

Die Rolle der IFN- γ induzierten 65 kDa
Guanylat-bindenden Proteine mGBP1 bis mGBP5
als Effektormoleküle bei der Erregerabwehr

Inaugural Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Carolin Konermann

aus Münster

Düsseldorf 2008

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

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

Referent: Prof. Dr. K. Pfeffer

Koreferent: Prof. Dr. J. H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2008

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Komponenten der angeborenen Immunität	2
1.1.1 Rezeptoren für Pathogen-assoziierte molekulare Muster.....	2
1.1.2 Toll-like Rezeptoren	3
1.1.3 MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger Signalweg	5
1.2 Interferone	7
1.2.1 IFN responsive Gene.....	9
1.3 Die Familie der GTPasen.....	11
1.3.1 Die Gruppe der kleinen GTP-bindenden Proteine	13
1.3.2 Dynamine	14
1.3.3 Mx-Proteine.....	15
1.3.4 47 kDa Proteine	16
1.3.5 65 kDa Guanylat-bindende Proteine.....	19
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Bezugsquellennachweis.....	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Antikörper	25
2.1.3 Enzyme	26
2.1.4 Radiochemikalien.....	26
2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	27
2.2 Geräte.....	27
2.3 Medien und Puffer.....	28
2.3.1 Stammlösungen und Puffer	28
2.3.2 Zellkulturmedien	31
2.3.3 Medien für die Bakterienkultur.....	32
2.4 Antibiotika.....	32
2.5 Bakterienstämme und Zelllinien.....	32
2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme.....	32
2.5.2 Zellen	33
2.6 Versuchstiere	34
2.7 Primer	34
2.8 Plasmidvektoren	38
2.8.1 Ausgangsvektoren	38
2.8.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide.....	39

2.9	Tierversuche	40
2.9.1	Superovulation.....	40
2.9.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	40
2.9.3	Generierung chimärer Mäuse	41
2.9.4	Infektion von Mäusen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	41
2.9.5	Gewinnung von Zysten aus dem Gehirn <i>Toxoplasma gondii</i> infizierter Mäuse	41
2.9.6	Infektion von Mäusen mit <i>Toxoplasma gondii</i>	42
2.9.7	Organentnahme.....	42
2.10	Zellbiologische Methoden.....	42
2.10.1	Kultivierung embryonaler Stammzellen und Fibroblasten.....	42
2.10.2	Kultivierung von Zelllinien	43
2.10.3	Kultivierung von BMDM und BMDC.....	43
2.10.4	Aufreinigung von B- und T-Zellen	44
2.10.5	Kalzium-Phosphat Transfektion.....	44
2.10.6	Transfektion mittels FuGENE6 Transfektionsreagenz.....	44
2.10.7	Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation	44
2.10.8	Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien.....	45
2.10.9	Stimulation von Zellen	46
2.10.10	Immunfluoreszenz-Färbung	46
2.10.11	<i>In vitro</i> Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	46
2.10.12	Kultivierung von virulenten und avirulenten Toxoplasmen	47
2.10.13	<i>In vitro</i> Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	47
2.10.14	Bestimmung der Rekrutierungsrate der 65 kDa GTPasen zur parasitophoren Vakuole von <i>Toxoplasma gondii</i>	47
2.10.15	Bestimmung der <i>Toxoplasma gondii</i> Proliferation.....	48
2.10.16	Aufnahme von FluoSpheres® durch 264.7 RAW Makrophagen	48
2.11	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	48
2.11.1	Isolierung von Plasmid-DNS	48
2.11.2	Isolierung von chromosomaler DNS aus 96-well Platten	48
2.11.3	Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen oder Schwanzbiopsien	49
2.11.4	Agarosegelelektrophorese	49
2.11.5	Restriktionsverdau von DNS	50
2.11.6	Dephosphorylierung von DNS	50
2.11.7	Ligation von DNS-Molekülen.....	51
2.11.8	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien	51
2.11.9	Southern Blot Analyse	51
2.11.10	Isolierung gesamtzellulärer RNS	53
2.11.11	cDNS Synthese aus gesamtzellulärer RNS	53
2.11.12	Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR.....	54
2.11.13	Realtime RT-PCR.....	54
2.11.14	Mutagenese-PCR.....	55
2.12	Protein-biochemische Methoden.....	56
2.12.1	Extraktion von Proteinen aus Organen	56
2.12.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.12.3	Western Blot Analyse	56
2.12.4	Immunpräzipitation	57
2.12.5	Durchflußzytometrische Färbung und Analyse	57

2.13	Computerprogramme	59
2.13.1	Klonierungsstrategien	59
2.13.2	Sequenzvergleiche	59
2.13.3	Alignment	59
2.13.4	Statistische Auswertung	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1	Expressionsanalysen der 65 kDa GTPasen mGBP1 bis mGBP5	60
3.1.1	Expression von mGBP1 bis mGBP5 in Zelllinien	60
3.1.1.1	Spleißvarianten von mGBP4	61
3.1.2	Expression der mGBPs nach Stimulation mit Zytokinen und TLR-Agonisten	64
3.1.3	Expression der 65 kDa GTPasen in primären Zellen	66
3.1.4	Expression der 65 kDa GTPasen in B- und T-Zellen	67
3.1.4.1	Expression von mGBP1	70
3.1.5	Halbwertszeit der mGBPs	71
3.1.6	Signalkaskade zur Induktion der 65 kDa GTPasen	72
3.1.7	Subzelluläre Lokalisation der GBPs mGBP1 bis mGBP5	75
3.1.8	Kolokalisation der GBPs mGBP1 bis mGBP5	79
3.1.8.1	Ko-Immunpräzipitation der GBPs mGBP1, 2, 3 und 5	81
3.2	Rolle der 65 kDa GTPasen in der Infektionsabwehr	83
3.2.1	mGBP2 Expression in MCMV infizierten Zellen	83
3.2.2	mGBP Expression in Mäusen nach <i>L. monocytogenes</i> Infektion	84
3.2.3	Subzelluläre Lokalisation der mGBPs nach Listerieninfektion	87
3.2.4	mGBP Expression in Mäusen nach <i>T. gondii</i> Infektion	88
3.2.5	Kolokalisation der 65 kDa GTPasen mit <i>T. gondii</i>	90
3.2.5.1	Lokalisation der mGBPs nach Infektion mit virulenten Toxoplasmen	92
3.2.5.2	Zelluläre Lokalisation von mGBP2 Mutanten nach Infektion mit avirulenten Toxoplasmen	95
3.2.5.3	Wachstumshemmung der Toxoplasmen durch die mGBPs	100
3.3	Generierung einer mGBP2 defizienten Mauslinie	103
3.3.1	„Targetingstrategie“ zur Deletion von mGBP2	103
3.3.2	Charakterisierung der mGBP2 defizienten Mauslinie	105
3.3.2.1	Infektion mGBP2 defizienter Zellen mit Vaccinia Virus	108
3.3.2.2	Infektion mGBP2 defizienter Zellen mit <i>T. gondii</i>	109
3.3.2.3	Infektion mGBP2 defizienter Mäuse mit <i>T. gondii</i>	111
4	DISKUSSION	116
4.1	Expressionsanalysen der 65 kDa GTPasen mGBP1 bis mGBP5	116
4.1.1	Subzelluläre Lokalisation der GBPs mGBP1 bis mGBP5	121
4.2	Rolle der 65 kDa GTPasen in der Infektionsabwehr	124
4.3	Ausblick	133
5	ZUSAMMENFASSUNG	135
6	LITERATURVERZEICHNIS	137
	Danksagung	148

Anhang: Alignment der Proteinsequenzen von mGBP1 bis mGBP5	149
---	------------

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Toll-like Rezeptor Signalkaskaden.....	6
Abb. 1.2: Interferon Rezeptoren und die Aktivierung des klassischen JAK-STAT Signalweges durch Typ I und II Interferone.....	8
Abb. 1.3: Der GTPase Zyklus.	12
Abb. 1.4: Dendrogramm der kleinen G Protein Superfamilie.	13
Abb. 1.5: Domänenstruktur der humanen Dynamin Superfamilie.	14
Abb. 1.6: Die GKS und GMS Subfamilie der p47 GTPasen.....	16
Abb. 1.7: Induktion der p47 GTPasen via mikrobielle „.....	17
Abb. 1.8: Phylogenetischer Baum der 65 kDa mGBPs.....	20
Abb. 3.1: Expression von mGBP1 bis mGBP5 Proteinen in IFN- γ stimulierten 264.7 RAW Makrophagen.	60
Abb. 3.2: Schematische Darstellung der mGBP4 Spleißvarianten.	62
Abb. 3.3: Expression der mGBP4 Spleißvarianten.	63
Abb. 3.4: Expression von mGBP4 und mGBP4.1.	64
Abb. 3.5: Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in Makrophagen nach Stimulation mit Zytokinen und TLR-Agonisten.	65
Abb. 3.6: Expression von mGBP2 in primären Zellen nach IFN- γ Stimulation.	66
Abb. 3.7: Expression von mGBP2 in primären Zellen nach verschiedenen Stimuli.	67
Abb. 3.8: Expression von mGBP2 in CD90 ⁺ und CD90 ⁻ Zellen.	68
Abb. 3.9: Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in B220 ⁺ und B220 ⁻ Zellen.	69
Abb. 3.10: Expression von mGBP1 in BMDM und BMDC aus C57BL/6 Mäusen.	70
Abb. 3.11: Stabilität von mGBP2 Protein im CHX-Versuch.	72
Abb. 3.12: Stimulation von mGBP2 in IFN- γ Rezeptor defizienten Zellen.....	73
Abb. 3.13: mGBP Expression nach IFN Stimulation in STAT1 ^{-/-} und IRF-1 ^{-/-} Fibroblasten.	74
Abb. 3.14: Subzelluläre Lokalisation von mGBP2.....	75
Abb. 3.15: Kotransfektion von mGBP2 mit Markerkonstrukten.	77
Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation von mGBP1 bis mGBP5.	78
Abb. 3.17: Kolokalisation der einzelnen 65 kDa GTPasen miteinander.	80
Abb. 3.18: Ko-Immunpräzipitation der GBPs mGBP1, 2, 3 und 5.	81
Abb. 3.19: Expression von mGBP2 nach Infektion mit MCMV.....	84
Abb. 3.20: Expression der mGBPs nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	85
Abb. 3.21: Lokalisation der mGBPs nach Listerieninfektion.....	87
Abb. 3.22: Expression der mGBPs nach Infektion mit <i>T. gondii</i>	89

Abb. 3.23: Lokalisation der mGBPs nach <i>T. gondii</i> Infektion.	91
Abb. 3.24: Lokalisation von GFP-mGBP2 und Fluospheres in Makrophagen.....	92
Abb. 3.25: Lokalisation der 65 kDa GTPasen nach Infektion mit virulenten Toxoplasmen.	94
Abb. 3.26: Vergleich der 65 kDa GTPasen Rekrutierung zu virulenten (BK) und avirulenten (ME49) Toxoplasmen.	95
Abb. 3.27: Lokalisation der GFP-mGBP2 GTPase Mutanten mit und ohne Toxoplasmeninfektion.	97
Abb. 3.28: Schematische Darstellung der mGBP2 und 5 Hybridkonstrukte.	98
Abb. 3.29: Lokalisation der GFP-mGBP2-5 und GFP-mGBP5-2 Hybride in NIH 3T3 Zellen nach Toxoplasmeninfektion.	99
Abb. 3.30: Lokalisation der GFP-mGBP2-Iso-5 Mutante in NIH 3T3 Zellen nach Toxoplasmeninfektion.	100
Abb. 3.31: Toxoplasmenproliferation in GFP und GFP-mGBP2 264.7 RAW Makrophagen.	101
Abb. 3.32: Toxoplasmenproliferation in GFP und GFP-mGBP5 264.7 RAW Makrophagen.	102
Abb. 3.33: Schematische Darstellung der Rekombinationsstrategie des mGBP2 Lokus.	104
Abb. 3.34: Southern Blot Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination im mGBP2 Lokus.	105
Abb. 3.35: Western Blot Analyse mGBP2 defizienter Zellen.....	106
Abb. 3.36: Southern Blot Analyse zum Nachweis der Deletion der Neomycin Kasette.....	107
Abb. 3.37: Durchflußzytometrische Analyse zum Nachweis der DsRed Expression in mGBP2 ^{-/-} Mäusen.	108
Abb. 3.38: Western Blot Analyse zum Nachweis der DsRed Expression in den mGBP2 ^{-/-} Mäusen.	108
Abb. 3.39: Vaccinia Virus Wachstumskurve in mGBP2 ^{+/+} und mGBP2 ^{-/-} mEFs.....	109
Abb. 3.40: Toxoplasmenproliferation in Wildtyp mEFs und mGBP2 defizienten mEFs.....	110
Abb. 3.41: Toxoplasmenproliferation in Wildtyp BMDM und mGBP2 defizienten BMDM.	111
Abb. 3.42: Überlebensrate der Wildtyp und mGBP2 defizienten Mäuse nach Toxoplasmeninfektion.	112
Abb. 3.43: Anzahl der Zysten im Gehirn der Wildtyp und mGBP2 defizienten Mäuse nach Toxoplasmeninfektion.	113
Abb. 3.44: mGBP Expression in mGBP2 ^{-/-} und mGBP2 ^{+/+} Mäusen nach Toxoplasmeninfektion. ..	114
Abb. 3.45: Lokalisation von mGBP1 und mGBP2/1 in mGBP2 defizienten Fibroblasten nach Toxoplasmeninfektion.	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Beispiele von PRRs und den PAMPs, die zur Rezeptoraktivierung führen.	2
Tabelle 1.2: Toll-like Rezeptoren und bekannte Aktivatoren.	4
Tabelle 1.3: Funktion der Mx-Proteine.	16
Tabelle 1.4: Suszeptibilität von IRG defizienten Mäusen und Zellen gegenüber intrazellulären Pathogenen.	18
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	31
Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums.	32
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.	32
Tabelle 2.4: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme.	33
Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien.....	33
Tabelle 2.6: Oligonukleotide zur Klonierung von DsRed Fusionskonstrukten.	34
Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Klonierung von pWPXL-GFP Fusionskonstrukten.....	35
Tabelle 2.8: Oligonukleotide zur Klonierung von pGAD und pGBD Fusionskonstrukten.....	36
Tabelle 2.9: Mutageneseprimer für Klonierung in pEGFP-C2 und pWPXL-GFP Vektoren.	36
Tabelle 2.10: Oligonukleotide zur Klonierung des mGBP2 Rekombinationsvektors, sowie die Sonden zur Detektion positiver Klone.	37
Tabelle 2.11: Sequenzen von Oligonukleotiden und Sonden für Realtime RT-PCR Versuche.....	37
Tabelle 2.12: Verwendete Ausgangsvektoren.....	38
Tabelle 2.13: Hergestellte Plasmide.	40
Tabelle 2.14: Durchgeführte durchflußzytometrische Immunfluoreszenzfärbungen.	58
Tabelle 3.1: Kolokalisation und Interaktion der 65 kDa GTPasen.	82
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Induzierbarkeit der GTPasen in Zelllinien und Primärzellen nach verschiedenen Stimulie.	120

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BAC	bacterial artificial chromosome
BES	(N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure)
BMDC	aus Knochenmarkszellen gereifte dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cells)
BMDM	aus Knochenmarkszellen gereifte Makrophagen (bone marrow derived macrophage cells)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNS	DNS-Kopie der mRNS (komplementäre DNS)
CFU	colony forming units
CHX	Cycloheximid
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF Zellen	embryonale Fibroblasten
EP	Elektroporation
ES Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	interferon regulatory factor
IRG	immunity-related GTPase
Kb	Kilobasenpaar(e)
ko	knock-out
kDa	Kilodalton
LIF	leukemia inhibitory factor
<i>L. m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar
min	Minute(n)
MCS	multiple cloning site
mRNS	Boten-RNS (messenger RNS)
MZB	Marginalzonen B-Zellen (marginal zone B cells)
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAMP	pathogen associated molecular pattern

p.i.	nach Infektion (post infection)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
Poly (I:C)	Polyinosin-polycytidin-Säure
PRR	pattern recognition receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription und PCR
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat Lösung
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
ü/N	über Nacht
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western Blot
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Das Immunsystem der Wirbeltiere besteht aus zellulären und humoralen Bestandteilen, welche den Organismus permanent vor Infektionen durch Pathogene schützen. Im Laufe der Evolution haben sich im Wesentlichen zwei Prinzipien der Pathogenabwehr entwickelt, die in das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem unterteilt werden. Die angeborene Immunität wird direkt durch Krankheitserreger aktiviert und dient als primäre schnelle Verteidigung gegen Pathogene. Eine erste Barriere des angeborenen Immunsystems gegen eindringende Keime sind die Epithelien, die einerseits einen mechanischen Schutzmechanismus darstellen und andererseits durch Oberflächenmoleküle und/oder sezernierte Proteine (Defensine) aktiv anti-mikrobielle Effektormechanismen zur Verfügung stellen. Weiterhin spielt das Komplementsystem, bestehend aus einer Anzahl löslicher Proteine, eine wichtige Rolle sowohl zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen zum Pathogen (Chemoattraktion), als auch zur direkten Lyse von Bakterien, Viren und Eukaryoten (Abbas, 2007). Die entscheidende Funktion des angeborenen Immunsystems wird jedoch über dessen zelluläre Bestandteile, bestehend aus Phagozyten, Natürlichen Killerzellen (NK) und weiteren inflammatorischen Zellen vermittelt, die bereits vor Aufbau einer adaptiven Immunabwehr potente anti-mikrobielle Effektormechanismen zur Verfügung stellen und somit entscheidend zur Eliminierung der Pathogene beitragen oder zumindest zu einer Verzögerung der Infektionsausbreitung beisteuern bis die adaptive Immunantwort eingeleitet wird. Das Zusammenspiel dieser zellulären Komponenten wird durch Zytokine und Chemokine gesteuert. Phagozyten bilden außerdem die Schnittstelle zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität, indem sie als Effektorzellen in der adaptiven Immunantwort dienen. Die adaptive Immunität besitzt durch B- und T-Zellen die Fähigkeit einer zellulären und humoralen Antwort und ist in der Lage, Erreger spezifisch zu erkennen und zu eliminieren. Anders als die angeborene Immunität ist die adaptive Immunantwort eine Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten auf ein Antigen. Durch Reifung und Expansion von Pathogenspezifischen B- und T-Zellen wird eine Immunantwort aufgebaut, die auf den Erreger abgestimmt ist und somit maximale Effektivität bei der Eliminierung des Pathogens darstellt. Zusätzlich wird als Folge einer Erkrankung oder Impfung ein so genanntes immunologisches Gedächtnis mit einer lang andauernden Immunität ausgebildet (Abbas, 2007).

Entscheidend für die Aktivierung der Immunabwehr ist jedoch zunächst der Primärkontakt des Immunsystems mit einem Erreger, der über Komponenten des angeborenen Immunsystems vermittelt wird. Durch das aktivierte angeborene Immunsystem wird das Pathogen entweder direkt eliminiert oder aber die Ausbreitung so lange verzögert, bis eine potente adaptive Immunität aufgebaut wurde. Daher ist für den Aufbau einer adäquaten Immunantwort das Verständnis des angeborenen Immunsystems von besonderer Bedeutung, da dies den ersten Schritt zur Eliminierung des Pathogens darstellt.

1.1 Komponenten der angeborenen Immunität

1.1.1 Rezeptoren für Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Mit dem angeborenen Immunsystem beginnt der erste Schritt in der Abwehrkaskade von Infektionen. Die Mechanismen dieses Systems bestehen bereits vor dem Kontakt mit Pathogenen und werden durch Erreger noch vor der adaptiven Immunantwort aktiviert. Eindringende Erreger stimulieren das Immunsystem durch so genannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns), die „pattern recognition“ Rezeptoren (PRR) aktivieren. Als PAMPs fungieren Komponenten, die für die Pathogene spezifisch sind und nicht von Säugerzellen selbst gebildet werden können. Dazu gehören unter anderem doppelsträngige RNS Moleküle, die von replizierenden Viren gebildet werden, unmethylierte DNS Moleküle von Bakterien, Lipopolysaccharide (LPS) in gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäuren (LTA) und Muramyl-Dipeptid (MDP) in gram-positiven Bakterien, Zymogene in Pilzen und mannosereiche Oligosaccharide in mikrobiellen Glykoproteinen. Häufig erkennt das Immunsystem mikrobielle Produkte, die für das Überleben der Pathogene essentiell sind. Damit wird gewährleistet, dass besonders konservierte Bereiche der Pathogene identifiziert werden, die nicht ständigen Mutationen unterliegen und somit vom Immunsystem nicht mehr identifiziert werden könnten. PRRs kommen auf Zelloberflächen vor, in intrazellulären Kompartimenten oder werden in den Blutkreislauf und in Gewebeflüssigkeiten sekretiert (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997).

Zellassoziierte PRRs	Lokalisation	Beispiel mit PAMP Liganden
Toll-like Rezeptoren (TLR)	Plasmamembran und endosomale Membran von DCs, Phagozyten, Endothelzellen und weitere Zellen	TLR1-11: mikrobielle und virale Moleküle
C-Typ Lektine	Plasmamembran von Phagozyten	Mannoserezeptor: mikrobielle Oberflächen-Carbohydrate mit terminaler Mannose und Fruktose
		Dectinrezeptor: Glukane in der Pilzzellwand
Scavenger Rezeptor	Plasmamembran von Phagozyten	CD36: mikrobielle Diacylglyceride
Nod-like Rezeptoren (NLR)	Zytoplasma von Phagozyten und anderen Zellen	NOD1, NOD2 und NALP3: bakterielle Peptidoglykane
N-formyl Met-Leu-Phe Rezeptoren	Plasmamembran von Phagozyten	FPR und FPRL1: Peptide, die N-formylmethionyl Reste enthalten
Lösliche PRRs	Lokalisation	Beispiel mit PAMP Liganden
Pentraxine	Plasma	C-reaktives Protein (CRP): mikrobielle Phosphorylcholine und Phosphatidylethanolamine
Kollektine	Plasma	Mannanbindendes Protein (MBL): Carbohydrate mit terminaler Mannose und Fruktose
	Alveolen	Surfactant Proteine SP-A und SP-D: verschiedene mikrobielle Strukturen
Fikoline	Plasma	Fikolin: N-Acetylglukosamine und Lipoteichonsäure aus der Zellwand gram-positiver Bakterien

Tabelle 1.1: Beispiele von PRRs und den PAMPs, die zur Rezeptoraktivierung führen. Überarbeitet nach Abbas, 2007.

Zu den löslichen Pathogenrezeptoren gehören die Pentraxine, Kollektine und Fikoline (siehe Tab. 1.1). Wichtige Rezeptoren der Pentraxinfamilie sind das C-reaktive Protein (CRP) und das Serum Amyloid Protein (SAP). Sie wirken opsonisierend durch Bindung von Phosphorylcholin auf bakteriellen Oberflächen. Weiterhin können Mitglieder dieser löslichen PRRs das klassische und das lektinabhängige Komplementsystem aktivieren (Fraser et al., 1998; Agrawal et al., 2001).

Eine weitere wichtige Klasse von PRRs stellen die intrazellulären PRRs, wie zum Beispiel die NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) Proteine, dar. Diese bestehen aus einer aminoterminalen CARD (caspase recruitment domain) Domäne, einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) und einer carboxyterminalen LRR (leucin-rich repeat) Region. Die CARD Domäne von NOD1 und NOD2 assoziiert mit einer Proteinkinase, RIP2, welche wiederum NF- κ B und MAP-Kinase Signalwege aktiviert (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999; Ogura et al., 2001). Die meisten PRRs, welche auf Zelloberflächen exprimiert werden, befinden sich auf phagozytierenden Zellen, insbesondere auf Makrophagen. Durch Erkennung konservierter Moleküle, vorwiegend auf den Oberflächen von Pathogenen, führen diese Rezeptoren zur Phagozytose des Mikroorganismus und sind somit entscheidend beim Aufbau einer effektiven Immunantwort beteiligt. Wichtige Oberflächen PRRs sind die C-Typ Lektine, die Scavenger Rezeptoren (SR), die NOD-like Rezeptoren (NLR), die N-formyl Met-Leu-Phe Rezeptoren und die Toll-like Rezeptoren (TLR), wobei einzelne TLR-Familienmitglieder jedoch auch intrazellulär vorkommen können und dort ebenfalls an der Erkennung viraler oder bakterieller Nukleinsäuren beteiligt sind.

1.1.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren bilden eine Familie von Proteinen bestehend aus mindestens 11 humanen Membranproteinen, die die angeborene Immunantwort durch einen NF- κ B- und „Interferon regulatory factor“- (IRF) abhängigen Signalweg steuern. TLRs sind evolutionär konservierte Moleküle, die ursprünglich in Vertebraten aufgrund ihrer Homologie zu Toll, einem Protein das die Produktion anti-mikrobieller Proteine in *Drosophila melanogaster* stimuliert, identifiziert wurden. Toll spielt in *D. melanogaster* eine entscheidende Rolle in der Resistenz gegen Infektionen mit Pilzen und gram-positiven Bakterien, wie in Toll-Signalweg mutierten *D. melanogaster* gezeigt wurde (Imler und Hoffmann, 2000). Die Mitglieder der TLR-Familie sind PRRs, die Lipoproteine, Carbohydrate, Peptide und Nukleinsäurestrukturen von verschiedensten Mikroorganismen erkennen. Die bisher identifizierten Liganden für die verschiedenen TLRs sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst. TLRs setzen sich aus einer Ektodomäne, die Leucin-reiche Wiederholungen enthält (LLRs) und einer zytoplasmatischen Toll/Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor (TIR) Domäne zusammen. Die LRRs sind für die Ligandenbindung essentiell. Bemerkenswert dabei ist, dass trotz hoher Sequenzkonservierung der verschiedenen LRR Domänen, unterschiedliche TLRs in der Lage sind, eine Vielfalt nicht verwandter PAMPs zu detektieren

(Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Akira und Takeda, 2004). Die intrazytoplasmatische TIR Domäne ist für die Interaktion mit anderen TIR Domänen enthaltenen Proteinen zuständig und somit für die Signalweiterleitung notwendig.

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	Triacyl Lipopeptide lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modul Glykoinositolphospholipide Glykolipide Porine atypische Lipopolysaccharide atypische Lipopolysaccharide Zymosan Heat-shock Protein 70 virale Proteine	diverse Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze Wirt mCMV, HSV, HCV, VMV
TLR3	doppelsträngige RNS	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Hüllenproteine Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Typ III Repeat Extra Domäne Oligosaccharide von Hyaluronsäure Polysaccharid Fragmente von Heparansulfat Fibrinogen Phosphatidylinositol Mannoside	Gram-negative Bakterien Pflanzen Viren <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Mykobakterien
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyl Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive Bakterien Pilze
TLR 7	Imidazolquinolin Loxoribin Bropirimin einzelsträngige RNS	synthetische Verbindungen synthetische Verbindungen synthetische Verbindungen Viren
TLR8	Imidazolquinolin einzelsträngige RNS	synthetische Verbindungen Viren
TLR9	CpG-DNS, Hämozoin	Viren, Mykobakterien, Plasmodien, <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>T. cruzi</i>
TLR10	N.D.	-
TLR11	Profilin	Uropathogene Bakterien <i>Toxoplasma gondii</i>

Tabelle 1.2: Toll-like Rezeptoren und bekannte Aktivatoren. N.D.: nicht determiniert. Überarbeitet nach Akira und Takeda, 2004, Coban et al., 2005, Trinchiri und Sher, 2007.

Zur Weiterleitung eines Signals bilden die TLRs Homo- oder Heterodimere. So ist zur Erkennung von Peptidoglykan ein Dimer aus TLR2 und TLR6 notwendig. TLR2 erkennt eine Vielzahl bakterieller Bestandteile wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren gram-positiver Bakterien, Zymosan von Pilzen und einige virale Proteine von VMV (Visna-Maedi Virus) und HCV (Hepatitis-C Virus). Dabei wurde beobachtet, dass TLR2 zur Ausbildung eines potenten Signals koordiniert mit anderen TLRs insbesondere TLR1 und TLR6 interagiert (Ozinsky et al., 2000; Takeda et al., 2003). Ein Signalweg über TLR4 ist nur möglich, wenn der Ligand LPS zunächst an

das lösliche Protein LBP (LPS-binding protein) bindet, welches wiederum die Bindung von LPS an CD14 vermittelt. Der Komplex aus LPS, CD14 und MD2 interagiert mit TLR4. Eine Mutation in der TIR Domäne (C3H/HeJ) führt zu einem Defekt in der Antwort auf LPS, da die Kontaktstelle zwischen TLR4 zu anderen TLRs zerstört ist (Poltorak et al., 1998). Für TLR5 konnte gezeigt werden, dass es mit Flagellin interagiert, einem Hauptbestandteil der Flagellen von Bakterien (Hayashi et al., 2001). Anders als TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 und 11 werden TLR3, 7, 8 und 9 hauptsächlich intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder in endosomalen Membranen exprimiert, wo sie mikrobielle Nukleinsäuren detektieren (Trinchieri und Sher, 2007). TLR3 bindet virale doppelsträngige RNS (Alexopoulou et al., 2001), TLR7 und 8 einzelsträngige RNS (Heil et al., 2004) und TLR9 CpG-enthaltende DNS von Viren und Bakterien (Hemmi et al., 2000). Der Ligand für TLR10 ist bisher unbekannt, doch konnte Yarovinsky et al. 2005 einen Liganden für TLR11 identifizieren. Dabei handelt es sich um ein profilinähnliches Molekül des Parasiten *Toxoplasma gondii*, das eine starke, MyD88 (myeloid differentiation factor 88)-abhängige Interleukin-12 (IL-12) Antwort in murinen DCs generiert (Yarovinsky et al., 2005).

1.1.3 MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger Signalweg

Die Ligandenbindung führt zur Dimerisierung von TLRs wodurch die Bindung von zytoplasmatischen Adapterproteinen an die TLRs erfolgt. Die Interaktion der Proteine wird über die jeweils enthaltene TIR-Domäne der TLRs und des Adapterproteins vermittelt. Bisher konnten vier Adapterproteine identifiziert werden, die in der Signalweiterleitung beteiligt sind: MyD88, MAL (MyD88 adapter-like)/TIRAP (TIR domain-containing adapter protein), TRIF (TIR domain-containing adapter inducing interferon- β) und TRAM (TRIF-related adapter molecule). TLRs rekrutieren verschiedene Kombinationen von Adaptern, wodurch die Antwort der einzelnen TLRs auf unterschiedliche Pathogene gesteuert wird. Nach Adaptermolekülbindung kommt es zur Assemblierung eines Komplexes, der Proteinkinasen, meist der IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) Familie und Adaptoren der TRAF (TNF receptor-associated factor) Familie enthält. Letztendlich führt die Signalweiterleitung zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher für die Expression vieler Gene der angeborenen Immunantwort notwendig ist (Abb. 1.1). Alle TLRs außer TLR3 binden MyD88, welches wiederum mit IRAK interagiert. IRAK aktiviert daraufhin TRAF-6, das TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) induziert und somit die MAP (mitogen activated protein) Kinase und die I κ B (inhibitor of NF- κ B) Kinase (IKK) Kaskade initiiert. I κ B wird degradiert und NF- κ B wird freigesetzt. Die MAP Kinase und die IKK Kaskade Aktivierung hat die Translokation von AP-1 und NF- κ B in den Zellkern zur Folge, die dort als Transkriptionsfaktoren wirken können. Neben dem MyD88-abhängigen Weg existiert ein MyD88-unabhängiger Signalweg, der über TLR3 und 4 vermittelt wird. TLR4, welches bakterielles LPS bindet, kann über MyD88, aber auch über MAL/TIRAP Bindung NF- κ B über IRAK, TRAF-6 und TAK1 aktivieren, oder alternativ, TRAM und TRIF rekrutieren, was über

TBK1 zur Aktivierung von IRF-3 (interferon response factor-3) führt. Bei IRF-3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Typ I IFN induziert. Somit kann TLR4 Aktivierung zu einer breiten Expression von inflammatorischen und auch anti-mikrobiellen Genen führen. TLR3 resultiert ebenfalls in der Induktion von IRF-3, wohingegen TLR9 sowohl NF- κ B als auch IRF-7 aktiviert. Durch die TLR3 Signalkaskade werden demnach auch IFN- α und IFN- β responsive Gene induziert.

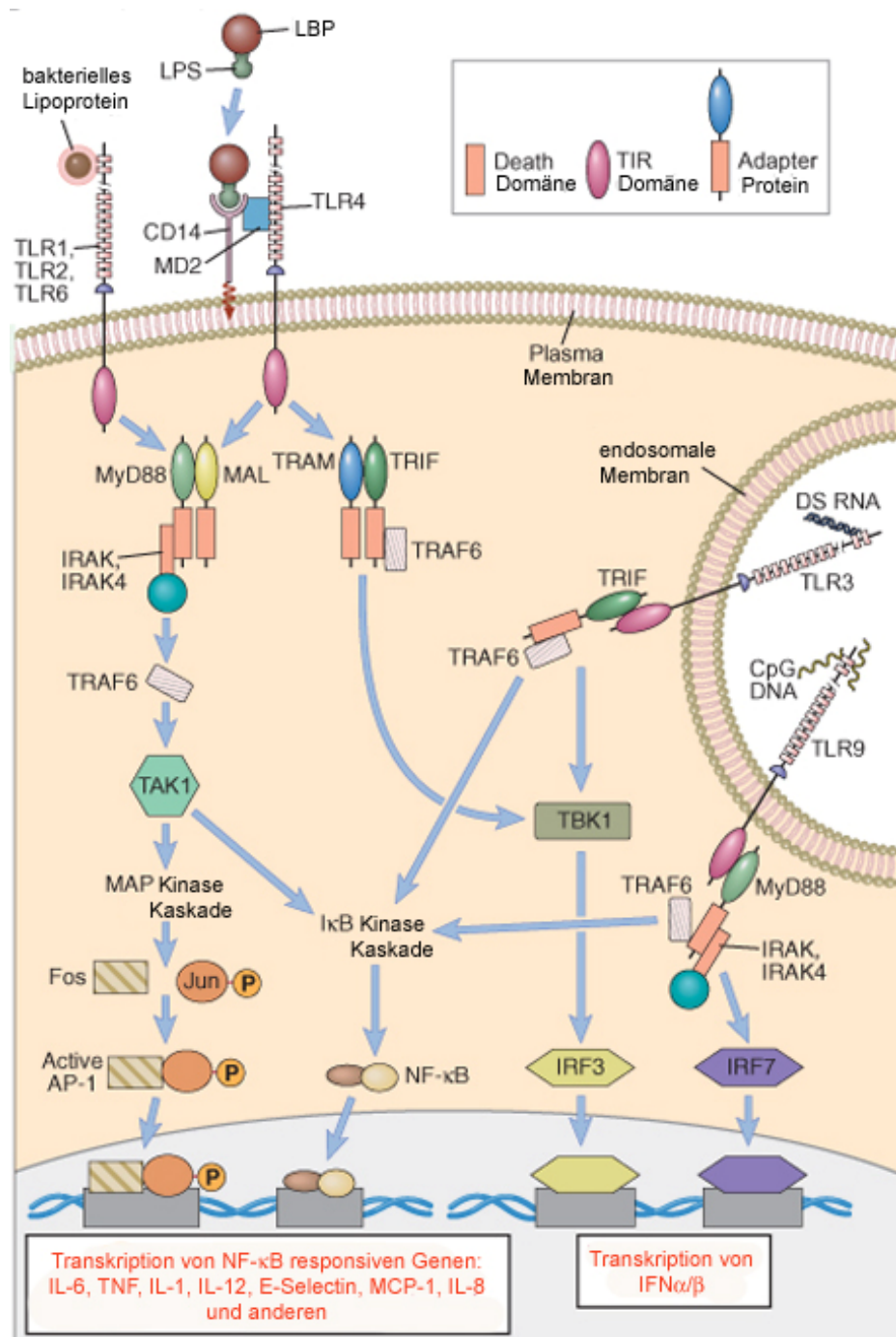


Abb. 1.1: Toll-like Rezeptor Signalkaskaden. Nach Abbas, 2007.

Wie oben beschrieben führt die Erkennung pathogener Strukturen durch die TLRs unter anderem zur Produktion von Typ I Interferonen (IFN). Da die Induktion von IFN eine der wichtigsten Abwehrmechanismen in der angeborenen Immunantwort darstellt, wird hierauf im Folgenden genauer eingegangen.

1.2 Interferone

Interferone sind Zytokine, die anti-mikrobielle, anti-proliferative und immunmodulatorische Effekte ausüben können. Die Familie der IFN wird in die drei Typen I, II und III geteilt. Typ I Interferone werden von vielen Zelltypen, wie zum Beispiel Fibroblasten und DCs sekretiert. Das Typ II Interferon, IFN- γ , wird von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen synthetisiert. Typ I Interferone gliedern sich in IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ und IFN- ω (Pestka et al., 1987; Pestka, 1997; Pestka et al., 2004). Sowohl im Menschen als auch in der Maus existieren 14 IFN- α Gene (Bogdan et al., 2004). IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , und IFN- ω wurden ebenfalls im Menschen gefunden, wohingegen für IFN- δ und IFN- τ keine Homologe existieren (Pestka et al., 2004). Diese Subtypen wurden lediglich in Schweinen und Rindern identifiziert. Die Gene für Typ I Interferone liegen geclustert auf Chromosom 9 im Menschen (Pestka et al., 2004) und Chromosom 4 in der Maus vor (Chen et al., 2004). Das Gen für Typ II Interferon, IFN- γ , ist im Menschen auf Chromosom 12 und in der Maus auf Chromosom 10 lokalisiert. Die dritte Klasse der Interferone bildet das kürzlich entdeckte IFN- λ , mit den drei Mitgliedern IFN- λ 1-3. Auch ihnen werden anti-mikrobielle Funktionen zugeschrieben. Sie unterscheiden sich jedoch von den anderen Interferonen indem sie an einen eigenen Rezeptor (Typ III IFN Rezeptor) binden und nicht den klassischen IFN-Signalweg verwenden (Pestka et al., 2004).

Alle Typ I Interferone binden an einen gemeinsamen Zelloberflächenrezeptor (IFNAR), während IFN- γ an einen von IFNAR verschiedenen Rezeptor (IFNGR) andockt. Beide Rezeptoren sind Heterotetramere, bestehend aus zwei Ligand-bindenden IFNAR1 bzw. IFNGR1 Untereinheiten und zwei signaltransduzierenden IFNAR2 bzw. IFNGR2 Untereinheiten (Abb. 1.2). Jede dieser Rezeptoruntereinheiten interagiert mit einem Mitglied der JAK (Janus kinase) Familie. Im Falle des Typ I Interferonrezeptors ist die IFNAR1 Untereinheit konstitutiv mit TYK2 (Tyrosine kinase 2) und die IFNAR2 Untereinheit mit JAK1 assoziiert. Die IFNGR1 Untereinheit des Typ II Interferonrezeptors ist konstitutiv mit JAK1 und die IFNGR2 Untereinheit mit JAK2 verknüpft (Bach et al., 1997; Chen et al., 2004). Die Ligandenbindung initiiert eine Konformationsänderung und Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten mit nachfolgende Autophosphorylierung und Aktivierung der assoziierten Kinasen. Die Aktivierung der JAKs, die mit dem Typ I Rezeptor assoziiert sind, führt zur Transphosphorylierung des IFNAR1 und generiert dadurch eine Bindungsstelle für den zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2), der mittels seiner SH2 Domäne an IFNAR1 bindet und anschließend durch Tyk2 phosphorylierungsabhängig aktiviert wird. Phosphoryliertes STAT2 dient als

Bindungsstelle für den latent im Zytoplasma vorhandenen Transkriptionsfaktor STAT1, der nachfolgend ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert wird (Prejean und Colamonici, 2000). Die Phosphorylierungen der Tyrosinreste von STAT2 und STAT1 führen zur Formierung eines STAT1-STAT2-IRF9 (IFN-regulatory factor 9) Komplexes. Dieser Komplex ist auch als ISGF3 (IFN-stimulated gene (ISG) factor 3) bekannt. Der Komplex transloziert in den Nukleus und bindet an bestimmte Promotorsequenzen, die als ISREs (IFN-stimulated response elements) bezeichnet werden. Durch die Bindung des Komplexes an die DNS wird die Transkription vieler Gene induziert. Insbesondere Typ II aber auch Typ I Interferone induzieren die Formierung von STAT1-STAT1 Homodimeren, die ebenfalls in den Kern rekrutieren und an GAS (IFN- γ activated site) Elemente binden, die im Promotor von vielen ISGs (IFN stimulated genes) vorkommen. Dadurch wird die Transkription dieser Gene initiiert.

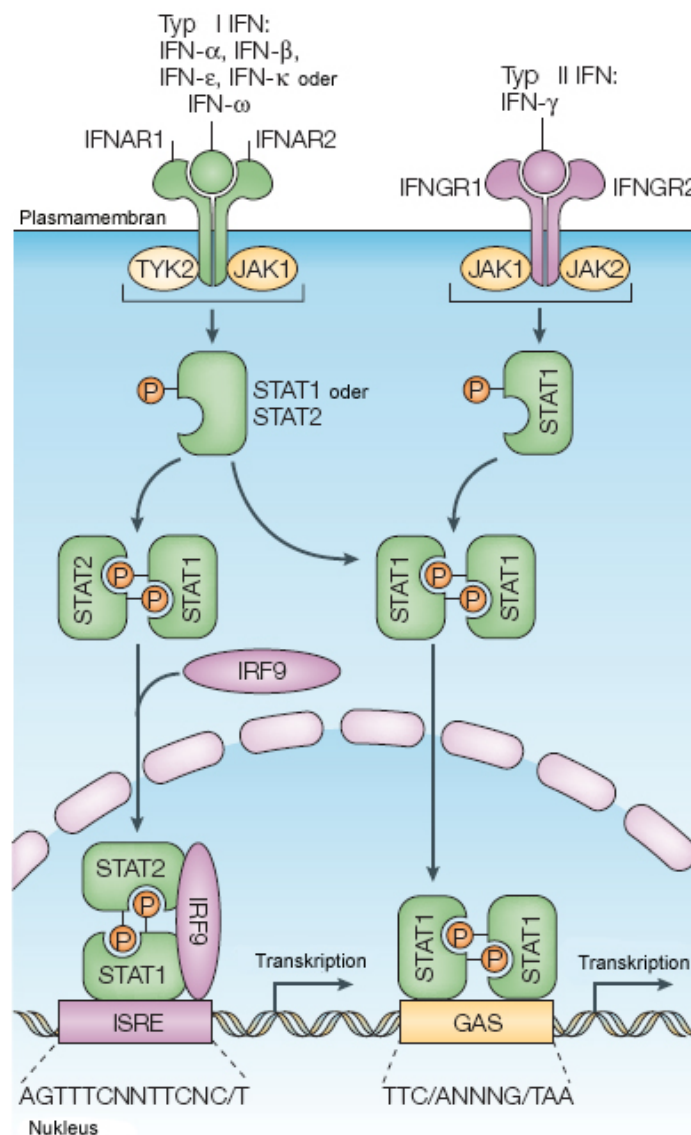


Abb. 1.2: Interferon Rezeptoren und die Aktivierung des klassischen JAK-STAT Signalweges durch Typ I und II Interferone. Aus Platanias, 2005.

Die erste Induktion IFN regulierter Gene erfolgt 15-30 Minuten nach Stimulation (Kerr und Stark, 1991). Viele der transkribierten Gene codieren für Transkriptionsfaktoren (z.B. IRF-1), die wiederum für die Proteinsynthese später IFN responsiver Gene verantwortlich sind.

1.2.1 IFN responsive Gene

Durch die Stimulation von Zellen mit IFN wird die Transkription einer großen Anzahl von Genen aktiviert, so dass die zellulären Effekte von IFN äußerst vielfältig und essentiell sowohl für die angeborene als auch für die adaptive Immunität sind. So regulieren Typ I und II Interferone die Expression von Genen, die für die Klasse I MHC vermittelte Antigenpräsentation wichtig sind. Die Hochregulation von Klasse I MHC ist entscheidend für die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, da die Erkennung von Fremdpeptiden durch zytotoxische T-Zellen erheblich gesteigert wird. Durch Induktion einiger proteasomaler Untereinheiten, welche als „Immunproteasom-“ Untereinheiten bezeichnet werden, wird die Quantität, Qualität und das Repertoire an Peptiden, welche auf MHC I Molekülen geladen werden, entschieden erhöht, was wiederum zu erhöhter und effektiverer Klasse I Antigenpräsentation beiträgt (Schroder et al., 2004). Neben Klasse I MHC Molekülen reguliert IFN- γ auch die Expression von Klasse II MHC Molekülen auf B-Zellen, DCs und Makrophagen und fördert dadurch die peptidspezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. Die Bildung von Peptid:MHC II Komplexen wird zusätzlich durch die Hochregulation bestimmter Gene begünstigt, die in der Produktion von Antigenen und der Beladung der MHC II Moleküle beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem die Ii (invariant) Kette, welche an der Weiterleitung von MHC II vom ER zu den Endosomen beteiligt ist, sowie Cathepsine B, H und L, lysosomale Proteasen, die für die Antigen Produktion zuständig sind und HLA-DM (α und β beim Menschen bzw. Ma, Mb1 und Mb2 in der Maus) (Cho et al., 1991; Kelly et al., 1991). HLA-DM entfernt das Klasse II assoziierte Ii-Peptid (CLIP) von der Peptidbindungs tasche, so dass es für die Peptidbeladung frei wird (Schroder et al., 2004). Weiterhin fördert IFN- γ die Immunantwort in Richtung Th1 Phänotyp. Dies wird durch die Induktion Th1 typischer Effektormechanismen eingeleitet, wie die Aktivierung von NK-Zellen, Förderung spezifischer zytotoxischer Immunität durch Interaktion von T-Zellen mit APCs und Aktivierung von Makrophagen (Boehm et al., 1997). Eine Vielzahl der durch IFN hochregulierten Gene steuern den Zellzyklus, das Zellwachstum, Apoptose und die Rekrutierung von spezifischen Immunzellen zum Ort der Inflammation durch Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen wie IP-10, MIG, MIP-1 und RANTES. Weiterhin beeinflusst IFN- γ den Isotypwechsel von B-Zellen zu IgG2a und verstärkt die TLR4 vermittelte Antwort auf LPS, indem es die Expression von TLR4, MyD88 und IRAK induziert (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004). Die Hauptaufgabe von IFN stellt jedoch die Abwehr von Viren und die Aktivierung antimikrobieller Effektormechanismen dar. Als wichtigste anti-virale Mechanismen sind die Mx Proteine (siehe Abschnitt 1.3.3) und PKR (Protein kinase dsRNA-dependent) zu nennen. PKR ist

eine Serin/Threonin Kinase, die durch dsRNS aktiviert wird. Die Kinase inhibiert die virale Proteinsynthese durch die Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF-2, wodurch dieser Translationsinitiationsfaktor der viralen Proteinbiosynthese entzogen wird (Meurs et al., 1990). Des Weiteren wird PKR eine Beteiligung in der Aktivierung von NF- κ B, Regulation der Spleißvarianten von TNF- α , Induktion von Apoptose und der Aktivierung von STAT1 und STAT3 zugeschrieben. Zu den essentiellen IFN-induzierten anti-mikrobiellen Effektorfunktionen gehören die Produktion von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffintermediaten (RNI, ROI) und die Hochregulation von IDO, NRAMP1, Fc γ RI, C2, C4, Faktor B und Mac-1, sowie der 47 und 65 kDa GTPasen. RNI entstehen als Nebenprodukte bei der durch die NOS Enzyme (eNOS, nNOS, iNOS) katalysierten, NADPH-abhängigen, Reduktion von L-Arginin zu L-Citrullin (Green et al., 1990; Green et al., 1991). RNI Produktion erhöht die Fähigkeit von phagozytierenden Zellen die aufgenommenen Pathogene zu töten. iNOS defiziente Mäuse zeigen dementsprechend eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber parasitären Infektionen und eine reduzierte, unspezifische inflammatorische Immunantwort (Wei et al., 1995). ROI werden durch das Enzym Phagozyten Oxidase (Phox) gebildet und stellen Zwischenschritte bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser dar. Das Enzym besteht aus vier Untereinheiten, gp91^{phox} und gp22^{phox}, die in der Membran von Phagosomen lokalisiert sind und zwei zytosolischen Komponenten, p47^{phox} und p67^{phox}. Nach Stimulation translozieren die Untereinheiten aus dem Zytosol zur Plasmamembran und bilden einen aktiven Komplex, der aus Sauerstoff durch Transfer eines Elektrons Superoxid im Phagosom bildet. Dieses Superoxid reagiert spontan zu H₂O₂, OH und HOCl (MacMicking et al., 1997). Die toxischen Sauerstoffintermediate sind in der Lage mit denen durch iNOS produzierten Zwischenprodukten zu reagieren und somit eine große Anzahl verschiedener toxischer Substanzen (z.B. Peroxidnitrit) zu bilden (MacMicking et al., 1997). ROI und RNI sind chemisch hochreaktive Moleküle, die zur Zerstörung von Nukleinsäuren sowie einer Vielzahl chemischer Verbindungen führen. Generell gilt, dass ROI für die Abwehr extrazellulärer Pathogene während der Phagozytose verantwortlich ist oder Pathogene tötet, die zu groß sind um sie zu phagozytieren (z.B. Würmer), während RNI intrazelluläre Mikroorganismen abtötet. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität führen ROI und RNI allerdings auch zu lokaler Zerstörung des Gewebes, weswegen ihre Aktivität erst im Rahmen einer Immunantwort freigesetzt wird und nicht konstitutiv wirkt (Nathan und Shiloh, 2000; Janeway, Jr. et al., 2005). Neben ROI und RNI initiiert IFN- γ die Bekämpfung von Mikroben durch eine gesteigerte Expression von Fc γ RI auf der Zelloberfläche von Phagozyten, wodurch die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität gesteigert wird. Fc γ RI bindet extrazelluläre Parasiten via IgG in der adaptiven Phase der Immunantwort. Ebenso wird die komplementvermittelte Phagozytose durch IFN- γ hochreguliert, indem verstärkt Komplementfaktoren sekretiert werden und Komplementrezeptoren auf der Zelloberfläche von Phagozyten exprimiert werden (Strunk et al., 1985). Dabei opsoniert das Komplementsystem extrazelluläre Pathogene, um sie der Rezeptor-vermittelten Phagozytose zuzuführen. Als ein weiteres, IFN-abhängiges, anti-mikrobielles Effektormolekül wird die

Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) beschrieben (Daubener und MacKenzie, 1999). Die Aktivierung von IDO führt zur lokalen Depletion der essentiellen Aminosäure Tryptophan und verhindert somit die Vermehrung des Pathogens. Auf die durch IFN induzierten GTPasen wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen, da sie für das Verständnis diese Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

1.3 Die Familie der GTPasen

GTP bindende Proteine spielen eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie die Proteinbiosynthese (Elongations- und Initiationsfaktoren), die intrazelluläre Signalweiterleitung (kleine Ras verwandte Proteine, heterotrimere G-Proteine), der vesikuläre Transport (Rab/Ypt1), die Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung der Zelle (Ras) und der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Dynamine) (Bourne et al., 1990). Es existieren schätzungsweise 200 verschiedene GTP bindende Proteine in eukaryotischen Zellen (Vetter und Wittinghofer, 2001). Anhand von Sequenzhomologien können die GTPasen in fünf Superfamilien eingeteilt werden: die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine ($G\alpha$), die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie (Ras, Rho, Ran, Rab, Arf, etc.), die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3), der Signalerkennungspartikel SRP und sein Rezeptor SR, sowie die großen GTP-bindenden Proteine (z.B. Dynamin, GBP, Mx, „very large inducible GTPase“ (VLIG)). Trotz der großen funktionellen Diversitäten sind den GTPasen die beiden Eigenschaften der Mg^{2+} -abhängigen Bindung von GTP und die anschließende Hydrolyse zu GDP und/oder GMP gemein (Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991; Bourne, 1995). Diese Eigenschaften werden durch die fünf Guaninnukleotidbindungsmotive G1 bis G5 vermittelt, von denen G1 ($GX_4GK[S/T]$), G3 (DXXG) und G4 ($N[T/Q]KXD$) in allen GTPasen konserviert vorliegen. Das G1 Motiv interagiert mit dem α -, β - und γ -Phosphat des gebundenen Nukleotids. Der Kontakt erfolgt über mehrere Amidwasserstoffe der Hauptkette, sowie über die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Die Koordination des Mg^{2+} -Ions der GTP- und GDP-gebundenen Form erfolgt über die Hydroxylgruppe des Serins oder des Threonins. Bei dem zweiten Motiv (T) handelt es sich um ein konserviertes Threonin, das im Schalter I-Bereich bzw. in der Effektorregion der kleinen GTP-bindenden Proteine liegt. Die Hydroxylgruppe dieses Threonins ist an der Koordination des Mg^{2+} -Ion beteiligt. Zusätzlich kontaktiert es mit dem Amidwasserstoff seiner Hauptkette das γ -Phosphat des Nukleotids. Das als G3 bezeichnete Bindungsmotiv liegt im Schalter II (*switch II*). Das Glyzin interagiert mit dem γ -Phosphat des Nukleotids. Die Interaktionen der Motive G2 und G3 finden nur in der GTP-gebundenen Form statt. Für die spezifische Erkennung der Guaninbase ist das Motiv G4 verantwortlich. Dieses Motiv bindet die Base, indem es zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette des Aspartats und der Base bildet. Die Struktur der Nukleotidbindungsstelle wird von den beiden anderen konservierten Resten des Motivs stabilisiert. Das Motiv G5 (SAK) ist nur in der Ras-Familie konserviert und ist dort an der Erkennung der Guaninbase beteiligt (Hilgenfeld, 1995).

Der GTPase-Zyklus verläuft nach einem gemeinsamen Prinzip von GTP-Bindung und Hydrolyse (Abb. 1.3).

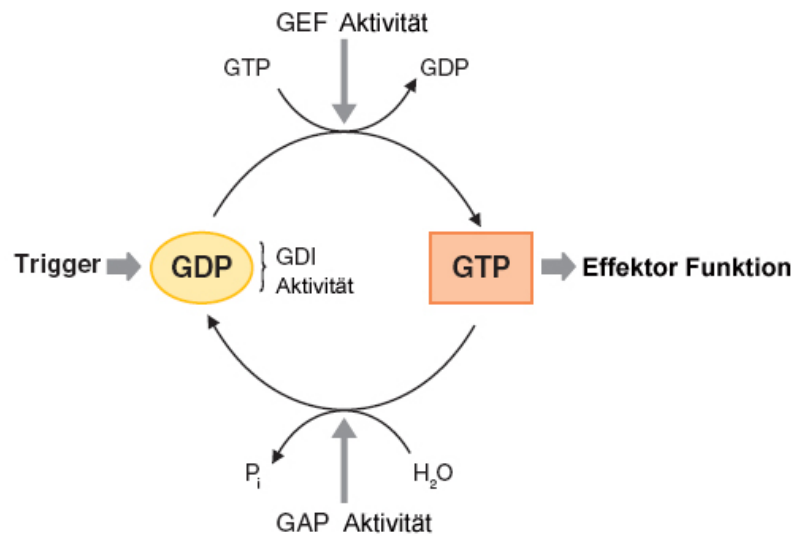


Abb. 1.3: Der GTPase Zyklus. Aus Martens und Howard, 2006.

Bei den meisten GTP-bindenden Proteinen wird die biologische Aktivität durch einen Zyklus zwischen einer GTP- und einer GDP-gebundenen Form reguliert. Im GDP-gebundenen Zustand sind die Proteine in der Regel inaktiv. Der Austausch von GDP gegen GTP führt zu einer Konformationsänderung und zur Aktivierung des Proteins. Der Austausch wird häufig durch GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) unterstützt, die die Dissoziation von GDP von der GTPase beschleunigen. Die Hydrolyse des GTP zu GDP und Orthophosphat inaktiviert das Protein wieder. Viele GTPasen haben eine geringe intrinsische Aktivität und die Inaktivierung wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) katalysiert, welche die Hydrolyse beschleunigen. Einige GTPasen wie Rab und Rho werden zusätzlich durch GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) reguliert, die an die GTPase-GDP Form binden und die Nukleotid Dissoziation verhindern (Sasaki et al., 1990).

1.3.1 Die Gruppe der kleinen GTP-bindenden Proteine

Kleine GTP-bindende Proteine sind monomere Proteine mit einem molekularen Gewicht zwischen 20 und 25 kDa und sind prädominant in eukaryotischen Zellen vertreten. Bislang wurden von der Hefe bis zum Menschen mehr als 100 kleine GTPasen identifiziert, die strukturell in die fünf Unterfamilien Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran eingeordnet werden (Hall, 1990; Takai et al., 2001) (Abb. 1.4).

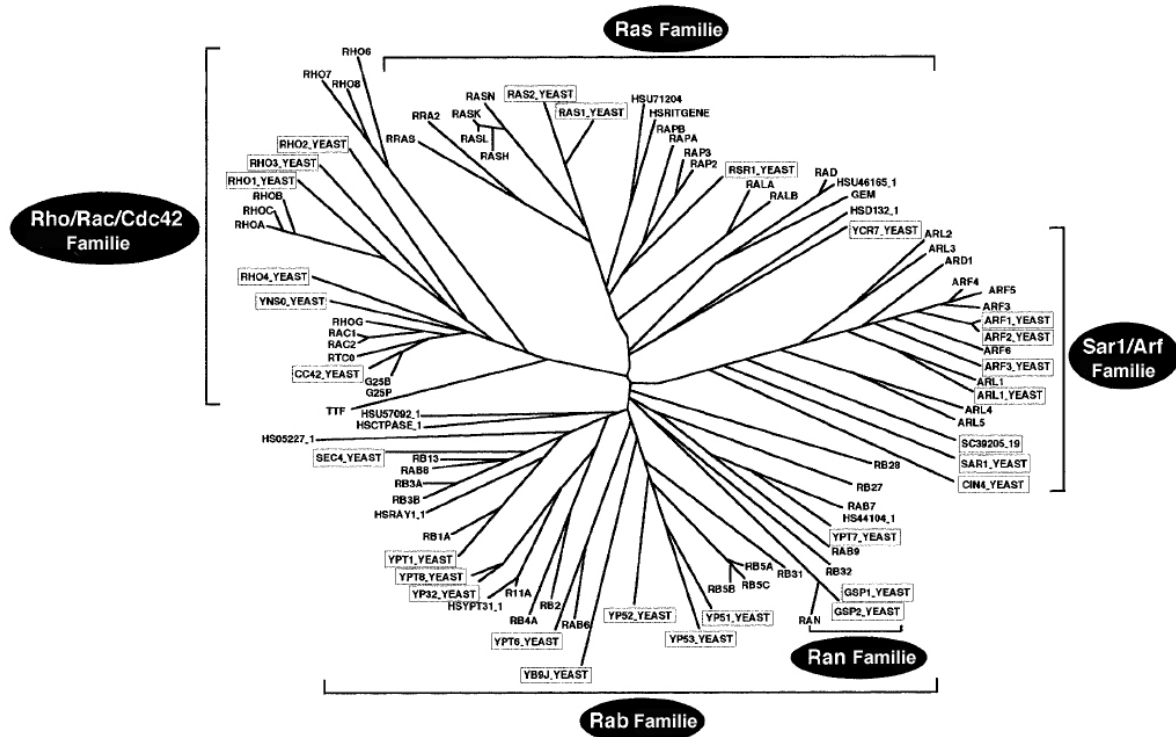


Abb. 1.4: Dendrogramm der kleinen G Protein Superfamilie. Aus Takai, Sasaki und Matozaki, 2001.

Wie alle GTP-bindenden Proteine haben die Mitglieder der Ras-Superfamilie konservierte Aminosäuresequenzen, die für die spezifischen Interaktionen mit GDP und GTP und für die GTP-Spaltung verantwortlich sind. Weiterhin tragen Mitglieder, die zu der Ras, Rho und Rab Familie gehören, posttranskriptionelle Modifikationen an ihrem -COOH Terminus an denen sie farnesyliert, geranylgeranyliert oder palmitoyliert werden können. Arf Proteine zeichnen sich durch einen N-terminalen Glycerinrest aus, der myristyliert wird. Sar1 und Ran werden posttranskriptionell nicht isoprenyliert (Moss und Vaughan, 1995). Funktionell sind die kleinen GTPasen an vielen verschiedenen zellulären Prozessen wie zum Beispiel dem Vesikeltransport beteiligt. So regulieren die Arf GTPasen die „coat protein complex“ (COP) vermittelte Abschnürung von Vesikeln (Chavrier und Goud, 1999). Rab GTPasen spezifizieren den vesikulären Transport (Zerial und McBride, 2001). Rho GTPasen wie RhoA, CDC42 und Rac1 regulieren Aktinmordnungen, Phagosomenbildung und -reifung (Chimini und Chavrier, 2000).

1.3.2 Dynamine

Dynamine bilden eine große Klasse von GTPasen, die an Prozessen wie Membranfusionen, Vesikelabschnürung, Vesikeltransport, Teilung von Zellen und Zellorganellen beteiligt sind (Praefcke und McMahon, 2004). Mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 kDa sind die Dynamine um einiges größer als Arf, Rab und Ras GTPasen. Strukturell sind die Dynamine durch eine N-terminale G Domäne, eine wenig konservierte mittlere Domäne zur Selbstzusammenlagerung, eine PH Domäne (Pleckstrin Homology) zum „Membrantargeting“, eine konservierte GTPase Effektor-domäne (GED) für die GTP Hydrolyse und einer C-terminalen prolinreichen Domäne (PRD) zur Interaktion mit anderen Proteinen gekennzeichnet (Praefcke und McMahon, 2004) (Abb. 1.5).

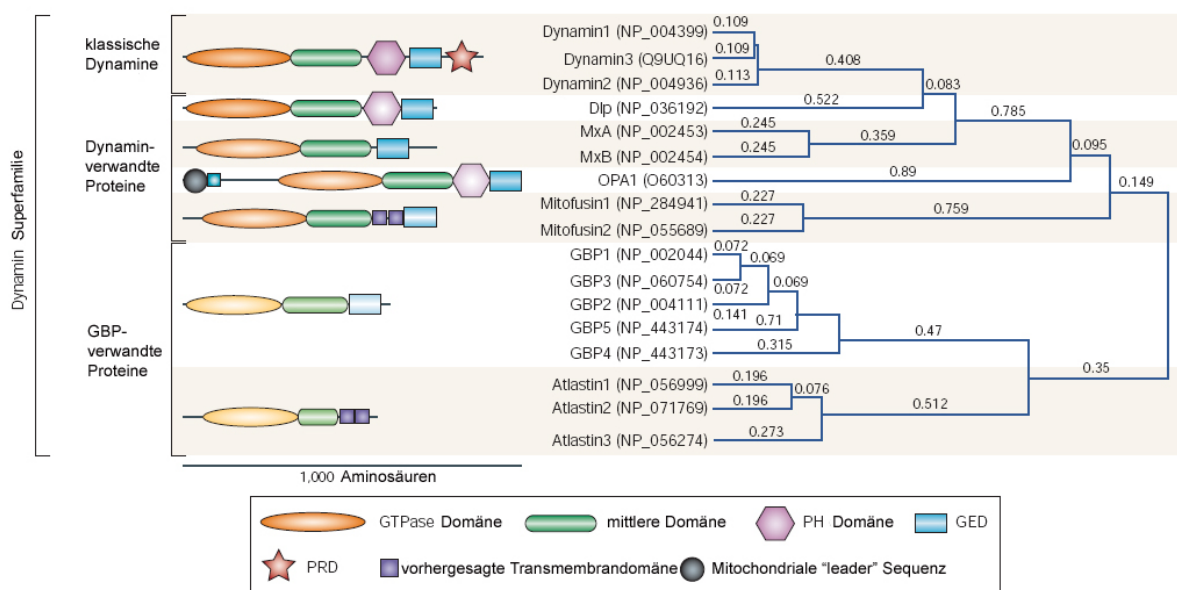


Abb. 1.5: Domänenstruktur der humanen Dynamin Superfamilie. Aus Praefcke und McMahon, 2004.

Neben strukturellen Gemeinsamkeiten teilen sich die Mitglieder der Dynaminfamilie auch gemeinsame biochemische Charakteristika. So binden die Dynamine im Vergleich zu Ras-ähnlichen GTPasen Nukleotide mit einer viel geringeren Affinität (μM Bereich) und zeigen eine hohe Hydrolyserate. Darüber hinaus weisen Dynamine eine Tendenz zur Selbstassemblierung und Oligomerisierung auf, wodurch die GTP-Hydrolyse noch verstärkt wird (Tuma und Collins, 1994). Die Oligomerisierung ist essentiell für die Funktion der GTPasen.

Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob es sich bei Dynamin und den Dynamin-verwandten Proteinen um molekulare Regulatoren oder lediglich um chemomechanische Enzyme handelt (Song und Schmid, 2003).

Für einige Mitglieder der Dynaminsuperfamilie (z.B. Mx-Proteine) konnten auch eine Funktion bei der Abwehr viraler und mikrobieller Pathogene nachgewiesen werden.

1.3.3 Mx-Proteine

1963 entdeckten Lindenmann und Kollegen, dass Mäuse vom A2G Stamm resistent gegenüber Influenza Viren sind (Lindenmann et al., 1963). Die Resistenz konnte auf ein Gen zurückgeführt werden, das Mx1 genannt wurde (Lindenmann, 1964). Die Resistenz konnte durch Antikörper gegen Typ I Interferone *in vivo* verhindert werden (Haller et al., 1979), da Mx Gene ausschließlich Typ I Interferon induzierbar sind. Noch heute sind Mx-Proteine die bekanntesten zellautonomen Resistenzfaktoren und zeigen den stärksten anti-viralen Effekt zellulärer Proteine. So werden Mx-negative Zellen auch ohne IFN-Stimulation resistent gegen Mx1-sensitive Viren, wenn ihnen Mx1 transferiert wird (Arnheiter et al., 1990). Transgene Mäuse, die das humane MxA in einem Typ I Rezeptor negativen Hintergrund konstitutiv exprimieren, sind resistent gegen etliche MxA-sensitive Virusinfektionen (Hefti et al., 1999). Wie Dynamin haben auch die Mx-Proteine ein großes Molekulargewicht, die Fähigkeit zur Selbstassemblierung und eine hohe Rate an intrinsischer GTPase Aktivität. Neben ihren biochemischen Ähnlichkeiten zu den Dynaminen weisen sie auch eine vergleichbare Domänenstruktur auf: eine N-terminale G-Domäne, eine Mitteldomäne und eine C-terminale Effektordomäne (Abb. 1.5). Die meisten Vertebraten besitzen zwei bis drei verschiedene Isoformen des Mx-Proteins mit unterschiedlichen anti-viralen Fähigkeiten. In der Maus wurden bisher Mx1 und Mx2 identifiziert, im Menschen MxA und MxB. MxA und Mx2 lokalisieren nach IFN-Stimulation in granulären Strukturen im Zytoplasma. Für MxA konnte nachgewiesen werden, dass es mit dem glatten ER kolokalisiert (Reichelt et al., 2004). Interessanterweise besitzt Mx1 ein Kernlokalisierungssignal und erscheint dort in bisher unidentifizierten subnukleären Strukturen. Der molekulare Mechanismus der anti-viralen Funktion von Mx scheint davon abhängig zu sein, ob es sich um eine zytosolische oder nukleäre Form des Proteins handelt. Das nukleäre Mx1-Protein aus Mäusen und Ratten blockiert die Replikation des Influenza Virus (Staeheli et al., 1986; Meier et al., 1990). Im Zwei-Hybrid-System interagiert Mx1 mit verschiedenen nukleären Proteinen wie Sp100, Daxx und SUMO-1 (Engelhardt et al., 2001). Das zytoplasmatische Mx2-Protein inhibiert das *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) jedoch keine Influenza Viren (Meier et al., 1990; Zurcher et al., 1992b). Das zytoplasmatische MxA-Protein des Menschen verleiht eine Resistenz gegen das Influenza Virus, das Thogoto Virus, das Masern Virus, das *La Crosse Virus* und gegen VSV (Pavlovic et al., 1990; Zurcher et al., 1992a; Schnorr et al., 1993; Hefti et al., 1999). Die anti-virale Aktivität des Proteins variiert dabei je nach Art des Virus. MxA inhibiert die Primärtranskription des VSV und des Masern Virus. Von beiden Viren ist bekannt, dass sie ihr Genom im Zytoplasma transkribieren (Haller et al., 1998). Die Primärtranskription des Thogoto Virus erfolgt im Kern. MxA unterbindet die Replikation des Virus, indem es direkt mit dem Nukleokapsid des Virus interagiert und so verhindert, dass es in den Zellkern importiert wird. In der GTP-gebundenen Form interagiert MxA über das C-terminale Ende mit dem Nukleokapsid des Thogoto Virus. Die GTPase-Aktivität

wird dabei erhöht (Flohr et al., 1999; Di Paolo et al., 1999; Kochs und Haller, 1999a; Kochs und Haller, 1999b).

Mx-Protein	Funktion
Mx1	vermittelt in der Maus Resistenz gegen Influenza Virus indem es die Replikation blockiert
Mx2	inhibiert in der Maus die Replikation von VSV
MxA	vermittelt im Menschen Resistenz gegen Influenza Virus, Thogoto Virus, Masern Virus, La Crosse Virus und VSV inhibiert Primärtranskription von Masern Virus und VSV interagiert mit Nukleokapsid des Thogoto Virus -> Inhibition der Primärtranskription
MxB	bisher keine anti-virale Aktivität gefunden

Tabelle 1.3: Funktion der Mx-Proteine.

1.3.4 47 kDa Proteine

Die Mitglieder der Interferon-induzierbaren p47 GTPasen, auch „immunity related GTPases“ (IRG) genannt, stellen eine weitere Familie der GTP-bindenden Proteine in der Maus dar. Im Menschen existiert ein homologes Gen, das jedoch nicht durch IFN induzierbar ist (Bekpen et al., 2005). In der Maus besteht die Familie aus 23 Mitgliedern, wovon 4 als Pseudogene beschrieben wurden. Sie werden jeweils durch ein einziges großes Exon kodiert. Die Gene liegen geclustert auf den beiden Chromosomen 11 und 18, mit der Ausnahme von mCINEMA (Irgc) das auf Chromosom 7 lokalisiert ist (Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991). Interessanterweise ist in drei der p47 GTPasen das im G1 Motiv ubiquitär konservierte Lysin (GxxxxGKS) zu Methionin substituiert, so dass sie in zwei Subfamilien eingeteilt werden: die GKS und die GMS Subfamilie (MacMicking, 2005) (Abb. 1.6).

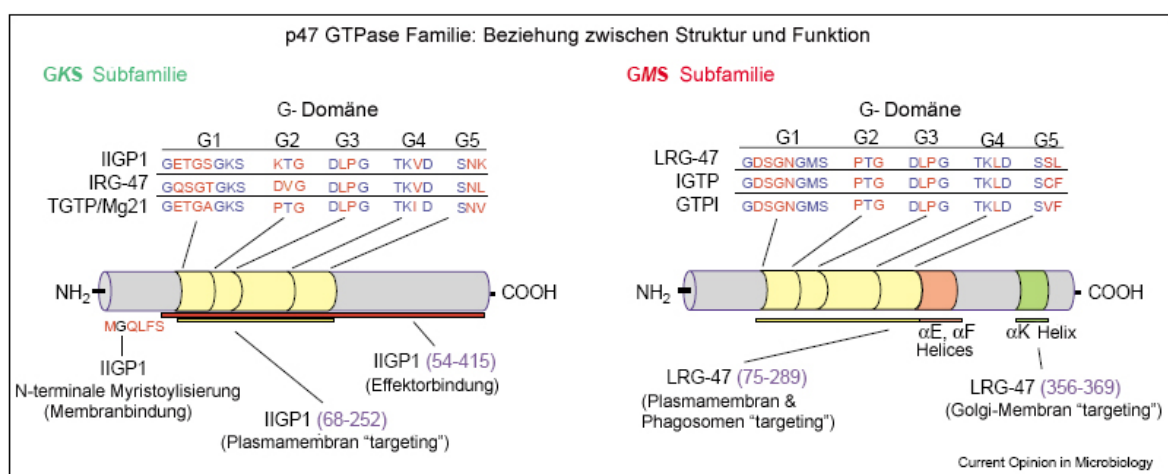


Abb. 1.6: Die GKS und GMS Subfamilie der p47 GTPasen. Aus MacMicking, 2005.

Bisher wurde von den 47 kDa GTPasen lediglich IIGP1 (Irga6) biochemisch untersucht (Uthaiyah et al., 2003). Wie die Dynamine bindet es Nukleotide mit einer Affinität die im μ M Bereich liegt

und weist eine GTP-abhängige Oligomerisierung auf. Im Gegensatz zu den Dynaminen zeigt IIGP1 eine höhere relative Affinität zu GDP und eine relativ geringe GTPase Aktivität (Sever et al., 1999; Uthaiyah et al., 2003). Fast alle Familienmitglieder werden deutlich durch Typ II Interferon induziert und weniger durch Typ I Interferon oder LPS, wobei sowohl Immunzellen als auch nicht-Immunzellen die GTPasen exprimieren können (Abb. 1.7) (Boehm et al., 1998; Zerrahn et al., 2002). Konstitutiv werden die p47 Proteine nur in einem sehr geringen Level transkribiert (Boehm et al., 1998).

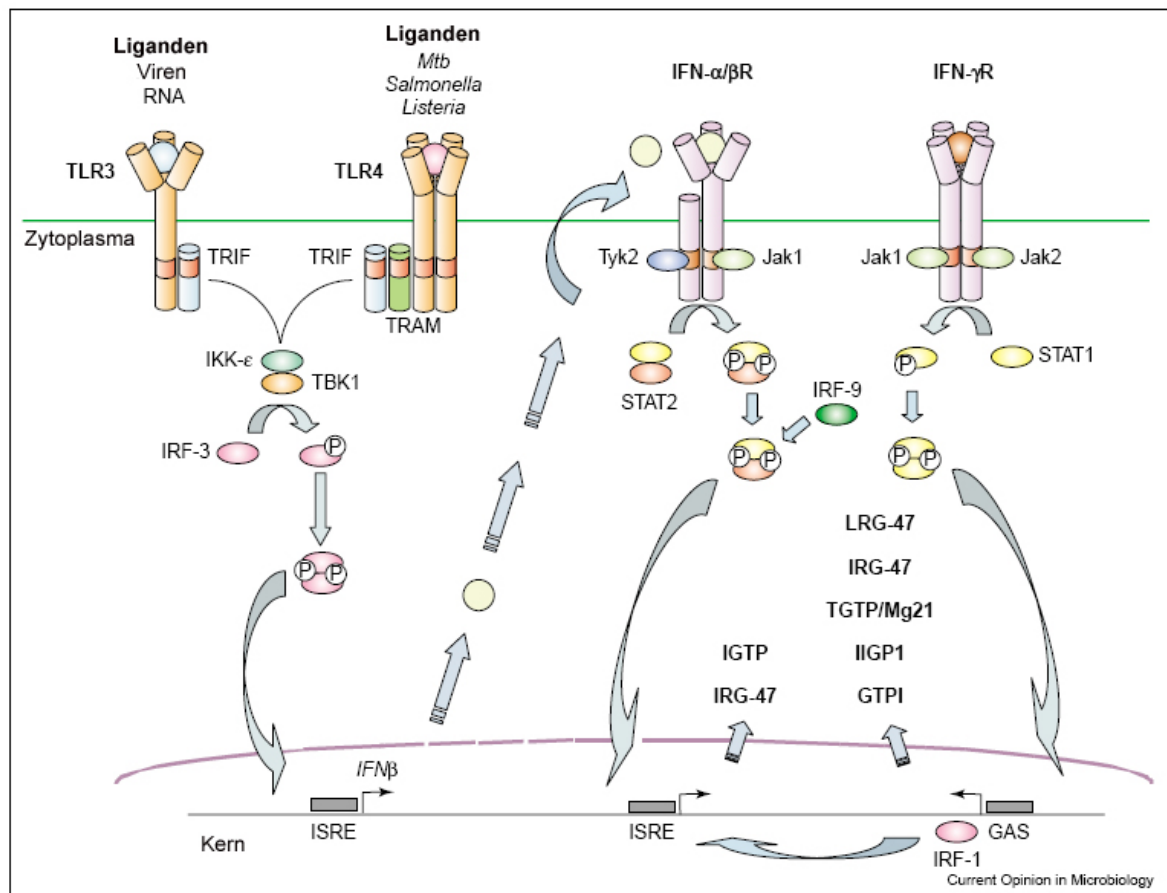


Abb. 1.7: Induktion der p47 GTPasen via mikrobielle „pattern recognition“ Rezeptoren (PRRs) und Zytokinrezeptoren. Aus MacMicking, 2005.

Infektionsexperimente mit Mäusen, in denen eine p47 GTPase inaktiviert wurde, zeigten, dass es sich bei den IRGs um essentielle, nicht-redundante, anti-mikrobielle Effektormoleküle handelt (Tab. 1.3) (Taylor et al., 2000; MacMicking et al., 2003; Taylor et al., 2004). Mäuse mit einer Defizienz in LRG-47 (*Irgm1*), IGTP (*Irgm3*) und IRG-47 (*Irgd*) sind suszeptibel gegenüber Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, LRG-47 defiziente Mäuse sind zusätzlich anfällig gegen Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzii*, *Mycobacterium avium* und *Salmonella typhimurium*. (Taylor et al., 2000; Collazo et al., 2001; Martens und Howard, 2006). Es wird angenommen, dass LRG-47 auch eine wichtige NOS2 unabhängige Rolle in der Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) spielt und es wird postuliert, dass das humane Homolog zu

LRG-47 eine ähnliche Funktion ausübt (MacMicking et al., 2003). IGTP defiziente Mäuse sind neben *T. gondii* auch sensitiv gegen Leishmanieninfektionen sowie Infektionen mit *Chlamydia psittaci* (Miyairi et al., 2007) und IGTP defiziente Zellen zusätzlich gegen Infektion mit *Chlamydia trachomatis*. Während IIGP „knock-out“ Mäuse resistent gegenüber *T. gondii* sind, zeigen IIGP^{-/-} Zellen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *T. gondii*. RNAi behandelte IIGP und Irgb10 Zellen weisen eine gesteigerte Suszeptibilität gegen eine Infektion mit *C. trachomatis* auf. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass TGTP (Irgb6) transfizierte Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber VSV, jedoch nicht gegen HSV zeigen (Carlow et al., 1998) und IGTP einen anti-viralen Effekt gegen Coxsackieviren B3 aufweist, wenn es in HeLa Zellen überexprimiert wird (Zhang et al., 2003). Allerdings sind beide anti-viralen Effekte sehr gering und *in vivo* Experimente konnten die Signifikanz von p47 GTPasen in der viralen Abwehr bisher nicht untermauern.

	Wildtyp	IFN- γ -/-	LRG-47 -/-	IGTP -/-	IRG-47 -/-	IIGP -/-	Irgb10
<i>Toxoplasma gondii</i>	R ^b	S ^b	S	S	Sm ^b , Rc ^b	Rm ^b , Sc ^b	ND
<i>Leishmania major</i>	R	S	S	S	ND ^b	R	ND
<i>Trypanosoma cruzi</i>	R	S	S	R	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	R	S	S	R	R	ND	ND
<i>Mycobacterium avium</i>	R	S	S	R	ND	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	S	S	R	R	R	ND
<i>Salmonella typhimurium</i>	R	S	S	R	R	ND	ND
<i>Chlamydia trachomatis</i>	R	S	ND	Sc	ND	Rm, Sc*	Sc*

Tabelle 1.4: Suszeptibilität von IRG defizienten Mäusen und Zellen gegenüber intrazellulären Pathogenen. R^(b): („knock-out“ Maus) resistent, S: sensitiv, Sm/Rm: sensitive bzw. resistente „knock-out“ Maus, Sc/Rc: sensitive bzw. resistente „knock-out“ Zellen, Sc*: sensitive Zellen nach RNAi Behandlung, ND: nicht determiniert. Aus Martens und Howard, 2006.

Wie die einzelnen p47 GTPasen als anti-mikrobielle Effektormoleküle wirken, ist bisher wenig geklärt. Mehrere Studien haben zur Aufklärung des Mechanismus die subzelluläre Lokalisation von p47 GTPasen nach Infektion mit intrazellulären Pathogenen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass LRG-47 mit Phagosomen *M. tuberculosis* infizierter Makrophagen assoziiert (MacMicking et al., 2003). Diese Assoziation war sensitiv gegenüber einer Behandlung mit BrefeldinA. Die Deletion von LRG-47 resultiert in einer verminderten Ansäuerung und Reifung von *Mycobacterium* infizierten Phagosomen, was mit Defekten in der Kontrolle mykobakterieller Infektionen korreliert (MacMicking et al., 2003). Neben einer Assoziation von LRG-47 mit *M. tuberculosis* konnte eine Akkumulation von IIGP, TGTP, IRG-47, GTPI und IGTP um die parasitophore Vakuole (PV) von *T. gondii* infizierten IFN- γ stimulierten Astrozyten, embryonalen Fibroblasten und 3T3 Zellen gezeigt werden (Martens et al., 2005; Martens und Howard, 2006). Die Kolokalisation von p47 GTPasen mit dem Pathogen wird mit der Zersetzung der PV in Zusammenhang gebracht. Interessanterweise kann keine Assoziation von LRG-47 mit der PV nachgewiesen werden, obwohl LRG-47 defiziente Mäuse suszeptibel gegenüber Infektionen mit *T. gondii* sind. Somit lassen sich die p47 GTPasen vermittelte Resistenzen für *T. gondii* Infektionen

nicht durch einen einzelnen Effektormechanismus erklären. Eine neue Studie von Sher und Kollegen zeigt, dass in LPS-stimulierten murinen Makrophagen LRG-47 durch IFN- β induziert wird und die TLR4 Signalweiterleitung unterbindet. Dadurch wird eine überschießende proinflammatorische Zytokinausschüttung und Schock verhindert, was eine neue immunregulatorische Funktion der GTPasen in der Antwort gegen Pathogene darstellt (Bafica et al., 2007).

1.3.5 65 kDa Guanylat-bindende Proteine

Neben den p47 GTPasen dominiert eine weitere Gruppe von GTPasen die zelluläre Antwort auf die Induktion der Genexpression durch Interferon- γ : die Familie der p65 kDa Guanylat-bindenden Proteine (Boehm et al., 1998). Sie wurden erstmals in IFN- γ stimulierten humanen Fibroblasten nachgewiesen, die die Synthese von mehreren Proteinen mit einer Größe von 44 kDa bis 68 kDa zeigten (Gupta et al., 1979; Knight E Jr und Korant, 1979). Zwei dieser Proteine konnten dadurch charakterisiert werden, dass sie an Agarose immobilisierte Guaninnukleotide binden, jedoch nicht an andere Nukleotide (Cheng et al., 1983). Sie können GTP-, GDP- und GMP-Agarose mit gleicher Stärke binden und sind in der Lage GTP zu GDP und GMP zu hydrolysieren (Schwemmle und Staeheli, 1994; Neun et al., 1996; Praefcke et al., 1999). Gemäß ihren Eigenschaften wurden sie „guanylate-binding-proteins“ (GBPs) genannt (Gupta et al., 1979; Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1985). Die 65 kDa GBPs sind innerhalb der Vertebraten hoch konserviert. Bisher konnten beim Menschen sieben GBPs und ein Pseudo GBP nachgewiesen werden, die geclustert auf dem Chromosom 1 liegen (Olszewski et al., 2006). In der Maus existieren mindestens elf GBPs und zwei Pseudogene, die jeweils als Cluster auf Chromosom 3 (*gbp1*, *gbp2*, *gbp3*, *gbp5*, *gbp7*, *pseudogbp1*) bzw. Chromosom 5 (*gbp4*, *gbp6*, *gbp8*, *gbp9*, *gbp10*, *gbp11*, *pseudogbp2*) angeordnet sind (Abb. 1.8 und A. Kresse, unveröffentlicht).

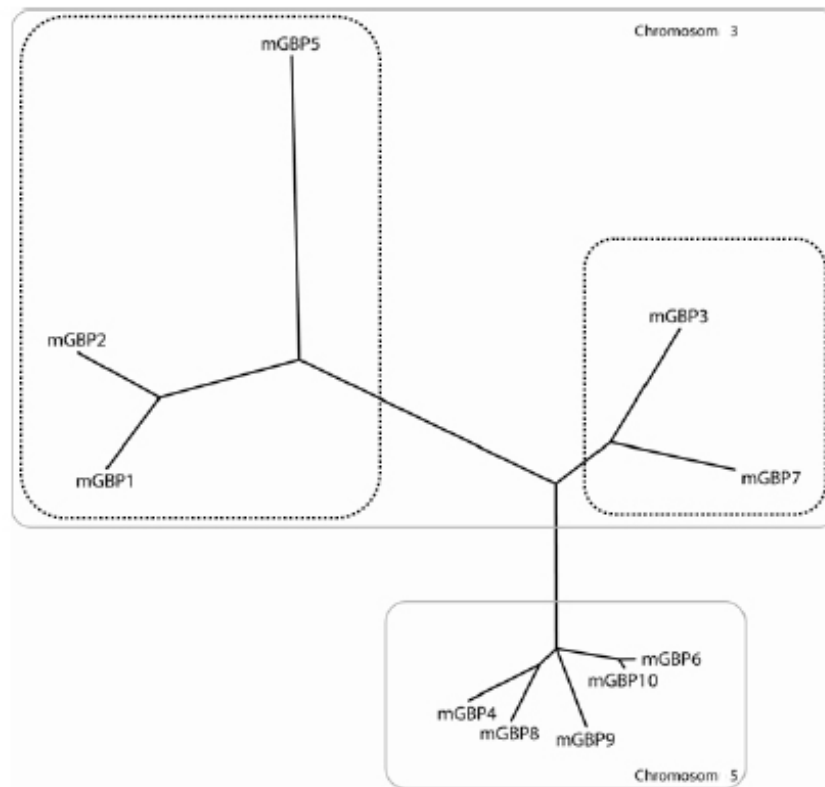


Abb. 1.8: Phylogenetischer Baum der 65 kDa mGBPs. Aus Degrandi et al., 2007.

Alle GBPs bestehen aus einer großen GTP Bindedomäne, einer Mitteldomäne und einer GTPase Effektdomäne (Abb. 1.5). Ihre GTPase Aktivität ist oligomerisierungsabhängig. Die GBPs besitzen die zwei kanonischen GTP-Bindemotive GxxxxGKS (G1) und DxxG (G3), weisen jedoch nicht das typische N/TKxD (G4) Motiv auf (Cheng et al., 1991). Stattdessen haben 65 kDa GBPs ein nicht-kanonisches RD Motiv, welches ebenfalls Guanylatnukleotid-bindende Eigenschaften besitzt (Cheng et al., 1991; Praefcke et al., 1999). Einige GBPs (hGBP1, hGBP2, hGBP5, mGBP1, mGBP2, mGBP5) tragen am C-Terminus ein CaaX Motiv, welches als Signal für posttranslationale Isoprenylierung dient (Stickney und Buss, 2000). Das CaaX Motiv von mGBP2 ist wichtig für dessen subzelluläre Lokalisation. Isoprenyliertes mGBP2 lokalisiert in granulären oder vesikelartigen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas, die bislang nicht näher charakterisiert werden konnten. Mutiertes mGBP2, das nicht mehr isoprenyliert werden kann, verliert diese typische subzelluläre Verteilung (Vestal et al., 2000 und eigene Arbeit).

Die 65 kDa GBPs (mGBP1 bis mGBP5) werden durch Typ I und II Interferone, durch die Interleukine IL-1 α und IL-1 β sowie durch den Tumornekrosefaktor TNF- α in Zellen des Immunsystems und nicht-immunologischen Zellen induziert (Guenzi et al., 2001; Lubeseder-Martellato et al., 2002). In murinen Makrophagen gehören einige Mitglieder der mGBPs zu den am höchsten IFN- γ induzierbaren Genen (Boehm et al., 1998). Nguyen und Kollegen zeigten, dass auch LPS zu einer transienten Induktion von mGBP1 bis mGBP5 führt (Nguyen et al., 2002).

Über die biologische Funktion der Guanylat-bindenden Proteine ist bisher wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die stabile oder transiente Transfektion von hGBP1 in HeLa-Zellen oder mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten die Vermehrung des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) hemmt (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Mutationsanalysen zeigten, dass die anti-virale Aktivität von hGBP1 GTP-bindungsabhängig ist. Die Inhibition war bei mGBP2 unabhängig von der GTP-Bindung wenn die Zellen mit EMCV infiziert waren, jedoch nicht bei einer Infektion mit VSV, was auf unterschiedliche Effektormechanismen des Proteins in Abhängigkeit vom Virustyp hindeutet (Carter et al., 2005). Im Vergleich zu den Mx-Proteinen ist der anti-virale Effekt der GBPs jedoch deutlich geringer. Sowohl hGBP1 als auch mGBP2 üben regulierende Funktionen auf das Zellwachstum aus. In humanen Endothelzellen führt eine retrovirale Expression von hGBP1 zur Inhibition der Zellproliferation. Diese Hemmung der Proliferation ist unabhängig von der GTPase Aktivität oder den posttranslationalen Modifikationen von hGBP1 (Guenzi et al., 2003). In NIH 3T3 Fibroblasten hingegen hat eine Überexpression von mGBP2 ein erhöhtes Zellwachstum zur Folge. Diese Zellproliferation ist abhängig von einer intakten GTP-Bindestelle (Gorbacheva et al., 2002). Neben der Proliferation ist die Invasion von Endothelzellen in Kollagen I Matrices durch hGBP1 beeinflusst. So inhibiert hGBP1 die Expression der Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) was zu einer verminderten Invasion der Endothelzellen in die Matrix führt (Guenzi et al., 2003). Anders als bei dem anti-proliferativen Effekt ist für den anti-angiogenetischen Effekt die GTPase-Aktivität von hGBP1 notwendig. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen hGBP1 Expression und Resistenz gegenüber Paclitaxel Behandlung in ovarialen Tumorzellen gefunden werden (Duan et al., 2006). Die biologische Funktion der GBPs in der Immunabwehr gegen bakterielle und protozoische Infektionen ist bisher jedoch nicht geklärt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

IFN- γ und TNF spielen eine essentielle Rolle im Rahmen der Immunabwehr gegen intrazelluläre Bakterien und Parasiten. Allerdings wurde gezeigt, dass TNFR1 defiziente Mäuse normale ROI und RNI Aktivität sowie normale Produktion von IFN- γ und anderer proinflammatorischer Zytokine aufweisen, jedoch hochgradig suszeptibel gegenüber Infektionen mit *L. monocytogenes* sind (Pfeffer et al., 1993; Endres et al., 1997). Diese Befunde sprechen dafür, dass die IFN- γ und TNF abhängige Antwort bislang unbekannte zelluläre Mechanismen in Gang setzt, die zu einer effektiven anti-mikrobiellen Aktivität führen. Vorrangehende Arbeiten konnten mit Hilfe von GeneChip Array Analysen neue IFN- γ und TNF regulierte Gene identifizieren. Im Vergleich von unstimulierten zu IFN- γ und/oder TNF induzierten Gene in Makrophagen fiel besonders die Gruppe der 65 kDa GTPasen als stark hochreguliert auf.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die Array Analysen der GTPasen mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP4 und mGBP5 auf translationaler Ebene verifiziert werden. Dazu sollten die Expressionseigenschaften dieser GTPasen sowohl *in vitro* unter proinflammatorischen Bedingungen, als auch *in vivo* während einer Infektion analysiert werden. Weiterhin sollte die subzelluläre Lokalisation der einzelnen GTPasen mikroskopisch bestimmt werden. Zur Identifizierung einer anti-mikrobiellen Effektorfunktion sollten mGBP stabil expremierende Zellen mit verschiedenen Pathogenen infiziert werden und das Wachstumsverhalten der Erreger gemessen werden. Um die biologische Funktion der GTPasen *in vivo* zu charakterisieren, sollte eine mGBP2 defiziente Mauslinie generiert werden und diese in verschiedenen Infektionsmodellen untersucht werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, eine Rolle der GTPasen in der Immunabwehr zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hamburg
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bactoagar	BD Biosciences, Heidelberg
BES	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
ConcanavalinA (ConA)	R&D Systems, Mainz
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CpG ODN 1668	TIB MolBiol, Berlin
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Dextransulfat	Amersham Biosciences, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium	Gibco, Eggenstein
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL	GE Healthcare, München
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
ExpressHyb Hybridisierungslösung	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll™ 400	Amersham, Braunschweig
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
FKS (Fötales Kälberserum) low Endotoxin	Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ, USA
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex, Aachen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Gentamycin	Gibco, Eggenstein
Glyzerin	Merck, Darmstadt

Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
HEPES	Gibco, Karlsruhe
hIFN- γ	R&D Systems, Mainz
IMDM Medium	BioWhittaker, Lonza, Belgien
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ionomycin	R&D Systems, Mainz
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
LTA	Thomas Hartung, Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS <i>E. coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Marker 1kb DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
MassRuler™ DNS-Leiter	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Methylenblau	Merck, Darmstadt
mIFN- β	R&D Systems, Mainz
mIFN- γ	R&D Systems, Mainz
mIL1- β	R&D Systems, Mainz
mIL-2	R&D Systems, Mainz
mIL-4	R&D Systems, Mainz
mTNF- α	R&D Systems, Mainz
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NKS (Neugeborenes Kälberserum)	Gibco, Karlsruhe
NP-40 (IGEPAL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
Poly (I:C)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PMA	R&D Systems, Mainz
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker, High-Range Rainbow	GE Healthcare, München
RPMI Medium	Biochrom, Berlin

Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TNF- α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIZOL Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Ultrapure H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
VLE RPMI-CLICKS 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	DaKoCytomation, Hamburg

2.1.2 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-B220-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-B220-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD3-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD4-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD4-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD5-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD8-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD8-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD19-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD23-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD25-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD43-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD44-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD69-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Gr1-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IgM-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IgD-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Mac1-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti- β -Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-GAPDH	Roche, Mannheim
Anti-GBP1-5 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-GFP	Roche, Mannheim
Anti-I κ B- α	NEB, Frankfurt a. M.
Anti-Listeria monocytogenes, ATCC43251	BioTrend Chemikalien GmbH, Köln
Anti-mGBP1.1 (CFIFDRPGDRKQLSKL)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP1.2 (RQEIEKIKNMPPPRSC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP2 (EVNGKPVTSDEYLEHC)	Eurogentec, Belgien

Anti-mGBP3.1 (CQGDNLKVQQSNMTRE)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP3.2 (CLREEMERTRRKPSLF)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP4.1 (CNIKEMKQNGDSLVS)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP4/4.1 (MTQPQMAPIC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP5.2 (CEQLKANYRQQPGKGTQA)	Eurogentec, Belgien
Anti-STAT1, CT	Biomol, Hamburg
Anti-Toxoplasma gondii [TP3]	Abcam, Cambridge, UK
Cy TM 2 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy TM 2 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy TM 3 Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy TM 3 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat Anti-Mouse POX	BD Biosciences, Heidelberg
Goat Anti-Rabbit IgG POX	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Living Colors® DsRed Polyclonal Antibody	TaKaRa, Shiga, Japan

2.1.3 Enzyme

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

2.1.4 Radiochemikalien

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

Das Reagenz wurde von der Firma GE Healthcare (München) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

[5,6-H3] Uracil

Das Reagenz wurde von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen und in einer Konzentration von 1:10 eingesetzt (0,037 MBq/well).

2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL
Bis-Tris Gele (4-12 %)	Invitrogen, Karlsruhe
cDNS Synthese Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Filme: Hyperfilm™-ECL	GE Healthcare, München
Kodak Biomax MS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Filtermate A 1205-401	PerkinElmer, Finnland
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Dassel
FluoSpheres® Fluorescent Microspheres	Invitrogen, Karlsruhe
Ladderman™ Labeling Kit	TaKaRa, Shiga, Japan
MACS® Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS® MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MicroSpin™ S-200 HR Säulen	Amersham Biosciences, Braunschweig
Nylonmembran, Hybond N+	Amersham, Braunschweig
Nylonmembran Protan BA85 Nitrocellulose	Whatman, Dassel
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
PCR-Aufreinigungskit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
Plasmid Isolierungskits	Macherey-Nagel, Düren
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
qPCR MasterMix No ROX	Eurogentec, Liege, Belgien
Quik-Change II Site Directed Mutagenese Kit	Stratagene, Californien
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Geräte

Gerät/Bezeichnung	Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Brutschrank, BBD6220	Heraeus, Hanau
Counter, 120S Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophorese von DNS und RNS, Agagel Maxi/Midi	Biometra, Göttingen
Elektroporationsgerät, Gene Pulser II	Biorad, München
ELISA Reader, Sunrise	Tecan, Crailsheim

Entwicklermaschine, Curix 60	Agfa, Köln
FACS-Calibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Geldokumentationssystem, BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Heizofen, OV3	Biometra, Göttingen
Harvester, Basic 96 Harvester	Satron instruments, Tampere, Finnland
Kühlzentrifugen, Sorvall® RC26 PLUS	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Konfokalmikroskop, LSM510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Mikroskope, Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
TE2000	Nikon, Düsseldorf
PCR Maschine, Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Realtime-PCR Maschine, iCycler IQ5	Biorad, München
Photometer, GeneQuant II	Pharmacia, Braunschweig
Spannungsquelle, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PS 500 XT	HIS, San Francisco, USA
Sterilbank, HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
Thermoblöcke, Termomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen, Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau
Ultra-TURRAX®	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad, WNB22	Memert, Schwabach
Zellkulturschüttler, 3015	GFL, Burgwedel

2.3 Medien und Puffer

2.3.1 Stammlösungen und Puffer

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

dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
Erythrozyten Lysepuffer	0,84 %	NH ₄ Cl ad H ₂ O
ES Zell Lysepuffer	10 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
	0,5 %	Sarkosyl
FACS Puffer	2 %	FKS
	0.01 %	NaN ₃
HEBS (2 x)	0,28 M	NaCl
	0,05 M	HEPES
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH 7,0
Lösung I (Alkalische Lyse)	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris
	10 mM	EDTA
Lösung II (Alkalische Lyse)	0,2 N	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
Lösung III (Alkalische Lyse)	60,0 %	Kaliumacetat
	28,5 %	H ₂ O _{bidest}
	11,5 %	Eisessig
MACS Puffer	0,5%	FKS
	5 mM	EDTA
		ad PBS
Minimal-TE	1 mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,01 mM	EDTA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50 %	Phenol, pH 8,0
	48 %	Chloroform
	2 %	Isoamylalkohol
10 x PCR Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine

Pronase E	10 mg/ml 10 mM 10 mM	Pronase E Tris, pH 8,0 NaCl
Proteinase K	10 mg/ml	Proteinase K in H ₂ O _{bidest} gelöst
20 x SSC	3 M 0,3 M	NaCl Trinatriumcitrat
Tail Buffer	200 mM 100 mM 5 mM 0,2 %	NaCl Tri/HCL EDTA, pH 8,0 SDS
50 x TAE	2 M 1 M 0,1 M	Tris, pH 8,0 Eisessig EDTA
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM 20 mM 2 mM	Tris, pH 8,0 Eisessig EDTA
TBS-T	150 mM 10 mM 0,1 %	NaCl Tris/HCl pH 7,6 Tween-20
TE Puffer	10 mM 1 mM	Tris, pH 8,0 EDTA, pH 8,0
TNE	100 mM 10 mM 1 mM	NaCl Tris, pH 8,0 EDTA, pH 8,0
Waschlösung I (Southern)	2 x 0,05 %	SSC SDS
Waschlösung II (Southern)	0,1 x 0,1 %	SSC SDS
WB Auftragspuffer (5 x)	45 % 25 % 10 % 0,15 % 30 mM	Glyzerin β-Mercaptoethanol SDS Bromphenolblau Tris/HCl pH 6,8
WB/IP Lysepuffer	140 mM 20 mM 5 mM 1 %	NaCl Tris/HCl pH 7,6 MgCl ₂ NP-40

WB Laufpuffer (20 x)	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris Base
	1 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	SDS
		pH 7,7
WB Transferpuffer	25 mM	Bicine
	25 mM	Bis/Tris
	1 mM	EDTA
	20 %	Methanol

2.3.2 Zellkulturmedien

Zelltyp	Grund-medium	FKS*	Penicillin	Streptomycin	β-ME	L-Glutamin
ANA-1 Makrophagen	RPMI 1640 VLE	10 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
BMDC**	RPMI 1640 VLE	10 %			0,05 mM	2 mM
BMDM***	RPMI 1640 VLE	10 %			0,05 mM	2 mM
B-Zellen	RPMI	10 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
EF Zellen	DMEM hohe Glukose	5 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
ES Zellen****	DMEM hohe Glukose	15 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
HS27 Fibroblasten	IMDM	5 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
NIH 3T3 Zellen	DMEM hohe Glukose	10 % NKS	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
RAW 264.7 Makrophagen	RPMI 1640 VLE	10 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
T-Zellen	RPMI	10 %	100 U/ml	100 µg/ml	0,05 mM	2 mM
293(F)T Zellen	DMEM hohe Glukose	10 %	100 U/ml	100 µg/ml		2 mM

* für ES und EF speziell getestetes ES-FKS, für Makrophagenzelllinien, BMDM und BMDC getestetes Endotoxin freies FKS, für NIH 3T3 Zellen getestetes NKS

** GM-CSF wurde als Kulturüberstand einer GM-CSF produzierenden Hybridomazelllinie zugegeben

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

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

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

2.3.3 Medien für die Bakterienkultur

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

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums.

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

2.4 Antibiotika

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

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

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.

2.5 Bakterienstämme und Zelllinien

2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme

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

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac	Stratagene
<i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251
GFP - <i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium stabil mit GFP transfiziert	(Chakraborty, Gießen)

<i>T. gondii</i> ME49, Gruppe II	obligat intrazellulär replizierender Einzeller	(Parmley et al., 1994)
<i>T. gondii</i> BK, Gruppe I	obligat intrazellulär replizierender Einzeller	(Winser et al., 1948; Institut für Med. Pathologie, Bonn)

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme.

2.5.2 Zellen

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

Zellen	Eigenschaften	Referenz
ANA-1	Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen, immortalisiert mittels J2 Retrovirus	(Cox et al., 1989)
BMDC	aus dem Knochenmark mit GM-CSF <i>in vitro</i> ausdifferenzierte Dendritische Zellen	frisch isoliert
BMDM	aus dem Knochenmark mit M-CSF <i>in vitro</i> ausdifferenzierte Makrophagen	frisch isoliert
EF Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus CD1 Embryonen	frisch isoliert (Klein et al., 1993)
ES Zellen	embryonale Stammzellen aus SvJ 129/Ola Mäusen	(Kuhn et al., 1991)
293T Zellen	humane primäre embryonale Nierenzelllinie transformiert mit humanem Adenovirus Type 5 DNS	(Graham et al., 1977)
293FT Zellen	293T Zellen zusätzlich mit pCMVSPORT6Tag.neo transformiert	Invitrogen
HS27	humane Vorhaut Fibroblasten	ATCC, CRL-1634™
IRF-1 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus IRF-1 ^{-/-} Embryonen	(Matsuyama et al., 1993)
Jak2 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus Jak2 ^{-/-} Embryonen	(Neubauer et al., 1998)
Jak2 ^{m/m} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus Jak2 ^{m/m} Embryonen	(Wufka, C, 2007)
L-929	Fibroblasten	(Sanford KK et al., 1948)
mGBP2 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus mGBP2 ^{-/-} Embryonen	diese Arbeit
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie	ATCC, CRL-1658™
264.7 RAW	murine Monozyten/Makrophagenzelllinie aus BALB/c Mäusen, ursprünglich aus Peritoneum	(Raschke et al., 1978)
STAT1 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus STAT ^{-/-} Embryonen	(Marie et al., 1998)

Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien.

2.6 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wildtyptiere des Mausstammes C57BL/6 und C57BL/6 x SvJ 129/Ola verwendet. Weitere Versuche wurden an mGBP2^{-/-} Tieren durchgeführt, die während dieser Arbeit generiert wurden. Alle Mäuse wurden im spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bereich in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet.

2.7 Primer

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

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

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pEF-DsRed_fwd	ATT ATC GAT GAA TTC AAG CTT CGT GAG GC	pEF-DsRed Ausgangskonstrukt
pEF-DsRed_rev	ATT TCT AGA CTA TGC GAG CGC TGC CCC ATT CAG ATC CTC	pEF-DsRed Ausgangskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP1_rev	TAT GCG GCC GCT TAA AGT ATG GTG CAT G	DsRed-mGBP1 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP2_fwd	TAT GTC GAC ATG GCC TCA GAG ATC CAC ATG	DsRed-mGBP1/2 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP2_rev	TAT GCG GCC GCT CAG AGT ATA GTG CAC TTC C	DsRed-mGBP2 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP3_fwd	TAT GTC GAC ATG GAG GCA CCC ATT TGT C	DsRed-mGBP3 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP3_rev	ATT GCG GCC GCC TAA CTA CTT AGT GAG CCG A	DsRed-mGBP3 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP4_fwd	ATT GTC GAC ATG ACC CAA CCA CAA ATG GC	DsRed-mGBP4 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP4_rev	ATT GCG GCC GCT CAC AGT CTA TCC TTT TTC C	DsRed-mGBP4 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP5_fwd	ATT GTC GAC ATG GCC CCA GAG ATT CAC ATG	DsRed-mGBP5 Fusionskonstrukt
pEF-DsRed-M-C1-mGBP5_rev	ATT GCG GCC GCT TAG CTT ATA ACA CAG TCA	DsRed-mGBP5 Fusionskonstrukt

Tabelle 2.6: Oligonukleotide zur Klonierung von DsRed Fusionskonstrukten.

In Tabelle 2.7 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung von GFP-mGBP-Fusionskonstrukten verwendet wurden.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pEGFP-C2-mGBP1_rev	ATT GGT ACC GTT AAA GTA TGG TGC ATG	GFP-mGBP1 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP2_fwd	ATT GGA AGA TCT CGG CCT CAG AGA TCC ACA TGT CG	GFP-mGBP1/2 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP2_rev	ATT AAC GGG GTA CCG GAG TAT AGT GCA CTT CCC AGA CG	GFP-mGBP2 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP3_fwd	ATT AGA TCT CGG AGG CAC CCA TTT GTC TGG	GFP-mGBP3 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP3_rev	ATT GGT ACC GCT AAC TAC TTA GTG AGC CGA	GFP-mGBP3 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP4_fwd	ATT AGA TCT CGA CCC AAC CAC AAA TGG CTC	GFP-mGBP4 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP4_rev	ATT GGT ACC GTC ACA GTC TAT CCT TTT TCC	GFP-mGBP4 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP5_fwd	ATT CTC GAG GGC CCC AGA GAT TCA CAT GC	GFP-mGBP5 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2-mGBP5_rev	ATT GGT ACC GTT AGC TTA TAA CAC AGT CA	GFP-mGBP5 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-w/o-STOP_fwd	ATT GGA TCC AGG CCT AAG CTT ACG	pWPXL-GFP Ausgangskonstrukt
pWPXL-GFP-w/o-STOP_rev	ATT GAA TTC GAA GTT GAG CTC AGA TCT GAG TCC GGA C	pWPXL-GFP Ausgangskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP1_fwd	ATA TCC CGG GAG CCT CAG AAA TCC ACA TGA AAG GCC CAG	pWPXL-GFP-mGBP1 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP1_rev	ATA TCA TAT GTT AAA GTA TGG TGC ATG ATC GAG G	pWPXL-GFP-mGBP1 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2_fwd	ATA TCC CGG GAG CCT CAG AGA TCC ACA TGT CG	pWPXL-GFP-mGBP2 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2_rev	ATA TCA TAT GTC AGA GTA TAG TGC ACT TCC CAG	pWPXL-GFP-mGBP2 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP3_fwd	ATA TCC CGG GAG AGG CAC CCA TTT GTC TGG TGG	pWPXL-GFP-mGBP3 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP3_rev	ATA TCA TAT GCT AAC TAC TTA GTG AGC CGA GG	pWPXL-GFP-mGBP3 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP4_fwd	ATA TCC CGG GAA CCC AAC CAC AAA TGG CTC CC	pWPXL-GFP-mGBP4 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP4_rev	ATA TCA TAT GTC ACA GTC TAT CCT TTT TCC TAA GG	pWPXL-GFP-mGBP4 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP5_fwd	ATA TCC CGG GAG CCC CAG AGA TTC ACA TGC	pWPXL-GFP-mGBP5 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP5_rev	ATA TCA TAT GTT AGC TTA TAA CAC AGT CAT G	pWPXL-GFP-mGBP5 Fusionskonstrukt

Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Klonierung von pWPXL-GFP Fusionskonstrukten.

In Tabelle 2.8 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung von pGAD-mGBP bzw. pGBD-mGBP Fusionskonstrukten verwendet wurden. Diese Konstrukte wurden im „yeast-2-hybrid“ eingesetzt.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pGA/BD-C1-mGBP1_fwd	ATA TAT CGA TAT GGC CTC AGA AAT CCA CAT GAA AGG	pGA/BD-mGBP1 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP1_rev	ATA TGT CGA CTT AAA GTA TGG TGC ATG ATC GAG	pGA/BD-mGBP1 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP2_fwd	ATA TAT CGA TAT GGC CTC AGA GAT CCA CAT GTC G	pGA/BD-mGBP2 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP2_rev	ATA TGT CGA CTC AGA GTA TAG TGC ACT TCC CAG	pGA/BD-mGBP2 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP3_fwd	ATA TAT CGA TAT GGA GGC ACC CAT TTG TCT GG	pGA/BD-mGBP3 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP3_rev	ATA TGT CGA CCT AAC TAC TTA GTG AGC CGA GG	pGA/BD-Mgbp3 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP4_fwd	ATA TAT CGA TAT GAC CCA ACC ACA AAT GGC TCC	pGA/BD-mGBP4 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP4_rev	ATA TGT CGA CTC ACA GTC TAT CCT TTT TCC TAA GG	pGA/BD-mGBP4 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP5_fwd	ATA TAT CGA TAT GGC CCC AGA GAT TCA CAT GCC	pGA/BD-mGBP5 Fusionskonstrukt
pGA/BD-C1-mGBP5_rev	ATA TGT CGA CTT GCT TAT AAC ACA GTC ATG	pGA/BD-mGBP5 Fusionskonstrukt

Tabelle 2.8: Oligonukleotide zur Klonierung von pGAD und pGBD Fusionskonstrukten.

In Tabelle 2.9 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung von GFP-mGBP2 Fusionskonstrukten verwendet wurden, die Mutationen in den GTP-Bindestellen aufweisen. Die Mutationen sind fett hervorgehoben.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pEGFP-C2-mGBP2 R48A_fwd	GGC AAT CGT GGG CCT CTA CGC CAC AGG CAA ATC CTA CCT G	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 R48A_rev	CAG GTA GGA TTT GCC TGT GGC GTA GAG GCC CAC GAT TGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 K51A_fwd	CAG GTA GGA TTT GCC TGT GGC GTA GAG GCC CAC GAT TGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 K51A_rev	GCT TGT TCA TCA GGT AGG ATG CGC CTG TGC GGT AGA GGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 E99A_fwd	GGT TCT GCT TGA CAC TGC GGG CCT TGA AGA TGT TGA G	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 E99A_rev	CTC AAC ATC TTC AAG GCC CGC AGT GTC AAG CAG AAC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 D184N_fwd	GTG TGG ACT CTG AGA AAT TTC TCC CTC GAG CTG G	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 D184N_rev	CCA GCT CGA GGG AGA AAT TTC TCA GAG TCC ACA C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 C592S_fwd	CAA ATC GTC TGG GAA GAG CAC TAT ACT CTG AGC GGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2 C592S_rev	GCG GTA CCG GAG TAT AGT GCT CTT CCC AGA CGA TTT G	Mutagenese von mGBP2
pWPXL-GFP-mGBP2 C592S_rev	ATA TCA TAT GTC AGA GTA TAG TGC TCT TCC CAG AC	Mutagenese von mGBP2

Tabelle 2.9: Mutageneseprimer für Klonierung in pEGFP-C2 und pWPXL-GFP Vektoren.

In Tabelle 2.10 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung des mGBP2 Rekombinationsvektors und der Sonden, zur Detektion positiver Klone, verwendet wurden.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
mGBP2-KA_fwd	AAG GAA AAA AGC GGC CGC CTA ACT GAA GGG TAC TCT ACA AGG	„Targetvektor“ mGBP2 kurzer Arm
mGBP2-KA_rev	GGA TCC ATG TCC AGG GTG GTT TCT TTT TGT C	„Targetvektor“ mGBP2 kurzer Arm
mGBP2-KA_VL_fwd	ATT GCG GCC GCG GGA AAG AAG ACT TCA CAC TGA GAG C	„Targetvektor“ mGBP2 Verlängerung des kurzen Arms
mGBP2-KA_VL_rev	TTAATTTAAATACAACATAATTTGAAATTCATTGAG GACC	„Targetvektor“ mGBP2 Verlängerung des kurzen Arms
mGBP2-LA_fwd	AAA CGC GTC GAC CGT GGG CCT CTA CCG CA	„Targetvektor“ mGBP2 langer Arm
mGBP2-LA_rev	TTC GGG GGT ACC GTG GGA CAT GTG GGA ATG TG	„Targetvektor“ mGBP2 langer Arm
DsRed_fwd	CCA TCG CGA CCA TGG CCT CC	„Targetvektor“ mGBP2 Expressionskassette
DsRed_rev	GAA TTC GAT ACA TTG ATG AGT TTG GAC	„Targetvektor“ mGBP2 Expressionskassette
3' fp2_fwd	CCT AAT GTA GTT TGT ATT C	3' Sonde
3' fp2_rev	CCC AGG AGC CTG GTT ATA CTT T	3' Sonde
3' fp Deleter_fwd	GTG AGT GCC ACC AAC AAA TC	3' Sonde
3' fp Deleter_rev	GAG AAA CCT AGT CTA TAA	3' Sonde

Tabelle 2.10: Oligonukleotide zur Klonierung des mGBP2 Rekombinationsvektors, sowie die Sonden zur Detektion positiver Klone.

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

Primername	Sequenz (5'→3')	Sonde (#)
β-Actin_fwd	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	CTCTGGCT (106)
β-Actin_rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	
mGBP4-SV1/2_fwd	AGC CAT AGA GAT TCT GGA CAA GAT	CTCAGCCA (102)
mGBP4-SV1_rev	GGA GCC CAG AGG GAA AAC	
mGBP4-SV2_rev	CTT TGG CTG GTA GGC AGC GTG	

Tabelle 2.11: Sequenzen von Oligonukleotiden und Sonden für Realtime RT-PCR Versuche.

Die Sonden sind Teil der Universal ProbeLibrary der Firma Roche, Mannheim. In Klammern sind die Nummern der Sonden angegeben.

2.8 Plasmidvektoren

2.8.1 Ausgangsvektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pCR II-TOPO	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ α - Fragment	Invitrogen
pBS-loxP-neo-loxP	Klonierungsvektor zur Herstellung von „Targetvektoren“ mit loxP flankierten Homologiebereichen, Amp ^R , Neo ^R	Labor Pfeffer
pBluescript II KS+	Klonierungsvektor, Amp ^R , Neo ^R	Fermentas
TK-KpnI	Vektor mit HSV-Tymidinkinase mit KpnI-Linkern, pGEM7-Derivat, Amp ^R	Labor Pfeffer
pDsRed2-N1 w/o NotI w EcoRI	Expressionsvektor für C-terminales DsRed-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Amp ^R , Neo ^R , modifiziert	Labor Pfeffer
pDsRed2-Mito	Expressionsvektor mit DsRed2 und mitochondrialer Targetingsequenz (Untereinheit VIII von humaner Cytochrom C Oxidase), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pDsRed2-ER	Expressionsvektor mit DsRed2 und ER Targetingsequenz (Calreticulin), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pEGFP-Endo	Expressionsvektor mit EGFP und Endosomenmarker (RhoB), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pECFP-Mem	Expressionsvektor mit ECFP und Targetingsequenz von zellulären Membranen (Neuromodulinfragment), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pAcGFP1-Golgi	Expressionsvektor mit AcGFP1 und Golgi Targetingsequenz (humane beta 1,4-galactosyltransferase), CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pDsRed-Monomer-C1	Expressionsvektor für N-terminales DsRed-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pEF-DsRed-M-C1	Expressionsvektor für N-terminales DsRed-Fusionsprotein, EF1 α -Promotor, Amp ^R , Neo ^R	diese Arbeit
pEGFP-C2	Expressionsvektor für N-terminales EGFP-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pGAD-C1	Expressionsvektor für N-terminales pGAD-Fusionsprotein, GAL4-Aktivierungsdomäne, ADH1-Promotor, Amp ^R	(James et al., 1996)
pGBD-C1	Expressionsvektor für N-terminales pGBD-Fusionsprotein, GAL4-DNS-Bindedomäne, ADH1-Promotor, Amp ^R	(James et al., 1996)
pWPXL	Ausgangsvektor zur Klonierung von pWPXL-GFP-w/o-STOP, EF1- α -Promotor, Amp ^R	Labor Trono
pWPXL-GFP-w/o-STOP	Expressionsvektor für N-terminale GFP-Fusionsproteine, EF1- α -Promotor, Amp ^R	diese Arbeit
pLP/VSVG	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (envelope), Expression des VSV-G Gens (VSV G Glycoprotein), CMV-Promotor, Amp ^R	Invitrogen
psPAX2	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (Packaging), Expression von Gag, Pol und Env, CMV-Promotor, Amp ^R	Labor Trono

Tabelle 2.12: Verwendete Ausgangsvektoren.

2.8.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
pEF-DsRed-M-C1	pDsRed-Monomer-C1	EF-Promotor	EF-Promotor
pWPXL-GFP-w/o-STOP	pWPXL	GFP ORF	Lentivirale Transduktion N-terminaler GFP-Fusionsproteine
pEF-DsRed-mGBP1	pEF-DsRed-M-C1	mGBP1 ORF	für subzelluläre Lokalisation
pEF-DsRed-mGBP2	pEF-DsRed-M-C1	mGBP2 ORF	für subzelluläre Lokalisation
pEF-DsRed-mGBP3	pEF-DsRed-M-C1	mGBP3 ORF	für subzelluläre Lokalisation
pEF-DsRed-mGBP4	pEF-DsRed-M-C1	mGBP4 ORF	für subzelluläre Lokalisation
pEF-DsRed-mGBP5	pEF-DsRed-M-C1	mGBP5 ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP1	pEGFP-C2	mGBP1 ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP2	pEGFP-C2	mGBP2 ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP3	pEGFP-C2	mGBP3 ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP4	pEGFP-C2	mGBP4 ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP5	pEGFP-C2	mGBP5 ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP2-R48A	pEGFP-C2	mGBP2 R48A ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP2-E99A	pEGFP-C2	mGBP2 E99A ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP2-D184N	pEGFP-C2	mGBP2 D184N ORF	für subzelluläre Lokalisation
GFP-C2-mGBP2-C592S	pEGFP-C2	mGBP2 C592S ORF	für subzelluläre Lokalisation
pWPXL-GFP mGBP1	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP1 ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2 ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP3	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP3 ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP4	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP4 ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP5	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP5 ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-R48A	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2 R48A ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-E99A	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2 E99A ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-D184N	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2 D184N ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-C592S	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2 C592S ORF	Lentivirale Transduktion
pGAD-C1 mGBP1	pGAD-C1	mGBP1 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGAD-C1 mGBP2	pGAD-C1	mGBP2 ORF	„yeast-2-hybrid“

pGAD-C1 mGBP3	pGAD-C1	mGBP3 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGAD-C1 mGBP4	pGAD-C1	mGBP4 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGAD-C1 mGBP5	pGAD-C1	mGBP5 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGBD-C1 mGBP1	pGBD-C1	mGBP1 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGBD-C1 mGBP2	pGBD-C1	mGBP2 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGBD-C1 mGBP3	pGBD-C1	mGBP3 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGBD-C1 mGBP4	pGBD-C1	mGBP4 ORF	„yeast-2-hybrid“
pGBD-C1 mGBP5	pGBD-C1	mGBP5 ORF	„yeast-2-hybrid“
mGBP2-TV	pBS-loxP-neo-loxP	s. Abb. 3.33	mGBP2 „Targetvektor“

Tabelle 2.13: Hergestellte Plasmide.

Die erfolgreiche Klonierung sämtlicher Konstrukte wurde durch Restriktionsanalysen überprüft und anschließend eine Sequenzierung bei der Firma GATC durchgeführt.

2.9 Tierversuche

2.9.1 Superovulation

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

2.9.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten für die Kultivierung von ES Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen am Tag 14 p.c. gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in eine Petrischale mit Medium gelegt. Die Embryonen wurden anschließend aus dem Uterus präpariert und der Kopf und die fötale Leber entfernt. Das restliche embryonale Gewebe wurde durch ein Sieb (100 µm Porengröße, BD) homogenisiert und in EF Medium kultiviert. Die vereinzelt EF Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Anschließend wurde alle zwei Tage frisches Medium auf die Zellen gegeben. Bei konfluentem Wachstum wurden die EF Zellen als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.9.3 Generierung chimärer Mäuse

Um chimäre Mäuse aus den homolog rekombinierten ES Zellen zu erhalten, wurden diese in Blastozysten (Tag 3,5) von superovulierten C57BL/6 Spendertieren injiziert. Dafür wurden die ES Zellen auf einer 5 cm Zellkulturschale mit Mitomycin C (MMC) behandelten EF Zellen ausplattiert, am nächsten Tag das Medium gewechselt und an Tag 3 auf zwei 5 cm Zellkulturschalen ohne EF Zellen umgesetzt. Am vierten Tag wurde wiederum das Medium gewechselt und an Tag 5 wurden die rekombinierten ES Zellen in die Blastozysten injiziert. 10 - 20 dieser Blastozysten wurden anschließend in den Uterus einer scheinschwangeren CD1 Ammenmutter transferiert (durchgeführt von Nicole Krafzik). Etwa sieben Tage nach der Geburt konnte anhand der Fellfarbe eine chimäre Maus identifiziert werden.

2.9.4 Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes*

Listerien (ATCC 43251) wurden über Nacht in 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium kultiviert und für die Infektion auf eine OD₆₀₀ von 0,7 eingestellt. Für die Infektionsexperimente der mGBP2 defizienten Mäuse wurden diese intraperitoneal mit 1 x LD₅₀ infiziert, und das Überleben der Mäuse täglich kontrolliert. Für die Expressionsexperimente wurden C57BL/6 Mäuse intraperitoneal mit 0,1 x LD₅₀ infiziert.

2.9.5 Gewinnung von Zysten aus dem Gehirn *Toxoplasma gondii* infizierter Mäuse

Toxoplasma gondii infizierte CD1 Mäuse wurden mittels CO₂ Narkose getötet und das Gehirn frei präpariert. Das Gehirn wurde zweimal in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4 ml PBS in einer 5 cm Zellkulturschale zerkleinert. Die Hirnsuspension wurde anschließend durch sukzessive kleiner werdende Kanülen gezogen (18G, 22G, 23G, 25G), um eine homogene Hirnsuspension zu erhalten. Nach Zentrifugation bei 800 UpM wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml PBS resuspendiert und mit 10 ml Ficoll unterschichtet. Zur Ausbildung des Gradienten wurde für 30 min bei 2500 UpM zentrifugiert und die Zentrifuge ohne Bremse auslaufen gelassen. Die Zysten bildeten nach der Zentrifugation das Pellet, welches anschließend mit 50 ml PBS gewaschen wurde (15 min, 2000 UpM). Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zystenpellet in 0,5-1 ml PBS resuspendiert. Zum Zählen der Zysten wurden 10 µl Suspension auf einen Objektträger getropft und mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen eingedeckelt. Es wurden alle Zysten unter dem Deckgläschen gezählt. Zur Infektion von Mäusen wurden die Zysten wenige Minuten trypsinisiert, um die Parasiten frei werden zu lassen.

2.9.6 Infektion von Mäusen mit *Toxoplasma gondii*

Zysten zur Infektion der mGBP2 defizienten Mäuse wurden aus dem Gehirn infizierter CD1 Mäuse präpariert (s. Abschnitt 2.9.5). Pro Maus wurden 20 Zysten intraperitoneal injiziert.

2.9.7 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen aus Mäusen wurden diese durch Genickbruch getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion mit 70 % EtOH steril entnommen. Zur Proteinextraktion wurden die Organe in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen und Fibroblasten

Zellkultur von ES/EF Zellen

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

Elektroporation von ES Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit dem Rekombinationsvektor mGBP2 transfiziert. Dafür wurden ES Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen mit EF Zellen expandiert. Für die Elektroporation wurden 5×10^7 Zellen in 7 ml ES Medium aufgenommen und mit 200 µg linearisiertem Rekombinationsvektor in 1 ml PBS vermischt. Pro Ansatz wurden je 800 µl in Elektroporationsküvetten überführt und bei 300 V/250 µF elektroporiert. Elektroporierte Zellen wurden anschließend 10 min auf Eis abgekühlt und je Ansatz auf zwei 10 cm Kulturschalen mit EF Zellen verteilt.

Selektion rekombinanter ES Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES Zellen einem zweifachen Selektionsdruck mit Geneticin und Gancyclovir unterzogen, um homolog rekombinierte ES Zellklone anzureichern. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 Tage ohne Selektion kultiviert. Am Tag 2 wurde zur Positivselektion dem Medium Geneticin (G418) (200 µg/ml) zugegeben und an Tag 4 zur Negativselektion zusätzlich 2 mg/ml Gancyclovir. Anschließend wurde alle zwei Tage das

Medium gewechselt, bis ES Zellkolonien gewachsen sind (Tag 11). Die Kolonien wurden mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS überschichtet. Mit einer sterilen Pipette wurden die Einzelkolonien in 20 µl PBS aufgenommen und in eine 96-well Rundboden Platte überführt. Der Zellverband der Kolonien wurde durch Trypsin/EDTA Behandlung aufgelöst und mit EF Zellen ko-kultiviert. Nach 2 Tagen wurde ein Teil der Zellen (2/3) auf eine 48-well Platte mit EF Zellen gesplittet und die restlichen Zellen in der 96-well Platte belassen. Die ES Zellen in der 48-well Platte wurden nach 2 Tagen eingefroren und die Zellen in der 96-well Platte auf zwei 96-well Flachbodenplatten ohne EF Zellen gesplittet. Die ES Zellen in den 96-well Platten wurden wachsen gelassen, bis sie einen dichten Layer gebildet haben. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren oder die Zellen direkt lysiert.

Einfrieren von ES Zellen

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

2.10.2 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken (Lamina AIR Flow) mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 8 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. ANA-1 und 264.7 RAW Makrophagen wurden mit Medium unter Verwendung von Plastikpipetten von der Kulturschale abgespült und dann verdünnt umgesetzt. NIH 3T3, 293T und 293FT Zellen wurden alle 2 Tage mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in Medium verdünnt auf neue Platten ausplattiert. HS27 Zellen zur Kultivierung von Toxoplasmen wurden in T75 Flaschen (Nunc) bis Passage 40 passagiert. Von konfluent bewachsenen Flaschen wurde einmal wöchentlich das Medium gewechselt. Dicht bewachsene T75 Flaschen wurden gesplittet indem die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert wurden. Vereinzelte Zellen wurden in Medium 1:6 in T25 Flaschen umgesetzt.

2.10.3 Kultivierung von BMDM und BMDC

Knochenmarkszellen wurden aus dem Femur der Maus ausgespült und in Petrischalen mit BMDM/BMDC Medium (s. Tab. 2.1) kultiviert. Zur Ausdifferenzierung von Makrophagen aus den Vorläuferzellen im Knochenmark wurde dem Medium M-CSF bzw. GM-CSF zur

Ausdifferenzierung von Dendritischen Zellen zugesetzt. Alle 2 Tage wurde ein Teil des Mediums abgenommen und frisches Medium zugegeben. Nach 10 Tagen Kultur waren die Zellen zu Makrophagen bzw. Dendritischen Zellen ausgereift.

2.10.4 Aufreinigung von B- und T-Zellen

Um reine Zellpopulationen zu erhalten, wurden Lymphknoten und Milzen von C57BL/6 Mäusen durch ein Zellsieb homogenisiert und die Zellen gezählt. Jeweils 10^7 Zellen wurden mit 90 μ l MACS Puffer und 10 μ l der entsprechenden Beads für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 10- bis 20-fach Puffer gewaschen. 10^8 Zellen wurden in 500 μ l MACS Puffer aufgenommen und über die mit MACS Puffer äquilibrierte und am Magneten befestigte Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule dreimal mit jeweils 3 ml MACS Puffer gewaschen und der Durchfluss in einem 15 ml Gefäß aufgefangen. Zur Elution wurde die Säule aus dem Magneten genommen und zweimal je 5 ml MACS Puffer durch die Säule gedrückt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und für weitere Versuche verwendet.

2.10.5 Kalzium-Phosphat Transfektion

Zur transienten Transfektion von Zellen (293T) wurden am Vortag 1×10^6 Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Nach 16 h wurden in einem sterilen Röhrchen (Falcon) 16 μ g Expressionsvektor und 80 μ l CaCl_2 gemischt und mit ddH_2O auf 400 μ l aufgefüllt. Unter Vortexen wurden tropfenweise 400 μ l 2 x BBS zugegeben, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. 8 h später wurde das Medium gewechselt. Der Erfolg der Transfektion konnte nach 24 h am Fluoreszenzmikroskop oder per Western Blot bestätigt werden.

2.10.6 Transfektion mittels FuGENE6 Transfektionsreagenz

Die transiente Transfektion mittels FuGENE6 Transfektionsreagenz erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Es wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen (NIH 3T3) in 2 ml Medium ohne P/S in einer 6-well Platte ausplattiert. Nach 16 h wurden 6 μ l FuGENE6 mit DMEM-Medium auf 100 μ l aufgefüllt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 μ g Expressionsvektor zugegeben und nach 15 min Inkubation bei RT auf die Zellen getropft. Eine erfolgreiche Transfektion wurde nach 24 h am Fluoreszenzmikroskop oder per Western Blot kontrolliert.

2.10.7 Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation

Die transiente Transfektion der 264.7 RAW Makrophagen erfolgte durch Elektroporation. Dafür wurden die Zellen einen Tag vor der Elektroporation passagiert. Am Tag der Elektroporation

wurden $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in 400 μ l EP-Medium (RPMI Medium mit 40 % FKS) aufgenommen und pro Elektroporationsansatz 20 μ g Plasmid-DNS zur Zellsuspension pipettiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und bei 280 V/975 μ F elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 15 min bei RT inkubiert und anschließend in Röhrchen mit 10 ml Medium gegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1200 UpM wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und ü/N im Brutschrank inkubiert.

2.10.8 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien

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

Generierung von Virusüberstand

5×10^6 293FT Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Zur Transfektion wurden 5 μ g pLP/VSVG, 10 μ g psPAX2 und 20 μ g Expressionsvektor mit 125 μ l 0,5 M CaCl_2 gemischt und mit 0,05 M HEPES auf 250 μ l aufgefüllt. In sterile Röhrchen wurden 250 μ l 2 x HEBS vorgelegt und die DNS unter Vortexen tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde für 32 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium der 293FT Zellen durch FKS-freies Medium ersetzt und anschließend die DNS auf die Zellen getropft. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 6 ml FKS-haltigem Medium. Nach 48 h wurde der Virusüberstand von den Zellen abgenommen, für 10 min bei 2000 UpM zentrifugiert und der Überstand mit einem 0,45 μ m Filter steril filtriert. Der Virusüberstand wurde anschließend in Cryotubes aliquotiert, kurz in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

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

Einen Tag vor der Transduktion wurden 3×10^4 Zellen auf 24-well Platten ausplattiert. 600 μ l Virusüberstand wurden mit 25 μ g Polybrene zur Transduktion von NIH 3T3 bzw. 130 μ g zur Transduktion von 264.7 RAW Makrophagen versetzt und auf die Zellen gegeben. Diese wurden für 30 min im Brutschrank inkubiert und dann für 2 h bei 1200 UpM und 32°C zentrifugiert. Nach Inkubation von 4 h im Brutschrank wurde der Virusüberstand durch 1 ml Medium ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit Virusüberstand transduziert. Die doppel-transduzierten Zellen wurden alle 2 Tage bis zur 10 cm Kulturschale auf eine größere Zellkulturplatte umgesetzt. Der Erfolg der Transduktion wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

2.10.9 Stimulation von Zellen

Die Induktion der verschiedenen primären Zellen und Zelllinien erfolgte in den in Abschnitt 2.3.2 angegebenen Nährmedien, wobei die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte eine ca. 75 %ige Konfluenz erreicht hatten. Folgende Zytokine und Chemikalien wurden zur Induktion eingesetzt: IFN- γ (R&D), IFN- β (R&D), TNF- α (R&D), CpG (TIB MolBiol), LPS (Sigma-Aldrich), IL-2 (R&D), IL-4 (R&D), IL-1 β (R&D), Concanavalin A (R&D), PMA (R&D), Ionomycin (R&D) und LTA (T. Hartung), sowie der Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) (Sigma-Aldrich). Die Stimulation/Inhibition der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe einer entsprechenden Substanzmenge zum Nährmedium. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

CHX wurde vor der direkten Zugabe zum Nährmedium in PBS solubilisiert, wobei die Zugabe von CHX 6 h vor der nachfolgenden Stimulation mit IFN- γ erfolgte. Die Endkonzentration von CHX betrug dabei 50 mg/ml.

2.10.10 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Färbung intrazellulärer mGBPs, Listerien oder Toxoplasmen wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewendet. Dafür wurden Zellen am Vortag in 24-well Platten auf Glasdeckelchen ausplattiert. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 4 % PFA/PBS für 15 min im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert und anschließend für 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde mit 0,05 % Saponin/PBS bei RT für 15 min abgedunkelt permeabilisiert und anschließend mit 0,005 % Saponin/PBS + 2 % Ziegenserum 20 min bei RT abgedunkelt geblockt. Zur Inkubation der Zellen mit Primärantikörper wurden diese in 0,0005 % Saponin/PBS + 0,2 % Ziegenserum verdünnt und für 1 h bei RT abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal 5 min mit 0,0005 % Saponin/PBS gewaschen und mit Sekundärantikörper verdünnt in 0,0005 % Saponin/PBS + 0,2 % Ziegenserum für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden die Zellkerne in DAPI Lösung (1:2500 in PBS verdünnt) 3 min bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit Fluoromount-G auf Objektträger fixiert und bei 4° C gelagert.

2.10.11 *In vitro* Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Transfizierte Zellen (3×10^4) wurden auf Glasplättchen in 24-well Platten ausgesät und im Brutschrank ü/N inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. 16 h später wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 (Zellen:Bakterien) mit EGFP-transfizierten *L. monocytogenes* für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

zweimal mit PBS gewaschen, 15 min im Dunkeln mit 4 % PFA/PBS Lösung fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Zellkerne wurden mit einer 1:2500 in PBS verdünnten DAPI Lösung für 3 min angefärbt und erneut zweimal gewaschen. Die Glasplättchen wurden schließlich auf Objektträger geklebt und mikroskopiert. Alternativ wurden 3×10^4 stabil überexprimierende mGBP 264.7 RAW Makrophagen oder NIH 3T3 Zellen auf Glasdeckelchen in 24-well Platten ausplattiert und ü/N mit 100 U/ml IFN- γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 16 h wurden die Zellen für 30 min mit Listerien inkubiert, anschließend gewaschen und fixiert. Die intrazellulären Listerien wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt (s. Abschnitt 1.10.10). Kernfärbung und Eindeckeln der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

2.10.12 Kultivierung von virulenten und avirulenten Toxoplasmen

Zur Vermehrung der virulenten BK (Winser et al., 1948; Institut für Medizinische Pathologie, Bonn) und avirulenten ME49 Toxoplasmen (Parmley et al., 1994) wurden die Parasiten in T25 Zellkulturflaschen mit einem Monolayer von HS27 Fibroblasten kultiviert. Nach Vermehrung der Toxoplasmen wurde der Überstand abgenommen, bei 50 x g und 22°C 5 min zentrifugiert und der Überstand mit den Zellresten abgesaugt. Bei einer weiteren Zentrifugation des Überstandes mit 600 x g für 15 min bei 22°C wurden die Parasiten pelletiert. Diese wurden anschließend in frischem IMDM-Zellmedium resuspendiert. Für die weitere Passage wurden $0,5-1,5 \times 10^6$ Parasiten in eine T25 Zellkulturflasche mit HS27 Fibroblasten gegeben.

2.10.13 *In vitro* Infektion mit *Toxoplasma gondii*

3×10^4 Zellen (mGBP transfiziert, stabil exprimierend oder unbehandelt) wurden auf Glasplättchen in 24-well Platten ausgesät und im Brutschrank ü/N inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen im Verhältnis 1:50 (Zellen:Parasiten) mit *T. gondii* (Stamm ME49 oder BK) für 2 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 min im Dunkeln mit 4 % PFA/PBS Lösung fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. GTPasen und intrazelluläre Parasiten wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt (s. Abschnitt 2.10.10).

2.10.14 Bestimmung der Rekrutierungsrate der 65 kDa GTPasen zur parasitophoren Vakuole von *Toxoplasma gondii*

3×10^4 264.7 RAW Makrophagen oder NIH 3T3 Zellen (GFP-mGBP stabil exprimierend oder unbehandelt) wurden, wie unter 2.10.13 beschrieben, ausplattiert, IFN- γ stimuliert und für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die GTPasen und intrazellulären Parasiten mittels Immunfluoreszenz angefärbt (s. Abschnitt 2.10.10). Zur

Bestimmung der Rekrutierungsrate der GTPasen zur PV der Toxoplasmen wurden etwa 10 Gesichtsfelder am Konfokalmikroskop ausgewertet. Dabei wurde die Gesamtzahl der Toxoplasmen bestimmt und die von der GTPase umrundeten Toxoplasmen gezählt.

2.10.15 Bestimmung der *Toxoplasma gondii* Proliferation

3 x 10⁴ mGBP2 defiziente bzw. wildtypische EF Zellen oder GFP-mGBP2 bzw. GFP-mGBP5 stabil transduzierte 264.7 RAW Makrophagen bzw. GFP-Kontrollzellen wurden in 96-well Flachbodenplatten ausplattiert und nach dem Absetzen mit 200 U/ml IFN- γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 24 h wurden 2 x 10⁴ ME49 Toxoplasmen zugegeben und 48 h später 10 μ l ³H-Uracil (1:10; 0,037 MBq/well) zur Proliferationsmessung der Parasiten. Nach weiteren 24 h wurden die Platten zur Abtötung der Zellen und der Toxoplasmen für 24 h bei -20°C gelagert. Die Messung des in die proliferierten Toxoplasmen eingebauten ³H-Uracils erfolgte im Betaplate Liquidscintillationscounter.

2.10.16 Aufnahme von FluoSpheres® durch 264.7 RAW Makrophagen

3 x 10⁴ GFP-mGBP2 stabil transduzierte 264.7 RAW Makrophagen bzw. GFP-Kontrollzellen wurden in 48-well Flachbodenplatten auf Glasplättchen ausplattiert und nach dem Absetzen mit 100 U/ml IFN- γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 16 h wurden 1,5 x 10⁶ fluoreszierende Microspheres (Invitrogen) zu den Zellen gegeben und die Phagozytoserate mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Glasplättchen mit Fluoromount-G auf Objektträger fixiert.

2.11 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.11.1 Isolierung von Plasmid-DNS

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

2.11.2 Isolierung von chromosomaler DNS aus 96-well Platten

Zur genomischen Southern Blot Analyse wurde aus selektierten ES Zellklonen die chromosomale DNS isoliert. Dafür wurden pro well 20 μ l ES Zell Lysepuffer mit 0,4 mg/ml Proteinase K zu den Zellen geben und die Platte über Nacht bei 56°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am

nächsten Tag wurde das Kondensat kurz abzentrifugiert und zur Abkühlung 1 h bei RT inkubiert. Zum Fällern der DNS wurden pro well 100 µl 100 % Ethanol zupipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNS 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend trocknen gelassen und für genomische Southern Blot Analyse verdaut.

2.11.3 Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen oder Schwanzbiopsien

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

2.11.4 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

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

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

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurde die Gelelektrophorese wie oben beschrieben durchgeführt, die gewünschten Banden im Gel jedoch unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten.

Die DNS wurde schließlich aus dem Gelstück mittels eines Gel Extraction Kits (Roche) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Bestimmung von Fragmentgrößen

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

2.11.5 Restriktionsverdau von DNS

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

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

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

2.11.6 Dephosphorylierung von DNS

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

2.11.7 Ligation von DNS-Molekülen

T4-Ligase

Die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNS-Moleküle. Sie kann sowohl überstehende Enden als auch glatte Enden miteinander verknüpfen. Hierfür wurden Vektor und DNS-Insert im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und 2 µl 10-fach Inkubationspuffer und 1 Einheit T4-DNS-Ligase hinzugefügt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Inkubiert wurde bei RT über Nacht.

TOPO TA Cloning® Kit

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

2.11.8 Transformation von *E. coli* Bakterien

CaCl₂ behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden. Hierfür wurden die Bakterienstämme DH5α, Top10 (Invitrogen) oder XL1-Blue (Stratagene) verwendet. 100 µl der kompetenten Bakterien (Lagerung bei -80°C) wurden kurz auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz bzw. etwa 100 ng zirkuläre doppelsträngige DNS zupipettiert. Anschließend wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 Sekunden. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium wurde für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert, um die Expression der plasmidkodierten Antibiotikumresistenz zu ermöglichen. Der Gesamtansatz wurde auf Agarplatten ausplattiert und ü/N bei 37°C unter Selektionsdruck wachsen gelassen.

2.11.9 Southern Blot Analyse

Diese Methode kann zum Nachweis bestimmter DNS-Sequenzen in einem DNS-Fragment dienen (Southern, 1975). Durch DNS/DNS Hybridisierung mit einer komplementären Sonde können die gesuchten DNS-Sequenzen markiert und anschließend detektiert werden.

Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen

Nach dem Restriktionsverdau der DNS werden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlung werden die

Fragmente denaturiert. Mittels eines Kapillarblots werden sie auf eine Nylonmembran transferiert, so dass ein Abbild des Fragmentmusters des Agarosegels auf der Membran entsteht. Nach dem Restriktionsverdau wurden 20 µg genomische DNS in einem 0,8 % Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (30V/ü/N) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur partiellen Depurinierung 15 min in 0,25 N HCl geschwenkt und zur Denaturierung und Spaltung an den depurinierten Stellen 30 min in 0,4 N NaOH.

Aufbau des Kapillarblots:

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

Der Kapillarblot wird mit etwa 0,5 kg beschwert und ü/N bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung durch das Zellstoffpapier gesaugt und die DNS-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und anschließend die DNS durch Backen für 30 min bei 80°C auf der Nylonmembran fixiert.

Radioaktive Markierung der Sonde

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wird das Klenow-Fragment verwendet, welches an einzelsträngiger DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten zu unmarkierten Nukleotiden wird die neusynthetisierte DNS markiert. Zur Markierung von Sonden wurde das Ladderman™ Labeling Kit (TaKaRa) nach Herstellerangaben verwendet. 25 ng DNS wurden mit 2 µl Random Primer und TE Puffer auf 14 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für 5 min bei 95°C gekocht und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 µl 10 x Puffer, 2,5 µl dNTP Mix, 1 MBq ³²P-dCTP und 1 µl *Bca* DNS Polymerase erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 55°C. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden anschließend mit Microspin S-200 Säulchen (Amersham) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/DNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären nachzuweisenden chromosomalen DNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybrid-Moleküle

können durch anschließende Detektion der Markierung sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde die Membran mind. 1 h bei 60°C in 10 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyb, BD) prähybridisiert und dann die markierte, hitzedenaturierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 60°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min bei RT mit Lösung I und einmal 15 min bei 50°C mit Lösung II gewaschen. Spezifisch gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe von Kodak Biomax MS Film detektiert.

2.11.10 Isolierung gesamtzellulärer RNS

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

2.11.11 cDNS Synthese aus gesamtzellulärer RNS

Bei der cDNS Synthese wird mRNA von Zellen oder Gewebeproben in cDNA enzymatisch umgeschrieben. Hierbei werden die molekularen Verhältnisse der Transkripte nicht verändert, weswegen die entstehende cDNA zur Expressionsquantifizierung mittels semiquantitativer RT-PCR oder Realtime RT-PCR eingesetzt werden kann. Zusätzlich wurden die cDNA-Proben als Ausgangsmaterial zur Klonierung von Expressionskonstrukten verwendet.

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

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

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

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

cDNA Proben aus Milz von *L. monocytogenes* infizierten C57BL/6 Mäusen und Kontrollmäusen wurden freundlicherweise von Dipl. Biol. Cornelia Beuter-Gunia, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

2.11.12 Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR

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

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

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

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

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

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

2.11.13 Realtime RT-PCR

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

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

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

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

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

Schritte 2 bis 3 wurden zyklisch 40-mal wiederholt.

2.11.14 Mutagenese-PCR

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

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

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

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

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

Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch 12-18 mal in Abhängigkeit von der eingefügten Mutation wiederholt. Für eine Punktmutation werden 12 Zyklen, für einen einzelnen Aminosäureaustausch 16 Zyklen und für eine Insertion oder Deletion mehrerer Aminosäuren 18 Zyklen vom Hersteller angegeben. Nach der Amplifikation wurden die Produkte für 1 h bei 37°C mit *DpnI* verdaut, um die methylierten, nicht-mutierten Templates zu fragmentieren. Anschließend wurde 1 µl der DNS zu den kompetenten XL1-Blue Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dem

Hitzeschock (45 sek., 42°C) und 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt und 250 µl auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausplattiert.

2.12 Protein-biochemische Methoden

2.12.1 Extraktion von Proteinen aus Organen

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

2.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

2.12.3 Western Blot Analyse

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

Angaben des Antikörperherstellers verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper abzuwaschen wurde der Blot bei RT für 15 min bei mehrmaligem Wechsel des Waschpuffers (TBS-T) gewaschen. Der Meerettich Peroxidase gekoppelte Sekundär-Antikörper wurde ebenfalls in 3 % Milchpulver gelöst und für 2 h mit der Membran inkubiert und im Anschluss mehrmals insgesamt 30 min gewaschen. In der Dunkelkammer erfolgte die Proteindetektion mit Chemolumineszenzlösung (ECL, Amersham, Braunschweig) mit anschließender Exposition und Entwicklung des durch Chemolumineszenz belichteten Films.

2.12.4 Immunpräzipitation

Zum Nachweis der Interaktion der GTPasen wurde die Methode der Immunpräzipitation angewendet. Hierfür wurden GFP-mGBP bzw. GFP stabil exprimierende NIH 3T3 Zellen ü/N mit 100 U/ml IFN- γ stimuliert, um die endogene GTPasen Expression zu induzieren. Nach 16 h wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Lysepuffer lysiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 UpM wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 5 μ l polyklonaler mGBP Antikörper zugegeben und ü/N bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die Protein-G-Sepharose 2-mal mit Lysepuffer gewaschen und pro Ansatz 60 μ l Protein-G-Sepharose zu den Lysaten gegeben und für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Lysepuffer wurde das Pellet vollständig trocken gesaugt und mit 30 μ l 5 x Auftragspuffer versehen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht, anschließend für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand erneut in ein frisches Gefäß überführt. Es wurden je 15 μ l auf ein SDS-Gel (4 % - 12 %) aufgetragen und, wie unter 2.12.3 beschrieben, ein Western Blot durchgeführt. Zum Proteinnachweis wurde mit anti-GFP Antikörper gefärbt.

2.12.5 Durchflußzytometrische Färbung und Analyse

Die durchflußzytometrische Analyse ermöglicht es, Oberflächenmoleküle auf einzelnen Zellen zu detektieren. Dabei binden Antikörper spezifisch an bestimmte Moleküle. Diese Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt welcher durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge Licht einer anderen speziellen Wellenlänge emittiert. Durch Laser werden die Farbstoffe angeregt und die Intensität des emittierten Lichts in einem Detektor gemessen. In dieser Arbeit wurden PE und FITC konjugierte Antikörper verwendet. PE und FITC werden mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt wobei PE bei der Wellenlänge 575 nm und FITC bei der Wellenlänge 517 nm detektiert werden. Zunächst wurden 2×10^5 Zellen/well pro Färbung in eine 96-well Platte gegeben. Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern wurden 10 μ l FC-Block zugegeben und die Zellen 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde der

spezifische Antikörper in einem Volumen von 30 µl zupipettiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und im Dunkeln erfolgte ein Waschschrift mit 150 µl FACS Puffer, fünfminütiger Zentrifugation mit 1200 Upm bei 4°C, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für die Messung wurden die Zellen in 300 µl FACS Puffer aufgenommen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software CellQuest Version 3.1 (FACS-Calibur, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg).

Für die Analyse der mGBP2 defizienten Mäuse wurden folgende Färbungen angesetzt:

Organ	Färbung	Funktion
Thymus	CD4/CD8	Reifungsstadium der T-Zellen
	CD25/CD44/CD4/CD8	T-Zellentwicklung (DN1-DN4)
Milz	B220/CD3	Verhältnis B-Zellen:T-Zellen
	CD4/CD8	Subpopulation der T-Zellen
	CD69/CD4	Aktivierungszustand der T-Zellen
	CD69/CD8	Aktivierungszustand der T-Zellen
	IgM/B220	Reifungsgrad der B-Zellen
	Gr1/Mac1	Anzahl Granulozyten, Makrophagen
	IgD/IgM	Reifungsgrad der B-Zellen
	CD23/IgM	MZB (marginal zone B cells)
KM	B220/IgM	Anzahl pro-B-Zellen
	Mac1/Gr1	Anzahl Granulozyten, Makrophagen
	IgD/IgM	Anzahl immature B-Zellen
	CD43/CD19	Anzahl prä-B-Zellen
PEC	Mac1	Anzahl Makrophagen
	Mac1/Gr1	Anzahl Granulozyten, Makrophagen
	Mac1/CD5	Anzahl B1-Zellen

Tabelle 2.14: Durchgeführte durchflußzytometrische Immunfluoreszenzfärbungen.

2.13 Computerprogramme

2.13.1 Klonierungsstrategien

Strategien zur Klonierung von Expressions- und Rekombinationsvektoren wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI Advance™ von Invitrogen erstellt.

2.13.2 Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm SeqMen von DNASTar durchgeführt.

2.13.3 Alignment

Das Alignment der GTPasen wurde mit der ClustalW Software und das Layout mit der JalView Software durchgeführt.

2.13.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung von Daten wurde das Programm SigmaPlot 8.0 verwendet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Standard t-Tests für gepaarte Daten. Alle Daten wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist, das heißt wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5 % liegt.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen der 65 kDa GTPasen mGBP1 bis mGBP5

3.1.1 Expression von mGBP1 bis mGBP5 in Zelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene wurden erstmals 2002 von Nguyen et al. (Nguyen et al., 2002) als durch IFN- γ und LPS in 264.7 RAW Makrophagen regulierte Gene beschrieben. Die bisher für murine GTPasen gezeigten Daten beruhten jedoch größtenteils auf RNS und cDNS gestützte Analysen, so dass eine Verifizierung der Ergebnisse auf Proteinebene noch ausstand. Zudem fehlten Daten, die eine koordinierte Analyse der GTPasen mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP4 und mGBP5 auf Stimulation mit verschiedenen Zytokinen, TLR-Agonisten und Infektionen unter Einschluss des verwendeten Signalwegs zeigten.

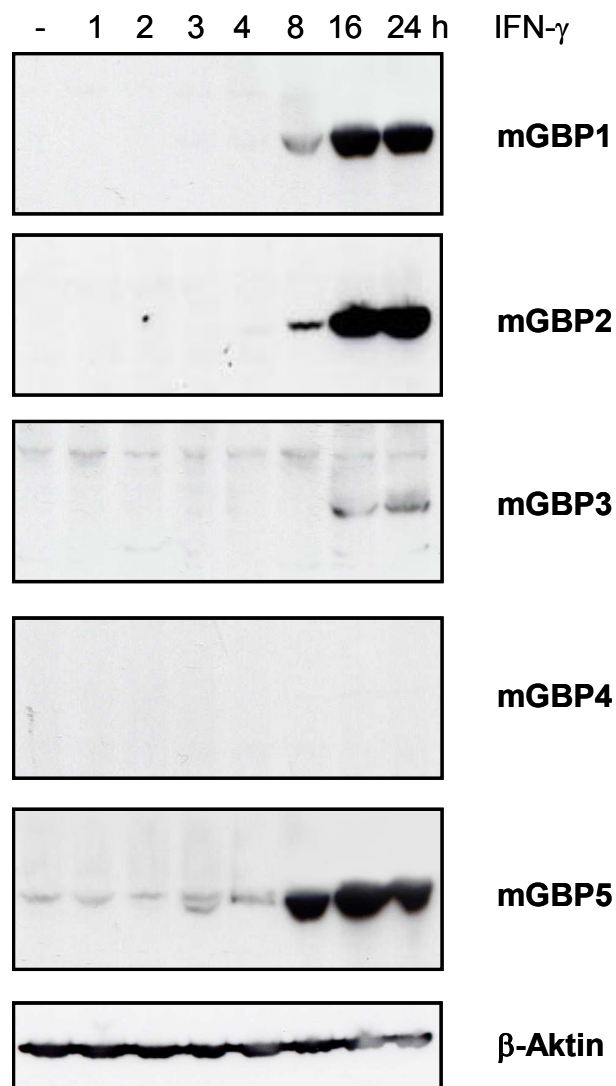


Abb. 3.1: Expression von mGBP1 bis mGBP5 Proteinen in IFN- γ stimulierten 264.7 RAW Makrophagen. Makrophagen wurden mit IFN- γ stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten Zelllysate hergestellt. Diese wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und auf Membranen geblottet. Die mGBPs wurden mit Peptid-spezifischen, Affinitäts-gereinigten Kaninchen anti-mGBP Antikörpern detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um zu zeigen, dass mGBP1 bis mGBP5 auch als Proteine exprimiert werden und wie schnell die Expression der Gene durch IFN- γ induziert wird, wurden 264.7 RAW Makrophagen für unterschiedlich lange Zeitintervalle mit IFN- γ stimuliert und Western Blot Analysen durchgeführt. Zum Nachweis der Proteinexpression wurden mGBP-spezifische Antikörper hergestellt und mit Hilfe von GFP-mGBP Fusionskonstrukten auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet (Daten nicht gezeigt). Zur Vergleichbarkeit der Proteinexpressionen der einzelnen GTPasen untereinander wurden jeweils das gleiche Lysat und die gleiche Proteinmenge eingesetzt.

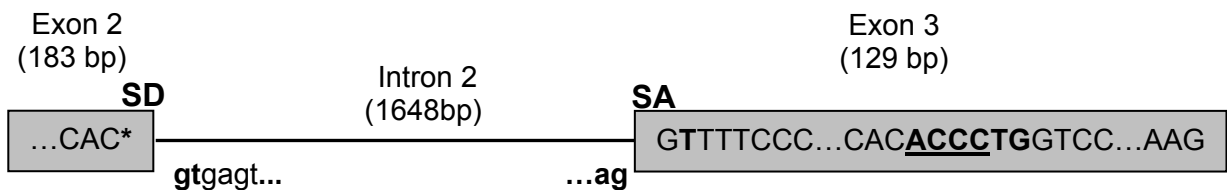
Acht Stunden nach IFN- γ Stimulation der 264.7 RAW Makrophagen konnte sowohl für mGBP1, mGBP2 und mGBP5 eine Proteininduktion beobachtet werden, die sich nach 16 Stunden Stimulation erheblich steigerte (Abb. 3.1). Die Proteinexpression von mGBP3 trat etwas verzögert auf, hier konnte erstmals nach 16 Stunden IFN- γ Stimulation Protein nachgewiesen werden. Obwohl in früheren Publikationen (Nguyen et al., 2002) mGBP4 cDNS in hohem Maße als IFN- γ induzierbar angegeben wurde, konnte trotz eines spezifischen Antikörpers kein Protein für mGBP4 in 264.7 RAW Makrophagen detektiert werden (Abb. 3.1). Auch in anderen Zelllinien oder Primärzellen war es nicht möglich, ein detektierbares Level an mGBP4 Protein zu erhalten (Abb. 3.4 und Daten nicht gezeigt).

Um diesen Gegensatz zu klären, wurden intensive cDNS und Datenbank Analysen durchgeführt.

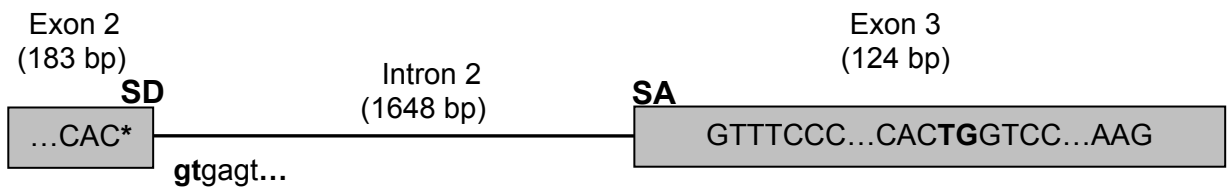
3.1.1.1 Spleißvarianten von mGBP4

Zur Identifizierung der Sequenz von mGBP4 wurden PCR-Analysen mit spezifischen mGBP4 Primern an cDNS von ANA-1 Makrophagen, 264.7 RAW Makrophagen und der Milz von Listerien infizierten Mäusen vorgenommen. Die amplifizierten Transkripte wurden in TA-Vektoren kloniert und sequenziert. Überraschenderweise entsprach keines der Transkripte der publizierten Version in der NCBI-Datenbank (GenBank M_81128; (Wynn et al., 1991)). Demnach sollten nach den „GT“-Nukleotiden des Spleißakzeptors im Exon 3 drei weitere T-Nukleotide folgen und zusätzlich im Exon 3 die vier Nukleotide „ACCC“ enthalten sein (Abb. 3.2 A). Stattdessen traten zwei Spleißvarianten auf, die sowohl in cDNS aus ANA-1 Makrophagen als auch aus Milzen Listerien infizierter C57BL/6 Mäuse gefunden wurden. Die Spleißvarianten entstanden durch die Nutzung unterschiedlicher Spleißdonoren im Exon 2, die durch die Deletion eines „G“ am Ende des Exon 2 generiert wurden (in Abb. 3.2 mit „*“ markiert). Dieses „G“ ist in allen bekannten GTPasen konserviert. Die Nutzung des zweiten Spleißdonors trat wesentlich seltener auf. Es handelt sich dabei nach der Definition von Freund et al. (Freund et al., 2005) um einen „schwachen“ Spleißdonor, wodurch das relativ seltene Auftreten dieses Transkriptes erklärt werden kann. Keine der beiden Spleißvarianten wies die vier aufeinander folgenden „T“-Nukleotide und die „ACCC“ Sequenz im Exon 3 auf. Nachfolgende Datenbank, BAC-Analysen (RP24-210D14) und EST-Analysen bestätigten die Sequenz mit nur drei „T“-Nukleotiden zu

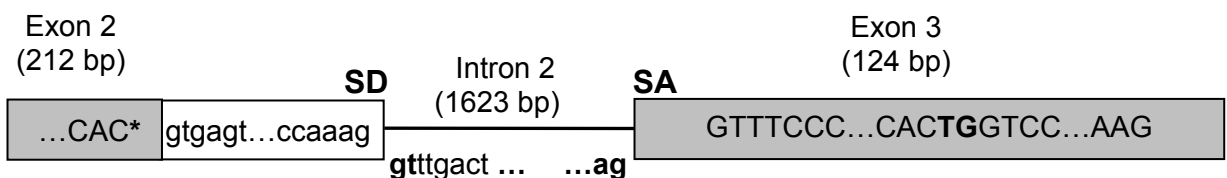
Beginn von Exon 3 und dem Fehlen der „ACCC“ Sequenz in der Mitte von Exon 3, da diese Nukleotide auf dem BAC RP24-210D14 nicht vorhanden waren. Die Spleißvariante, die den ersten Donor als Spleißstelle verwendet, wird im Folgenden als „mGBP4“ (Abb. 3.2 B) bezeichnet und die Variante, die an dem schwachen zweiten Donor spleißt als „mGBP4.1“ (Abb. 3.2 C). Die beiden Varianten wurden mit den Nummern EF494423 (mGBP4.1) und EF494424 (mGBP4) in die NCBI-Datenbank gestellt.

A

-> Volllänge NCBI-Datenbank

B

-> STOP nach 312 bp

C

-> Volllänge

Abb. 3.2: Schematische Darstellung der mGBP4 Spleißvarianten. cDNS von ANA-1, 264.7 RAW Makrophagen und aus der Milz von *Listeria monocytogenes* infizierten Mäusen wurde in TA-Vektoren kloniert und sequenziert. Es konnten zwei Spleißvarianten identifiziert werden, die durch die Nutzung unterschiedlicher Spleißdonoren des Exon 2 zustande kommen. Dieser Sequenzabschnitt ist in der Abbildung durch fette Buchstaben hervorgehoben. *: fehlendes „G“ an der Spleißdonorstelle des Exon 2. **(A)** Sequenz von mGBP4, wie sie in der NCBI-Datenbank publiziert ist (M81128). **(B)** Sequenz von mGBP4 (EF494424), das zu einer trunkeierten Variante führt und **(C)** die Sequenz von mGBP4.1 (EF494423), welche theoretisch ein Volllängenprotein ergeben würde.

Die volle cDNS Länge von mGBP4 entspricht 4509 Basenpaaren und hat einen 312 Basenpaar langen offenen Leserahmen ausgehend von Nukleotid 132 bis 443. mGBP4 kodiert für ein trunkeiertes Protein von 104 Aminosäuren und beinhaltet das G1-Bindemotiv. Die Volllängen cDNS von mGBP4.1 besteht aus 4538 Basenpaaren und hat einen offenen Leserahmen von 1896 Basenpaaren von Nukleotid 132 bis 2027. Somit codiert mGBP4.1 für ein Protein von 632

Aminosäuren, dem jedoch das G2 Motiv fehlt. Durch die Deletion des „Gs“ in Position -1 im Spleißdonorbereich von Exon 2 kommt es zur Verschiebung des Leserahmens. Bei der Variante mGBP4 führt dies zu einem frühzeitigen Abbruch nach 312 Basenpaaren, hervorgerufen durch ein STOP-Codon in Exon 4. Im Gegensatz dazu führt die Verwendung des schwachen Spleißdonors bei mGBP4.1 zu einem Einschub von 28 Basenpaaren des Introns 2 und einem Abschnitt von 36 Aminosäuren, der nicht homolog zu den anderen GTPasen ist. Dadurch wird das G2-Motiv zerstört.

Um herauszufinden, ob und in welchen Mengenverhältnissen die beiden Spleißvarianten von mGBP4 auftreten, wurde eine RT-PCR etabliert, die die beiden Varianten spezifisch unterscheiden kann. Als Template diente cDNS aus der Leber von *Listerien* infizierten Mäusen.

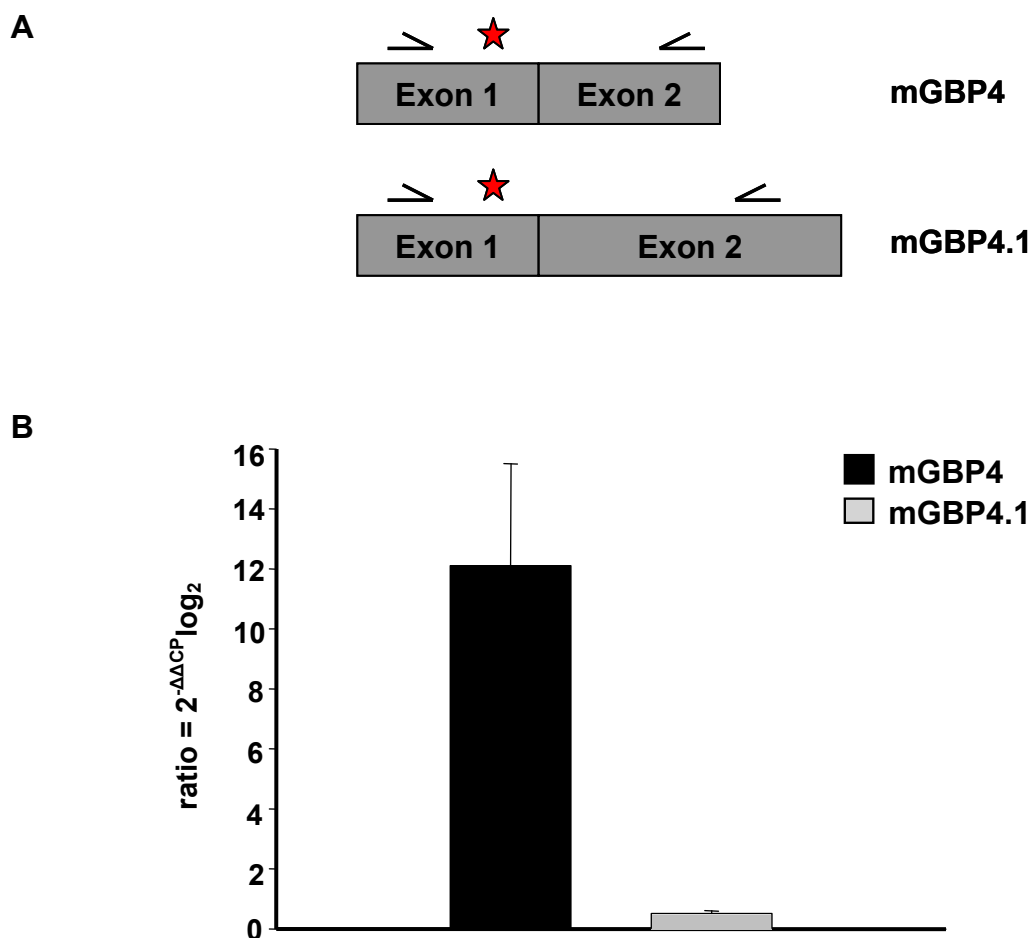


Abb. 3.3: Expression der mGBP4 Spleißvarianten. (A) Schematische Darstellung der Primer- ($\angle$ $\rightrightarrows$) und Sondenbindungsstellen (★) in den Spleißvarianten mGBP4 und mGBP4.1. (B) Aus der Leber *L. monocytogenes* infizierter Mäuse (48 h) wurde die Gesamt-RNS präpariert, revers transkribiert und eine RT-PCR Analyse basierend auf der UniversalProbeLibrary durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine Expression relativ zu uninfizierten Mäusen und normalisiert auf β -Aktin. mGBP4: trunkierte Variante; mGBP4.1: Volllängen-Variante.

Die Abbildung 3.3 zeigt die Induktion der Expression der verschiedenen mGBP4 Spleißvarianten in der Leber *Listeria monocytogenes* infizierter Mäuse im Vergleich zu uninfizierten Mäusen.

Lediglich die trunkierte mGBP4 Spleißvariante zeigte eine 14-fache Induktion der Expression in den infizierten im Vergleich zu uninfizierten Mäusen. mGBP4.1 wurde nicht induziert, was darauf hinweist, dass es sich bei dem alternativ genutzten Donor um eine sehr schwache Spleißstelle handelt.

Um festzustellen, ob die RNS der trunkierten mGBP4 Variante translatiert wird, wurde ein zweiter Antikörper spezifisch gegen den N-terminalen Bereich von mGBP4 und mGBP4.1 etabliert. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen, konnte keine der beiden Varianten in Milzlysaten *L. monocytogenes* infizierter Mäuse detektiert werden (Spur 2), obwohl Lysate von GFP-mGBP4.1 (Spur 3) und GFP-mGBP4 (Spur 4) transfizierten 293T Zellen als Positivkontrolle ein deutliches Signal zeigten.

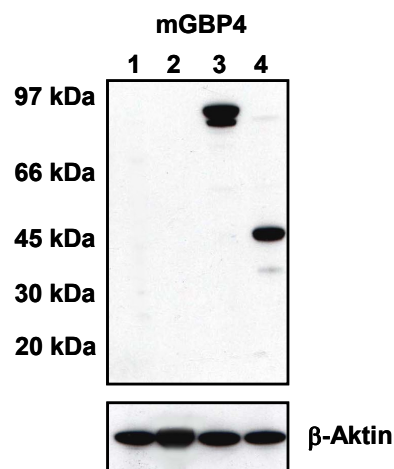


Abb. 3.4: Expression von mGBP4 und mGBP4.1. C57BL/6 Mäuse wurden mit *L. monocytogenes* infiziert, nach 48 h die Milzen entnommen, homogenisiert und Proteinlysate angefertigt, die im Western Blot auf eine mGBP4 und mGBP4.1 Expression untersucht wurden (2). Kontrollmäuse wurden nicht infiziert (1). Als Positivkontrolle des N-terminalen mGBP4/4.1 Antikörpers dienten Proteinlysate von GFP-mGBP4.1 (3) und GFP-mGBP4 (4) transfizierten 293T Zellen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse belegen, dass beide Varianten von mGBP4 auf Grund einer Mutation in der Spleißdonorstelle im Exon 2 nicht zu funktionellen Proteinen translatiert werden. Daher wurde diese GTPase im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter charakterisiert.

3.1.2 Expression der mGBPs nach Stimulation mit Zytokinen und TLR-Agonisten

Um die Expression der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 näher zu charakterisieren, wurden intensive Analysen in weiteren Zelllinien und primären Zellen vorgenommen. So wurde geprüft, ob mGBP1, 2, 3 und 5 auch durch weitere Zytokine und TLR-Agonisten in der Expression veränderbar sind. Hierfür wurden, analog zu dem in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Versuch, 264.7 RAW Makrophagen über 16 Stunden mit IFN- γ (100 U/ml), IFN- β (10 ng/ml), TNF (10 ng/ml),

IFN- γ und TNF, Interleukin-2 (IL-2; 10 ng/ml), Interleukin-1 β (IL-1 β ; 10 ng/ml), Listerien LTA (1 μ g/ml), LPS (100 ng/ml), CpG ODN 1668 (1 μ M) und Poly (I:C) (pI:C; 1 μ g/ml) stimuliert, die Zellen lysiert und Western Blot Analysen mit den für mGBP1, 2, 3 und 5 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Stimulationskontrolle diente der Antikörper Phospho-p38, der die Kinase nur dann detektiert, wenn sie nach Stimulation phosphoryliert wurde. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet (Abb. 3.5).

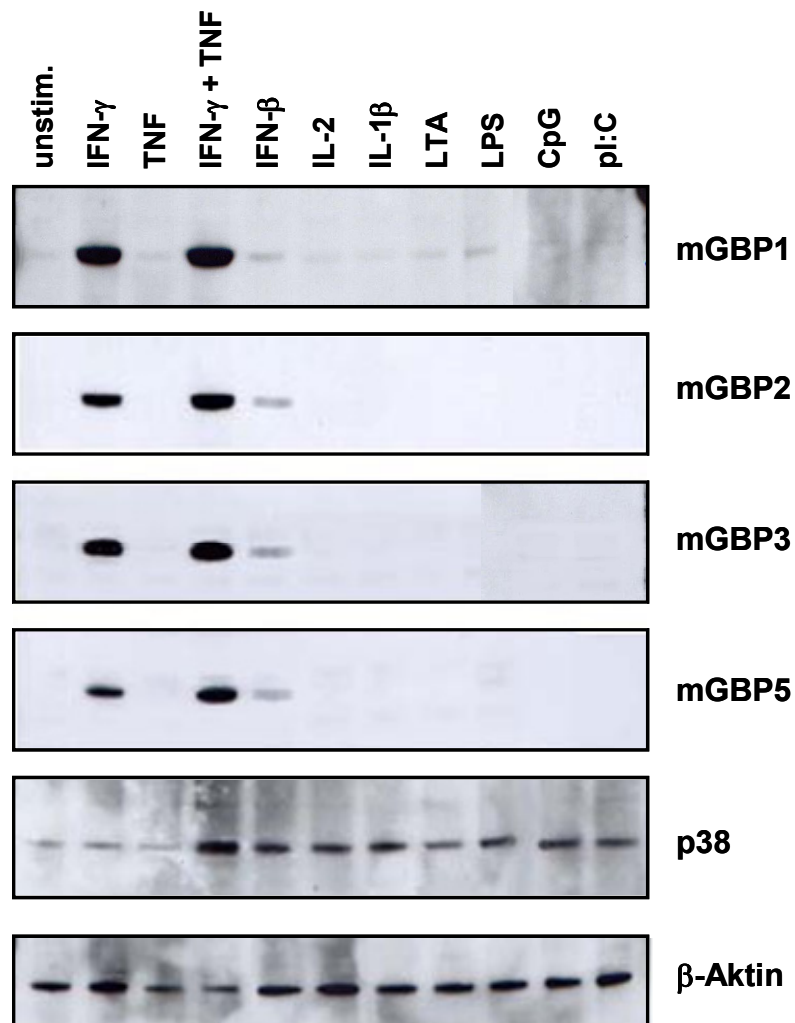


Abb. 3.5: Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in Makrophagen nach Stimulation mit Zytokinen und TLR-Agonisten. 264.7 RAW Makrophagen wurden für 16 h mit IFN- γ (100 U/ml), IFN- β (10 ng/ml), TNF (10 ng/ml), Interleukin-2 (IL-2; 10 ng/ml), Interleukin-1 β (IL-1 β ; 10 ng/ml), Listerien LTA (1 μ g/ml), LPS (100 ng/ml), CpG ODN 1668 (1 μ M) und Poly (I:C) (1 μ g/ml) stimuliert, die Zellen lysiert und WB Analysen durchgeführt. β -Aktin diente als Ladekontrolle und der Antikörper p38, der nur aktivierte, phosphorylierte Kinase erkennt, als Stimulationskontrolle.

Hierbei wurde deutlich, dass neben IFN- γ auch IFN- β , wenn auch nur in sehr geringem Maße, eine Auswirkung auf die Expression aller vier GTPasen hat. Die Zytokine TNF und IL-1 β , welche ebenfalls aktivierend auf Makrophagen wirken, bzw. IL-2 als Negativkontrolle, führten zu keiner Induktion der Genexpression von mGBP1, 2, 3 und 5. Die simultane Stimulation von IFN- γ mit

TNF zeigte allenfalls einen geringfügigen synergistischen Effekt. Die TLR-Agonisten LTA, LPS, CpG und pI:C zeigten keinen Effekt auf die Expression von mGBP2, 3 und 5. mGBP1 wurde durch LPS leicht induziert, jedoch ebenfalls nicht durch LTA, CpG und pI:C.

3.1.3 Expression der 65 kDa GTPasen in primären Zellen

Da die Expression der 65 kDa GTPasen nicht nur in Zelllinien wie 264.7 RAW Makrophagen (Abschnitt 3.1.1), NIH 3T3, PAM212, EL4 und A20 Zellen (Daten nicht gezeigt), sondern auch in primären Zellen nachgewiesen werden sollte, wurden Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen für 16 Stunden mit IFN- γ stimuliert und eine Western Blot Analyse mit dem spezifischen polyklonalen mGBP2 Antikörper durchgeführt.

Basal trat keine Expression von mGBP2 in unstimulierten Zellen auf, wohingegen in den IFN- γ stimulierten primären Milzzellen eine deutliche Expression von mGBP2 gezeigt werden konnte (Abb. 3.6).

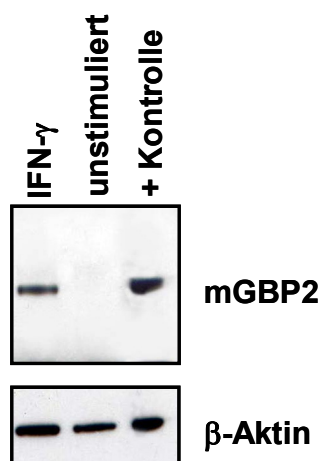


Abb. 3.6: Expression von mGBP2 in primären Zellen nach IFN- γ Stimulation. Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden für 16 h mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert, lysiert und eine WB Analyse durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden IFN- γ stimulierte 264.7 RAW Makrophagen verwendet, β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um auch die Induktion der mGBP2 Expression in primären Zellen durch andere Zytokine und TLR-Agonisten zu untersuchen, wurden die Milzzellen über 16 Stunden mit IFN- γ (100 U/ml), IFN- β (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Concanavalin A (ConA; 4 μ g/ml), PMA/Ionomycin (50 μ g/ml/1 μ g/ml) und mit ConA+LPS+IFN- γ stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen, die ansonsten identisch behandelt wurden (Abb. 3.7).

Wie in Abbildung 3.7 zu sehen, wurde mGBP2, wie in den 264.7 RAW Makrophagen, durch IFN- γ und IFN- β Stimulation induziert, wobei die Induktion durch IFN- β wesentlich schwächer ausfiel als durch IFN- γ . Der TLR-Agonist LPS führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Proteinexpression. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen der LPS stimulierten 264.7 RAW Makrophagen (Abb. 3.5), allerdings handelt es sich in diesem Versuch um

Gesamtmilzzellen, die aus vielen verschiedenen Zelltypen (z.B. B-Zellen/T-Zellen) besteht. Neben Makrophagen sind somit auch andere Zelltypen, wie zum Beispiel B-Zellen in der Lage auf LPS zu reagieren und mGBP2 zu exprimieren. Da das Mitogen ConA, welches primär T-Zellen aktiviert, ebenfalls zu einer mGBP2 Expression führte, können wahrscheinlich auch T-Zellen diese GTPase exprimieren. Diese Annahme wird durch die Induzierbarkeit von mGBP2 durch PMA/Ionomycin bestärkt. Mitogene wie PMA/Ionomycin sind ebenfalls potente Induktoren der Aktivierung und Proliferation von T- und auch B-Lymphozyten. PMA aktiviert die Protein Kinase C θ (PKC θ) und stimuliert damit die Wirkung von Diacylglycerol als Bestandteil von Glycolipid-angereicherten Mikrodomänen in der Plasmamembran. In Kombination mit Ionomycin, einem Kalziumionophor, führt PMA zur Aktivierung der Zellen unter Umgehung des Antigen-Rezeptors. PMA/Ionomycin regulierte mGBP2 zu einem mit IFN- β vergleichbaren Level hoch. Eine kombinierte Stimulation von primären Milzzellen mit ConA, LPS und IFN- γ zeigte eine geringfügige Steigerung der Proteinmenge gegenüber einzeln stimulierten Zellen.

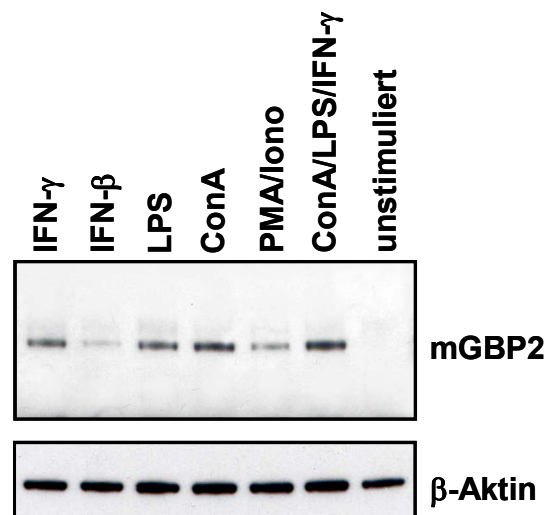


Abb. 3.7: Expression von mGBP2 in primären Zellen nach verschiedenen Stimuli. Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden für 16 h mit IFN- γ (100 U/ml), IFN- β (10 ng/ml), LPS (100 μ g/ml), ConA (4 μ g/ml), PMA/Ionomycin (50 μ g/ml/1 μ g/ml) und mit ConA+LPS+IFN- γ stimuliert, lysiert und eine WB Analyse durchgeführt. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Stimulation der Gesamtmilzzellen deutet daraufhin, dass neben Makrophagen auch B- und T-Zellen mGBPs exprimieren können. Um dies genauer zu untersuchen, wurden B- und T-Zellen aus Lymphknoten und Milzen isoliert und stimuliert.

3.1.4 Expression der 65 kDa GTPasen in B- und T-Zellen

Wie das vorangehende Experiment gezeigt hat, wurde mGBP2 Protein neben IFN- γ auch durch andere Zytokine und TLR-Agonisten in Milzzellen der Maus induziert. Um zu differenzieren, welche Subpopulationen neben Makrophagen GTPasen exprimieren können, wurden B- und T-

Zellen aus Lymphknoten und Milzen von C57BL/6 Mäusen isoliert, stimuliert und im Western Blot analysiert (Abb. 3.8).

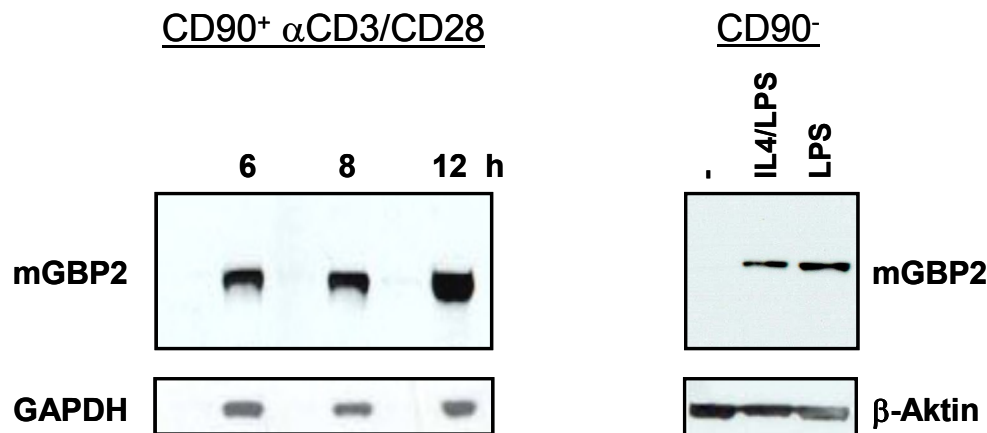


Abb. 3.8: Expression von mGBP2 in CD90⁺ und CD90⁻ Zellen. Aus Lymphknoten und Milzen von C57BL/6 Mäusen wurden T-Zellen aufgereinigt und sowohl die T-Zellen als auch die CD90⁻ Zellen (16 h) stimuliert, lysiert und eine WB Analyse durchgeführt. β-Aktin bzw. GAPDH dienten als Ladekontrolle.

In den T-Zellen (CD90⁺) konnte bereits sechs Stunden nach α-CD3/CD28 Stimulation (je 0,5 µg/ml) mGBP2 Protein detektiert werden. Eine Stimulation über ein längeres Zeitintervall erhöhte die Proteinmenge nicht. Unstimulierte Zellen zeigten keine basale mGBP2 Expression. Somit sind auch T-Zellen in der Lage nach Stimulus mGBP2 zu exprimieren. In der CD90⁻ Fraktion (überwiegend B-Zellen) konnte nach 16-stündiger Stimulation mit LPS (100 ng/ml) beziehungsweise IL-4/LPS (IL-4: 10 µg/ml) eine deutliche Induktion des mGBP2 Proteins nachgewiesen werden, wobei kein synergistischer Effekt der beiden simultan gegebenen Stimuli zu erkennen war. Da neben den T-Zellen in den Follikeln der Milz hauptsächlich B-Zellen auftreten, wurde zusätzlich die Fähigkeit von B-Zellen mGBP2 hoch zuregulieren untersucht. Hierfür wurden die B-Zellen durch eine B220⁺ Selektion aufgereinigt und anschließend mit PMA/Ionomycin, IL-4/LPS und IgM stimuliert (Abb. 3.9).

Nach 16-stündiger Stimulation der B220⁺ Zellen mit PMA/Ionomycin zeigte sich eine deutliche Expression des mGBP2 Proteins. IL-4/LPS und IgM Stimulus führten lediglich nach 16 Stunden zu einer schwachen Induktion der GTPase, was mit den Beobachtungen der IL-4/LPS stimulierten CD90⁻ Zellen (siehe Abb. 3.8) übereinstimmt. Eine Stimulation für jeweils nur eine Stunde reichte offensichtlich nicht aus, um mGBP2 hoch zuregulieren, was eher für eine sekundäre, verzögerte Antwort spricht. Interessanterweise waren mGBP3 und 5 im Gegensatz zu mGBP2 bereits in unstimulierten Zellen nachzuweisen. Dieser basale Proteinlevel konnte durch eine Stimulation für 16 Stunden mit PMA/Ionomycin bei mGBP3 und mGBP5 angehoben werden, während IL-4/LPS und IgM Stimulation lediglich die Expression von mGBP5 steigern konnte.

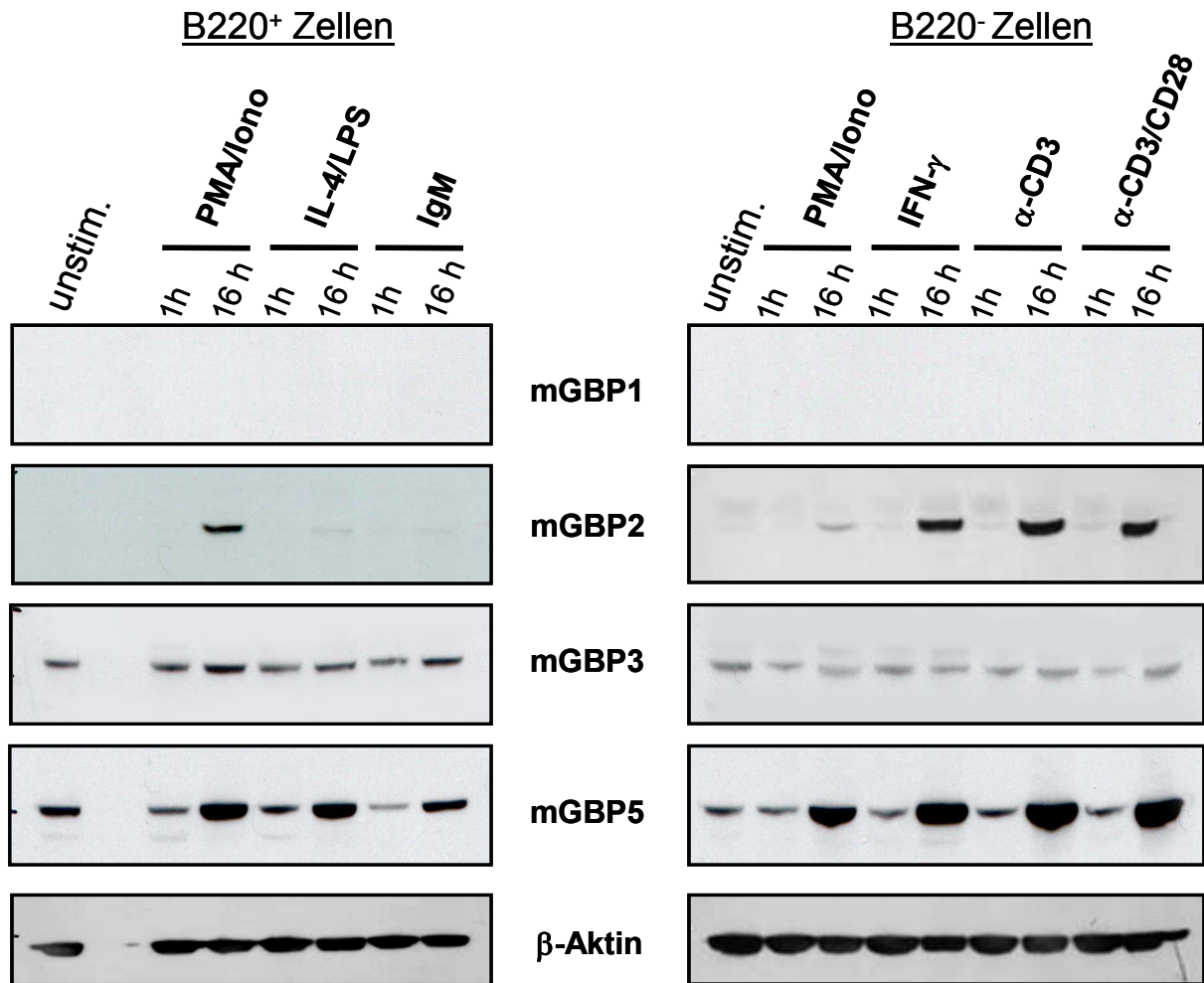


Abb. 3.9: Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in B220⁺ und B220⁻ Zellen. Aus Lymphknoten und Milzen von C57BL/6 Mäusen wurden B-Zellen aufgereinigt, sowohl die B-Zellen als auch die B220⁻ Zellen für 1 bzw. 16 h stimuliert, lysiert und eine WB Analyse durchgeführt. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die B220⁻ Fraktion, die überwiegend aus Makrophagen und T-Zellen besteht, wurde ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, nach Stimulation eine oder mehrere GTPasen zu exprimieren. In Kongruenz zu den stimulierten 264.7 RAW Makrophagen induzierte IFN- γ auch hier eine starke GTPase Antwort: 16 Stunden nach Stimulation zeigte sich sowohl eine deutliche mGBP2 als auch eine mGBP5 Expression. Nur die mGBP3 Proteinmenge stieg nicht über den basalen Level unstimulierter Zellen. Offenbar sind T-Zellen nicht die Hauptproduzenten von mGBP3, denn auch α -CD3 und Kostimulation mit α -CD28 führte nicht zu einem nennenswerten mGBP3 Anstieg, wie er bei mGBP2 und mGBP5 beobachtet werden konnte. Allerdings ließ sich hier ebenfalls kein synergistischer Effekt auf die Expression bei simultaner Gabe beider Stimulanzen erkennen. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin der B220⁻ Fraktion verursachte lediglich eine Aktivierung der Promotoren von mGBP2 und mGBP5. Wie auch schon bei den B220⁺ Zellen wiesen mGBP3 und mGBP5 einen basalen Proteinlevel in den unstimulierten Zellen auf. Zusätzlich kann die Aussage getroffen werden, dass eine einstündige Stimulation der Zellen jeweils nicht ausreichte, um eine Expression der GTPase zu induzieren.

Somit lässt sich belegen, dass die GTPase Expression nicht nur auf Makrophagen beschränkt ist, sondern auch in lymphoiden Zellen des Immunsystems induzierbar ist.

Bemerkenswerterweise konnten weder die primären B-Zellen noch die in der B220⁺ Fraktion enthaltenen T-Zellen und Makrophagen aus C57BL/6 Mäusen eine mGBP1 Expression induzieren, obwohl eine deutliche Proteinproduktion in 264.7 RAW Makrophagen zu detektieren war. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Publikationen überein, in denen beschrieben wurde, dass ein Maustamm-spezifischer Unterschied in der Expression von mGBP1 existiert (Staeheli et al., 1984; Asundi et al., 1994; Vestal et al., 1998). Demnach ist z.B. in BALB/c Mäusen ein funktionelles mGBP1 Allel vorhanden, jedoch nicht in C57BL/6 Mäusen. Da 264.7 RAW Makrophagen ursprünglich aus der Mauslinie BALB/c abgeleitet wurden, konnte nach Stimulation dieser Zellen eine mGBP1 Expression festgestellt werden, jedoch nicht nach Stimulation von ANA-1 Zellen (aus C57BL/6 Mäusen isoliert) und primären Zellen aus C57BL/6 Mäusen, denen ein responsives Allel für mGBP1, laut Publikation, fehlt.

Um diese Aussage zu unterstützen wurden primäre Knochenmarksmakrophagen und Dendritische Zellen aus C57BL/6 Mäusen ausgereift und stimuliert (Abb. 3.10).

3.1.4.1 Expression von mGBP1

Wie erwartet konnte in den Knochenmarksmakrophagen mit keinem der verwendeten Stimuli (IFN- β , IFN- γ , LPS, CpG) eine mGBP1 Expression induziert werden.

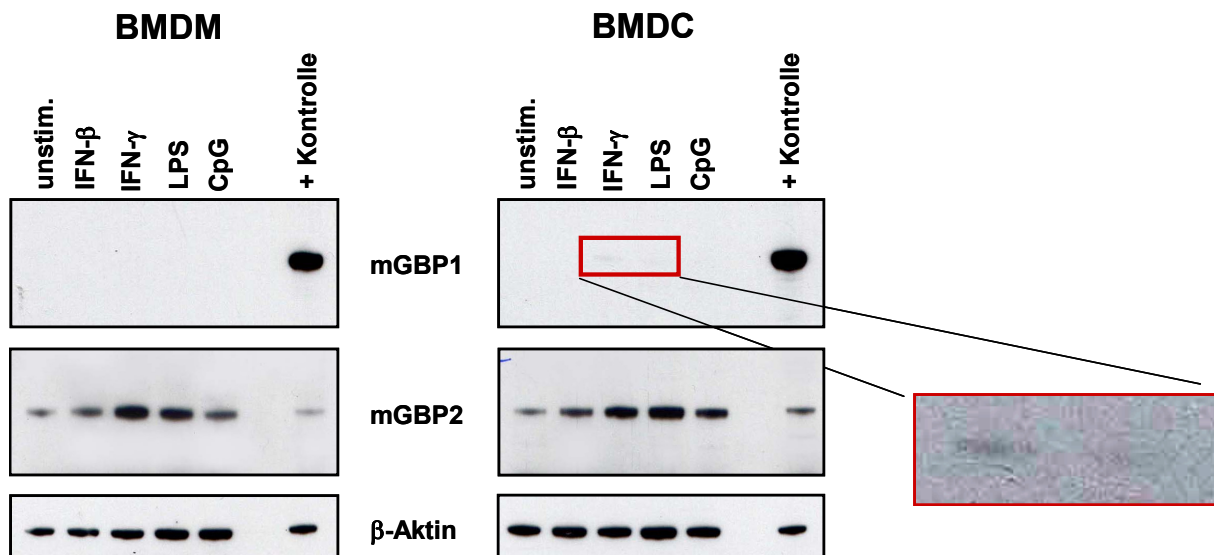


Abb. 3.10: Expression von mGBP1 in BMDM und BMDC aus C57BL/6 Mäusen. BMDM und BMDC wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen ausgereift, 16 h stimuliert, lysiert und im WB die Expression von mGBP1 analysiert. mGBP2 diente als Stimulationskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle für den WB wurden IFN- γ stimulierte 264.7 RAW Makrophagen mit aufgetragen. Der rechte WB stellt eine Ausschnittsvergrößerung des BMDC-WB dar.

Im Gegensatz dazu, ließ sich mGBP2 Protein nach 16 Stunden deutlich nachweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Stimulation der Zellen funktioniert hat (Abb. 3.10).

Auch eine Stimulation der BMDCs mit IFN- β und CpG zeigte keine Hochregulation der murinen GTPase 1. Erstaunlicherweise konnte jedoch eine sehr schwache Bande auf Höhe des mGBP1 Proteins nach Stimulation mit LPS und etwas prominenter mit IFN- γ detektiert werden (siehe Ausschnittsvergrößerung Abb. 3.10). Im Vergleich zu mGBP2 handelt es sich allerdings um eine sehr geringe mGBP1 Proteinmenge die hier nach Stimulation translatiert wurde. Dennoch steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den bisher publizierten Daten. Auf die Expression von mGBP1 wird zusätzlich in Abschnitt 3.2 näher eingegangen.

3.1.5 Halbwertszeit der mGBPs

Bei einer IFN- γ Stimulation der 264.7 RAW Makrophagen für unterschiedlich lange Zeiträume konnte beobachtet werden, dass nach 16 Stunden Stimulus eine maximale Proteinkonzentration erreicht wurde, die auch durch längere IFN- γ Exposition nicht gesteigert werden konnte (Abb. 3.1). Hieraus ergab sich die Frage, ob die Proteinmenge in den vier Stunden zusätzlicher IFN- γ Gabe tatsächlich gleich geblieben ist, da eine kritische Menge GTPase produziert wurde, oder ob ein Gleichgewicht zwischen degradiertem und neu synthetisiertem Protein besteht und soviel Protein abgebaut wurde wie neu produziert worden ist. Diese Frage lässt sich beantworten, indem die Proteinstabilität der GTPasen untersucht wird. Zur Bestimmung der Stabilität der Proteine wurden Versuche mit Cycloheximid durchgeführt. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das von *Streptomyces griseus* produziert wird. Es wirkt als Translationshemmer in eukaryotischen Zellen und hemmt die Proteinbiosynthese, wodurch die Haltbarkeit eines Proteins bestimmt werden kann.

264.7 RAW Makrophagen wurden für sechs Stunden mit IFN- γ vorinkubiert, um die Synthese der GTPasen zu induzieren. Anschließend wurde dem Medium das IFN- γ entzogen und Cycloheximid (CHX; 25 ng/ml) zugegeben und die Zellen nach 16 und 24 Stunden lysiert. Da eine Exposition der Zellen mit CHX für länger als 24 Stunden cytotoxisch wirkt, wurde das CHX entfernt und weitere Zelllysate nach insgesamt 40, 48 und 64 Stunden angefertigt.

Die Western Blot Analyse mit dem spezifischen mGBP2 Antikörper zeigte eine deutliche Induktion der GTPase nach sechs Stunden Stimulation (Abb. 3.11). Diese Proteinmenge blieb für einen Zeitraum bis zu 40 Stunden nach CHX-Gabe konstant und nahm erst nach 48 Stunden sichtbar ab. Nach 64 Stunden war die GTPase vollständig degradiert und konnte im Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle zeigte, dass CHX alleine nicht die Expression von mGBP2 induzieren kann. Als Vitalitätskontrolle wurden Zellen ausschließlich für 24 Stunden mit CHX behandelt. Es konnte keine vermehrte Apoptose der Zellen gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt werden.

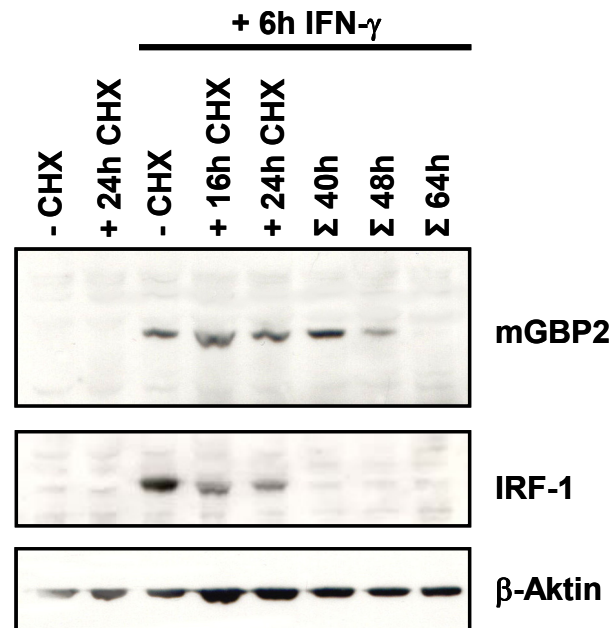


Abb. 3.11: Stabilität von mGBP2 Protein im CHX-Versuch. 264.7 RAW Makrophagen wurden für 6 h mit IFN- γ vorinkubiert und anschließend für 24 h mit CHX (25 ng/ml) behandelt. Die Proteininstabilität von mGBP2 wurde im Western Blot untersucht. β -Aktin diente als Ladungs- und Vitalitätskontrolle, IRF-1 als Positivkontrolle, um zu zeigen, dass CHX die Proteinbiosynthese gehemmt hat.

Da IRF-1 als ein kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten bekannt ist (Decker et al., 1991a), wurde dieses Protein als Positivkontrolle verwendet. Wie erwartet nahm die Proteinkonzentration innerhalb der ersten 16 Stunden bereits drastisch ab und war nach 40 Stunden nicht mehr nachzuweisen. Dies entspricht den bereits publizierten Daten für die Proteininstabilität von IRF-1 und belegt, dass bei der im Experiment eingesetzten CHX-Dosierung die Proteinbiosynthese gehemmt war. Dieser Versuch zeigt, dass die GTPase mGBP2 über einen sehr langen Zeitraum stabil in der Zelle vorliegt und erst nach 40 Stunden die Degradation des Proteins einsetzt.

3.1.6 Signalkaskade zur Induktion der 65 kDa GTPasen

Es wird davon ausgegangen, dass die GTPasen hauptsächlich durch den IFN- γ vermittelten Signalweg über STAT Proteine IRF-1 abhängig induziert werden. Diese Annahme beruht unter anderem auf Publikationen von Schwemmle et al., in denen gezeigt werden konnte, dass hGBP1 neben IFN- α /IFN- γ auch durch IL-1 α /IL-1 β und TNF- α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiviert werden konnte (Guenzi et al., 2001; Lubeseder-Martellato et al., 2002) jedoch nicht durch andere Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren. Im Zusammenhang damit wurde eine IFN-responsive Region als Promotor von hGBP1 beschrieben, die durch zwei überlappende ISRE („IFN- α stimulated response element“) Elemente und eine GAS („ γ -IFN activation site“) Sequenz charakterisiert ist (Lew et al., 1991). Nach Typ I oder II IFN Stimulation bindet der

Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3 („IFN-stimulated gene factor 3“) an die ISRE Sequenz und induziert dadurch die Transkription des entsprechenden Gens (Miyamoto et al., 1988; Levy et al., 1989). An das GAS Element binden STAT-Proteine, wobei sie die frühe Phase der Genaktivierung regulieren und IRF-1 die späte Phase (Decker et al., 1991a; Decker et al., 1991b; Mirkovitch et al., 1992). Naschberger et al. identifizierten zusätzlich ein NF- κ B Bindemotiv, das die Induktion der hGBP1 durch IL-1 β und TNF- α erklärt (Naschberger et al., 2004). Da die humanen und murinen GTPasen hoch homolog zueinander sind und die murinen GBPs ebenfalls durch Typ I und II IFN und TNF- α induzierbar sind, lag die Vermutung nahe, dass sie durch einen ähnlichen Signalweg wie das humane GBP1 induziert werden. Um die Regulation der Induktion der murinen GTPasen aufzuklären, wurden gendefiziente Zellen verwendet, bei denen die IFN Signalkaskade an unterschiedlichen Stellen unterbrochen ist.

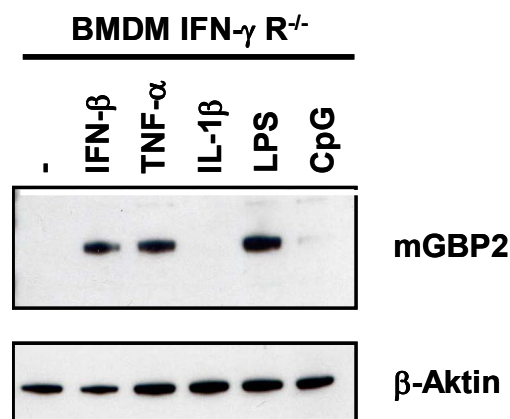


Abb. 3.12: Stimulation von mGBP2 in IFN- γ Rezeptor defizienten Zellen. Knochenmarksmakrophagen IFN- γ Rezeptor defizienter Mäuse wurden ü/N mit IFN- β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml) und CpG (1 μ Mol) stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Expression von mGBP2 wurde im Western Blot nachgewiesen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um zu testen, ob die Stimulation von mGBP2 ausschließlich über den IFN- γ Rezeptor vermittelt wird, wurden Knochenmarksmakrophagen IFN- γ Rezeptor defizienter Mäuse für 16 Stunden mit den inflammatorischen Zytokinen IFN- α , IL-1 β und TNF- α , sowie mit dem TLR-Agonisten LPS und CpG stimuliert und die Expression von mGBP2 im Western Blot untersucht. Sowohl nach IFN- β , TNF- α als auch nach LPS Stimulation konnte eine deutliche Induktion von mGBP2 nachgewiesen werden (Abb. 3.12). CpG führte lediglich zu einer schwachen Proteinexpression, wohingegen IL-1 β kein mGBP2 induzieren konnte. Dieses Experiment bestätigt, dass die Induktion der GTPase Expression nicht ausschließlich über den IFN- γ Rezeptorsignalweg geleitet wird, sondern auch andere Stimuli und Rezeptoren zur Hochregulation der GTPasen führen können.

Die Abhängigkeit der GTPase Expression von in der Signalkaskade weiter abwärts gelegener Proteine wurde untersucht, indem STAT1 und IRF-1 defiziente Fibroblasten stimuliert wurden

und die Expression der GTPasen im Western Blot analysiert wurde (Abb. 3.13). STAT1 defiziente Zellen bzw. Wildtyp-Kontrollzellen wurden mit Typ I und II IFN stimuliert. In den Wildtyp-Fibroblasten wurde durch IFN- γ Stimulation mGBP1, 2, 3 und 5 hochreguliert. Zusätzlich wurde mGBP3 durch IFN- β induziert. Nach keinem der beiden Stimuli zeigte sich eine mGBP Expression in den STAT1 defizienten Zellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Signaltransduktion nach Typ I und II IFN Stimulation über STAT1 weitergeleitet wird. Neben STAT1 ist die Transduktion bei allen vier GTPasen IRF-1 vermittelt, da keine Proteinexpression nach IFN- γ Stimulation in IRF-1 defizienten Fibroblasten zu detektieren war, während in den stimulierten Wildtyp-Kontrollzellen eine Induktion erfolgte (Abb. 3.13).

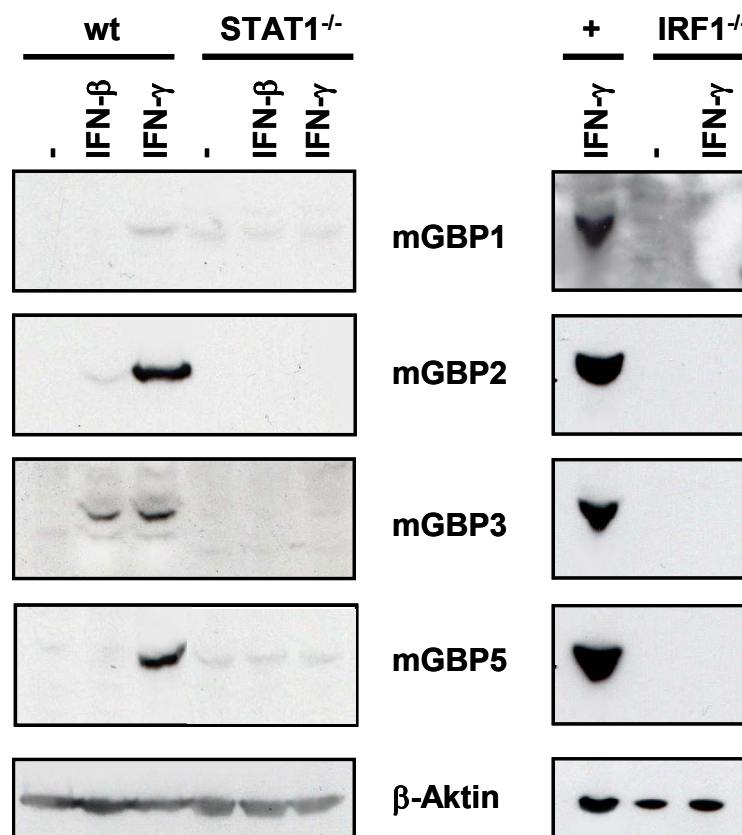


Abb. 3.13: mGBP Expression nach IFN Stimulation in STAT1^{-/-} und IRF1^{-/-} Fibroblasten. STAT1 und IRF-1 defiziente Fibroblasten wurden mit Typ I und II IFN stimuliert und die Expression der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 im Western Blot untersucht. Stimulation von Wildtyp-Fibroblasten (linke Blots) bzw. ANA-1 Makrophagen (rechte Blots) dienten als Stimulationskontrollen. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Somit kann zusammengefasst werden, dass die mGBP Induktion wie die humane GTPase 1 Expression nach Stimulation des IFN- γ Rezeptors STAT1 und IRF-1 abhängig vermittelt wird und somit die Promotoren der murinen GTPasen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine GAS und ISRE Sequenz aufweisen. Die Hochregulation von mGBP2 in IFN- γ Rezeptor defizienten Knochenmarksmakrophagen nach TNF- α Stimulation könnte, wie bei Naschberger et al.

beschrieben, durch ein NF- κ B Bindemotiv in der Promotorregion erklärt werden. Um diese Vermutung zu bestätigen sind allerdings ausführlichere Promotoranalysen notwendig.

3.1.7 Subzelluläre Lokalisation der GBPs mGBP1 bis mGBP5

In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass das Genprodukt von mGBP2 subzellulär in granulären oder vesikelartigen Strukturen angeordnet ist. Die genaue Identität dieser Strukturen konnte allerdings bislang nicht näher charakterisiert werden (Vestal et al., 2000). Daher wurde die Lokalisation von mGBP2 in NIH 3T3 Zellen, embryonalen Fibroblasten und 264.7 RAW Makrophagen sowohl endogen mit dem spezifischen Antikörper als auch nach Expression als N- und C-terminales GFP- und DsRed-Fusionskonstrukt untersucht.

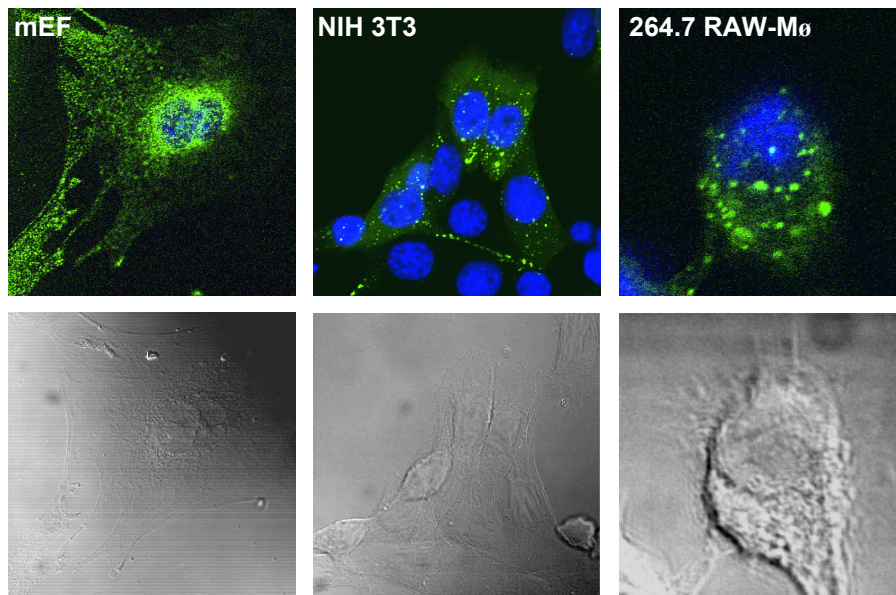


Abb. 3.14: Subzelluläre Lokalisation von mGBP2. EF, NIH 3T3 Fibroblasten und 264.7 RAW Makrophagen wurden 16 h mit IFN- γ stimuliert und anschließend endogen mit dem spezifischen mGBP2 Antikörper gefärbt. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Grün: mGBP2; Blau: DAPI zur Kernfärbung; untere Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der entsprechenden Zellen.

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, lokalisierte mGBP2 sowohl in embryonalen Fibroblasten, als auch in NIH 3T3 Zellen und 264.7 RAW Makrophagen in vesikulären Strukturen. Die Lokalisation der GTPase änderte sich nicht, wenn das Fluoreszenzprotein GFP oder DsRed an den N-Terminus kloniert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Fusion des Fluoreszenzmarkers an den C-Terminus der GTPase führte jedoch zu einer Fehlverteilung von mGBP2. Anstatt der Lokalisation in Vesikeln zeigte sich eine homogene zytoplasmatische Verteilung (Daten nicht gezeigt). mGBP2 weist, wie auch mGBP1 und 5, an seinem Carboxylterminus eine Isoprenylierungssequenz auf. Diese Isoprenylierung ermöglicht Proteinen eine Integration in Lipidmembranen, wodurch die Verteilung der GTPasen in vesikulären Strukturen erklärt werden kann. Wahrscheinlich wird

durch das Anhängen des Fluoreszenzproteins an die GTPase die Isoprenylierung unterbunden, so dass das Fusionsprotein nicht mehr an membranähnliche Strukturen binden kann. Aufgrund der Fehlverteilung der GTPasen durch das Anhängen eines Fluoreszenzproteins an seinen C-Terminus wurde in den folgenden Experimenten das N-terminal markierte Konstrukt verwendet.

Zur Identifizierung der vesikelähnlichen Strukturen wurden Markerkonstrukte, die die Lokalisation der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums (ER), der Endosomen, membranösen Strukturen und des Golgi-Apparates aufzeigen, transfiziert und nach einer Kolo-kalisation der GTPasen mit einer der zellulären Substrukturen kontrolliert. Dafür wurden NIH 3T3 Zellen mit den verschiedenen Markerkonstrukten und einem GFP- oder DsRed-mGBP2 Konstrukt kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 16 Stunden mit IFN- γ behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen und anschließend wie in Abschnitt 2.10.10 beschrieben fixiert, die Kerne angefärbt, auf Objektträger befestigt und am Konfokalmikroskop auf eine Kolo-kalisation der GTPase mGBP2 mit einem der Markerkonstrukte untersucht (Abb. 3.15).

Mit Hilfe der unterschiedlichen kotransfizierten Markerkonstrukten, die die Mitochondrien, das ER, die Endosomen, den Golgi-Apparat oder Membranen anfärbten, konnten die Vesikel in denen mGBP2 lokalisiert ist, nicht identifiziert werden. Keine der Strukturen zeigte eine Überlagerung mit der GTPase in den NIH 3T3 Fibroblasten. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen mit IFN- γ vorinkubiert wurden oder nicht.

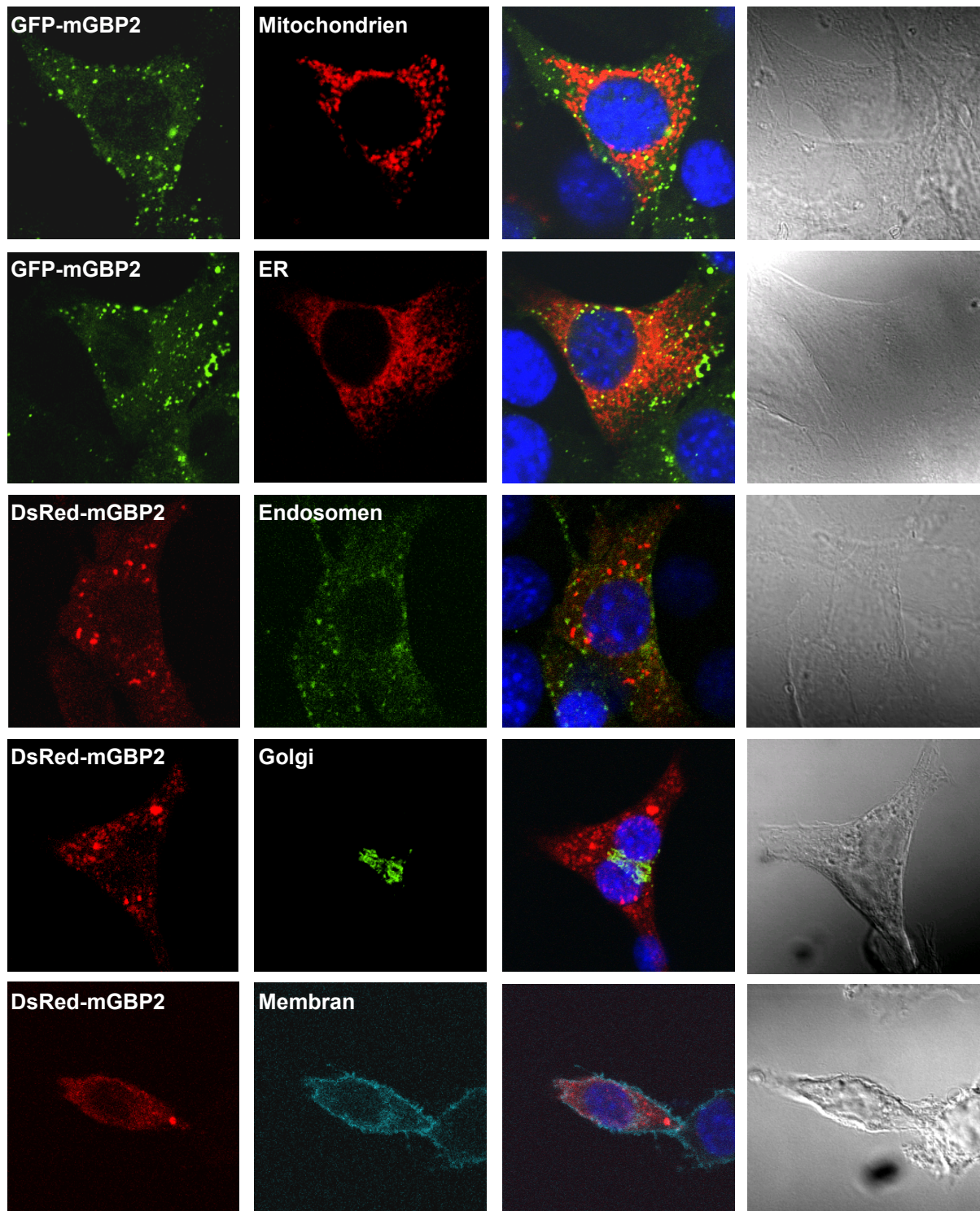


Abb. 3.15: Kotransfektion von mGBP2 mit Markerkonstrukten. NIH 3T3 Fibroblasten wurden mit einem mGBP2 Fusionskonstrukt und verschiedenen Markerkonstrukten (s. Tab. 2.12), die die Mitochondrien, das ER, die Endosomen, den Golgi-Apparat und Lipidmembranen markieren, kotransfiziert und 24 h später für 16 h mit IFN- γ stimuliert. Kontrollzellen wurden unstimuliert gelassen (nicht dargestellt). Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Erste Spalte: mGBP2; zweite Spalte: Markerkonstrukte; dritte Spalte: Überlagerung aus Spalte eins und zwei mit blauer Kernfärbung (DAPI); vierte Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

Neben mGBP2 sollte die subzelluläre Lokalisation von mGBP1, mGBP3, mGBP4 und mGBP5 untersucht werden. Da nur für mGBP1, 2 und 3 spezifische Antikörper zur Verfügung standen, die auch in der Immunfluoreszenz funktionieren, wurden für mGBP4 beziehungsweise mGBP4.1 und mGBP5 cDNS Fusionskonstrukte kloniert, welche am 5' Ende des offenen Leserahmens zusätzlich eine GFP bzw. DsRed Sequenz besitzen. Nach Transfektion der so generierten Expressionsvektoren sollte von den Zellen ein mGBP Protein gebildet werden, welches am N-Terminus das grün-fluoreszierende GFP oder das rot-fluoreszierende DsRed Protein aufweist.

Um die subzelluläre Lokalisation der mGBPs zu bestimmen, wurden Fibroblasten entweder mit den Fusionskonstrukten transfiziert oder die mGBPs endogen mittels Intrazellulärfärbung angefärbt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 16 Stunden mit IFN- γ inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit dem Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht (Abb. 3.16).

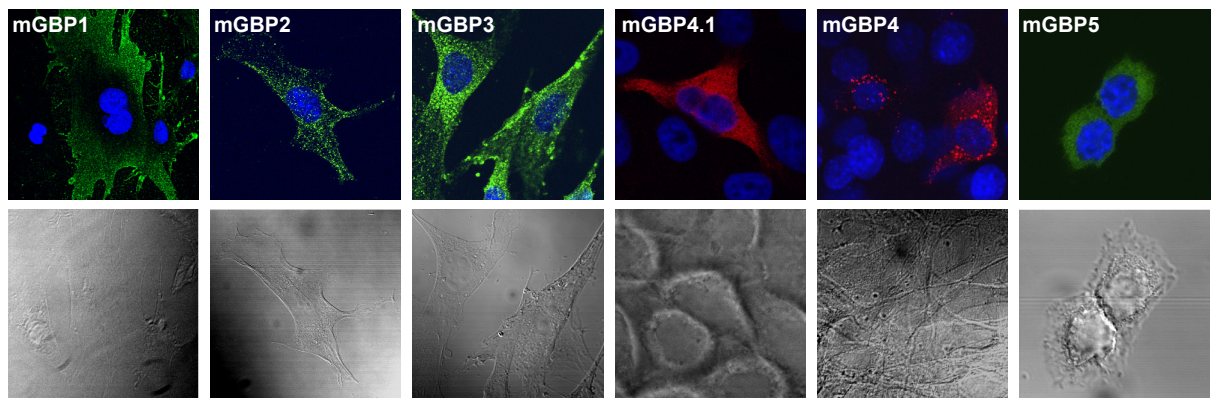


Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation von mGBP1 bis mGBP5. NIH 3T3 Fibroblasten wurden 16 h mit IFN- γ stimuliert und endogen mit den spezifischen mGBP1, 2 und 3 Antikörpern gefärbt oder mit DsRed-mGBP4/4.1 und GFP-mGBP5 Fusionskonstrukten transfiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Grün/rot: mGBP1-5; Blau: DAPI zur Kernfärbung; untere Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der oberen Zellen.

Wie mGBP2 lokalisieren auch mGBP1, mGBP3, mGBP4 und mGBP5 in vesikulären Kompartimenten innerhalb des Zytoplasmas. Lediglich mGBP4.1 zeigte eine eher zytoplasmatische Verteilung des Proteins. Die Vesikel der GTPasen mGBP1 bis mGBP4 zeigten eine homogene zytoplasmatische Verteilung, wohingegen die Vesikel die mGBP5 enthielten in der perinukleären Region akkumulierten. Es konnten keine Unterschiede in der Lokalisation der Fusionsproteine oder den endogen angefärbten GTPasen festgestellt werden. Die N-terminale Fusion der GTPase mit einem Fluoreszenzprotein verändert deren Lokalisation somit nicht und kann für weitere Experimente verwendet werden. Da die GTPasen alle in Vesikeln vorliegen und mGBP2 sowie mGBP5 (s. Diplomarbeit S. Schmidt) nicht mit einem der bekannten zytoplasmatischen Strukturen koloalisieren, trat die Frage auf, ob alle mGBPs in den gleichen

Vesikeln vorliegen. Hierfür wurden Fibroblasten mit einem GFP-mGBP Fusionskonstrukt transfiziert und gleichzeitig mit einer der anderen GTPasen endogen angefärbt.

3.1.8 Kolokalisation der GBPs mGBP1 bis mGBP5

Um zu bestimmen, ob die GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 in den gleichen Vesikeln lokalisieren, wurden stabil transduzierte GFP-mGBP2, 3 und 5 NIH 3T3 Fibroblasten mit IFN- γ stimuliert und endogen mit den spezifischen Antikörpern gegen mGBP1, 2 und 3 gegengefärbt (Abb. 3.17). Mit dieser Versuchsreihe wurden alle sechs verschiedenen GTPase Kombinationsmöglichkeiten durchgeführt. Wie die Bilder zeigen, kolokalisierten die Vesikel, in denen sich mGBP1 befindet deutlich mit den mGBP2 enthaltenen Strukturen (Abb. 3.17, obere Reihe, weißer Pfeil). Dies traf auch für mGBP1 und mGBP3 zu. Beide GTPasen zeigten eine Überlagerung, wie eindeutig an der gelben Färbung an den Überlappungsstellen zu erkennen. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen kolokalisierten konsequenterweise auch mGBP2 und mGBP3 in den Fibroblasten, erneut an den gelb erscheinenden punktförmigen Strukturen zu identifizieren (Abb. 3.17, vierte Reihe, weißer Pfeil). Eine Überlappung von mGBP1, 2 und 3 mit mGBP5 ließ sich nicht eindeutig belegen. Die größte Überlagerung konnte zwischen mGBP2 und mGBP5 ausgemacht werden. Wie schon in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, ist mGBP5 eher in perinukleären Strukturen zu finden und ist weniger homogen im Zytoplasma verteilt wie die übrigen drei GBPs. Daher trat eine Gelbfärbung überwiegend rund um die Kernregion auf. Im Konfokalmikroskop erschienen nur diese Stellen gelb, was für eine partielle Überlagerung spricht, aber es konnten keine distinkten Vesikel ausgemacht werden, die direkt miteinander kolokalisierten. Somit scheinen weder mGBP1 noch mGBP3 in den gleichen Strukturen wie mGBP5 enthalten zu sein. Ob mGBP2 und mGBP5 miteinander kolokolalisieren konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

Diese Versuchsreihe zeigte, dass mGBP1, 2 und 3 miteinander kolokolalisieren und sich daher wahrscheinlich in denselben vesikulären Kompartimenten befinden. Eine Überlagerung mit mGBP5 konnte jedoch mit dieser Methode nicht eindeutig bewiesen werden. Um eine genauere Aussage über die Kolokolisation einzelner GTPasen miteinander treffen zu können, wurden in den nachfolgenden Versuchen Immunpräzipitationen durchgeführt.

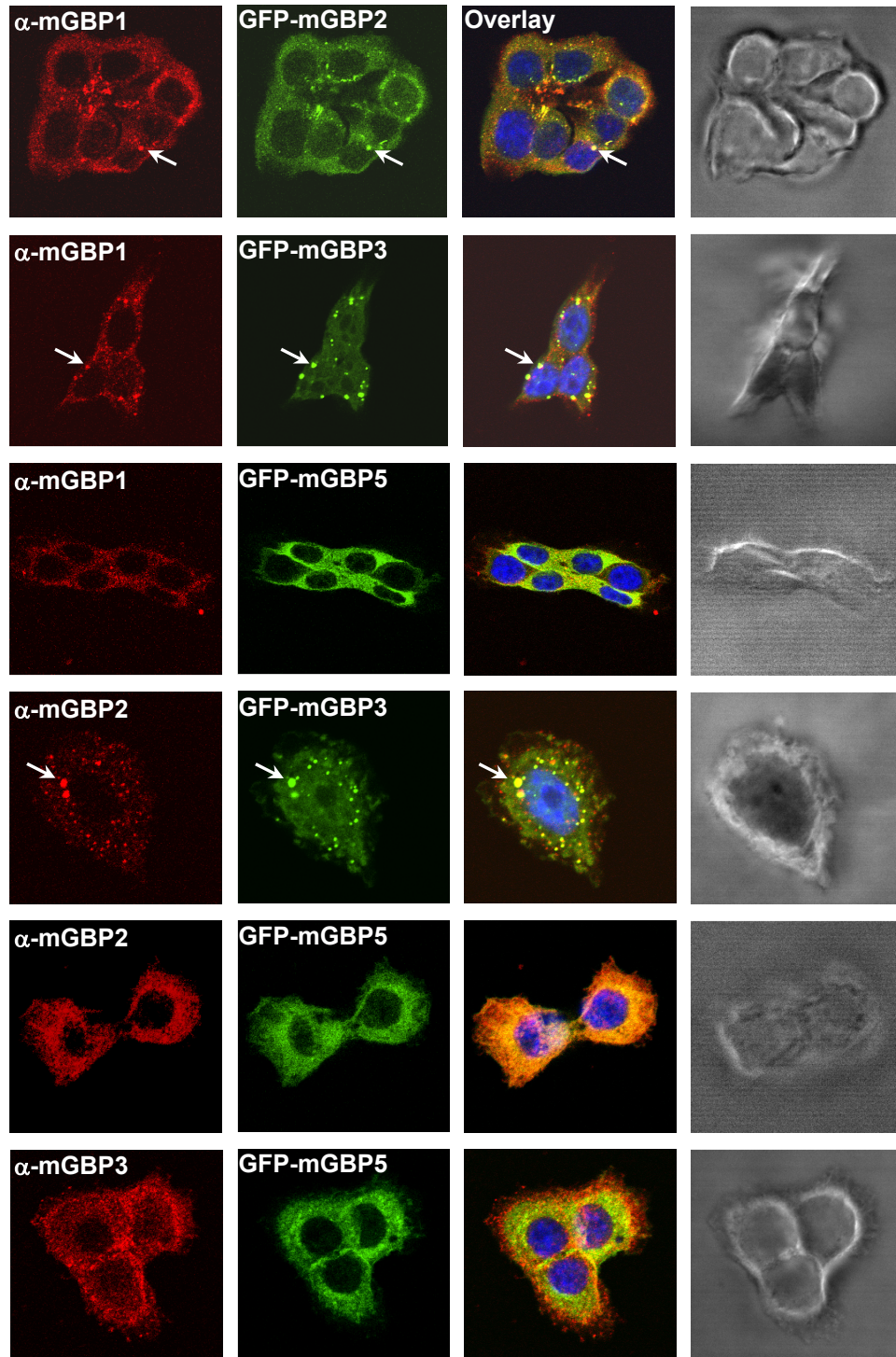


Abb. 3.17: Kolokalisation der einzelnen 65 kDa GTPasen miteinander. Stabil transduzierte GFP-mGBP2, 3 und 5 NIH 3T3 Fibroblasten wurden 16 h mit IFN- γ stimuliert und endogen mit den spezifischen mGBP1, 2 und 3 Antikörpern gegengefärbt, um eine Kolokalisation der einzelnen GTPasen untereinander festzustellen. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Erste Spalte: endogene GTPase angefärbt mit α -mGBP1, 2, 3; zweite Spalte: GFP-mGBP2, 3, 5 Fusionskonstrukte; dritte Spalte: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung in blau (DAPI); gelbe Färbung weist auf eine Kolokalisation hin; vierte Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen. Pfeile heben die Kolokalisation hervor.

3.1.8.1 Ko-Immunpräzipitation der GBPs mGBP1, 2, 3 und 5

Da mit Hilfe des Konfokalmikroskops eine eindeutige Interaktion der GTPasen, insbesondere mGBP5 mit mGBP1, 2 und 3 nicht bewiesen werden konnte, wurde eine weitere Methode angewendet, die die Interaktion zweier Proteine auf proteinbiochemischen Weg nachweisen kann. Zum Nachweis der Interaktion der einzelnen GBPs untereinander wurden die GFP-mGBP1 bis GFP-mGBP5 stabil exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten mit IFN- γ vorinkubiert, um die Expression der endogenen GTPasen zu induzieren. Mit Hilfe der spezifischen mGBP Antikörper wurden die GTPasen und die möglichen Interaktionspartner an die Protein G Sepharose gekoppelt, unspezifische Bindungen abgewaschen und die mGBPs anschließend eluiert. Im Western Blot wurde mit einem α -GFP Antikörper eine Interaktion zwischen den GTPasen detektiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur das GFP-Protein stabil exprimierten.

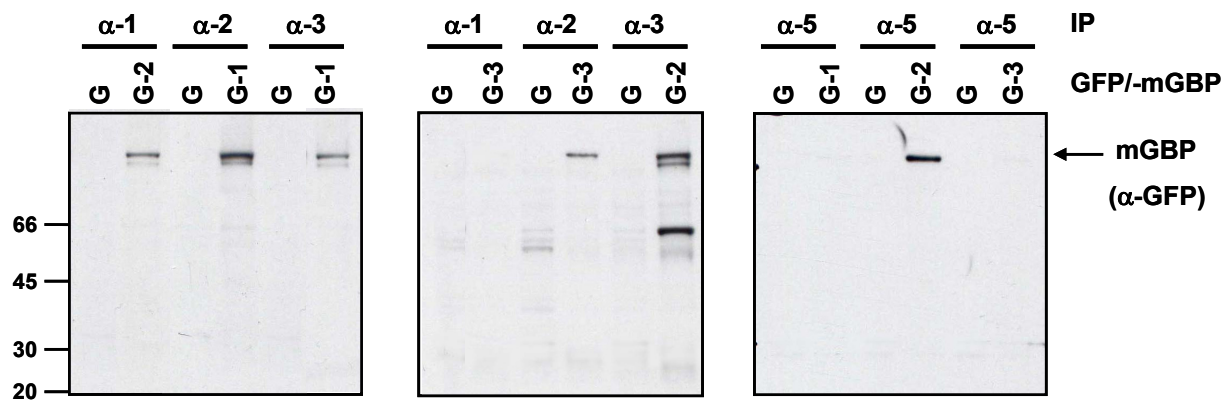


Abb. 3.18: Ko-Immunpräzipitation der GBPs mGBP1, 2, 3 und 5. GFP-mGBP stabil exprimierende NIH 3T3 Fibroblasten wurden für 16 h mit IFN- γ stimuliert, um die endogenen GTPasen zu induzieren. Mit den spezifischen mGBP Antikörpern wurden die GTPasen mit ihren Interaktionspartnern gezogen und an die Sepharose gekoppelt. Nach Waschen und Eluieren der Proteine wurde die Interaktion einzelner GTPasen im WB mit α -GFP Antikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur GFP-Protein stabil exprimieren. G: GFP; G-1, G-2, G-3: GFP-mGBP1, 2, 3 Fusionskonstrukt; α -1, α -2, α -3, α -5: α -mGBP1, 2, 3, 5 Antikörper, mit denen die Präzipitate gezogen wurden. Linke Seite: Proteinstandard in kDa.

Mit Hilfe der GFP-mGBP1 konstitutiv exprimierenden Zelllinie wurde eine mögliche Interaktion mit den GTPasen mGBP2, 3 und 5 untersucht (Abb. 3.18). Im Western Blot zeigte sich eine Interaktion sowohl zwischen GFP-mGBP1 und mGBP2 als auch mit mGBP3, jedoch nicht mit mGBP5. Die GFP-mGBP2 stabil exprimierenden Zellen interagierten mit mGBP1, 3 und 5. GFP-mGBP3 konnte lediglich mit der GTPase mGBP2 immunpräzipitiert werden, jedoch nicht mit mGBP1 und 5. Alle detektierten Interaktionen, mit Ausnahme von mGBP1 und mGBP3, konnten auch in reziproker Orientierung festgestellt werden. Somit waren die Interaktionspartner von mGBP1 GFP-mGBP2, jedoch nicht GFP-mGBP3 und GFP-mGBP5. mGBP2 interagiert mit GFP-mGBP1, 3 und 5 und mGBP3 mit GFP-mGBP1 und 2. Mit mGBP5 immunpräzipitierte nur GFP-

mGBP2, nicht mGBP1 und 3. Neben diesen Versuchsreihen wurde auch untersucht, ob eine mGBP2 GTPase Mutante noch in der Lage ist mit mGBP1, 3, und 5 zu interagieren oder ob die GTP-Bindung essentiell für die Interaktion ist. Bei der verwendeten Mutante wurde im dritten Nukleotidbindungsmotiv die Glutaminsäure an der Position 99 gegen ein Alanin austauscht (E99A). Dadurch wurde in der korrespondierende Mutation in der humanen GTPase 1 sowohl die GTP-Bindung als auch die Hydrolyserate deutlich verringert (Praefcke et al., 2004). Jedoch scheint weder die GTP-Bindung noch die Hydrolyserate für die Interaktion der GTPasen untereinander essentiell zu sein, da auch die mGBP2-E99A Mutante noch mit mGBP1, 3 und 5 interagieren konnte (Daten nicht gezeigt).

Mit der Methode der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass bestimmte GTPasen direkt miteinander interagieren. In der Tabelle 3.1 wurden die jeweiligen Bindungspartner zusammengefasst.

Antikörper GFP	mGBP1	mGBP2	mGBP3	mGBP5
mGBP1	ND	+	+	-
mGBP2	+	ND	+	+
mGBP3	+/-	+	ND	-
mGBP5	-	+	-	ND

Tabelle 3.1: Kolokalisation und Interaktion der 65 kDa GTPasen. ND: nicht determiniert.

Die Ergebnisse decken sich vollständig mit den Resultaten aus der Konfokalmikroskopie, bei der die Anordnung der GBPs in den Vesikeln untersucht wurde. So waren mGBP1, 2 und 3 in den gleichen vesikulären Strukturen enthalten und ließen sich ebenfalls ko-immunpräzipitieren. Auch mGBP2 und mGBP5 zeigten partielle Überlagerungen in den mikroskopischen Bildern und waren auch in der Immunpräzipitation Interaktionspartner. Somit lokalisieren bestimmte GTPasen in denselben Kompartimenten und sind darüber hinaus direkte Bindungspartner. Neben der Konfokalmikroskopie und der Immunpräzipitation konnten ähnliche Resultate im „yeast-2-hybrid“ System erzielt werden. Hierfür wurden die GTPasen mGBP1 bis mGBP5 in Aktivierungs- und Bindungsvektoren kloniert und in Zusammenarbeit mit Julia Hunn aus dem Institut für Genetik an der Universität Köln ein „yeast-2-hybrid Screen“ durchgeführt. In einem ersten Experimentaldurchlauf wurde ebenfalls die Interaktion der mGBP1 bis 5 untereinander ausgetestet. Die primären Daten spiegelten die Ergebnisse der Immunpräzipitation wieder (Daten nicht gezeigt).

3.2 Rolle der 65 kDa GTPasen in der Infektionsabwehr

Frühere Publikationen haben gezeigt, dass die zu den 65 kDa GBPs verwandten Mx Proteine eine starke anti-virale Funktion gegen RNS Viren, wie Influenza und Vesicular Stomatitis Virus (VSV), ausüben. Neuere Publikationen weisen darauf hin, dass eine direkte Interaktion zwischen Mx Proteinen und viralen Komponenten notwendig ist, um die virale Replikation zu inhibieren (Haller und Kochs, 2002). Neben den Mx Proteinen konnten auch die in die Gruppe der GTPasen einzuordnenden 47 kDa Proteine als anti-virale Effektormoleküle identifiziert werden. Zwar handelt es sich im Gegensatz zu den Mx Proteinen um einen schwachen anti-viralen Effekt, aber es konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber VSV in TGTP (Irgb6) transfizierten Zellen (Carlow et al., 1998) und eine anti-virale Aktivität gegenüber Coxsackieviren B3 nachgewiesen werden, wenn es in HeLa Zellen überexprimiert wurde (Zhang et al., 2003). Mit Hilfe Gen-defizienter Mäuse konnten Mitgliedern der IRGs, wie Irgm1 (LRG-47), Irgd (IRG-47) und Irgm3 (IGTP), zusätzlich eine signifikante Bedeutung in der Abwehr von *Listeria monocytogenes* und *Toxoplasma gondii* zugewiesen werden (Taylor et al., 2004; Martens und Howard, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die 65 kDa GTPasen wie das humane GBP1 (hGBP1) oder mGBP2 schwache anti-virale Funktionen bei Infektion von HeLa oder NIH 3T3 Zellen mit den einzelsträngigen RNS Viren VSV oder EMCV übernehmen können (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Um eine potentielle anti-virale Funktion von mGBP2 auch auf doppelsträngige DNS Viren zu testen, wurden in dieser Arbeit Infektionen mit MCMV und Vaccinia Virus durchgeführt. Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellen mit den intrazellulär replizierenden Pathogenen *T. gondii* und *L. monocytogenes* infiziert und der Einfluss auf die mGBP Expression untersucht.

3.2.1 mGBP2 Expression in MCMV infizierten Zellen

Wie oben beschrieben, konnte für hGBP1 und mGBP2 eine sehr schwache anti-virale Aktivität gegen einzelsträngige RNS Viren gemessen werden. Um neben Picornaviren und Rhabdoviren auch einen Vertreter der doppelsträngigen DNS Viren zu untersuchen, wurden NIH 3T3 Zellen mit MCMV infiziert und die Expression der GTPase mGBP2 analysiert. Hierfür wurden die Zellen zeitgleich mit der Infektion jeweils für 30 Minuten bzw. 4 Stunden mit IFN- γ stimuliert und Zelllysate nach 4 und 48 Stunden angefertigt. Anschließend wurde im Western Blot die Expression der GTPase mGBP2 untersucht. Wie in der Abbildung 3.19 zu erkennen, wurde nach lediglich 30 Minuten IFN- α bzw. IFN- γ Stimulation mGBP2 nicht induziert. Nach vier Stunden konnte jedoch ein deutliches mGBP2 Signal detektiert werden. Dies nahm erstaunlicherweise im Verlauf der Infektion mit MCMV drastisch ab, so dass nach 24 Stunden MCMV Infektion keine mGBP2 mehr nachgewiesen werden konnte. Da bekannt ist, dass einige Viren mit dem IFN- γ Signalweg interferieren, um so eine anti-virale Aktivität der Zelle zu unterbinden, wurde auch die Proteinmenge für IRF-1 bestimmt. Im Verlauf der Infektion konnte kontinuierlich weniger IRF-1

detektiert werden. Da in Abschnitt 3.1.6 gezeigt wurde, dass die GBP Expression strikt IRF-1 abhängig verläuft, kann durch die Reduktion von IRF-1 auch die Inhibition der mGBP2 Expression erklärt werden.

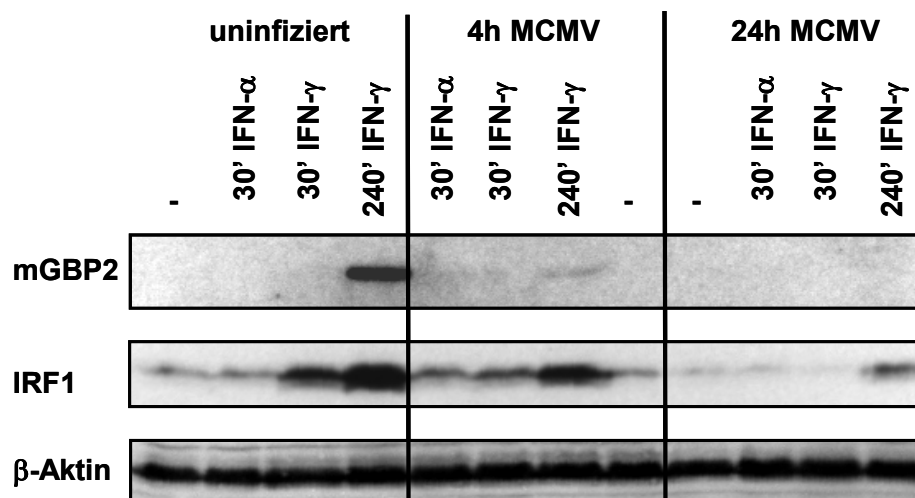


Abb. 3.19: Expression von mGBP2 nach Infektion mit MCMV. NIH 3T3 Zellen wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert. Gleichzeitig wurden die Zellen für 30 min bzw. 4 h mit IFN- α oder IFN- γ behandelt. Nach 4 und 24 Stunden wurden Zelllysate angefertigt und im Western Blot die mGBP2 und IRF-1 Expression untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Mit diesem Experimentalansatz konnte nicht geklärt werden, ob mGBP2 einen Mechanismus zur Inhibition von MCMV besitzt, da bereits durch die Reduktion von IRF-1 durch das Virus die GTPase nicht mehr exprimiert werden kann. Auch nach Infektion von embryonalen Fibroblasten mit Vaccinia Virus konnte keine mGBP2 Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ob mGBP2 dennoch einen anti-viralen Effekt ausüben kann, sollte daher *in vivo* mit Hilfe mGBP2 defizienter Mäuse getestet werden.

3.2.2 mGBP Expression in Mäusen nach *L. monocytogenes* Infektion

Um zu klären, ob neben den verwandten p47 GTPasen auch die 65 kDa GBPs als anti-mikrobielle Effektormoleküle wirken können, wurden C57BL/6 Mäuse wie in Abschnitt 2.9.4 beschrieben i.p. mit $0,1 \times LD_{50}$ *L. monocytogenes* infiziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Organe entnommen und im Western Blot die Expression der GTPasen 1, 2, 3 und 5 untersucht. mGBP4 wurde nicht weiterverfolgt, da wie in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben, kein Protein in infizierten Mäusen exprimiert wurde. Es wurden Western Blots aus Lysaten von Peyerschen Plaques, peripheren und mesenterialen Lymphknoten, Thymus, Lunge, Milz, Leber und Gehirn angefertigt und die Expression der GTPasen untersucht. In Abb. 3.20 A ist die Expression der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 in der Milz und der Leber uninfizierter Kontrollmäuse sowie mit Listerien infizierter Mäuse gesondert dargestellt, da es sich hierbei um die durch Listerien zuerst und hauptsächlich befallenen Organe handelt.

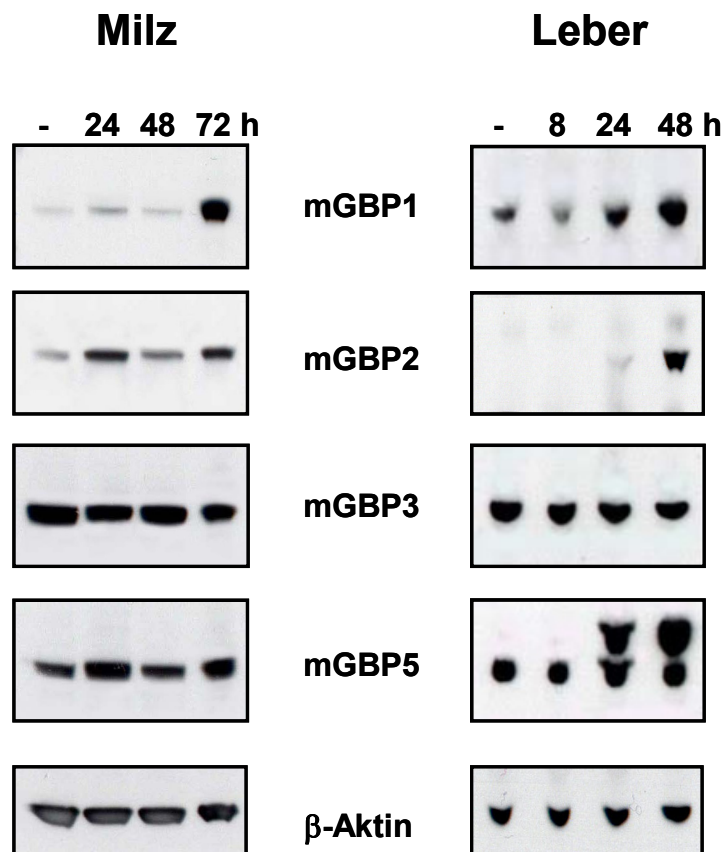
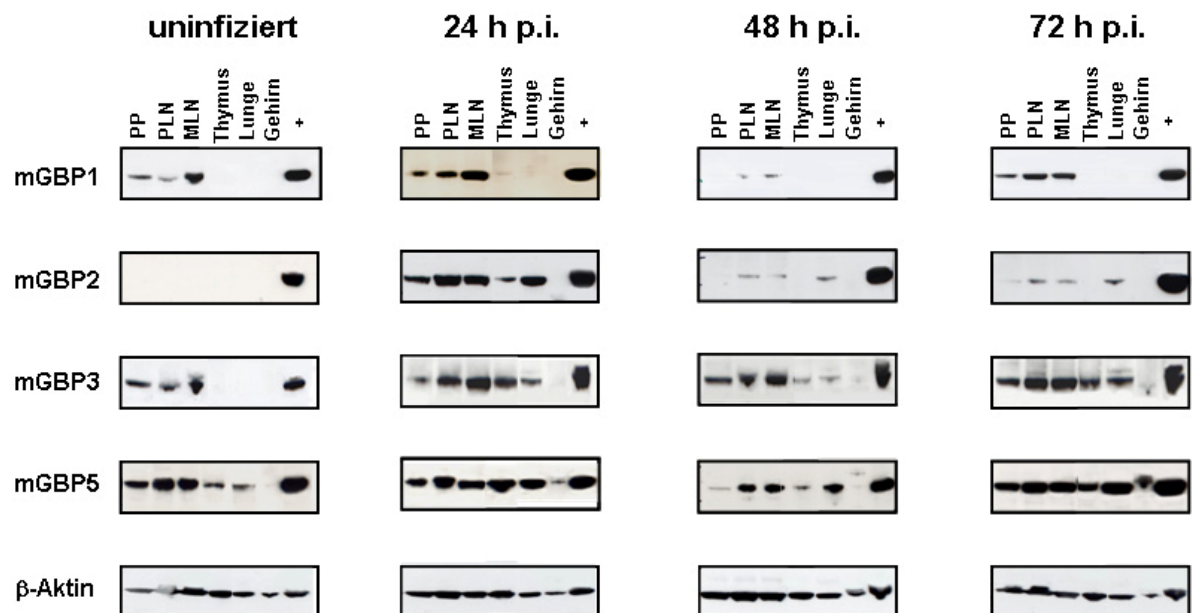
A**B**

Abb. 3.20: Expression der mGBPs nach Infektion mit *L. monocytogenes*. C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit 0,1 x LD₅₀ Listerien infiziert. Nach 8, 24, 48 bzw. 72 Stunden wurden die Organe entnommen, lysiert und im Western Blot analysiert. Dargestellt ist die Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in der Milz und in der Leber (A) bzw. den PP, PLN, MLN, dem Thymus, der Lunge und dem Gehirn (B). Es wurden jeweils 35 μ g Protein aufgetragen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. p.i.= nach Infektion.

mGBP1 und 2 waren in der Milz uninfizierter Kontrollmäuse bereits basal leicht exprimiert, jedoch steigerte sich die Expression im Laufe der Infektion mit Listerien deutlich. In der Leber dieser Kontrollmäuse war mGBP1 ebenfalls basal nachweisbar. Doch auch hier war die Proteinmenge des 24 und 72 Stundenwertes im Vergleich zu dem 8 Stundenwert signifikant höher. mGBP2 Protein war in der Leber uninfizierter Mäuse nicht detektierbar. Es zeigte sich aber eine starke Expression der GTPase nach 48 Stunden. Neben der Leber und der Milz wurden die GTPasen mGBP1 und 2 in den Peyerschen Plaques (PP), den peripheren und mesenterialen Lymphknoten und mGBP2 zusätzlich in der Lunge 72 Stunden nach Infektion exprimiert (Abb. 3.20 B). Eine Grundexpression der GBPs zeigte sich auch für mGBP3 und mGBP5 sowohl in der Milz als auch in der Leber. Eine gesteigerte Expression von mGBP3 konnte weder in der Leber noch in der Milz nachgewiesen werden, dafür konnte eine Hochregulation in den Peyerschen Plaques, den peripheren und mesenterialen Lymphknoten, dem Thymus und der Lunge festgestellt werden (Abb. 3.20 B). Im Gegensatz zu mGBP3 steigerte sich die Proteinmenge von mGBP5 in der Milz von 0 auf 24 Stunden und blieb im Verlauf der nächsten 48 Stunden relativ konstant. Interessanterweise trat in der Leber der Listerien infizierten Mäuse nach 24 Stunden eine Spleißvariante von mGBP5 bei etwa 68 kDa auf, deren Größe der bereits publizierten Spleißvariante mGBP5a entspricht (Nguyen et al., 2002). Nach 48 Stunden nahm der Anteil dieser Variante deutlich zu, während mGBP5 konstant blieb. Diese Daten wurden durch RT-PCR Analysen mittels Spleißvarianten-spezifischer Primer und Sonden bestätigt (s. Diplomarbeit S. Schmidt). Die Spleißvariante mGBP5a konnte nicht in der Milz *L. monocytogenes* infizierter Mäuse oder der Milz, Leber und Lunge *T. gondii* infizierter Mäuse detektiert werden (Abb. 3.20 A und 3.22). Ob es sich hierbei um eine organ- oder pathogenspezifische Spleißvariante handelt, muss noch näher charakterisiert werden. Wie mGBP1, 2 und 3 wurde auch mGBP5 in den Peyerschen Plaques, den peripheren und mesenterialen Lymphknoten, dem Thymus, der Lunge und zusätzlich im Gehirn exprimiert. Eine erhebliche Proteinsteigerung im Verlauf der Infektion konnte lediglich im Thymus, der Lunge und dem Gehirn festgestellt werden (Abb. 3.20 B).

Wie schon im Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben, konnte erneut eine Expression von mGBP1 in C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den stimulierten BMDC führte die Infektion mit Listerien zu einem wesentlich stärkeren mGBP1 Signal. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass mGBP1 in C57BL/6 Mäusen existiert und nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* exprimiert werden kann.

Diese koordinierte starke Induktion der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 während einer Infektion gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die GTPasen eine Rolle in der Infektionsabwehr spielen könnten und somit als anti-infektiöse Effektormoleküle in Frage kommen.

3.2.3 Subzelluläre Lokalisation der mGBPs nach Listerieninfektion

Nach diesem Befund stellte sich die Frage, wie die GBPs als Effektormoleküle gegen eine Listerieninfektion wirken könnten. Eine Möglichkeit stellt eine direkte Interaktion zwischen intrazellulärem Pathogen und der GTPase dar. Um dies zu untersuchen, wurden die mGBP stabil exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten mit IFN- γ stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen und für einen Zeitraum von 10 Minuten bis 3 Stunden mit *L. monocytogenes* infiziert. Die Listerien wurden anschließend mittels Immunfärbung markiert und die Präparate am Konfokalmikroskop auf eine mögliche Kolokalisation der GBPs mit dem Erreger untersucht. Die Aufnahmen zeigen die Ergebnisse nach IFN- γ Inkubation und 30 Minuten Infektion (Abb. 3.21). Nach 30 Minuten befand sich bereits ein großer Teil der Listerien in den Zellen. Dennoch konnte für mGBP1, 2, 3 oder mGBP5 keine Kolokalisation mit den Pathogenen beobachtet werden. Dies änderte sich auch nicht nach Verlängerung der Infektionszeit und war unabhängig von der Präinkubation mit IFN- γ .

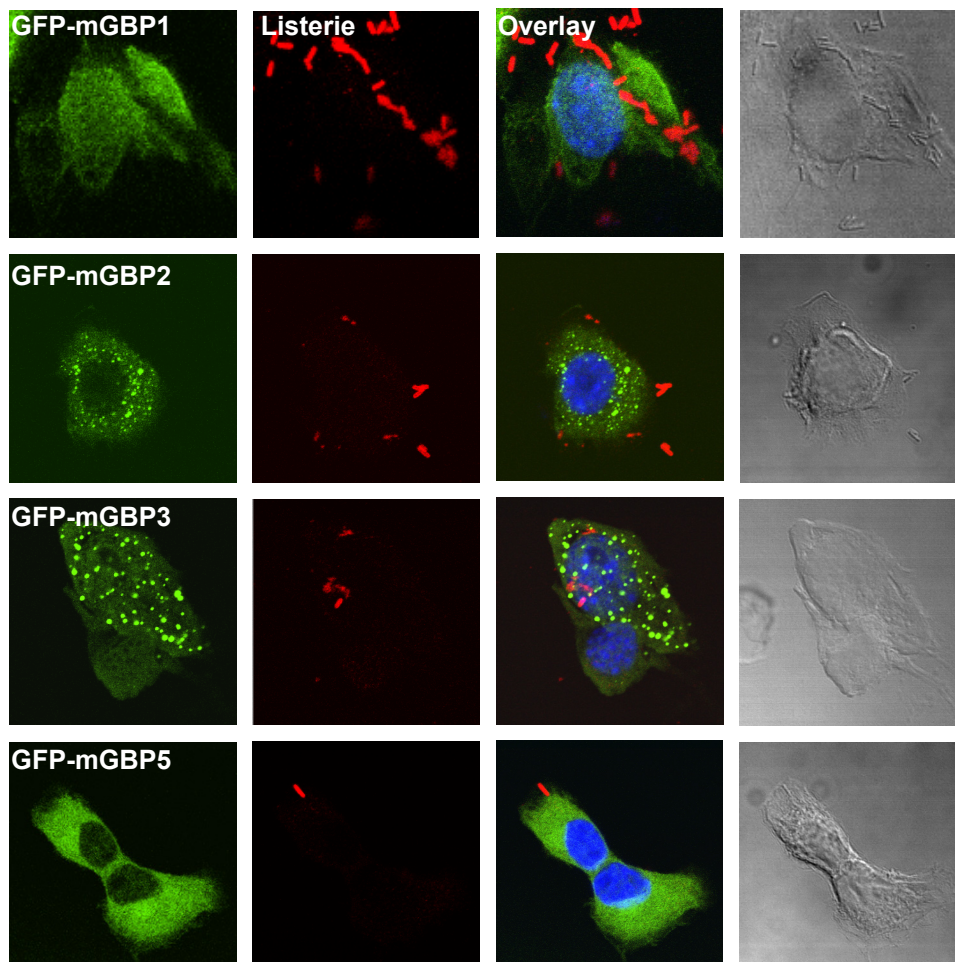


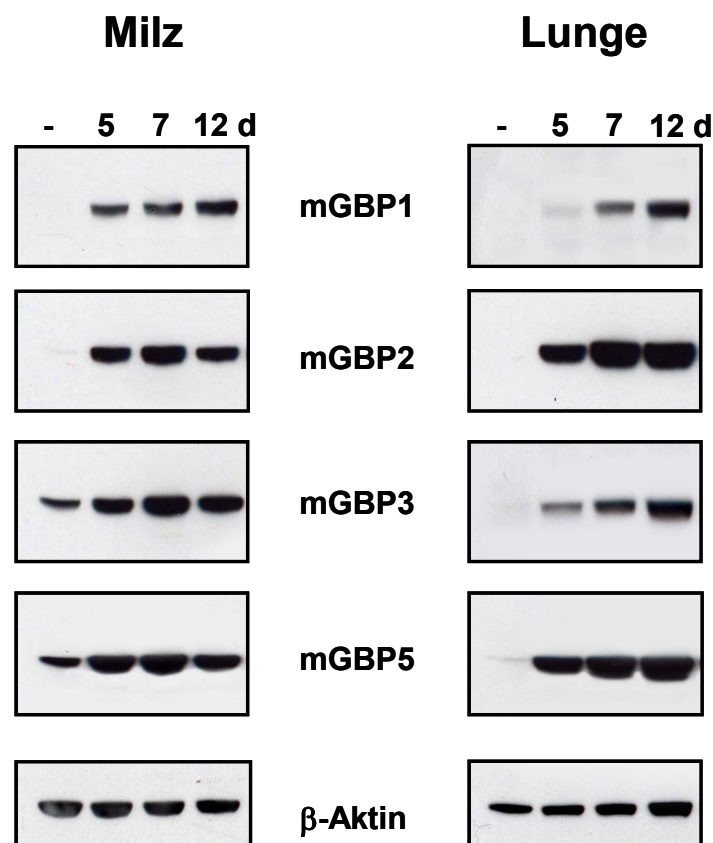
Abb. 3.21: Lokalisation der mGBPs nach Listerieninfektion. Stabil transduzierte GFP-mGBP1, 2, 3 und 5 NIH 3T3 Fibroblasten wurden für 16 h mit IFN- γ stimuliert und für 30 min mit Listerien infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Listerien mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Erste Spalte: GFP-mGBP1, 2, 3, 5 Fusionskonstrukte; zweite Spalte: α -*L. monocytogenes* gefärbt; dritte Spalte: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau; vierte Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

3.2.4 mGBP Expression in Mäusen nach *T. gondii* Infektion

Um zu untersuchen, ob die 65 kDa GBPs auch nach Infektion mit Protozoen exprimiert werden, wurden C57BL/6 Mäuse wie in Abschnitt 2.9.6 beschrieben mit dem Modellorganismus *T. gondii* infiziert. Nach 5, 7 und 12 Tagen wurden die Organe entnommen und im Western Blot auf die Expression der GTPasen mGBP1, mGBP2, mGBP3 und mGBP5 hin getestet.

Neben der Lunge und der Milz wurde die Expression der GTPasen in PECs, Lymphknoten, Leber und Gehirn sowohl in uninfizierten als auch in Toxoplasma infizierten Tieren untersucht. Hervorgehoben sind die Milz und die Leber als die Hauptansiedlungsorte in der akuten Phase der Infektion (Abb. 3.22 A).

A



B

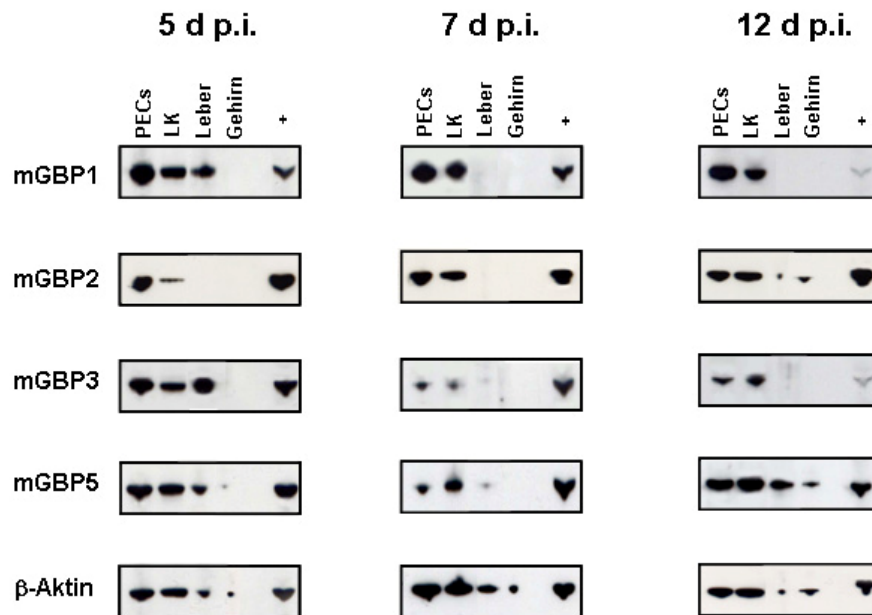


Abb. 3.22: Expression der mGBPs nach Infektion mit *T. gondii*. C57BL/6 Mäuse wurden mit 20 Zysten ME49 Toxoplasmen infiziert. Nach 5, 7 bzw. 12 Tagen wurden die Organe entnommen, lysiert und im Western Blot analysiert. Dargestellt ist die Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in der Milz und der Lunge (A) bzw. den PECs, LK, Leber und Gehirn (B). Es wurden jeweils 35 μ g Protein aufgetragen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. d=Tag(e), p.i.=nach Infektion.

In den uninfizierten Kontrollmäusen konnte in keinem der Organe mGBP1 oder mGBP2 im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.22 A). Doch bereits fünf Tage nach Toxoplasmen Infektion zeigte sich eine deutliche Hochregulation von mGBP1 und mGBP2 in der Milz und der Lunge. Die Expression beider GTPasen steigerte sich im Laufe der Infektion erheblich (Abb. 3.22 A: Tag 7 und 12). Dies traf neben der Milz und der Lunge auch für die PECs und die Lymphknoten zu. Lediglich im Gehirn zeigte sich erst nach 12 Tagen Infektion eine Induktion der mGBP2 Expression (Abb. 3.22 B). Im Gegensatz zu mGBP1 und mGBP2 waren mGBP3 und mGBP5 bereits in der Milz uninfizierten Kontrollmäusen basal exprimiert (siehe auch Abb. 3.20 A). Jedoch wurde die Proteinmenge durch die Infektion mit Toxoplasmen signifikant erhöht und steigerte sich im Laufe der Infektion. Auch in der Lunge war 5 Tage nach der Infektion mGBP3 und 5 detektierbar, deren Menge ebenfalls nach 7 und 12 Tagen deutlich anstieg. In den anderen Organen wurden mGBP3 und 5 auch stark induziert. So zeigte sich im Gehirn, in das die Toxoplasmen im Laufe der Infektion einwandern, nach 12 Tagen eine starke mGBP5 Hochregulation (Abb. 3.22 B).

Zusammen mit den Ergebnissen aus der Listerieninfektion weist die starke Induktion der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 auch nach Toxoplasmeninfektion darauf hin, dass die GBPs eine entscheidende Rolle in der Infektionsabwehr spielen können.

3.2.5 Kolokalisation der 65 kDa GTPasen mit *T. gondii*

Da gezeigt werden konnte, dass die GTPasen in der Maus auch nach einer Infektion mit *T. gondii* stark hochreguliert werden, wurde getestet ob *T. gondii*, als Modellorganismus für intrazelluläre parasitäre Infektionen, Einfluss auf die mGBP Verteilung ausübt. Hierfür wurden sowohl 264.7 RAW Makrophagen als auch embryonale Fibroblasten und NIH 3T3 Zellen entweder endogen mit den spezifischen Antikörpern gegen die GTPasen gefärbt oder als stabil exprimierende GFP-mGBP Linie verwendet. Die Zellen wurden vor der Infektion für 16 Stunden mit IFN- γ stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen und für zwei Stunden mit Toxoplasmen (Stamm ME49, Verhältnis Zellen:Parasiten 1:50) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und dann mit einem spezifischen Antikörper gefärbt, welcher das *T. gondii* Oberflächenprotein SagI detektiert. Die Lokalisation der GTPasen und der Toxoplasmen wurde im Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 3.23).

In diesen Experimenten ließ sich ein klarer Effekt der Toxoplasmeninfektion auf die Lokalisation der GTPasen mGBP2 und mGBP3 feststellen. Die GBPs verloren ihre subzelluläre vesikuläre Verteilung und rekrutierten nahezu vollständig zu den in die Zellen invasierten Toxoplasmen. Dies traf sowohl für die endogene Färbung mit den spezifischen Antikörpern, als auch mit den stabil exprimierenden Linien von mGBP2 und mGBP3 in 264.7 RAW Makrophagen und Fibroblasten zu. Eine Kolokalisation mit der parasitophoren Vakuole (PV) der Toxoplasmen zeigte sich nur in den IFN- γ vorstimulierten Zellen. GBP stabil exprimierende und nicht IFN- γ stimulierte Zellen zeigten nur nach sehr langer Infektionszeit (> 7 h) sehr vereinzelte Rekrutierungen zur PV (Daten nicht gezeigt). Weitere Experimente ergaben, dass nach IFN- γ Stimulation die Umverteilung der GTPasen zum Toxoplasma innerhalb von 30 Minuten nach der Infektion beginnt und die Akkumulation an der PV über einen langen Zeitraum bestehen bleibt (>16 Stunden) (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise akkumulierte GFP-mGBP5 nicht mit der PV, unabhängig vom Stimulationsstatus der Zellen. Eine Färbung mit dem für mGBP1 spezifischen Antikörper ließ eine deutliche Überlappung der GTPase mit der Toxoplasmen Oberfläche erkennen, was durch die gelbe Farbe in der Überlagerung der LSM-Einzelbilder zu sehen ist. Zusätzlich fiel auf, dass weiterhin grün angefärbte Vesikel im Zytoplasma der Zelle vorlagen, die bei den endogenen Färbungen der anderen GTPasen nicht zu beobachten war. Erstaunlicherweise kolokalisierte das stabil in der Zelle exprimierte GFP-mGBP1 nicht mit der PV. Detaillierte Untersuchungen ergaben, dass eine weitere GTPase existiert, die im N-terminalen Bereich sequenzidentisch mit mGBP2 ist und im C-Terminus der mGBP1 Sequenz entspricht (Daten nicht gezeigt). Diese mGBP2/1 GTPase konnte in 264.7 RAW Makrophagen nach IFN- γ Stimulation zu den Toxoplasmen rekrutieren (Abb. 3.23). Der mGBP1 spezifische Antikörper bindet im C-terminalen Bereich und detektiert somit mGBP1 und mGBP2/1. Daher zeigten die Bilder bei der endogenen mGBP1-Färbung sowohl die Kolokalisation von mGBP2/1, als auch die

subzelluläre Verteilung von mGBP1, wodurch die stärkere Grundfärbung der Zellen im Vergleich zu den anderen Endogenfärbungen erklärt werden kann.

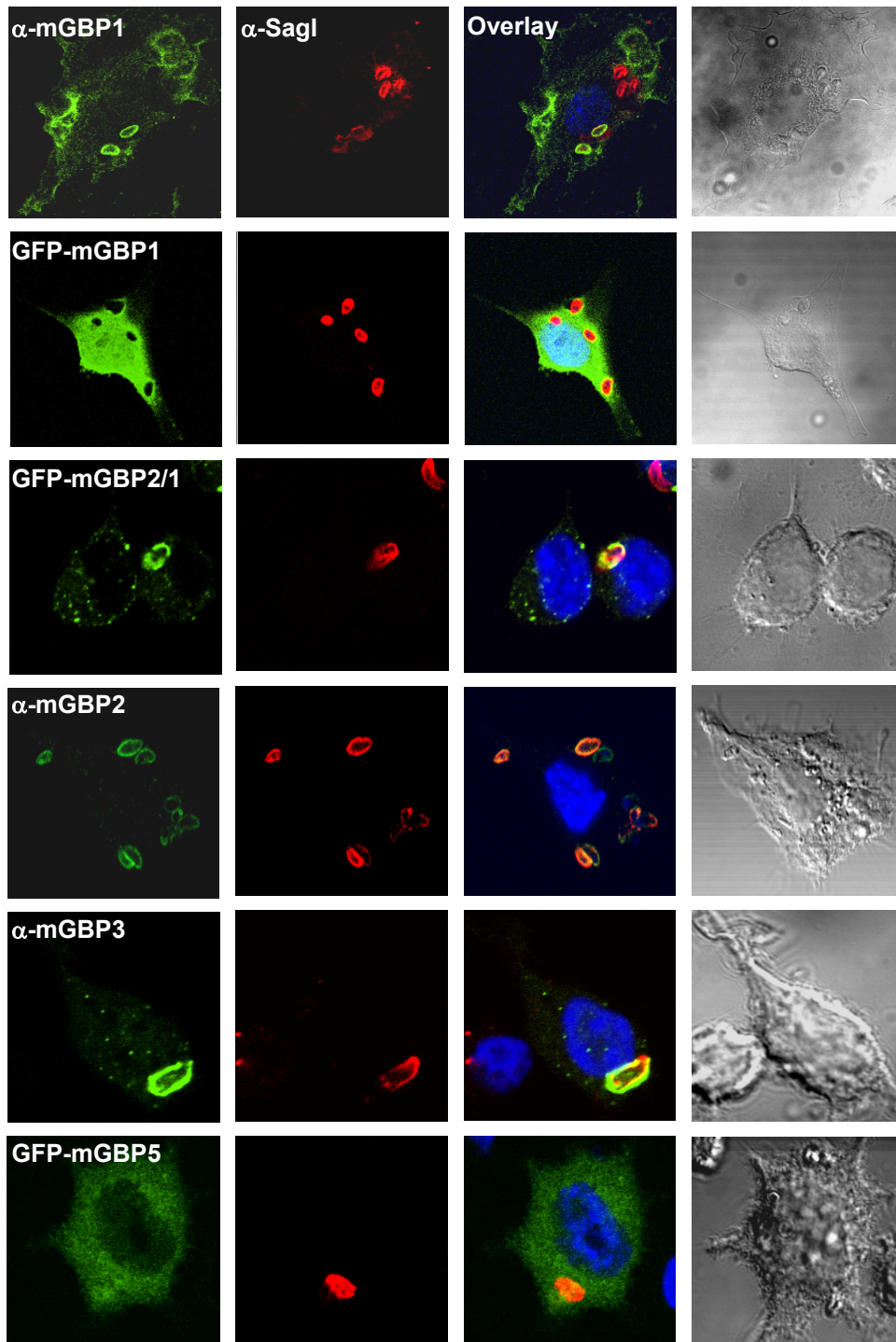


Abb. 3.23: Lokalisation der mGBPs nach *T. gondii* Infektion. Stabil transduzierte GFP-mGBP1 und GFP-mGBP5 NIH 3T3 Fibroblasten oder transient GFP-mGBP2/1 transfizierte RAW Makrophagen wurden 16 h mit IFN- γ stimuliert und 2 h mit Toxoplasmen infiziert. Alternativ wurden Fibroblasten IFN- γ stimuliert, mit Toxoplasmen infiziert und die GTPasen mGBP1 + mGBP2/1, mGBP2 und mGBP3 endogen angefärbt. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Erste Spalte: GFP-mGBP1 und GFP-mGBP5 Fusionskonstrukte oder α -mGBP1 (2/1), 2 und 3 endogen gefärbt; zweite Spalte: *T. gondii* mit α -Sag1 gefärbt; dritte Spalte: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau; vierte Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

Bei der Akkumulation der GTPasen um die PV der Toxoplasmen handelt es sich nicht um einen generellen Effekt der GTPasen, Fremdkörper zu detektieren. Dies konnte durch Fluospheres gezeigt werden, die nach Phagozytose durch 264.7 RAW Makrophagen nicht von mGBP2 umrundet wurden (Abb. 3.24).

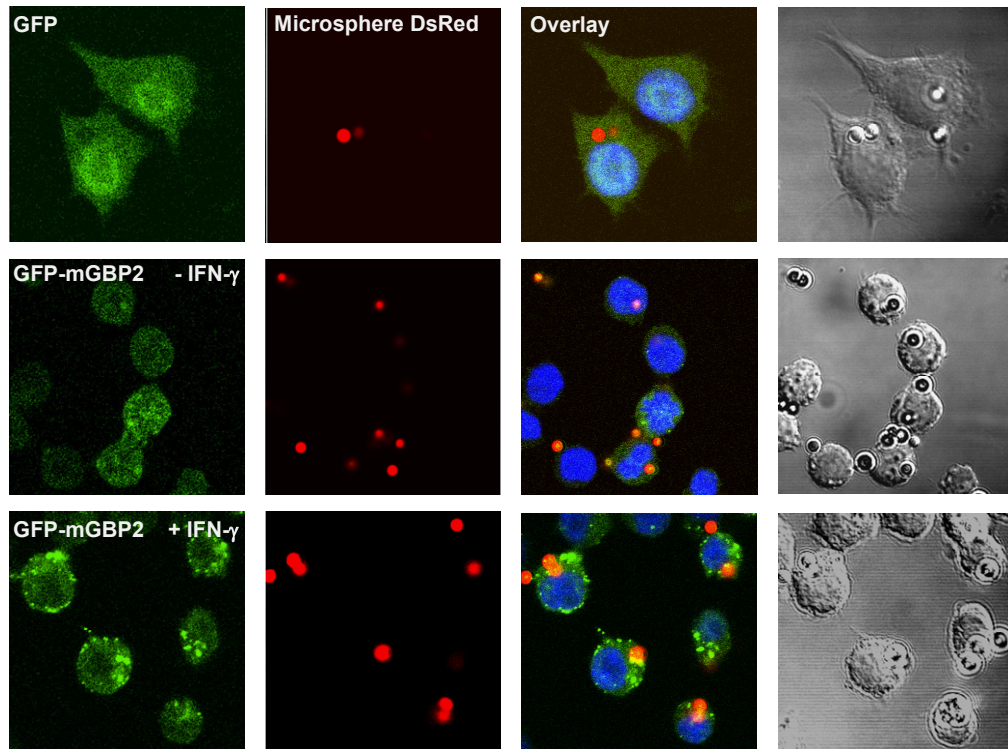


Abb. 3.24: Lokalisation von GFP-mGBP2 und Fluospheres in Makrophagen. Stabil transduzierte GFP und GFP-mGBP2 264.7 RAW Makrophagen wurden 16 h mit IFN- γ stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit Fluospheres inkubiert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Erste Spalte: GFP bzw. GFP-mGBP2; zweite Spalte: DsRed fluoreszierende Fluospheres; dritte Spalte: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau; vierte Spalte: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

GFP-mGBP2 stabil exprimierende Makrophagen wurden für 16 Stunden mit IFN- γ stimuliert bzw. unstimuliert gelassen und mit DsRed fluoreszierenden Fluospheres inkubiert. Zur Kontrolle wurden GFP exprimierende Zellen verwendet. Nach Phagozytose der Fluospheres wurden die Zellen fixiert, eingedeckelt und am Konfokalmikroskop analysiert. Weder bei den unstimulierten noch bei den stimulierten GFP-mGBP2 exprimierenden 264.7 RAW Makrophagen zeigte sich eine Kolokalisation zwischen Fluospheres und GTPase (Abb. 3.24).

3.2.5.1 Lokalisation der mGBPs nach Infektion mit virulenten Toxoplasmen

Um den Mechanismus der Interaktion zwischen GTPasen und Toxoplasmen näher zu untersuchen, wurden neben der Infektion mit dem avirulenten Toxoplasmen-Stamm ME49 auch

die virulenten BK Toxoplasmen verwendet. Embryonale Fibroblasten (Abb. 3.25) oder 264.7 RAW Makrophagen (Daten nicht gezeigt) wurden mit IFN- γ vorinkubiert, um die endogenen GTPasen zu induzieren. Nach 16 Stunden wurden die Zellen für zwei Stunden mit BK Toxoplasmen infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, die GTPasen mit den Antikörpern gegen mGBP1, 2 oder 3 endogen angefärbt und im Konfokalmikroskop analysiert. Alternativ wurden die mGBP stabil exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten in derselben Versuchsanordnung verwendet. Erstaunlicherweise zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen einer Infektion mit dem avirulenten Stamm ME49 und den virulenten BK Toxoplasmen. In Abbildung 3.25 sind zum Vergleich beide Infektionen untereinander dargestellt. mGBP1 (bzw. mGBP2/1) und mGBP2 rekrutierten, wie schon in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, zu den avirulenten Toxoplasmen und umschlossen diese vollständig (Zeile 1 und 3). Nach einer Infektion der embryonalen Fibroblasten mit Toxoplasmen des virulenten BK Stammes konnte nur selten eine Rekrutierung der GTPasen mGBP1 (mGBP2/1) und 2 zu der PV detektiert werden (Zeile 2 und 4). Allenfalls konnte eine partielle Erkennung des Toxoplasma ausgemacht werden, bei der nur ein Teil der PV von der GTPase umrundet wurde. Dasselbe Ergebnis konnte für mGBP3 gezeigt werden (Daten nicht abgebildet). Weiterhin konnten keine Unterschiede zwischen embryonalen Fibroblasten, 264.7 RAW Makrophagen und GTPase stabil exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten ausgemacht werden.

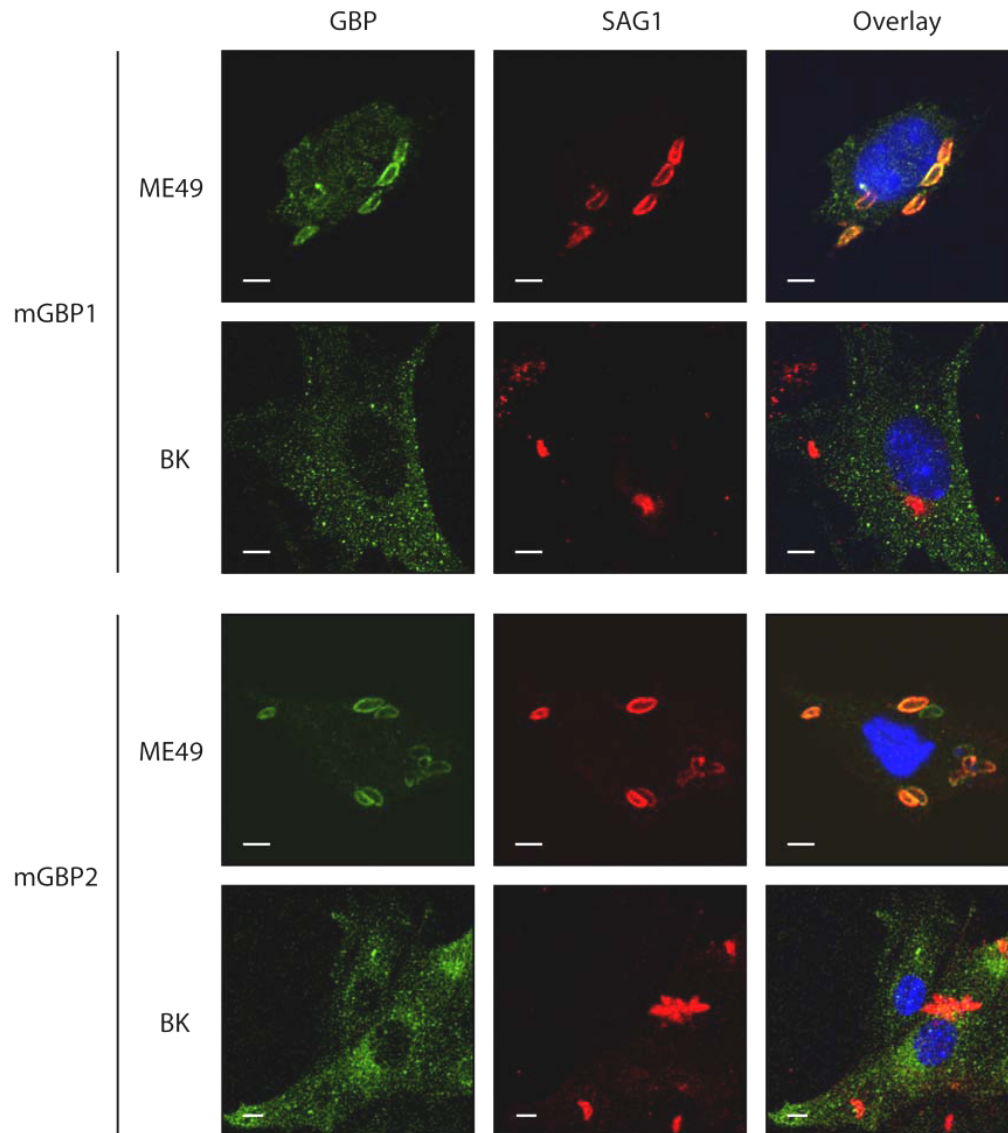


Abb. 3.25: Lokalisation der 65 kDa GTPasen nach Infektion mit virulenten Toxoplasmen. EF wurden 16 h mit IFN- γ stimuliert und 2 h mit ME49 bzw. BK Toxoplasmen infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die GTPasen mGBP1 (mGBP2/1) bzw. mGBP2 mit den entsprechenden Antikörpern endogen und die Toxoplasmen mit α -SagI gefärbt. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Erste Spalte: mGBP1 (mGBP2/1) bzw. mGBP2 endogen gefärbt; zweite Spalte: *T. gondii* mit α -SagI gefärbt; dritte Spalte: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau.

Eine graphische Darstellung der von den GTPasen assoziierten avirulenten Toxoplasmen im Vergleich zu den virulenten Toxoplasmen zeigt, dass etwa jedes zweites ME49 Toxoplasma von der GTPase 1, 2 oder 3 umlagert wurde, wohingegen lediglich 3-4 % aller virulenten Toxoplasmen von den GBPs detektiert wurden (Abb. 3.26). Somit ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kolokalisation der GTPasen mit Toxoplasmen des avirulenten ME49 Stammes und der virulenten BK Toxoplasmen. Warum die GTPasen an den virulenten Stamm nicht akkumulieren können, konnte noch nicht geklärt werden.

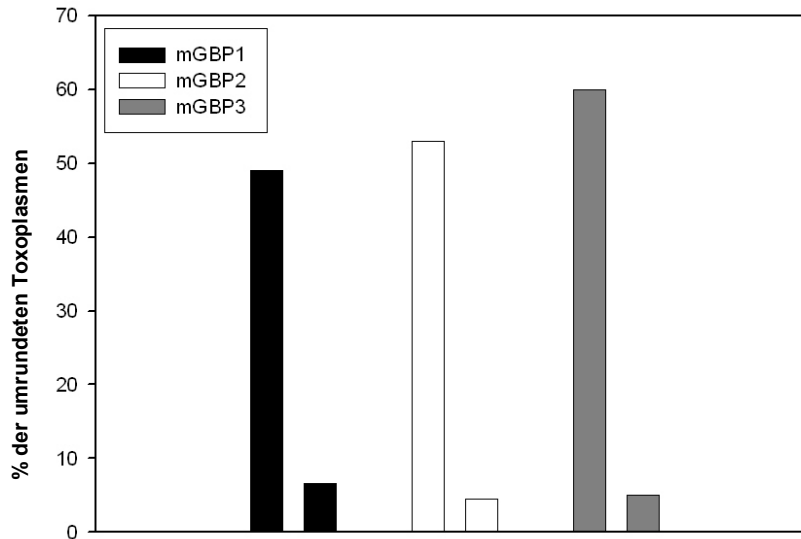


Abb. 3.26: Vergleich der 65 kDa GTPasen Rekrutierung zu virulenten (BK) und avirulenten (ME49) Toxoplasmen. Graphische Auswertung der Prozentzahlen der von den GTPasen mGBP1, 2 und 3 erkannten avirulenten Toxoplasmen (linker Balken) im Vergleich zu den virulenten Toxoplasmen (rechter Balken).

Um zu untersuchen, welche Eigenschaften die GTPasen aufweisen müssen um zur Toxoplasma PV zu rekrutieren, wurden im Folgenden verschiedene Mutationsanalysen der mGBPs durchgeführt. Dabei wurden zum einen die GTP-Bindestellen und die Isoprenylierungsstelle von mGBP2 mutiert, zum anderen wurden Hybride zwischen der zur Toxoplasmen PV rekrutierenden GTPase mGBP2 und der nicht zur Toxoplasmen PV rekrutierenden GTPase mGBP5 kloniert.

3.2.5.2 Zelluläre Lokalisation von mGBP2 Mutanten nach Infektion mit avirulenten Toxoplasmen

Die Familie der GTP-bindenden Proteine zeichnet sich durch eine geringe Affinität zu Guaninnukleotiden, einer Nukleotid-abhängigen Oligomerisierung und einer kooperativen GTPase Aktivität als gemeinsame Merkmale aus. Weiterhin besitzen die 65 kDa GTPasen zwei weitere, spezielle Eigenschaften: sie zeigen eine ähnliche Affinität zu GTP, GDP und GMP und können GTP zu GDP und GMP hydrolysieren, eine einzigartige Eigenschaft der GBP Familie. Zur Hydrolyse des GTP haben die GTPasen vier GTP-Bindestellen: G1 (P-Loop: GxxxxGKS/T), G2 (T), G3 (DxxG) und G4 ((N/T)KxD), über deren Funktion bisher wenig bekannt ist. Studien über GTP-Bindestellen Mutanten von hGBP1, welche nicht mehr in der Lage waren GTP zu binden oder zu hydrolysieren, haben gezeigt, dass GTP-Bindung, jedoch nicht Hydrolyse, essentiell zur Assoziation des Proteins mit dem Golgi-Apparat ist (Modiano et al., 2005).

Um herauszufinden, ob die GTP-Bindung oder Hydrolyseaktivität der GTPasen für die Assoziation mit den Toxoplasmen essentiell ist, wurden Mutanten von mGBP2 hergestellt, die Einzelaminosäurenaustausche in den GTP-Bindestellen und zusätzlich in der

Isoprenylierungsstelle aufweisen. Die Punktmutationen wurden analog zu den für hGBP1 beschriebenen GTP-Bindungs- und Hydrolysemutanten hergestellt (Praefcke et al., 2004). Als erste Mutation wurde in der G1 GTP-Bindestelle das Arginin an Position 48 gegen ein Alanin ausgetauscht (R48A). Diese Mutation entspricht der R46A Mutante, die für hGBP1 beschrieben wurde. Dieses Protein besitzt eine ähnlich hohe Affinität zu GTP wie das Wildtypprotein, weist jedoch eine deutlich verringerte GTP-Hydrolyseaktivität auf, die vermutlich durch Verhinderung der beschriebenen GTP-abhängigen Oligomerisierung des Proteins zustande kommt. In der zweiten Mutante wurde die Aminosäure Lysin, welche sich ebenfalls im P-Loop befindet, zu Alanin verändert (K51A). Das Lysin interagiert mit der β - und γ -Phosphatgruppe sowie mit dem Magnesiumion, das als Kofaktor für die Nukleotidbindung und Hydrolyse fungiert. Anders als die R46A Mutante zeigt diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp sowohl eine deutlich verringerte GTP-Bindung als auch eine geringere Hydrolyserate. K51 scheint daher in der Nukleotidbindung, der Oligomerisation und der Katalyse des GTPase-Zyklus essentiell zu sein. Die nächste Mutation verändert das dritte Nukleotidbindungsmotiv (G3), indem die Glutaminsäure an der Stelle 99 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (E99A). Dadurch wurde in der humanen GTPase 1 sowohl die GTP-Bindung als auch die Hydrolyserate deutlich verringert. Als vierte Mutante wurde die Aminosäure Aspartat 184 in der G4 Region gegen Asparagin (D184N) ausgetauscht. Die entsprechende D184N Mutante in hGBP1 ist gekennzeichnet durch eine stark verminderte Affinität zu GTP. Die Hydrolyseraten sind jedoch ähnlich wie die des Wildtyps. Neben den GTP-Bindungs- und Hydrolysemutanten sollte die Funktion der Isoprenylierung auf die Toxoplasmenerkennung untersucht werden. Dafür wurde das Zystein der Isoprenylierungssequenz von mGBP2 an der Stelle 592 gegen ein Serin ausgetauscht. Durch Entfernen dieser Lipidansatzstelle kann die Isoprenylierung verhindert werden (Vestal et al., 2000).

Mit Hilfe eines lentiviralen Gentransfers wurden von den GTP-Bindungs- und Hydrolysemutanten sowie der isoprenylierungsdefizienten Mutante stabil exprimierende NIH 3T3 Zellen angefertigt. Alle Konstrukte enthielten ein N-terminales GFP-Protein, so dass ein GFP-mGBP Fusionsprotein von den Zellen exprimiert wurde. Die Zellen wurden kultiviert und die Lokalisation der einzelnen Mutanten mit und ohne IFN- γ Stimulation im Konfokalmikroskop betrachtet (Abb. 3.27, 1. Spalte).

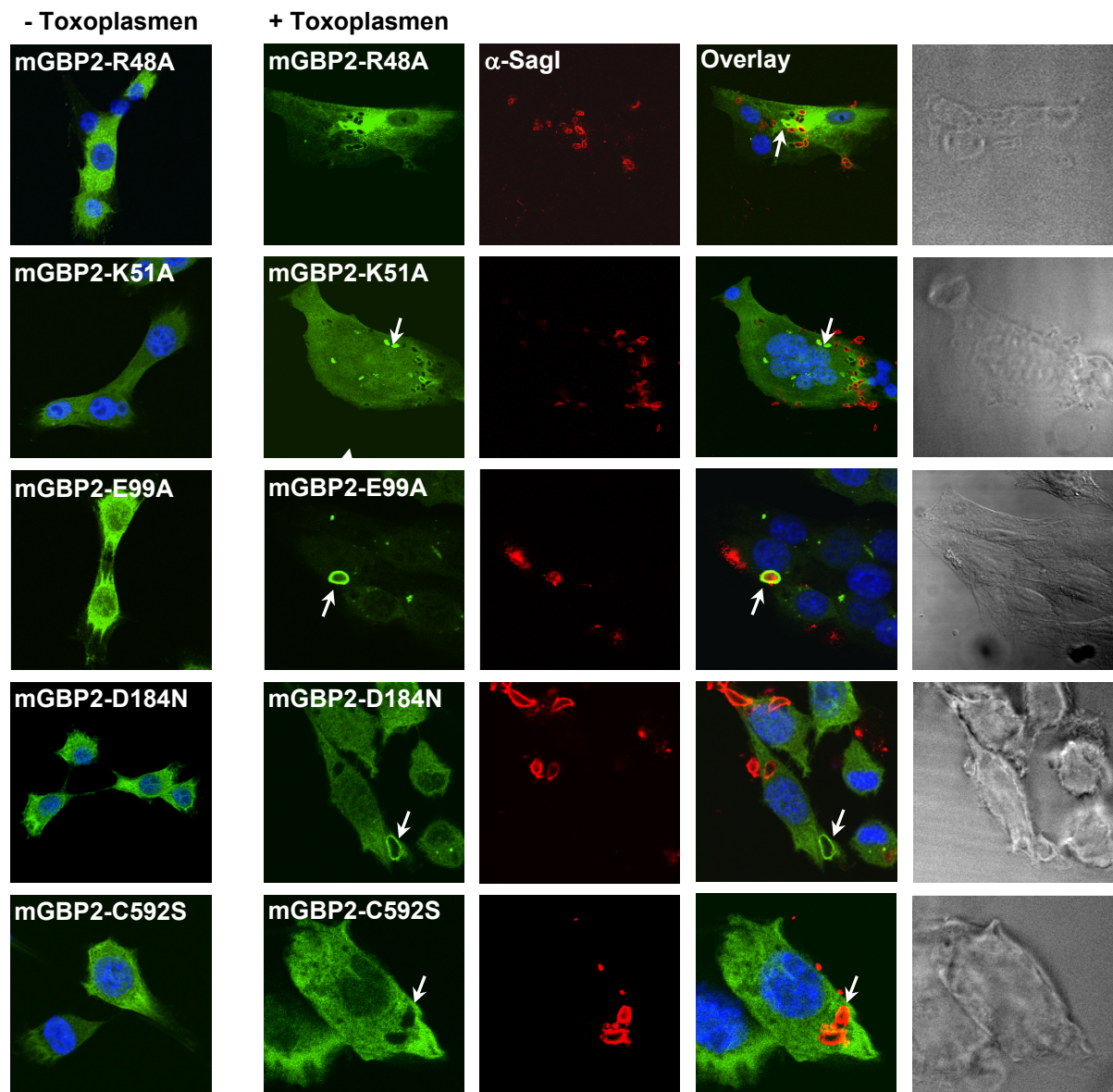


Abb. 3.27: Lokalisation der GFP-mGBP2 GTPase Mutanten mit und ohne Toxoplasmeninfektion. 1. Spalte: Lokalisation der GFP-mGBP2 Mutanten in NIH 3T3 Zellen nach IFN- γ Stimulation. 2.-5. Spalte: GFP-mGBP2 Mutanten exprimierende NIH 3T3 Zellen wurden für 16 h mit IFN- γ vorinkubiert, 2 h mit ME49 Toxoplasmen infiziert, anschließend fixiert und die Toxoplasmen mit α -Sagl gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Spalte 2: GFP-mGBP2 Mutanten; Spalte 3: *T. gondii* mit α -Sagl gefärbt; Spalte 4: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau; Spalte 5: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen ist, zeigten sowohl die GTP-Bindungsmutanten R48A, K51A, E99A und D184N als auch die Isoprenylierungsmutante C592S eine Fehlverteilung. Die typische vesikuläre Lokalisation der GTPasen war vollständig aufgehoben, so dass die Mutanten homogen in der Zelle verteilt vorlagen. Diese Fehlverteilung war auch bei den unstimulierten Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Um zu klären, ob die GTP-Bindungsdefizienten GTPasen und die isoprenylierungsdefiziente Mutante nach wie vor die Fähigkeit der Assoziation mit Toxoplasmen besitzen, wurden die Fibroblasten nach 16-stündiger IFN- γ Behandlung zusätzlich mit ME49 Toxoplasmen infiziert. Erstaunlicherweise zeigten alle GTP-Bindungsmutanten eine, wenn auch zahlenmäßig verringerte, Kolo-kalisation mit der PV der Toxoplasmen (Abb. 3.27, Zeile 1-4). Allerdings verursachte die Mutation in der ersten GTP-Bindestelle (R48A) eine deutliche Reduktion der Toxoplasmenerkennung. Nur noch etwa jedes fünfte Toxoplasma wurde von der Mutante umrundet. Somit scheint die Fähigkeit zur Hydrolyse zumindest teilweise einen Effekt auf die Identifizierung der Toxoplasmen durch die GTPase zu haben. Die GTP-Bindung scheint keine absolute Voraussetzung für die Toxoplasmenerkennung zu sein. Interessanterweise konnte bei der isoprenylierungsdefizienten Mutante keinerlei Kolo-kalisation mit der PV gefunden werden (Abb. 3.27, Zeile 5). Die über die Isoprenylierung vermittelte Verankerung von mGBP2 in Lipidschichten scheint somit essentiell für die Rekrutierung zu den Erregern zu sein.

Wie bereits im Abschnitt 3.2.5 beschrieben, kolo-kalisierte die GTPase mGBP2 mit den Toxoplasmen, wohingegen mGBP5 nicht in der Lage war, zu den Toxoplasmen zu rekrutieren. Mit Hilfe von Hybriden aus mGBP2 und 5 sollte als nächstes versucht werden, das Toxoplasma-Rekrutierungsmotiv einzuengen. Hierfür wurden zwei Konstrukte kloniert, wobei das erste Konstrukt aus dem G1 bis G4 Motiv von mGBP2 und der fehlende Bereich aus der mGBP5 Sequenz, inklusive der mGBP5 Isoprenylierungsstelle, bestand. Das zweite Plasmid wurde exakt umgekehrt kloniert und enthielt somit die G1 bis G4 Region aus mGBP5 und die noch fehlende Sequenz von mGBP2 mit dessen Isoprenylierungsmotiv (Abb. 3.28).

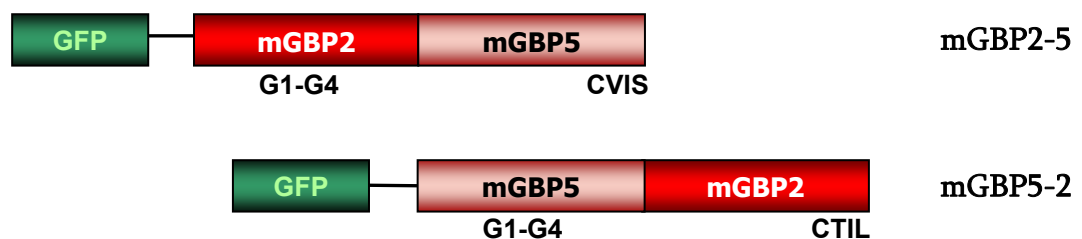


Abb. 3.28: Schematische Darstellung der mGBP2 und 5 Hybridkonstrukte. Obere Darstellung: Konstrukt aus GFP und dem G1-G4 Motiv von mGBP2, fusioniert mit der fehlenden Sequenz von mGBP5; CVIS entspricht dem Aminosäuremotiv der Isoprenylierungsstelle; untere Darstellung: Fusionsprotein aus GFP und G1-G4 Sequenz von mGBP5 und den restlichen Aminosäuren von mGBP2; CTIL steht für das Aminosäuremotiv, an denen das Protein isoprenyliert wird.

Mit beiden Plasmiden wurden mittels lentiviraler Transduktion GFP-mGBP2-5 und GFP-mGBP5-2 stabil exprimierende NIH 3T3 Fibroblasten generiert. Diese wurden für 16 Stunden mit IFN- γ stimuliert und anschließend für 2 Stunden mit ME49 Toxoplasmen infiziert um zu untersuchen, ob eines der beiden mGBP2-5 Hybridproteine in der Lage ist, zu den Toxoplasmen zu rekrutieren. Die Zellen wurden fixiert, die Toxoplasmen mit α -SagI und der

Zellkern mit DAPI gefärbt. Die Präparate wurden am Konfokalmikroskop analysiert. Zunächst fiel auf, dass auch diese Hybride, wie die mGBP2 GTPase Mutanten, nicht mehr in den für mGBP2 typischen Vesikeln angeordnet waren. Insbesondere das mGBP5-2 Hybrid ähnelte in der Verteilung eher mGBP5 mit der typischen perinukleären Akkumulation. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Hybrid aus N-terminaler mGBP2 Sequenz und C-terminaler mGBP5 Sequenz nicht zu den Toxoplasmen PV rekrutierte, wohingegen eine deutliche Akkumulation des mGBP5-2 Hybrids um die PV beobachtet wurde (Abb. 3.29).

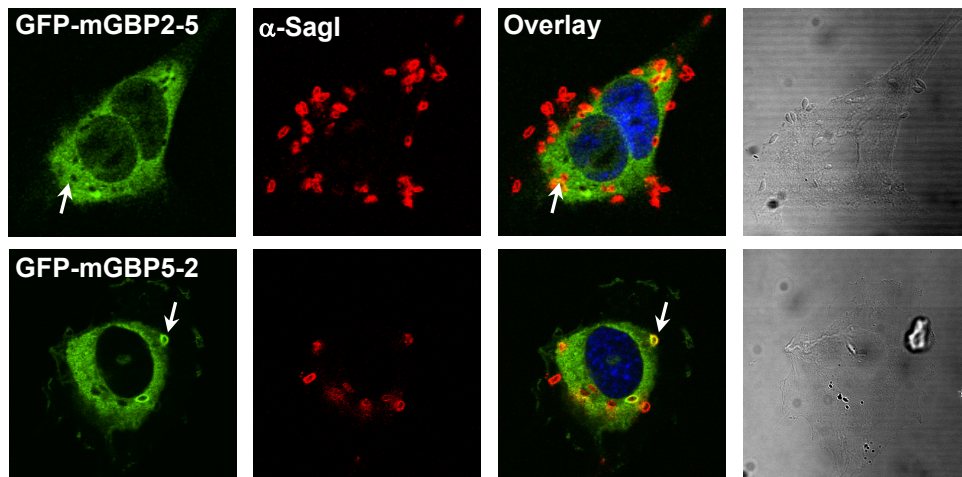


Abb. 3.29: Lokalisation der GFP-mGBP2-5 und GFP-mGBP5-2 Hybride in NIH 3T3 Zellen nach Toxoplasmeninfektion. Obere Reihe: Lokalisation des GFP-mGBP2-5 Hybrids in NIH 3T3 Zellen nach IFN- γ Stimulation und Toxoplasmeninfektion. Untere Reihe: GFP-mGBP5-2 exprimierende NIH 3T3 Zellen wurden für 16 h mit IFN- γ vorinkubiert und 2 h mit ME49 Toxoplasmen infiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Spalte 1: GFP-mGBP2-5 und GFP-mGBP5-2 Hybride; Spalte 2: *T. gondii* mit α -SagI gefärbt; Spalte 3: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau; Spalte 4: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

Zusammen mit den Ergebnissen der GTP-Bindungsmutanten und der Isoprenylierungsmutante lässt sich schließen, dass die Region, die für die Erkennung der Toxoplasmen essentiell ist, im C-terminalen Bereich von mGBP2 lokalisiert ist. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich die Isoprenylierungssequenzen von mGBP2 und mGBP5 unterscheiden, scheint insbesondere die Isoprenylierungsstelle eine entscheidende Rolle in der Toxoplasmenerkennung zu spielen.

Um die Rolle der Isoprenylierungsstelle in der Toxoplasmenerkennung zu untersuchen wurde eine mGBP2 Mutante generiert, deren Isoprenylierungssequenz der von mGBP5 entspricht (mGBP2-Iso-5). GFP-mGBP2-Iso-5 stabil exprimierende NIH 3T3 Zellen wiesen eine homogene Verteilung der GTPase im Zytoplasma auf (Abb. 3.30, obere Reihe). Nach 16-stündiger IFN- γ Stimulation der Fibroblasten und anschließender Infektion von zwei Stunden mit avirulenten Toxoplasmen zeigte sich im Konfokalmikroskop, dass lediglich 23 % der Toxoplasmen mit der GTPase Mutante kolokalisierten (Abb. 3.30, untere Reihe). Unstimulierte Zellen wiesen keine Kolokalisation von GFP-mGBP2-Iso-5 mit ME49 Toxoplasmen auf.

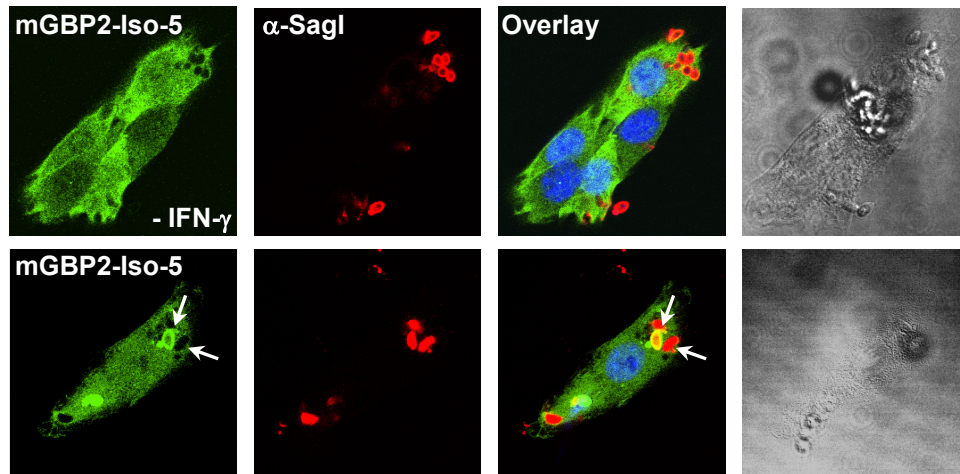


Abb. 3.30: Lokalisation der GFP-mGBP2-Iso-5 Mutante in NIH 3T3 Zellen nach Toxoplasmeninfektion. Obere Reihe: Lokalisation der GFP-mGBP2-Iso-5 Mutante in NIH 3T3 Zellen nach Toxoplasmeninfektion. Untere Reihe: GFP-mGBP2-Iso-5 exprimierende NIH 3T3 Zellen wurden für 16 h mit IFN- γ vorinkubiert und 2 h mit ME49 Toxoplasmen infiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. Spalte 1: GFP-mGBP2-Iso-5 Mutante; Spalte 2: *T. gondii* mit α -SagI gefärbt; Spalte 3: Überlagerung aus erster und zweiter Spalte und Kernfärbung (DAPI) in blau; Spalte 4: Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

Aus dieser Versuchsreihe kann geschlossen werden, dass die Isoprenylierungssequenz tatsächlich eine wichtige Rolle in der Erkennung von Toxoplasmen spielt.

Weiterführende Mutationsanalysen könnten diese Aussage unterstützen. Insbesondere eine Mutante von mGBP5 deren Isoprenylierungssequenz der von mGBP2 entspricht, wäre in diesem Zusammenhang interessant.

3.2.5.3 Wachstumshemmung der Toxoplasmen durch die mGBPs

Bisher gaben die Hochregulation der GTPasen nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit Listerien oder Toxoplasmen und die Kolo­kalisation von mGBP2/1, mGBP2 und mGBP3 mit der PV der Toxoplasmen Hinweise darauf, dass die GTPasen als anti-mikrobielle Effektormoleküle wirken, doch ein direkter Beweis hierfür konnte noch nicht geführt werden. Um nachzuweisen, dass die GTPasen auch direkt an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sind, wurden *in vitro* Erregerproliferationsassays durchgeführt. Hierfür wurden GFP-mGBP2 stabil exprimierende 264.7 RAW Makrophagen mit Hilfe lentiviraler Transduktion hergestellt. Als Kontrollzellen dienten GFP exprimierende 264.7 RAW Makrophagen. Die Zellen wurden vereinzelt und jeweils zwei unabhängige Klone subkloniert. Diese wurden ausplattiert und für 16 Stunden mit IFN- γ (200 U) vorstimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit ME49 Toxoplasmen infiziert (Verhältnis Toxoplasmen:Zellen 1:1,5). Uninfizierte Zellen dienten als Kontrollzellen. Nach 48-stündiger Infektion wurde für 24 Stunden ^3H -Uracil zur Messung der Toxoplasmenproliferation zugegeben und dann die weitere Proliferation mittels Einfrieren bei

-20°C unterbrochen. Die Proliferation der Toxoplasmen korreliert mit der Menge des eingebautem ^3H -Uracils.

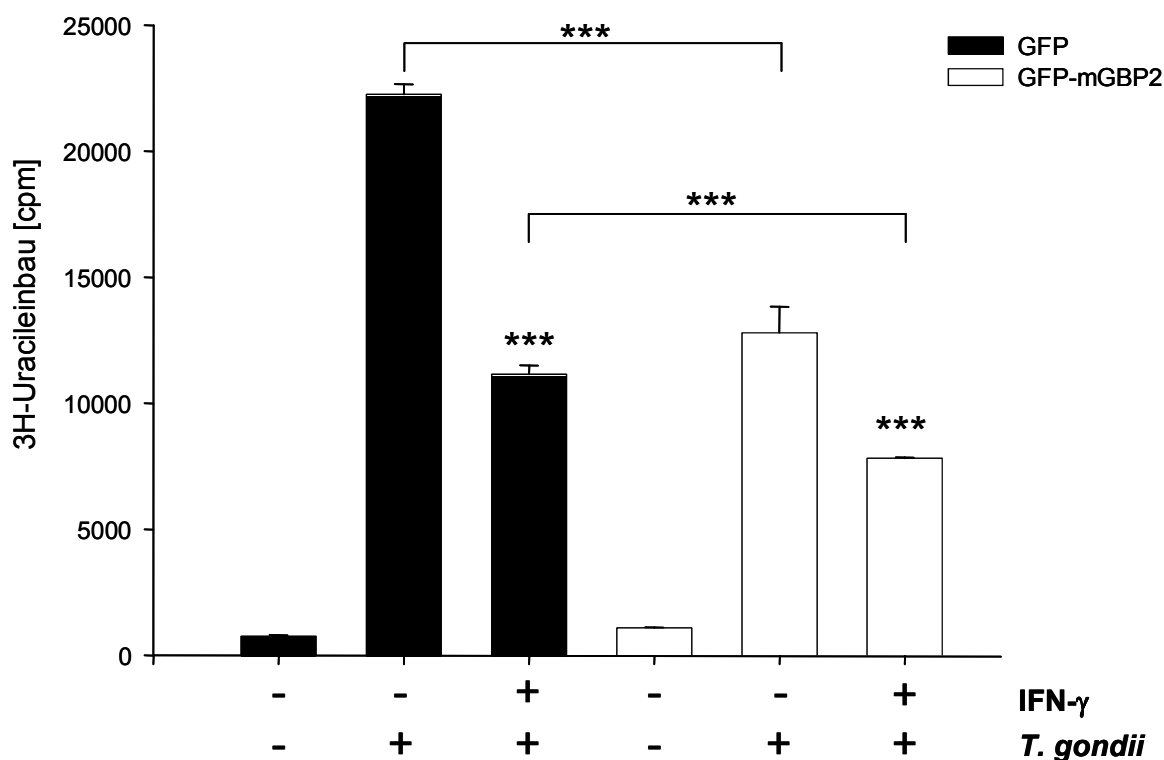


Abb. 3.31: Toxoplasmenproliferation in GFP und GFP-mGBP2 264.7 RAW Makrophagen. 3×10^4 Makrophagen wurden entweder mit IFN- γ (200 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen mit ME49 Toxoplasmen (2×10^4 /well) infiziert. Die Parasitenproliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Uracil in die Toxoplasmen in GFP und GFP-mGBP2 stabil exprimierenden 264.7 RAW Makrophagen gemessen. Dargestellt ist das Parasitenwachstum in unstimulierten und stimulierten Makrophagen, sowie GFP und GFP-mGBP2 exprimierenden Zellen (n=6; ***: $p < 0,001$). Es wurde jeweils 1 Klon von 2 dargestellt.

Der *in vitro* Toxoplasmen-Proliferationsassay zeigte, dass die Parasiten durch die Zugabe von IFN- γ signifikant in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten (Abb. 3.31). Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein. So wurde beschrieben, dass in murinen IFN- γ aktivierten Makrophagen die Toxoplasmenreplikation NO-abhängig inhibiert wird (Adams et al., 1990). Darüber hinaus konnte jedoch eine signifikante Verringerung der Toxoplasmenproliferation durch Expression der GTPase mGBP2 in unstimulierten Zellen im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Diese Inhibition wurde nach zusätzlicher IFN- γ Stimulation noch verstärkt. Auf Grund des Nachweises einer Inhibition des Toxoplasmenwachstums auch ohne IFN- γ , kann gefolgert werden, dass eine Akkumulation der GTPase um die PV nicht essentiell für die Hemmung ist, da eine starke Rekrutierung der GTPase zum Parasiten erst nach IFN- γ Stimulation zu beobachten war (siehe Abschnitt 3.2.5). Um diese These zu unterstützen, wurde das gleiche Experiment mit GFP-mGBP5 stabil exprimierenden 264.7 RAW Makrophagen durchgeführt. In Abschnitt 3.2.5 wurde gezeigt, dass mGBP5 weder im

stimulierten noch im unstimulierten Zustand die PV umrundet. Für mGP5 konnte ebenfalls eine signifikante Inhibition des Toxoplasmenwachstums in den stabil exprimierenden GFP-mGBP5 Zellen im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.32). Dieser Effekt trat auch nach zusätzlicher Stimulation mit IFN- γ auf. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Akkumulation der PV für die Proliferationsinhibition nicht notwendig ist.

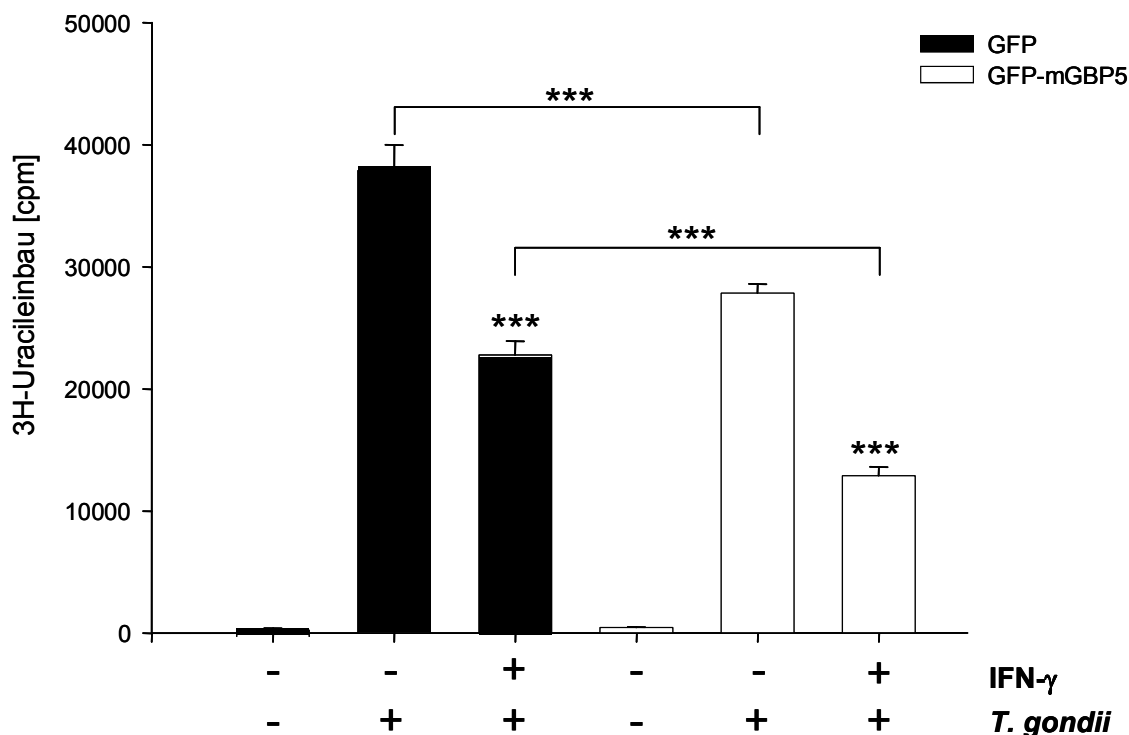


Abb. 3.32: Toxoplasmenproliferation in GFP und GFP-mGBP5 264.7 RAW Makrophagen. 3×10^4 Makrophagen wurden entweder mit IFN- γ (200 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen mit ME49 Toxoplasmen (2×10^4 /well) infiziert. Die Parasitenproliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Uracil in die Toxoplasmen in GFP und GFP-mGBP5 stabil exprimierenden 264.7 RAW Makrophagen gemessen. Dargestellt ist das Parasitenwachstum in unstimulierten und stimulierten Makrophagen, sowie GFP und GFP-mGBP5 exprimierenden Zellen (n=6; ***: $p < 0,001$). Es wurde jeweils 1 Klon von 2 dargestellt.

Mit diesen Experimenten konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sowohl mGBP2 als auch mGBP5 einen anti-proliferativen Effekt auf Toxoplasmen ausüben. Interessanterweise konnte die Toxoplasmeninhibition in einem gleichen Experimentalansatz nicht mehr nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit virulenten BK Toxoplasmen infiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Zwar zeigte sich noch eine geringfügige Reduktion des Toxoplasmenwachstums nach Stimulation mit IFN- γ , jedoch trat kein signifikanter Unterschied mehr zwischen wildtypischen und mGBP2 stabil exprimierenden Zellen auf.

Um den Effekt der Toxoplasmeninhibition auch *in vivo* zu bestätigen, wurde eine mGBP2 defiziente Mauslinie generiert.

3.3 Generierung einer mGBP2 defizienten Mauslinie

3.3.1 „Targetingstrategie“ zur Deletion von mGBP2

Das „gene targeting“ durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus erlaubt die systematische Generierung von Mauslinien mit definierten genetischen Veränderungen. Hierdurch lässt sich die Funktion einzelner Gene *in vivo* untersuchen. Um die Rolle der GTPasen im Gesamtorganismus untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mGBP2 defiziente Mauslinie generiert, indem in embryonalen Stammzellen (ES) aus 129/Ola Mäusen (Kuhn et al., 1991) der mGBP2 Lokus mit Hilfe homologer Rekombination durch einen genetisch veränderten Lokus ersetzt wurde. Hierfür wurde ein so genannter Rekombinationsvektor kloniert, der die homologe Rekombination in den ES Zellen initiiert.

Zur Inaktivierung des mGBP2 Gens wurde eine „Targetingstrategie“ verwendet, bei der eine Reporterkassette in den Lokus integriert wurde (Abb. 3.33). Hierfür wurde in das Exon 2, in dem sich der Translationsstart befindet, eine promotorlose DsRed Reporterkassette und eine Neomycin-Resistenzkassette integriert. Nach Rekombination des Vektors mit dem homologen Bereich des mGBP2 Gens sollte das Start-ATG der Reporterkassette an der gleichen Stelle wie das ursprüngliche mGBP2 Startkodon liegen, um zu gewährleisten, dass die Translation der mRNA am Startkodon der DsRed Kassette beginnt. Die Reporterkassette wurde in gleicher Leserichtung wie das ursprüngliche mGBP2 Gen kloniert. Das Einbringen dieser Reporterkassette sollte zum Nachweis der Promotor Aktivität von mGBP2 in der gendefizienten Maus dienen. Die Neomycin Kassette wurde mit flankierenden loxP (locus of X-ing over P1 phage) Sequenzen versehen. Diese dienen dazu, durch spätere Transfektion von korrekt rekombinierten ES Klonen mit einem CRE exprimierenden Vektor oder durch Verkreuzung mit „CRE-deleter“ Mäusen, die Sequenzen zwischen den loxP-Stellen wieder zu entfernen (Sternberg und Hamilton, 1981). Durch das Entfernen der Neomycin Kassette nach erfolgreicher Selektion sollte ebenfalls die Expression des DsRed Proteins sichergestellt werden, da diese durch eigene transkriptionelle Aktivität mit dem endogenen mGBP2 Promotor interferieren könnte.

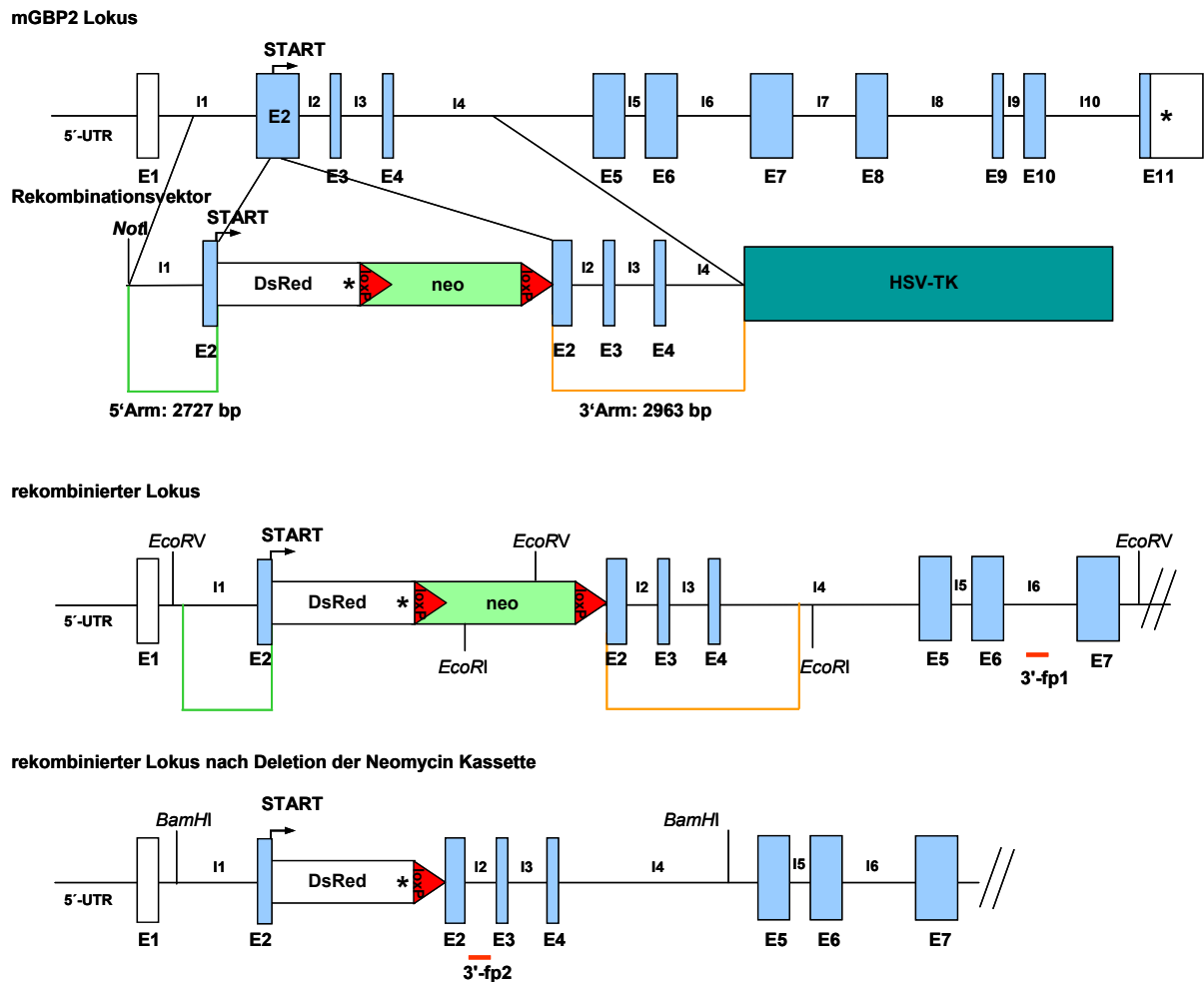


Abb. 3.33: Schematische Darstellung der Rekombinationsstrategie des mGBP2 Lokus. Die obere Abbildung stellt den genomischen Lokus des mGBP2 Gens mit seinen Exonen (E) und Intronen (I) dar. Im Exon 2 ist das START-Codon lokalisiert (START). Die mittlere Zeichnung zeigt den Rekombinationsvektor mit seinen zu mGBP2 homologen 5' und 3' Bereichen. In der nachfolgenden Abbildung ist der rekombinierte Lokus dargestellt mit den homologen Armen und der Neomycin Kasse. Die unterste Zeichnung spiegelt die genomische Situation des Lokus nach Deletion der Neo-Kasse wieder. Zusätzlich sind die Schnittstellen für die genomische Southern Blot Analyse angegeben und die Stellen markiert, an denen die 3' Sonden binden (3'-fp1 und 3'-fp2). *: DsRed Kasse mit STOP-Codon und polyA-Signal.

Zusätzlich zu dem DsRed Reporter und der Neomycin Kasse enthält der mGBP2 Rekombinationsvektor homologe Arme der Länge 2727 Kb (5'Arm) und 2963 Kb (3'Arm) sowie eine HSV-Thymidinkinase Kasse. Der Rekombinationsvektor wurde vor Elektroporation in die ES Zellen mit *NotI* linearisiert. Zum Nachweis der homologen Rekombination wurde die genomische DNS der selektierten Klone mit *EcoRV* restringiert und eine spezifische 3' Sonde (3'-fp1) verwendet, die außerhalb des rekombinierten Bereichs im Intron 6 bindet. In der Southern Blot Analyse wurde eine Bande auf der Höhe von 10,99 Kb erwartet wenn eine Integration in den mGBP2 Lokus stattgefunden hat, im Vergleich zu 20,69 Kb in der Wildtyp Situation. Der Nachweis der singulären Integration sollte unter Verwendung der Neomycin-spezifischen Sonde

und einem *EcoRI* Verdau der genomischen DNS erfolgen. Im Southern Blot sollte eine einzelne Bande bei 5,2 Kb auftreten.

3.3.2 Charakterisierung der mGBP2 defizienten Mauslinie

Nach Durchführung der homologen Rekombination konnte nach Doppelselektion drei Klone isoliert werden, die nach *EcoRV* Verdau der genomischen DNS und darauf folgender Southern Blot Analyse eine Wildtyp Bande auf Höhe von 20,69 Kb und eine Bande auf Höhe des „knockout“ Allels von 10,99 Kb aufwiesen (Abb. 3.34). Zur Kontrolle wurde E14-DNS aufgetragen die nach Restriktion nur das Wildtyp Allel zeigte. Als Beispiel einer Integration des Rekombinatiovektors an die falsche Stelle diente der Klon 36. Der Nachweis der singulären Integration des Rekombinatiovektors wurde im Southern Blot durch Restriktion der DNS mit *EcoRI* und unter Verwendung der Neomycin-spezifischen Sonde erbracht. Hierbei zeigte sich eine einzige Bande auf der Höhe von 5,2 Kb bei den positiven Klonen 49, 24 und 37. Bei dem negativen Klon 36 lief die Bande deutlich tiefer.

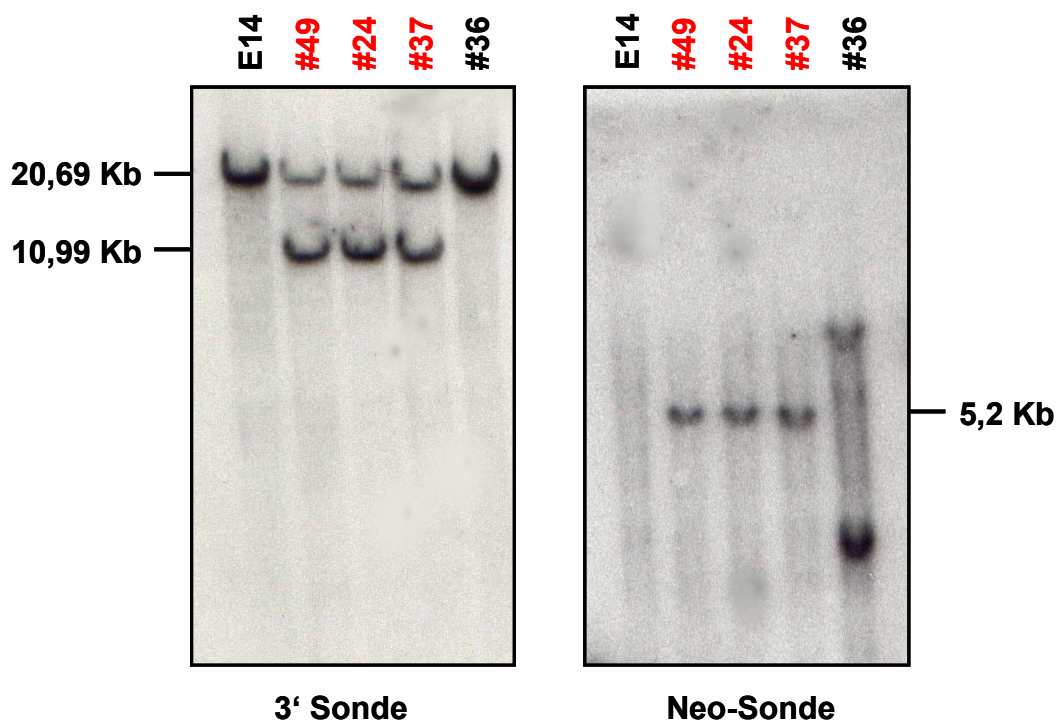


Abb. 3.34: Southern Blot Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination im mGBP2 Lokus. Der linke Blot zeigt die Banden nach Verdau der genomischen DNS mit *EcoRV* unter Verwendung der 3' Sonde (3'-fp1). In der rechten Abbildung ist der genomische Southern nach Hybridisierung mit der Neomycin-spezifischen Sonde dargestellt. Die DNS wurde hierfür mit *EcoRI* verdaut. An den Seiten sind jeweils die zu erwartenden Bandengrößen angegeben, wenn die homologe Rekombination erfolgreich war. Rot hervorgehoben sind die positiven Klone.

Die Klone wurden mehrmals injiziert. Die daraus resultierenden Chimären wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Bis dato wurden lediglich von Klon 49 Keimbahntiere geboren, die auf C57BL/6 Hintergrund zurück gekreuzt wurden. Erste Analysen ergaben, dass die Verteilung der mGBP2-defizienten Nachkommen den Mendel'schen Regeln entspricht. Die homozygoten „knock-out“ Mäuse sind vital und fertil. Der Western Blot mGBP2-defizienter, IFN- γ stimulierter Milzzellen zeigte, dass keine trunkierte Variante von mGBP2 exprimiert wird, sondern es sich um eine vollständige Inaktivierung des mGBP2 Proteins handelt (Abb. 3.35).

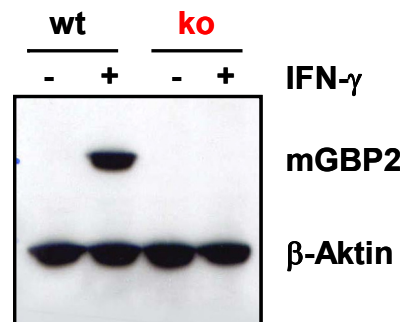


Abb. 3.35: Western Blot Analyse mGBP2 defizienter Zellen. Milzzellen von wt und mGBP2^{-/-} Mäusen wurden für 16 h mit IFN- γ stimuliert und die mGBP2 Expression mit dem mGBP2-spezifischen Antikörper detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Zur weiteren Analyse der mGBP2 „knock-out“ Mäuse wurden Durchflußzytometrie-Analysen des Thymus, der Milz, des Knochenmarks und der Peritoneallavage durchgeführt. Hierbei wurde die Zellzahl der jeweiligen Organe von Wildtypmäusen und mGBP2 defizienten Mäusen ermittelt, das Verhältnis von B- zu T-Zellen, der Reifungs- bzw. Aktivierungsgrad der B- und T-Zellen und die Anzahl von Granulozyten und Makrophagen untersucht (Tab. 2.14). Keine der untersuchten Parameter zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyp und „knock-out“ Mäusen (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Untersuchungen stehen noch aus.

Weiterhin wurden die mGBP2 defizienten Mäuse mit „CRE-deleter“ Mäusen verpaart, um die Neomycin Kasette zu deletieren. Nach der Verpaarung wurden transgene Mäuse mittels PCR identifiziert. Die anschließende Deletion der Neomycin Kasette wurde mit einem *Bam*HI Verdau der genomischen DNS nachgewiesen, wobei 2,18 Kb der deletierten Situation entsprach, 4,99 Kb einem nicht deletierten Zustand und 6,82 Kb der Wildtyp Situation. Als 3' Sonde wurde eine Region im Intron 2 gewählt.

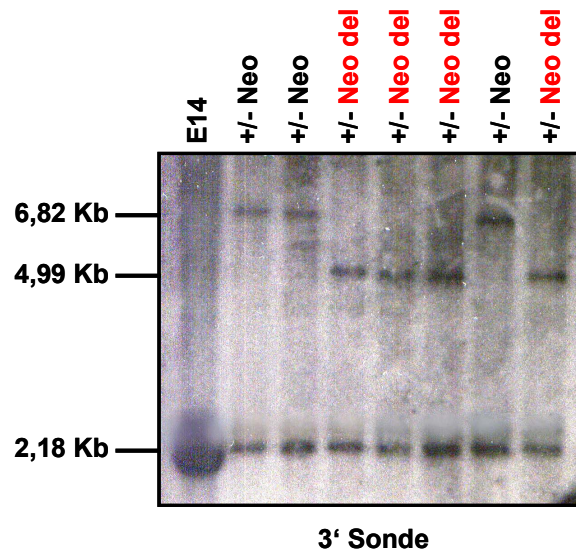


Abb. 3.36: Southern Blot Analyse zum Nachweis der Deletion der Neomycin Kassette. Nach Restriktion der genomischen DNS mit *Bam*HI konnten im Southern Blot unter Verwendung der 3' Sonde (3'-fp2) Mäuse, bei denen die Neomycin Kassette deletiert wurde, von Mäusen, bei denen die Kassette nicht deletiert wurde, an Hand der Größenunterschiede (6,82 -> 4,99 Kb, wt-Allel: 2,18 Kb) erkannt werden. Rot hervorgehoben sind die DNSs, bei denen sich eine Deletion der Neomycin Kassette bestätigte.

Wie in Abbildung 3.36 zu sehen, konnte bei der E14-Kontroll DNS lediglich eine einzige Bande auf Höhe von 2,18 Kb nachgewiesen werden, die der Bande des Wildtyp Allels entspricht. Auch alle anderen Spuren weisen eine Bande auf Höhe des Wildtyp Allels auf. Zusätzlich war im Southern Blot bei drei Mäusen eine Bande auf der Höhe von 6,82 Kb zu finden. Das bedeutet, dass es sich hierbei um heterozygote Mäuse handelt, bei denen die Neomycin Kassette nicht deletiert wurde. Bei den vier rot hervorgehobenen Proben trat im Southern Blot eine zusätzliche Bande der Größe 4,99 Kb auf. Bei diesen heterozygoten Mäusen wurde die Neomycin Kassette erfolgreich deletiert. Auch diese Mäuse wurden mit C57BL/6 Mäusen zurück gekreuzt.

Zur Bestätigung der Funktionalität der Reporter-kassette wurde die DsRed Expression nachgewiesen. Hierfür wurde den Mäusen die Milz entnommen, das Organ homogenisiert und die Zellen mit Concanavalin A (4 µg/ml) und IFN-γ (100U) stimuliert bzw. zur Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Induktion der DsRed Expression unter der Kontrolle des mGBP2 Promotors wurde im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 3.37). Wie in der Auswertung zu sehen, konnte in den unstimulierten Zellen keine Fluoreszenz gemessen werden. Nach Stimulation exprimierten 2,4 % der heterozygoten und 11,1 % der homozygoten mGBP2-defizienten Milzzellen das DsRed Protein.

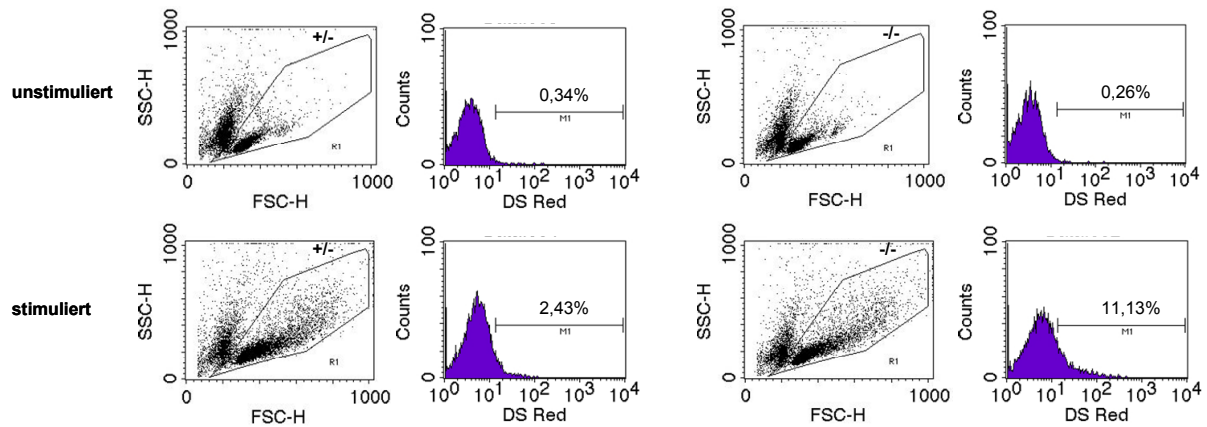


Abb. 3.37: Durchflußzytometrische Analyse zum Nachweis der DsRed Expression in mGBP2^{-/-} Mäusen. Milzzellen von mGBP2^{-/-} (Neo del) und mGBP2^{+/-} Mäusen wurden mit ConA und IFN- γ ü/N stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert gelassen. Die DsRed Expression wurde im Durchflußzytometer detektiert.

Zusätzlich zu der durchflußzytometrischen Analyse konnte die Expression des DsRed Proteins in Milzzellen nach Stimulation mit IFN- γ und ConA im Western Blot detektiert werden (Abb. 3.38).

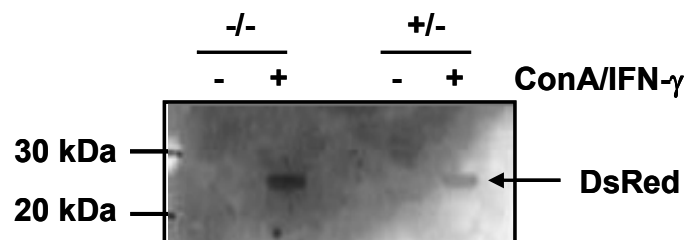


Abb. 3.38: Western Blot Analyse zum Nachweis der DsRed Expression in den mGBP2^{-/-} Mäusen. Milzzellen von mGBP2^{-/-} und mGBP2^{+/-} Mäusen wurden mit ConA und IFN- γ ü/N stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert gelassen. Die DsRed Expression wurde mit einem polyklonalen DsRed-spezifischen Antikörper detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Reporter funktionell ist und nach Stimulation das DsRed Protein exprimiert wird. Somit kann mit diesen Mäusen die Promotoraktivität des mGBP2 Gens gemessen und Zelltypen mit mGBP2 Expression charakterisiert werden.

3.3.2.1 Infektion mGBP2 defizienter Zellen mit Vaccinia Virus

Wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass hGBP1 und mGBP2 einen schwachen anti-viralen Effekt in HeLa bzw. NIH 3T3 Fibroblasten gegen VSV und EMCV ausüben. (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Um herauszufinden, ob mGBP2 einen anti-viralen Effekt gegen DNS Viren aufweist, wurden mGBP2 defiziente embryonale Fibroblasten mit Vaccinia Viren infiziert. Damit sollte getestet werden, ob das Virus in den defizienten Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber Wildtypzellen hat. Als Kontrollzellen dienten wildtypische Fibroblasten von Geschwistermäusen.

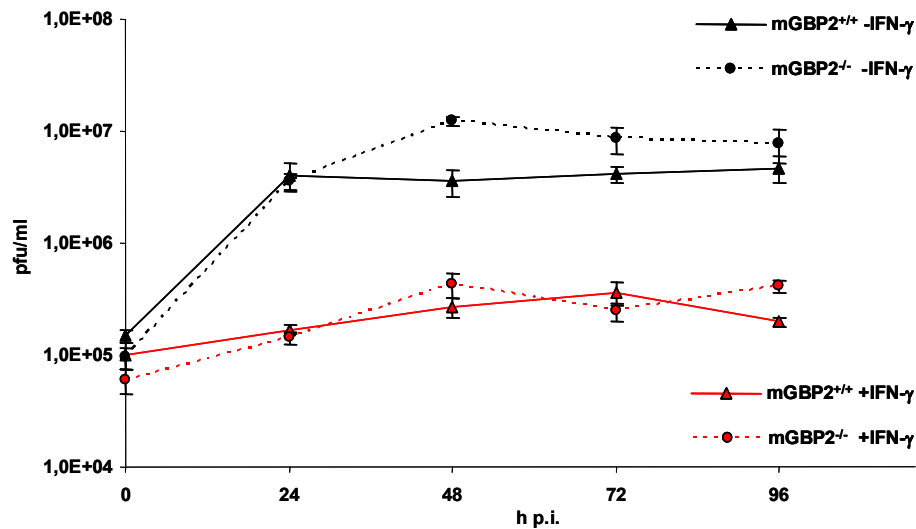


Abb. 3.39: Vaccinia Virus Wachstumskurve in mGBP2^{+/+} und mGBP2^{-/-} mEFs. Wildtyp und mGBP2 „knock-out“ Fibroblasten wurden für 48 h mit 5 U/ml IFN-γ vorinkubiert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 mit Vaccinia Viren infiziert. Danach wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und die Viren nach Ultraschallbehandlung in CD1 Zellen (von M. Trilling, Institut für Virologie, Düsseldorf) austitriert. Anschließend wurden die entstandenen Plugs gezählt. n=8, in jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Zellen aus je zwei verschiedenen Embryonen.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 bis zu 96 Stunden mit Vaccinia Viren infiziert und das Wachstum mit und ohne IFN-γ Vorstimulation verglichen. Um die Zellen abzutöten wurden sie bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Viren durch Ultraschallbehandlung aus den Zellen gelöst und zur Bestimmung des Virenwachstums in CD1 Fibroblasten austitriert. Die Vermehrung der Viren konnte am nächsten Tag an Hand der entstanden Plaques gemessen werden. Wie der Abbildung 3.39 zu entnehmen ist, konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der entstanden „plaque forming units“ (pfu) zwischen den wildtypischen Fibroblasten und den mGBP2 defizienten Fibroblasten festgestellt werden. Nach IFN-γ Präinkubation vermehrten sich die Viren zwar insgesamt langsamer, aber auch hier zeigte sich kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Wildtyp und „knock-out“ Fibroblasten. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass mGBP2 zumindest auf das Vaccinia Virus keinen inhibitorischen Effekt ausübt. Ob dies auch für andere Viren gilt, muss in weiteren Experimenten noch geklärt werden.

3.3.2.2 Infektion mGBP2 defizienter Zellen mit *T. gondii*

Wie im Abschnitt 3.2.5.3 beschrieben, konnte eine Reduktion der Toxoplasmenproliferation in mGBP2 stabil exprimierenden Fibroblasten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine Induktion der mGBP2 Expression nach Infektion von C57BL/6 Mäusen und eine direkte Interaktion von mGBP2 mit der parasitophoren Vakuole der Toxoplasmen in Fibroblasten und Makrophagen. Dies sind deutliche Hinweise darauf, dass die GTPase als Effektormolekül gegen

Toxoplasmeninfektion dient. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden *in vitro* Toxoplasmen Proliferationsassays mit mGBP2 defizienten embryonalen Fibroblasten durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit und ohne IFN- γ Präinkubation ausplattiert und nach 16 Stunden mit einem Verhältnis Toxoplasmen zu Zellen von 1 zu 1,5 infiziert. Nach 48 Stunden wurde für 24 Stunden die Toxoplasmenproliferation durch die Inkorporation von ^3H -Uracil gemessen. Als Kontrollzellen dienten uninfizierte Zellen.

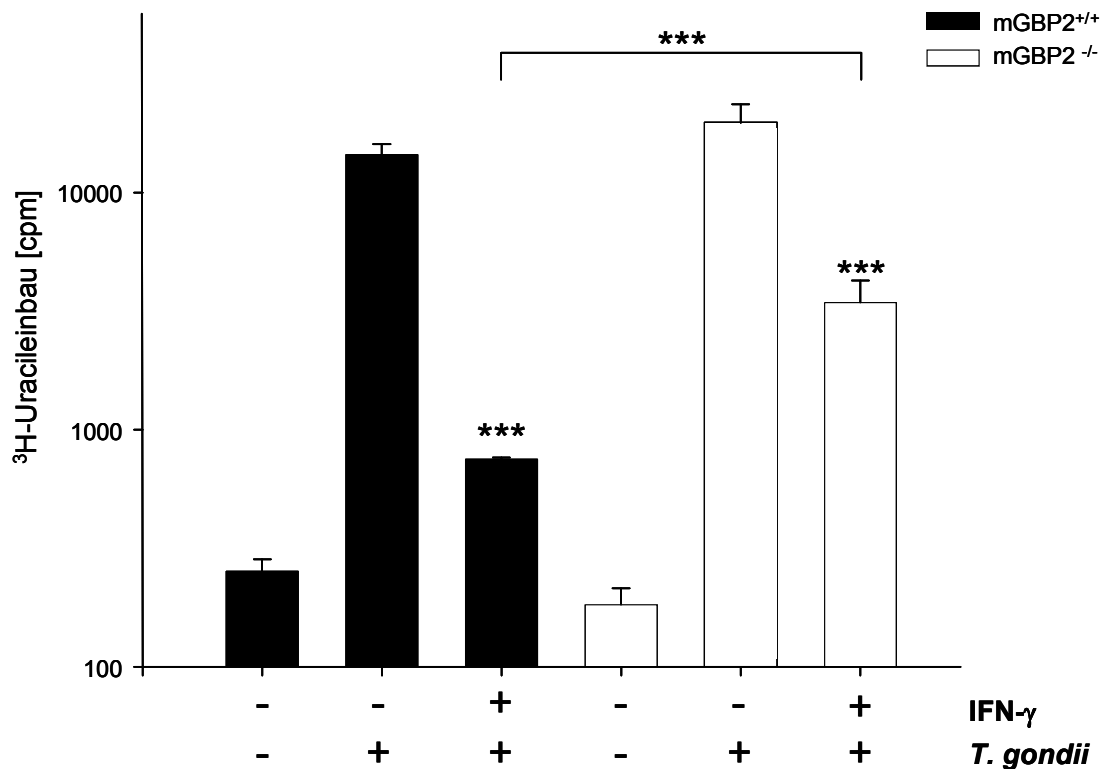


Abb. 3.40: Toxoplasmenproliferation in Wildtyp mEFs und mGBP2 defizienten mEFs. 3×10^4 mEFs wurden mit IFN- γ (200 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen mit ME49 Toxoplasmen (2×10^4 /well) infiziert. Die Parasitenproliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Uracil in die Toxoplasmen in den mGBP2^{+/+} und mGBP2^{-/-} mEFs gemessen. Das Diagramm zeigt das Toxoplasmenwachstum in unstimulierten und stimulierten mEFs, sowie mGBP2^{+/+} und mGBP2^{-/-} Zellen (n=6; ***: p < 0,001).

Im Gegensatz zu den mGBP2 stabil exprimierenden Zellen, die eine Inhibition der Toxoplasmenproliferation zeigten, konnte in den mGBP2 defizienten Zellen nach IFN- γ Stimulation im Vergleich zu den Wildtypzellen nur eine geringe Reduktion des Parasitenwachstums beobachtet werden (Abb. 3.40).

Um die Toxoplasmenproliferation nicht nur in Fibroblasten sondern auch in den immunologisch relevanteren Makrophagen zu messen, wurden aus dem Knochenmark von mGBP2 defizienten und wildtypischen Geschwistermäusen Makrophagen herangereift und diese im *in vitro* Toxoplasmenproliferationsassay verwendet. Dieser Versuch bestätigte die Ergebnisse, die bereits mit den Fibroblasten erzielt werden konnten. Die Toxoplasmen vermehrten sich in den mGBP2

defizienten Zellen um etwa das 10fache schneller als in den wildtypischen Kontrollzellen (Abb. 3.41).

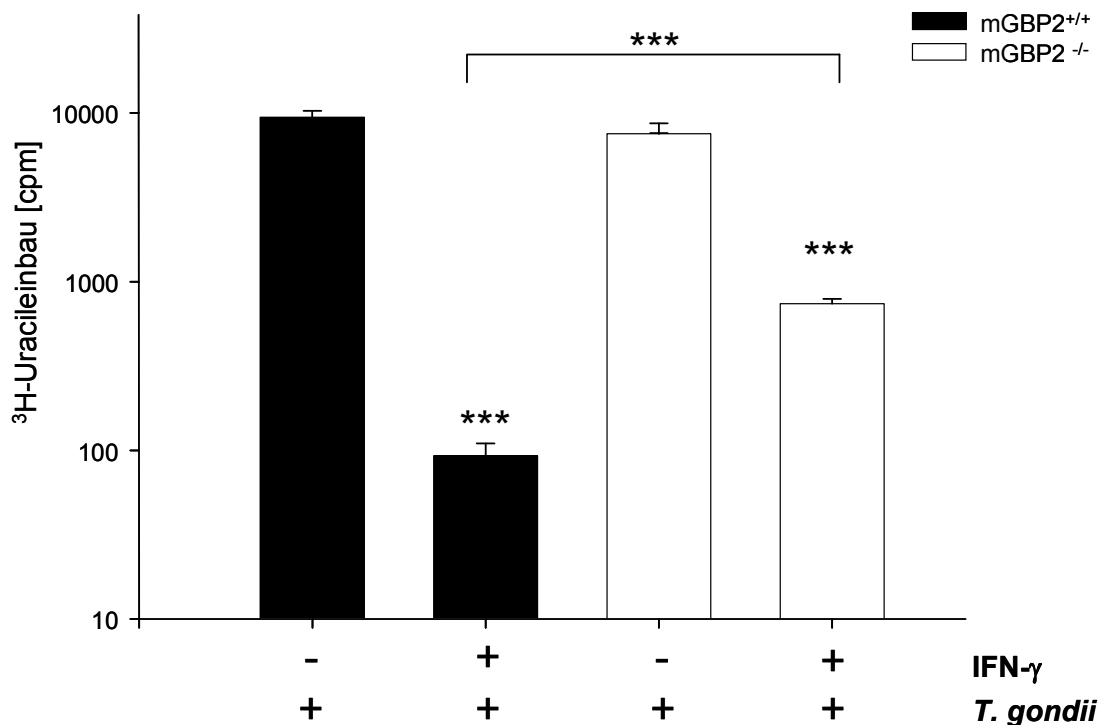


Abb. 3.41: Toxoplasmenproliferation in Wildtyp BMDM und mGBP2 defizienten BMDM. 3×10^4 BMDM wurden mit IFN- γ (200 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen mit ME49 Toxoplasmen (2×10^4 /well) infiziert. Die Parasitenproliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Uracil in die Toxoplasmen in den mGBP2^{+/+} und mGBP2^{-/-} BMDM gemessen. Das Diagramm zeigt Unterschiede des Toxoplasmenwachstums in unstimulierten und stimulierten mGBP2^{+/+} und mGBP2^{-/-} BMDM (n=6; ***: p < 0,001).

Diese Experimente unterstützen die Aussage, dass mGBP2 eine wichtige Rolle in der Abwehr von Toxoplasmen spielt. Als Standardnachweismethode eines anti-mikrobiellen Effektes eines Proteins gilt allerdings nicht das *in vitro*, sondern das *in vivo* Experiment.

3.3.2.3 Infektion mGBP2 defizienter Mäuse mit *T. gondii*

Durch die Generierung von „knock-out“ Mauslinien einzelner p47 GTPasen konnte eine essentielle Bedeutung dieser Gene für die Pathogenabwehr aufgedeckt werden. Mit Hilfe der mGBP2 defizienten Mauslinie sollte es nun ebenfalls möglich sein, die Rolle dieses Gens für die Abwehr von Pathogenen aufzuklären. Dafür wurden die mGBP2 defizienten Mäuse sowie wildtypische Kontrollmäuse mit 20 Zysten ME49 Toxoplasmen intraperitoneal infiziert und das Überleben der Mäuse in der akuten und chronischen Phase der Infektion dokumentiert.

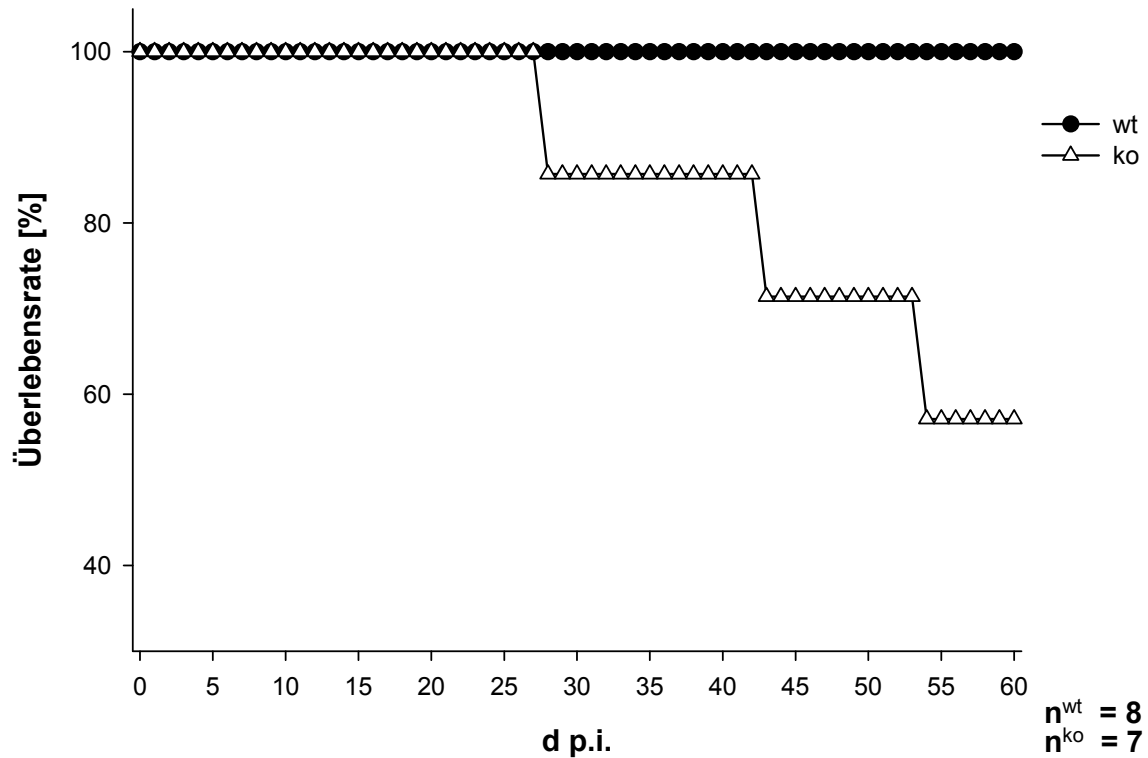


Abb. 3.42: Überlebensrate der Wildtyp und mGBP2 defizienten Mäuse nach Toxoplasmeninfektion. mGBP2^{+/+} bzw. mGBP2^{-/-} Mäuse wurden mit 20 Zysten ME49 Toxoplasmen i.p. infiziert und das Überleben der Mäuse über einen Zeitraum von insgesamt 65 Tagen dokumentiert (n=8 (wt) bzw. n=7 (ko)). Es ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Nach 30 Tagen Infektion waren 43 % der mGBP2 defizienten Mäuse an der Infektion mit Toxoplasmen verstorben, wohingegen alle wildtypischen Kontrollmäuse die Infektion überlebten (Abb. 3.42). Nach 60 Tagen wurde der Versuch beendet und die Anzahl der Zysten im Gehirn der überlebenden Mäuse gezählt. Während der chronischen Phase der Toxoplasmeninfektion gelangen die Parasiten über die Blut-Hirn Schranke in das Gehirn der Mäuse und bilden dort Zysten aus. Die Anzahl der Zysten im Gehirn der mGBP2 defizienten Mäuse war signifikant höher (40 Zysten) als in den verbleibenden Wildtyp Mäusen (10 Zysten) (Abb. 3.43).

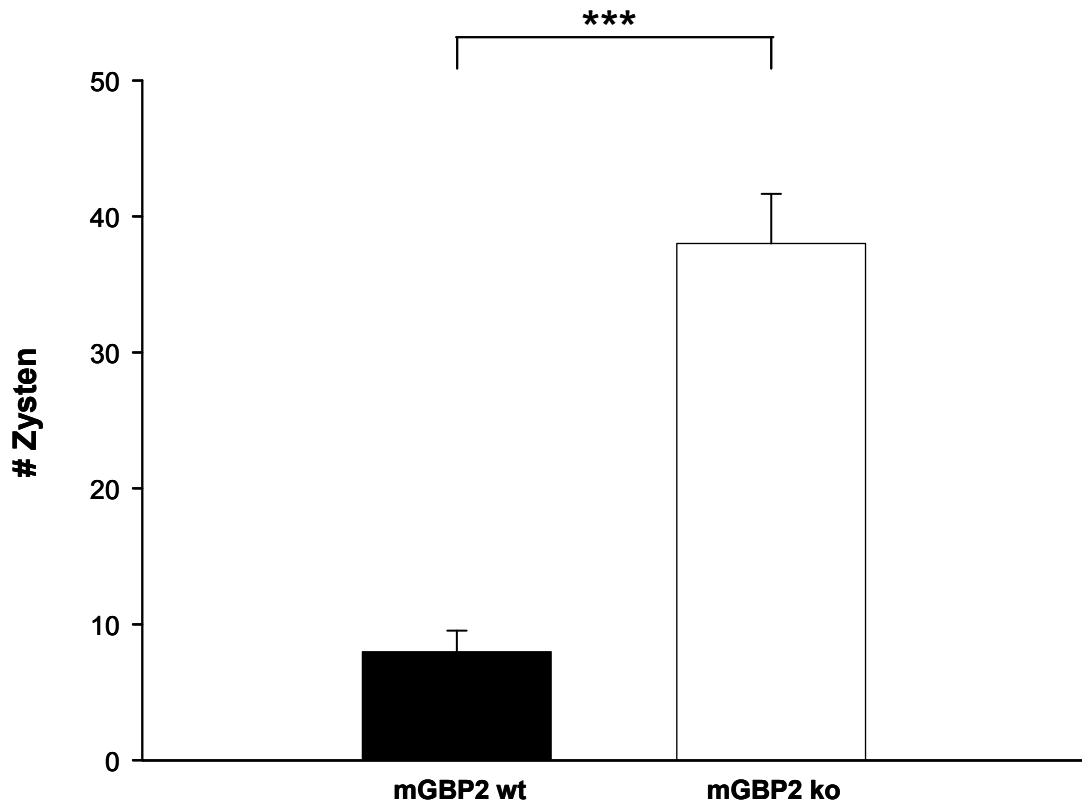


Abb. 3.43: Anzahl der Zysten im Gehirn der Wildtyp und mGBP2 defizienten Mäuse nach Toxoplasmeninfektion. mGBP2^{+/+} bzw. mGBP2^{+/-} und mGBP2^{-/-} Mäuse wurden mit 20 Zysten ME49 Toxoplasmen i.p. infiziert und bei den überlebenden Mäusen nach 60 Tagen die Anzahl der Zysten im Gehirn gezählt (***: $p < 0,005$; $n=8$ (wt) bzw. $n=5$ (ko)). Es ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Zusätzlich zum Gehirn wurden den Mäusen die Milz, Leber und Lunge entnommen, Organlysate angefertigt und die Expression der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 analysiert. Im Vergleich zu den Organlysaten der Toxoplasmen infizierten C57BL/6 Mäuse (Abschnitt 3.2.4) lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der GTPasen ausmachen. In Abwesenheit der GTPase mGBP2 wurden die GTPasen mGBP1, mGBP3 und mGBP5 in normalem Maße exprimiert (Abb. 3.44)

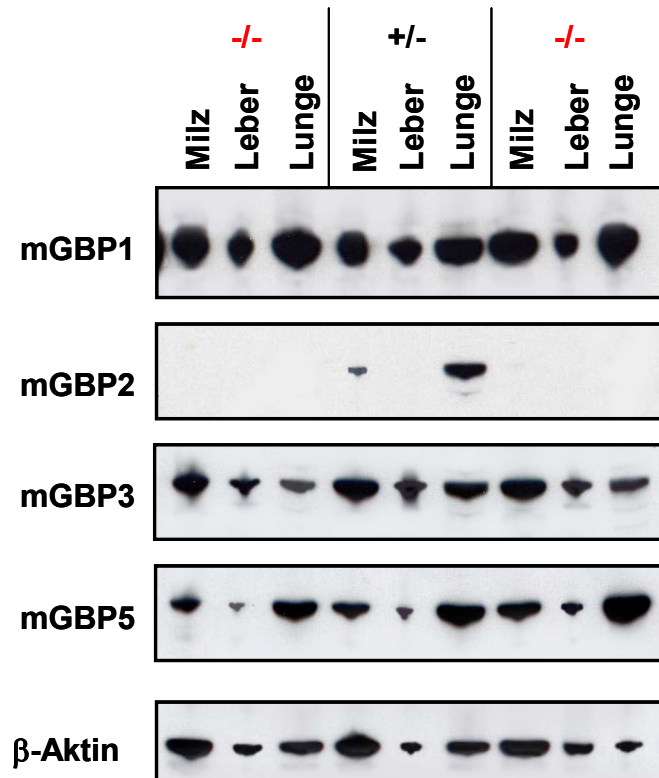


Abb. 3.44: mGBP Expression in mGBP2^{-/-} und mGBP2^{+/-} Mäusen nach Toxoplasmeninfektion. Nach 65 Tagen Toxoplasmeninfektion wurden den Mäusen die Organe entnommen. Es wurden Organlysate angefertigt und Western Blot Analysen zum Vergleich der Expression von mGBP1-5 durchgeführt. Es wurden jeweils 35 μ g Protein aufgetragen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um herauszufinden, ob mGBP2 für die Rekrutierung der anderen GTPasen zu den Toxoplasmen z.B. als „Führungsprotein“ absolut notwendig ist, wurde in embryonalen Fibroblasten mGBP2 defizienter Mäusen untersucht, ob mGBP2/1 nach wie vor an die PV akkumulieren kann. Dafür wurden die Zellen für 16 Stunden mit IFN- γ vorinkubiert und für 2 Stunden mit ME49 Toxoplasmen infiziert. Nach Färbung mit dem mGBP1 und mGBP2/1 spezifischen Antikörper zeigte sich eine deutliche Kolokalisation von mGBP2/1 mit der PV der Toxoplasmen (Abb. 3.45).

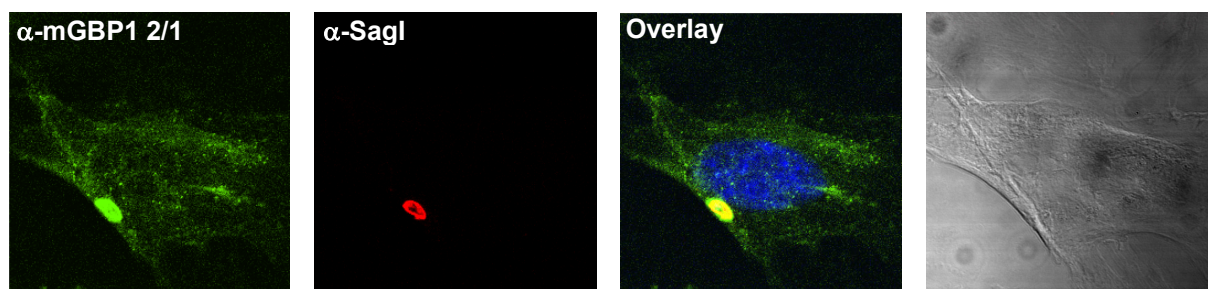


Abb. 3.45: Lokalisation von mGBP1 und mGBP2/1 in mGBP2 defizienten Fibroblasten nach Toxoplasmeninfektion. mGBP2 defiziente embryonale Fibroblasten wurden für 16 h mit IFN- γ vorinkubiert und 2 h mit ME49 Toxoplasmen infiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop angefertigt. grün:

mGBP1 bzw. mGBP2/1; rot: *T. gondii* mit α -SagI gefärbt; blau: Kernfärbung (DAPI); Bild 3: Überlagerung aus dem ersten und zweiten Bild; Bild 4: Differentialkontrastaufnahme der Zelle.

Da mGBP2/1 auch in mGBP2 defizienten Zellen nach wie vor an die PV von *T. gondii* akkumulieren konnte, kann davon ausgegangen werden, dass mGBP2 für die Rekrutierung der anderen GTPasen nicht essentiell ist.

Die *ex vivo* und *in vivo* Toxoplasmeninfektionsexperimente der mGBP2 defizienten Zellen bzw. Mäuse zusammen mit den Beobachtungen, die in den mGBP stabil exprimierenden Zelllinien *in vitro* gemacht werden konnten, belegen, dass mGBP2 ein wichtiges Effektormolekül in der Abwehr von Toxoplasmen darstellt.

4 Diskussion

4.1 Expressionsanalysen der 65 kDa GTPasen mGBP1 bis mGBP5

Interferone sind immunregulatorische Zytokine, die einen starken anti-mikrobiellen Effekt in Wirtszellen initiieren. Sie regulieren die Expression von einigen hundert Genen, unter ihnen vier Familien von GTPasen: die Mx-Proteine, die VLIGs, die p47 GTPasen und die 65 kDa GBPs (Boehm et al., 1997; Martens und Howard, 2006). Die p65 GBPs und die verwandten p47 GTPasen gehören zu den durch IFN- γ am stärksten induzierten Genen. Die Typ I Interferon induzierbaren Mx-Proteine üben eine starke anti-virale Funktion gegenüber einer Anzahl von RNS Viren, wie zum Beispiel Influenza und VSV, aus (Haller und Kochs, 2002). In den letzten Jahren konnten mehrere Studien auch einen Pathogen-spezifischen Effekt der 47 kDa GTPasen in der Maus zeigen. So belegen Untersuchungen mit Mäusen, die gendefizient für LRG-47 (*Irgm1*), IRG-47 (*Irgd*) oder IGTP (*Irgm3*) sind, dass diese Proteine eine essentielle Rolle in der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie *T. gondii* und *L. monocytogenes* darstellen (Taylor et al., 2004; Martens und Howard, 2006). Die Rolle der 65 kDa GTPasen in der Immunabwehr konnte bisher jedoch nicht hinreichend geklärt werden. Um die Funktion dieser Proteine in der Immunantwort zu entschlüsseln, wurde zunächst eine koordinierte Expressionsanalyse von mGBP1 bis mGBP5 durchgeführt, um zum einen bereits auf RT-PCR beruhende Daten auf Proteinebene zu verifizieren und zum anderen die Induzierbarkeit durch verschiedene Zytokine und TLR-Agonisten und den dabei verwendeten Signalwegen zu analysieren. Darüber hinaus wurden verschiedene Zelltypen auf ihre Fähigkeit mGBPs zu exprimieren getestet.

Zur Analyse der GTPasen Expression auf Proteinebene wurden RAW Makrophagen mit IFN- γ stimuliert und die Induktion mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht (Abb. 3.1). Sowohl mGBP1, als auch mGBP2, mGBP3 und mGBP5 wurden innerhalb von 8 bis 16 Stunden IFN- γ Stimulation stark exprimiert. Diese verzögerte Induktion der GTPasen lässt sich dadurch erklären, dass es sich um IRF-1 abhängige sekundär-responsive Gene handelt, wie bereits für mGBP1 und mGBP2 beschrieben (Briken et al., 1995; Boehm et al., 1998, und Abb. 3.13). Eine mGBP4 Expression konnte selbst nach 24 Stunden Stimulation nicht beobachtet werden. Auch in anderen Zelllinien und Primärzellen konnte kein mGBP4 Protein nachgewiesen werden, obwohl zwei Antiseren das Protein aus Lysaten GFP-mGBP4 exprimierender 293T Zellen spezifisch detektieren konnten (Abb. 3.4). Mehrere Publikationen haben jedoch gezeigt, dass mGBP4 nach Stimulation zu einem vergleichbaren Level wie mGBP1, 2, 3 und 5 transkribiert wurde (Nguyen et al., 2002; Degrandi et al., 2007). Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden intensive cDNS und Datenbank Analysen durchgeführt. Dabei stellte sich mittels BAC-Analyse (RP24-210D14) heraus, dass die in der NCBI-Datenbank eingetragene Sequenz von mGBP4 fehlerhaft annotiert war. Zur Identifizierung der tatsächlichen Sequenz von mGBP4 wurden PCR-Analysen mit spezifischen mGBP4 Primern an cDNS von ANA-1 Makrophagen, 264.7 RAW

Makrophagen und der Milz von Listerien infizierten Mäusen vorgenommen. Es konnten zwei Spleißvarianten identifiziert werden, die durch die Nutzung unterschiedlicher Spleißdonoren im Exon 2 generiert wurden. Die mGBP4 Variante, die den weiter 5' gelegenen Donor als Spleißstelle verwendet, führt zu einem frühzeitigen Abbruch nach 312 Basenpaaren, hervorgerufen durch ein STOP-Codon in Exon 4. Im Gegensatz dazu resultiert die Verwendung des zweiten Spleißdonors in einem Einschub von 28 Basenpaaren des Intron 2 und einem Abschnitt von 36 Aminosäuren, der nicht homolog zu den anderen GTPasen ist und wodurch die G2-Domäne zerstört wird (mGBP4.1). Zusätzlich fehlt beiden Varianten im Vergleich zu allen anderen GTPasen ein konserviertes „G“, wodurch es zu einer Mutation in der ursprünglichen Spleißstelle kommt (Abb. 3.2). Bei der Untersuchung, ob beide mGBP4 Spleißvarianten transkribiert werden, stellte sich heraus, dass lediglich die trunkierte mGBP4 Spleißvariante induziert wird, jedoch nicht mGBP4.1 was darauf hinweist, dass es sich bei dem alternativ genutzten Donor um eine sehr schwache Spleißstelle handelt (Abb. 3.3 und Konermann et al., 2007). Dies wurde auch durch Untersuchungen des Spleißdonors mit dem „Splicefinder“ (Freund et al., 2005) unterstützt, der die mGBP4.1 Spleißstelle als sehr schwach einstuft. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl mGBP4 als auch mGBP4.1 nicht zu funktionellen Proteinen translatiert werden. Ob die RNS von mGBP4 eine Funktion in der Abwehr von Pathogenen ausübt bleibt offen. Da jedoch bei keiner der verwandten GTPasen eine Funktion der RNS beschrieben wurde, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die RNS alleine eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielt. Somit scheint für mGBP4 kein funktioneller Locus zu existieren.

Nguyen beschrieb die GTPasen mGBP1 bis mGBP5 erstmals als koordinierte, durch IFN- γ und LPS, jedoch nicht durch IL-1 β und TNF- α in 264.7 RAW Makrophagen induzierbare Gene. Interessanterweise konnte jedoch eine Induktion der GTPasen nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α in NIH 3T3 Zellen beobachtet werden (Nguyen et al., 2002). Mit Hilfe der spezifischen Antikörper konnte im Western Blot die Induzierbarkeit der GTPasen in 264.7 RAW Makrophagen auf IFN- γ und in einem geringeren Maße auf IFN- β bestätigt werden, jedoch nicht für TNF, IL-1 β , LTA, LPS, CpG und pI:C (Abb. 3.5). Lediglich mGBP1 wurde durch LPS leicht induziert. Dies stimmt auch mit RT-PCR Daten von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe überein, die zeigen konnten, dass mGBP1, 2, 3 und 5 hauptsächlich von Typ I und II Interferon induziert werden und nicht oder nur sehr geringfügig von anderen Zytokinen und TLR-Agonisten (Degrandi et al., 2007). Die fehlende bzw. geringfügige Induktion nach LPS Stimulation könnte durch den unterschiedlichen Stimulationszeitraum erklärt werden. Nguyen et al. haben gezeigt, dass die Induktion von mGBP1 bis mGBP5 in 264.7 RAW Makrophagen nach LPS Stimulation transient ist und bereits nach zwölf Stunden auf den Ausgangswert zurückfällt (Nguyen et al., 2002). In dieser Arbeit und bei Degrandi et al. wurden die Zellen jedoch erst nach 16 Stunden Stimulation auf ihre mGBP Expression untersucht, so dass die GTPase vielleicht bereits wieder degradiert war und nicht mehr detektiert werden konnte. Versuche zur Bestimmung der Halbwertszeit von mGBP2 relativieren diese Theorie. Zur Bestimmung der Halbwertszeit von

mGBP2 wurden 264.7 RAW Makrophagen mit IFN- γ vorinkubiert und anschließend für unterschiedlich lange Zeiträume mit Cycloheximid (CHX) behandelt. Da CHX die Proteinneusynthese hemmt, kann die Stabilität eines Proteins bestimmt werden. Der Western Blot in Abb. 3.11 zeigt, dass es sich bei mGBP2 um ein Protein mit einer Halbwertszeit von bis zu 40 Stunden handelt. Somit kann mGBP2, im Vergleich zum Beispiel zu IRF-1 mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten (Abb. 3.11), als ein sehr stabiles Protein bezeichnet werden. Um diesen Widerspruch aufzuklären und die Induzierbarkeit auf LPS zu überprüfen, müsste die Proteinexpression der GTPasen zu einem früheren Zeitpunkt als 16 Stunden untersucht werden.

Die Induzierbarkeit von p65 GBPs durch Typ I Interferone wie IFN- β wurde bereits für hGBP1 und mGBP2 beschrieben (Cheng et al., 1986; Vestal et al., 2000; Gorbacheva et al., 2002). Analysen der Promotorregion von hGBP1 und mGBP2 identifizierten sowohl eine ISRE als auch eine GAS Sequenz, die die Induzierbarkeit durch Typ I und Typ II IFN vermitteln (Decker et al., 1991a; Lew et al., 1991). Promotoranalysen für mGBP1, 3 und 5 wurden bisher nur *in silico* durchgeführt (Olszewski et al., 2006). Demnach weisen die GTPasen 1 bis mGBP5 sowohl ISRE als auch GAS Elemente auf. Die Induzierbarkeit dieser Gene durch Typ I und II Interferone lässt vermuten, dass die ISRE und GAS Sequenzen in den Promotorregionen funktionell sind. Neben der ISRE und der GAS Sequenz wurde für hGBP1 ein NF- κ B Bindemotiv nachgewiesen, was dessen Responsivität auf IL-1 β und TNF Stimulus erklärt (Naschberger et al., 2004). Auch für mGBP2, 3, 4 und 5 wurde *in silico* ein NF- κ B Bindemotiv nachgewiesen (Olszewski et al., 2006). Da jedoch weder mGBP1 noch mGBP2, 3 und 5 in RAW Makrophagen durch IL-1 β oder TNF stimuliert werden konnten, ist das NF- κ B Bindemotiv entweder nicht funktionell oder wird in diesem Zelltyp nicht induziert.

Interessanterweise konnte eine Hochregulation der GTPase mGBP2 in primären Milzzellen sowohl nach Stimulation mit IFN- γ , IFN- β , ConA und PMA/Ionomycin als auch mit LPS beobachtet werden (Abb. 3.12). Diese Induzierbarkeit durch LPS lässt sich möglicherweise durch die Aktivierung des NF- κ B Bindemotivs erklären. Es könnte jedoch auch sein, dass die Milzzellen in der Lage sind, sekundär nach LPS Stimulation IFN zu produzieren, was wiederum zur Induktion der GTPase führt. Weiterführende Promotoranalysen und Experimente mit IFNAR und IFN- γ Rezeptor defizienten Milzzellen sind notwendig, um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können.

Die Zelltypen, die GTPasen in primären Milzzellen exprimieren können, konnten durch Aufreinigung einzelner Zellpopulationen genauer differenziert werden. Sowohl in B- als auch in T-Zellen konnte nach Antigenstimulation mGBP1, 2, 3 und 5 nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Die Expression von mGBP2 konnte bereits von Patrone et al. in 70Z/3 pre-B Zellen nach Stimulation mit IFN- γ , und leicht nach IFN- α , jedoch nicht nach LPS im Northern Blot nachgewiesen werden (Patrone et al., 2002). mGBP3 und mGBP5 wurden bereits basal in nicht stimulierten B-Zellen exprimiert, jedoch nach Rezeptorstimulation eindeutig hochreguliert (Abb. 3.9). Dieser basale Proteinlevel entsteht eher durch eine Grundexpression in B- und T-Zellen und

nicht von den vorhandenen Makrophagen, da 264.7 RAW Makrophagen keinen Grundstimulus der GTPasen aufwiesen (Abb. 3.1). Eine Stimulation von nur einer Stunde reichte dabei jedoch nicht aus, um die GTPase Expression zu induzieren. Erst nach 16-stündiger Stimulation konnten mGBP2, 3 und 5 nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass es sich bei den GTPasen um Gene handelt, die erst nach Induktion von IRF-1 und dessen Bindung an den mGBP Promotor sekundär induziert werden. Um den Signalweg, der zur Expression der GTPasen führt näher zu charakterisieren, wurden gendefiziente Zellen verwendet, bei denen die IFN Signalkaskade an unterschiedlichen Stellen unterbrochen war. Mit Hilfe der IFN- γ Rezeptor defizienten Knochenmarksmakrophagen, die nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen und TLR-Agonisten immer noch mGBP2 exprimierten, konnte gezeigt werden, dass die GTPase Expression nicht ausschließlich über den IFN- γ Rezeptorsignalweg geleitet wird, sondern auch andere Stimuli und Rezeptoren zur Hochregulation der GTPasen führen können (Abb. 3.12). Mittels STAT1 und IRF-1 defizienter Zellen wurde die Signalvermittlung über die weiter abwärts gelegenen Proteine untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl in stimulierten STAT1 als auch IRF-1 defizienten Zellen keine mGBP Expression mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.13). Dies bestätigt, dass nach Stimulation des IFN- γ Rezeptors die mGBP Transkription STAT1 und IRF-1 abhängig vermittelt wird und somit die Promotoren auch von mGBP1, 3 und 5 GAS und ISRE Motive aufweisen. Ausführlichere *in silico* und *in vitro* Promotoranalysen sind jedoch notwendig, um die Funktionalität dieser Sequenzen zu zeigen. Dies könnte mit Datenbankmotivsuchprogrammen und experimentell mit Elektrophorese-Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) durchgeführt werden. Bemerkenswerterweise konnte kein mGBP1 Protein in B-Zellen aus C57BL/6 Mäusen detektiert werden. Dies stimmt mit Publikationen überein, die eine mGBP1 spezifische RNS in 129/SvJ und BALB/c Mäusen gefunden haben, jedoch nicht in C57BL/6 Mäusen (Cheng et al., 1991; Anderson et al., 1999). Um heraus zu finden, ob mGBP1 generell nicht in C57BL/6 Mäusen vorhanden ist, oder nur in bestimmten Zelltypen nach speziellen Stimuli induziert wird, wurden verschiedene Zellen und Stimulationen auf die Expression von mGBP1 getestet. BMDM von C57BL/6 Mäusen konnten nach IFN- γ , IFN- β , LPS und CpG Stimulation ebenfalls kein mGBP1 translatieren (Abb. 3.10). Nach Stimulation von BMDC mit IFN- γ oder LPS zeigte sich jedoch eine schwache Hochregulation von mGBP1 (Abb. 3.10). Im Vergleich zu mGBP2 handelte es sich allerdings um eine sehr geringe mGBP1 Proteinmenge die hier nach Stimulation translatiert wurde. Dennoch steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den bisher publizierten Daten. Zusätzlich konnte in *in vitro* Studien eine Induktion von mGBP1 durch IFN- γ in ANA-1 Makrophagen, welche aus C57BL/6 Mäusen stammen, gezeigt werden. Hier wurde mit Hilfe der RT-PCR mGBP1 Transkript nachgewiesen (Degrandi et al., 2007). Neben der geringen Expression von mGBP1 in BMDC wurde eine starke Expression von mGBP1 in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit Listerien und Toxoplasmen gefunden (Abb. 3.20 und 3.22). Diesen Abweichungen zu den publizierten Daten könnten zelltypspezifische Unterschiede in der GTPasen Expression zu Grunde liegen. Auch könnte für die Hochregulation dieser GTPase ein Gemisch aus mehreren Zytokinen und TLR-

Agonisten notwendig sein, welches in der Zellkultur durch singuläre Stimuli nicht simuliert werden kann. Erst eine Infektion mit der dazugehörigen komplexen Zytokinausschüttung führt zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktorsets das für die mGBP1 Expression benötigt wird.

Zelllinie	mGBP1	mGBP2	mGBP3	mGBP5
IFN- γ	+	+	+	+
TNF	-	-	-	-
IFN- γ + TNF	++	++	++	++
IFN- β	+	+	+	+
IL-1 β	-	-	-	-
LTA	-	-	-	-
LPS	(+)	-	-	-
CpG	-	-	-	-
pI:C	-	-	-	-
Primärzellen				
IFN- γ	+	+	+	+
TNF	-	-	+	+
IFN- γ + TNF	++	++	++	++
IFN- β	+	+	+	+
IL-1 β	-	-	-	-
LTA	-	-	+	(+)
LPS	(+)	+	+	+
CpG	-	-	-	
pI:C	+	+	+	+
ConA	ND	+	ND	ND
PMA/Iono	-*	+	+	+
CD3/28	-*	+	-	+
IL-4/LPS	-*	+	-	+
IgM	-*	(+)	(+)	+

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Induzierbarkeit der GTPasen in Zelllinien und Primärzellen nach verschiedenen Stimulie. (+): nur sehr schwache Expression; *: fehlende Expression wahrscheinlich auf C57BL/6 Hintergrund zurück zuführen; ND: nicht determiniert.

4.1.1 Subzelluläre Lokalisation der GBPs mGBP1 bis mGBP5

Neben der Analyse des Expressionsprofils der GTPasen wurde auch die subzelluläre Verteilung von mGBP1 bis mGBP5 in verschiedenen Zelltypen untersucht. Hierfür wurden Fibroblasten und Makrophagen stabil oder transient mit GFP-mGBP Fusionsplasmiden transfiziert oder mit den spezifischen Antikörpern (mGBP1, mGBP2, mGBP3) gegen die mGBPs gefärbt (Abb. 3.16). Dabei konnte festgestellt werden, dass die GTPasen innerhalb des Zytoplasmas in granulären oder vesikulären Strukturen vorliegen. Eine ähnliche Verteilung wurde bereits früher für mGBP2 beschrieben, wobei eine Lokalisation von mGBP2 in Granula und in Vesikeln von heterogener Größe gezeigt wurde (Vestal et al., 2000). Im Gegensatz dazu beschrieben Vestal et al. für mGBP1 eine homogene zytoplasmatische Verteilung die nicht mit Vesikeln assoziiert war (Vestal et al., 2000). Für ihre Lokalisationsstudien hat die Arbeitsgruppe ein mGBP1-Flag Fusionsprotein verwendet. Für die Klonierung des Fusionskonstruktes lag 2000 eine inkorrekte mGBP1 Datenbankannotation vor, die erst 2006 durch Olszewski et al. korrigiert wurde (Olszewski et al., 2006). Die ursprüngliche mGBP1 Sequenz war bis Exon 3 sequenzidentisch mit mGBP2 und wurde daher in dieser Arbeit als mGBP2/1 bezeichnet. Somit haben Vestal et al. nicht die Lokalisation von mGBP1, sondern die von mGBP2/1 beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionskonstrukte entsprechen der tatsächlichen mGBP1 Sequenz. Mit diesen Fusionskonstrukten wies mGBP1 eine deutliche vesikuläre Verteilung auf. Darüber hinaus zeigte auch die endogene Färbung mit dem Antikörper, der sowohl mGBP1 als auch mGBP2/1 erkennt, dass beide GTPasen in Vesikeln vorliegen. Eventuell verändert die Fusion von mGBP1 mit Flag die Lokalisation des Proteins, so dass das Fusionsprotein in der Zelle fehlverteilt war. Für eine Lokalisation von mGBP1 und mGBP2/1 in vesikulären Strukturen spricht zusätzlich eine C-terminale Isoprenylierungsstelle. mGBP2 und 5 weisen ebenfalls eine CaaX-Sequenz an ihrem C-Terminus auf und zumindest für mGBP2 konnte die vesikuläre Lokalisation in Zusammenhang mit einer funktionellen Isoprenylierungsstelle gebracht werden (diese Arbeit und (Vestal et al., 2000)). Die Mutation der Isoprenylierungsstelle führte zu einer homogenen zytoplasmatischen Verteilung des Proteins (Abb. 3.27).

Zur Identifizierung der vesikulären Strukturen untersuchten Vestal et al. eine mögliche Kolo-kalisation von mGBP2 mit Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen, Peroxysomen und MHC Klasse I Proteinen, konnten jedoch keine Überlagerung feststellen (Vestal et al., 2000). Deshalb wurden in dieser Arbeit zusätzlich zu Mitochondrien und Endosomen eine Überlappung von mGBP2 mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), membranösen Strukturen und dem Golgi-Apparat überprüft. Dafür wurden NIH 3T3 Zellen mit den verschiedenen Markerkonstrukten und einem GFP-mGBP2 oder DsRed-mGBP2 Fusionskonstrukt kotransfiziert. Eine Überlagerung der Markerkonstrukte mit mGBP2 wurde am Konfokalmikroskop dokumentiert. Jedoch konnten auch mit diesen Markerkonstrukten die Vesikel, in denen die GTPase lokalisiert ist, nicht identifiziert werden. Eine Überlappung mit den Markerkonstrukten konnte auch für mGBP5 nicht gezeigt

werden (s. Diplomarbeit S. Schmidt, 2007). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Vesikeln um GTPase spezifische Strukturen handelt, die hauptsächlich wenn nicht sogar ausschließlich GTPasen enthalten. Für hGBP1 konnte eine Nukleotid-abhängige Oligomerisierung nachgewiesen werden (Prakash et al., 2000b). GTP Bindung und Hydrolyse führen dabei zur Oligomerisierung, wohingegen GDP gebundenes hGBP1 im monomeren Zustand vorliegt (Prakash et al., 2000a). Da die GTP Bindedomäne zwischen den humanen und murinen GTPasen konserviert ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch die murinen GTPasen oligomerisieren und somit als Oligomere in membranösen Strukturen verankert sind. Um diese Vermutungen zu untermauern wurden Koexpressionsexperimente durchgeführt, die zeigen sollten, dass die GTPasen in den gleichen Vesikeln lokalisiert sind. Hierfür wurden Fibroblasten mit einem GFP-mGBP Fusionskonstrukt transfiziert und gleichzeitig eine weitere GTPase endogen angefärbt. Eine Kolo-kalisation wurde wiederum am Konfokalmikroskop untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mGBP1, 2 und 3 miteinander kolo-kalisieren und sich daher wahrscheinlich in denselben vesikulären Kompartimenten befinden (Abb. 3.17). Eine Überlagerung mit mGBP5 konnte jedoch mit dieser Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden. Um eine genauere Aussage über die Interaktion einzelner GTPasen miteinander treffen zu können, wurde als eine weitere Methode die Ko-Immunpräzipitation angewendet. Hierbei konnte eine Interaktion zwischen mGBP1 und mGBP2 als auch mit mGBP3, jedoch nicht mit mGBP5 nachgewiesen werden. mGBP2 interagiert zusätzlich mit mGBP3 und mGBP5. mGBP3 immunpräzipitierte nicht mit mGBP5 (Abb. 3.18). Diese Ergebnisse decken sich mit den beobachteten Kolo-kalisationen in der Konfokalmikroskopie. So waren mGBP1, 2 und 3 in den gleichen vesikulären Strukturen enthalten und ließen sich ebenfalls ko-immunpräzipitieren. Auch mGBP2 und mGBP5 zeigten partielle Überlagerungen in den mikroskopischen Bildern und waren in der Immunpräzipitation Interaktionspartner. Neben der Konfokalmikroskopie und der Immunpräzipitation konnten vergleichbare Resultate im „yeast-2-hybrid“ System erzielt werden. In Zusammenarbeit mit Julia Hunn aus dem Institut für Genetik an der Universität Köln wurde ein „yeast-2-hybrid Screen“ durchgeführt. In einem ersten Experimentaldurchlauf wurde die Interaktion von mGBP1 bis mGBP5 untereinander ausgetestet. Die primären Daten spiegeln die Ergebnisse der Immunpräzipitation wieder (Daten nicht gezeigt). Somit lokalisieren bestimmte GTPasen in denselben Kompartimenten und sind darüber hinaus direkte Bindungspartner. Neben der Mutation der Isoprenylierungsstelle von mGBP2, die zum Verlust der vesikulären Verteilung führte, wurden Einzelpunktmutationen in die GTP-Bindestellen G1, G3 und G4 von mGBP2 inseriert. Dadurch sollte der Einfluss der GTP Affinität, der Hydrolyserate und der Fähigkeit zur Oligomerisierung auf die Lokalisation des Proteins untersucht werden. Die Mutationen wurden analog zu den für hGBP1 publizierten Mutanten hergestellt (Praefcke et al., 2004). Da die GTP-Bindestellen unter den GTPasen hoch konserviert sind, wird davon ausgegangen dass die zu hGBP1 analogen Mutationen in mGBP2 vergleichbare Auswirkungen haben. Die Mutation eines Arginins in der G1 Region von hGBP1 (korrespondierende Mutation

von mGBP2: R48A) zeigte eine wildtypische GTP-Affinität jedoch eine deutlich reduzierte GTP-Hydrolyse Aktivität, die eine verringerte GMP Produktion zur Folge hat. Weiterhin führte diese Mutation zum Verlust der Nukleotid-abhängigen Oligomerisierung von hGBP1. Die zweite Mutation betraf ebenfalls den P-Loop. Hier wurde die Aminosäure Lysin zu Alanin substituiert (K51A). Das Lysin interagiert mit der β - und γ -Phosphatgruppe sowie mit dem Magnesiumion, das als Kofaktor für die Nukleotidbindung und Hydrolyse fungiert. Anders als die R46A Mutante wies diese Mutante sowohl eine deutlich verringerte GTP-Bindung als auch Hydrolyserate im Vergleich zum Wildtyp auf. K51 scheint daher in der Nukleotidbindung, der Oligomerisation und der Katalyse des GTPase-Zyklus essentiell zu sein. Ein Austausch der Glutaminsäure an der Stelle 99 gegen ein Alanin (E99A) in der dritten GTP-Bindestelle verringerte in der humanen GTPase 1 sowohl die GTP-Bindung als auch die Hydrolyserate. Eine Mutation des Aspartats zu Asparagin in der G4 Region von hGBP1 (korrespondierende Mutation von mGBP2: D184N) zeigte eine deutlich verminderte GTP Affinität jedoch normale Hydrolyseraten und GMP Produktion. Zusätzlich konnte eine leicht verringerte Fähigkeit zur Oligomerisierung gemessen werden (Praefcke et al., 2004). Die Auswirkungen der Mutationen auf die GTPase Aktivität sind für mGBP1 bis mGBP5 bislang nicht untersucht, jedoch lassen sich aufgrund der hoch konservierten GTP-Bindestellen zwischen humanen und murinen GTPasen ähnliche biochemische Eigenschaften der mutierten Proteine postulieren. Erstaunlicherweise führt jede der Mutationen zu einem vollständigen Verlust der vesikulären Verteilung der GTPase mGBP2 (Abb. 3.27). Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Mutanten lässt sich somit nicht eindeutig klären, welcher molekulare Mechanismus für die Lokalisation in Vesikeln verantwortlich ist. Es ist jedoch nahe liegend, dass die Aggregation der GTPasen in zytosolischen Granula die Folge von GTP-abhängigen Oligomerisierungsprozessen darstellt, die durch eine nicht funktionelle GTPase Domäne unterbunden werden. Somit ist durch eine gestörte GTP Bindung und Hydrolyse infolge einer mutierten GTPase Domäne keine Oligomerisierung mehr möglich und die Bindekapazität des Proteins an Membranen reicht nicht aus, um mit den entsprechenden Vesikeln zu assoziieren. Weiterführende Mutationsanalysen könnten diese Hypothese unterstützen.

4.2 Rolle der 65 kDa GTPasen in der Infektionsabwehr

Frühere Publikationen haben gezeigt, dass die zu den 65 kDa verwandten Mx Proteine eine starke anti-virale Funktion gegen RNS Viren, wie Influenza und Vesicular Stomatitis Virus (VSV), ausüben. Um die virale Replikation zu inhibieren, scheint eine direkte Interaktion zwischen Mx Protein und viralen Partikeln notwendig zu sein (Haller und Kochs, 2002). Neben den Mx Proteinen konnten auch die verwandten 47 kDa Proteine als anti-virale Effektormoleküle identifiziert werden. Zwar weisen sie im Gegensatz zu den Mx Proteinen einen schwachen anti-viralen Effekt auf, aber es konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber VSV in TGTP (Irgb6) transfizierten Zellen (Carlow et al., 1998) und eine anti-virale Aktivität gegenüber Coxsackieviren B3 nachgewiesen werden, wenn es in HeLa Zellen überexprimiert wurde (Zhang et al., 2003). Auch die 65 kDa GTPasen, wie hGBP1 oder mGBP2, können eine schwache anti-virale Funktion bei der Infektion von HeLa oder NIH 3T3 Zellen mit den einzelsträngigen RNS Viren VSV oder EMCV übernehmen (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Um neben Picornaviren und Rhabdoviren auch Vertreter der doppelsträngigen DNS Viren zu untersuchen, wurden NIH 3T3 Zellen mit dem Maus Cytomegalovirus (MCMV) oder dem Vaccinia Virus infiziert und die Expression der GTPase mGBP2 untersucht. Erstaunlicherweise verhinderte MCMV die IFN- γ induzierte mGBP2 Expression (Abb. 3.19). Zwar war vier Stunden nach IFN- γ Stimulation mGBP2 deutlich hochreguliert, die Generierung des mGBP2 Proteins wurde jedoch bei gleichzeitiger Infektion mit MCMV drastisch inhibiert. Nach 24-stündiger Infektion konnte keinerlei mGBP2 Protein detektiert werden (Abb. 3.19). Die Inhibition der mGBP2 Expression durch eine MCMV Infektion kann auf die Interferenz des Virus mit dem IFN-Signalweg zurückgeführt werden. MCMV unterbindet die Expression von IRF-1 und verhindert somit zelluläre anti-virale Aktivitäten. Wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben wurde, ist die Expression der GTPasen strikt IRF-1 abhängig reguliert, so dass durch die Inhibition von IRF-1 durch das Virus sekundär auch die Expression der GTPase verhindert wird. Auch nach Infektion von Fibroblasten mit dem Vaccinia Virus konnte kein mGBP2 Protein detektiert werden. Ob das Vaccinia Virus ebenfalls mit dem IFN-Signalweg interferiert wurde hier nicht untersucht. Um mit Hilfe eines anderen Methodenansatzes festzustellen, ob mGBP2 dennoch als anti-virales Effektormolekül eine Rolle in der Abwehr von DNS Viren spielt, wurde das Wachstum von Vaccinia Virus in mGBP2 defizienten Fibroblasten mit dem Wachstum in Wildtyp Fibroblasten verglichen (Abb. 3.37). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten der Viren zwischen Wildtyp und „knock-out“ Fibroblasten detektiert werden. Somit konnte auch mit dieser Methode kein inhibitorischer Effekt von mGBP2 auf das Vaccinia Virus gezeigt werden. Zum Nachweis anti-viraler Funktionen von mGBP2 auf DNS Viren sollten mGBP2 defiziente Mäuse infiziert werden. Weiterhin sollte das Wachstumsverhalten von MCMV in mGBP2 defizienten Fibroblasten im Vergleich zu wildtypischen Zellen analysiert werden. Diese Versuche stehen noch aus.

Neben anti-viralen Effekten konnte den 65 kDa GTPasen verwandten p47 GTPasen mit Hilfe Gen-defizienter Mäuse (LRG-47 (Irgm1), IRG-47 (Irgd) und IGTP (Irgm3)) eine signifikante Bedeutung in der Abwehr intrazellulär replizierender Pathogene wie Listerien und Toxoplasmen zugeordnet werden (Taylor et al., 2004; Martens und Howard, 2006). Um eine ähnliche Funktion für die 65 kDa mGBPs nachzuweisen und die *in vivo* Rolle der differentiell induzierten GBPs aufzuklären, wurde die Regulation der GTPasen während Infektionen in C57BL/6 Mäusen analysiert. Neben einer Expression der GTPasen nach einer Virusinfektion wurde die Hochregulation von mGBP1 bis mGBP5 auch nach einer Infektion mit Bakterien und Protozoen untersucht. Dafür wurden C57BL/6 Mäuse mit *Listeria monocytogenes* oder dem ME49 Stamm von *Toxoplasma gondii* infiziert, die Organe während der akuten Phase der Infektion entnommen und im Western Blot auf ihre mGBP Expression getestet. Es zeigte sich, dass die GTPasen mGBP1, mGBP2, mGBP3 und mGBP5 in einer Vielzahl von Organen durch die Listerieninfektion induziert wurden und im Verlauf der Infektion die Expression deutlich zunahm (Abb. 3.20).

Dabei fiel auf, dass die vier GTPasen nicht in allen Organen gleichermaßen stimuliert wurden. So wurden mGBP1 und mGBP2 in der Leber, Milz, den Peyerschen Plaques (PP), peripheren und mesenterialen Lymphknoten und mGBP2 zusätzlich in der Lunge 72 Stunden nach Infektion hochreguliert. mGBP3 und 5 wurden bereits basal in uninfizierten Mäusen exprimiert. Die mGBP3 Expression stieg als einzige GTPase in der Leber und der Milz nicht an. Dafür konnte eine Hochregulation von mGBP3 und mGBP5 in den Peyerschen Plaques, den peripheren und mesenterialen Lymphknoten, dem Thymus, der Lunge und für mGBP5 zusätzlich im Gehirn festgestellt werden. Die Proteinmenge von mGBP5 steigerte sich in der Milz von 0 auf 24 Stunden und blieb im Verlauf der nächsten 48 Stunden relativ konstant. Die differentielle Genexpression der GTPasen nach Listerieninfektion lässt vermuten, dass die einzelnen GTPasen unterschiedlich reguliert werden und eine nicht-redundante Rolle in der Abwehr von Pathogenen einnehmen.

Interessanterweise trat in der Leber der Listerien infizierten Mäuse nach 24 Stunden eine Spleißvariante von mGBP5 bei etwa 68 kDa auf, deren Proteingehalt im Laufe der Infektion deutlich zunahm, während die Expression der kleineren Spleißform konstant blieb. Die Größe der 68 kDa Spleißvariante entspricht der bereits publizierten Spleißform mGBP5a (Nguyen et al., 2002). Diese alternativ gespleißte Variante wurde aus cDNS der Lunge LPS behandelter Mäuse identifiziert. mGBP5a fehlt die zweite GTP-Bindestelle und weist einen verlängerten C-Terminus jedoch ohne Isoprenylierungsstelle auf. Im Gegensatz zu Nguyen et al. konnte in der Lunge Listerien infizierter Mäuse zwar eine Hochregulation von mGBP5 gefunden werden, jedoch trat die Spleißvariante mGBP5a nur in der Leber auf. Diese organspezifischen Unterschiede könnten durch die verschiedenen Stimuli zustande kommen. Im Rahmen einer LPS Injektion werden andere Zytokine und Rezeptoren induziert als bei einer systemischen Listerieninfektion. Weiterhin könnten je nach Stimulus (LPS oder Listerien) unterschiedliche Zelltypen in die Lunge einwandern. Es wäre sinnvoll, auch in der Leber LPS injizierter Mäuse die Expression von mGBP5a zu untersuchen.

Zusätzlich zu Listerien wurden C57BL/6 Mäuse mit avirulenten ME49 Toxoplasmen infiziert, die Organe 5 bis 12 Tage nach Infektion entnommen und die Expression der GTPasen analysiert. Sowohl mGBP1 als auch mGBP2, mGBP3 und mGBP5 wurden im Laufe der Infektion in der Milz und der Lunge stark hochreguliert (Abb. 3.22). Dies traf auch für die PECs, die Lymphknoten, die Lunge und das Gehirn zu. Im Gegensatz zu mGBP1 und mGBP2 waren mGBP3 und mGBP5 erneut in der Milz basal exprimiert. In der Lunge zeigte sich keine mGBP3 und mGBP5 Expression, was darauf hinweist, dass entweder Zellen aufgrund der Infektion in die Lunge einwandern oder residente Zellen diese GTPasen hochregulieren. Diese organspezifische differentielle Regulation der mGBPs könnte auch auf verschiedene regulatorische Sequenzen in den Promotorregion oder unterschiedliche Promotoraktivitäten innerhalb der GTPasen zurückzuführen sein. Immunhistologische Untersuchungen mit Hilfe der Reportermaus, die an Stelle des mGBP2 Proteins DsRed exprimiert, sollten diese Möglichkeiten trennen können. Prinzipiell spricht die differentielle Expression der einzelnen GTPasen für eine nicht-redundante, pathogenspezifische Funktion der mGBPs. Interessanterweise wurde mGBP5 in der Leber Toxoplasmen infizierter Mäuse im Gegensatz zu Listerien infizierten Mäusen nicht alternativ gespleißt. Pathogenspezifische Immunantworten könnten für diese Unterschiede verantwortlich sein. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine differentielle Expression von IIGP2 (*Irgm2*) Spleißvarianten mit *Chlamydia psittaci* Suszeptibilität korreliert (Miyairi et al., 2007). Analysen von mGBP5 Spleißvarianten nach Infektionen mit anderen Erregern könnten diese These bestätigen.

Die starke Hochregulation der mGBPs im Verlauf von verschiedenen Infektionen deutet darauf hin, dass die GTPasen als Effektormoleküle in der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle einnehmen. Die Funktion als Abwehrproteine könnten sie zum Beispiel durch direkte Interaktionen mit dem Pathogen ausüben. So wurde publiziert, dass die Mx Proteine direkt mit viralen Partikeln interagieren, um die virale Replikation zu inhibieren (Engelhardt et al., 2001; Haller und Kochs, 2002). Auch für mehrere Mitglieder der p47 GTPasen wurde gezeigt, dass sie nach Infektion in unmittelbarer Nähe des Pathogens akkumulieren. LRG-47 (*Irgm1*) assoziiert mit Phagolysosomen, die Mykobakterien enthalten (MacMicking et al., 2003). IIGP1 (*Irga6*), TGTP (*Irgb6*), IRG-47 (*Irgd*), GTPI (*Irgm2*) und IGTP (*Irgm3*) akkumulieren um die parasitophore Vakuole (PV) von aktiv invasierten Toxoplasmen (Martens et al., 2005; Martens und Howard, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob auch die 65 kDa Proteine ihre potentielle Rolle als anti-mikrobielle Effektormoleküle durch eine direkte Interaktion mit Pathogenen ausüben. Hierfür wurden Fibroblasten oder Makrophagen mit Chlamydien, Listerien oder Toxoplasmen infiziert und eine Kolokalisation zwischen Pathogen und mGBP1, 2, 3 oder mGBP5 im Konfokalmikroskop analysiert. Die untersuchten GTPasen kolokalisierten weder mit Chlamydien (Daten nicht gezeigt) noch mit Listerien (Abb. 3.21). Dies schließt jedoch nicht aus, dass diese GTPasen einen Effekt gegen Chlamydien und Listerien ausüben. Andere Effektormechanismen als eine direkte Interaktion können in Frage kommen, um diese Pathogene

abzutöten. Weiterhin könnten andere GTPasen mit diesen Erregern interagieren, um sie zu eliminieren. Anders als Chlamydien und Listerien zeigte sich eine starke Assoziation der GTPasen mGBP2 und mGBP3 mit der PV von avirulenten Toxoplasmen (Abb. 3.23). Dieser Effekt trat nach IFN- γ Stimulation innerhalb von 20-30 Minuten nach Invasion der Toxoplasmen in die Zelle auf. mGBP stabil exprimierende Zellen zeigten ohne IFN- γ Stimulation erst nach einer sehr langen Inkubation mit Toxoplasmen (7 Stunden) vereinzelt GTPase positive Parasiten. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die PV der Parasiten vollkommen von den GTPasen eingeschlossen wurde, so dass nahezu keine GTPase im Zytoplasma verblieb. Für mGBP1 konnte gezeigt werden, dass nach Färbung der GTPase mit dem Antikörper eine Rekrutierung um die PV auftrat (Abb. 3.23). Erstaunlicherweise kolokalisierte das stabil in der Zelle exprimierte GFP-mGBP1 nicht mit der PV. Detaillierte Untersuchungen ergaben, dass eine weitere GTPase existiert, die im N-terminalen Bereich sequenzidentisch mit mGBP2 ist (Exon 1-3, 475 nt) und im C-Terminus mit mGBP1. Interessanterweise entspricht dieses 2/1 Hybrid der früher als mGBP1 annotierten Sequenz (Cheng et al., 1991; Wynn et al., 1991), die erst Ende 2006 durch Olszewski et al. mit Hilfe von *in silico* Analysen korrigiert wurde (Olszewski et al., 2006). Somit existiert neben mGBP1 eine weitere GTPase, die als mGBP2/1 Hybrid bezeichnet wurde. Mit Hilfe von RT-PCR Analysen aus RNS von mGBP2 defizienten Zellen konnte nachgewiesen werden, dass dieses Hybrid tatsächlich genomisch vorhanden ist und nicht etwa durch Transsplicing aus mGBP2 und mGBP1 RNS entsteht, wie von Olszewski et al. vermutet wurde (Daten nicht gezeigt). Der dazugehörige genomische Locus konnte bis dato nicht identifiziert werden. Mit Hilfe des Antikörpers, der sowohl mGBP1 als auch mGBP2/1 erkennt da er im C-terminalen Bereich der GTPase bindet, konnte eine Kolokalisation mit den Toxoplasmen detektiert werden, die auf die GTPase mGBP2/1 zurück zuführen ist, jedoch nicht auf mGBP1 (Abb. 3.23). Diese Daten werden unterstützt durch die Beobachtung, dass das GFP-mGBP2/1 Fusionskonstrukt ebenfalls mit der PV der Toxoplasmen kolokalisierte (Abb. 3.23). Neben mGBP1 assoziierte auch mGBP5 nicht mit der PV der Toxoplasmen (Abb. 3.23). Um herauszufinden, welche Eigenschaften der GTPasen für die Erkennung der Toxoplasmen verantwortlich sind, wurden die oligomerisierungs-, hydrolysierungs- und isoprenylierungsdefizienten GTPase-Mutanten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit der PV zu interagieren. Alle GTP-Bindungsmutanten kolokalisierten, wenn auch zu einem geringeren Maße, mit der PV (Abb. 3.27). Insbesondere die Mutation in der ersten GTP-Bindestelle (R48A) verursachte eine deutliche Reduktion der Toxoplasmenerkennung. Die Mutante assoziierte nur noch mit etwa jeder fünften PV anstatt mit jeder zweiten. Somit scheint die Fähigkeit zur Hydrolyse zumindest teilweise einen Effekt auf die Identifizierung der Toxoplasmen durch die GTPase zu haben. Die GTP-Bindung spielt offenbar keine überragende Rolle bei der Toxoplasmenerkennung. Interessanterweise konnte bei der Isoprenylierungsdefizienten Mutante keinerlei Kolokalisation mit der PV gefunden werden (Abb. 3.27, Zeile 5). Die über die Isoprenylierung vermittelte Verankerung in Lipidmembranen scheint somit essentiell für die Rekrutierung zu dem Pathogen zu sein. Es ist vorstellbar, dass die GTPasen mit Hilfe der

Vesikel entlang des Zytoskeletts der Zelle zu den Toxoplasmen transportiert werden. In der Tat lassen sich früh nach Invasion von *T. gondii* in Zellen drastische Umlagerungen von zellulären Mikrotubuli beobachten, die zu einem vollständigen Einschließen der PV in ein Mikrotubulinetzwerk führen (Melo et al., 2001). Die GTPase Aktivität könnte benötigt werden, um die mGBP enthaltenden Vesikel entlang der Mikrotubuli in Richtung PV zu bewegen. In diesem Zusammenhang wären insbesondere Versuche interessant, die die Stabilität von Mikrotubuli beeinflussen. Damit könnten Erkenntnisse über die Notwendigkeit eines Mikrotubulinetzwurkes zur Umlagerung der GTPasen zur PV erlangt werden.

Es wurden jedoch bereits Experimente mit mGBP2 und mGBP5 Hybriden durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob eine Lokalisation in bestimmten Vesikeln die Rekrutierungsfähigkeit der GTPase zu der PV beeinflusst und um ein mögliches Toxoplasmenerkennungsmotiv zu identifizieren. Hierfür wurden Hybride aus der toxoplasmenrekrutierenden GTPase mGBP2 und der nicht-toxoplasmenerkennenden GTPase mGBP5 kloniert und auf ihre Fähigkeit untersucht, mit dem Pathogen zu interagieren (s. Abb. 3.29). Das Hybrid, das die GTPase Domänen von mGBP2 enthielt, jedoch den C-Terminus inklusive der Isoprenylierungsstelle von mGBP5, wies einen vollständigen Verlust der Toxoplasmenrekrutierung auf. Das Konstrukt mit den GTPase Domänen von mGBP5 und der Isoprenylierungssequenz von mGBP2 akkumulierte weiterhin um die PV der Toxoplasmen. Zusammen mit den Ergebnissen der GTP-Bindungsmutanten und der Isoprenylierungsmutante lässt sich schließen, dass die Region, die für die Erkennung der Toxoplasmen essentiell ist, im C-terminalen Bereich von mGBP2 lokalisiert ist. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich die Isoprenylierungssequenzen von mGBP2 und mGBP5 unterscheiden und mGBP5 in einem anderen zellulären Kompartiment lokalisiert zu sein scheint, stellte sich die Frage, ob die Lokalisation in unterschiedlichen Vesikeln für eine Rekrutierung zu den Toxoplasmen entscheidend ist. Ein Austausch der Isoprenylierungsstelle von mGBP2 gegen die von mGBP5 sollte dies näher charakterisieren. Tatsächlich kolokalisierte diese Isoprenylierungsmutante (mGBP2-Iso-5) wesentlich geringer (23 %) mit der PV als mGBP2 (Abb. 3.30), erzielte jedoch keinen vollständigen Verlust der Toxoplasmenerkennung. Interessanterweise ergab die Verteilung dieser Mutante nicht die erwartete typische perinukleäre Verteilung, wie sie zuvor für mGBP5 beschrieben wurde (Abb. 3.16). Da nachgewiesen wurde, dass mGBP2 stark mit den GTPasen mGBP1 und mGBP3 interagiert, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Isoprenylierung und somit auch die Lokalisation in bestimmten Vesikeln die Rekrutierung zu der PV stark beeinflusst, dass jedoch die Mutante teilweise über ihre Interaktion mit anderen GTPasen nach wie vor an die PV akkumulieren kann. Um diese These zu bestätigen, wäre eine mGBP5 Mutante interessant, die die Isoprenylierungssequenz von mGBP2 enthält, die ihr die Lokalisation in „toxoplasmatischen“ Vesikeln ermöglicht.

Neben der Infektion mit dem avirulenten Toxoplasmenstamm ME49 (Klasse II) wurden Kolokalisationsexperimente auch mit dem virulenten BK Stamm (Klasse I) durchgeführt. Erstaunlicherweise wurden lediglich 3-4 % aller virulenten Toxoplasmen von den GBPs

mGBP2/1, mGBP2 oder mGBP3 umschlossen (Abb. 3.26). Zusätzlich wiesen diese Toxoplasmen lediglich eine partielle Umrundung durch die GTPasen auf. Ob die Unterscheidung zwischen virulenten und avirulenten Toxoplasmen aufgrund der Rekrutierung der GTPasen zur PV zustande kommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Kürzlich wurde jedoch ein Virulenzfaktor (ROP18) in Klasse I Toxoplasmen identifiziert, der in den avirulenten Toxoplasmenstämmen defekt ist. Durch Rekonstitution dieser Serin-Threonin Kinase in Klasse II Toxoplasmen konnte dessen Mortalität *in vivo* erheblich gesteigert werden (Taylor et al., 2006). ROP18 wird in die PV und in Vesikeln in das Zytosol der Zelle sekretiert. Die Kinase könnte in der Lage sein mit den GTPasen zu interferieren und deren GTPase Aktivität zu unterbinden. Es wäre sehr interessant, die Lokalisation der GTPasen in einer virulenten Toxoplasmenmutante mit einem Defekt in ROP18 zu untersuchen. Möglicherweise wird diese Mutante wieder von den GTPasen erkannt und umrundet. Offensichtlich haben die virulenten Toxoplasmen im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, die sie vor der Detektion durch die mGBPs schützen. Dies unterstützt die These, dass die GTPasen einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen die Toxoplasmen darstellen.

Durch die Untersuchung der Toxoplasmenproliferation in mGBP stabil exprimierenden 264.7 RAW Makrophagen sollte die Rolle der GTPasen als direkte anti-parasitäre Effektormoleküle analysiert werden. Dafür wurden GFP, GFP-mGBP2 und GFP-mGBP5 stabil exprimierende Makrophagen mit Toxoplasmen infiziert und das Wachstum der Parasiten in An- und Abwesenheit von IFN- γ gemessen (Abb. 3.31 und 3.32). Der *in vitro* Toxoplasmen-Proliferationsassay zeigte, dass die Parasiten durch die Zugabe von IFN- γ signifikant in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten. Dies stimmt mit Publikationen überein, die gezeigt haben dass in murinen IFN- γ aktivierten Makrophagen die Toxoplasmenreplikation NO-abhängig inhibiert wird (Adams et al., 1990). Darüber hinaus konnte jedoch eine signifikante Verringerung der Toxoplasmenproliferation durch Expression der GTPasen als GFP-mGBP Fusionskonstrukte in unstimulierten Zellen im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Diese Inhibition trat auch nach zusätzlicher IFN- γ Stimulation auf. Neueste Untersuchungen wiesen einen ähnlichen Effekt auch für mGBP1 und 3 auf (Daten nicht gezeigt). Auf Grund des Nachweises einer Inhibition des Toxoplasmenwachstums auch ohne IFN- γ Stimulation, kann gefolgert werden, dass eine Akkumulation der GTPase um die PV nicht essentiell für die Hemmung ist, da eine starke Rekrutierung der GTPase zum Parasiten erst nach IFN- γ Stimulation zu beobachten war (siehe Abschnitt 3.2.5). Dies wird unterstützt durch den Befund, dass auch die nicht zum Toxoplasma rekrutierende GTPase mGBP5 einen anti-proliferativen Effekt auf die Toxoplasmen ausübt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass kleine Mengen von mGBPs um die PV lagern. Dies könnte durch Elektronenmikroskopische Untersuchungen geklärt werden. Der anti-parasitäre Effekt der mGBPs konnte nur mit dem avirulenten Toxoplasmenstamm nachgewiesen werden. Eine Hemmung der Toxoplasmenproliferation trat nicht nach Infektion der Zelllinien mit dem virulenten BK Stamm auf (Daten nicht gezeigt). Dies

ist kongruent zu den Daten die zeigen, dass die Klasse I Toxoplasmen die Rekrutierung der GTPasen zur PV offenbar aktiv inhibieren können (s.o.).

Die Funktion der GTPasen an der PV der Toxoplasmen ist bisher weitgehend ungeklärt, es gibt jedoch mehrere Theorien, die die Rolle der GTPasen erklären könnten. Eine Möglichkeit wäre, dass die GTPasen die Toxoplasmen von lebensnotwendigen zellulären Molekülen abschirmen. Die Toxoplasmen würden somit in ihrem Wachstum inhibiert werden und könnten sich nicht weiter vermehren. Weiterhin könnten die GTPasen einen „ring of defense“ um die PV bilden, so dass die Toxoplasmen so lange in ihrem Wachstum gehemmt werden, bis andere effektive Mechanismen zur Eliminierung der Pathogene induziert wurden, also so lange, bis der Organismus eine adäquate adaptive Immunantwort aufgebaut hat. Außerdem wäre es vorstellbar, dass eine direkte Assoziation des Proteins mit der PV die Replikation des Pathogens inhibiert. Eine solche Funktion wurde für manche Mitglieder der p47 GTPasen postuliert. Martens et al. konnten mit Hilfe von fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass IIGP1 (Irga6) mit der PV aktiv eingedrungener Toxoplasmen kolokalisiert und die Membran der PV im Verlauf der Infektion zersetzt wurde. IIGP1 positive PVs zeigten drei Stufen der Zersetzung, die als „smooth“ für intakte Membran, „rough“ für angegriffene Membran und „disrupted“ für eine zersetzte Membran, bezeichnet wurden. Die Zersetzung der PV Membran führte schließlich zur Abtötung des Parasiten selbst. Ob der Effekt der PV Zersetzung dabei tatsächlich allein auf die Assoziation der PV mit IIGP1 zurückzuführen ist, bleibt unklar, da der Inhibitionseffekt abhängig von einer IFN- γ Behandlung der Zellen war (Martens et al., 2005). Durch die Stimulation werden jedoch auch andere Effektormoleküle, wie IDO und auch die 65 kDa GTPasen hochreguliert. Somit scheint es wahrscheinlicher, dass ein Zusammenspiel der GTPasen die Zersetzung der PV bedingt. In diesem Zusammenhang konnte eine interessante Beobachtung mit den GFP-mGBP2 stabil exprimierenden NIH 3T3 Zellen gemacht werden. Nach Infektion der Zellen für 24 Stunden mit ME49 Toxoplasmen sowohl mit als auch ohne IFN- γ Präinkubation wurde die Anzahl der gebildeten Rosetten und die Zahl der Parasiten pro Rosette ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der Rosetten im Vergleich zwischen GFP und GFP-mGBP2 transduzierten Fibroblasten keine signifikanten Unterschiede aufwies. Die Anzahl der Toxoplasmen pro Rosette unterschieden sich jedoch erheblich: ohne IFN- γ Stimulation konnten in den GFP exprimierenden Zellen im Schnitt vier Parasiten pro Rosette gezählt, in den GFP-mGBP2 exprimierenden Fibroblasten durchschnittlich lediglich zwei (Daten nicht gezeigt). In den IFN- γ vorstimulierten GFP-mGBP2 transduzierten Zellen war der Effekt noch drastischer: hier waren nur Einzelparasiten zu finden. Diese Beobachtungen sprechen eher für einen toxoplasmastatischen als für einen toxoplasmaziden Effekt. Diese Aussage wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Toxoplasmenproliferation bereits in den unstimulierten 264.7 RAW Makrophagen durch die Überexpression einer GTPase gehemmt werden kann (Abb. 3.31), was bedeutet, dass eine starke direkte Interaktion der mGBPs für einen anti-parasitären Effekt nicht notwendig ist. Die GTPasen könnten somit eine doppelte Funktion in der Abwehr gegen Toxoplasmen einnehmen. Zum einen

hemmen sie durch ihre Anwesenheit das Wachstum der Toxoplasmen, zum anderen können sie durch direkte Akkumulation an den Parasiten deren PV zerstören und sie dadurch abtöten. Insgesamt weist die Induktion der GTPasen nach Infektion mit Toxoplasmen und Listerien, die Kolokalisation einiger mGBPs mit der PV von *T. gondii* und die Proliferationshemmung der Klasse II Toxoplasmen nach Überexpression von mGBP stark auf eine anti-mikrobielle Funktion der 65 kDa GTPasen hin. Um diese Vermutung *in vivo* zu untermauern, wurde eine mGBP2 defiziente Mauslinie generiert. Dafür wurde eine DsRed Reporterkassette zusammen mit einer geflochten Neomycin Kassette in das Exon 2 an die Stelle des Translationsstarts inseriert (s. Abb. 3.33). Nach Deletion der Neomycin Kassette wird an Stelle von mGBP2 das DsRed Protein translatiert, wodurch die Promotoraktivitäten und die Zelltypen, die mGBP2 exprimieren, analysiert werden können. Mit Hilfe von Western Blots (Abb. 3.35 und 3.38) und FACS Analysen (Abb. 3.37) konnte nachgewiesen werden, dass in den mGBP2 defizienten Mäusen kein mGBP2 mehr translatiert wird, die „CRE-deleter“ verpaarten Mäuse nach Stimulation jedoch DsRed exprimieren. Somit konnte sowohl eine mGBP2 defiziente Maus als auch eine Reportermaus generiert werden. Erste Analysen ergaben, dass die Verteilung der mGBP2 defizienten Nachkommen den Mendelschen Regeln entsprechen. Die homozygoten „knock-out“ Mäuse sind vital und fertil, was schließen lässt, dass mGBP2 bei der Reproduktion nicht essentiell ist. Zur weiteren Analyse der mGBP2 „knock-out“ Mäuse wurden FACS Analysen des Thymus, der Milz, des Knochenmarks und der Peritoneallavage durchgeführt. Hierbei wurde die Zellzahl der jeweiligen Organe von Wildtypmäusen und mGBP2 defizienten Mäusen ermittelt, das Verhältnis von B- zu T-Zellen, der Reifungs- bzw. Aktivierungsgrad der B- und T-Zellen und die Anzahl der Granulozyten und Makrophagen untersucht (Tab. 2.14). Keine der analysierten Parameter zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyp und den mGBP2^{-/-} Mäusen (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Experimente, wie z. B. das Proliferationsverhalten der Zellen nach Stimulation, stehen noch aus. Zur Verifizierung der Aussage, dass die GTPasen einen anti-proliferativen Effekt auf Toxoplasmen ausüben, wurden das Wachstum der Toxoplasmen sowohl in mEFs als auch BMDMs aus Wildtyp und „knock-out“ Mäusen gemessen (Abb. 3.40 und 3.41). In Übereinstimmung zu den mGBP2 Überexpressionsdaten, die eine Reduktion des Toxoplasmenwachstums zeigten, proliferierten die Parasiten in den mGBP2 defizienten Zellen nach IFN- γ Stimulation stärker als in den Wildtypzellen. Somit bedingt das Fehlen bereits einer GTPase einen deutlichen Verlust in der Abwehrleistung gegen *T. gondii*. Die Rolle von mGBP2 konnte auch durch *in vivo* Experimente bestätigt werden, in dem Wildtyp und mGBP2 defiziente Mäuse mit 20 Zysten ME49 Toxoplasmen infiziert wurden und das Überleben der Mäuse über mehr als zwei Monate beobachtet wurde. Dabei verstarben 43 % der mGBP2 defizienten Mäuse, wohingegen alle Wildtyp Mäuse die Infektion in dem beobachteten Zeitraum überlebten (Abb. 3.42). Darüber hinaus war die Anzahl der Zysten im Gehirn der mGBP2 defizienten Mäuse erheblich höher als in den Kontrollmäusen (Abb. 3.43). Die Expression der GTPasen mGBP1, mGBP3 und mGBP5 wurden durch das Fehlen von mGBP2 nicht sichtbar alteriert (Abb. 3.44).

Auch die Fähigkeit der GTPase mGBP2/1 zu der PV von *T. gondii* zu rekrutieren war durch die Deletion von mGBP2 nicht beeinträchtigt (Abb. 3.44). Die Rolle einer „Führungs-GTPase“, die die anderen GTPasen zu der PV leitet, nimmt mGBP2 somit nicht ein. Eher stellen die einzelnen GTPasen unabhängige Faktoren in der Abwehr von *T. gondii* Infektion dar. Diese Resultate sind vergleichbar mit Daten, die über IRG-47 (Irgd) defiziente Mäuse in der Toxoplasmeninfektion publiziert wurden (Collazo et al., 2001). Collazo et al. konnten zeigen, dass 67 % der IRG-47 defizienten Mäuse hauptsächlich während der chronischen Phase zwischen Tag 10 und 47 nach Infektion verstarben, während LRG-47 (Irgm1) und IGTP (Irgm3) defiziente Tiere innerhalb von 9 bis 11 Tagen der akuten Phase der Toxoplasmeninfektion erlagen. Auch die Anzahl der Zysten war in den jeweiligen „knock-out“ Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen erhöht. Aufgrund des unterschiedlichen Infektionsverlaufs in den 47 kDa GTPasen defizienten Mäusen während einer Toxoplasmeninfektion (akut vs. chronisch) teilten die Autoren diese GTPasen in zwei Subgruppen. Die eine besteht demnach aus LRG-47 und IGTP und die andere beinhaltet IRG-47. Interessanterweise entspricht diese Unterteilung auch den Homologieclustern basierend auf der primären Sequenzähnlichkeit der IRGs. Ob eine solche Differenzierung auch für die 65 kDa GTPasen vorgenommen werden kann bleibt abzuwarten, bis weitere gendefiziente Mauslinien (bisher generiert wurden mGBP1, mGBP3 und mGBP5) nach Toxoplasmeninfektion untersucht wurden.

Neben der Infektion mit *T. gondii* haben Collazo et al. auch Listerieninfektionen durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass die GTPasen unterschiedliche Funktionen in der Pathogenabwehr einnehmen. Interessanterweise waren nur LRG-47 defiziente Mäuse suszeptibel gegenüber Listerien. 100 % der Mäuse verstarben innerhalb von fünf Tagen, während IRG-47 und IGTP defiziente Tiere resistent waren (Collazo et al., 2001). Eine erste vorläufige Versuchsreihe deutete auf eine erhöhte Suszeptibilität mGBP2 defizienter Mäuse in der Listereinfektion hin. Zur Bestätigung dieser Annahme muss dieses Infektionsexperiment jedoch noch mehrmals wiederholt werden.

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass die GTPasen mGBP1, mGBP2, mGBP3 und mGBP5 eine bedeutende Rolle in der Abwehr von intrazellulären Parasiten einnehmen. Insbesondere für mGBP2 konnte eine essentielle Funktion bei der Abwehr von Toxoplasmen nachgewiesen werden. Ein anti-viraler Effekt konnte nicht gezeigt werden. Ob den verschiedenen GTPasen ein gemeinsamer Wirkmechanismus zu Grunde liegt, oder ob distinkte anti-parasitäre Funktionen einzelner GTPasen vorliegen, kann bis jetzt nicht beantwortet werden. Das unterschiedliche Verhalten der GTPasen in Bezug auf ihre Kolokalisation mit verschiedenen Pathogenen spricht jedoch eher für einen individuellen, pathogenspezifischen Effekt der mGBPs.

4.3 Ausblick

Zur Charakterisierung der mGBP2 defizienten Mäuse sollten Untersuchungen des Reifungs- bzw. Aktivierungsgrad der B- und T-Zellen und die Anzahl von Granulozyten und Makrophagen in verschiedenen Organen vertieft werden. Insbesondere das Proliferationsverhalten von mGBP2 defizienten und wildtypischen Zellen nach Stimulation ist hierbei von Interesse. Proliferationsassays und zytotoxische T-Zellmessungen könnten Unterschiede zwischen mGBP2 defizienten und Wildtyp Zellen aufdecken.

Mit Hilfe der mGBP2-DsRed Reportermaus kann der Phänotyp der mGBP2 exprimierenden Zellen ermittelt werden. Zusätzlich sollte die Aussage getroffen werden, zu welchem Zeitpunkt einer Infektion mGBP2 exprimiert wird und ob die Zellen in den Organen selbst die GTPase hochregulieren oder ob Zellen aus peripheren Regionen zum Ort der Infektion migrieren. Da das DsRed Protein die Promotoraktivität des mGBP2 Gens widerspiegelt, könnten Gewebeschnitte von verschiedenen Organen nach Infektion Aufschluss hierüber geben.

Um die Rolle der GTPasen in der Infektionsabwehr zu untermauern, ist das Listerien Infektionsexperiment in den mGBP2 defizienten Mäusen von besonderem Interesse. Dabei sollte auch die Pathogenlast in verschiedenen Organen ermittelt werden. Zusätzlich sollte die Serumkonzentration wichtiger proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-12 verglichen werden, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob z. B. ein verminderter IFN- γ Spiegel in den mGBP2 defizienten Tieren für das Sterben der Mäuse nach Infektion verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang wäre auch das Expressionsverhalten der anderen GTPasen interessant. Zwar zeigten sich auf Proteinebene in den mGBP2 defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der GTPasen mGBP1, mGBP3 und mGBP5 nach Toxoplasmeninfektion, über die Hochregulation während der Listerieninfektion ist jedoch nichts bekannt. Es wäre durchaus möglich, dass eine andere GTPase durch das Fehlen von mGBP2 stärker induziert wird.

Ein besonderes Interesse liegt in der Aufdeckung der molekularen Funktion der GTPasen an der PV der Toxoplasmen und wie sie auch ohne Kolokalisation das Wachstum der Parasiten hemmen können. Konfokale Laser Scanning mikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten klären, ob mGBP positive Vakuolen im Verlauf der Infektion zersetzt werden. In diesem Zusammenhang soll mit Hilfe weiterer mGBP2 Deletionsmutanten und mGBP2-mGBP5 Hybriden ein „Toxoplasmenerkennungsmotiv“ identifiziert werden. ROP18 defizienten Klasse I Toxoplasmen oder ROP18 rekonstituierten Klasse III Toxoplasmen sollten klären, ob diese Kinase dafür verantwortlich ist, dass die GTPasen nicht mehr mit den BK Toxoplasmen kolokalisieren können.

Zur Identifizierung einer anti-viralen Funktion ist beabsichtigt, mGBP2 defiziente Mäuse mit unterschiedlichen Viren zu infizieren und sowohl das Überleben der Mäuse zu beobachten als

auch die Virenlast in verschiedenen Organen zu analysieren. Es ist möglich, die Virenlast durch Titrationsassays zu ermitteln.

Die Bedeutung der GTPasen mGBP1, mGBP3 und mGBP5 in der Immunabwehr sollen durch die Generierung weitere GBP-defizienter Mauslinien untersucht werden. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits vorbereitende Schritte unternommen. Auch diese mGBP-defizienten Mäuse sollen dann in künftigen Studien auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Infektionen mit verschiedenen Pathogenen zu kontrollieren. Ein Hauptaugenmerk wird dabei auf die Rolle der GTPasen in der Abwehr gegen *L. monocytogenes*, *T. gondii* sowie virale Infektionen mit VSV und MCMV gelegt werden. Mit Hilfe dieser „knock-out“ Mäuse kann eine redundante Funktion der GTPasen ausgeschlossen werden. Weiterhin wäre die Generierung von mGBP Doppel- und Mehrfach-defizienten Mauslinien von besonderem Interesse um herauszufinden, ob sich z.B. der Effekt der mGBP2 defizienten Maus in der Toxoplasmeninfektion verstärken lässt.

5 Zusammenfassung

Interferon γ (IFN- γ) und TNF sind inflammatorische Zytokine die für die effektive Eliminierung von intrazellulären Erregern eine entscheidende Rolle spielen. Überraschenderweise konnten Studien belegen, dass TNFR1 defiziente Mäuse normale ROI und RNI Aktivität sowie eine normale Produktion von IFN- γ und anderer proinflammatorischer Zytokine zeigen, jedoch hochgradig suszeptibel gegenüber Infektionen mit *L. monocytogenes* sind (Pfeffer et al., 1993; Endres et al., 1997). Diese Befunde sprechen dafür, dass die IFN- γ und TNF abhängige Immunantwort bislang unbekannte zelluläre Mechanismen aktiviert, die zu einer effektiven antimikrobiellen Aktivität führen. Diese bisher unbekannten Effektormoleküle könnten 65 kDa GTPasen sein, die nach IFN- γ Stimulation hochreguliert werden. Um diese Hypothese zu bestätigen wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Expression der bisher bekannten GTPasen mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP4 und mGBP5 in murinen Makrophagen, Fibroblasten, primären Milzzellen sowie B- und T-Zellen charakterisiert. Zusätzlich zu IFN- γ , waren die GTPasen, außer mGBP4, durch weitere Zytokine, wie IFN- β und IL-1 β , sowie durch TLR-Agonisten, wie LPS und CpG 1668 auch auf Proteinebene induzierbar. Es konnte gezeigt werden, dass die GTPase mGBP4 auf Grund einer Mutation im Spleißdonor nicht zu einem funktionellen Protein translatiert wird. Darüber hinaus konnte eine weitere GTPase, mGBP2/1, identifiziert werden. In verschiedenen Organen *T. gondii* und *L. monocytogenes* infizierter Mäuse ließ sich eine deutliche Induktion der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 nachweisen. Die mikroskopische Analyse von endogenen GTPasen sowie GFP-mGBP Fusionskonstrukten in RAW 264.7 Makrophagen und Fibroblasten zeigte, dass die mGBP Proteine in granulären bzw. vesikelartigen Strukturen im Zytoplasma lokalisiert vorliegen. Nach Infektion von mGBP exprimierenden, IFN- γ stimulierten Zellen mit *T. gondii*, ließ sich eine Akkumulation von mGBP2/1, mGBP2 und mGBP3 an der parasitophoren Vakuole des Parasiten beobachten, jedoch nicht von mGBP1 und mGBP5. Die Fähigkeit der GTP-Hydrolyse und die Lokalisation in „toxoplasmatische Vesikel“ schienen hier von besonderer Bedeutung zu sein, damit das Protein an intrazelluläre Toxoplasmen akkumulierte. Virulente Toxoplasmen waren in der Lage, die mGBP2/1, mGBP2 und mGBP3 Akkumulation aktiv zu inhibieren. Die Überexpression der GTPasen in Makrophagen führte zu einer deutlichen Verringerung der Toxoplasmenproliferation. Dabei handelte es sich eher um einen toxoplasmastatischen als einen toxoplasmaziden Effekt. Diese Inhibition konnte bei virulenten Toxoplasmen nicht gefunden werden. Mit Hilfe von mGBP2 defizienten Zellen, die nach Etablierung von mGBP2^{-/-} Mäusen gewonnen werden konnten, konnte ein anti-mikrobieller Effekt von mGBP2 bestätigt werden. In mGBP2 defizienten Zellen konnten die Toxoplasmen wesentlich besser proliferieren als in wildtypischen Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mGBP2 defiziente Mäuse suszeptibler gegenüber Infektionen mit Toxoplasmen waren und zudem die Anzahl der Toxoplasmenzysten in den Gehirnen der mGBP2 „knock-out“ Mäuse

signifikant höher war als in den Kontrollmäusen. Die Expression von mGBP1, mGBP3 und mGBP5 war in Abwesenheit von mGBP2 nicht alteriert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die GTPasen mGBP1, mGBP3, mGBP5 und insbesondere mGBP2 wesentliche anti-mikrobielle Effektormoleküle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene darstellen.

6 Literaturverzeichnis

Abbas,A.K., Lichtman,A.H., Pallai,S. (2007). Cellular and Molecular Immunology. 6th Edition.

Adams,L.B., Hibbs,J.B., Jr., Taintor,R.R., and Krahenbuhl,J.L. (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* *144*, 2725-2729.

Agrawal,A., Shrive,A.K., Greenhough,T.J., and Volanakis,J.E. (2001). Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J. Immunol.* *166*, 3998-4004.

Akira,S. and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499-511.

Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.

Anderson,S.L., Carton,J.M., Lou,J., Xing,L., and Rubin,B.Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* *256*, 8-14.

Arnheiter,H., Skuntz,S., Noteborn,M., Chang,S., and Meier,E. (1990). Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* *62*, 51-61.

Asundi,V.K., Stahl,R.C., Showalter,L., Conner,K.J., and Carey,D.J. (1994). Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1217*, 257-265.

Bach,E.A., Aguet,M., and Schreiber,R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 563-591.

Bafica,A., Feng,C.G., Santiago,H.C., Aliberti,J., Cheever,A., Thomas,K.E., Taylor,G.A., Vogel,S.N., and Sher,A. (2007). The IFN-Inducible GTPase LRG47 (Irgm1) Negatively Regulates TLR4-Triggered Proinflammatory Cytokine Production and Prevents Endotoxemia. *J. Immunol.* *179*, 5514-5522.

Bekpen,C., Hunn,J.P., Rohde,C., Parvanova,I., Guethlein,L., Dunn,D.M., Glowalla,E., Leptin,M., and Howard,J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* *6*, R92.

Bertin,J., Nir,W.J., Fischer,C.M., Tayber,O.V., Errada,P.R., Grant,J.R., Keilty,J.J., Gosselin,M.L., Robison,K.E., Wong,G.H., Glucksmann,M.A., and DiStefano,P.S. (1999). Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *274*, 12955-12958.

Boehm,U., Guethlein,L., Klamp,T., Ozbek,K., Schaub,A., Futterer,A., Pfeffer,K., and Howard,J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J. Immunol.* *161*, 6715-6723.

Boehm,U., Klamp,T., Groot,M., and Howard,J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 749-795.

- Bogdan,C., Mattner,J., and Schleicher,U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* *202*, 33-48.
- Bourne,H.R. (1995). GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *349*, 283-289.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* *348*, 125-132.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.
- Briken,V., Ruffner,H., Schultz,U., Schwarz,A., Reis,L.F., Strehlow,I., Decker,T., and Staeheli,P. (1995). Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol. Cell Biol.* *15*, 975-982.
- Carlow,D.A., Teh,S.J., and Teh,H.S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J. Immunol.* *161*, 2348-2355.
- Carter,C.C., Gorbacheva,V.Y., and Vestal,D.J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch. Virol.* *150*, 1213-1220.
- Chavrier,P. and Goud,B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 466-475.
- Chen,J., Baig,E., and Fish,E.N. (2004). Diversity and relatedness among the type I interferons. *J. Interferon Cytokine Res.* *24*, 687-698.
- Cheng,Y.S., Becker-Manley,M.F., Chow,T.P., and Horan,D.C. (1985). Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J. Biol. Chem.* *260*, 15834-15839.
- Cheng,Y.S., Becker-Manley,M.F., Nguyen,T.D., DeGrado,W.F., and Jonak,G.J. (1986). Nonidentical induction of the guanylate binding protein and the 56K protein by type I and type II interferons. *J. Interferon Res.* *6*, 417-427.
- Cheng,Y.S., Colonno,R.J., and Yin,F.H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J. Biol. Chem.* *258*, 7746-7750.
- Cheng,Y.S., Patterson,C.E., and Staeheli,P. (1991). Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol. Cell Biol.* *11*, 4717-4725.
- Chimini,G. and Chavrier,P. (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol.* *2*, E191-E196.
- Cho,S.G., Attaya,M., and Monaco,J.J. (1991). New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* *353*, 573-576.

- Collazo,C.M., Yap,G.S., Sempowski,G.D., Lusby,K.C., Tessarollo,L., Woude,G.F., Sher,A., and Taylor,G.A. (2001). Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* **194**, 181-188.
- Cox,G.W., Mathieson,B.J., Gandino,L., Blasi,E., Radzioch,D., and Varesio,L. (1989). Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 1492-1496.
- Daubener,W. and MacKenzie,C.R. (1999). IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 517-524.
- Decker,T., Lew,D.J., and Darnell,J.E., Jr. (1991a). Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5147-5153.
- Decker,T., Lew,D.J., Mirkovitch,J., and Darnell,J.E., Jr. (1991b). Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J.* **10**, 927-932.
- Degrandi,D., Konermann,C., Beuter-Gunia,C., Kresse,A., Wurthner,J., Kurig,S., Beer,S., and Pfeffer,K. (2007). Extensive Characterization of IFN-Induced GTPases mGBP1 to mGBP10 Involved in Host Defense. *J. Immunol.* **179**, 7729-7740.
- Di Paolo,C., Hefti,H.P., Meli,M., Landis,H., and Pavlovic,J. (1999). Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J. Biol. Chem.* **274**, 32071-32078.
- Duan,Z., Foster,R., Brakora,K.A., Yusuf,R.Z., and Seiden,M.V. (2006). GBP1 overexpression is associated with a paclitaxel resistance phenotype. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **57**, 25-33.
- Endres,R., Luz,A., Schulze,H., Neubauer,H., Futterer,A., Holland,S.M., Wagner,H., and Pfeffer,K. (1997). Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity.* **7**, 419-432.
- Engelhardt,O.G., Ullrich,E., Kochs,G., and Haller,O. (2001). Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Exp. Cell Res.* **271**, 286-295.
- Flohr,F., Schneider-Schaulies,S., Haller,O., and Kochs,G. (1999). The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *FEBS Lett.* **463**, 24-28.
- Fraser,I.P., Koziel,H., and Ezekowitz,R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* **10**, 363-372.
- Freund,M., Hicks,M.J., Konermann,C., Otte,M., Hertel,K.J., and Schaal,H. (2005). Extended base pair complementarity between U1 snRNA and the 5' splice site does not inhibit splicing in higher eukaryotes, but rather increases 5' splice site recognition. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5112-5119.

- Gorbacheva,V.Y., Lindner,D., Sen,G.C., and Vestal,D.J. (2002). The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J. Biol. Chem.* **277**, 6080-6087.
- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74.
- Green,S.J., Crawford,R.M., Hockmeyer,J.T., Meltzer,M.S., and Nacy,C.A. (1990). Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* **145**, 4290-4297.
- Green,S.J., Nacy,C.A., and Meltzer,M.S. (1991). Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **50**, 93-103.
- Guenzi,E., Topolt,K., Cornali,E., Lubeseder-Martellato,C., Jorg,A., Matzen,K., Zietz,C., Kremmer,E., Nappi,F., Schwemmle,M., Hohenadl,C., Barillari,G., Tschachler,E., Monini,P., Ensoli,B., and Sturzl,M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* **20**, 5568-5577.
- Guenzi,E., Topolt,K., Lubeseder-Martellato,C., Jorg,A., Naschberger,E., Benelli,R., Albini,A., and Sturzl,M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* **22**, 3772-3782.
- Gupta,S.L., Rubin,B.Y., and Holmes,S.L. (1979). Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4817-4821.
- Hall,A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**, 635-640.
- Haller,O., Arnheiter,H., Gresser,I., and Lindenmann,J. (1979). Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J. Exp. Med.* **149**, 601-612.
- Haller,O., Frese,M., and Kochs,G. (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* **17**, 220-230.
- Haller,O. and Kochs,G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**, 710-717.
- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.
- Hefti,H.P., Frese,M., Landis,H., Di Paolo,C., Aguzzi,A., Haller,O., and Pavlovic,J. (1999). Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J. Virol.* **73**, 6984-6991.

- Heil,F., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Kirschning,C., Akira,S., Lipford,G., Wagner,H., and Bauer,S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529.
- Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745.
- Hilgenfeld,R. (1995). Regulatory GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 810-817.
- Imler,J.L. and Hoffmann,J.A. (2000). Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection. *Rev. Immunogenet.* **2**, 294-304.
- Inohara,N., Koseki,T., del Peso,L., Hu,Y., Yee,C., Chen,S., Carrio,R., Merino,J., Liu,D., Ni,J., and Nunez,G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* **274**, 14560-14567.
- James,P., Halladay,J., and Craig,E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216.
- Janeway,C.A., Jr., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M. (2005). Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th Edition. (New York and London: Garland Science), pp. 358-359.
- Kelly,A.P., Monaco,J.J., Cho,S.G., and Trowsdale,J. (1991). A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* **353**, 571-573.
- Kerr,I.M. and Stark,G.R. (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett.* **285**, 194-198.
- Klein,R., Smeyne,R.J., Wurst,W., Long,L.K., Auerbach,B.A., Joyner,A.L., and Barbacid,M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* **75**, 113-122.
- Knight E Jr and Korant,B.D. (1979). Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 1824-1827.
- Kochs,G. and Haller,O. (1999a). GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol. Chem.* **274**, 4370-4376.
- Kochs,G. and Haller,O. (1999b). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2082-2086.
- Konermann,C., Kresse,A., Beuter-Gunia,C., Wurthner,J., Degrandi,D., Pfeffer,K., and Beer,S. (2007). In Silico and In Vitro Characterization of mGBP4 Splice Variants. *DNA Cell Biol.*
- Kuhn,R., Rajewsky,K., and Muller,W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* **254**, 707-710.

- Levy,D.E., Kessler,D.S., Pine,R., and Darnell,J.E., Jr. (1989). Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev.* **3**, 1362-1371.
- Lew,D.J., Decker,T., Strehlow,I., and Darnell,J.E. (1991). Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol. Cell Biol.* **11**, 182-191.
- Lindenmann,J. (1964). Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**, 506-509.
- Lindenmann,J., Lane,C.A., and Hobson,D. (1963). The resistance of A2G mice to Myxoviruses. *J. Immunol.* **90**, 942-951.
- Lubeseder-Martellato,C., Guenzi,E., Jorg,A., Topolt,K., Naschberger,E., Kremmer,E., Zietz,C., Tschachler,E., Hutzler,P., Schwemmle,M., Matzen,K., Grimm,T., Ensoli,B., and Sturzl,M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am. J. Pathol.* **161**, 1749-1759.
- MacMicking,J., Xie,Q.W., and Nathan,C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323-350.
- MacMicking,J.D. (2005). Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 74-82.
- MacMicking,J.D., Taylor,G.A., and McKinney,J.D. (2003). Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* **302**, 654-659.
- Marie,I., Durbin,J.E., and Levy,D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* **17**, 6660-6669.
- Martens,S. and Howard,J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 559-589.
- Martens,S., Parvanova,I., Zerrahn,J., Griffiths,G., Schell,G., Reichmann,G., and Howard,J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS. Pathog.* **1**, e24.
- Matsuyama,T., Kimura,T., Kitagawa,M., Pfeffer,K., Kawakami,T., Watanabe,N., Kundig,T.M., Amakawa,R., Kishihara,K., Wakeham,A., and . (1993). Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* **75**, 83-97.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4-9.
- Meier,E., Kunz,G., Haller,O., and Arnheiter,H. (1990). Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J. Virol.* **64**, 6263-6269.

- Melo,E.J., Carvalho,T.M., and De Souza,W. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell* *25*, 53-59.
- Meurs,E., Chong,K., Galabru,J., Thomas,N.S., Kerr,I.M., Williams,B.R., and Hovanessian,A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* *62*, 379-390.
- Mirkovitch,J., Decker,T., and Darnell,J.E., Jr. (1992). Interferon induction of gene transcription analyzed by in vivo footprinting. *Mol. Cell Biol.* *12*, 1-9.
- Miyairi,I., Tatireddigari,V.R., Mahdi,O.S., Rose,L.A., Belland,R.J., Lu,L., Williams,R.W., and Byrne,G.I. (2007). The p47 GTPases Iigp2 and Irgb10 regulate innate immunity and inflammation to murine *Chlamydia psittaci* infection. *J. Immunol.* *179*, 1814-1824.
- Miyamoto,M., Fujita,T., Kimura,Y., Maruyama,M., Harada,H., Sudo,Y., Miyata,T., and Taniguchi,T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* *54*, 903-913.
- Modiano,N., Lu,Y.E., and Cresswell,P. (2005). Golgi targeting of human guanylate-binding protein-1 requires nucleotide binding, isoprenylation, and an IFN-gamma-inducible cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 8680-8685.
- Moss,J. and Vaughan,M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J. Biol. Chem.* *270*, 12327-12330.
- Naschberger,E., Werner,T., Vicente,A.B., Guenzi,E., Topolt,K., Leubert,R., Lubeseder-Martellato,C., Nelson,P.J., and Sturzl,M. (2004). Nuclear factor-kappaB motif and interferon-alpha-stimulated response element co-operate in the activation of guanylate-binding protein-1 expression by inflammatory cytokines in endothelial cells. *Biochem. J.* *379*, 409-420.
- Nathan,C. and Shiloh,M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 8841-8848.
- Neubauer,H., Cumano,A., Muller,M., Wu,H., Huffstadt,U., and Pfeffer,K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* *93*, 397-409.
- Neun,R., Richter,M.F., Staeheli,P., and Schwemmle,M. (1996). GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* *390*, 69-72.
- Nguyen,T.T., Hu,Y., Widney,D.P., Mar,R.A., and Smith,J.B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* *22*, 899-909.
- Ogura,Y., Inohara,N., Benito,A., Chen,F.F., Yamaoka,S., and Nunez,G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *276*, 4812-4818.
- Olszewski,M.A., Gray,J., and Vestal,D.J. (2006). In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J. Interferon Cytokine Res.* *26*, 328-352.

- Ozinsky,A., Underhill,D.M., Fontenot,J.D., Hajjar,A.M., Smith,K.D., Wilson,C.B., Schroeder,L., and Aderem,A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 13766-13771.
- Patrone,L., Damore,M.A., Lee,M.B., Malone,C.S., and Wall,R. (2002). Genes expressed during the IFN gamma-induced maturation of pre-B cells. *Mol. Immunol.* *38*, 597-606.
- Pavlovic,J., Zurcher,T., Haller,O., and Staeheli,P. (1990). Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.* *64*, 3370-3375.
- Pestka,S. (1997). The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Semin. Oncol.* *24*, S9.
- Pestka,S., Krause,C.D., and Walter,M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* *202*, 8-32.
- Pestka,S., Langer,J.A., Zoon,K.C., and Samuel,C.E. (1987). Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 727-777.
- Pfeffer,K., Matsuyama,T., Kundig,T.M., Wakeham,A., Kishihara,K., Shahinian,A., Wiegmann,K., Ohashi,P.S., Kronke,M., and Mak,T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* *73*, 457-467.
- Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffer,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., and Beutler,B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* *282*, 2085-2088.
- Praefcke,G.J., Geyer,M., Schwemmle,M., Robert,K.H., and Herrmann,C. (1999). Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J. Mol. Biol.* *292*, 321-332.
- Praefcke,G.J., Kloep,S., Benscheid,U., Lilie,H., Prakash,B., and Herrmann,C. (2004). Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* *344*, 257-269.
- Praefcke,G.J. and McMahon,H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133-147.
- Prakash,B., Praefcke,G.J., Renault,L., Wittinghofer,A., and Herrmann,C. (2000a). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* *403*, 567-571.
- Prakash,B., Renault,L., Praefcke,G.J., Herrmann,C., and Wittinghofer,A. (2000b). Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J.* *19*, 4555-4564.
- Prejean,C. and Colamonici,O.R. (2000). Role of the cytoplasmic domains of the type I interferon receptor subunits in signaling. *Semin. Cancer Biol.* *10*, 83-92.

- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**, 261-267.
- Reichelt, M., Stertz, S., Krijnse-Locker, J., Haller, O., and Kochs, G. (2004). Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic* **5**, 772-784.
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., and Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 2333-2337.
- Schnorr, J.J., Schneider-Schaulies, S., Simon-Jodicke, A., Pavlovic, J., Horisberger, M.A., and ter, M., V (1993). MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J. Virol.* **67**, 4760-4768.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163-189.
- Schwemmle, M. and Staeheli, P. (1994). The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J. Biol. Chem.* **269**, 11299-11305.
- Sever, S., Muhlberg, A.B., and Schmid, S.L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.
- Song, B.D. and Schmid, S.L. (2003). A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* **42**, 1369-1376.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., and Weissmann, C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* **44**, 147-158.
- Staeheli, P., Prochazka, M., Steigmeier, P.A., and Haller, O. (1984). Genetic control of interferon action: mouse strain distribution and inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology* **137**, 135-142.
- Sternberg, N. and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**, 467-486.
- Stickney, J.T. and Buss, J.E. (2000). Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2191-2200.
- Strunk, R.C., Cole, F.S., Perlmutter, D.H., and Colten, H.R. (1985). gamma-Interferon increases expression of class III complement genes C2 and factor B in human monocytes and in murine fibroblasts transfected with human C2 and factor B genes. *J. Biol. Chem.* **260**, 15280-15285.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208.

- Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 335-376.
- Taylor,G.A., Collazo,C.M., Yap,G.S., Nguyen,K., Gregorio,T.A., Taylor,L.S., Eagleson,B., Secret,L., Southon,E.A., Reid,S.W., Tessarollo,L., Bray,M., McVicar,D.W., Komschlies,K.L., Young,H.A., Biron,C.A., Sher,A., and Vande Woude,G.F. (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 751-755.
- Taylor,G.A., Feng,C.G., and Sher,A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 100-109.
- Taylor,S., Barragan,A., Su,C., Fux,B., Fentress,S.J., Tang,K., Beatty,W.L., Hajj,H.E., Jerome,M., Behnke,M.S., White,M., Wootton,J.C., and Sibley,L.D. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* *314*, 1776-1780.
- Torres,R.M., and Kühn,R. (1997). Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press.
- Trinchieri,G. and Sher,A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 179-190.
- Tuma,P.L. and Collins,C.A. (1994). Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* *269*, 30842-30847.
- Uthaiiah,R.C., Praefcke,G.J., Howard,J.C., and Herrmann,C. (2003). IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J. Biol. Chem.* *278*, 29336-29343.
- Vestal,D.J., Buss,J.E., McKercher,S.R., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Kelner,G.S., Asundi,V.K., and Maki,R.A. (1998). Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* *18*, 977-985.
- Vestal,D.J., Gorbacheva,V.Y., and Sen,G.C. (2000). Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J. Interferon Cytokine Res.* *20*, 991-1000.
- Vetter,I.R. and Wittinghofer,A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* *294*, 1299-1304.
- Wei,X.Q., Charles,I.G., Smith,A., Ure,J., Feng,G.J., Huang,F.P., Xu,D., Muller,W., Moncada,S., and Liew,F.Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* *375*, 408-411.
- Wynn,T.A., Nicolet,C.M., and Paulnock,D.M. (1991). Identification and characterization of a new gene family induced during macrophage activation. *J. Immunol.* *147*, 4384-4392.
- Yarovinsky,F., Zhang,D., Andersen,J.F., Bannenberg,G.L., Serhan,C.N., Hayden,M.S., Hieny,S., Sutterwala,F.S., Flavell,R.A., Ghosh,S., and Sher,A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.
- Zerial,M. and McBride,H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 107-117.

Zerrahn,J., Schaible,U.E., Brinkmann,V., Gühlich,U., and Kaufmann,S.H. (2002). The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum- associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J. Immunol.* *168*, 3428-3436.

Zhang,H.M., Yuan,J., Cheung,P., Luo,H., Yanagawa,B., Chau,D., Stephan-Tozy,N., Wong,B.W., Zhang,J., Wilson,J.E., McManus,B.M., and Yang,D. (2003). Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J. Biol. Chem.* *278*, 33011-33019.

Zurcher,T., Pavlovic,J., and Staeheli,P. (1992a). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.* *11*, 1657-1661.

Zurcher,T., Pavlovic,J., and Staeheli,P. (1992b). Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* *187*, 796-800.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Überlassung des interessanten Themas und die wissenschaftlichen Diskussionen und Freiräume während der gesamten Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. J. Hegemann für die Übernahme der Betreuung und der guten Zusammenarbeit in Hinblick auf GTPasen und Chlamydien.

Vielen Dank an Dr. Sandra Beer für die Anleitung, stete Betreuung, Infektionen, „paper“ Schreiben, Korrekturlesen, eine nette Arbeitsgruppe und vieles mehr.

Vielen Dank an Conny Beuter-Gunia und Daniel Degrandi für die Bereitstellung von cDNA Proben und vor allem für die produktive Zusammenarbeit.

PD Dr. Gaby Reichmann möchte ich besonders für die Hilfe bei den Toxoplasmenexperimenten danken.

Bei Mirko Trilling bedanke ich mich für die exzellente Zusammenarbeit und die vielen anregenden Diskussionen.

Danke auch an Karin Buchholz für unzählige Southern Blots und gemeinsame Targetingexperimente und Nicole Krafzik für die Blastozysteninjektionen.

Dankeschön an die AG Beer, AG Pfeffer, AG Scheu und die Virologen für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima.

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern, meine Schwester, Florian und besonders an Alf für die großartige Unterstützung und unersetzliche Fürsprache.

Anhang: Alignment der Proteinsequenzen von mGBP1 bis mGBP5

Das Alignment der GTPasen wurde mit der ClustalW Software und das Layout mit der JalView Software durchgeführt. Aminosäuren die in allen dargestellten GTPasen identisch sind wurden in dunkelblau, Identitäten von $\geq 75\%$ in mittelblau und eine Identität $\geq 50\%$ in hellblau dargestellt.

mGBP1	115	QKGFSLGSTVQSHTKGIWMWCMPH-----PEKPEHTLVLLDTEGLKDMQKGDNDQNCWI
mGBP2	115	RTGFSLGSTVQSHTKGIWMWCVPH-----PKKAGQTLVLLDTEGLEDEKGDNDQNCWI
mGBP3	109	NHGFSLGSTVQSETKGIWMWCVPH-----PTKPTHVLVLLDTEGLGDVEKGDPKNDWSI
mGBP4.1	121	NHVSGLPTSQRFPSGLHRAVSDQGHLDVVHAPPHQARALVLLDTEGLGDVEKGDPKNDLWI
mGBP5	115	EKGFSVGSTVQSHTKGIWMWCVPH-----PQKPDHTLVLLDTEGLGDVEKDDKKNDTQI
mGBP5a	63	EK-----
mGBP1	116	FALAVLLSSTFIYNSIGTINQQAMDQLHYVTELTDLIKSKSSPDQSDVD-NSANFVGFFPI
mGBP2	116	FALAVLLSSTFIYNSIGTINQQAMDQLHYVTELTDLIKSKSSPDQSGVD-DSANFVGFFPT
mGBP3	110	FALAVLLSSTFVYNSMSTINQQALEQLHFVTELTQLIRAKSSPREDKVK-DSSEFVGFFPD
mGBP4.1	122	FALSULLSSTFVYNSMNTINHQALEQLHYVTELTDLIRAKSSPNPHGIK-NSTEFVSFFPD
mGBP5	116	FALAILLSSTFVYNTMNKIDQGAIDLHNVTETDLRLTRNSSDSNQTEGEGPADMSFFPD
mGBP5a	64	-----D
mGBP1	237	FVWTLRDFSLDLEFDGESITPDEYLETSLALRKGTIDENTKKFNMPRLCIRKFFPKRKCFIFD
mGBP2	237	FVWTLRDFSLDELEVNGKPVTSDEYLEHSLTLKKGADKKTKSFNEPRLCIRKFFPKRKCFIFD
mGBP3	231	FIWAVRDFALELKLNGRPIIDEYLENALKLIGQDNLKVQSSNMTRCIRYFFPVRKCFVFD
mGBP4.1	243	FVWTVRDFMLELKLNGEDITSDEYLENALKLIPGNPNRIQASNSARECIRRFPPNRKCFVFE
mGBP5	238	LVWTLRDFFLDLQANGHAITSDEYLENSLKLKQGSDERTQTENLRLCIQKFFPVRKCFVFD
mGBP5a	126	LVWTLRDFFLDLQANGHAITSDEYLENSLKLKQGSDERTQTENLRLCIQKFFPVRKCFVFD
mGBP1	238	RFG-DRKQLSKLEWIQEDQLNKEFVEQVAEFTSYIFSYSGVKTLGGITVNGPRLKSLVQT
mGBP2	238	RPA-QRKQLSKLETLREEELCGEFVEQVAEFTSYILSYSSVKTLGGIIVNGPRLKSLVQT
mGBP3	232	RFTSDKRLLLQIENVPENQLERNFQVESEKFCSYIFTNGKTTLRGGVIVTGNRLGLTVQT
mGBP4.1	244	WPTHDIELIKQLETISEDQLDPTFKESAMAFASYIFTYAKIKTLREGIKVTGNGLGLTVTT
mGBP5	239	APALG-SKLSQLPTLSNEELNSDFVQDLSEFCSHIFTQSKTKTLPGGIQVNGPRLKSLVLT
mGBP5a	127	APALG-SKLSQLPTLSNEELNSDFVQDLSEFCSHIFTQSKTKTLPGGIQVNGPRLKSLVLT
mGBP1	359	YVSAICSGELPCMENAVLTLAQIENSAAVQKAIITYEEQMNQKIHMPTETLQELLDLHRTCE
mGBP2	359	YVGAISNGSLPCMESAVLTLAQIENSAAVQKAIITYEEQMNQKIHMPTETLQELLDLHRTCE
mGBP3	354	YVNAISNGSTVPCLENVTTLAQRENSIAYQKAADHYSEQMAQRMLPTDTLQELLTVHAACE
mGBP4.1	366	YVDAISNGAVPCLDDAVTTLAQRENSVAVQKAASHYSEQMAQRSLPTDTIQELLDVHAACE
mGBP5	360	YVDAISNGALPSIENTVVTLARRENSAAVQKAIHYDQMLSEKVLPTETLQELLDLHRTCE
mGBP5a	248	YVDAISNGALPSIENTVVTLARRENSAAVQKAIHYDQMLSEKVLPTETLQELLDLHRTCE
mGBP1	360	REAIEVFMKNSFKDQVQKFEELGAQLEAKRDAFVKKNDMSSAHCSDDLLEGLFAHLEEEV
mGBP2	360	SEAIEVFLKNSFKDQVQKFEELGNLLVAKRDAFIKKNDVSSARCSDDLLEDFGPLEEEV
mGBP3	355	KEAIAVFMHSFKDDEQEFQKKLVVTIEERKEEFIRQNEAASIRHQCAELERLSEGLRKS
mGBP4.1	367	KEAMAVFMHSFKDENQQLKKLVELLREKNGLELLKNEEASDKYQCEELDRLSKDLMDNI
mGBP5	361	REAIEIRKHSFKDEGEFFQKELESLLSAQDEICKKNADASAALCSTLLGSIFKPLEQEV
mGBP5a	249	REAIEIRKHSFKDEGEFFQKELESLLSAQDEICKKNADASAALCSTLLGSIFKPLEQEV
mGBP1	482	KQGTFFKPGGYYLFLQRKQELEKKYIQTPGKGLQAEVMLRKVFESKEDLADTLKMDQSLTE
mGBP2	482	KLGTFSKPGGYYLFLQMRQELEKKYNQAPGKGLQAEAMLKNYFDSKADVVETLLQTDQSLTE
mGBP3	477	SCGAFSYPGGHSLYLEARKKIELGYQQVLRKGVKAEVLKSFLQSQAIMEDSILQSDKALTD
mGBP4.1	487	ST--FSVPGGHRLYMDMREKIEHDYQWVPRKGVKASEVFQNFQSQAIIESSILQADTALTA
mGBP5	483	AQEFYHKPGGHKFLQRMEQLKANYRQPGKGTQAEVLQTYLNAKETVSRTILQTDQVLT
mGBP5a	371	AQEFYHKPGGHKFLQRMEQLKANYRQPGKGTQAEVLQTYLNAKETVSRTILQTDQVLT
mGBP1	483	KEKQIEMERIKAEAAEAANRLAEKQKKHEMLEQKEQSYQEHMKQLTEKMEQERKELMAE
mGBP2	483	AAKEVEEERTKAEAAEAANRLAEKQKEFELMMQKKEKSYQEHVKKLTETKMEQERKQLLAE
mGBP3	478	GERAIAAERTKKEVAEKELRLRQRKEQEQVMEAQERSFRENIAKLQEKMESEKEMLLRE
mGBP4.1	488	GQKAAIEKHTKKEAAEKEDLRLRQKQKEHQEYMAAQEKRNKENLEQLRRKLEQEREQLIKD
mGBP5	484	KEIQKKAQERAAEARLKAQRLAARIQEEQRKAEMERQHQEQLR---QIALEKARVAQE
mGBP5a	372	KEIQSKAEQERAAEARLKAQRLAARIQEEQRKAEMERQHQEQLR---QIALEKARVAQE
mGBP1	578	QQRILSLKLEQE-----RLLKQGFQNESLQRQIEKIK-----
mGBP2	578	QENIIAAKLREQE-----KFLKEGFENESKLLIREIDTLK-----
mGBP3	573	QEKMLEHKLKVQE-----ELLIEGFREKSDMLKNEISHLR-----
mGBP4.1	583	HNMMLEKLTKEQK-----TFREEGYKTAEEELRREIHQLG-----
mGBP5	574	QQWILKQRAQEEA-----DRIKAEQEAQLRALQQQLQHM-----
mGBP5a	490	QQWILKQRAQGRCPVWCLDLLAEDEGPKQDLQSKLCCFGQEGGRLSGAEDGAASEALWIS
mGBP1	579	-----NMP-----
mGBP2	579	-----QNK-----
mGBP3	574	-----EEMERTRRK-PSLFGQILDITIGNA-----
mGBP4.1	584	-----HNIKEMKQNGDSLVSILRSWFS-----
mGBP5	575	-----REMNHRR-----
mGBP5a	491	PPPETAGLCIPHCHPSNLPVSVESRSQGSRRRLRHKPLRPGGPLCTHQEGARLSGAEDGTA
mGBP1	589	-----PPRSCTIL-----
mGBP2	589	-----SSGKCTIL-----
mGBP3	620	-----FIMILPGAGKLFVGVLKFLGSLSS-----
mGBP4.1	631	-----FISPPSESKAISSVLSLLRKKDRL-----
mGBP5	590	-----HHHDCVIS-----
mGBP5a	612	SEALWLSPVLETVGLFIPHHPCSLPSDTSRSEGGSSRRRLRQKPLGLVDPICALTRKVAGCL-