoczko, J.L. & Berg, J.M. (2002). Biochemistry. *W.H. Freeman and Company*. New York. **5** nd edition.
- Sutherst, R. W. (1993). Arthropods as disease vectors in a changing environment. *Ciba Found.Symp.* **175**, 124-141.
- Tadei, W. P., Thatcher, B. D., Santos, J. M., Scarpassa, V. M., Rodrigues, I. B. & Rafael, M. S. (1998). Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am.J Trop.Med.Hyg.* **59**, 325-335.
- The worldwatch institute (2003). State of the world 2003.
- Tromans, A. (2004). Malaria - The calcium connection. *Nature* **429**, 253.
- van Loon, A. P., Brandli, A. W. & Schatz, G. (1986). The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. *Cell* **44**, 801-812.
- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.
- Vennerstrom, J. L., Arbe-Barnes, S., Brun, R., Charman, S. A., Chiu, F. C. K., Chollet, J., Dong, Y. X., Dorn, A., Hunziker, D., Matile, H., McIntosh, K., Padmanilayam, M., Tomas, J. S., Scheurer, C., Scorneaux, B., Tang, Y. Q., Urwyler, H., Wittlin, S. & Charman, W. N. (2004). Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* **430**, 900-904.
- Walter, P., Gilmore, R. & Blobel, G. (1984). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* **38**, 5-8.
- Warell, D. A., Molyneux, M. E. & Beales, P. F. (1990). Severe and complicated malaria. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **84**, 1-65.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P. & Raymond, M. (2003). Insecticide resistance in mosquito vectors (vol 423, pg 136, 2003). *Nature* **425**, 366.
- WHO (2002). Roll Back Malaria. Infosheet 2 of 11.
- WHO (2003). Malaria - International Travel and Health 2003.

- Wunderlich, F., Stubig, H. & Konigk, E. (1982). Development of *Plasmodium chabaudi* in mouse red-blood-cells - structural properties of the host and parasite membranes. *Journal of Protozoology* **29**, 60-66.
- Wunderlich, F. & 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. & Helwig, M. (1988). *Plasmodium chabaudi* Malaria: protective immunization with surface membranes of infected erythrocytes. *Infection and Immunity* **56**, 3326-3328.
- Wunderlich, F. & Schmitt, H.-P. (1988). Malaria Vakzine: Erste Versuche am Menschen. *Biologie unserer Zeit* **6**, 189-195.
- Wunderlich, F., Mossmann, H., Helwig, M. & Schillinger, G. (1988). Resistance to *Plasmodium chabaudi* in B-10 mice: influence of the H-2-complex and testosterone. *Infection and Immunity* **56**, 2400-2406.
- Wunderlich, F., Marinovski, P., Benten, W. P. M., Schmitt-Wrede, H.-P. & Mossmann, H. (1991). Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* Malaria. *Parasite Immunology* **13**, 357-367.
- Wunderlich, F., Benten, W. P. M., Bettenhäuser, U., Schmitt-Wrede, H.-P. & Mossmann, H. (1992). Testosterone-unresponsiveness of existing immunity against *Plasmodium chabaudi* Malaria. *Parasite Immunology* **14**, 307-320.
- Wunderlich, F., Dkhil, M. A., Mehnert, L. I., Braun, J. V., El-Khadragy, M., Borsch E., Hermsen, D., Benten, W.P.M., Pfeffer, K., Mossmann, H. & Krücken, J. (in press). Testosteron-responsiveness of spleen and liver in female lymphotoxin  $\beta$  receptor deficient mice resistant to blood stage malaria. *Microbes Infect.*
- Yap, G. S. & Stevenson, M. M. (1994). Inhibition of *in vitro* erythropoiesis by soluble mediators in *Plasmodium chabaudi* as malaria - lack of a major role for interleukin-1, tumor-necrosis-factor- $\alpha$ , and  $\gamma$ -interferon. *Infection and Immunity* **62**, 357-362.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zenz, T., Roessner, A., Thomas, A., Frohling, S., Döhner, H., Calabretta, B. & Dahéron, L. (2004). hlan5: the human ortholog to the rat Ian4/Iddm1/lyp is a new member of the Ian family that is overexpressed in B-cell lymphoid malignancies. *Genes and Immunity* **5**, 109-116.
- Zhang, J. & Madden, T. L. (1997). PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* **7**, 649-656.

## 7.0 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb	Abbildung
AC	"Accession Number"
ad	additiv
A.dest	destilliertes Wasser
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
cDNA	"copy"-DNA
cfu	"colony forming unit"
CHO	"chinese hamster ovary"
CLSM	"confocal laser scanning microscopy"
cm, mm, µm, nm	Zenti-, Milli-, Mikro- und Nanometer
Con A	Concanavalin A
d(A, C, G, T)TP	2'-Desoxyadenosin-, 2'-Desoxycytosin-, 2'-Desoxyguanosin-, 2'-Desoxythymidin-5-Triphosphat
DABCO	1,2-diazobicyclo-(2,2,2)octane
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified EageI Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonucleotid 5'-Triphosphat
DSMZ	"deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen"
ds	doppelsträngig
E.coli	Escherichia coli
ECL	"enhanced chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	"fötales Kälberserum"

g, kg, mg, µg, ng	Gramm, Kilo-, Mikro-, Nanogramm
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
G	Guanidin
GFP	"Green-Fluorescent-Protein"
Glyoxal	Glyoxaethandial
GPI	Glyoxalphosphatidylinositol
h	Stunde
HAM's F12	von Ham 1965 zusammengestelltes Medium
HRP	Meerrettich-Peroxidase
His	Histidin
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
µCi	Mikrocurie (3,7 x 10 <sup>7</sup> Zerfälle pro sec; 1 µCi = 37 kBq)
M, mM, µM	Molarität, Milli- und Mikromolarität
mA	Milliampere
MCS	"multiple cloning site"
MHC	Haupt-Histo-Kompatibilitätskomplex
min	Minuten
mJ	Millijoule
mRNA	"messenger"-RNA
ODnm	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
OligodT	Oligodeoxythymidin
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	"polymerase chain reaction"
p.i.	post infectionem
Poly A+	Polyadenylsäure
Pos.	Position
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschliessender Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden

---

sog.	sogenannt (-e; -er)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE / TBE	Tris-Acetat- / Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur für Nukleinsäure-Hybridisierung
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan
TST	Tris- und Tweenhaltiger Block- und Waschpuffer
U	Einheit der Enzymaktivität
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Volumen
v/v	"volume per volume"
WHO	World Health Organization
w/v	"weight per volume"
z.B.	zum Beispiel

---

## 8.0 Danksagung

Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB 590 Teilprojekt C4.

Herrn Prof. Dr. Wunderlich danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. Greven danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. J.Krücken für seine zahlreichen Hilfestellungen im Labor, die gründliche Durchsicht des Manuskriptes, viele gemeinsame Mittagessen und zahlreiche weniger biologische Gespräche.

Herrn PD Dr. W.P.M. Benten danke ich für den unermüdlichen Einsatz bei allen konfokalen Mikroskopiearbeiten und für "das an einem Strang ziehen" im Kampf mit dem Sauerländer.

Frau A. Grunwald danke ich für alle Arbeiten rund um die Maus und die Durchführung vieler alltäglicher leicht zu übersehender Arbeiten.

Bei Herrn Dr. H.-P. Schmitt-Wrede bedanke ich mich ganz besonders für seine stetige Diskussionsbereitschaft, auch bei fachfremden Themen und die vielen wertvollen Anregungen.

PräPoDo M. Epe danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragen rund um den Computer sowie für viele nette Stunden in und außerhalb des Parasitenschuppens. Letzteres gilt auch für Schnäpplekönigin M. Bartl und ihre mühevollen Arbeit beim Korrekturlesen.

Dank auch an Herrn P. Marinovski für die Einführung in Corel Draw.

Herrn Dr. S. Tschuschke danke ich für die Einweisung ins Labor und die philosophischen Gespräche bei gemeinsamen Frühstückspausen.

Den Dipl. Biol. J. Abel, N. Tillmanns, R. Schroetel, S. Mühlfeld und C. Weiland danke ich für das gemeinsame Lachen, das den oft grauen Laboralltag erhellt und den beiden letztgenannten für gemeinsame Stunden in der Oper.

Besonderer Dank gilt dem Hauskreis "Zietenstraße", den Henkes, Wrobels, Dr. Bartschats, der Ballettruppe Praxis Dr.Haneveld sowie den vielen namentlich hier nicht einzeln aufgeführten guten Freunden der alten Heimat fürs Mittragen der vielen kleinen und großen Sorgen, zum Teil auch über tausende Kilometer hinweg.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name	Verena Wünsche
Geburtsdatum	29.03.1973
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	österreichisch

## Schulbildung

08/1979 – 07/1981	städtische Gemeindegrundschule Nordstrasse, Mülheim an der Ruhr
09/1981 – 06/1991	allgemeinbildender Primar- und Sekundarschulunterricht Heidberg-Insitut, Eupen (B) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium und beruflicher Werdegang

10/1991 – 03/2000	Studium der Biologie an der RWTH-Aachen Abschluss: Diplom-Biologin
05/2000 – 09/2000	Hauptverantwortliche der interaktiven Wanderausstellung „Focus on genes“ im Alten Kurhaus Aachen
11/2000 – 08/2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf
seit 08/2001	Promotion in der Abteilung für Molekulare Parasitologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf