

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Wagner, Ph.D. (Melbourne)

**Analyse von Interferon g induzierten Genen in Makrophagen:
Klonierung und Charakterisierung von PUMA-G und
Inaktivierung des Gens in der Maus**

Annette Constanze Schaub

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
3. Univ.-Prof. Dr. K. Pfeffer

Die Dissertation wurde am 19.12.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 29.3.2001 angenommen.

Für meine lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I-V
Abbildungsverzeichnis	VII-VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Infektionsabwehr gegen Listerien.....	1
1.2 Interferon γ	2
1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	5
1.3.1 Struktur.....	5
1.3.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung	6
1.3.3 Signalweiterleitung über G-Proteine	7
1.4 Möglichkeiten zur Klonierung und Identifizierung differentiell exprimierter Gene	8
1.4.1 PCR-Select	8
1.4.2 Weitere Möglichkeiten zur Analyse differentiell exprimierter Gene	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Bezugsquellennachweis	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Radiochemikalien.....	14
2.2 Enzyme	14
2.2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial.....	15
2.2.2 Geräte	15

2.3	Medien und Puffer.....	16
2.3.1	Stammlösungen und Puffer.....	16
2.3.2	Medien für die Bakterienkultur	19
2.3.3	Medien für die Zellkultur.....	20
2.4	Hemm- und Zusatzstoffe.....	20
2.4.1	Antibiotika	20
2.4.2	X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid).....	21
2.4.3	IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)	21
2.5	Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere	21
2.5.1	Bakterienstämme	21
2.5.2	Zellen und Zelllinien.....	22
2.5.3	Versuchstiere	22
2.6	Primer und Antikörper	23
2.7	Plasmidvektoren.....	25
2.7.1	Ausgangsvektoren.....	25
2.7.2	Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide	26
2.8	Zellbiologische Methoden.....	26
2.8.1	Kultivierung von Makrophagenzelllinien und 293T-Zellen.....	26
	Zellkultur	26
	Transfektion von 293T-Zellen mit CaPO ₄	27
	Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation	27
2.8.2	Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten	28
	Zellkultur von ES/EF Zellen	28
	Elektroporation von ES-Zellen.....	28
	Selektion rekombinanter ES-Zellklone	28
	Einfrieren von ES-Zellen.....	29
2.9	Tierversuche	29
2.9.1	Superovulation.....	29
2.9.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	30
2.9.3	Generierung chimärer Mäuse	30
2.9.4	Organentnahme.....	30
2.9.5	Infektion mit Listerien	30

2.10	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	31
2.10.1	Isolierung von Plasmid-DNS	31
	Alkalische Lyse.....	31
	Qiagen Kits	31
2.10.2	Isolierung von chromosomaler DNS.....	32
2.10.3	Agarosegelelektrophorese	32
	Analytische Agarosegelelektrophorese.....	32
	Präparative Agarosegelelektrophorese.....	33
	Bestimmung von Fragmentgrößen.....	33
2.10.4	Enzymatische Behandlung von DNS	34
	Restriktionsverdau	34
	Klenowbehandlung von DNS	34
	Dephosphorylierung von DNS.....	34
2.10.5	Ligation von DNS-Molekülen.....	35
2.10.6	Transformation von <i>E.coli</i> Bakterien	35
2.10.7	Southernblot Analyse	36
	Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen	36
	Radioaktive Markierung der Sonde	37
	DNS/DNS Hybridisierung	37
2.10.8	Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR.....	37
2.10.9	Sequenzanalyse	38
	Sequenziergel	39
2.10.10	Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe	40
2.10.11	Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Zellen.....	42
2.10.12	Elektrophoretische Auftrennung von RNS	42
2.10.13	Northernblot Analyse	43
	Transfer von RNS auf Nylonmembranen	43
	Nicht-radioaktive RNS/DNS Hybridisierung	44
	Radioaktive RNS/DNS Hybridisierung	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	PCR-Select Screen.....	45
3.1.1	Durchführung des PCR-Select	45
3.1.2	Ergebnis des PCR-Select Screens	45
3.2	Neue Mitglieder der 47 kDa und 65 kDa GTPasen Familie.....	46
3.2.1	Identifizierung von neuen Mitgliedern der 47 kDa und 65 kDa GTPasen Familien	46
3.2.2	Expression von mGBP-2 und IIGP in ANA-1 und EF	47
3.2.3	Expression von mGBP-2 und IIGP nach Listerieninfektion.....	47

3.3	Charakterisierung der PUMA-G cDNS.....	48
3.3.1	Durchführung eines modifizierten PCR-Select Screens.....	48
3.3.2	Volle Länge Klonierung der PUMA-G cDNS.....	49
3.3.3	Charakterisierung der PUMA-G cDNS und Proteinsequenz.....	49
3.3.4	Homologien von PUMA-G zu anderen Rezeptoren der GPCR-Superfamilie.....	52
3.4	Expressionsanalyse von PUMA-G.....	54
3.4.1	Kinetik der PUMA-G Expression in ANA-1 Makrophagen	54
3.4.2	Expression von PUMA-G in Typ I Interferon stimulierten ANA-1 Makrophagen	55
3.4.3	PUMA-G Expression in verschiedenen Makrophagen Zelllinien nach IFN γ Stimulierung.....	56
3.4.4	PUMA-G Expression in primären Zellen	57
3.4.5	Expression von PUMA-G in murinen Geweben	58
3.4.6	PUMA-G Expression in Mäusen nach Infektion.....	59
3.5	Subzelluläre Lokalisation von PUMA-G	60
3.6	Charakterisierung des PUMA-G genomischen Lokus	63
3.6.1	Klonierung des genomischen PUMA-G Lokus in der Maus.....	63
3.6.2	Untersuchung und Kartierung des murinen PUMA-G Genlokus.....	64
3.6.3	Chromosomale Lokalisation von PUMA-G	65
3.7	Die Generierung einer PUMA-G defizienten Mausmutante durch "knock-in" eines Reportergens	66
3.7.1	Klonierung des PUMA-G Rekombinationsvektors	66
	Klonierungsstrategie.....	66
	β -Galaktosidase Kasette.....	67
	Neomycin Kasette.....	68
	Thymidinkinase (TK) Kasette.....	68
3.7.2	Generierung von PUMA-G defizienten embryonalen Stammzellen	68
	Erzeugung von PUMA-G ^{-/-} Stammzellen durch homologe Rekombination	68
	Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellen durch eine "Screening PCR"	68
	Southernblot Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen	69
3.7.3	Generierung einer PUMA-G defizienten Mausmutante	70

3.8	Charakterisierung des Klons AS 329.....	72
3.8.1	Kinetik der AS 329 Expression in ANA-1 Makrophagen.....	72
3.8.2	AS 329 Expression in Typ I Interferon stimulierten ANA-1 Makrophagen.....	73
3.8.3	AS 329 Expression in verschiedenen Makrophagen Zelllinien nach IFN γ Stimulierung	74
3.8.4	Expression von AS 329 in murinen Geweben	74
4	DISKUSSION	77
4.1	Isolierung von differentiell exprimierten Genen in Makrophagen mittels PCR-Select.....	77
4.2	Die GTPasen der 47 kDa und der 65 kDa Familien	79
4.3	PUMA-G ist ein neues Mitglied der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren	81
4.4	Analyse des genomischen Lokus von PUMA-G.....	83
4.5	PUMA-G Expression <i>in vitro</i>	84
4.6	PUMA-G Expression <i>in vivo</i>	85
4.7	Generierung einer PUMA-G defizienten Mauslinie.....	87
4.8	Das PCR-Select Fragment AS 329	87
4.9	Ausblick.....	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
6	LITERATURVERZEICHNIS	91
	Danksagung.....	103
	Anhang 1: Nukleotidsequenz des genomischen Lokus von PUMA-G.....	105
	Anhang 2: Nukleotidsequenz des PCR-Select Fragments AS 329.....	110

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der IFN γ Signaltransduktion	3
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der Signalweiterleitung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren.....	7
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der PCR-Select Technik (CLONTECH).....	9
Abb. 3.1:	Expression von mGBP-2 und IIGP in unstimulierten und IFN γ stimulierten EF und ANA-1 Zellen.....	47
Abb. 3.2:	Expression von mGBP-2 und IIGP in der Leber von Mäusen nach Listerieninfektion.....	48
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung der "nested" RACE-PCR Reaktion	49
Abb. 3.4:	Nukleotid und Aminosäuresequenz von PUMA-G	50
Abb. 3.5:	Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Transmembrandomänen bei PUMA-G.....	51
Abb. 3.6:	Homologievergleich der Proteine PUMA-G und HM74.....	53
Abb. 3.7:	Kinetik der PUMA-G Genexpression nach Stimulierung von ANA-1 Makrophagen mit TNF α und IFN γ	55
Abb. 3.8:	Induktion von PUMA-G in ANA-1 durch IFN γ , jedoch nicht durch IFN α/β	56
Abb. 3.9:	Expressionsanalyse von PUMA-G in verschiedenen murinen Makrophagen Zelllinien nach Stimulierung mit TNF α und IFN γ	56
Abb. 3.10:	Expressionsanalyse von PUMA-G in primären Makrophagen (PEC) und primären embryonalen Fibroblasten (EF).....	57
Abb. 3.11:	Expressionsanalyse von PUMA-G in unreifen und reifen dendritischen Zellen (DC).....	58
Abb. 3.12:	Gewebeverteilung von PUMA-G	58
Abb. 3.13:	PUMA-G Expression in Milz und Leber nach Infektion.....	60
Abb. 3.14:	Subzelluläre Lokalisation von PUMA-G-EGFP und PUMA-G-FLAG in 264.7 RAW Makrophagen und 293T Zellen	61
Abb. 3.15:	Southernblot Hybridisierung von BAC-Klon 380F15/22369 mit der PUMA-G spezifischen Sonde AS 333 (X/H)	63
Abb. 3.16:	Schematische Restriktionskarte des 7,1 kb großen Fragments des genomischen PUMA-G Lokus.....	64

Abb. 3.17: Genomischer Southernblot von E14.1 DNS nach Hybridisierung mit AS 333 (X/H)	65
Abb. 3.18: Chromosomale Lokalisation von PUMA-G. Murine Metaphase Chromosome wurden mit dUTP markierter PUMA-G DNS hybridisiert.....	66
Abb. 3.19: Inaktivierung des PUMA-G Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus	67
Abb. 3.20: Genomische Southernblotanalyse homolog rekombinierter ES-Zell Klone.....	70
Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Generierung von Mäusen aus ES-Zellen durch Blastozysteninjektion	71
Abb. 3.22: Kinetik der Expression von AS 329 in ANA-1 Makrophagen nach Stimulierung mit TNF α und IFN γ	73
Abb. 3.23: AS 329 Expression in Typ I Interferon stimulierten ANA-1 Makrophagen.....	73
Abb. 3.24: AS 329 Expression in verschiedenen Makrophagen Zelllinien nach TNF α und IFN γ Stimulierung	74
Abb. 3.25: Gewebeverteilung von AS 329	75
Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum von ausgewählten GTPasen.....	80
Abb. 4.2: Schematische Darstellung von PUMA-G	81

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1:	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	20
Tabelle 2.2:	Verwendete Antibiotika.....	20
Tabelle 2.3:	Verwendete Bakterienstämme	22
Tabelle 2.4:	Verwendete Zellen und Zelllinien	22
Tabelle 2.5:	Primer zur Durchführung der RACE-PCR.....	23
Tabelle 2.6:	Sequenzierprimer	23
Tabelle 2.7:	Screening PCR-Primer	23
Tabelle 2.8:	Zusätzliche Primer	24
Tabelle 2.9:	Primer zur Genotypisierung PUMA-G defizienter Mäuse	25
Tabelle 2.10:	Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren	25
Tabelle 2.11:	Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide und Sonden	26
Tabelle 2.12:	Standard PCR-Bedingungen.....	38
Tabelle 3.1:	Ergebnis der Sequenzanalyse von 70 PCR-Select Fragmenten.....	46
Tabelle 3.2:	Zuordnung der 18 GTPasen zur 47 kDa oder 65 kDa Familie.....	46
Tabelle 3.3:	Prozentuale Aminosäureidentität verschiedener muriner GPCRs.....	54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
bp	Basenpaar(e)
BAC	bacterial artificial chromosome
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zelle	embryonale Fibroblasten
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
h	Stunde(n)
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
HSV-TK	Thymidinkinase aus Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
i.p	<i>intraperitoneal</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
mRNS	Boten-RNS
neo	Neomycin Phosphotransferase
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSG	<i>pregnant mare serum gonadotropin</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SPF	Spezifisch pathogen frei
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat-Lösung
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute

1 EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution hat das Immunsystem hochspezifische und komplexe Mechanismen entwickelt, um den Organismus vor einer Vielzahl von Pathogenen und Tumoren zu schützen. Während einer Infektion ist die Koordination der zellulären und löslichen Komponenten des Immunsystems eine Grundvoraussetzung für die Etablierung einer adäquaten Immunantwort. Für eine effektive Infektionsabwehr ist das Zytokin Interferon γ (IFN γ) von zentraler Bedeutung. Neben einer Vielzahl von immunmodulatorischen Aufgaben besitzt es eine bedeutende Funktion in der Aktivierung von Makrophagen, die durch die Bereitstellung antimikrobieller und antiviraler Mechanismen wesentlich zur Eliminierung von Pathogenen beitragen. Die molekularen Veränderungen, die IFN γ in Makrophagen bewirkt, beinhalten die Hochregulation einer spezifischen Gruppe von Genen, die Körperzellen und insbesondere Makrophagen in erhöhte Abwehrbereitschaft versetzen. Es ist daher von besonderem Interesse, weitere bislang unbekannte IFN γ induzierbare Gene in Makrophagen zu identifizieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse und Klonierung von IFN γ induzierbaren Genen in Makrophagen. Eines dieser Gene, PUMA-G (**p**rotein **u**prelulated in **ma**-crophages by **IFN** γ), stellt ein neu kloniertes Mitglied der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar, das im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurde.

1.1 Infektionsabwehr gegen Listerien

Listerien sind gram-positive fakultativ intrazelluläre Bakterien, die über kontaminierte Lebensmittel wie z.B. Kohl, nicht pasteurisierte Milch oder Käse aufgenommen werden können. Eine Infektion von gesunden Menschen mit *Listeria monocytogenes* verläuft in der Regel inapparent. Für Immunsupprimierte, Schwangere oder ältere Menschen kann eine Infektion mit diesem fakultativ pathogenen Krankheitserreger jedoch das klinische Krankheitsbild der Sepsis hervorrufen. Das Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* in der Maus eignet sich besonders gut, um die immunologischen Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Bakterien zu charakterisieren. In der frühen Phase der Immunabwehr gegen Listerien ist es von entscheidender Bedeutung, daß durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems bereits ein Großteil der Bakterien abgewehrt wird. Zur endgültigen Eliminierung werden jedoch die antigenspezifischen T- und B-Zellen, die Bestandteil der adaptiven Immunantwort sind, benötigt (Edelson und Unanue, 2000; Unanue, 1997).

Listerien sind in der Lage, Phagozyten, Epithelzellen und mesenchymale Zellen zu infizieren. Von den Makrophagen werden die Listerien über Phagozytose aufgenommen, wobei die Bakterien sehr schnell durch das Poren-bildende Listeriolysin dem Phagosom entkommen und sich so im Zytoplasma der Zellen vermehren können. Die Interaktion zwischen Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist in der frühen Abwehrphase besonders wichtig.

Die Aktivierung von NK-Zellen durch die Zytokine TNF α und IL-12, die von infizierten Makrophagen produziert werden, regen diese zur Produktion von IFN γ an. Die Stimulierung mit TNF α und IFN γ führt zur vollen Aktivierung der Makrophagen und zur Etablierung antimikrobieller Effektorsysteme (Edelson und Unanue, 2000). Die antimikrobiellen reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffintermediate können hier eingeordnet werden. Die Inaktivierung der Zytokinrezeptoren TNFRp55 und IFN γ R in der Maus zeigte, daß diese Tiere nicht mehr in der Lage sind, eine Listerieninfektion zu überleben (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993; Huang et al., 1993). Mäuse mit Inaktivierungen von Komponenten, die zur Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffintermediate essentiell sind, weisen dagegen überraschenderweise im Vergleich zu IFN γ R defizienten Tieren nur eine geringfügigere Beeinträchtigung der Infektionsabwehr auf (MacMicking et al., 1995; Endres et al., 1997; Fehr et al., 1997; Shiloh et al., 1999). Neben den NK-Zellen und Makrophagen spielen auch die neutrophilen Granulozyten bei der frühen Abwehr gegen Listerien eine entscheidende Rolle (Czuprynski et al., 1994; Conlan und North, 1994). Während der Infektion wandern die Granulozyten in Gewebe wie z.B. die Leber ein, wo sie apoptierende infizierte Hepatozyten und freigewordene Listerien beseitigen. Eine entgültige Eliminierung der Listerien ist ein T-Zell abhängiger Prozeß. Dies haben Studien an SCID-Mäusen (severe combined immunodeficient), die weder T- noch B-Zellen besitzen, nach Listerieninfektion belegt. Die SCID Mäuse können zwar die Mehrheit der Listerien abwehren, dennoch werden sie chronische Träger der Listerien (Bancroft et al., 1991).

1.2 Interferon γ

Die Interferone sind eine Gruppe von Zytokinen, die bei der Etablierung einer effektiven Infektionsabwehr eine wesentliche Funktion ausüben. Sie wurden ursprünglich vor mehr als 30 Jahren als antivirale Substanzen beschrieben (Bogdan, 2000; Boehm et al., 1997). Durch intensive Forschungsarbeiten in den letzten Jahrzehnten wurde offenbar, daß Interferone zudem weitreichende Bedeutung bei der Abwehr von Bakterien, Protozoen und auch von Tumoren besitzen und daß ihnen wichtige immunregulatorische Funktionen zukommen. Die Interferone können in Typ I Interferone (IFN α , IFN β , IFN δ , IFN ω , IFN τ) und Typ II Interferone (IFN γ) unterteilt werden.

Interferon γ wurde ursprünglich als antivirale Substanz im Zellüberstand von Phytohämagglutinin stimulierten Leukozyten entdeckt (Wheelock, 1965). Es wird hauptsächlich von aktivierten NK-Zellen, T_H1 Zellen, und zytotoxischen T-Zellen produziert (Boehm et al., 1997). T-Zellen werden nach Aktivierung über den T-Zell Rezeptor zur IFN γ Produktion angeregt (Ullman et al., 1990). Die IFN γ Produktion von NK-Zellen wird durch die inflammatorischen Makrophagenzytokine TNF α und IL-12 stimuliert (Boehm et al., 1997). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß auch Makrophagen (Munder et al., 1998), B-Zellen (Yoshimoto et al., 1997) und CD8 α + dendritische Zellen (Ohteki et al., 1999) nach Aktivierung IFN γ produ-

zieren können. Das biologisch aktive IFN γ ist ein nicht-kovalent verknüpftes 34 kDa Homodimer.

Die biologische Wirkung von IFN γ wird durch Bindung an den spezifischen Rezeptor (IFN γ R) vermittelt (Abb. 1.1). Der Interferon γ Rezeptor ist ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Die Entschlüsselung der Interferon Signalübertragung führte zur Entdeckung des JAK-STAT Signalweges (Darnell, Jr. et al., 1994; Schindler und Darnell, Jr., 1995).

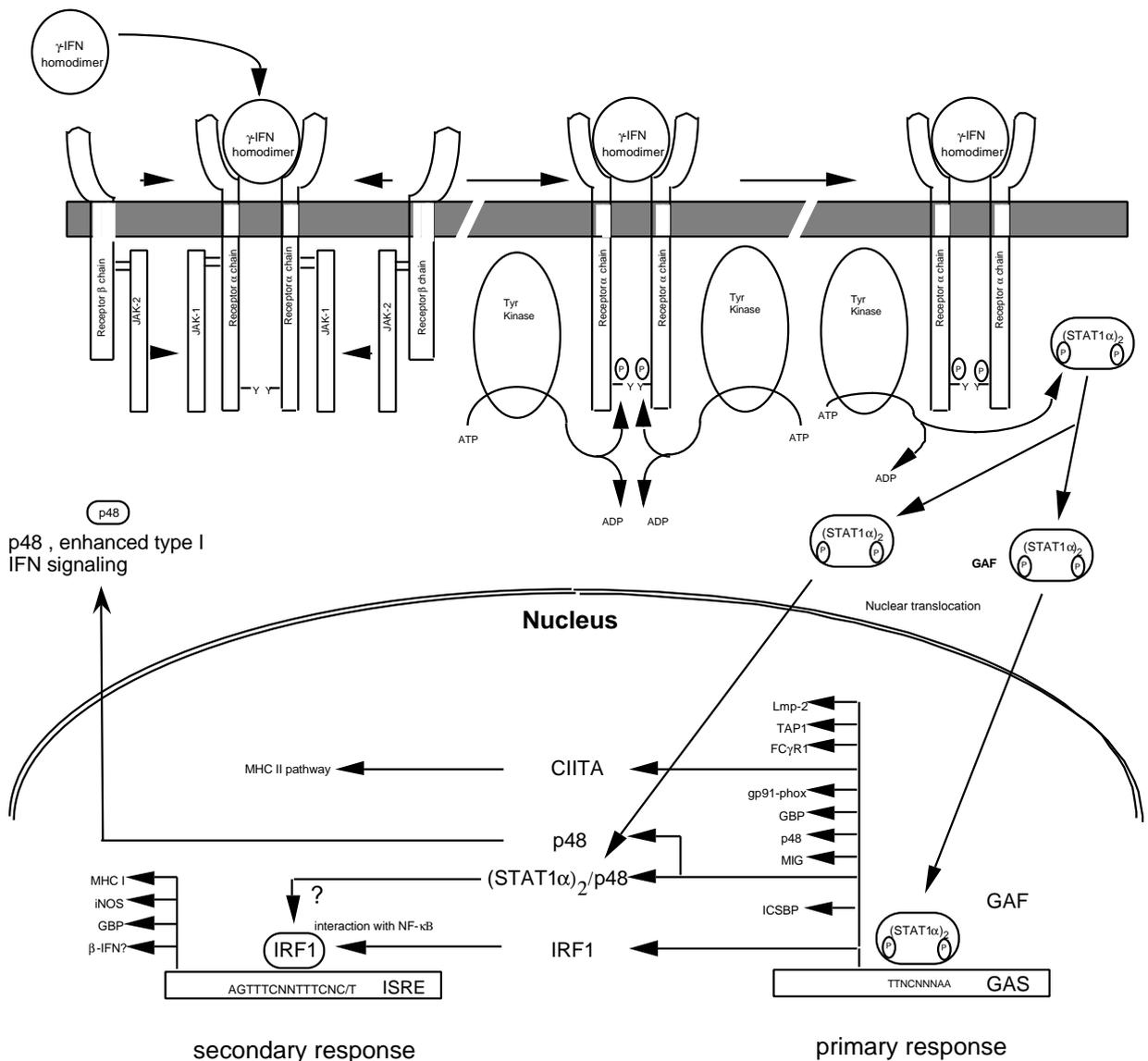


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der IFN γ Signaltransduktion. Abbildung aus Boehm et al., 1997.

Das IFN γ Homodimer bindet zuerst an die beiden IFN γ Rezeptor α Ketten (IFNGR1), die konstitutiv mit den Janus Kinasen 1 (JAK 1) assoziiert sind. Dann findet eine Heterodimerisierung mit den IFN γ Rezeptor β Ketten (IFNGR2) statt, die konstitutiv JAK 2 gebunden haben (Pestka, 1997). Dadurch gelangen die JAKs in räumliche Nähe zueinander, so daß sie durch Auto- und Transphosphorylierung aktiviert werden und anschließend die Phosphorylierung der IFN γ Rezeptor α Kette bewirken. An diese phosphorylierten Bindungsstellen können die STAT 1 α Moleküle (signal transducer and activator of transcription 1) binden, die ihrerseits von den JAKs phosphoryliert werden. Die phosphorylierten STAT 1 α Homodimere lösen sich vom Rezeptorkomplex ab und wandern in den Zellkern, wo sie durch die Bindung an GAS-Sequenzen (gamma activated site) im Promotorbereich die Transkription einer Vielzahl von Genen bewirken (Boehm et al., 1997). Diese Gene werden als primär-responsive Gene bezeichnet. Auf diese Weise wird auch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie (interferon regulatory factor) induziert, die wiederum die Transkription von Genen mit ISRE (IFN γ -stimulated response element) Bindestellen im Promotor aktivieren können. Diese Gene werden als sekundär-responsive Gene bezeichnet, da sie für ihre Induktion die Neusynthese von Transkriptionsfaktoren benötigen. Die Gesamtzahl der IFN γ induzierten Gene wird auf mindestens 400 geschätzt (Wan et al., 1996; Früh et al., 1997).

Interferon γ besitzt eine Vielzahl von immunregulatorischen Funktionen. IFN γ hat zusammen mit IL-12 einen entscheidenden Einfluß auf die Differenzierung von naiven T-Zellen in T_H1 Zellen und damit auf die Etablierung einer zellulären Immunantwort. Dagegen blockiert es die Produktion von IL-4, welches für die Differenzierung von T_H2 Zellen benötigt wird (Szabo et al., 1995). IFN γ kann auch direkt auf B-Zellen wirken, wo es die Entwicklung und Proliferation der B-Zellen und die Produktion der verschiedenen Antikörperisotypen reguliert (Stark et al., 1998). Es favorisiert in der Maus hauptsächlich die Produktion von IgG2a und in geringerem Ausmaß von IgG3 und antagonisiert die IL-4 vermittelte IgG1 und IgE Produktion (Stark et al., 1998). IgE wird vor allem nach Infektion mit Würmern und Parasiten produziert. Durch den Einfluß auf die Produktion verschiedener Antikörperisotypen kann IFN γ die Interaktionen zwischen humoralen und zellulären Effektormechanismen verstärken und so eine effektive Immunantwort gegen Pathogene herbeiführen.

Die Fähigkeit von IFN γ , die Transkription und Expression von MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) zu induzieren, war einer der ersten beschriebenen biologischen Effekte (Rosa et al., 1986). Durch das vermehrte Vorhandensein von MHC Klasse I und II Molekülen auf der Zelloberfläche wird sowohl die Entwicklung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellantworten wie auch die Entwicklung von CD4⁺ T-Zellantworten begünstigt (Stark et al., 1998). Die Antigenpräsentation wird durch IFN γ neben der vermehrten Produktion von MHC Molekülen auch durch die Erhöhung der Expression von β 2 Mikroglobulin und von Komponenten des Proteasoms, das für die Generierung aller an MHC I bindenden Peptide verantwortlich ist, verstärkt.

Die direkt antiviralen Eigenschaften von IFN γ sind nach heutigem Wissensstand hauptsächlich auf die vermehrte Synthese von drei Genprodukten, der Protein Kinase R (PKR), der

2'-5' Oligoadenylat Synthetase (2-5A Synthetase) und der dsRNS spezifischen Adenosin Desaminase (dsRAD) zurückzuführen, die zur Inhibierung der Proteinsynthese führen und damit die virale Vermehrung hemmen (Boehm et al., 1997).

Eine der zentralen Funktionen von IFN γ ist die Aktivierung von Makrophagen, die eine der Haupteffektor Zellpopulationen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort sind. Während der Makrophagenaktivierung finden eine Reihe reversibler biochemischer und funktioneller Veränderungen statt, die unter anderem antimikrobielle Mechanismen induzieren, wodurch die Makrophagen intrazelluläre und phagozytierte Organismen wie z.B. Mykobakterien, Toxoplasmen, Trypanosomen und Leishmanien effizient eliminieren können (Bogdan et al., 2000a; Bogdan et al., 2000b; Stark et al., 1998; Boehm et al., 1997). Zu den wichtigsten antimikrobiellen Effektorsystemen zählt die Generierung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffintermediate (siehe Kapitel 1.1).

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, G-protein-coupled receptor) stellt mit ihren 1000 bis 2000 Mitgliedern in Vertebraten und ca. 1000 Mitgliedern in *Caenorhabditis elegans* wahrscheinlich die größte und diverseste Rezeptorfamilie dar (Bockaert und Pin, 1999). Die Rezeptoren können eine außerordentlich große Vielfalt an extrazellulären Signalen, meist über die Interaktion mit kleinen trimeren G-Proteinen ins Zellinnere übermitteln. Die Signalmoleküle umfassen Hormone, Neurotransmitter, Geruchsstoffe, Pheromone, Photonen, Nukleotide, Lipide, Peptide und Proteine (Ji et al., 1998). Eine Gruppe von Molekülen des Immunsystems, welche die Aktivierung und Chemotaxis von Leukozyten bewirken und ebenfalls an GPCRs binden, sind die Chemoattraktanten. Zur Gruppe der Chemoattraktanten zählen neben den klassischen Chemoattraktanten wie dem N-Formylpeptid, den Komplementfragmentpeptiden C3a und C5a, dem Leukotrien B4 und dem Plättchenaktivierenden Faktor auch die Gruppe der Chemokine. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren werden aufgrund von Homologie, Funktion und Vorhandensein bestimmter Schlüsselsequenzen in Familien bzw. Subfamilien eingeteilt (Horn et al., 1998). Die fünf Hauptfamilien umfassen die Rhodopsin-Familie, die Sekretin-Familie, die metabotropische Glutamat/Pheromon Familie, die Familie der Pilzpheromone und die cAMP Familie von Dictyostelium.

1.3.1 Struktur

Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind strukturell ähnliche Membranproteine. Sie besitzen sieben Transmembranhelizes, die durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Baldwin, 1993). Die Transmembranregionen sind in der Membran kreisförmig angeordnet und werden durch Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen sehr dicht zusammengehalten, um einen passiven Transport von Molekülen zwischen Extra- und Intrazellularraum zu verhindern (Pebay-Peyroula et al., 1997). Außerdem wird die Konformation

der Transmembranregionen durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen der ersten und der zweiten extrazellulären Schleife stabilisiert (Karnik und Khorana, 1990). Die aminotermi-nale Region befindet sich auf der extrazellulären Seite und wird häufig posttranslational durch N-gebundene Oligosaccharide modifiziert (Ji et al., 1998). Der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert und wird häufig durch GRKs (GPCR regulatory kinases) phosphoryliert (Lefkowitz, 1998). Eine Palmitoylierung an hochkonservierten Cysteinen innerhalb der C-terminalen Region kann zur Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife führen.

1.3.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Da die generelle Struktur der GPCR gleich ist, ist die Variabilität zwischen den einzelnen Rezeptoren auf die N- und C-terminalen Regionen (7 - 600 Aminosäuren) und auf die extra- und intrazellulären Schleifen (5 - 230 Aminosäuren) beschränkt (Jin et al., 1997). Diese unterschiedlichen Domänen können die Bindung der verschiedensten Liganden ermöglichen. Interessanterweise besteht eine schwache positive Korrelation zwischen der Länge des N-Terminus und der Ligandengröße (Ji et al., 1998). Niedermolekulare Liganden wie z.B. Nukleotide, Lipide, Photonen und Amine binden direkt an den hydrophoben Kern, der von den Transmembranhelizes gebildet wird, wohingegen Peptid und Proteinliganden häufiger an die N-terminale Region und an die hydrophilen extrazellulären Schleifen binden (Gether und Kobilka, 1998). Große Liganden wie Glykoprotein-Hormone (LH, FSH, TSH) binden ausschließlich und mit hoher Affinität an die N-terminale Region der GPCRs, woraufhin eine strukturelle Veränderung des Rezeptors induziert wird und eine zweite Interaktion des Liganden mit den Transmembrandomänen stattfinden kann (Ji et al., 1998). Protease-aktivierte Rezeptoren, wie z.B. der Thrombin Rezeptor, werden durch proteolytische Spaltung der N-terminalen Region aktiviert (Vu et al., 1991). Generell bewirkt die Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor eine Konformationsänderung, die zur Rezeptoraktivierung und zur Bindung und Aktivierung von G-Proteinen führt (Abb. 1.2). Viele GPCRs werden nach ihrer Aktivierung durch die Bindung von Arrestinen an phosphorylierte Aminosäuren der C-terminalen Region desensitiviert, da Arrestine die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein stören. Zudem bewirken die an den Rezeptor gebundenen Arrestine auch eine rasche Internalisierung über Clathrin (Lefkowitz, 1998). Die internalisierten Rezeptoren werden dann entweder in Lysosomen degradiert oder aber nach ihrer Dephosphorylierung zurück an die Zelloberfläche transportiert, wo sie erneut Liganden binden können und auch wieder aktivierbar sind.

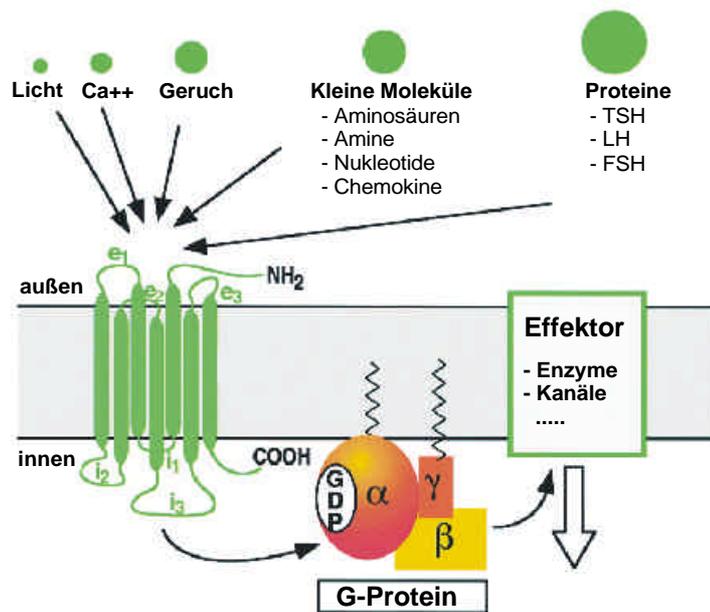


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Signalweiterleitung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Abbildung nach Bockeaert und Pin, 1999.

1.3.3 Signalweiterleitung über G-Proteine

Die Signalübermittlung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in das Zellinnere beruht generell auf einer Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen (Abb. 1.2). Im inaktiven Zustand bestehen die G-Proteine aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Es sind bislang 23 α , 5 β und 10 γ Untereinheiten bekannt, die durch verschiedene Kombinationen eine Vielzahl unterschiedlicher heterotrimerer G-Proteine bilden können (Kehrl, 1998). Die Ligandenbindung an den Rezeptor löst den Austausch des an die α Untereinheit gebundenen Guanosindiphosphats (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) aus. Daraufhin kann die GTP gebundene α Untereinheit von dem membrangebundenen Komplex abdissoziieren. Sowohl die GTP gebundene α Untereinheit als auch das membrangebundene $\beta\gamma$ Heterodimer sind in der Lage, eine Reihe von Effektormolekülen wie z.B. die Adenylatzyklase und die Phospholipase C β (PLC β) zu aktivieren. Durch die Veränderung des cAMP-Spiegels und die Erhöhung der sekundären Signalmoleküle Ca²⁺, DAG (Diazylglyzerin) und IP₃ (Phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphat) können die Protein Kinasen A und C aktiviert werden, die wiederum eine Reihe von Signalkaskaden in Gang setzen und schließlich zu einer zellulären Reaktion führen (Offermanns und Simon, 1996). Das G-Protein vermittelte Signal kommt zum Erliegen, sobald das GTP der α Untereinheit zu GDP hydrolysiert wurde und es wieder zur Ausbildung des inaktiven, heterotrimeren G-Proteins kommt.

Die Signalstärke und die Signaldauer wird von einigen Faktoren beeinflusst. Durch die Bindung von Arrestinen an phosphorylierte Serine und Threonine in der C-terminalen Region der GPCRs werden die Rezeptoren desensitiviert, da die Bindung von G-Proteinen unterbunden wird. Zudem bewirken die Arrestine auch eine verringerte Expression der GPCRs auf der

Zelloberfläche, da sie die Internalisierung und Degradation vorantreiben. Sogenannte GTPase Aktivatoren wie die RGS Proteine (regulators of G-protein signaling) erhöhen die intrinsische Hydrolyserate der G-Protein α Untereinheiten und inhibieren so den Signalweg (Kehrl, 1998).

Obwohl die Mehrheit der G-Protein gekoppelten Rezeptoren Signale über G-Proteine weiterleiten, wird diskutiert, ob einige Rezeptoren dies auch über alternative Signalmoleküle wie z.B. die JAK 2 Kinase (Ali et al., 1997; Marrero et al., 1995; McWhinney et al., 1998; McWhinney et al., 1998), die Phospholipase C γ (Venema et al., 1998) oder die Protein Kinase C (Minakami et al., 1997) tun können.

1.4 Möglichkeiten zur Klonierung und Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Die Klonierung und Identifizierung von differentiell exprimierten Genen erlaubt es, neue Einblicke in eine Reihe biologischer Prozesse zu erlangen. So können beispielsweise Gene und Genprodukte isoliert werden, die in verschiedenen Zelltypen oder Geweben ausgeprägt sind oder die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien exprimiert werden. Ebenso können stimulatorische oder inhibitorische Effekte auf die Transkriptionsrate für eine Vielzahl von Genen in einer Zellpopulation bestimmt werden.

1.4.1 PCR-Select

Bei der PCR-Select Technik (CLONTECH) handelt es sich um eine abgewandelte Form der subtraktiven Hybridisierungsmethode (siehe Abb. 1.3) (Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1999). Sie erlaubt es, das Genexpressionsmuster von zwei RNS Populationen miteinander vergleichen zu können und ermöglicht eine schnelle und selektive Isolierung differentiell exprimierter Gene. Als Ausgangsmaterial werden 2 μ g polyA RNS der zu vergleichenden Zellen oder Gewebe benötigt. Diese werden in doppelsträngige cDNS umgeschrieben. Als "tester cDNS" wird diejenige cDNS Population bezeichnet, die differentiell exprimierte Gene beinhaltet. Die Referenz cDNS Population wird als "driver cDNS" bezeichnet. Nach der Fragmentierung beider cDNS Populationen durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Rsa I, das eine 4 bp Erkennungssequenz besitzt, wird jeweils die Hälfte der "tester cDNS" Fragmente beidseitig mit den Adaptoren 1 oder 2 versehen (siehe Abb. 1.3).

Poly A⁺ RNS

ds cDNS Synthese

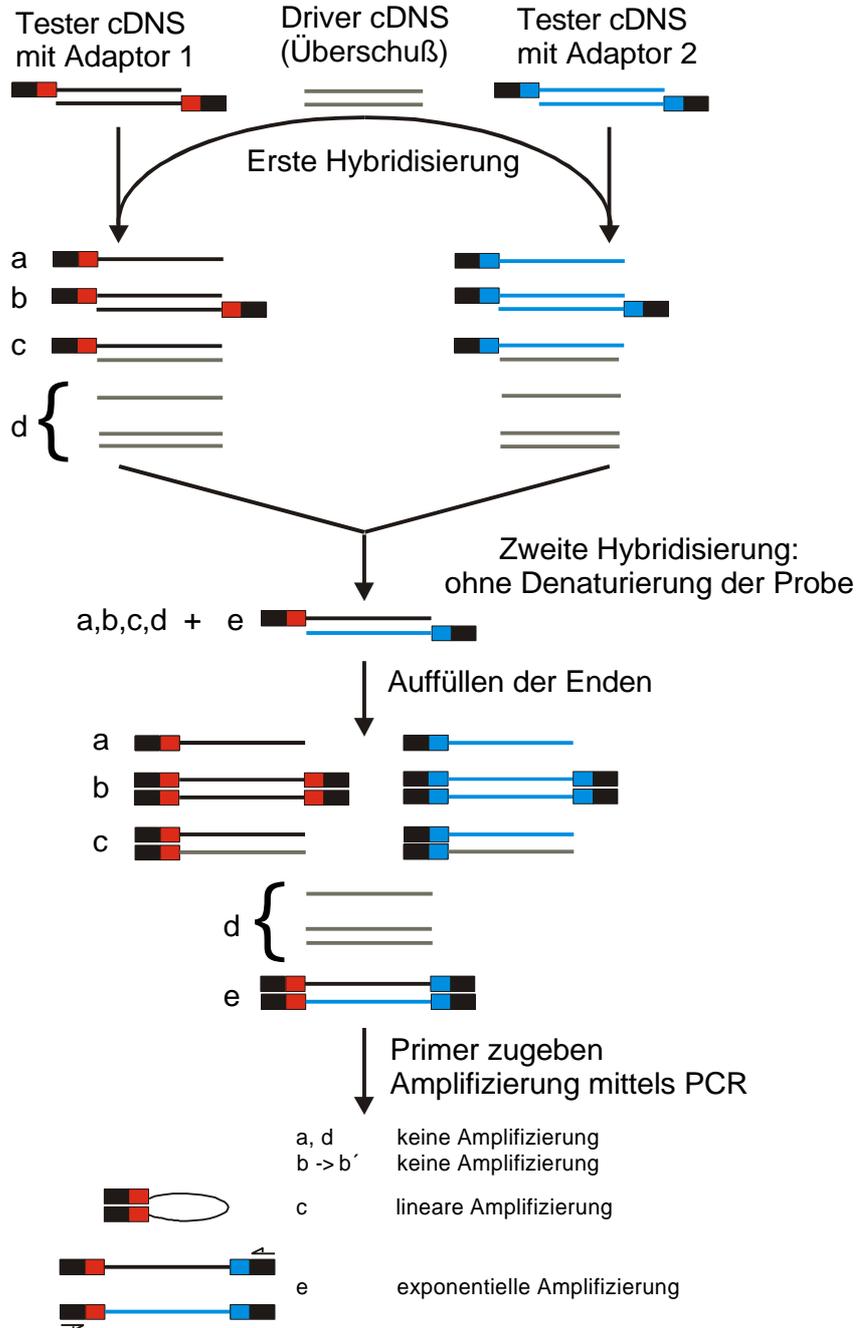


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der PCR-Select Technik (CLONTECH).

In einer ersten Hybridisierungsreaktion wird in zwei getrennten Ansätzen jeweils die "tester cDNS" mit einem hohen Überschuß von "driver cDNS" hybridisiert. Als Ergebnis können die Moleküle vom Typ a, b, c oder d entstehen. Da die Hybridisierungsreaktion einer Kinetik zweiter Ordnung folgt, findet eine Normalisierung zwischen den differentiell exprimierten cDNS Fragmenten statt, die in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, da die redundanten cDNS Fragmente präferentiell Moleküle vom Typ b bilden. Gleichzeitig sind die Typ a Moleküle signifikant für differentiell ausgeprägte cDNS Fragmente angereichert. In einer zweiten Hybridisierungsreaktion werden die Produkte der ersten Reaktion ohne vorherige Denaturierung vermischt. Es kommt zur Ausbildung der Hybridmoleküle vom Typ e, die vorwiegend differentiell exprimierte cDNS Fragmente beinhalten. Durch eine PCR mit Primern, die spezifisch an die beiden Adaptern binden, können nur die Typ e Moleküle exponentiell amplifiziert werden, da eine Amplifikation der Typ b Moleküle durch intramolekulare Hybridisierung stark herabgesetzt ist (Siebert et al., 1995). Die so angereicherten differentiell exprimierten Genfragmente können subkloniert und identifiziert werden.

1.4.2 Weitere Möglichkeiten zur Analyse differentiell exprimierter Gene

Neben der subtraktiven Hybridisierung ist die elektronische Subtraktion (ES) eine weitere Möglichkeit zur Analyse differentiell ausgeprägter Gene. Hierbei werden cDNS Banken der interessierenden Zellen oder Gewebe hergestellt, von denen eine größere Anzahl von Klonen (1000 – 3000) sequenziert wird. Die Häufigkeit der ESTs (expressed sequence tags) in den zu untersuchenden Proben wird rein rechnerisch miteinander verglichen (Okubo et al., 1992). Ein Gen oder Genfragment gilt dann als differentiell exprimiert, wenn es mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in einer Probe häufiger enthalten ist als in einer anderen (Wan et al., 1996). Da die Anzahl der redundanten Klone in einer Zelle bis zu 50 % der RNS Masse betragen kann, ist bei der elektronischen Subtraktion die Sequenzierung einer extrem hohen Zahl von Klonen nötig, um mit befriedigender Wahrscheinlichkeit nicht-redundante differentiell exprimierte Gene identifizieren zu können (Wan et al., 1996).

Bei der "differential display" (DD) Methode (Liang und Pardee, 1992) werden die zu vergleichenden RNS Populationen zuerst in cDNS umgeschrieben. Diese werden dann einer PCR unterworfen, in der sich eine Vielzahl verschiedener Primerkombinationen befindet. Die 3'-Primer bestehen zum Großteil aus Desoxyadenosinen und hybridisieren deshalb selektiv an die oligo dT 3'-Region der cDNS. Die 5'-Primer sind so beschaffen, daß sie zufällig in verschiedenen Bereichen der cDNS binden können. Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl verschiedener PCR-Produkte, die über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können. Nach Vergleich des Bandenmusters der zu untersuchenden Proben können selektiv Banden, in denen sich Proben unterscheiden, aufgereinigt und subkloniert werden. Die "differential display" Methode erfährt eine Limitation dadurch, daß präferentiell kleine cDNS Fragmente, die überwiegend in der 3' untranslatierten Region binden, amplifiziert werden, wodurch sich eine Datenbanksuche zur Identifizierung der cDNS Fragmente oft schwierig gestaltet.

Die Hybridisierung sogenannter DNS-Chips und DNS-Filter mit spezifischen Sonden ist eine Methode, mit der es möglich ist, eine sehr große Anzahl differentiell ausgeprägter Gene in einem Ansatz analysieren zu können (Lockhart et al., 1996; Lennon et al., 1996). Durch den enormen Fortschritt in der Bioinformatik in den letzten Jahren und der Automatisierung vieler molekularbiologischer Arbeitsprozesse wie z.B. Sequenzierung oder Oligonukleotidsynthese ist die Entwicklung solcher Chips und Filter möglich geworden. Bis zu 18.000 verschiedene cDNS Fragmente oder ESTs können dabei auf einen Chip bzw. Filter aufgebracht werden. Diese werden mit RNS oder cDNS Fragmenten aus den zu untersuchenden Zellen oder Geweben, die als spezifische Sonden dienen, hybridisiert. Die unterschiedlichen Hybridisierungssignale werden mittels Computeralgorithmen ausgewertet. Dadurch ist es auch möglich, nicht redundante Gene zu identifizieren, die in einer sehr geringen Frequenz (1:300.000) vorliegen (Lockhart et al., 1996). Die Hybridisierung von DNS-Chips und DNS-Filtern ist jedoch mit hohem Kostenaufwand und Zeitaufwand für die Verifizierung der Klone verbunden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Interferon γ ist ein zentrales Zytokin bei der Infektionsabwehr. Eine der wichtigsten Funktionen von IFN γ ist es, Makrophagen zu aktivieren und diese zur Produktion von antimikrobiellen Substanzen wie reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffmetaboliten anzuregen. Mäuse, die für das IFN γ oder IFN γ R Gen defizient sind, oder Menschen mit einer Mutation im IFN γ R Gen sind extrem anfällig gegenüber einer Vielzahl von Infektionen wie z.B. *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* und Mykobakterien (Dalton et al., 1993; Newport et al., 1996; Jouanguy et al., 1996). Die Zahl der durch IFN γ induzierten Gene wird auf mindestens 400 geschätzt (Wan et al., 1996; Früh et al., 1997). Da Mäuse, die nicht mehr in der Lage sind, reaktive Stickstoff- und Sauerstoffintermediate zu produzieren in der Infektionsabwehr im Vergleich zu IFN γ R defizienten Tieren nur geringfügig beeinträchtigt sind, legt dies die Vermutung nahe, daß es weitere Wirts-protective IFN γ induzierbare Genprodukte in Makrophagen gibt. Durch IFN γ werden in verschiedenen Zelltypen höchstwahrscheinlich auch verschiedene Transkriptionsprogramme aktiviert, die den speziellen Rollen und Funktionen der verschiedenen Zelltypen in der Immunantwort entsprechen. Das Ziel dieser Arbeit war es, bislang unbekannte IFN γ induzierbare Gene, die präferentiell in aktivierten Makrophagen ausgeprägt sind, mittels PCR-Select zu identifizieren. Ein bisher nicht beschriebenes Gen sollte kloniert und dessen Transkription charakterisiert werden. Zur Aufklärung der *in vivo* Funktion dieses Gens sollte das Gen in der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Antikörper	Pharmingen, Hamburg
Amberlite	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma, Taufkirchen
Bactoagar	Difco Labs, Detroit, USA
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin, RIA Qualität)	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMEM Medium	GibcoBRL, Eggenstein
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Eosin Y	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FKS (Fötale Kälberserum)	GibcoBRL, Eggenstein
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex
Geneticin (G418)	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
Guanidiniumthiocyanat	Fluka, Ulm
Harnstoff (Urea)	GibcoBRL, Eggenstein
Hämatoxin, Pulver	Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Difco Labs, Detroit, USA
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
IPTG	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Marker 1kb DNS-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
mIFN γ	Genzyme, Cambridge, USA
mIFN α	Biosource, USA
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma Taufkirchen

MOPS (3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure)	Sigma Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
N,N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran [®]	Roth, Karlsruhe
RPMI Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'- Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Thioglykollat	Difco Labs, Detroit, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haen, Seelze
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Trypton	Difco Labs, Detroit, USA
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
X- Gal (X-Galaktopyranosid)	GibcoBRL, Eggenstein
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Radiochemikalien

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

Das Reagenz wurde von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

2.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	BioLabs, New England
cDNS Synthese Kit	GibcoBRL, Eggenstein
DNS T4 Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNS Polymerase Klenowfragment	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNS Taq-Polymerase	GibcoBRL, Eggenstein
Pronase E	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	BioLabs, New England
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	GibcoBRL, Eggenstein
RNase A	Sigma, Taufkirchen

2.2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
Cycle Sequencing Ready Reaction Filme	Perkin Elmer, Foster City, USA Hyperfilm™-MP, Amersham, Braunschweig X-OMAT (XAR-5) Kodak, München
Filterpapier Whatman 3MM	Schultheiss, München
Gene Images CDP-Star labelling module	Amersham, Braunschweig
Gene Images CDP-Star detection module	Amersham, Braunschweig
Marathon-ready RACE-PCR-Kit	Clontech, Palo Alto, USA
NucTrap® Sonden-Aufreinigungssäulen	Stratagene, Heidelberg
Nylonmembran, Gene Screen Plus	NEN® Research Products, USA
Parafilm M	American National Can™, Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden Falcon, New Jersey Corning, New York, USA
QIAGEN Plasmid Isolierungskits	QIAGEN, Hilden
Rediprime DNA labelling system	Amersham, Braunschweig
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

2.2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Cytoperm, Heraeus, Hanau
Elektrophorese von DNS und RNS	Agagel Maxi/Midi, Biometra, Göttingen
Geldokumentationssystem	Eagle EYE II, Stratagene, Heidelberg
Kühlzentrifugen	Sorvall® RC 26 PLUS, Heraeus, Hanau Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau Rotor 2250 mit Mikrotiterschaukeln Omnifuge 2,0 RS, Heraeus, Hanau
Mikroskop	ID 03, Zeiss, Jena Leica DMBRE
PCR Maschinen	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen GeneAmp 9600, Perkin Elmer, Norwalk, USA
Phosphoimager	Storm 840, Molecular Dynamics, USA
Photometer	LKB Biochrom Ultrospec Plus, Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sequenziergerät	373 DNS Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsquelle	Power Pack P25, Biometra, Göttingen PS 500 XT, HIS, San Francisco, USA
Sterilbank	HLB 2472 GS, Heraeus, Hanau

Tischzentrifugen

Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg
Biofuge 15, Heraeus, Hanau
Biofuge 15 R, Heraeus, Hanau

2.3 Medien und Puffer

2.3.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer		Zusammensetzung
2 x BBS	50 mM 280 mM 1,5 mM	BES ("cell culture grade") NaCl Na ₂ HPO ₄ pH 6,96
PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Lösung I (Alkalische Lyse)	50 mM 25 mM 10 mM	Glukose Tris EDTA
Lösung II (Alkalische Lyse)	0,2 N 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung III (Alkalische Lyse)	60,0 % 11,5 % 28,5 %	Kaliumacetat Eisessig H ₂ O _{bidest}
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50 % 48 % 2 %	Phenol, pH = 8,0 Chloroform Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 EDTA, pH = 8,0
TNE	10 mM 100 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 NaCl EDTA, pH = 8,0
Proteinase K	10 mg/ml	Proteinase K in H ₂ O _{bidest} gelöst

Pronase E	10 mg/ml 10 mM 10 mM	Pronase E (10mg/ml) Tris, pH = 8,0 NaCl Selbstverdau 1h bei 37°C
Verdaulösung	500 µl 50 µl 7,5 µl 25 µl	TNE SDS 10 % Proteinase K Pronase E
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM 20 mM 2 mM	Tris, pH = 8,0 Eisessig EDTA
6 x DNS-Auftragspuffer	15 % 0,05 % 0,05 %	Ficoll Typ 400 Bromphenolblau Xylencyanol
RNS-Elektrophoresepuffer		1 x MOPS
2 x RNS Auftragspuffer	48,0 % (v/v) 10,0 % (v/v) 17,3 % (v/v) 14,0 % (v/v) 5,3 % (v/v) 5,3 % (v/v)	Formamid 10 x MOPS Formaldehyd DEPC-H ₂ O Glyzerin Bromphenolblau
10 x MOPS-Puffer	0,4 M 0,1 M 10 mM	MOPS Natriumacetat×3H ₂ O EDTA×Na ₂ ×2H ₂ O pH = 7,2
50 x Denhardt	1 % (w/v) 1 % (w/v) 1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon Ficoll BSA
20 x SSC	3 M 0,3 M	NaCl Trinatriumcitrat
20 x SSPE	3 M 0,2 M 0,02 M	NaCl Natriumdihydrogenphosphat EDTA pH = 7,4
50 x TAE	2 M 1 M 0,1 M	Tris, pH = 8,0 Eisessig EDTA

10 x TBE	1 M	Tris, pH = 7,5
	1 M	Borsäure
	0,01 M	EDTA
Hybridisierungslösung (Southern)	5 %	Dextransulfat
	0,5 %	SDS
	0,03 %	NaCl
Waschlösung I (Southern)	2 x	SSC
	0,1 %	SDS
Waschlösung II (Southern)	0,2 x	SSC
	0,1 %	SDS
Hybridisierungslösung (Northern)	5 x	SSPE
	5 x	Denhardts
	50 %	Formamid
	10 %	Dextransulfat
	1 %	SDS
Waschlösung I (Northern)	2 x	SSPE
Waschlösung II (Northern)	2 x	SSPE
	2 %	SDS
Waschlösung III (Northern)	0,1 x	SSPE
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
Auftragspuffer (Sequenzierung)	1 Vol.	25 mM EDTA, pH = 8,0
	5 Vol.	50 mg/ml Blue Dextran Formamid
Sequenziergel	40 g	Harnstoff
	1 g	Amberlite (Ionentauscher)
	28 ml	H ₂ O (LiChrosolv [®] , Merck, Darmstadt)
	12,5 ml	30 % Acrylamid/Bis (Bio-Rad, USA)
	8 ml	TBE
10x PCR-Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine

2.3.2 Medien für die Bakterienkultur

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde ausschließlich durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiertes Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet.

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

Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Flüssigkulturen wurden im Schüttelkolben inkubiert.

Die Organismen wurden auf Festmedium mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt, wobei ein Verschluß der Petrischalen durch Parafilm Austrocknung und Kontamination verhinderte. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Klone mit 50 % sterilem Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Die Gewinnung der Bakterien aus Flüssigmedium erfolgte durch Abzentrifugieren bei 5000 UpM.

2.3.3 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

	Zelltypen			
	ES	EF	293T-Zellen	Makrophagen
Grundmedium	DMEM	DMEM	DMEM	RPMI 1640
Zusätze				
FKS	15 %	5 %	10 %	10 %
LIF*	1 %			
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
β-Merkaptoethanol	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
Behandlung				
Mitomycin C		10 µg/ml für 2 h		
*LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugesetzt				

2.4 Hemm- und Zusatzstoffe

2.4.1 Antibiotika

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol beigelegt.

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert	100 µg/ml
Chloramphenicol	12,5 µg/µl in EtOH	12,5 µg/ml

2.4.2 X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid)

Zur Blau-Weiß Selektion von Transformanten wurde dieses Analogon des natürlichen Substrats der β -Galaktosidase etwa 20 - 30 min vor Verwendung auf die Agarplatten ausplattiert.

Voraussetzung für eine Blau-Weiß Selektion ist die Verwendung von Bakterienstämmen, die eine Deletion im *lacZ* Gen besitzen. Durch α -Komplementation mit dem *lacZ* α -Fragment können plasmidhaltige Bakterien eine aktive β -Galaktosidase bilden und so das Substrat X-Gal hydrolysieren. Das dabei gebildete 5-Brom-4-chlorindoxyl oxidiert an Luft spontan zu dem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo, der Klone mit leerem Vektor blau färbt. Klone, die zusätzlich eine Insertion im α -Fragment besitzen, sind weiß.

	Stammlösung	Endkonzentration
X-Gal	20 mg/ml in N,N'-Dimethylformamid gelöst, Lagerung bei -20°C im Dunkeln	1 mg/Agarplatte

2.4.3 IPTG (Isopropyl-b-D-thiogalaktosid)

Bei Verwendung von Bakterienstämmen, die den *lac*-Repressor überexprimieren, wurde den Festmedien dieser Induktor der β -Galaktosidase zugesetzt, um farbliche Insertionsselektion zu ermöglichen.

	Stammlösung	Endkonzentration
IPTG	0,1 M in H ₂ O _{bidest.} , Aliquotlagerung (sterilfiltriert) bei -20°C	5 mM/Agarplatte

2.5 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.5.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2.3 sind die im Labor verwendeten Bakterienstämme für Klonierungszwecke oder Infektionsexperimente unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
E. coli XL1-blue	endA1, hsdR17, thi-1, supE44, recA1, relA1, gyrA96, Δ (lac), (F'proAB), lacI ^q ZAM15, Tn10 (Tet ^R)	Stratagene
E.coli DH5a	supE44, Δ lacU169, (Φ 80lacZAM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Hanahan, 1983
L. monocytogenes	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251

2.5.2 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
ANA-1	Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen, immortalisiert mittels J2 Retrovirus	Cox et al., 1989
264.7 RAW	murine Monozyten/Makrophagenzelllinie aus BALB/c Mäusen, ursprünglich aus Peritoneum	Raschke et al., 1978
W1C3	murine Makrophagenvorläufer Hybridzelllinie	Leenen et al., 1994
IC21	murine Peritoneal-Makrophagen Zelllinie mit SV40 transformiert	Traber et al., 1981
293T	humane embryonale Nieren-Zelllinie	ATCC
DC	Kultivierung aus Knochenmarksvorläuferzellen mit GM-CSF	Inaba et al., 1992
PEC (peritoneal exudate cells)	wandern durch einen unspezifischen Thioglykolat-Reiz in das Peritoneum ein	
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 postcoitum aus CD1 Embryonen	Wurst and Joyner, 1993
ES-Zellen E14.1	embryonale Stammzellen aus dem Mausstamm 129/SvJ gewonnen	Wurst and Joyner, 1993

2.5.3 Versuchstiere

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere handelte es sich überwiegend um Wildtyptiere des Mausstammes C57BL/6 und 129/J. Einige Versuche wurden an IFN γ R defizienten Tieren (Huang et al., 1993) und an IFN γ defizienten Tieren (Dalton et al., 1993) durchgeführt. Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität in München gezüchtet.

2.6 Primer und Antikörper

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) oder Metabion (Martinsried) bezogen. Die in den Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6 angegebenen Primer wurden ausschließlich für RACE-PCR Reaktionen und für Sequenzierreaktionen eingesetzt.

Tabelle 2.5: Primer zur Durchführung der RACE-PCR

Primername	Sequenz (5'®3')	Verwendung
AP1 (Clontech)	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	Race-PCR
AP2 (Clontech)	ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC	Race-PCR
R333-1	GCG GAT GCG CAC AGC CAC ACG GGG	Race-PCR
R333-1N	CCA CCA TGA TGA AGT TGA TGG CCC	Race-PCR
R333-2	GCC CCA GGA GGG ACT GAA CTC AGT GCT GG	Race-PCR
R333-2N	GGG GAA ACA GTG GCT TCC CCC CTC TGT	Race-PCR

Tabelle 2.6: Sequenzierprimer

Primername	Sequenz (5'®3')	Verwendung
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Sequenzierung
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	Sequenzierung
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung
M13-20	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung

In Tabelle 2.7 sind die Primer aufgelistet, die in der sogenannten "Screening PCR" zum Nachweis der homologen Rekombination des PUMA-G Rekombinationsvektors in ES-Zellen eingesetzt wurden.

Tabelle 2.7: Screening PCR-Primer

Primername	Sequenz (5'®3')	Verwendung
333-sense1	GAG CAC GGC GCT AGA GAA CTG	Screening PCR
333-KO	CCT CTT CGC TAT TAC GCC AGC	Screening PCR
333-WT	CCA TTG CCC AGG AGT CCG AAC	Screening PCR

In Tabelle 2.8 sind eine Vielzahl von Primern aufgelistet, die in PCR- und Sequenzierreaktionen zur Charakterisierung der PUMA-G cDNS Sequenz und des PUMA-G genomischen Lokus zum Einsatz kamen. Weitere Primer wurden für die PCR-Suche einer BAC

genomischen Genbank herangezogen, sowie zur Amplifikation des PUMA-G ORFs zur Klonierung der PUMA-G-FLAG und PUMA-G-EGFP Fusionsproteine.

Tabelle 2.8: Zusätzliche Primer

Primername	Sequenz (5'®3')	Verwendung
333-1	TTG CTT CCT ACC CAG TGT GGC	PUMA-G Charakterisierung
333-2	TCT CCA GCA CTG AGT TCA GTC CC	PUMA-G Charakterisierung
333-3	ACT GGC CAG ATC CAC TCA TGA GC	Screening BAC (5') ORF-Amplifikation (5') ORF-flag Amplifikation (5')
333-4	ATC CAC AAG GCA AGG CCA TTG C	PUMA-G Charakterisierung
333-5	AGT GAT AAA CGG CAA GAA CTG C	PUMA-G Charakterisierung
333-6	TGA TCA GGA GAA AGT CAG CC	PUMA-G Charakterisierung
333-7	TGA ACA AGA TCT CCA ACC GG	PUMA-G Charakterisierung
333-8	TGT TCA AGA AGT GGT GTG GAT GG	Screening BAC (3')
333-9	GGA CCC CAG CAC AAC CAG AAG	PUMA-G Charakterisierung
333-10	GTT CCA AGA AAG CGT AAG CC	PUMA-G Charakterisierung
333-anti	TTA ACG AGA TGT GGA AGC CAG	ORF-Amplifikation (3')
333-antiflag	TTT ATC GTC ATC GTC TTT GTA GTC ACG AGA TGT GGA AGC CAG	ORF- flag Amplifikation (3')
333s Xho	AAC CGC TCG AGT CCA CTC ATG AGC AAG TCA G	ORF-PCR zur Klonierung in pEGFP-N1/pEGFP-C2 (5')
333as Bam	TGG CGG ATC CGT ACG AGA TGT GGA AGC CAG ATA AG	ORF-PCR zur Klonierung in pEGFP-N1/pEGFP-C2 (3')
kA-sense 2	CTC GAG GAC CTG CAT TAA GCT CCC	PUMA-G Synthese kurzer Arm (5')
kA-anti 1	TCC GGA AAA CTT TAT GCA TGA GTG GAT CTG GCC AGT C	PUMA-G Synthese kurzer Arm (3')

Die verwendeten Primer zur Genotypisierung der PUMA-G defizienten Mäuse sind in Tabelle 2.9 aufgelistet. Das Primerpaar PUMA-G-sense/333-WT ist spezifisch für das PUMA-G WT-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 450 bp; das Primerpaar PUMA-G-sense/333-KO ist spezifisch für das KO-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 530 bp.

Tabelle 2.9: Primer zur Genotypisierung PUMA-G defizienter Mäuse

Primername	Sequenz (5'® 3')	Verwendung
PUMA-G-sense	TCA GAT CTG ACT CGT CCA CC	Typisierungs PCR
333-KO	CCT CTT CGC TAT TAC GCC AGC	Typisierungs PCR
333-WT	CCA TTG CCC AGG AGT CCG AAC	Typisierungs PCR

Für die konfokale Mikroskopie wurde der Cy3 markierte anti-FLAG Antikörper des IgG1 Isotyps aus der Maus verwendet. Dieser wurde von der Firma Sigma bezogen.

2.7 Plasmidvektoren

2.7.1 Ausgangsvektoren

Für die Klonierung und Expression von DNS-Sequenzen wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren verwendet.

Tabelle 2.10: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pBluescript	Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, <i>lacZ</i> α -Fragment, rop ⁻	Stratagene
pCR II-TOPO	Vektoren zur direkten Klonierung von PCR Produkten Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promoter, <i>lacZ</i> α -Fragment	Invitrogen
T neo K44	pMC1Neo poly A mit flankierenden loxP Sequenzen in pCR 2.1 Vektor	Pfeffer, München
pGEM7 TK	enthält die Thymidinkinase aus Herplex Simplex Virus, pGEM7 Derivat	Seriono, München
pcDNA3 lacZ	β -Galaktosidase mit nls "nuclear localization site" in pcDNA3 Vektor	Hehlgans, Regensburg
pEGFP-N1	Expressionsvektor für C-terminale EGFP-Fusionsproteine, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pEGFP-C2	Expressionsvektor für N-terminale EGFP-Fusionsproteine, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pcDNA3	Expressionsvektor, CMV-Promotor, Amp ^R , Neo ^R	Invitrogen
pEF-SEM	Expressionsvektor basierend auf pcDNA3 mit EF-1 α Promotor, Amp ^R , Neo ^R	Häcker, München

2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide

Tabelle 2.11: Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide und Sonden

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
AS 333 (X/H)	-	770 bp XhoI/HindIII Fragment des PCR-Select Klons AS 333; entspricht dem 760 bp EcoRI/HindIII Fragment des PUMA-G ORF	PUMA-G spezifische Sonde
5'-Sonde	-	440 bp PstI/NsiI Fragment von HindBac	5'-flankierende Sonde, vermutlich im PUMA-G Promotorbereich
HindBac	pBluescript	ca. 5,5 kb HindIII-Fragment	genomischer PUMA-G BAC Subklon
BamBac	pBluescript	ca. 5 kb BamHI-Fragment	genomischer PUMA-G BAC Subklon
ApaBac	pBluescript	ca. 9 kb ApaI-Fragment	genomischer PUMA-G BAC Subklon
SacBac	pBluescript	ca. 3,7 kb SacI-Fragment	genomischer PUMA-G BAC Subklon
SpeBac	pBluescript	ca. 7 kb SpeI-Fragment	genomischer PUMA-G BAC Subklon
PUMA-G ORF	pEF-SEM	PCR-Produkt 333-3/333-anti PUMA-G ORF ohne Stopkodon	für subzelluläre Lokalisation
PUMA-G-FLAG	pEF-SEM	PCR-Produkt 333-3/333-antiflag PUMA-G ORF mit FLAG	für subzelluläre Lokalisation
EGFP-PUMA-G	pEGFP-C2	PCR-Produkt 333sXho/333asBam PUMA-G ORF (mit Xho/Bam)	für subzelluläre Lokalisation
PUMA-G-EGFP	pEGFP-N1	PCR-Produkt 333sXho/333asBam PUMA-G ORF (mit Xho/Bam)	für subzelluläre Lokalisation

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Kultivierung von Makrophagenzelllinien und 293T-Zellen

Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 7 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Im Überstand wachsende Zellen oder semiadhärente Zellen wurden mit Medium abgespült und dann verdünnt umgesetzt. Die Zellablösung adherenter Zellen erfolgte durch Inkubation der mit PBS gewaschenen Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen neu ausgesät.

Transfektion von 293T-Zellen mit CaPO₄

Die transiente Transfektion der 293T-Zellen erfolgte nach der CaPO₄-Methode (Chen und Okayama, 1987). Die maximale Expression ist ca. 48 h nach der Transfektion erreicht.

Durchführung:

- am Tag vor der Transfektion die subkonfluent wachsenden Zellen mit PBS waschen und mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale ablösen und zählen
- pro Transfektion 1×10^6 Zellen in 8 ml Transfektionsmedium aussäen und ÜN bei 37°C inkubieren
- am folgenden Tag 16 µg Plasmid-DNS mit 80 µl 1 M CaCl₂ vermischen und mit H₂O_{bidest} auf 400 µl auffüllen
- 400 µl 2 x BBS zugeben und vortexen
- Inkubation bei RT für 10 min
- die DNS- CaCl₂-BBS Lösung langsam unter Schwenken zu den Zellen in der Kulturschale zugeben
- Inkubation der Zellen bei 37°C und 3 % CO₂
- Mediumwechsel nach 12-16 h
- nach 48 h ist die maximale Expression erreicht

Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation

Die transiente Transfektion der 264.7 RAW Makrophagen erfolgte durch Elektroporation. Nach ca. 20 h wurden die Zellen geerntet und auf ihre Expression hin untersucht.

Durchführung:

- Zellen einen Tag vor der Elektroporation passagieren
pro Elektroporation $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in 400 µl EP-Medium (RPMI Medium mit 40 % FKS) aufnehmen
- 20 µg Plasmid-DNS zur Zellsuspension dazupipettieren
- Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführen
Elektroporation mit 280 V und 960 µF
- nach der Elektroporation die Zellen 15 min bei RT stehen lassen
- Zellen in 10 ml Medium aufnehmen
- Zentrifugation bei 1200 UpM, 5 min um tote Zellen abzutrennen
- Zellpellet in frischem Medium aufnehmen und ÜN im Brutschrank inkubieren

2.8.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten

Zellkultur von ES/EF Zellen

Embryonale Stammzellen wurden grundsätzlich auf mit Mitomycin C (10µg/ml) vorbehandelten EF-Zellen (2 h, 37°C) kokultiviert, um die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich wurde den ES-Zell Kulturen LIF-Überstand (1000 U/ml Endkonzentration) zugegeben, um das Ausdifferenzieren zu verhindern. Undifferenzierte ES-Zellen erscheinen im Lichtmikroskop als spindelförmige Kolonien mit einem glatten, hell-scheinenden Rand. Die ausdifferenzierten Kolonien dagegen erscheinen grau, werden matt und bilden Pseudopodien aus.

Elektroporation von ES-Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit dem PUMA-G- Rekombinationsvektor transfiziert.

Durchführung:

- die ES-Zellen auf drei 15 cm-Zellkulturplatten expandieren (ca. 5×10^7 Zellen)
- für die Elektroporation in 7 ml ES-Medium aufnehmen und mit 200 µg linearisiertem Rekombinationsvektor in 1 ml PBS mischen
- je 800 µl in Elektroporationsküvetten überführen
- Elektroporation: 340 V/250 µF
- Elektroporierte Zellen 10-15 min auf Eis abkühlen lassen
- jeden Elektroporationsansatz auf zwei vorbereitete 10 cm EF-Kulturschalen verteilen

Selektion rekombinanter ES-Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES-Zellen einem zweifachen Selektionsdruck mit G418 und Gancyclovir unterworfen, um homolog rekombinierte ES-Zell Klone anzureichern.

Durchführung:

- nach der Transfektion werden die Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert
- am Tag 2 erfolgt Positivselektion durch Zugabe von Geneticin (G418) im Medium (200 µg/ml)
- am Tag 4 erfolgt zusätzliche Negativselektion mit 2 mg/ml Gancyclovir im Medium
- Mediumwechsel alle zwei Tage

- wenn sich überlebende ES-Zell Klone etabliert haben (Tag 14-16), werden die Kolonien mit PBS gewaschen
- ES-Zell Kolonien mit 10 ml PBS überschichten
- die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipette in 20 µl PBS aufnehmen und in eine Vertiefung einer 96-well Platte überführen
- den Zellverband der Kolonien durch Trypsin/EDTA Behandlung auflösen
- Kultivierung mit EF-Zellen
- nach 2 Tagen die Zellen auf drei 96-well Platten verteilen
- zwei der drei 96-well Platten sehr dicht bewachsen lassen, dann das mit PBS gewaschene Zellpellet bei -20°C wegfrieren
- die Zellen in der dritten 96-well Platte auf 48-well Platten verteilen und in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff einfrieren, wenn diese gut bewachsen sind

Einfrieren von ES-Zellen

Durchführung:

- Die Zellen vor dem Einfrieren mit Trypsin/EDTA vereinzeln und die Reaktion mit Medium abstoppen
- die Zellsuspension 1:1 mit dem Einfriermedium (80 % FKS, 20 % DMSO) vermischen

Zellen 30 min bei -20°C inkubieren, dann ÜN bei -80°C lagern und anschließend in flüssigem Stickstoff einfrieren.

2.9 Tierversuche

2.9.1 Superovulation

Um Embryonen im Blastozystenstadium entnehmen zu können und um die Anzahl der gebildeten Embryonen zu erhöhen, wurden weibliche Mäuse superovuliert. Dazu wurden den Mäusen zwischen 14-17 Uhr 10 U PMSG und 44-48 h später 10 U hCG intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse mit männlichen Mäusen verpaart. Der Zeitplan war so organisiert, daß die Ovulation, die etwa 12 h nach hCG Gabe erfolgte, auf die Mitte der Dunkelphase fiel. Innerhalb von weiteren 12 h erfolgte die Untersuchung auf einen Vaginalpfropf (plug), der auf eine Begattung hinweist. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf entdeckt wird, gilt gemäß den üblichen Konventionen als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 entnommen.

2.9.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten für die Kokultivierung von ES-Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen (Kapitel 2.9.1) am Tag 14 *post coitem* gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert, in PBS gewaschen und der Kopf und die fötale Leber entfernt, um einen Großteil der nicht fibroblastischen Zellen zu entfernen. Das restliche embryonale Gewebe wurde mit einem Skalpell so fein wie möglich zerteilt, dann durch ein Sieb gedrückt und in EF Medium kultiviert. Pro 10 cm Kulturschale wurden etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit Medium versorgt, expandiert und als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.9.3 Generierung chimärer Mäuse

Für die Generierung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES-Zellen kam die Blastozysteninjektion zur Anwendung. Die Embryonen wurden dazu im Blastozystenstadium am Tag 3,5 der Embryonalentwicklung aus dem Uterus superovulierter C57BL/6 Weibchen retrograd ausgespült und in M2 Medium aufgenommen. Etwa 15-20 der homolog rekombinierten ES-Zellen wurden pro Blastozyste unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe von Mikromanipulatoren in das Blastocoel injiziert. Anschließend erfolgte der Uterustransfer der manipulierten Blastozysten in pseudoschwangere Ammenmütter. Bis zu 15 Blastozysten wurden pro Uterushorn transferiert.

2.9.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70 % EtOH semisteril entnommen.

2.9.5 Infektion mit Listerien

Die Anzucht von *L. monocytogenes* (ATCC strain 43251) erfolgte in 5 ml brain-heart infusion Medium durch aerobe Inkubation bei 37°C. Die ÜN Kulturen wurden bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 in Medium seriell 10-fach verdünnt. Den Experimentaltieren wurden 300 µl der vierten Verdünnungsstufe i.p injiziert, was einer Bakterienmenge von etwa 50000 entspricht. Die tatsächlich verabreichte Dosis an Listerien wurde durch Auszählen der Kolonien einer ÜN Kultur von 10 µl Aliquots der einzelnen Verdünnungen auf Columbia Red Blutagar Platten ermittelt.

2.10 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.10.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Alkalische Lyse

Die Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wurde dazu benutzt, um viele Klone durch geeignete Restriktionsanalysen gleichzeitig genetisch zu überprüfen. Die Bakterien werden unter denaturierenden Bedingungen für RNS, DNS und Proteine durch SDS in Gegenwart von NaOH in der Kälte lysiert. Die anschließende Neutralisation führt zur Kopräzipitation von SDS, chromosomaler DNS und Proteinen. Die Plasmid-DNS renaturiert und verbleibt in Lösung, aus der sie durch Ethanol-fällung gewonnen werden kann. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.3.1 aufgeführt.

Durchführung:

- zu untersuchende Klone in 2 ml LB unter Selektionsdruck ÜN wachsen lassen
- 1,5 ml in einem Eppendorfreaktionsgefäß (ERG) abzentrifugieren (6000 UpM/1 min)
- Zellen in 100 µl Lösung I vollständig resuspendieren und für 5 min bei RT inkubieren
- 200 µl Lösung II zugeben, vorsichtig mischen und 5 min auf Eis inkubieren
- durch Zugabe von 150 µl Lösung III neutralisieren, wiederum vorsichtig mischen und 5 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 14000 UpM zentrifugieren
- Überstand (ÜS) abheben und verbleibende Proteine durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion entfernen
- Plasmid DNS mit 2 Volumen EtOH_{abs.} fällen (-20°C/10 min)
- Pelletieren (14000 UpM/10 min)
- DNS-Pellet mit 1 ml 70 % EtOH waschen und in der Vakuumzentrifuge trocknen
- Pellet in 20 µl TE mit 20 µg/ml RNase A lösen

Für eine anschließende Restriktionsanalyse wird die mit der Plasmid-DNS zusammen isolierte RNS durch RNase Zugabe zerstört.

Qiagen Kits

Die Plasmid-DNS Isolierung erfolgte mit Hilfe von Qiagen Kits, um besonders reine DNS für Klonierungszwecke und für Sequenzierreaktionen zu erhalten. Je nach benötigter DNS-Menge wurden Mini- Midi- oder Maxi-Säulchen verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.10.2 Isolierung von chromosomaler DNS

Aus Proteinase-verdauten Mausschwanzproben oder ES-Zellen wird die genomische DNS nach Abtrennung von Proteinen und Festbestandteilen direkt durch Ausspinnen gewonnen.

Durchführung:

- Schwanzprobe (ca. 0,4 cm) in ein ERG geben und in der Verdaulösung ÜN (Kapitel 2.3.1) in einem Überkopfrührer bei 37°C inkubieren, um Proteine zu verdauen
- durch Zentrifugieren (14000 UpM/2 min) alle festen Bestandteile abtrennen, den Überstand in ein neues ERG überführen
- ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Kapitel 2.3.1) zugeben und kurz vortexen
- zentrifugieren (14000 UpM/5 min) und Überstand mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig abnehmen
- zwei Volumen kalten EtOH_{abs.} zugeben und mehrmals schwenken
- DNS mit Pipettenspitze ausspinnen, mit 70 % EtOH waschen und erneut zentrifugieren (14000 UpM/5 min)
- Pellet an der Luft oder in der Vakuumzentrifuge trocknen
- Pellet in 100 µl TE-Puffer oder H₂O_{bidest} bei 37°C ca. 1 h lösen
- gelöste chromosomale DNS bei 4°C lagern

2.10.3 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode, die zur Auftrennung von DNS-Fragmenten verwendet wird. 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 in der Gelmischung fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht. Das Muster kann dadurch auch photographisch festgehalten und analysiert werden.

Durchführung:

- 0,8-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufkochen, bis eine klare homogene Lösung entsteht
- nach Abkühlen auf Handwärme Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugeben, dann in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämmen gießen und verfestigen lassen

- die Gelwanne mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese Apparatur einsetzen und mit TAE-Puffer überschichten
- DNS-Proben 1:5 mit Auftragspuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren
- die Elektrophorese wird je nach Gelgröße bei 80-150 Volt durchgeführt
- das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei UV-Bestrahlung (Transilluminator, 280 nm), und das Bandenmuster kann photographisch dokumentiert werden
- für eine Auswertung der Bandenmuster mittels Computerprogrammen (Adobe Photoshop™ 5.0, CorelDRAW 8) wurden die Daten zusätzlich auf Diskette festgehalten.

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurden mehrere Taschen der Kämme abgeklebt, um größere DNS-Mengen auftragen zu können. Anschließend wurde die Gelelektrophorese (s.o.) durchgeführt. Die gewünschten Banden im Gel wurden unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gewonnen. Das Gel wird durch chaotrope Effekte geschmolzen und die DNS anschließend durch Säulenchromatographie gereinigt. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

Bestimmung von Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Standards verwendet, wobei die λ -Standards durch Restriktionsverdau von λ -Phagen DNS mit *Eco* RI und *Hind* III hergestellt wurden. Die 1 kb-Leiter wurde von der Firma GibcoBRL (Eggenstein) bezogen.

Fragmentgrößen:

- λ /*Hind* III (bp): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125
- λ /*Hind* III, *Eco* RI (bp): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125
- 1 kb-Leiter (bp) 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 154/134, 75

2.10.4 Enzymatische Behandlung von DNS

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zu Klonierungszwecken eignen. Die durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente chromosomaler DNS wurden auch als Sonden verwendet, um spezifische Sequenzen durch Hybridisierung zu identifizieren (Kapitel 2.10.7). Für den Totalverdau 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.

Klenowbehandlung von DNS

Das Klenowfragment entsteht durch proteolytische Spaltung der DNS-Polymerase I aus *E. coli*. Es entspricht dem C-terminalen Teil der Polymerase I und besitzt die 5' → 3'-Polymeraseaktivität sowie die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität. Dadurch kann es sowohl überstehende 5'-Enden als auch überstehende 3'-Enden in glatte Enden verwandeln und eignet sich daher zur Modifikation von DNS-Molekülen mit inkompatiblen Enden, die miteinander verknüpft werden sollen. Nach einem vollständigen Restriktionsverdau wurden dem Ansatz zwei Einheiten Klenowenzym und 10 pmol Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) hinzugefügt. Anschließend wurde für zwei weitere Stunden bei 37°C inkubiert.

Dephosphorylierung von DNS

Um eine Selbstligation des Vektors mit kompatiblen Enden 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 bzw. der Linearisierung des Vektors wurde dem Ansatz eine Einheit Alkalische Phosphatase zugegeben und dieser bei 37°C mindestens eine Stunde inkubiert. Um bei der anschließenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden, wurde das Enzym für 10 min bei 65°C inaktiviert und durch Qiagen Säulchen von der DNS abgetrennt.

2.10.5 Ligation von DNS-Molekülen

Die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNS-Moleküle. Sie vermag sowohl überstehende Enden als auch glatte Enden miteinander zu verknüpfen.

Durchführung:

- Vektor und DNS-Insert im molaren Verhältnis 1:3 mischen
- 2 µl 10-fach Inkubationspuffer und 1-2 Einheiten T4-DNS-Ligase hinzufügen
- mit H₂O_{bidest} ad 20 µl auffüllen
- Inkubation bei 16°C ÜN

TA- Cloning[®] Kit:

Bei Klonierungen von PCR-Produkten in die Vektoren pCR II und pCR II-TOPO (Kapitel 2.7.1) wird die Eigenschaft thermostabiler DNS-Polymerasen, an alle doppelsträngigen DNS-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenutzt. PCR-Produkte können so direkt in die Vektoren pCR II und pCR II-TOPO kloniert werden, da sie die kompatiblen Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzen.

2.10.6 Transformation von *E.coli* Bakterien

CaCl₂ behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden (Cohen et al., 1972).

Durchführung:

- 100 µl kompetente Bakterien (Lagerung bei -80°C) auf Eis auftauen lassen
- Ligationsansatz bzw. etwa 100 ng zirkuläre doppelsträngige DNS dazupipettieren
- Inkubation für 30 min auf Eis
- Hitzeschritt (2 min/42°C)
- Inkubation für 2 min auf Eis
- 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugeben
- Inkubation für 1 h im 37°C Schüttler, um Expression der plasmidkodierte Antibiotikumresistenz zu ermöglichen
- 100 µl und 200 µl ausplattieren und ÜN bei 37°C unter Selektionsdruck wachsen lassen

2.10.7 Southernblot 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 mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen werden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlung werden die Fragmente in kleinere Stücke zerlegt und denaturiert. Mittels eines Kapillarblots werden sie auf eine Nylonmembran transferiert, so daß ein Abbild des Fragmentmusters des Agarosegels auf dem Filter entsteht.

Durchführung:

- Restriktionsverdau von 20 µg chromosomaler DNS
- DNS-Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (30V/ÜN)
- Dokumentation mit Längenstandard (z.B. Photographie mit Lineal)
- das Gel zur partiellen Depurinierung etwa 10 min in 0,25 N HCl schwenken
- das Gel zur Denaturierung und Spaltung an den depurinierten Stellen etwa 30 min in 0,4 N NaOH schwenken
- die Nylonmembran auf die gleiche Größe des Gels zurechtschneiden
- Befeuchten der Membran in H₂O_{bidest}
- die Membran in 0,4 N NaOH etwa 15 min äquilibrieren

Aufbau des Kapillarblots:

- Gelträger auf Ränder von zwei mit 0,4 N NaOH Blotlösung gefüllten Wannen stellen
- darauf luftblasenfrei folgende Schichten plazieren
 - ein mit Blotlösung befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier, dessen Enden in die Blotlösung eintauchen
 - Gel mit der Oberseite nach unten
 - Nylonmembran
 - 2 Lagen befeuchtetes 3 MM Whatmanpapier
 - 9 Lagen trockenes 3 MM Whatmanpapier
 - ca. 10 cm Zellstoffpapier
 - Glasplatte

Der Kapillarblot wird mit etwa 0,5 kg beschwert und ÜN bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung nach oben gesaugt, und die DNS-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert.

- die Membran kurz in 2 x SSC waschen, um Gelreste zu entfernen
- DNS durch UV-Kreuzvernetzung auf der noch feuchten Nylonmembran fixieren

Radioaktive Markierung der Sonde

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wird das Klenow-Fragment benutzt, welches an einzelsträngiger DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten Nukleotiden zu unmarkierten Nukleotiden wird die neusynthetisierte DNS radioaktiv (Feinberg und Vogelstein, 1984). Verwendet wurde der "readiprime"-Kit (Amersham), mit dem bis zu 25 ng DNS unter Verwendung von 50 µCi ³²P-dCTP markiert werden können. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide werden mit NucTrap Säulchen (Stratagene) 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 Hybridmoleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sichtbar gemacht werden. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.3.1 aufgeführt.

Durchführung:

- Membran ÜN bei 65°C in 20 ml frischer Hybridisierungslösung prähybridisieren
- markierte, hitzedenaturierte Sonde und 5 mg hitzedenaturierte Lachsspermien-DNS zugeben
- ÜN bei 65°C hybridisieren
- stringentes Waschen mit Lösung I: 2 mal 30 min bei 65°C
- stringentes Waschen mit Lösung II: 1 mal 30 min bei 65°C
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) oder durch Schwärzung eines Röntgenfilmes detektieren

2.10.8 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen, einzelsträngige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um so extrem viele Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz zu produzieren (Mullis und

Faloon, 1987). Meist wird als Ausgangsmaterial doppelsträngige DNS benutzt. Nach Hitze-denaturierung hybridisieren spezifische Primer, die jeweils das 5'-Ende und das 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz flankieren, an die einzelsträngige DNS. Die Primerverlängerung erfolgt durch eine thermostabile DNS-Polymerase. Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung über mehrere Zyklen zur Anreicherung der gewünschten DNS-Sequenz.

Reaktionsansatz:	DNS	ca. 100 ng
	1 µl	Primer 1 (100 µM)
	1 µl	Primer 2 (100 µM)
	5 µl	10x Puffer (Kapitel 2.3.1)
	10 µl	dNTP (Kapitel 2.3.1)
	1 µl	Taq-Polymerase (5 Einheiten/µl)
	ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Durchführung:

- Reaktionsansatz auf Eis zusammenpipettieren, kurz vortexen und abzentrifugieren
- vorsichtig mit 50 µl Mineralöl beschichten, um Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu vermeiden
- Durchführung des Reaktionszyklus unter den in Tabelle 2.1 angegebenen Bedingungen

Tabelle 2.12: Standard PCR-Bedingungen

Funktion	Dauer	Temperatur
DNS-Denaturierung	5 min	95°C
DNS-Denaturierung	1 min	95°C
Primerhybridisierung	30 sec	59-65°C
Primerverlängerung	1 min 30 sec	72°C
Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	24 h	4°C

30 Zyklen

2.10.9 Sequenzanalyse

In der Kettenabbruchmethode wird eine DNS-Polymerase benutzt, um den Komplementärstrang des zu sequenzierenden DNS-Abschnittes herzustellen (Sanger et al., 1977). Zur Synthese benutzt das Enzym Desoxyribonukleosidtriphosphate, die es an spezifische Primer anhängt. Da sich im Reaktionsansatz auch markierte 2', 3'-Dideoxynanaloga befinden, nach deren Einbau die weitere DNS-Synthese stoppt, werden Fragmente verschiedenster Länge produziert, die alle an ihrem 3'-Ende das markierte Dideoxynanalogon besitzen. Durch die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese werden die DNS-Moleküle aufgetrennt und je nach verwendeter Markierung sichtbar gemacht.

Bei dem Kit, der in dieser Arbeit verwendet wurde, wird die Reaktion in einem Ansatz durchgeführt, in dem sich vier verschiedene fluoreszenzmarkierte Didesoxyanaloge befinden. Der Einsatz einer thermostabilen DNS-Polymerase ermöglicht die Sequenzierungsreaktion nach der „Cycle-Sequencing“-Methode, die auf dem Prinzip der PCR (Kapitel 2.10.8) beruht.

Reaktionsansatz:	0,8-1,2 µg	DNS
	10 pmol	Sequenzierprimer
	8 µl	Terminationsmix
	ad 20 µl	H ₂ O _{bidest}
	50 µl	Mineralöl
Reaktionsbedingungen:	Denaturierung	96°C
	Primer-Anlagerung	50°C
	Primer-Verlängerung	60°C
	bis zur Aufarbeitung	4°C
		30 sec
		15 sec
		4 min(25 Zyklen)

Durchführung:

- den Reaktionsansatz auf Eis zusammenpipettieren und mit leichtem Mineralöl überschichten und kurz abzentrifugieren
- nach beendeter Reaktion das Volumen auf 100 µl erhöhen
- Reaktionsansatz in ein neues ERG überführen
- DNS mit 0,3 M Natriumacetat, pH = 4,8 und 2,5 Volumen EtOH_{abs.} bei -20°C mindestens 1 h fällen
- Zentrifugieren (15000 UpM/30 min/4°C) und Pellet zweimal mit 70 % EtOH waschen
- Pellet bei 37°C trocknen und in 4 µl Probenauftragspuffer (2.3.1) aufnehmen
- vor dem Auftragen auf das Gel die Probe erhitzen (90°C/2 min)
- Probe bis zum Auftragen auf Eis aufbewahren

Sequenziergel

Die Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel erlaubt im Gegensatz zum Agarosegel eine Auftrennung von Fragmenten mit extrem geringen Größenunterschieden. Unter denaturierenden Bedingungen wandern die DNS-Fragmente aus den Sequenzierungsreaktionen im elektrischen Feld unterschiedlich schnell und werden so nach der Größe aufgetrennt. Die Detektion erfolgt durch einen Laser.

Durchführung:

- in einem Becherglas Harnstoff, Amberlite, H₂O und Acrylamid/Bis unter ständigem Rühren leicht erwärmen, bis sich der Harnstoff gelöst hat
- Ionentauscher mit einem 0,2 µm Filter abtrennen und TBE-Puffer hinzufügen
- Gelflüssigkeit unter Vakuum entgasen
- unmittelbar vor dem Gießen 300 µl APS (10 % in H₂O_{bidest}) und 15 µl TEMED hinzufügen

2.10.10 Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe

Das zu untersuchende Gewebe wird unter sterilen Bedingungen aus den Versuchstieren entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Isolierung der RNS wird eine Methode angewendet, bei der die Zellen durch Homogenisierung und Verwendung von Detergenzien aufgeschlossen werden (Chomczynski und Sacchi, 1987). Detergenzien wie Guanidiniumthiocyanat und Natriumlaurylsarcosin zerstören zelluläre Strukturen und bewirken die Denaturierung von Proteinen. Die durch Zellyse freigesetzten RNasen werden durch Guanidiniumthiocyanat und β-Mercaptoethanol inaktiviert. Die Abtrennung der RNS von anderen Nukleinsäuren erfolgt durch saure Phenolextraktion.

Puffer und Lösungen:

Bei der Herstellung folgender Puffer und Lösungen muß darauf geachtet werden, daß jegliche Kontamination mit RNasen vermieden wird. Eine Möglichkeit zur Inaktivierung von RNasen ist die Behandlung von Lösungen mit DEPC, einem RNase Inhibitor. Die anschließende Inaktivierung von DEPC ist unbedingt notwendig, da es sonst durch Carboxymethylierungsreaktionen zur Modifizierung von Purinbasen der RNS kommt.

DEPC-H₂O:

0,1 % DEPC in H₂O_{bidest}

Lösung ÜN rühren

DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

35 % Natriumlaurylsarcosin:

Die Lösung wird mit DEPC-H₂O angesetzt

1 M Natriumcitrat, pH = 7,5:

Natriumcitrat in H₂O_{bidest} lösen, pH einstellen

Lösung mit 0,1 % DEPC behandeln

DEPC durch Autoklavieren inaktivieren

Guanidiniumthiocyanat (GSCN):

25 g Guanidinthiocyanat
0,25 g Natriumlaurylsarcosin (0,71 ml einer 35 % Lösung)
0,75 ml 1M Natriumcitrat, pH = 7,5
0,35 ml Merkaptoethanol
ad 50 ml DEPC-H₂O

2 M Natriumacetat, pH = 4,0:

Natriumacetat in H₂O_{bidest} lösen
pH mit Eisessig einstellen
Lösung mit 0,1 % DEPC behandeln
Lösung autoklavieren

3 M Natriumacetat, pH = 5,0:

Herstellung s.o.

1 M Tris/HCl, pH = 9,5:

Tris in DEPC-H₂O lösen
pH mit HCl einstellen, dabei den pH nur von entnommenen Aliquots messen
Lösung autoklavieren

Phenol/Chloroform Tris-gesättigt, pH = 9,5:

Phenol und 1 M Tris/HCl, pH = 9,5 1:1 mischen und 30 min rühren
mehrere Stunden stehen lassen bis sich die Phasen getrennt haben
obere wässrige Phase verwerfen
2 x Äquilibrierung wiederholen
1 Volumen Chloroform zugeben
Lagerung im Kühlschrank

Phenol, H₂O gesättigt

Chloroform

RNase freie Pipettenspitzen, Schraubdeckelgefäße, ERG

Durchführung:

- Gewebe aus flüssigem Stickstoff entnehmen und in ein 15 ml Schraubdeckelgefäß mit 3 ml kaltem GSCN geben
- Gewebe sofort mittels Ultraturrax homogenisieren
- zentrifugieren (5 min/2000 UpM), um feste Bestandteile abzutrennen
- je 400 µl Überstand in ein ERG geben, 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat zugeben und sofort vortexen
- 1 Volumen Phenol (H₂O-gesättigt) zugeben und sofort vortexen
- 1/7 Volumen Chloroform zugeben und kräftig schütteln

- 15 min Inkubation auf Eis
- zentrifugieren (15 min/13000 UpM/4°C)
- obere wässrige Phase in ein neues ERG überführen und mit 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- pelletieren (15min/13000 UpM/4°C)
- 3-5 Pellets in 400 µl GSCN lösen und wiederum mit 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
- pelletieren (15 min/13000 UpM/ 4°C)
- Phenol/Chloroform-Extraktion:
 - Pellet in 400 µl DEPC-H₂O aufnehmen und lösen
 - 1 Volumen Phenol/Chloroform (Tris gesättigt, pH = 9,5) zugeben und 30 sec. vortexen
 - zentrifugieren (1 min/13000 UpM/4°C)
- Überstand mit 0,3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen EtOH_{abs.} mindestens 1 h bei -20°C fällen
 - pelletieren (15 min/13000 UpM/4°C)
- Pellet mit 70 % Ethanol waschen und Ethanol quantitativ abnehmen
- Pellet in 100-200 µl DEPC-H₂O aufnehmen und 5 min bei 65°C lösen
- Bestimmung der RNS-Konzentration bei 260 nm im Photometer

2.10.11 Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Zellen

Zur Isolierung von RNS aus Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und dann direkt in kaltem GSCN lysiert. Die weitere RNS Isolierung erfolgte analog zu 2.10.10.

2.10.12 Elektrophoretische Auftrennung von RNS

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

Durchführung:

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

2.10.13 Northernblot Analyse

Transfer von RNS auf Nylonmembranen

Der Transfer vom Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillarkräfte, die durch den aufsteigenden Puffer hervorgerufen wurden. Durch Methylenblaufärbung der Membran kann die RNS sichtbar gemacht werden (Wilkinson et al., 1991).

Durchführung:

- Agarosegel zweimal 5 min in H₂O_{bidest} schwenken, um Formaldehyd zu entfernen
- Nylonmembran auf die gleiche Größe des Gels zurechtschneiden
- die Membran ca. 5 min mit 10 x SSC äquilibrieren
- Kapillarblot mit 10 x SSC Puffer aufbauen
- Blot mit ca. 0,5 kg beschweren und ÜN inkubieren
- die Membran mit der gebundenen RNS kurz in 2 x SSC waschen
- die RNS auf der noch feuchten Membran durch UV Kreuzvernetzung fixieren
- Membran in Methylenblau (0,5 M NaAc pH = 4,8/0,04 % Methylenblau) leicht schwenken, bis RNS sichtbar wird
- Hintergrundfärbung durch Schwenken in H₂O_{bidest} entfernen

Nicht-radioaktive RNS/DNS Hybridisierung

Analog zur radioaktiven Markierung (Kapitel 2.10.7) wurde auch bei der nicht-radioaktiven Markierung der Sonde das Klenowfragment zur Synthese der markierten DNS-Sonde verwendet. Im Reaktionsansatz befinden sich ein Oligonukleotid-nonamer-Gemisch, das als Primer dient, Desoxynukleotide und auch Fluoreszein-markierte dUTPs, die anstelle von dTTP eingebaut werden können. Nach dem Markieren kann die Sonde entweder sofort benutzt werden oder bis zu sechs Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Eine Entfernung von nicht eingebauten Fluoreszein-11-dUTPs vor der Verwendung ist nicht nötig. Nach der Hybridisierung und dem stringenten Waschen der Nylonmembran bindet ein mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-Fluoreszein-Antikörper an das Fluoreszein-11-dUTP der Sonde. Nach Entfernung des überschüssigen Konjugats wird das Substrat Dioxetan zugegeben, das in einer licht-emittierenden Reaktion von der Alkalischen Phosphatase umgesetzt wird. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgt durch Schwärzung eines Röntgenfilmes.

Durchführung:

In dieser Arbeit wurde für die Markierung der Sonde und deren Detektion ein nicht-radioaktiver Hybridisierungskit der Firma Amersham verwendet. Der Ablauf von Sondenmarkierung, Detektion und Hybridisierung, sowie die Herstellung der verwendeten Lösungen entsprach den Angaben des Herstellers.

Radioaktive RNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/RNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen DNS-Sonde und der dazu komplementären nachzuweisenden RNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen doppelsträngigen DNS/RNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybridmoleküle können durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden. Alle Lösungen sind in Kapitel 2.3.1 aufgeführt.

Durchführung:

- Membran mehrere Stunden bei 42°C in 20 ml Prähybridisierungslösung unter Zugabe von $100\ \mu\text{g/ml}$ denaturierter Lachssperma DNS inkubieren
- Hybridisierungslösung erneuern, diesmal ohne Lachssperma DNS
- markierte, hitzedenaturierte Sonde zugeben (Markierung wie in Kapitel 2.10.7) und ÜN bei 42°C hybridisieren
- stringentes Waschen mit Waschlösung I (Northern): 3 mal 15 min bei RT
- stringentes Waschen mit Waschlösung II (Northern): 3 mal 30 min bei 65°C
- stringentes Waschen mit Waschlösung III (Northern): 2 mal 15 min bei RT
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) oder durch Schwärzung eines Röntgenfilmes detektieren

3 ERGEBNISSE

3.1 PCR-Select Screen

PCR-Select ist eine Methode, die auf subtraktiver Hybridisierung basiert und die zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene herangezogen werden kann (Jin et al., 1997; Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1999). In dieser Arbeit wurde ein Kit der Firma Clontech verwendet, um zunächst die cDNS der TNF α und IFN γ stimulierten ANA-1 Makrophagen Zelllinie gegen die cDNS aus unstimulierten ANA-1 Zellen zu hybridisieren.

3.1.1 Durchführung des PCR-Select

Als Ausgangsmaterial für PCR-Select dienten 2 μ g PolyA RNS, die mit einer Standardmethode aus unstimulierten ANA-1 Zellen und aus Zellen, die für 16 Stunden mit 55 U/ml IFN γ und 2000 U/ml TNF α stimuliert waren, isoliert wurde. Die beiden RNS Präparationen wurden in doppelsträngige cDNS umgeschrieben, die dann zwei aufeinanderfolgenden Hybridisierungsreaktionen unterworfen wurden. Im letzten Schritt wurden durch eine PCR diejenigen cDNS Fragmente, die differentiell in den stimulierten ANA-1 Zellen exprimiert waren, spezifisch angereichert. Die PCR Produkte wurden in den pCR II-TOPO Vektor kloniert und in Bakterien transformiert. Von 70 Klonen wurde die Nukleotidsequenz durch Sequenzierung bestimmt und unter Verwendung des BlastN Algorithmus mit bekannten Sequenzen in der GenBank verglichen (Altschul et al., 1997).

Um die Effizienz der subtraktiven Hybridisierungsmethode zu überprüfen, wurden die 70 subklonierten cDNS Fragmente im Northernblot auf ihre IFN γ Induzierbarkeit hin überprüft. Hierfür wurde RNS aus unstimulierten und aus TNF α und IFN γ stimulierten ANA-1 Zellen isoliert, im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und anschließend mit den radioaktiv markierten cDNS Fragmenten, die als Sonden dienten, hybridisiert.

3.1.2 Ergebnis des PCR-Select Screens

Das Ergebnis der Sequenzierung der 70 subklonierten cDNS Fragmente ist in Tabelle 3.1 aufgelistet. Interessanterweise waren 18 cDNS Fragmente Mitglieder der 47 kDa oder der 65 kDa GTPasen Familie (Kapitel 3.2). Unter den 24 bekannten Genen waren auch die Chemokine IP-10 (6 x vertreten) und Mig (mouse monokine inducible by IFN γ , 3 x vertreten), CD40 und IRF-7 (interferon regulatory factor 7, 1x vertreten). Weiterhin wurden 5 Fragmente isoliert, die keinerlei Homologie zu bekannten Genen in der GenBank aufwiesen. Von 13 Klonen waren die Sequenzen zu kurz oder nicht auswertbar. Im Northernblot konnte gezeigt werden, daß nur 10 der 70 analysierten Klone in ANA-1 Makrophagen nicht durch IFN γ induzierbar waren.

Tabelle 3.1: Ergebnis der Sequenzanalyse von 70 PCR-Select Fragmenten.

G-Proteine	bekannte Gene	unbekannte Gene	nicht auswertbar	nicht IFN γ induziert
18	24	5	13	10

3.2 Neue Mitglieder der 47 kDa und 65 kDa GTPasen Familie

Interessanterweise waren ca. 30 % aller analysierten cDNS Fragmente entweder der 47 kDa oder der 65 kDa Familie der GTPasen zuzuordnen. In einem unabhängig durchgeführten PCR-Select Ansatz, in dem IFN γ stimulierte embryonale Fibroblasten (EF) gegen unstimulierte EF hybridisiert wurden, war ein ähnlich hoher Anteil an GTPasen zu verzeichnen (Boehm et al., 1998). Dieser Screen wurde in Zusammenarbeit mit einer Kölner Arbeitsgruppe (U. Boehm, J. Howard) durchgeführt. Die Hochregulation der 47 kDa und der 65 kDa GTPasen scheint eine der dominierenden zellulären Antworten auf IFN γ darzustellen.

3.2.1 Identifizierung von neuen Mitgliedern der 47 kDa und 65 kDa GTPasen Familien

Von den 18 GTPase cDNS Fragmenten konnte das 11 mal vorkommende mGBP-2 aufgrund seiner Homologie zu Mitgliedern der 65 kDa GTPasen Familie eindeutig dieser Familie zugeordnet werden (Tabelle 3.2). Von dem mGBP-2 Gen war bislang nur die Promotorregion und die 5'-Region des ersten Exons in der Datenbank veröffentlicht (Briken et al., 1995). Aufgrund dieser Sequenzinformation und der Tatsache, daß die 11 cDNS Fragmente verschiedenste Bereiche des gesamten Gens umfaßten, war es möglich, über einen PCR Ansatz die volle Länge cDNS von mGBP-2 zu identifizieren (Boehm et al., 1998). Das mGBP-2 stellt somit ein neues Mitglied der 65 kDa GTPasen Familie dar. Die verbleibenden sieben GTPase Fragmente waren IGTP (3 x vertreten), TGTP (2 x vertreten) und IIGP (2 x vertreten). IIGP ist ein neues Mitglied der 47 kDa GTPasen Familie, da die cDNS hohe Homologien zu Mitgliedern dieser Familie aufwies. Die volle Länge cDNS wurde durch Hybridisierung einer λ -cDNS Bank mit einem IIGP cDNS Fragment erhalten (Boehm et al., 1998).

Tabelle 3.2: Zuordnung der 18 GTPasen zur 47 kDa oder 65 kDa Familie.

65 kDa (11)	47 kDa (7)		
mGBP-2 (11)	IGTP (3)	TGTP (2)	IIGP (2)

3.2.2 Expression von mGBP-2 und IIGP in ANA-1 und EF

Zur Verifizierung der IFN γ induzierten Genexpression von mGBP-2 und IIGP wurde eine Northernblot Analyse mit RNS aus embryonalen Fibroblasten (EF) von C57BL/6 Mäusen und IFN γ R defizienten Mäusen und aus ANA-1 Zellen vor und nach Stimulierung mit IFN γ (1000 U/ml) durchgeführt (Abb. 3.1). Zusätzlich wurden EF aus IRF-1 (interferon regulatory factor-1) defizienten Mäusen eingesetzt, um zu untersuchen, ob es sich bei mGBP-2 und IIGP um primär oder sekundär IFN γ induzierbare Gene handelte. Beide GTPasen waren in unstimulierten EF und ANA-1 nicht exprimiert. Sie wurden jedoch in beiden Zelltypen durch IFN γ massiv induziert. IIGP war im Gegensatz zu mGBP-2 auch in EF aus IRF-1^{-/-} Mäusen deutlich induzierbar. IIGP wird demnach IRF-1 unabhängig reguliert, wohingegen die IFN γ Induzierung von mGBP-2 von IRF-1 abhängig ist.

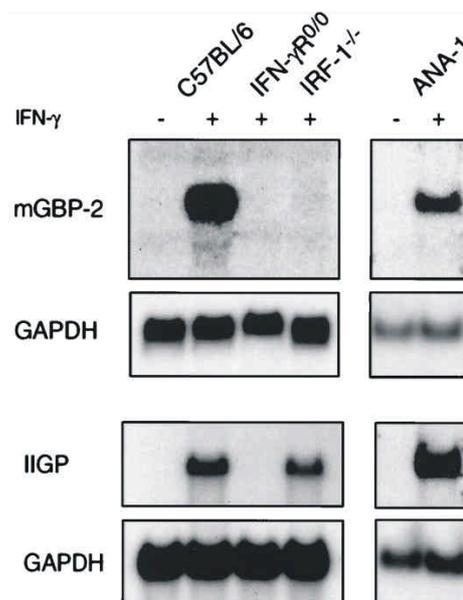


Abb. 3.1: Expression von mGBP-2 und IIGP in unstimulierten und IFN γ stimulierten EF und ANA-1 Zellen. EF wurden aus C57BL/6 Mäusen, IFN γ R^{-/-} und IRF-1^{-/-} Mäusen gewonnen. EF und ANA-1 Zellen wurden für 24 h mit 1000 U/ml IFN γ stimuliert. Die RNS wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit mGBP-2, IIGP und GAPDH spezifischen Sonden hybridisiert.

3.2.3 Expression von mGBP-2 und IIGP nach Listerieninfektion

Die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ist ein häufig angewandtes Infektionsmodell zum Studium der Abwehr von intrazellulär replizierenden Bakterien. IFN γ und TNF α sind in der Abwehr gegen Listerien essentiell, da sowohl IFN γ R^{-/-} Mäuse als auch TNFRp55^{-/-} Mäuse nicht in der Lage sind, eine Infektion mit *L. monocytogenes* zu überleben (Huang et al., 1993; Pfeffer et al., 1993). Deshalb wurde untersucht, ob die IFN γ induzierbaren Gene mGBP-2 und IIGP nach Listerieninfektion in der Leber von C57BL/6 Mäusen, IFN γ ^{-/-} Mäusen und TNFRp55^{-/-} Mäusen induzierbar sind. Wie aus Abb. 3.2 hervorgeht, waren mGBP-2 und IIGP drastisch in der Leber von infizierten C57BL/6 Mäusen induziert. Dagegen war keine Induk-

tion in $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Mäusen erkennbar. Die beiden GTPasen werden demnach spezifisch durch $\text{IFN}\gamma$ reguliert. Da sie in $\text{TNFRp55}^{-/-}$ Mäusen normal induziert waren, spielt eine $\text{TNF}\alpha$ Induktion dieser Gene über den TNFRp55 *in vivo* wahrscheinlich keine entscheidende Rolle.

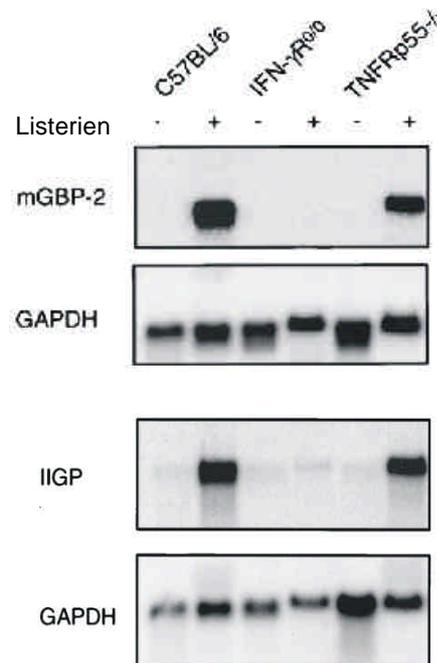


Abb. 3.2: Expression von mGBP-2 und IIGP in der Leber von Mäusen nach Listerieninfektion. C57BL/6 Mäuse, $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Mäuse und $\text{TNFRp55}^{-/-}$ Mäuse wurden mit 50000 *L. monocytogenes* i.p infiziert. Nach 24 h wurden die Tiere schmerzfrei getötet und die Leber für RNS Isolierung entnommen.

3.3 Charakterisierung der PUMA-G cDNS

3.3.1 Durchführung eines modifizierten PCR-Select Screens

Die induzierbaren Gene aus dem PCR-Select Screen waren alle nicht nur in ANA-1 Zellen, sondern auch in embryonalen Fibroblasten induzierbar. Da Fibroblasten wahrscheinlich nicht über die antimikrobiellen Effektormechanismen wie Makrophagen verfügen, wurde ein zweiter, modifizierter PCR-Select Screen durchgeführt. Dieser sollte eine Makrophagen spezifische Anreicherung von Genen zur Folge haben. Prinzipiell wurde der modifizierte PCR-Select Screen auch wie der erste durchgeführt, außer daß der "driver" cDNS, die zuvor nur aus cDNS von unstimulierten ANA-1 bestand, cDNS aus $\text{IFN}\gamma$ stimulierten EF beigemischt wurde. 81 cDNS Fragmente wurden subkloniert, sequenziert und mit GenBank-Sequenzen verglichen. Interessanterweise wurden diesmal keine cDNS Fragmente isoliert, die im ersten PCR-Select Screen häufig vertreten waren wie die GTPasen oder andere redundante Fragmente wie Mig oder IP-10. Ein 1211 bp Transkript mit dem Arbeitsnamen AS 333 war in ANA-1, jedoch nicht in EF, stark durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ induzierbar und zeigte Homologie zur Superfamilie der sieben Transmembran-Rezeptoren.

3.3.2 Volle Länge Klonierung der PUMA-G cDNS

Zur Klonierung der vollen Länge cDNS von Klon AS 333 wurden zwei "nested" RACE-PCRs (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt, um das fehlende 5'- und 3'-Ende zu erhalten (Abb. 3.3). Als Matritze für die PCR Reaktion diente eine cDNS-Bank aus murinem Lungengewebe (Marathon-Ready™ cDNA Kit, Clontech).

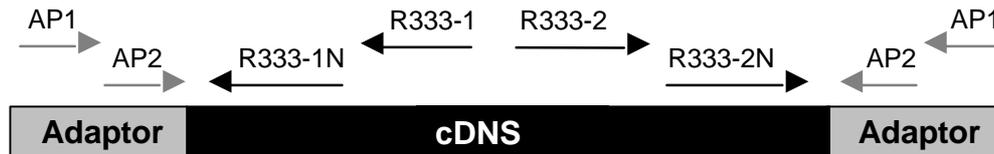


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der "nested" RACE-PCR Reaktion.

In der ersten PCR-Reaktion wurde das Primerpaar AP1/R333-1 zur Amplifikation des 5'-Endes und das Primerpaar AP1/R333-2 zur Amplifikation des 3'-Endes der AS 333 cDNS benutzt (Kapitel 2.6). Beide Reaktionen lieferten neben einer Bande zusätzlich eine Vielzahl unspezifischer Produkte, was durch einen Schmier auf dem Agarosegel erkennbar war. In der zweiten PCR Reaktion wurde jeweils das weiter innen liegende Primerpaar AP2/R333-1N bzw. AP2/R333-2N und als Matritze das jeweilige Produkt der ersten PCR verwendet (Kapitel 2.6). Das Ergebnis dieser PCR Reaktionen waren zwei eindeutige Banden, die nach Aufreinigung in den pCR II-TOPO Vektor kloniert und danach in Mehrfachbestimmung sequenziert wurden. Durch den Sequenzvergleich mit dem 1214 bp großen PCR-Select Fragment konnte das fehlende 5'-Ende von 674 bp und das 3'-Ende von 68 bp ermittelt werden. Der volle Länge Klon AS 333 besitzt eine Gesamtlänge von 1956 bp und wurde PUMA-G (protein upregulated in macrophages by IFN γ) benannt.

3.3.3 Charakterisierung der PUMA-G cDNS und Proteinsequenz

Die volle Länge cDNS von PUMA-G ist in Abb. 3.4 dargestellt. Die cDNS besitzt ein ATG Startkodon (bp 59-61), welches von einer Sequenz umgeben ist, die der Kozak Sequenz (Kozak, 1987) teilweise, aber nicht vollständig entspricht. In der 5'-untranslatierten Region befindet sich ein Stopkodon (TGA; bp 23-25). Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 360 Aminosäuren und einer berechneten Proteingröße von 42 kDa. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 9,95.

1	CTCGCCTTGAGCCTTCGCTAGGTGAGGCACTCTGAAGCTGGACTGGCCAGATCCACTC	58
59	ATG AGC AAG TCA GAC CAT TTT CTA GTG ATA AAC GGC AAG AAC TGC TGT GTG TTC CGA GAT GAA	121
1	Met Ser [*] Lys Ser Asp His Phe Leu Val Ile Asn Gly Lys Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Glu	21
	TM 1	
122	AAC ATC GCC AAG GTC TTG CCA CCG GTG TTG GGG CTG GAA TTT GTG TTC GGA CTC CTG GGC AAT	184
22	Asn Ile Ala Lys Val Leu Pro Pro Val Leu Gly Leu Glu Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn	42
185	GGC CTT GCC TTG TGG ATT TTC TGT TTC CAC CTC AAG TCC TGG AAA TCC AGC CGG ATT TTC TTG	247
43	Gly Leu Ala Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile Phe Leu	63
	TM 2	
248	TTC AAC TTG GCC GTG GCT GAC TTT CTC CTG ATC ATC TGC CTG CCG TTC CTG ACG GAC AAC TAT	310
64	Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu Pro Phe Leu Thr Asp Asn Tyr	84
311	GTC CAT AAC TGG GAC TGG AGG TTC GGA GGC ATC CCT TGC CGT GTG ATG CTC TTC ATG TTG GCT	373
85	Val His Asn Trp Asp Trp Arg Phe Gly Gly Ile Pro Cys Arg Val Met Leu Phe Met Leu Ala	105
	TM 3	
374	ATG AAC CGA CAG GGC AGC ATC ATC TTC CTC ACC GTG GTG GCT GTG GAC CGC TAC TTC CGG GTG	436
106	Met Asn Arg Gln Gly Ser[*] Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg Val	126
437	GTC CAT CCA CAC CAC TTC TTG AAC AAG ATC TCC AAC CGG ACG GCG GCC ATC ATT TCT TGC TTC	499
127	Val His Pro His His Phe Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ile Ser Cys Phe	147
	TM 4	
500	TTG TGG GGT CTC ACC ATC GGC CTG ACT GTC CAC CTC CTC TAT ACA AAC ATG ATG ACC AAA AAT	562
148	Leu Trp Gly Leu Thr Ile Gly Leu Thr Val His Leu Leu Tyr Thr Asn Met Met Thr Lys Asn	168
563	GGC GAG GCA TAT CTG TGT AGC AGC TTC AGC ATC TGT TAC AAC TTC AGG TGG CAC GAT GCT ATG	625
169	Gly Glu Ala Tyr Leu Cys Ser Ser Phe Ser Ile Cys Tyr Asn Phe Arg Trp His Asp Ala Met	189
	TM 5	
626	TTC CTC TTG GAA TTC TTC TTG CCC CTG GCC ATC ATC TTG TTC TGC TCA GGC AGG ATC ATC TGG	688
190	Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Ala Ile Ile Leu Phe Cys Ser Gly Arg Ile Ile Trp	210
689	AGC CTG AGG CAG AGA CAG ATG GAC AGA CAT GCC AAG ATC AAG AGG GCC ATC AAC TTC ATC ATG	751
211	Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala Lys Ile Lys Arg Ala Ile Asn Phe Ile Met	231
	TM 6	
752	GTG GTG GCT ATT GTA TTC ATC ATT TGC TTC CTA CCC AGT GTG GCT GTG CGC ATC CGC ATC TTC	814
232	Val Val Ala Ile Val Phe Ile Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Ala Val Arg Ile Arg Ile Phe	252
815	TGG CTT CTC TAC AAA TAT AAC GTA CGC AAC TGT GAC ATC TAC TCC TCG GTG GAC CTG GCT TTC	877
253	Trp Leu Leu Tyr Lys Tyr Asn Val Arg Asn Cys Asp Ile Tyr Ser Ser Val Asp Leu Ala Phe	273
	TM 7	
878	TTT ACC ACC CTT AGC TTT ACC TAC ATG AAC AGC ATG CTG GAC CCT GTG GTC TAC TAT TTC TCC	940
274	Phe Thr Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser	294
941	AGC CCA TCT TTC CCC AAC TTC TTC TCC ACG TGT ATC AAC CGC TGC CTT CGA AAG AAA ACA TTG	1003
295	Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe Phe Ser Thr Cys Ile Asn Arg Cys Leu Arg Lys Lys Thr Leu	315
1004	GGT GAA CCC GAT AAT AAC CGA AGC ACT AGT GTG GAG CTC ACG GGG GAC CCC AGC ACA ACC AGA	1066
316	Gly Glu Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr[*] Ser[*] Val Glu Leu Thr[*] Gly Asp Pro Ser[*] Thr Thr Arg	336
1067	AGT ATT CCA GGG GCG CTA ATG GCT GAC CCC AGT GAG CCA GGC AGC CCC CCT TAT CTG GCT TCC	1129
337	Ser Ile Pro Gly Ala Leu Met Ala Asp Pro Ser Glu Pro Gly Ser[*] Pro Pro Tyr Leu Ala Ser	357
1130	ACA TCT CGT TAAGTTACTATGACAAGAAGGGAGATTGCCGCTCAGGCCCTGTGCTCTCTGGAGAGGCGATTGGCCGTTCCG	1209
358	Thr Ser Arg	360
1210	TTGAACAGGGTAACATCTTCAGATTTGGCTTACGCTTTCTTGGAACTTCTAGATTCCGAGAATCGAATTTAGAGAAACGGCGT	1292
1293	GGTGCAGTGAGCAGTTTGGTTGCGAGGTGCAGCCATAGAAAATCTCAGAGGAACAGAAAGCAGAGTTTCCAGACAGTGGAAA	1375
1376	CTTCTCAGCCTTCCAAGCTTACAGGACTGAAGAAGACAGAGTCTGCAGAGTTTGTAGTCCCAGATGCACCCAGACACACCTCA	1458
1459	GTTCTGCTCAAAGTCACGGATGGCTCTTCGTCCTAGGGTCTTACCTAGCCTGTCCGTTGGGCCCCAGTGAGGACAAGGAGATCC	1541
1542	ACGAACTGGAGGGGATCTCTACCCAGATGTCACCTGATAAGCCAGTTGGTCACTTGTGTTCCGGTGGGACCAGTATACCTTTCA	1624
1625	GCCAGACTTTAGCAGAAATGCTAAAGAGGGGAGGAGATGCAAAAGATTTGATTTGTTCTCCAAGTCTCCAAGGTGGTAAAGAGG	1707
1708	GGGTTAGCCCAGGAGGACTGAACCTCAGTGTGGAGAGAAACAATAACAAATTCAGCTGAGCTTTAAAGGCTTTGGGGAAA	1790
1791	CAGTGGCTTCCCCCTCTGTCTGCGTTTCTTAGTAAAGGAATTCAACTGTGTCCATGGTTGGGGGGGGGGGGGGCGGTTTCAT	1873
1874	TACTTGGGTTTCTGTACTTTAACATCTACCATTTCAATAAATTTTCGACTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1956

Abb. 3.4: Nukleotid und Aminosäuresequenz von PUMA-G. Das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Die Transmembrandomänen (TM 1-7) sind grau hinterlegt. Potentielle Phosphorylierungsstellen sind folgendermaßen dargestellt: PKC Phosphorylierungsstellen sind eingerahmt, potentiell phosphorylierte Serine und Threonine sind mit einem Stern markiert.

Bei der Suche nach Proteinmotiven wurde mit Transmembrandomänen begonnen, da bereits der DNS Vergleich des 1214 bp PCR-Select Fragments mit GenBank eine Homologie zur GPCR-Superfamilie (G-Protein coupled receptor) zeigte. Das charakteristische strukturelle Hauptmerkmal dieser G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist das Vorhandensein von sieben Transmembranhelizes, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus befindet sich auf der extrazellulären Seite der Membran und ist häufig glykosyliert. Der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert (Kapitel 1.3). Durch die Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) konnten zwar mehrere hydrophobe Bereiche in der PUMA-G Aminosäuresequenz identifiziert werden, die Bestimmung der Anzahl und Lage der Transmembrandomänen war jedoch nicht möglich. Das Vorhandensein von sieben Transmembrandomänen konnte bei PUMA-G unter Verwendung des TMPred (Abb. 3.5) und des TMHMM Algorithmus nachgewiesen (Hofmann und Stoffel, 1993; Sonnhammer et al., 1998). Die beiden Algorithmen beruhen auf der statistischen und strukturellen Analyse von Transmembrandomänen Datenbanken.

Neben sieben Transmembrandomänen konnten bei PUMA-G sieben potentielle Protein Kinase C (PKC) Phosphorylierungsstellen und mehrere Phosphorylierungsstellen an Serin und Threonin Resten (Abb. 3.4) identifiziert werden (Woodget et al., 1986). Ein Signalpeptid wurde bei PUMA-G nicht gefunden.

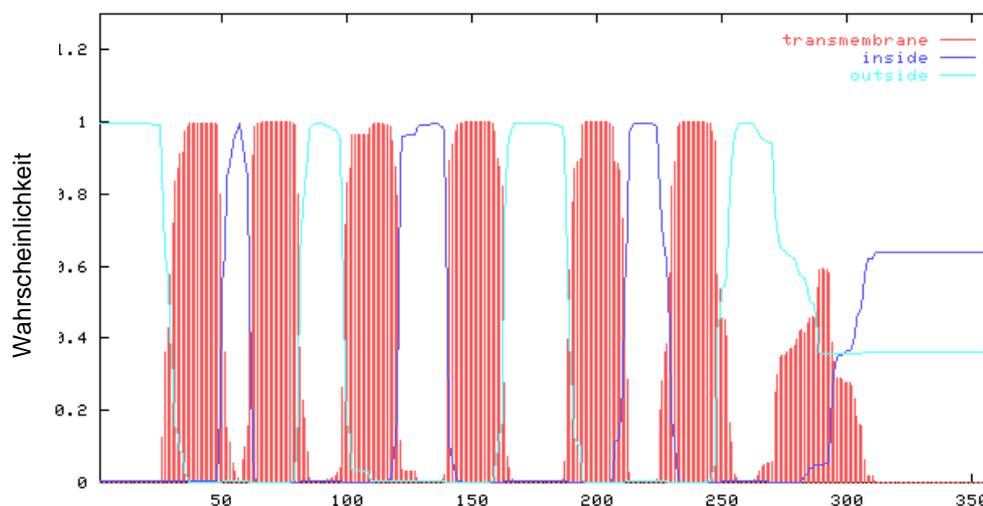


Abb. 3.5: Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Transmembrandomänen bei PUMA-G. Zur Berechnung wurde der TMHMM Algorithmus verwendet.

3.3.4 Homologien von PUMA-G zu anderen Rezeptoren der GPCR Superfamilie

Die Datenbank GenBank wurde unter Verwendung der BLASTP (Altschul et al., 1997) Suchmethode mit der PUMA-G Proteinsequenz nach homologen Proteinen durchsucht. Die Proteinsequenzen mit der besten Übereinstimmung wurden daraufhin paarweise mit der PUMA-G Sequenz mit der CLUSTAL W(1.4) Methode (Thompson et al., 1994) verglichen und so die prozentuale Identität berechnet. Die höchste Homologie wurde zu den zwei humanen Rezeptoren HM74 (Nomura et al., 1993) und GPR31 (Zingoni et al., 1997) gefunden. Das PUMA-G Protein ist zu 73 % mit dem HM74 Protein und zu 30 % mit dem GPR31 Protein identisch. Von beiden humanen GPCR-Rezeptoren sind Ligand und Funktion unbekannt. Beide Rezeptoren konnten jedoch aufgrund struktureller Merkmale in die Rhodopsin-Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren eingeordnet werden (Attwood und Findlay, 1994). Die Rhodopsin-Familie ist die größte und die am besten untersuchte der fünf GPCR-Familien (Kapitel 1.3). Der Vergleich der PUMA-G Proteinsequenz mit HM74 ist in Abb. 3.6 gezeigt. Die größten Sequenzunterschiede sind in den extra- und intrazellulären Domänen zu verzeichnen, wohingegen die Variabilität in den Transmembranhelizes generell geringer ist. Beide Proteinsequenzen besitzen ein konserviertes Aspartat (D) in der zweiten Transmembrandomäne und das hochkonservierte Tripeptid Aspartat-Arginin-Tyrosin (DRY) an der zytoplasmatischen Seite der dritten Transmembrandomäne. Diese Aminosäuren sind für die Rezeptoraktivierung wichtig und innerhalb der Rhodopsin-Familie hoch konserviert (Savarese und Fraser, 1992). Ein weiteres charakteristisches Merkmal der GPCR-Superfamilie ist die Existenz zweier konservierter Cysteine in den beiden ersten extrazellulären Schleifen (Bockaert und Pin, 1999). Sie bilden wahrscheinlich eine Disulfidbrücke und stabilisieren so die Anordnung der Transmembrandomänen (Karnik und Khorana, 1990).

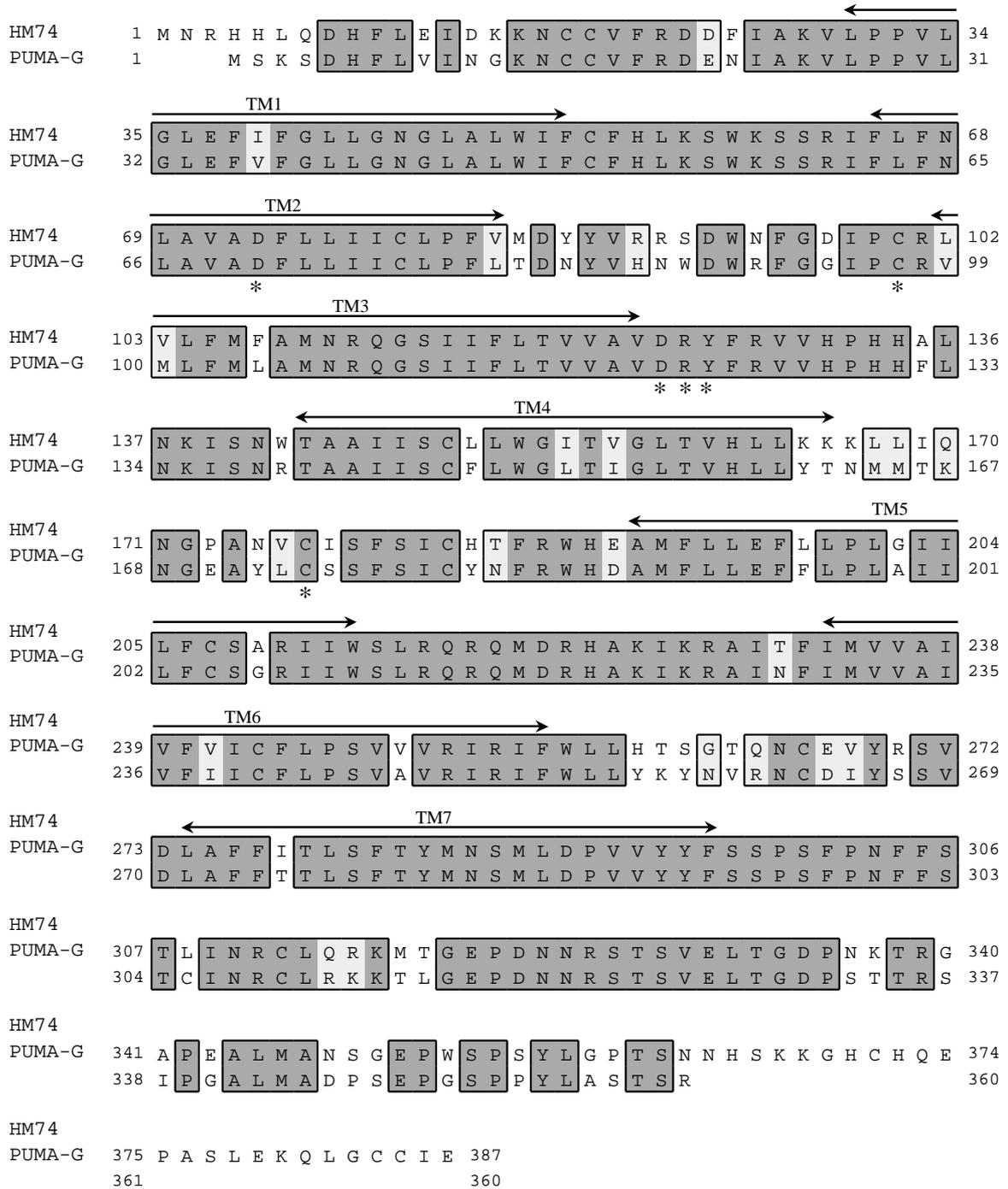


Abb. 3.6: Homologievergleich der Proteine PUMA-G und HM74. Die Aminosäuresequenzen wurden mit der CLUSTAL W(1.4) Methode verglichen. Die beiden Proteine sind zu 73% identisch. Die Zugangsnummer von HM74 für GenBank ist D10923. Die Zugangsnummer von PUMA-G für die EMBL Nukleotidsequenz Datenbank ist AJ300198.

Die Suche nach murinen Homologen von PUMA-G resultierte in einem generell schlechteren Übereinstimmungsgrad. So lassen sich nur geringe Homologien zu dem Bradykinin Rezeptor (25% AS Identität), dem ATP Rezeptor (25% AS Identität), dem Plättchen-aktivierenden Faktor Rezeptor (24% AS Identität), dem CC Chemokin Rezeptor 5 (21% AS Identität), dem Thrombin Rezeptor (21% AS Identität) und dem N-Formylpeptid Rezeptor-1 (20% AS Identität) erkennen. In Tabelle 3.3 sind die Homologien der einzelnen Rezeptoren zueinander aufgelistet.

Tabelle 3.3: Prozentuale Aminosäureidentität verschiedener muriner GPCRs. Die Berechnung der Aminosäureidentität erfolgte nach der CLUSTAL W(1.4) Methode. Die folgenden Abkürzungen wurden benutzt: BR: Bradykinin Rezeptor, TR: Thrombin Rezeptor, FPR-1: N-Formylpeptid Rezeptor, CCR5: CC Chemokin Rezeptor 5, ATP-R: ATP-Rezeptor, PAFR: Plättchen-aktivierender Faktor Rezeptor. Die Zugangsnummern der einzelnen Rezeptoren für GenBank sind: BR (L26047), TR (NM_010169), FPR-1 (L22181), CCR5 (U83327), ATP-R (L14751), PAF (D50872)

	Peptid-Subfamilie				Nukleotid-Subfamilie	PAFR-Subfamilie
	BR	TR	FPR-1	CCR5	ATP-R	PAFR
PUMA-G	25	20	20	21	25	24
BR		23	23	24	24	22
TR			18	17	24	21
FPR-1				25	23	24
CCR5					18	24
ATP-R						24

3.4 Expressionsanalyse von PUMA-G

3.4.1 Kinetik der PUMA-G Expression in ANA-1 Makrophagen

Die Klonierung von PUMA-G erfolgte aus einer für 16 Stunden mit TNF α und IFN γ stimulierten ANA-1 Makrophagen cDNS-Bank, die gegen eine unstimulierte ANA-1 und eine IFN γ stimulierte embryonale Fibroblasten cDNS-Bank subtrahiert wurde. Um den Zeitverlauf der Zytokin induzierten Genexpression zu bestimmen, wurden die ANA-1 Zellen unterschiedlich lange mit TNF α und IFN γ stimuliert und die Genexpression mittels Northernblot-Analyse ermittelt (Abb. 3.7). Die Hybridisierung des Northernblots mit der PUMA-G spezifischen Sonde ergab ein spezifisches Signal bei ca. 2 kb, was aufgrund der cDNS Größe von 1956 bp auch zu erwarten war. Die PUMA-G mRNA war in unstimulierten ANA-1 Zellen nur schwach vorhanden. Die Expression stieg jedoch nach Stimulierung der Zellen mit TNF α und IFN γ drastisch an, erreichte ein Maximum nach ca. vier Stunden und war auch nach 24 Stunden noch erhöht. Die Stimulierung von ANA-1 Zellen mit TNF α allein für 16 Stunden führte

zu keiner erhöhten Genexpression, dagegen resultierte die Stimulierung mit IFN γ allein in einer vergleichbaren Induktion der PUMA-G mRNA Menge wie nach Stimulierung mit beiden Zytokinen.

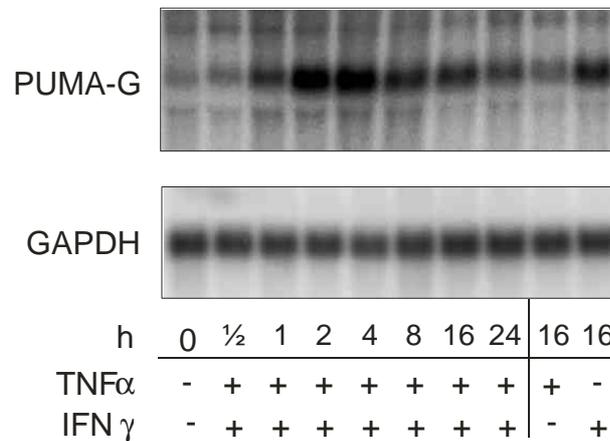


Abb. 3.7: Kinetik der PUMA-G Genexpression nach Stimulierung von ANA-1 Makrophagen mit TNF α und IFN γ . Die Zellen wurden mit 55 U/ml IFN γ und/oder 2000 U/ml TNF α für unterschiedliche Zeiten stimuliert. 20 μ g Gesamt-RNS wurden pro Spur geladen. Die radioaktive Hybridisierung des Northernblots erfolgte mit einer PUMA-G spezifischen Sonde. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit einer GAPDH spezifischen Sonde.

3.4.2 Expression von PUMA-G in Typ I Interferon stimulierten ANA-1 Makrophagen

Interferone vermitteln ihre biologische Wirkung, indem sie in Zielzellen die vermehrte Transkription von Interferon-responsiven Genen bewirken. Neben antiviralen Eigenschaften besitzen Interferone auch wichtige immunmodulatorische Funktionen. Typ I (IFN α/β) und Typ II (IFN γ) Interferone binden an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren und induzieren über ähnliche Signaltransduktionskaskaden die vermehrte Transkription von IFN α/β oder IFN γ spezifischen Genen. Daneben existiert auch ein überlappendes Set an Genen, das durch beide Interferontypen aktiviert werden kann (Staheli, 1990). Synergistische Effekte von IFN α und IFN γ sind ebenfalls beschrieben worden (Boehm et al., 1997).

Um die Wirkung von IFN α und IFN β auf die Transkription von PUMA-G zu untersuchen, wurden ANA-1 Zellen für vier und acht Stunden mit jeweils 100 U IFN α , IFN β oder IFN γ stimuliert und die Genexpression mittels Northernblot analysiert. Die Abb. 3.8 zeigt, daß PUMA-G spezifisch durch IFN γ , jedoch nicht durch IFN α/β induziert wurde. Als Positivkontrolle für die Stimulierung der ANA-1 Zellen mit IFN α/β wurde der Blot zusätzlich mit einer Mx1-Sonde hybridisiert, da die Mx1 mRNA spezifisch von Typ I Interferon induziert wird (Stark et al., 1998).

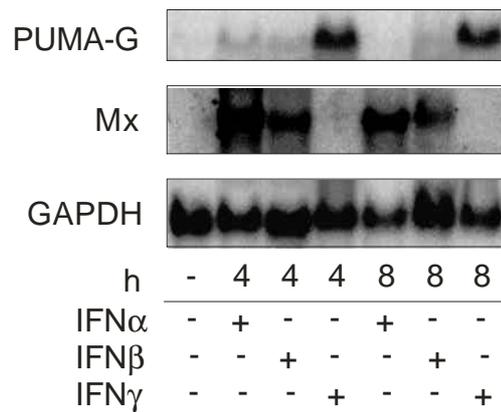


Abb. 3.8: Induktion von PUMA-G in ANA-1 durch IFN γ , jedoch nicht durch IFN α /b. ANA-1 Zellen wurden für 4 oder 8 Stunden mit je 100 U IFN α , IFN β oder IFN γ stimuliert, bevor die Gesamt-RNS isoliert wurde. Der Northernblot wurde mit radioaktiven DNS-Sonden spezifisch für PUMA-G, Mx1 und GAPDH hybridisiert.

3.4.3 PUMA-G Expression in verschiedenen Makrophagen Zelllinien nach IFN γ Stimulierung

Eine Reihe von Makrophagen Zelllinien (Kapitel 2.5.2) wurde auf Induktion der PUMA-G Expression nach IFN γ und TNF α Stimulierung getestet (Abb. 3.9). In diesem Experiment wurden die Zellen für vier Stunden mit TNF α und IFN γ stimuliert, da zu diesem Zeitpunkt die höchste PUMA-G Expression in den ANA-1 Zellen zu verzeichnen war (Abb. 3.7). In allen untersuchten Makrophagen Zelllinien waren die basalen PUMA-G mRNA Mengen in den unstimulierten Zellen mittels Northernblot nicht oder nur schwach nachweisbar. Die PUMA-G mRNA Mengen waren jedoch in allen Zelllinien nach TNF α und IFN γ Stimulierung drastisch erhöht.

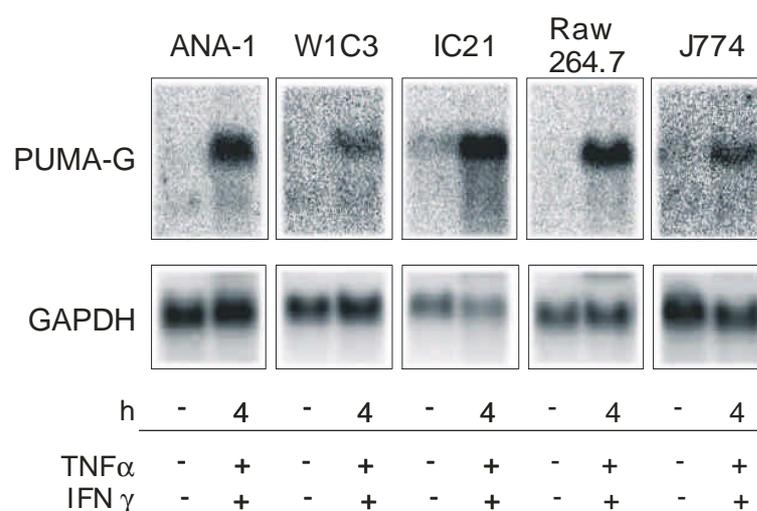


Abb. 3.9: Expressionsanalyse von PUMA-G in verschiedenen murinen Makrophagen Zelllinien nach Stimulierung mit TNF α und IFN γ . Die Zellen wurden für 4 h mit 2000 U/ml TNF α und 55 U/ml IFN γ stimuliert, die Gesamt-RNS wurde isoliert und der Northernblot wurde mit einer PUMA-G und einer GAPDH spezifischen Sonde hybridisiert.

3.4.4 PUMA-G Expression in primären Zellen

Um zu untersuchen, ob PUMA-G auch in primären Makrophagen exprimiert wird, wurden Peritonealmakrophagen aus der Maus isoliert, in Kultur genommen und anschließend mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ behandelt. Die Genexpression wurde wiederum mittels Northernblot untersucht. Die $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ induzierte Genexpression von PUMA-G war in Thioglykolatvorstimulierten Peritonealmakrophagen (PEC) besonders stark ausgeprägt (Abb. 3.10). Interessant war hierbei, daß der unspezifische Thioglykolatreiz, der eine vermehrte Einwanderung der PECs in die Bauchhöhle bewirkte, keinen Einfluß auf die PUMA-G Genexpression besaß.

$\text{IFN}\gamma$ erhöht auch in embryonalen Fibroblasten (EF) stark die Transkriptionsrate Interferonresponsiver Gene (Kapitel 3.2). In EF-Zellen war PUMA-G nicht exprimiert, auch wenn die Zellen dem Zytokinstimulus bis zu 16 Stunden ausgesetzt waren (Abb. 3.10). Die Abwesenheit von PUMA-G in EF-Zellen und die stark induzierbare Genexpression in Makrophagen Zelllinien und primären Makrophagen deutet darauf hin, daß PUMA-G spezifisch in Zelltypen, die antimikrobielle Effektorfunktionen besitzen, aktiviert werden kann.

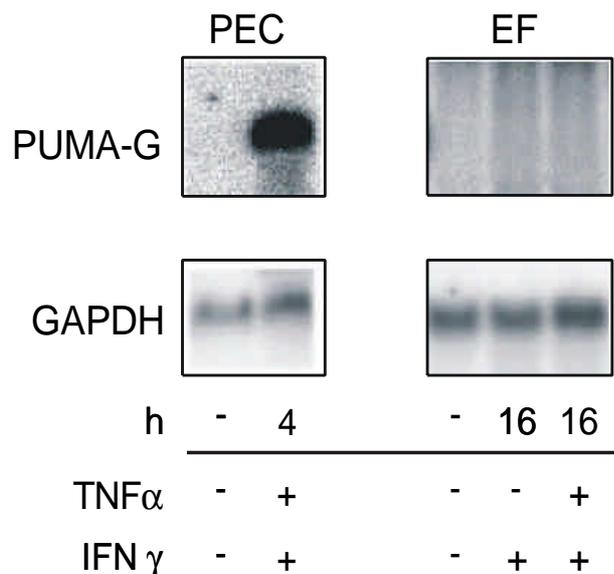


Abb. 3.10: Expressionsanalyse von PUMA-G in primären Makrophagen (PEC) und primären embryonalen Fibroblasten (EF). PECs wurden mit 2000 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und 100 U/ml $\text{IFN}\gamma$ stimuliert, EF-Zellen wurden mit 2000 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und/oder 55 U/ml $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Der Northernblot wurde mit einer PUMA-G und einer GAPDH spezifischen Sonde hybridisiert.

Weiterhin wurden aus dem Knochenmark kultivierte dendritische Zellen auf ihre PUMA-G Expression hin untersucht. Sowohl unreife, wie auch reife dendritische Zellen exprimieren basal PUMA-G mRNA (Abb. 3.11).

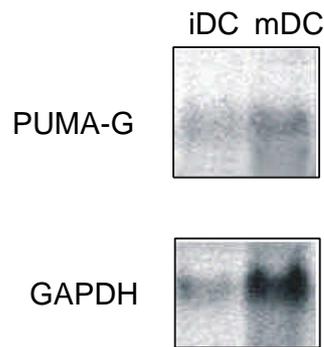


Abb. 3.11: Expressionsanalyse von PUMA-G in unreifen und reifen dendritischen Zellen (DC). Dendritische Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen isoliert und für 6 Tage mit GM-CSF kultiviert (iDC, immature DC). Zur Gewinnung von reifen DCs (mDC, mature DC) wurde dem Medium am Tag 5 zusätzlich 1 µg/ml LPS zugegeben. Die Zellen wurden am Tag 6 geerntet und auf ihre PUMA-G Expression hin untersucht. Der Northernblot wurde mit einer PUMA-G und einer GAPDH spezifischen Sonde hybridisiert.

3.4.5 Expression von PUMA-G in murinen Geweben

Um die Gewebeverteilung von PUMA-G zu charakterisieren, wurde ein Gewebe-Northernblot der Firma Clontech mit einer spezifischen Sonde gegen PUMA-G hybridisiert. Signale für PUMA-G wurden in Lunge, Milz, Herz und Skelettmuskel detektiert. Aufgrund der ungleichmäßigen RNS Beladung, die durch die unterschiedliche Intensität der GAPDH-Banden erkennbar war, war eine Quantifizierung der PUMA-G Expression in verschiedenen Geweben nicht möglich. Die Expression von PUMA-G war demnach in der Lunge und insbesondere der Milz im Verhältnis zu GAPDH am höchsten. Das generelle Expressionsmuster ist dem von gp91 phox sehr ähnlich. Gp91 phox ist ein Bestandteil des Enzymkomplexes zur Generierung reaktiver Sauerstoffintermediate in Neutrophilen und Makrophagen.

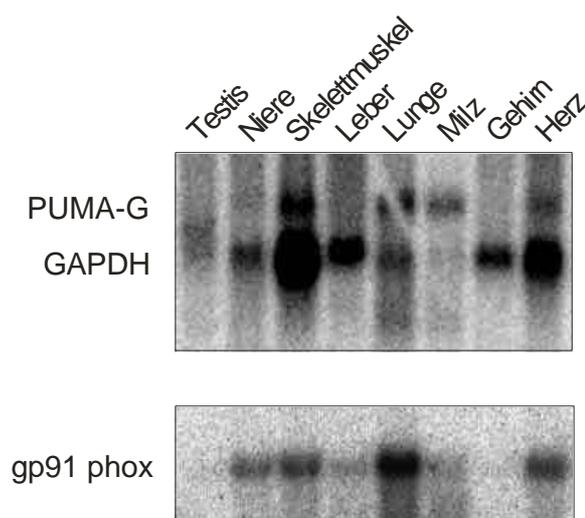


Abb. 3.12: Gewebeverteilung von PUMA-G. Der Gewebelot der Firma Clontech war mit 2 µg PolyA+ RNS beladen und wurde mit den spezifischen Sonden für PUMA-G, GAPDH und gp91 phox hybridisiert.

3.4.6 PUMA-G Expression in Mäusen nach Infektion

Die unabkömmliche Funktion von IFN γ in der Abwehr des Organismus gegen Pathogene wurde durch eine Reihe von Infektionsexperimenten in IFN γ ^{-/-} oder IFN γ R^{-/-} Mäusen bestätigt (Stark et al., 1998; Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993). Beide Mausstämme sind nicht in der Lage, Infektionen mit Mykobakterien oder Listerien zu überleben. Die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ist ein häufig angewandtes Infektionsmodell zum Studium der Abwehr von intrazellulär replizierenden Bakterien (Kapitel 1.1). Um einen möglichen Einfluß von PUMA-G in der Infektionsabwehr gegen *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurde die Expression in C57BL/6 Mäusen und in IFN γ ^{-/-} Mäusen in Milz und Leber nach Infektion ermittelt. Hierfür wurde den Mäusen ein Zehntel der LD50 intraperitoneal injiziert. Nach 24 h und 72 h wurden die Tiere schmerzfrei getötet und Milz und Leber entnommen. Die PUMA-G Expression wurde durch Northernblot ermittelt. Aus Abb. 3.13 ist erkennbar, daß in Milz und Leber von C57BL/6 Mäusen die Expression von PUMA-G nach Infektion leicht erhöht war. Diese Vermehrung könnte auf eine in Milz und Leber induzierte PUMA-G Expression wie z. B. durch IFN γ oder andere spezifische Stimuli zurückzuführen sein. Sie wäre jedoch auch durch einen kumulativen Effekt erklärbar, bedingt durch das massive Einwandern von Makrophagen in Milz und Leber, die bereits basal PUMA-G exprimieren. PUMA-G RNS war auch in Milzpräparationen von IFN γ ^{-/-} Mäusen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß PUMA-G nicht exklusiv durch IFN γ reguliert wird.

Beim Menschen kann eine unkontrollierte Ausbreitung und Vermehrung von Bakterien im Gesamtorganismus das Krankheitsbild des septischen Schocks hervorrufen. In diesem Zustand wird TNF α in großen Mengen im Organismus systemisch freigesetzt. Die destruktiven Wirkungen von TNF α tragen dabei wesentlich zur Sepsispathogenese bei. Mäuse, bei denen der TNFRp55 inaktiviert wurde, sind gegenüber einem experimentell induzierten Endotoxinschock resistent (Pfeffer et al., 1993). Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen, daß auch IFN γ eine wichtige Funktion in der Sepsis zukommt. IFN γ R^{-/-} Mäuse sind einerseits resistenter gegen den endotoxischen Schock (Car et al., 1994), andererseits sind sie in einem polymikrobiellen Infektionsmodell, der Colon ascendens stent peritonitis (CASP), anfälliger (Zantl et al., 1998). Das CASP Modell soll in Mäusen eine abdominale Sepsis widerspiegeln. Durch das Einbringen eines kleinen Röhrchens (14 - 22 gauge) in die Kolonwand kommt es zum kontinuierlichen Austritt von Darminhalt zunächst in das Peritoneum und dann auch ins Blut. Die Konsequenz ist der septische Schock. Eine mögliche Rolle von PUMA-G als IFN γ induziertes Gen sollte in der CASP untersucht werden. In der Leber von Kontrolltieren war mittels Northernblot Analyse PUMA-G mRNA nicht detektierbar, dagegen war 6 h und 10 h nach CASP Operation eine sehr starke Expression zu beobachten (Abb. 3.13). Die Analyse in der Lunge und der Milz dagegen ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede (Daten nicht gezeigt).

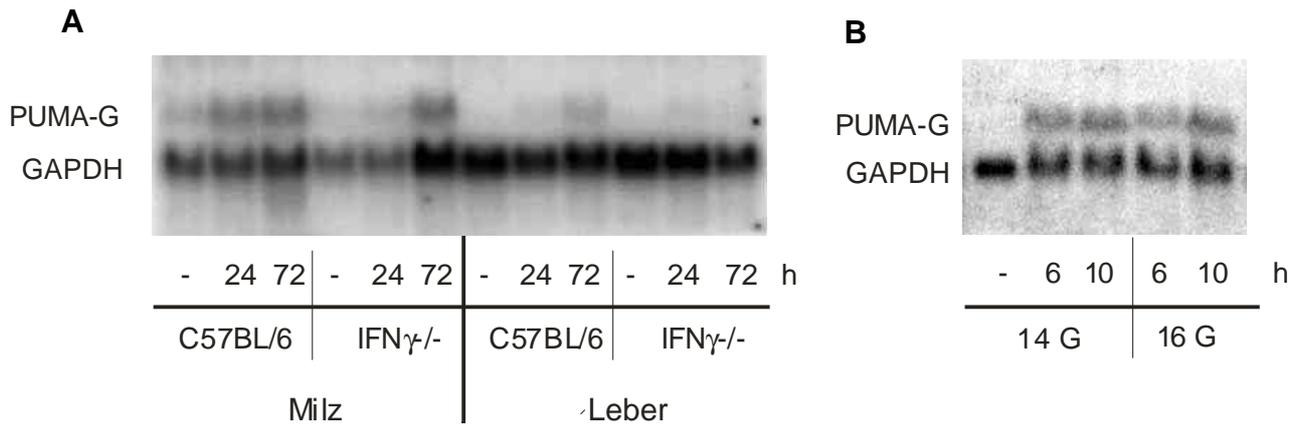


Abb. 3.13: PUMA-G Expression in Milz und Leber nach Infektion.

- A) 50000 Listerien wurden i.p. in C57BL/6 Mäuse und IFN γ ^{-/-} Mäuse injiziert. Nach 24 h und nach 72 h wurden die Tiere schmerzfrei getötet, die RNS aus Milz und Leber isoliert und eine Northernblot Analyse durchgeführt.
- B) C57BL/6 Mäusen wurde in einer CASP Operation (Colon ascendens stent peritonitis) ein 14-gauge oder ein 16-gauge Röhrchen in die Darmwand eingebracht. Nach 6h und nach 10h wurden die Tiere schmerzfrei getötet, die Leber-RNS isoliert und ein Northernblot durchgeführt.

3.5 Subzelluläre Lokalisation von PUMA-G

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind durch ihre sieben Transmembranhelizes in der Zytoplasmamembran verankert. Nach Bindung von extrazellulären Liganden werden Signale über kleine trimere G-Proteine, die mit den GPCR assoziiert sind, in das Zellinnere weitergeleitet. Im Folgenden wurde untersucht, ob auch PUMA-G an der Zelloberfläche lokalisiert war. Zunächst wurden 264.7 RAW Makrophagen transient mit einem carboxyterminalen PUMA-G-EGFP Konstrukt (Kapitel 2.7.2) transfiziert und anschließend im konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 3.14). In kontrolltransfizierten Makrophagen war das EGFP in der ganzen Zelle gleichmäßig verteilt, wohingegen in PUMA-G-EGFP transfizierten Zellen die Fluoreszenz auf die Zelloberfläche beschränkt war. Das Ergebnis deutete auf eine Zelloberflächenexpression von PUMA-G hin. In manchen Zellen waren allerdings auch einige intrazellulär fluoreszierenden Stellen erkennbar, die höchstwahrscheinlich auf die Anfärbung biosynthetischer Kompartimente wie z.B. des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi Komplexes zurückzuführen waren (Kallal und Benovic, 2000). Als nächstes wurden 293T Zellen mit dem PUMA-G-EGFP Konstrukt und einem PUMA-G-FLAG Konstrukt transient transfiziert und die Expression der Fusionsproteine wiederum im konfokalen Mikroskop untersucht (Abb. 3.14). Die PUMA-G-FLAG exprimierenden Zellen wurden zuvor mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gefärbt. Auch in den transfizierten 293T Zellen war die Fluoreszenz auf die Zelloberfläche beschränkt. Da die Lokalisation der beiden Fusionsproteine in den zwei untersuchten Zelltypen gleich war, ist davon auszugehen, daß sich PUMA-G in der Zytoplasmamembran befindet.

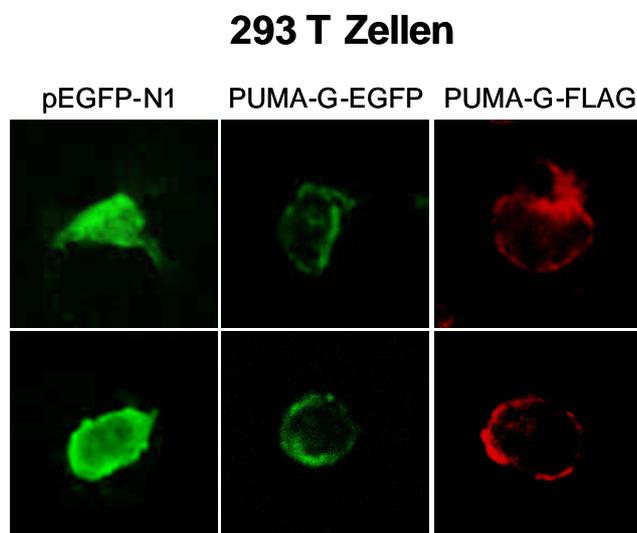
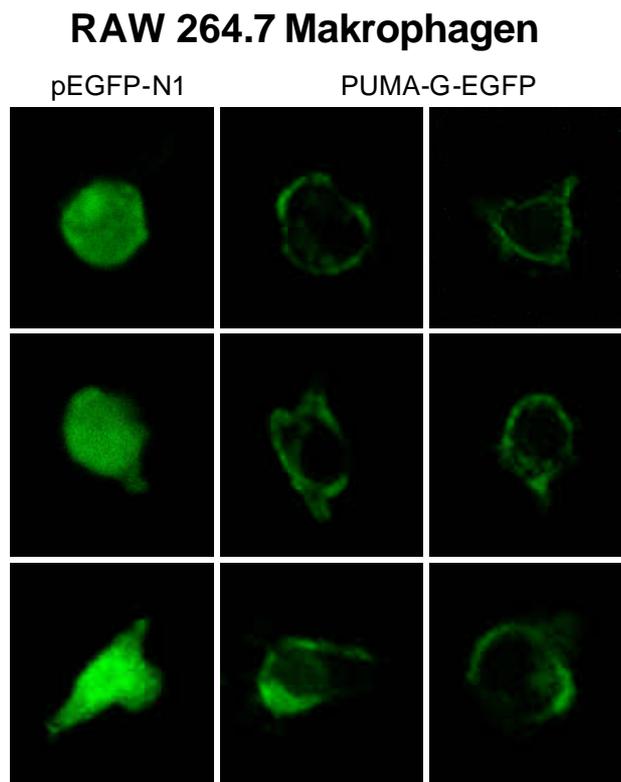


Abb. 3.14: Subzelluläre Lokalisation von PUMA-G-EGFP und PUMA-G-FLAG in 264.7 RAW Makrophagen und 293T Zellen.

PUMA-G-EGFP oder pEGFP-N1 transfizierte Makrophagen wurden auf Glasplättchen gegeben, 16 h nach Transfektion in 2 % Formalin fixiert und anschließend direkt im konfokalen Mikroskop analysiert (488 nm).

Transfizierte 293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion auf Objektträger aufgebracht (Zytospin) und in 2 % Formalin fixiert. PUMA-G-FLAG und pEF-SEM (Kontrolltransfektion) transfizierte Zellen wurden mit einem Fluoreszenz-konjugiertem Antikörper gefärbt (543 nm). pEF-SEM transfizierte 293T Zellen sind nicht abgebildet, da die Färbung negativ war.

3.6 Charakterisierung des PUMA-G genomischen Lokus

3.6.1 Klonierung des genomischen PUMA-G Lokus in der Maus

Zur Klonierung des PUMA-G genomischen Lokus in der Maus, wurde eine BAC (bacterial artificial chromosome) chromosomale Genbank von ES-Zellen des Mausstammes 129/SvJ mittels einer PUMA-G spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchsucht (Genome Systems, St. Louis, MO). Für die PUMA-G spezifische PCR wurden die im ORF bindenden Primer 333-3 und 333-8 (Kapitel 2.6) ausgewählt, die mit E14.1 genomischer DNS als Substrat, ein Amplifikat von 420 bp ergaben. Das Durchsuchen der murinen ES-129/SvJ genomischen BAC Genbank resultierte in einem positiven Klon (380F15/22369). Um zu überprüfen, ob dieser positive BAC-Klon auch tatsächlich den PUMA-G Lokus enthielt, wurde die DNS des Klons mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP radioaktiv markierten Sonde AS 333 (X/H) (Kapitel 2.7.2) hybridisiert (Abb. 3.15).

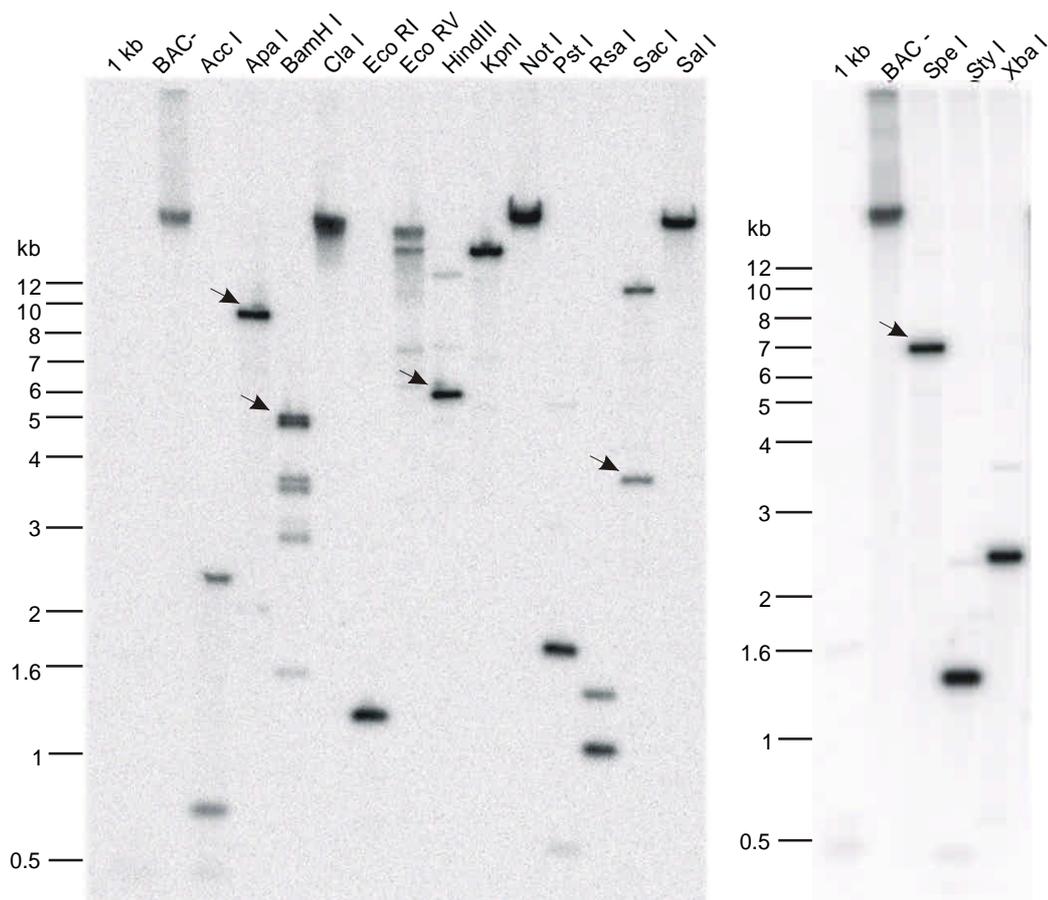


Abb. 3.15: Southernblot Hybridisierung von BAC-Klon 380F15/22369 mit der PUMA-G spezifischen Sonde AS 333 (X/H). Der BAC-Klon wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte wie in Kapitel 2.10.7 beschrieben. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Banden wurden subkloniert.

3.6.2 Untersuchung und Kartierung des murinen PUMA-G Genlokus

Um den genomischen Lokus einfacher charakterisieren und handhaben zu können, wurden einige BAC-Fragmente, die nach der Hybridisierung mit der PUMA-G spezifischen Sonde ein positives Signal ergaben und die in Abb. 3.15 mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, in den bakteriellen Vektor pBluescript kloniert (Kapitel 2.7.2). Von diesen Subklonen des PUMA-G genomischen Lokus wurde das 5 kb BamHI Fragment, das 3,7 kb SacI Fragment und ein Teil des ca. 5,5 kb HindIII Fragments sequenziert. Da alle drei Subklone miteinander überlappten, konnte insgesamt eine 7,1 kb umfassende Sequenz des murinen genomischen Lokus bestimmt werden (siehe Anhang). Die Sequenz wurde in die EMBL Nukleotidsequenz Datenbank eingegeben und besitzt die Zugangsnummer AJ300199. Eine schematische Restriktionskarte des PUMA-G Gens ist in Abb. 3.16 dargestellt.

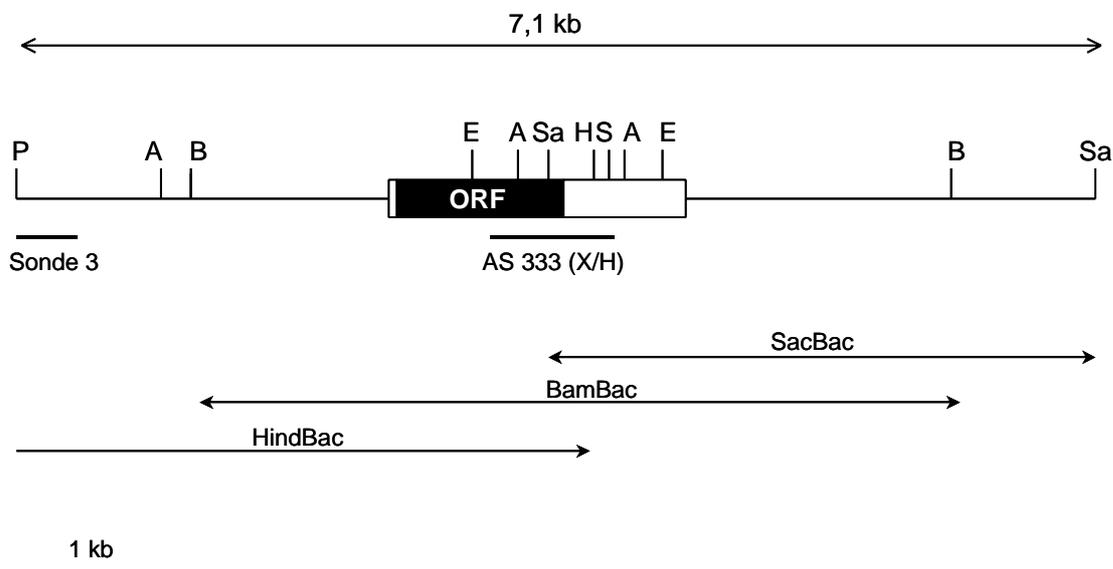


Abb. 3.16: Schematische Restriktionskarte des 7,1 kb großen Fragments des genomischen PUMA-G Lokus. Das PUMA-G Exon ist eingerahmt. Die Sonden Sonde 3 und AS 333 (X/H) sind als Balken dargestellt. Die Subklone SacBac, BamBac und HindBac sind als Pfeile dargestellt. A, AccI; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; Sa, SacI; S, Styl. Die Sequenz des genomischen Lokus wurde in die EMBL Nukleotidsequenz Datenbank eingegeben und besitzt die Zugangsnummer AJ300199.

Das 7,1 kb große Fragment des genomischen PUMA-G Lokus beinhaltet neben dem kompletten Exon bestehend aus 60 bp 5'-UTR, 1,1 kb ORF und 0,8 kb 3'-UTR auch 2,4 kb der wahrscheinlichen Promotorregion am 5'-Ende und weitere 2,8 kb Sequenz am 3'-Ende. Diese genomische Organisation zeigte, daß PUMA-G ein sogenanntes "single exon" Gen ist. Daß es sich bei dem isolierten PUMA-G Gen um kein Pseudogen handelt, zeigt der genomische Southernblot in Abb. 3.17. Das Bandenmuster stimmte genau mit der Restriktionskarte (Abb. 3.16) überein und zeigte, daß PUMA-G ein "single exon" Gen ist und in einfacher Kopie im Genom vorliegt.

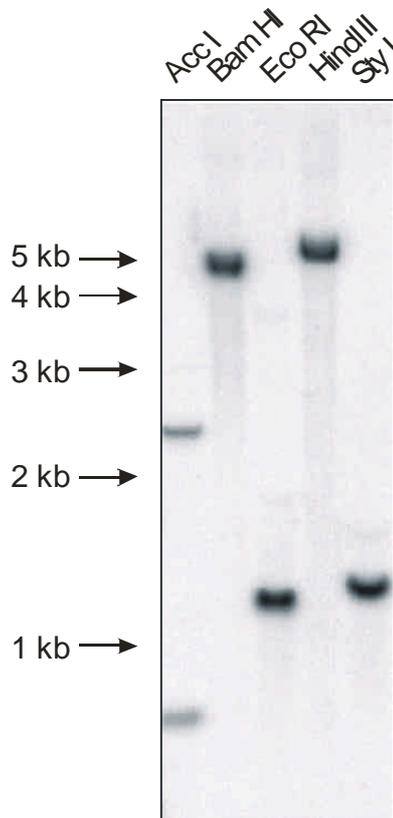


Abb. 3.17: Genomischer Southernblot von E14.1 DNS nach Hybridisierung mit AS 333 (X/H). Das Bandenmuster stimmt mit der Restriktionskarte in Abb. 3.16 überein und zeigt, daß PUMA-G ein "single exon" Gen ist und in einfacher Kopie im Genom vorliegt.

3.6.3 Chromosomale Lokalisation von PUMA-G

Zur Untersuchung der chromosomalen Lokalisation von PUMA-G wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt (Genome Systems, St. Louis, MO). Hierfür wurden murine Metaphase Chromosomen zunächst mit dUTP markierter PUMA-G spezifischer BAC-DNS hybridisiert. Nach Inkubation mit einem Fluoreszenz-markierten anti-Digoxigenin Antikörper und einer DAPI Gegenfärbung erfolgte die mikroskopische Untersuchung. Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 3.18 dargestellt. Positive Fluoreszenzsignale für PUMA-G fanden sich am distalen Ende von Chromosom 5. Diese Region entsprach der Bande 5F. Zusätzlich wurde eine Cohybridisierung mit einer Sonde durchgeführt, die spezifisch für die centromere Region von Chromosom 5 ist.

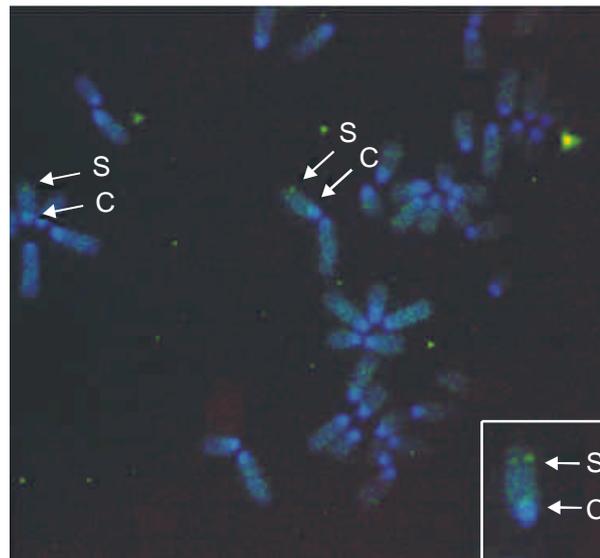


Abb. 3.18: Chromosomale Lokalisation von PUMA-G. Murine Metaphase Chromosomen wurden mit dUTP markierter PUMA-G DNS hybridisiert. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenz-markierten anti-Digoxigenin Antikörper. S, PUMA-G Signal; C, Signal für die centromere Region von Chromosom 5.

3.7 Die Generierung einer PUMA-G defizienten Mausmutante durch "knock-in" eines Reportergens

Die gezielte Mutagenese von Genen in der Keimbahn von Mäusen eröffnet neuartige Möglichkeiten, Einblicke in die *in vivo* Funktion dieser Gene und deren Rolle im Immunsystem zu erlangen. Um die Rolle von PUMA-G im Gesamtorganismus untersuchen zu können, wurde durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen eine PUMA-G defiziente Mausmutante generiert, indem das PUMA-G Gen durch eine Reporterkassette ersetzt wurde. Der große Vorteil dieser "Knock-out" Strategie liegt darin, daß es möglich ist, in einer Gen-defizienten Maus gleichzeitig die Expression dieses Gens über ein Reportergen untersuchen zu können.

3.7.1 Klonierung des PUMA-G Rekombinationsvektors

Klonierungsstrategie

Die Strategie zur Inaktivierung des PUMA-G Gens wurde so gewählt, daß fast der gesamte offene Leserahmen des PUMA-G Gens bis auf 110 bp am 3'-Ende durch eine β -Galaktosidase (*lacZ*) Kasette und eine Neomycin-Resistenz Kasette (Kapitel 2.7.1) ersetzt wurde (Abb. 3.19). Die Kassetten waren von beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen des PUMA-G genomischen Lokus flankiert, die als "kurzer Arm" und als "langer Arm" bezeichnet wurden. Der kurze Arm liegt 5' der *lacZ* Kasette und ist 737 bp lang. Der lange

Arm liegt 3' der Neomycin-Resistenz Kasette und besitzt eine Länge von ca. 3,7 kb. Im Anschluß an den "langen Arm" wurde das Gen für die virale Thymidinkinase (TK) am 3'-Ende des Rekombinationsvektors eingebaut. Das Konstrukt war beidseitig von zwei XhoI Restriktionsschnittstellen flankiert und konnte durch einen XhoI Verdau linearisiert werden.

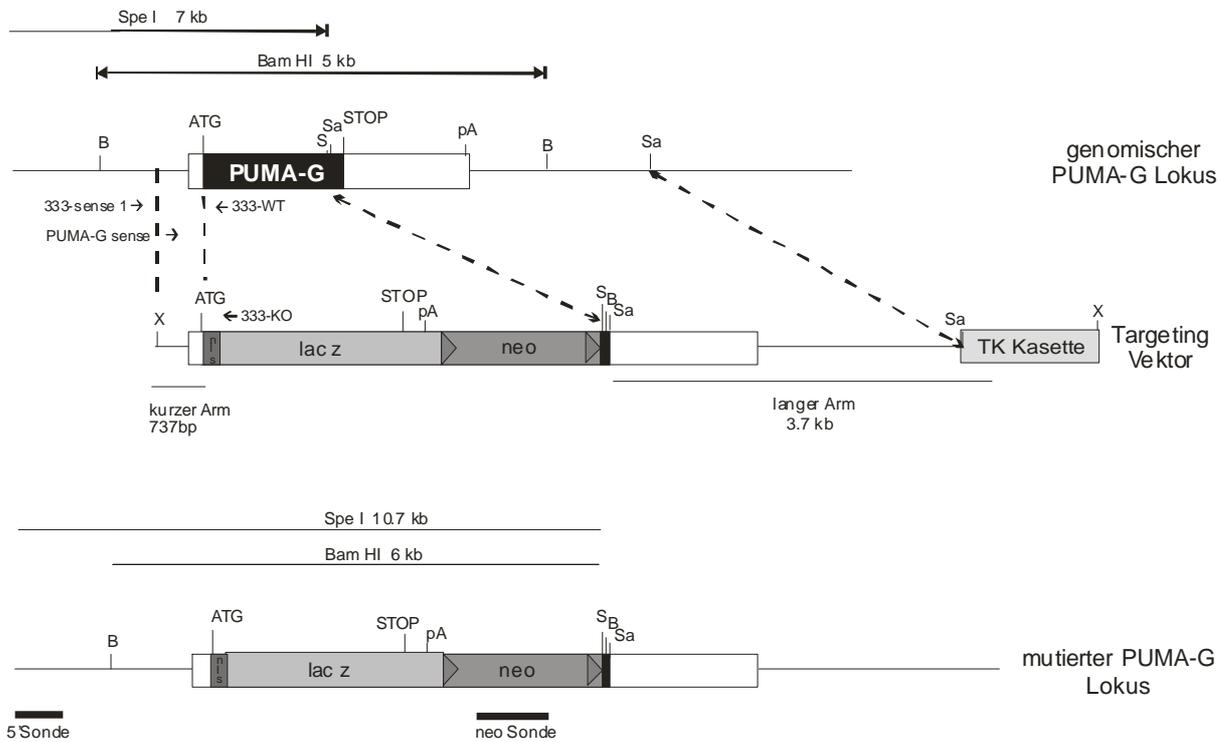


Abb. 3.19: Inaktivierung des PUMA-G Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus. Fast der gesamte ORF des PUMA-G Gens ist durch den Einbau der β -Galaktosidase (*lacZ*) Kasette und der Neomycin-Resistenz Kasette deletiert. Die Lage der Sonden für die Hybridisierung und die Lage der "Screening-PCR" Primer sind angegeben. Durch Pfeile sind die zur Genotypisierung im Southernblot verwendeten Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Größen der entstehenden Fragmente aufgeführt. pA, Polyadenylierungssignal.

b-Galaktosidase Kasette

Die in dieser Arbeit verwendete β -Galaktosidase Kasette besaß in ihrer 5'-Region eine nukleäre Lokalisationsstelle (nls), die eine Translokation des reifen Proteins in den Zellkern bewirkt. Dadurch führt die Färbung von β -Galaktosidase exprimierenden Zellen nach Zugabe eines geeigneten Substrats zur spezifischen Färbung der Zellkernregion. Dies ist besonders bei der Untersuchung von schwach exprimierenden Zellen von Vorteil, da die ohnehin schwache Färbung zusätzlich noch diffus auf die Zelle verteilt wäre. Weiterhin besaß die β -Galaktosidase Kasette in ihrer 3'-Region ein Polyadenylierungssignal. Die Funktionalität der in dieser Arbeit verwendeten β -Galaktosidase Kasette wurde vor Verwendung durch eine Kontrolltransfektion von 293T Zellen und eine anschließende Färbung überprüft (Daten nicht gezeigt).

Neomycin Kasette

Der Rekombinationsvektor muß aus technischen Gründen einen Marker zur Positivselektion enthalten. Die in dieser Arbeit verwendete Neomycin Phosphotransferase erlaubte das Wachstum von rekombinierten ES-Zell Klonen in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin (G418). Die Neomycin-Resistenz Kasette war an beiden Seiten von loxP (**l**ocus of **X**-ing over **P**1 phage) Erkennungssequenzen flankiert, so daß sie später in PUMA-G defizienten Mäusen durch CRE (causes recombination) medierte Deletion, z.B. durch Verpaarung mit der ubiquitär CRE exprimierenden CRE Deleter Maus, entfernt werden kann (Sternberg et al., 1986; Sternberg et al., 1981; Sternberg und Hamilton, 1981; Schwenk et al., 1995). Bei der Klonierung des PUMA-G Rekombinationsvektors wurde die Neomycin Kasette "in sense" Orientierung eingebaut, um mögliche Auswirkungen auf den endogenen PUMA-G Promotor zu minimieren.

Thymidinkinase (TK) Kasette

Der Einbau der TK Kasette in den Rekombinationsvektor erlaubte die Negativselektion aller ES-Zell Klone, bei denen der Rekombinationsvektor zufällig und nicht über homologe Rekombination ins Genom integrierte. Bei solchen Klonen wird mit hoher Effizienz auch heterologe DNS ins Genom eingebaut. Sie waren daher sensitiv für die Phosphorylierung und den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogs Gancyclovir in die DNS, was zur Blockade der DNS-Replikation führte. Da bei homolog rekombinierten ES-Zell Klonen die TK Kasette nicht ins Genom integrierte und die endogene Thymidinkinase Gancyclovir nicht zu aktivieren vermag, waren diese dagegen resistent (Wurst und Joyner, 1993).

3.7.2 Generierung von PUMA-G defizienten embryonalen Stammzellen

Erzeugung von PUMA-G^{-/-} Stammzellen durch homologe Rekombination

Der linearisierte Rekombinationsvektor wurde in E14.1 embryonale Stammzellen aus 129/SvJ Mäusen elektroporiert. Nach zehntägiger Doppelselektion der Zellen mit G418 und Gancyclovir wurden 234 resistente Klone in 96-well Platten gepickt und expandiert. Ein Teil der Zellen wurde eingefroren, während der andere Teil mittels einer "Screening PCR" auf homologe Rekombination hin getestet wurde.

Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellen durch eine "Screening PCR"

Die doppelt resistenten Klone wurden mit Hilfe einer "Screening PCR" auf korrekt mutierte ES-Zellen untersucht. Die "Screening PCR" Primer (Kapitel 2.6) wurden so gewählt, daß der 5'-Primer (333-sense1) außerhalb des Rekombinationsvektors und der 3'-Primer (333-KO) in der lacZ Kasette hybridisierte. Im Wesentlichen erreicht man mit dieser "Screening PCR" die

Amplifikation des "kurzen Arms", die jedoch nur in den korrekt mutierten ES-Zell Klonen ein Produkt ergibt. Die spezifische PCR für den mutierten PUMA-G Genlokus ergab ein PCR-Produkt von 996 bp. Da ein früherer Versuch, die PCR direkt mit einem Zellysatz als DNS-Substrat durchzuführen, gescheitert war, wurde in einem zweiten Versuch gereinigte chromosomale DNS als Matritze verwendet. Hierzu wurden alle 234 ES-Zell Klone bis zur 12-well Platte expandiert und die chromosomale DNS mit einer Standardmethode isoliert (Kapitel 2.10.2). Bei zwei ES-Zell Klonen (#154, #205) war bereits im Agarosegel eine PCR-Bande deutlich erkennbar (Daten nicht gezeigt). Um Kontaminationen und falsch positive PCR Signale auszuschließen und um möglicherweise in der Agarosegelelektrophorese nicht sichtbare PCR Signale zu detektieren, wurden die Gele auf Nylonmembranen geblottet und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde wurde der "kurze Arm" verwendet. Durch die radioaktive Hybridisierung wurde das PCR-Signal der beiden ES-Zell Klone #154 und #205 bestätigt. Weitere homolog rekombinierten Klone konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Southernblot Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen

Dem "PCR Screening" folgte die genomische Überprüfung der beiden ES-Zell Klone #154 und #205. Die Anzucht der Zellen erfolgte dabei auf Zellkulturplatten ohne embryonale Fibroblasten, um das Verhältnis des Wildtypsignals zum homolog rekombinierten Signal nicht zu verändern. Die chromosomale DNS wurde mit dem Restriktionsenzym SpeI verdaut, die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer radioaktiv markierten 5'-Sonde, die außerhalb des Rekombinationsvektors lag (Abb. 3.19). Der genomische Southernblot der homolog rekombinierten ES-Zellen ist in Abb. 3.20 gezeigt. Das Wildtypallel ergab eine Bandengröße von 7 kb, was der Größe des subklonierten genomischen Fragments entsprach (Abb. 3.15). Das Hybridisierungssignal von 10,7 kb ist spezifisch für das mutierte Allel. Die Hybridisierung mit der 5'-flankierenden Sonde schließt allerdings nicht aus, daß zusätzlich zur homologen Rekombination weitere zufällige Integrationen ins Genom stattgefunden haben. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die BamHI verdaute ES-Zell DNS mit einer neo Sonde (Abb. 3.19) hybridisiert. Wie die Abb. 3.20 zeigt, war nur ein Hybridisierungssignal mit richtigen Größe von 6 kb bei den mutierten ES-Zell Klonen detektierbar, wohingegen kein Signal bei dem Kontrollklon auftrat.

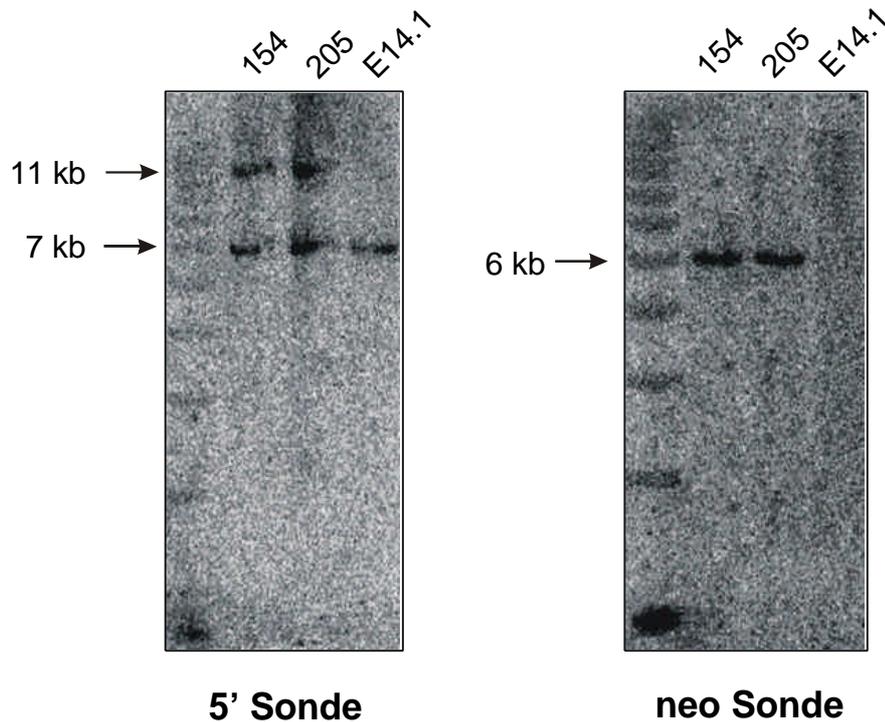


Abb. 3.20: Genomische Southernblotanalyse homolog rekombinierter ES-Zell Klone. Die DNS der homolog rekombinierten ES-Zellklone #154 und #205 und eines Kontrollklons wurden mit SpeI oder BamHI verdaut und mit der 5'-flankierenden Sonde oder einer neo Sonde hybridisiert. Die Intensitäten der Signale für das Wildtypallel (7 kb) und das homolog rekombinierte Allel (10,7 kb) waren gleich. Für Lage der Sonden und Größe der Hybridisierungssignale siehe Abb. 3.19.

3.7.3 Generierung einer PUMA-G defizienten Mausmutante

Die beiden unabhängig voneinander gewonnenen homolog rekombinierten ES-Zell Klone #154 und #205 wurden in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert (Abb. 3.21) und anschließend in pseudoschwangere (C57BL/6 x BALB/c) F1 Weibchen transferiert. Auf diese Weise entstehen chimäre Mäuse. Der Grad des Chimarismus spiegelt den Anteil wieder, den die homolog rekombinierten ES-Zellen am Gesamtorganismus besitzen und kann leicht an der Fellfarbe abgeschätzt werden. Hochchimäre Mäuse, also diejenigen mit einem überwiegend agoutifarbenem Fell, wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart und auf Keimbahntransmission getestet. Bei den agoutifarbenen Nachkommen lag die Wahrscheinlichkeit, daß das mutierte Allel transmittiert wurde, bei 50%.

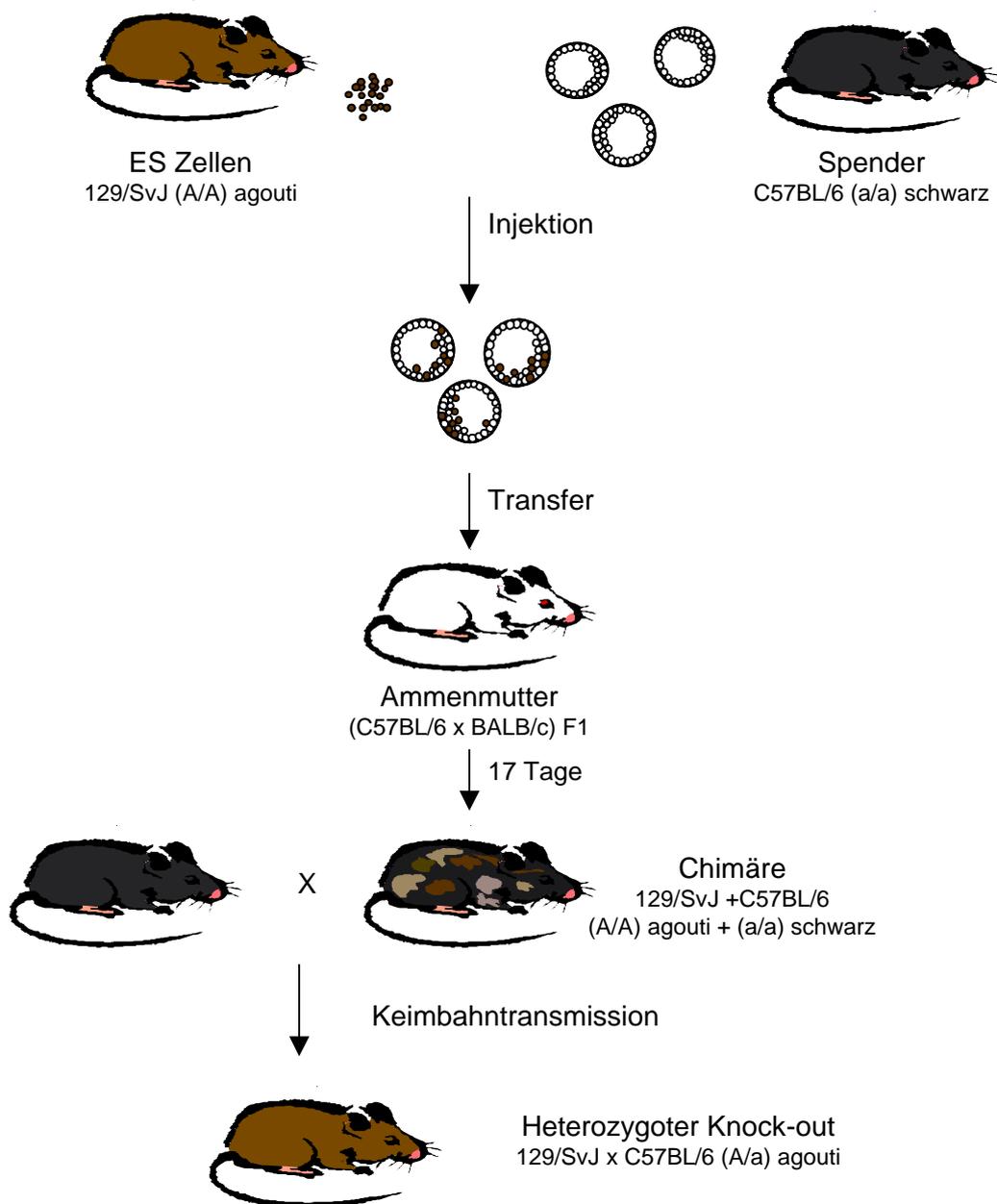


Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Generierung von Mäusen aus ES-Zellen durch Blastozysteninjektion. Der Anteil, den mutierte ES-Zellen am Gesamtorganismus der Chimären besitzen, kann anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden. Die Fellfarbe der Nachkommen aus der Testverpaarung zeigt an, ob das mutierte Allel in der Keimbahn weitergegeben wurde. Das agouti Allel im A Farblokus der 129/SvJ Mäuse ist über das C57BL/6 Allel dominant.

Alle agoutifarbenen Nachkommen aus der Testverpaarung von chimären Mäusen mit C57BL/6 Mäusen wurden zunächst mit Hilfe einer Typisierung PCR und anschließend mittels Southernblot auf das Vorhandensein des mutierten PUMA-G Allels getestet. Die in der Typisierungs PCR verwendeten Primer entsprachen im Wesentlichen denen der "Screening

PCR", außer daß der gemeinsame 5'-Primer im "kurzen Arm" hybridisierte, um kleinere PCR-Produkte zu erhalten (Kapitel 2.6). Die Lage der Primer geht aus Abb. 3.19 hervor. Chimäre Mäuse transmittierten das mutierte PUMA-G Allel in der Keimbahn. Die PUMA-G heterozygoten Mäuse waren phänotypisch normal.

3.8 Charakterisierung des Klons AS 329

Die Sequenzanalyse der 81 PCR-Select Fragmente, die durch subtraktive Hybridisierung der cDNS aus stimulierten Makrophagen mit cDNS aus unstimulierten Makrophagen und stimulierten embryonalen Fibroblasten erhalten wurden (Kapitel 3.3.1), ergab die Identifizierung eines weiteren unbekanntes cDNS Fragments, AS 329. Da der Klon im Northernblot äußerst stark nach IFN γ und TNF α Behandlung in ANA-1 Zellen ausgeprägt war, jedoch nicht in EF Zellen, wurde mit der Charakterisierung dieses Klons begonnen.

Der DNS Sequenzvergleich des PCR-Select Klons AS 329 (735 bp) mit GenBank unter Verwendung des Suchalgorithmus BlastN ergab eine gewisse Homologie zu zwei humanen Genen. So weist der Klon AS 329 über eine Länge von ca. 100 bp eine Homologie zu dem humanen Transkriptionsaktivator Sp110 (80% Sequenzidentität) und zu dem Interferon-induzierten Protein 75 (80% Sequenzidentität) auf (Bloch et al., 2000; Kadereit et al., 1993).

3.8.1 Kinetik der AS 329 Expression in ANA-1 Makrophagen

Analog der PUMA-G Expressionsanalyse (Kapitel 3.4.1) wurde auch für AS 329 der Zeitverlauf der induzierten Genexpression in ANA-1 nach Stimulierung mit TNF α und IFN γ untersucht. Der Northernblot in Abb. 3.22 zeigt, daß AS 329 bereits in unstimulierten ANA-1 Zellen exprimiert wurde und daß die Expression bereits 4 h nach Stimulierung mit TNF α und IFN γ drastisch anstieg und nach 24 h ein Maximum erreichte. TNF α Stimulierung allein bewirkte keine vermehrte AS 329 Transkription, die Stimulierung mit IFN γ allein hingegen schon. Die Northernblot Analyse zeigte auch, daß AS 329 Transkripte in unstimulierten EF-Zellen nicht und nach Stimulierung nur äußerst gering vorhanden waren. Das Hybridisierungssignal lag bei ca. 2 kb.

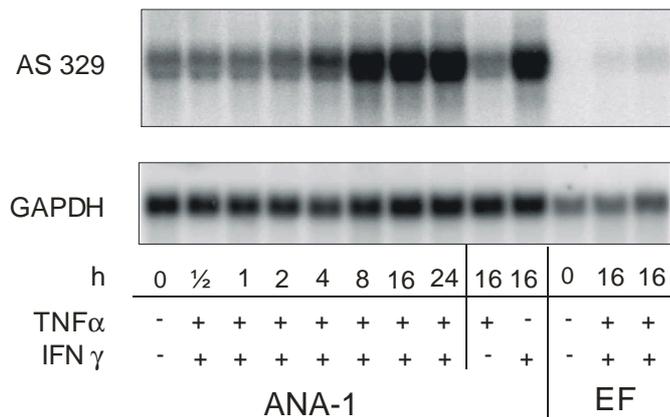


Abb. 3.22: Kinetik der Expression von AS 329 in ANA-1 Makrophagen nach Stimulierung mit TNF α und IFN γ . Die Zellen wurden mit 55 U/ml IFN γ und/oder 2000 U/ml TNF α für unterschiedliche Zeiten stimuliert. 20 μ g Gesamt-RNS wurden pro Spur geladen. Die radioaktive Hybridisierung des Northernblots erfolgte mit einer AS 329 spezifischen Sonde. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung mit einer GAPDH spezifischen Sonde.

3.8.2 AS 329 Expression in Typ I Interferon stimulierten ANA-1 Makrophagen

Eines der Proteine, zu denen AS 329 eine Homologie zeigte, das Interferon-induzierte Protein 75, ist durch Typ I Interferone induzierbar. Deshalb wurde die IFN α / β induzierbare AS 329 Genexpression in ANA-1 Makrophagen untersucht. Nach 4 h und 8 h Behandlung der Zellen mit IFN α war eine drastische AS 329 RNS Erhöhung zu beobachten. Nach IFN β Behandlung dagegen, war nur eine mäßige Induktion zu verzeichnen. Allerdings war die Expression von Mx1, die als Positivkontrolle für IFN α / β induzierte Transkription diente, nach IFN β Stimulierung ebenfalls geringer als die nach IFN α Stimulierung.

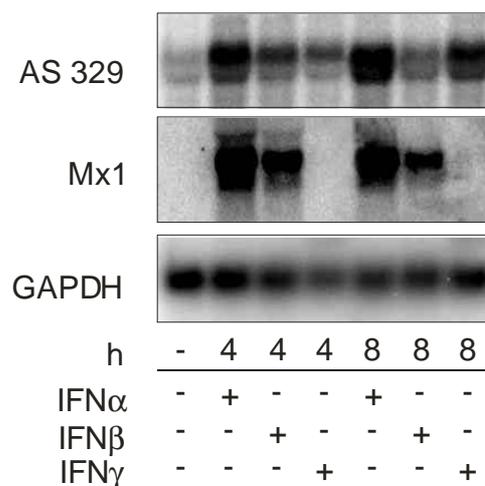


Abb. 3.23: AS 329 Expression in Typ I Interferon stimulierten ANA-1 Makrophagen. ANA-1 Zellen wurden für 4 oder 8 h mit je 100 U IFN α , IFN β oder IFN γ stimuliert, bevor die Gesamt-RNS isoliert wurde. Der Northern blot wurde mit radioaktiven DNS-Sonden spezifisch für AS 329, Mx1 und GAPDH hybridisiert.

3.8.3 AS 329 Expression in verschiedenen Makrophagen Zelllinien nach IFN γ Stimulierung

Die Abb. 3.24 zeigt, daß der Klon AS 329 außer in der bislang verwendeten Makrophagen Zelllinie ANA-1 auch in den murinen Makrophagen Zelllinien W1C3, IC21, RAW 264.7 und J774 durch TNF α und IFN γ induzierbar war.

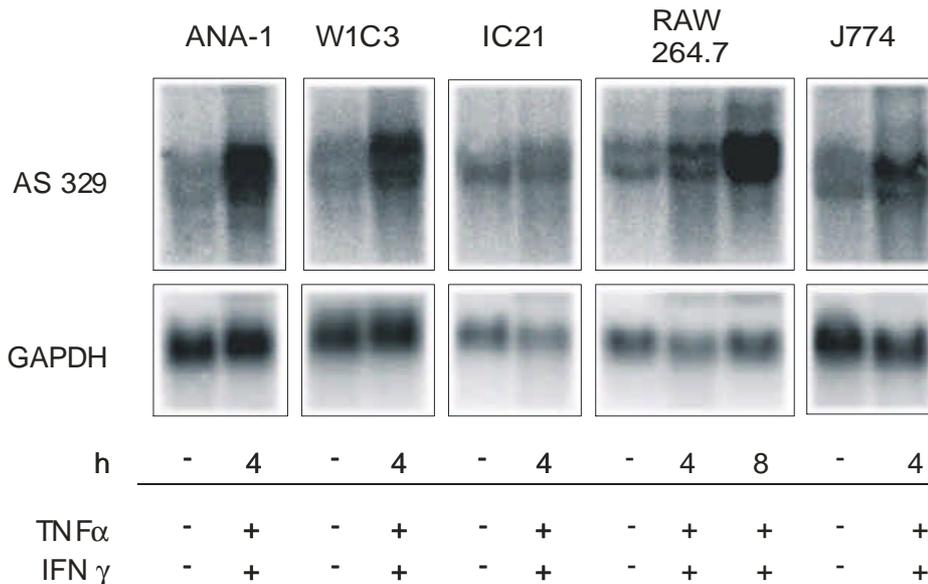


Abb. 3.24: AS 329 Expression in verschiedenen Makrophagen Zelllinien nach TNF α und IFN γ Stimulierung. Die Zellen wurden für 4 oder 8 h mit 2000 U/ml TNF α und 55 U/ml IFN γ stimuliert, die Gesamt-RNS wurde isoliert und der Northernblot wurde mit einer AS 329 und einer GAPDH spezifischen Sonde hybridisiert.

3.8.4 Expression von AS 329 in murinen Geweben

Die Expression von AS 329 in verschiedenen murinen Geweben wurde, analog wie für PUMA-G in Kapitel 3.4.5 beschrieben, durch eine Northernblot Analyse analysiert. AS 329 war, ähnlich wie PUMA-G, am stärksten in Lunge, Milz, Herz, Niere und Skelettmuskel ausgeprägt. Neben den dominierenden Banden von ca. 2 kb Größe waren weitere Banden von ca. 3,0 und 4,4 kb Größe zu beobachten. Möglicherweise handelte es sich dabei um verschiedene Spleißvarianten von AS 329. Die beiden größeren Spleißvarianten traten nur auf dem kommerziellen Gewebelot (Clontech) auf, was wahrscheinlich an der höheren Sensitivität des mit Poly A+ RNS beladenen Blots lag.

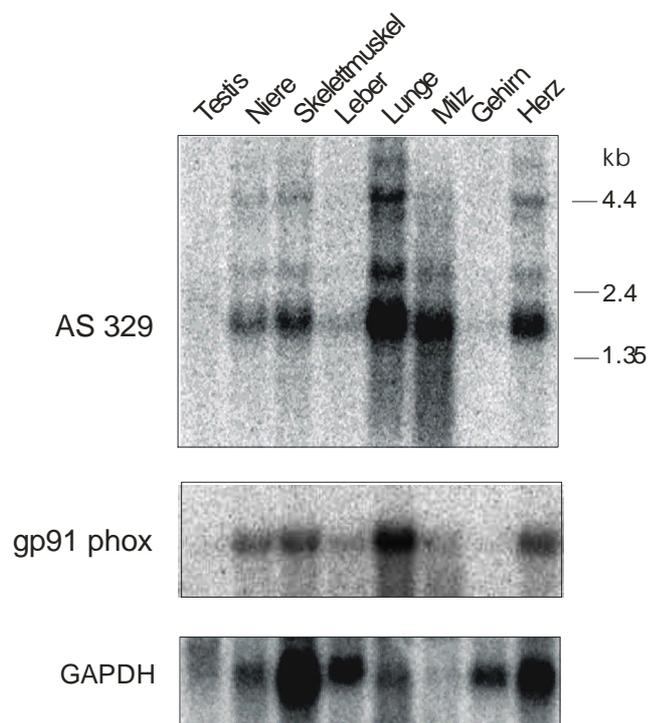


Abb. 3.25: Gewebeverteilung von AS 329. Der Geweblot der Firma Clontech war mit 2 µg Poly A+ RNS beladen und wurde mit den spezifischen Sonden für AS 329, GAPDH und gp91 phox hybridisiert.

4 DISKUSSION

4.1 Isolierung von differentiell exprimierten Genen in Makrophagen mittels PCR-Select

Die PCR-Select Technik erlaubt die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen. Sie kann beispielsweise dazu verwendet werden, die Genexpression verschiedener Zelltypen miteinander zu vergleichen oder auch um Unterschiede in der Genexpression von Zellen nach Behandlung mit einem bestimmten Stimulus oder Inhibitor zu untersuchen. PCR-Select ermöglicht die Identifizierung von gewebespezifisch exprimierten Transkripten oder von Genen, die zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in bestimmten Zellen oder Geweben ausgeprägt sind. In den letzten Jahren wurde die subtraktive Hybridisierung bereits erfolgreich eingesetzt, um Gene zu isolieren, die spezifisch in hämatopoetischen Stammzellen ausgeprägt sind oder die präferentiell in epithelialen Vorläuferzellen der fötalen Rattenleber exprimiert sind (Orlic et al., 1999; Petkov et al., 2000). Weiterhin konnten spezifisch in Testis ausgeprägte Gene identifiziert werden, sowie Gene, die in Endothelzellen verschiedener angiogenetischer Stadien aktiv sind (Diatchenko et al., 1996; Glienke et al., 2000).

Um differentiell ausgeprägte Gene in aktivierten Makrophagen identifizieren zu können, wurde zunächst mit der PCR-Select Technik das Genexpressionsmuster von unstimulierten ANA-1 Makrophagen mit dem von stimulierten ANA-1 Makrophagen verglichen. Die Stimulationsbedingungen zur Aktivierung der Makrophagen wurden so gewählt, um eine möglichst maximale Expression derjenigen Gene zu gewährleisten, die überwiegend in der Abwehr von Makrophagen gegen Pathogene involviert sind. Die Zellen wurden deshalb mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ behandelt, da beiden Zytokinen in der Aktivierung von Makrophagen eine wesentliche Funktion zukommt (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993; Huang et al., 1993; Dalton et al., 1993). Durch die Stimulierung mit beiden Zytokinen wurde einerseits die Wahrscheinlichkeit erhöht, auch Gene identifizieren zu können, deren Expression durch die synergistische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ auf die Transkriptionsrate deutlich höher ist als nach Stimulierung mit $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IFN}\gamma$ allein. Andererseits war auch die Möglichkeit gegeben, unbekannte Gene isolieren zu können, die nur durch $\text{TNF}\alpha$ in Makrophagen induzierbar sind. In der Literatur sind bislang nur wenige selektiv $\text{TNF}\alpha$ induzierte Gene wie z.B. A20, $\text{TNF}\alpha$ selbst, Mangansuperoxid Dismutase (MnSOD) oder Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) beschrieben (Opipari, Jr. et al., 1992; Opipari, Jr. et al., 1990; Philip und Epstein, 1986; Liu et al., 2000; Sawdey et al., 1989; Opipari, Jr. et al., 1992). Die Signalübermittlung von $\text{TNF}\alpha$ über den TNFRp75 spielt im Gegensatz zum TNFRp55 wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Erregern wie Listerien (Pfeffer et al., 1993). Da der murine TNFRp75 hinsichtlich seiner Ligandenbindung speziesspezifisch ist, der murine TNFRp55 hingegen humanes $\text{TNF}\alpha$ und murines $\text{TNF}\alpha$ mit ähnlicher Affinität bindet (Lewis

et al., 1991), wurden die ANA-1 Makrophagen deshalb mit humanem TNF α stimuliert, um ausschließlich über den TNFRp55 vermittelte Signale zu generieren.

Von den 70 cDNS Fragmenten, die nach der subtraktiven Hybridisierung von stimulierten gegen unstimulierten ANA-1 Makrophagen isoliert wurden, waren nach Überprüfung im Northernblot 47 durch IFN γ in Makrophagen wie auch in embryonalen Fibroblasten induzierbar. Neben den IFN γ induzierten GTPasen der 47 kDa und 65 kDa GTP bindenden Familien (18 x vertreten) fanden sich auch Gene, die bereits in der Literatur als IFN γ induzierbar beschrieben sind, wie z.B. Mig (mouse monokine inducible by IFN γ , 3 x vertreten), IP-10 (IFN γ inducible protein-10, 6 x vertreten) und CD40 (1 x vertreten) (Luster und Ravetch, 1987; Farber, 1990; Karmann et al., 1995). Da annähernd 70 % der identifizierten Gene IFN γ induzierbar waren, spricht dies für die hohe Spezifität der subtraktiven Hybridisierungsmethode. Nur 10 der 70 analysierten Klone waren nach Northernblot Analyse nicht durch IFN γ in Makrophagen oder embryonalen Fibroblasten induzierbar. Möglicherweise wären jedoch durch die Verwendung von sensitiveren Methoden wie z.B. des "RNase protection assays" oder der kompetitiven semiquantitativen PCR Analyse (H. Neubauer, K. Pfeffer, unveröffentlicht) Unterschiede in den RNS-Mengen von unstimulierten und stimulierten Zellen offenbar geworden. In dieser Arbeit wurde die Präferenz jedoch auf solche Gene gelegt, deren Expression durch TNF α und/oder IFN γ stark reguliert war. Deshalb wurde auch die Northernblot Analyse als Methode zum Vergleich verschiedener RNS-Mengen verwendet.

Interessanterweise fanden sich unter allen analysierten cDNS Fragmenten keine, die nur durch alleinige TNF α Stimulierung in Makrophagen induzierbar waren. Eine mögliche Erklärung hierzu könnte sein, daß durch die geringe basale TNF α Produktion der ANA-1 Zellen (Stefanie Scheu, Diplomarbeit) bereits in den unstimulierten Zellen TNF α induzierte Transkripte exprimiert waren. Das Vorhandensein von auch nur einer geringen Menge TNF α induzierter Transkripte in der "driver cDNS" Population (Abb. 1.3) setzt die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung differentiell TNF α induzierter Gene stark herab, da in der ersten Hybridisierungsreaktion die "driver cDNS" in hohem Überschuß eingesetzt wird. Da die Anzahl der IFN γ -regulierten Gene auf mindestens 400 geschätzt wird (Wan et al., 1996; Früh et al., 1997) und aus der Literatur nur wenige TNF α induzierbare Gene bekannt sind, ist die Wahrscheinlichkeit demnach viel höher, IFN γ induzierte Gene zu identifizieren. Um abschätzen zu können, wie viele Transkripte unter der Kontrolle von TNF α reguliert werden, sollte in Zukunft eine differentielle Hybridisierungsstrategie angewendet werden, bei der die verwendete Zellpopulation kein endogenes TNF α bilden kann.

Ein Vergleich der IFN γ induzierten Gene in Makrophagen mit Genen, die durch subtraktive Hybridisierung von unstimulierten und IFN γ stimulierten embryonalen Fibroblasten identifiziert wurden (U. Boehm, J. Howard, Köln), zeigte eine hohe Übereinstimmung. Von den in beiden Zelltypen induzierten Gene waren mehr als 30 % in die Familien der 47 kDa oder der 65 kDa GTP bindenden Proteine einzuordnen (Kapitel 4.2). Um auch Gene isolieren zu können, die selektiv in aktivierten Makrophagen, jedoch nicht in aktivierten embryonalen Fibroblasten ausgeprägt sind, wurde ein zweiter, modifizierter PCR-Select Screen durchgeführt.

Die Veränderung bestand darin, nicht nur cDNS aus unstimulierten ANA-1 Makrophagen sondern auch aus IFN γ stimulierten embryonalen Fibroblasten gegen die cDNS aus TNF α und IFN γ stimulierten ANA-1 Zellen zu hybridisieren. Nach der Identifizierung von 81 Fragmenten war festzustellen, daß sich unter den 81 analysierten Transkripten weder GTPasen noch IP-10 oder Mig fanden. Dies weist auf eine hohe und exzellente Spezifität der PCR-Select Technik hin.

4.2 Die GTPasen der 47 kDa und der 65 kDa Familien

Die Analyse von cDNS Fragmenten aus dem PCR-Select Screen in dem stimulierte gegen unstimulierte cDNS aus ANA-1 Makrophagen hybridisiert wurde, resultierte in der Identifizierung der bislang unbekanntes GTPasen, IIGP und mGBP-2 (Boehm et al., 1998). IIGP stellt ein neues Mitglied der 47 kDa Familie der GTPasen dar, die als weitere Mitglieder IGTP, GTPI, LRG-47, IRG-47 und TGTP/Mg21 beinhaltet (Abb. 4.1). Das mGBP-2 ist der 65 kDa GTPasen Familie zuzuordnen, zu der auch mGBP-1, mag-2 und mGBP-4 gehören (Abb. 4.1). Die GTPasen der beiden Familien sind sich in ihrer Primärstruktur sehr ähnlich. Die Mitglieder der 47 kDa Familie besitzen zwischen 30 und 60 % identische Aminosäuresequenzen, die Mitglieder der 65 kDa Familie sogar zwischen 50 und 80 % (Boehm et al., 1998). IIGP und mGBP-2 waren sowohl in embryonalen Fibroblasten wie auch in ANA-1 Makrophagen massiv durch IFN γ induzierbar. Da IIGP im Gegensatz zu mGBP-2 auch in embryonalen Fibroblasten aus IRF-1 defizienten Mäusen durch IFN γ induzierbar war, wird es IRF-1 unabhängig reguliert. Die Induktion von mGBP-2 war dagegen strikt IRF-1 abhängig. Beide GTPasen waren in der Leber basal nicht exprimiert. Da 24 Stunden nach Listerieninfektion die RNS Mengen beider GTPasen in der Leber drastisch erhöht waren, ist eine mögliche Funktion in der Bakterienabwehr denkbar. In IFN γ R defizienten Mäusen war die Induktion von IIGP und mGBP-2 komplett inhibiert. Beide GTPasen werden demnach strikt durch IFN γ reguliert. Die Tatsache, daß IRF-1 defiziente Mäuse in der Abwehr gegen Listerien kaum beeinträchtigt sind obwohl sie keine reaktiven Stickstoffintermediate produzieren können (Fehr et al., 1997), läßt vermuten, daß hinsichtlich einer möglichen Funktion der GTPasen in der Listerienabwehr die Beteiligung der IRF-1 unabhängig regulierten GTPasen der 47 kDa Familie wahrscheinlicher erscheint. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß IGTP Knock-out Mäuse zwar in der Abwehr gegen Listerien nicht beeinträchtigt sind, ihre Abwehr gegen Toxoplasmen jedoch empfindlich gestört ist (Taylor et al., 2000). Für die Abwehr von *Toxoplasma gondii* werden IFN γ vermittelte Signale sowohl auf hämatopoetischen Zellen wie auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Fibroblasten benötigt (Yap und Sher, 1999). Möglicherweise regulieren die Mitglieder der 47 kDa GTPasen Familie unterschiedliche antimikrobielle Mechanismen, die durch IFN γ in den verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen oder Fibroblasten induziert werden. Diese Vermutung wird durch *in vitro* Versuche von TGTP/Mg21 bestärkt. Die Überexpression von TGTP in Fibroblasten führt zur Limitierung der Vermehrung des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), jedoch nicht von Herpes

Virus (Carlow et al., 1998). Interessanterweise besitzt auch die GTPase Mx1 eine Reihe antiviraler Eigenschaften. Sie ist der Superfamilie der Dynamine zuzuordnen (Abb. 4.1) und wird spezifisch durch Typ I Interferone induziert (Stark et al., 1998).

Von einigen GTPasen wie IGTP, LRG-47 und TGTP konnte gezeigt werden, daß sie im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Taylor et al., 2000; Taylor et al., 1997). Sie könnten daher auch in der Prozessierung oder im Transport von immunologisch relevanten Proteinen, wie MHC-Antigenkomplexen oder Zytokinen eine Funktion besitzen.

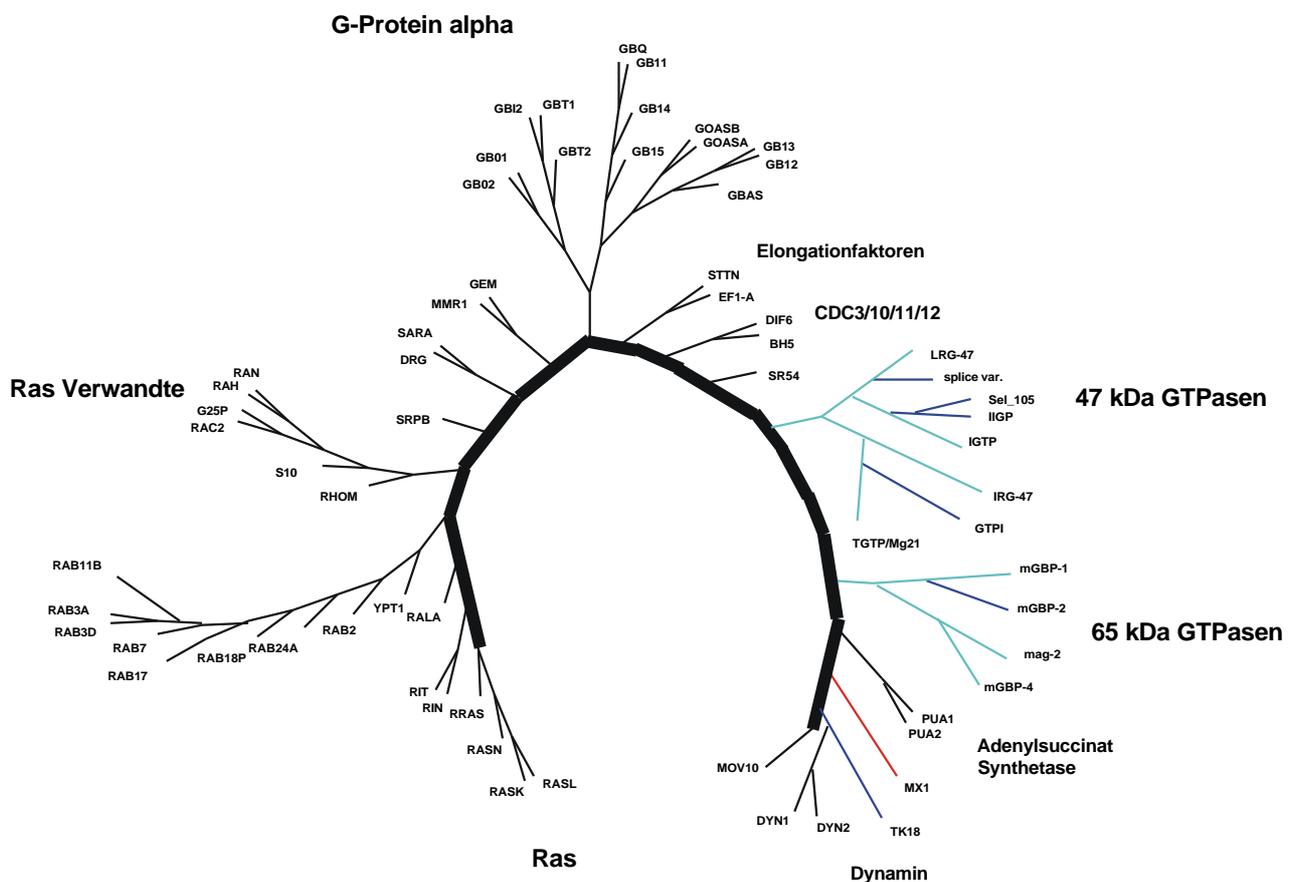


Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum von ausgewählten GTPasen (U. Boehm, L. Guethlein, J. Howard, Köln). Die 47 kDa GTPasen und die 65 kDa GTPasen bilden zwei Familien.

4.3 PUMA-G ist ein neues Mitglied der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die volle Länge cDNS von PUMA-G konnte mittels RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) ermittelt werden. Die Gesamtlänge der PUMA-G cDNS beträgt 1956 bp und stimmt mit dem ca. 2 kb großen Signal im Northernblot überein. Der offene Leserahmen beträgt 1083 bp und beinhaltet ein ATG Startkodon, welches von einer Sequenz umgeben ist, die der Kozak Sequenz (Kozak, 1987) teilweise, jedoch nicht vollständig entspricht. Da sich in der 5'- untranslatierten Region 30 bp vom Startkodon entfernt ein Stopkodon (TGA: bp 23-25) befindet, ist das als Startkodon identifizierte ATG mit größter Wahrscheinlichkeit auch der tatsächliche Translationsstart.

Die Suche nach Proteinmotiven in der PUMA-G Aminosäuresequenz unter Verwendung des TMPred (Hofmann und Stoffel, 1993) und TMHMM (Sonnhammer et al., 1998) Algorithmus resultierte in der Identifizierung von sieben Transmembranhelizes, die das charakteristische Hauptmerkmal der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind (Abb. 4.2) (Baldwin, 1993).

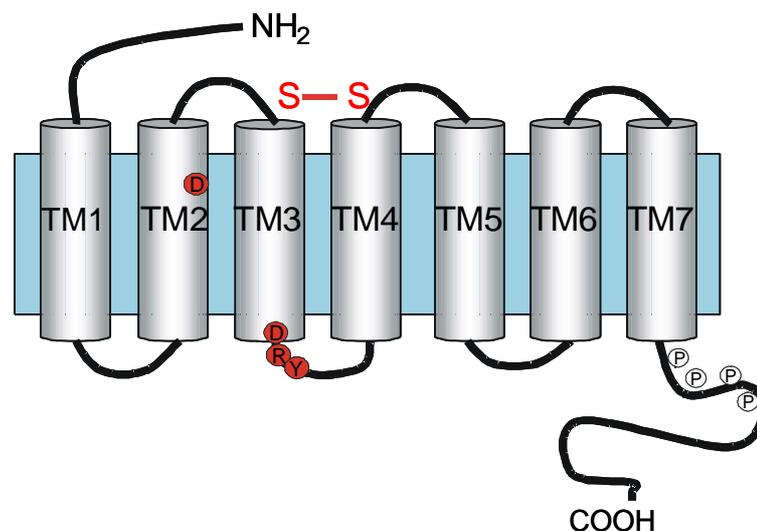


Abb. 4.2: Schematische Darstellung von PUMA-G. PUMA-G besteht aus sieben Transmembranhelizes, die durch drei intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus ist extrazellulär lokalisiert, der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert. Zwei hochkonservierte Cysteine befinden sich in den ersten beiden extrazellulären Schleifen. Ein konserviertes Aspartat (D) befindet sich in TM 2, das konservierte Aspartat-Arginin-Tyrosin (DRY) Tripeptid befindet sich an der intrazellulären Seite von TM 3. Potentielle Phosphorylierungsstellen sind schematisch dargestellt.

Die Transmembrandomänen der GPCRs sind durch aufeinanderfolgende intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Das aminoterminal Ende dieser Rezeptoren befindet sich auf der extrazellulären Seite der Membran und ist häufig glykosyliert, wohingegen sich der C-Terminus intrazellulär befindet (Ji et al., 1998). Potentielle Glykosylierungsstellen konnten für PUMA-G nicht gefunden werden. Durch den Vergleich der PUMA-G Proteinse-

quenz mit bekannten Proteinen in der Datenbank GenBank unter Verwendung des BLASTP Algorithmus (Altschul et al., 1997) fanden sich zwei humane G-Protein gekoppelte Rezeptoren, HM74 (Nomura et al., 1993) und GPR31 (Zingoni et al., 1997), zu denen PUMA-G eine Homologie aufweist. Das PUMA-G Protein ist 73 % mit HM74 und 30 % mit GPR31 identisch. Von den beiden humanen Rezeptoren sind Ligand und Funktion unbekannt (Nomura et al., 1993; Zingoni et al., 1997; Marchese et al., 1999). Aufgrund struktureller Merkmale konnten beide Proteine jedoch in die Rhodopsin-Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren eingeordnet werden (Attwood und Findlay, 1994). Es ist daher auch sehr wahrscheinlich, daß PUMA-G ein neues Mitglied dieser Familie darstellt. Die Rhodopsin-Rezeptoren bilden innerhalb der GPCR-Superfamilie die größte und auch die am besten untersuchte Familie (Gether und Kobilka, 1998). Weitere Mitglieder der Rhodopsin-Rezeptor Familie sind die Rezeptoren der viel untersuchten klassischen Chemoattraktanten N-Formylpeptid, C5a und C3a Komplementfragmentpeptid, Leukotrien B4 und PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) sowie die Rezeptoren der Chemokine. PUMA-G zeigt zu den murinen G-Protein gekoppelten Rezeptoren generell einen wesentlich niedrigeren Homologiegrad. Dennoch sind die besten Homologien wiederum zu Rezeptoren aus der Rhodopsin-Familie zu verzeichnen. So beträgt die Aminosäureidentität von PUMA-G zu dem ATP-Rezeptor 25 %, dem Bradykinin Rezeptor 25 %, dem PAF Rezeptor 24 %, dem CC Chemokin Rezeptor 5 21 %, dem Thrombin Rezeptor 20 %, und dem N-Formylpeptid Rezeptor 20 %. Neben den Homologien zu Rhodopsin-Rezeptoren weist PUMA-G auch einige der charakteristischen Schlüsselemente dieser GPCR-Familie auf. Diese beinhalten ein konservierte Aspartat in der zweiten Transmembrandomäne, das Aspartat-Arginin-Tyrosin (DRY) Tripeptid an der Interphase zwischen der dritten Transmembrandomäne und der zweiten zytoplasmatischen Schleife und zwei hochkonservierte Cysteine in den ersten beiden extrazytoplasmatischen Schleifen (Abb. 4.2). Das Vorhandensein dieser strukturellen Merkmale ist ein weiterer Hinweis darauf, daß PUMA-G in die Rhodopsin-Rezeptor Familie eingeordnet werden kann.

Die GPCRs übermitteln Signale eines sehr breiten Spektrums von extrazellulären Liganden wie z.B. Hormone, Neurotransmitter, Photonen, Nukleotide, Lipide, Peptide und Proteine. In den meisten Fällen erfolgt die Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine, die unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren können und so verschiedene zelluläre Antworten hervorrufen. Die GPCRs können aufgrund ihrer Struktur, Funktion, Ligandenbindung und Homologie zu anderen GPCR Rezeptoren in verschiedene Subfamilien eingeteilt werden (Horn et al., 1998). Beispiele für Subfamilien sind die Peptid-bindenden Rezeptoren, die Nukleotid-bindenden Rezeptoren oder die Amin-bindenden Rezeptoren (Horn et al., 1998). Interessanterweise bieten die Subfamilien der Prostanoid und Nukleotid Rezeptoren eindrucksvolle Beispiele dafür, daß Rezeptoren weniger als 30 % Aminosäureidentität besitzen können und doch aufgrund ihrer extrem hohen Ähnlichkeit eine Subfamilie bilden (Marchese et al., 1999). Eine ähnliche Situation existiert für die Chemokinrezeptoren. Der Chemokinrezeptor CCR1 beispielsweise zeigt nur 31 % Homologie zu CXCR1 und 33 % zu CXCR2 (Murdoch und Finn, 2000).

Aufgrund der geringen Aminosäuresequenzidentität von PUMA-G zu anderen GPCRs ist es bislang nicht möglich, PUMA-G aufgrund von Homologie in eine der existierenden Subfamilien einzuordnen. Auch der humane Rezeptor HM74, zu dem PUMA-G am meisten Ähnlichkeit zeigt, konnte keiner Subfamilie zugeordnet werden (Marchese et al., 1999). Möglicherweise bildet PUMA-G zusammen mit dem humanen Rezeptor HM74 auch eine eigene Subfamilie.

4.4 Analyse des genomischen Lokus von PUMA-G

Die genomische Struktur von PUMA-G wurde nach Subklonierung eines 7,1 kb großen DNS-Fragments aus einem BAC-Klon, der den genomischen Lokus enthielt, mittels Sequenzierung und Southernblot Analyse untersucht. Die Analyse ergab, daß PUMA-G ein intronloses Gen ist, das in einfacher Kopie im Genom vorliegt. Das Fehlen von Introns in einem Gen ist oft ein Indiz für das Vorhandensein eines Pseudogens. Der Großteil der Pseudogene in den Genomen von Säugetieren ist wahrscheinlich über einen Mechanismus entstanden, bei dem im Laufe der Entwicklung eine reverse Transkription einer RNS stattgefunden hat (Knippers, 1995). Die entstandene cDNS könnte so als eine Art "blinder Passagier" durch Retroviren oder Retroposons in das Genom integriert worden sein, die dann über Generationen weitervererbt wurde (Knippers, 1995). Bei der auf dieser Art entstandenen Pseudogene findet sich häufig eine Adenin-Folge, die normalerweise erst posttranskriptionell an die RNS angeheftet wird, in der 3'-Region des Gens. Oftmals sind die Leseraster solcher Pseudogene durch den fehlenden Selektionsdruck durch kleine Insertionen und Deletionen unterbrochen. Da sich in der PUMA-G genomischen Sequenz keine Adenin-Folge in der 3'-Region befand und da die über RACE ermittelte cDNS Sequenz über die gesamte Länge identisch mit der genomischen Sequenz war, ist die Existenz eines Pseudogens auszuschließen. Zudem besitzen wahrscheinlich mehr als 90 % der G-Protein gekoppelten Rezeptoren keine Introns im offenen Leseraster (Gentles und Karlin, 1999). Insgesamt wird die Zahl der intronlosen humanen Gene auf maximal 5 % geschätzt, von denen bis zu einem Drittel GPCRs sein könnten (Gentles und Karlin, 1999). Höchst interessant, jedoch ungeklärt ist die Frage, wie sich die GPCRs im Laufe der Evolution entwickelt haben und ob intronlose Gene einen selektiven Vorteil besitzen. Möglicherweise können diese Gene effizienter transkribiert und vermehrt exprimiert werden, da ein posttranskriptionales Spleißen nicht mehr erforderlich ist (Gentles und Karlin, 1999; Brosius, 1999).

4.5 PUMA-G Expression *in vitro*

In vitro Untersuchungen zur Analyse der IFN γ induzierten PUMA-G Expression wurden vor allem an murinen Makrophagen Zelllinien, primären Makrophagen, dendritischen Zellen und embryonalen Fibroblasten durchgeführt. In IFN γ und TNF α stimulierten ANA-1 Makrophagen erreichte die PUMA-G Expression nach 2 - 4 Stunden ein Maximum und war auch nach 24 Stunden noch erhöht. Da TNF α allein zu keiner erhöhten mRNS Menge von PUMA-G führte, IFN γ allein hingegen schon, ist die induzierte Expression von PUMA-G nach TNF α und IFN γ Stimulierung der ANA-1 Zellen deshalb höchstwahrscheinlich auf die alleinige Wirkung von IFN γ zurückzuführen. Ein synergistischer Effekt von IFN γ und TNF α auf die Aktivierung der Transkription, wie für eine Reihe von Genen wie z.B. IRF-1, ICAM-1, Mig und RANTES beschrieben (Ohmori et al., 1997), war für PUMA-G jedoch nicht zu beobachten.

Da die PUMA-G Expression in allen untersuchten Makrophagen Zelllinien, sowie in primären peritonealen Makrophagen (PEC) stark durch IFN γ induzierbar war, in embryonalen Fibroblasten hingegen auch nach 16-stündiger Stimulierung der Zellen mit TNF α und IFN γ keine RNS im Northernblot nachgewiesen werden konnte, ist für PUMA-G eine spezifische Funktion in aktivierten Makrophagen zu vermuten. Da PUMA-G neben Makrophagen auch in unreifen, sowie in reifen dendritischen Zellen exprimiert war, ist eine Rolle von PUMA-G in der Antigenaufnahme oder -prozessierung ebenfalls denkbar, da beide Zelltypen als Antigen-präsentierende Zellen im Immunsystem fungieren (Banchereau und Steinman, 1998).

Die Analyse der Genexpression in ANA-1 Makrophagen, die mit IFN α , IFN β oder IFN γ stimuliert wurden zeigte, daß PUMA-G spezifisch durch IFN γ , jedoch nicht durch Typ I Interferone induziert wurde. Die Expression von Mx1, einer antiviral wirkenden GTPase die als Positivkontrolle mitgeführt wurde, war hingegen wie erwartet stark durch Typ I Interferone induzierbar. Die Nicht-Induzierbarkeit von PUMA-G durch Typ I Interferone ist möglicherweise damit erklärbar, daß diese nicht über die gleiche Makrophagen-aktivierende Funktion wie IFN γ verfügen (Stark et al., 1998). Dies ist darin begründet, daß die Signalwege von Typ I und Typ II Interferonrezeptoren unterschiedlich sind. Möglich ist auch, daß die Funktion von PUMA-G mehr in der Abwehr gegen Bakterien als gegen Viren anzusiedeln ist, da IFN α und IFN β vorwiegend von virus-infizierten Zellen produziert werden und eine wesentliche Rolle in der Abwehr gegen Viren besitzen (Stark et al., 1998).

Vermutlich ist PUMA-G ein primär-responsives Gen (Kapitel 1.2), da in ersten Untersuchungen die IFN γ induzierte Genexpression nicht durch Zugabe von Cycloheximid, einem Bioproteinsynthesehemmer, inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies würde mit dem frühen Expressionsmaximum von PUMA-G nach 2 - 4 Stunden sehr gut korrelieren, da keine Neusynthese für die Aktivierung der Transkription vonnöten wäre. Außerdem fanden sich im Promotorbereich von PUMA-G zwei GAS (gamma activated site) Sequenzen. Daß der zeitliche Verlauf der IFN γ induzierten Genexpression nicht immer mit der primären oder sekundären Induzierbarkeit eines Gens korreliert, zeigen die Gene gp91 phox oder IGTP beispielhaft. In

TNF α und IFN γ stimulierten ANA-1 Zellen erreichte die gp91 phox Expression erst nach 16 - 24 Stunden ihr Maximum (Daten nicht gezeigt), obwohl es sich um ein primär-responsives Gen handelt (Eklund und Skalnik, 1995). Dagegen zeigt die GTPase IGTP als sekundär-responsives Gen ein Expressionsmaximum bereits nach 3 Stunden in IFN γ stimulierten RAW Makrophagen (Taylor et al., 1996).

Von einigen Rezeptoren für die klassischen Chemoattraktanten, wie N-Formylpeptid, Komplementfragment Peptid C5a und PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) konnte gezeigt werden, daß sie durch IFN γ in Monozyten oder Neutrophilen induzierbar sind (Ouellet et al., 1994; Klein et al., 1992; Burg et al., 1995). Die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 ist in peritonealen Makrophagen durch Stimulierung mit LPS (Lipopolysaccharid) und IFN γ ebenfalls induzierbar (Zhou et al., 1998). Die Rezeptoren der klassischen Chemoattraktanten sowie die der Chemokine sind in die Familie der Rhodopsin-Rezeptoren der GPCR-Superfamilie einzuordnen (Horn et al., 1998; Attwood und Findlay, 1994). Sie erfüllen wesentliche Funktionen im Transport und der Aktivierung von Leukozyten, in der Regulation akuter und chronischer Entzündungsreaktionen und in der Immunabwehr gegen Pathogene (Zhou et al., 1998; Murphy, 1994; Gao et al., 1997; Gao et al., 1999; Kurihara et al., 1997). Da PUMA-G höchstwahrscheinlich auch in die Rhodopsin-Familie einzuordnen ist und ebenso wie die Rezeptoren der Chemoattraktanten spezifisch auf Abwehrzellen des Immunsystems vorhanden ist und darüber hinaus in diesen Zellen durch IFN γ induziert werden kann, ist für PUMA-G auch eine Funktion bei der Chemotaxis von Leukozyten denkbar.

4.6 PUMA-G Expression *in vivo*

Die Analyse der PUMA-G Expression in verschiedenen Geweben in der Maus mittels Northernblot ergab, daß PUMA-G im Vergleich zu GAPDH in Milz und Lunge am höchsten ausgeprägt war. In beiden Organen kommt es häufig zum Kontakt zwischen eindringenden Pathogenen und Zellen des Immunsystems. Das Vorhandensein von PUMA-G in der Lunge könnte auf eine hohe basale Expression in Alveolarmakrophagen zurückzuführen sein. Im Herz und im Skelettmuskel war PUMA-G basal exprimiert, in der Niere dagegen äußerst schwach. Keine PUMA-G Transkripte waren in Testis und Gehirn nachweisbar. Generell stimmte das Expressionsmuster von PUMA-G in den meisten Geweben mit dem von gp91 phox überein. Deshalb könnte die zelluläre Ausprägung von PUMA-G und gp91 phox ähnlich sein. Gp 91 phox ist ein Bestandteil des Multienzymkomplexes zur Generierung reaktiver Sauerstoffintermediate in Phagozyten (Eklund und Skalnik, 1995). Außer in Neutrophilen und Makrophagen ist gp91 phox zudem in Eosinophilen, B-Zellen und Endothelzellen nachgewiesen worden (Gorlach et al., 2000; Yang et al., 2000). Möglicherweise ist die Expression von gp91 phox und auch die von PUMA-G im Herz durch eine Expression in Endothelzellen zu erklären.

Untersuchungen an einem Sepsismodell in Mäusen, der CASP (colon ascendens stent peritonitis), haben gezeigt, daß IFN γ für das Überleben dieser experimentellen, polymikrobiellen Sepsis eine essentielle Rolle spielt (Zantl et al., 1998). In CASP operierten Mäusen war 6 - 10 Stunden nach Operation die PUMA-G RNS in der Leber sehr stark exprimiert, wohingegen in der Leber von Kontrolltieren PUMA-G nicht detektierbar war. In der Lunge und der Milz dagegen waren keine signifikanten Expressionsunterschiede zu verzeichnen, obwohl die Bakterienlast 12 Stunden nach CASP-Operation in Leber, Milz und Lunge ähnlich hoch ist (Zantl et al., 1998). Möglicherweise ist PUMA-G in den ruhenden Makrophagen der Leber, den Kupfferzellen, nicht oder nur sehr gering exprimiert und wird nach Infektion in diesen Zellen induziert, wo es zur vermehrten Prozessierung und Präsentation von bakteriellen Antigenen beitragen könnte. Denkbar ist auch, daß PUMA-G direkt in der Bakterienabwehr beteiligt ist. Ungeklärt ist, ob PUMA-G in der Leber direkt durch bakterielle Komponenten wie z.B. LPS oder weiteren bakteriellen Zellwandbestandteilen induziert wird oder sekundär durch IFN γ . Weitere Untersuchungen an IFN γ defizienten Mäusen und an PUMA-G defizienten Mäusen können Aufschluß darüber geben, welche Rolle PUMA-G in der Sepsis spielt.

Nach Infektion von Wildtypmäusen mit *Listeria monocytogenes* war eine Zunahme der PUMA-G Expression in Milz und in geringerem Ausmaß auch in der Leber zu beobachten. Die PUMA-G RNS Mengen wurden 24 und 72 Stunden nach Infektion mittels Northernblot bestimmt. Einer der ersten Abwehrmechanismen gegen die eindringenden Listerien ist deren Beseitigung durch Monozyten und Makrophagen, wie z.B. den Kupfferzellen in der Leber (Rosen et al., 1989; Portnoy, 1992). Neutrophile Granulozyten wandern bereits ab Tag 1, Monozyten und Makrophagen ab Tag 2 - 4 in die infizierten Organe ein, wo sie zur Bildung von Granulomen beitragen (Mandel und Cheers, 1980; Portnoy, 1992). Die erhöhte PUMA-G RNS Menge in Milz und Leber könnte einerseits auf die gesteigerte Transkriptionsrate von PUMA-G zurückzuführen sein, andererseits ist sie auch durch das vermehrte Einwandern von Makrophagen oder Neutrophilen, die basal bereits PUMA-G exprimieren, erklärbar. PUMA-G war auch in der Milz von IFN γ defizienten Mäusen nach Listerieninfektion ausgeprägt. Diese Tatsache läßt vermuten, daß PUMA-G nicht ausschließlich durch IFN γ , sondern auch durch andere Zytokine oder Bakterienbestandteile induziert werden kann. Allerdings ist in IFN γ R defizienten Tieren die Zahl der einwandernden Granulozyten leicht erhöht, so daß die verstärkte PUMA-G Ausprägung in der Leber von IFN γ defizienten Mäusen möglicherweise durch die einwandernden neutrophilen Granulozyten bedingt sein könnte.

Untersuchungen der PUMA-G Expressionsrate über das *lacZ* Reportergen (Kapitel 3.7) in verschiedenen Organen von heterozygoten und homozygoten PUMA-G defizienten Mäusen nach Listerieninfektion werden entscheidende Hinweise über die Funktion von PUMA-G in der Listeriose liefern können.

4.7 Generierung einer PUMA-G defizienten Mauslinie

Durch die gezielte Mutagenese von Genen in der Keimbahn können Mäuse mit spezifischen Gendefekten generiert werden. Dies eröffnet neuartige Möglichkeiten, wertvolle Einblicke in die *in vivo* Funktion dieser Gene zu erlangen und ermöglicht dadurch auch ein besseres Verständnis komplexer biologischer Mechanismen (Pfeffer und Mak, 1994). Die Generierung der PUMA-G defizienten Mauslinie erfolgte mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus. Dabei wurde fast der gesamte kodierende Bereich durch Insertion einer β -Galaktosidase (*lacZ*) und einer Neomycin-Resistenz Kasette ersetzt. Der Vorteil dieser Strategie zur Inaktivierung von PUMA-G liegt darin, daß durch das eingeführte Reporter-gen, das vom endogenen PUMA-G Promotor aus gesteuert wird, die Untersuchung der Expression möglich ist. Das β -Galaktosidasegen ist als Reporter-gen in einer Vielzahl von biologischen Systemen weit verbreitet. Es wurde bereits erfolgreich zur Generierung von Reporter-mäusen für VEGF Rezeptor-3 (vascular endothelial growth factor receptor-3), Prox1 (ein Homeobox Gen) und für die Brutons Tyrosinkinase eingesetzt (Dumont et al., 1998; Wigle und Oliver, 1999; Wigle et al., 1999; Hendriks et al., 1996). Ein kritischer Punkt bei der Klonierung des Rekombinationsvektors ist, daß zwischen dem Translationsstop des Reporter-gens und dem Polyadenylierungssignal kein Intron liegen darf, da sonst das Stopkodon als prämaures Stopkodon erkannt wird und eine rasche Degradierung der RNS die Folge ist (Hentze und Kulozik, 1999). Dieser Mechanismus, der als NMD (nonsense-mediated decay) bezeichnet wird und wahrscheinlich dazu dient, die Produktion fehlerhafter Proteine in der Zelle zu vermeiden, erklärt auch warum es kaum Gene mit Introns in der 3'-untranslatierten Region gibt (Hentze und Kulozik, 1999). Interessanterweise ist bislang kein Gen bekannt, das für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodiert und ein 3' gelegenes Intron besitzt (Brosius, 1999). Um den Mechanismus des NMD zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein β -Galaktosidasegen verwendet, das über ein eigenes Polyadenylierungssignal verfügt und somit in der Zelle eine stabile mRNS bilden kann. Allerdings geht dabei der mögliche Einfluß von regulatorischen Elementen in der 3'-Region des endogenen Gens verloren. Um mögliche Interferenzen des Neomycin-Resistenz Gens mit der Ausprägung des Reporter-gens unterbinden zu können, wurde eine Neomycin-Resistenz Kasette verwendet die beidseitig mit loxP (locus of X-ing over P1 phage) Erkennungssequenzen flankiert war, so daß diese durch CRE medierte Deletion wieder entfernt werden kann.

4.8 Das PCR-Select Fragment AS 329

Das cDNS Fragment AS 329 wurde, wie auch PUMA-G, innerhalb des modifizierten PCR-Select Screens identifiziert, in welchem cDNS aus stimulierten ANA-1 Zellen gegen cDNS aus unstimulierten ANA-1 Zellen und aus stimulierten Fibroblasten subtrahiert wurde. AS 329 war bereits basal in unstimulierten ANA-1 Makrophagen ausgeprägt. Durch IFN γ und TNF α Stimulierung der Zellen war die AS 329 RNS sehr stark induzierbar. Die maximale

Expression war im Gegensatz zu PUMA-G erst nach 8 - 24 Stunden zu beobachten. Behandlung der Zellen mit TNF α allein resultierte in keiner vermehrten Expression, wohingegen IFN γ allein die gleiche Erhöhung der AS 329 RNS bewirkte wie IFN γ und TNF α zusammen. Wie für PUMA-G konnte auch bei AS 329 kein synergistischer Effekt der beiden Zytokine auf die Transkriptionsrate festgestellt werden. Untersuchungen zur Induzierbarkeit von AS 329 durch Typ I Interferone ergab, daß die AS 329 Genexpression bereits nach 4 Stunden stark induziert war. IFN α und IFN β vermitteln ihre Signale wahrscheinlich durch Bindung an denselben Rezeptor (Pestka, 1997). Eines der Proteine, zu denen AS 329 eine Homologie aufweist, das Interferon-induzierte Protein 75, ist ebenfalls durch IFN α und IFN γ induzierbar (Kadereit et al., 1993).

Die Analyse der Gewebeverteilung von AS 329 zeigte, daß neben der Hauptbande von ca. 2 kb zwei weitere Banden von ca. 3 und 4,4 kb auftraten. Möglicherweise handelt es sich dabei um unterschiedliche Spleißvarianten desselben Gens. Denkbar ist auch, daß die verwendete Sonde mit der RNS von verwandten Genen kreuzhybridisierte. AS 329 war vor allem in Lunge, Milz und Niere stark ausgeprägt. Im Verhältnis zu GAPDH war die Expression von AS 329 in Herz und Skelettmuskel schwächer. Keine Expression konnte in Testis und Gehirn nachgewiesen werden. Da das Expressionsmuster von AS 329 identisch mit dem von gp91 phox war, ist eine ähnliche zelluläre Ausprägung der beiden Gene denkbar. Deshalb sollten in weiteren Studien neutrophile Granulozyten, Eosinophile, B-Zellen und Endothelzellen auf ihre AS 329 Expression hin untersucht werden.

AS 329 zeigte über eine Sequenzlänge von 100 bp 80 % DNS-Identität zu dem humanen Protein Sp110 und zu dem Interferon-induzierten Protein 75. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Sp110 spezifisch in Leukozyten exprimiert ist und in den Nukleus lokalisiert, wo es wahrscheinlich als Transkriptionskoaktivator von nukleären Hormonrezeptoren dient (Bloch et al., 2000). Das Interferon-induzierte Protein 75 ist ebenfalls im Nukleus lokalisiert und besitzt eine DNS bindende Domäne (Kadereit et al., 1993).

Über eine Funktion von AS 329 kann zu diesem frühen Zeitpunkt der Charakterisierung nur spekuliert werden. Es ist jedoch denkbar, daß AS 329 auch im Nukleus lokalisiert ist, wo es möglicherweise in der Aktivierung IFN γ induzierter Gene beteiligt ist.

4.9 Ausblick

Die zukünftigen Arbeiten werden sich neben der volle Länge Klonierung von AS 329 vorwiegend mit der Charakterisierung der PUMA-G defizienten Mäuse beschäftigen. Durch verschiedene Infektionsexperimente wie z.B. mit Listerien, Salmonellen, Leishmanien, Toxoplasmen oder Viren in diesen Mäusen, ist eine gezielte Untersuchung der Beteiligung von PUMA-G an der Immunabwehr gegen diese verschiedenen Pathogene möglich. Das eingebrachte β -Galaktosidase Reporter gen wird zudem die Analyse der *in vivo* Expression und der zellulären Verteilung von PUMA-G ermöglichen. Da die PUMA-G Expression wahrschein-

lich nicht nur durch IFN γ reguliert ist, wird in weiteren *in vitro* Versuchen getestet, ob auch andere Stimuli wie LPS oder weitere Zellwandbestandteile, IL-12, IL-18 oder bakterielle DNS PUMA-G zu induzieren vermögen. Zudem wird auch die Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen PUMA-G erfolgen.

Eine sehr anspruchsvolle wie auch spannende zukünftige Aufgabe wird es sein, den Liganden für PUMA-G zu identifizieren. Eine Möglichkeit hierfür wäre, PUMA-G stabil zu exprimieren und nach Zugabe verschiedener Substanzen eine zelluläre Antwort wie z.B. Kalziumeinstrom zu beobachten. Daneben existiert auch ein System in der Hefe, in dem das Hefenwachstum auf Histidin-freiem Medium von der Stimulierung des transfizierten GPCRs abhängig ist (Klein et al., 1998). Möglicherweise ist auch die Suche nach Liganden in lebenden, PUMA-G-EGFP transfizierten Zellen durchführbar, da die Stimulation des Rezeptors zu dessen Internalisierung führt, die direkt beobachtet werden könnte (Kallal und Benovic, 2000).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Interferon- γ (IFN γ) ist ein inflammatorisches Zytokin, das essentielle Funktionen in der angeborenen Immunantwort besitzt. Die Aktivierung von Makrophagen durch IFN γ ist für die Etablierung einer effektiven frühen Immunantwort und zur Eliminierung von intrazellulären Erregern von zentraler Bedeutung. Unter Verwendung einer subtraktiven Hybridisierungsmethode wurde eine murine Makrophagen cDNS Bank generiert, die differentiell IFN γ induzierbare Gene beinhaltet. Mehrere bislang unbekannte IFN γ induzierbare Gene konnten so identifiziert werden. IIGP und mGBP-2 sind neue Mitglieder der 47 kDa und 65 kDa GTPasen Familien. Beide GTPasen waren in Makrophagen und embryonalen Fibroblasten spezifisch durch IFN γ induzierbar. Besonders stark war IIGP und mGBP-2 nach Listerieninfektion in der Leber ausgeprägt, wo sie an der Bakterienabwehr beteiligt sein könnten.

Ein weiteres bislang unbekanntes differentiell exprimiertes Gen in aktivierten Makrophagen war PUMA-G (**protein upregulated in macrophages by IFN γ**). PUMA-G zeigte die charakteristischen strukturellen Merkmale der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese beinhalten die typischen sieben Transmembranhelizes, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Das PUMA-G Protein weist die höchste Aminosäureidentität zu den humanen GPCRs HM74 (73 %) und GPR31 (30 %) auf. Eine Homologie zu murinen GPCRs dagegen ist wesentlich geringer ausgeprägt und liegt zwischen 20 und 25 % zu den Mitgliedern der Rhodopsin-Familie.

Die Expression von PUMA-G war in einer Reihe von Makrophagen Zelllinien und auch in primären Makrophagen durch IFN γ , jedoch nicht durch die Typ I Interferone IFN α und IFN β , stark induzierbar. In embryonalen Fibroblasten war PUMA-G auch nach Stimulierung der Zellen mit IFN γ nicht exprimiert. Untersuchungen der *in vivo* Expression durch Northernblot Analyse ergaben, daß die PUMA-G mRNA besonders in der Milz von Listerien infizierten Mäusen und in Mäusen, bei denen durch eine CASP-Operation eine experimentelle Sepsis hervorgerufen wurde, drastisch erhöht war. Die Charakterisierung des genomischen PUMA-G Locus zeigte, daß PUMA-G ein intronloses Gen ist und in einfacher Kopie im Genom vorliegt. Eine FISH-Untersuchung zeigte, daß PUMA-G in der telomeren Region des Chromosom 5 in der Maus lokalisiert ist. Durch transiente Transfektion verschiedener Zelltypen mit PUMA-G-EGFP und PUMA-G-FLAG Fusionskonstrukten und nachfolgender Analyse im konfokalen Mikroskop konnte gezeigt werden, daß PUMA-G an der Zytoplasmamembran lokalisiert ist.

Um die *in vivo* Funktion von PUMA-G eingehend untersuchen zu können, wurde das Gen in der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert. Dabei wurde fast der komplette offene Leserahmen durch das β -Galaktosidase Reporter gen (*lacZ*) und eine Neomycin-Resistenz Kassetten ersetzt. So kann durch die Inaktivierung des PUMA-G Gens die Expression über das Reporter gen bestimmt werden. Durch Untersuchungen an PUMA-G Knock-out Mäusen wird es möglich sein, neue Einblicke in die spezielle Funktion von PUMA-G in Makrophagen und in der Infektionsabwehr zu erlangen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ali, M.S., Sayeski, P.P., Dirksen, L.B., Hayzer, D.J., Marrero, M.B., and Bernstein, K.E. (1997). Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 23382-23388.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Attwood, T.K. and Findlay, J.B. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7, 195-203.
- Baldwin, J.M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12, 1693-1703.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., and Unanue, E.R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* 124, 5-24.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bloch, D.B., Nakajima, A., Gulick, T., Chiche, J.D., Orth, D., de la Monte, S.M., and Bloch, K.D. (2000). Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Mol. Cell Biol.* 20, 6138-6146.
- Bockaert, J. and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729.
- 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. (2000). The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 419-424.

- Bogdan,C., Rollingshoff,M., and Diefenbach,A. (2000b). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 64-76.
- Bogdan,C., Rollingshoff,M., and Diefenbach,A. (2000a). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* *173*, 17-26.
- 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.
- Brosius,J. (1999). Many G-protein-coupled receptors are encoded by retrogenes [letter; comment]. *Trends Genet.* *15*, 304-305.
- Burg,M., Martin,U., Rheinheimer,C., Kohl,J., Bautsch,W., Bottger,E.C., and Klos,A. (1995). IFN-gamma up-regulates the human C5a receptor (CD88) in myeloblastic U937 cells and related cell lines. *J. Immunol.* *155*, 4419-4426.
- Car,B.D., Eng,V.M., Schnyder,B., Ozmen,L., Huang,S., Gallay,P., Heumann,D., Aguet,M., and Ryffel,B. (1994). Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* *179*, 1437-1444.
- 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.
- Chen,C. and Okayama,H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* *7*, 2745-2752.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.
- Cohen,S.N., Chang,A.C., and Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *69*, 2110-2114.
- Conlan,J.W. and North,R.J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* *179*, 259-268.
- 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.

- Czuprynski,C.J., Brown,J.F., Maroushek,N., Wagner,R.D., and Steinberg,H. (1994). Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 152, 1836-1846.
- Dalton,D.K., Pitts-Meek,S., Keshav,S., Figari,I.S., Bradley,A., and Stewart,T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes [see comments]. *Science* 259, 1739-1742.
- Darnell,J.E., Jr., Kerr,I.M., and Stark,G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- Diatchenko,L., Lau,Y.F., Campbell,A.P., Chenchik,A., Moqadam,F., Huang,B., Lukyanov,S., Lukyanov,K., Gurskaya,N., Sverdlov,E.D., and Siebert,P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6025-6030.
- Diatchenko,L., Lukyanov,S., Lau,Y.F., and Siebert,P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303, 349-380.
- Dumont,D.J., Jussila,L., Taipale,J., Lymboussaki,A., Mustonen,T., Pajusola,K., Breitman,M., and Alitalo,K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282, 946-949.
- Edelson,B.T. and Unanue,E.R. (2000). Immunity to *Listeria* infection. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 425-431.
- Eklund,E.A. and Skalnik,D.G. (1995). Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J. Biol. Chem.* 270, 8267-8273.
- 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.
- Farber,J.M. (1990). A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 5238-5242.
- Fehr,T., Schoedon,G., Odermatt,B., Holtschke,T., Schneemann,M., Bachmann,M.F., Mak,T.W., Horak,I., and Zinkernagel,R.M. (1997). Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J. Exp. Med.* 185, 921-931.

- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* *137*, 266-267.
- Früh, K., Karlsson, L., and Yang, Y. (1997). γ -Interferon in antigen processing and presentation. In γ -Interferon in Antiviral Defense, G. Karupiah, ed. Springer, Heidelberg, p. 39.
- Gao, J.L., Lee, E.J., and Murphy, P.M. (1999). Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J. Exp. Med.* *189*, 657-662.
- Gao, J.L., Wynn, T.A., Chang, Y., Lee, E.J., Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Tiffany, H.L., Westphal, H., Kwon-Chung, J., and Murphy, P.M. (1997). Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J. Exp. Med.* *185*, 1959-1968.
- Gentles, A.J. and Karlin, S. (1999). Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless? [letter] [see comments]. *Trends Genet.* *15*, 47-49.
- Gether, U. and Kobilka, B.K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* *273*, 17979-17982.
- Glienke, J., Schmitt, A.O., Pilarsky, C., Hinzmann, B., Weiss, B., Rosenthal, A., and Thierauch, K.H. (2000). Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic states. *Eur. J. Biochem.* *267*, 2820-2830.
- Gorlach, A., Brandes, R.P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., and Busse, R. (2000). A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall [see comments]. *Circ. Res.* *87*, 26-32.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-580.
- Hendriks, R.W., de Bruijn, M.F., Maas, A., Dingjan, G.M., Karis, A., and Grosveld, F. (1996). Inactivation of Btk by insertion of lacZ reveals defects in B cell development only past the pre-B cell stage. *EMBO J.* *15*, 4862-4872.
- Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* *96*, 307-310.
- Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993). TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* *347*, 166-168.
- Horn, F., Weare, J., Beukers, M.W., Horsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, O., Campaigne, F., and Vriend, G. (1998). GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* *26*, 275-279.

- Huang,S., Hendriks,W., Althage,A., Hemmi,S., Bluethmann,H., Kamijo,R., Vilcek,J., Zinker-nagel,R.M., and Aguet,M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor [see comments]. *Science* 259, 1742-1745.
- Inaba,K., Inaba,M., Romani,N., Aya,H., Deguchi,M., Ikehara,S., Muramatsu,S., and Stein-man,R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702.
- Ji,T.H., Grossmann,M., and Ji,I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 17299-17302.
- Jin,H., Cheng,X., Diatchenko,L., Siebert,P.D., and Huang,C.C. (1997). Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multi-ple tissues. *Biotechniques* 23, 1084-1086.
- Jouanguy,E., Altare,F., Lamhamedi,S., Revy,P., Emile,J.F., Newport,M., Levin,M., Blanche,S., Seboun,E., Fischer,A., and Casanova,J.L. (1996). Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N. Engl. J. Med.* 335, 1956-1961.
- Kadereit,S., Gewert,D.R., Galabru,J., Hovanessian,A.G., and Meurs,E.F. (1993). Molecular cloning of two new interferon-induced, highly related nuclear phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* 268, 24432-24441.
- Kallal,L. and Benovic,J.L. (2000). Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 175-180.
- Karmann,K., Hughes,C.C., Schechner,J., Fanslow,W.C., and Pober,J.S. (1995). CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4342-4346.
- Karnik,S.S. and Khorana,H.G. (1990). Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187. *J. Biol. Chem.* 265, 17520-17524.
- Kehrl,J.H. (1998). Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity.* 8, 1-10.
- Klein,C., Paul,J.I., Sauve,K., Schmidt,M.M., Arcangeli,L., Ransom,J., Trueheart,J., Man-fredi,J.P., Broach,J.R., and Murphy,A.J. (1998). Identification of surrogate agonists for the human FPRL-1 receptor by autocrine selection in yeast. *Nat. Biotechnol.* 16, 1334-1337.
- Klein,J.B., Scherzer,J.A., and McLeish,K.R. (1992). IFN-gamma enhances expression of formyl peptide receptors and guanine nucleotide-binding proteins by HL-60 granulocytes. *J. Immunol.* 148, 2483-2488.

- Knippers,R. (1995). *Molekulare Genetik*. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Kozak,M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196, 947-950.
- Kurihara,T., Warr,G., Loy,J., and Bravo,R. (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* 186, 1757-1762.
- Kyte,J. and Doolittle,R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Leenen,P.J., Canono,B.P., Drevets,D.A., Voerman,J.S., and Campbell,P.A. (1994). TNF-alpha and IFN-gamma stimulate a macrophage precursor cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide-independent manner. *J. Immunol.* 153, 5141-5147.
- Lefkowitz,R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 18677-18680.
- Lehrach,H., Diamond,D., Wozney,J.M., and Boedtker,H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.
- Lennon,G., Auffray,C., Polymeropoulos,M., and Soares,M.B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33, 151-152.
- Lewis,M., Tartaglia,L.A., Lee,A., Bennett,G.L., Rice,G.C., Wong,G.H., Chen,E.Y., and Goeddel,D.V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2830-2834.
- Liang,P. and Pardee,A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* 257, 967-971.
- Liu,R., Buettner,G.R., and Oberley,L.W. (2000). Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha [In Process Citation]. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1197-1205.
- Lockhart,D.J., Dong,H., Byrne,M.C., Follettie,M.T., Gallo,M.V., Chee,M.S., Mittmann,M., Wang,C., Kobayashi,M., Horton,H., and Brown,E.L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays [see comments]. *Nat. Biotechnol.* 14, 1675-1680.
- Luster,A.D. and Ravetch,J.V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med.* 166, 1084-1097.

- MacMicking,J.D., Nathan,C., Hom,G., Chartrain,N., Fletcher,D.S., Trumbauer,M., Stevens,K., Xie,Q.W., Sokol,K., and Hutchinson,N. (1995). Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase [published erratum appears in Cell 1995 Jun 30;81(7):following 1170]. *Cell* 81, 641-650.
- Mandel,T.E. and Cheers,C. (1980). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect. Immun.* 30, 851-861.
- Marchese,A., George,S.R., Kolakowski,L.F., Jr., Lynch,K.R., and O'Dowd,B.F. (1999). Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology [published erratum appears in Trends Pharmacol Sci 1999 Nov;20(11):447]. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 370-375.
- Marrero,M.B., Schieffer,B., Paxton,W.G., Heerd,L., Berk,B.C., Delafontaine,P., and Bernstein,K.E. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375, 247-250.
- McWhinney,C.D., Dostal,D., and Baker,K. (1998). Angiotensin II activates Stat5 through Jak2 kinase in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30, 751-761.
- Minakami,R., Jinnai,N., and Sugiyama,H. (1997). Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 20291-20298.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Munder,M., Mallo,M., Eichmann,K., and Modolell,M. (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187, 2103-2108.
- Murdoch,C. and Finn,A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-3043.
- Murphy,P.M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593-633.
- Newport,M.J., Huxley,C.M., Huston,S., Hawrylowicz,C.M., Oostra,B.A., Williamson,R., and Levin,M. (1996). A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* 335, 1941-1949.
- Nomura,H., Nielsen,B.W., and Matsushima,K. (1993). Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int. Immunol.* 5, 1239-1249.

- Offermanns,S. and Simon,M.I. (1996). Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv.* 27, 177-198.
- Ohmori,Y., Schreiber,R.D., and Hamilton,T.A. (1997). Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* 272, 14899-14907.
- Ohteki,T., Fukao,T., Suzue,K., Maki,C., Ito,M., Nakamura,M., and Koyasu,S. (1999). Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189, 1981-1986.
- Okubo,K., Hori,N., Matoba,R., Niiyama,T., Fukushima,A., Kojima,Y., and Matsubara,K. (1992). Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression [see comments]. *Nat. Genet.* 2, 173-179.
- Opipari,A.W., Jr., Boguski,M.S., and Dixit,V.M. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* 265, 14705-14708.
- Opipari,A.W., Jr., Hu,H.M., Yabkowitz,R., and Dixit,V.M. (1992). The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 267, 12424-12427.
- Orlic,D., Laprise,S.L., Cline,A.P., Anderson,S.M., and Bodine,D.M. (1999). Isolation of stem cell-specific cDNAs from hematopoietic stem cell populations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872, 243-254.
- Ouellet,S., Muller,E., and Rola-Pleszczynski,M. (1994). IFN-gamma up-regulates platelet-activating factor receptor gene expression in human monocytes. *J. Immunol.* 152, 5092-5099.
- Pebay-Peyroula,E., Rummel,G., Rosenbusch,J.P., and Landau,E.M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases [see comments]. *Science* 277, 1676-1681.
- Pestka,S. (1997). The interferon receptors. *Semin. Oncol.* 24, S9-S9.
- Petkov,P.M., Kim,K., Sandhu,J., Shafritz,D.A., and Dabeva,M.D. (2000). Identification of differentially expressed genes in epithelial Stem/Progenitor cells of fetal rat liver [In Process Citation]. *Genomics* 68, 197-209.
- Pfeffer,K. and Mak,T.W. (1994). Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 367-411.

- 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.
- Philip, R. and Epstein, L.B. (1986). Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature* 323, 86-89.
- Portnoy, D.A. (1992). Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 20-24.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-267.
- Rosa, F.M., Cochet, M.M., and Fellous, M. (1986). Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation? *Interferon* 7, 47-87.
- Rosen, H., Gordon, S., and North, R.J. (1989). Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in nonphagocytic cells. *J. Exp. Med.* 170, 27-37.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Savarese, T.M. and Fraser, C.M. (1992). In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 283 (Pt 1), 1-19.
- Sawdey, M., Podor, T.J., and Loskutoff, D.J. (1989). Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor-beta, lipopolysaccharide, and tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 264, 10396-10401.
- Scheu, S. (1998). Klonierung und Charakterisierung einer neuen TNF α Rezeptor p55 regulierten mRNS. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Schindler, C. and Darnell, J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 621-651.

Schwenk,F., Baron,U., and Rajewsky,K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 5080-5081.

Shiloh,M.U., MacMicking,J.D., Nicholson,S., Brause,J.E., Potter,S., Marino,M., Fang,F., Dinauer,M., and Nathan,C. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* 10, 29-38.

Siebert,P.D., Chenchik,A., Kellogg,D.E., Lukyanov,K.A., and Lukyanov,S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23, 1087-1088.

Sonnhammer,E.L., von Heijne,G., and Krogh,A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Ismb.* 6, 175-182.

Southern,E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 , 503-517.

Staeheli,P. (1990). Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv. Virus Res.* 38, 147-200.

Stark,G.R., Kerr,I.M., Williams,B.R., Silverman,R.H., and Schreiber,R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.

Sternberg,N. and Hamilton,D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467-486.

Sternberg,N., Hamilton,D., and Hoess,R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J. Mol. Biol.* 150, 487-507.

Sternberg,N., Sauer,B., Hoess,R., and Abremski,K. (1986). Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J. Mol. Biol.* 187, 197-212.

Szabo,S.J., Jacobson,N.G., Dighe,A.S., Gubler,U., and Murphy,K.M. (1995). Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity.* 2, 665-675.

Taylor,G.A., Collazo,C.M., Yap,G.S., Nguyen,K., Gregorio,T.A., Taylor,L.S., Eagleson,B., Secrest,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., Jeffers,M., Largaespada,D.A., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., and Woude,G.F.V. (1996). Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* 271, 20399-20405.
- Taylor,G.A., Stauber,R., Rulong,S., Hudson,E., Pei,V., Pavlakis,G.N., Resau,J.H., and Vande Woude,G.F. (1997). The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J. Biol. Chem.* 272, 10639-10645.
- Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Traber,M.G., Defendi,V., and Kayden,H.J. (1981). Receptor activities for low-density lipoprotein and acetylated low-density lipoprotein in a mouse macrophage cell line (IC21) and in human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 154, 1852-1867.
- Ullman,K.S., Northrop,J.P., Verweij,C.L., and Crabtree,G.R. (1990). Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 421-452.
- Unanue,E.R. (1997). Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 35-43.
- Venema,R.C., Ju,H., Venema,V.J., Schieffer,B., Harp,J.B., Ling,B.N., Eaton,D.C., and Marrero,M.B. (1998). Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G-protein-coupled AT1 receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 7703-7708.
- Vu,T.K., Hung,D.T., Wheaton,V.I., and Coughlin,S.R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64, 1057-1068.
- Wan,J.S., Sharp,S.J., Poirier,G.M., Wagaman,P.C., Chambers,J., Pyati,J., Hom,Y.L., Galindo,J.E., Huvar,A., Peterson,P.A., Jackson,M.R., and Erlander,M.G. (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat. Biotechnol.* 14, 1685-1691.
- Wheelock,E.F. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149, 310-311.
- Wigle,J.T., Chowdhury,K., Gruss,P., and Oliver,G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat. Genet.* 21, 318-322.
- Wigle,J.T. and Oliver,G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769-778.

Wilkinson,M., Doskow,J., and Lindsey,S. (1991). RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* *19*, 679.

Woodget,J.R., Gould,K.L., and Hunter,T. (1986). Substrate specificity of protein kinase C. *Eur. J. Biochem.* *161*, 177-184.

Wurst,W. and Joyner,A.L. (1993). Production of targeted embryonic stem cell clones. In *In Gene Targeting: A practical approach*: (Oxford: IRL Press at Oxford University Press: Joyner,A.L.(ed)).

Yang,D., Suzuki,S., Hao,L.J., Fujii,Y., Yamauchi,A., Yamamoto,M., Nakamura,M., and Kumatori,A. (2000). Eosinophil-specific regulation of gp91(phox) gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. *J. Biol. Chem.* *275*, 9425-9432.

Yap,G.S. and Sher,A. (1999). Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ . *J. Exp. Med.* *189*, 1083-1092.

Yoshimoto,T., Okamura,H., Tagawa,Y.I., Iwakura,Y., and Nakanishi,K. (1997). Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 3948-3953.

Zantl,N., Uebe,A., Neumann,B., Wagner,H., Siewert,J.R., Holzmann,B., Heidecke,C.D., and Pfeffer,K. (1998). Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect. Immun.* *66*, 2300-2309.

Zhou,Y., Kurihara,T., Ryseck,R.P., Yang,Y., Ryan,C., Loy,J., Warr,G., and Bravo,R. (1998). Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J. Immunol.* *160*, 4018-4025.

Zingoni,A., Rocchi,M., Storlazzi,C.T., Bernardini,G., Santoni,A., and Napolitano,M. (1997). Isolation and chromosomal localization of GPR31, a human gene encoding a putative G protein-coupled receptor. *Genomics* *42*, 519-523.

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Klaus Pfeffer, der mich über die Jahre hinweg stets exzellent betreute und mich auch nach Rückschlägen wieder motivierte und mich durch neue Ideen und konstruktive Vorschläge inspirierte, gilt mein besonderer Dank.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. H. Wagner, Ph.D., der mir die Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene ermöglichte.

Bei Herrn Prof. Dr. Gierl bedanke ich mich für die freundliche Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät für Chemie.

Bedanken möchte ich mich bei Ulrich Boehm, Thorsten Klamp und Jonathan Howard für die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön an alle "Pfeffers" für den hervorragenden Teamgeist, die stete Hilfsbereitschaft und die vielen konstruktiven Diskussionen und Gespräche bei Kaffee und Kuchen im Wintergarten.

Mein großer Dank geht an Agnes Fütterer für die fachliche Unterstützung, die vielen Ratschläge und dafür, daß sie immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte.

Conni Brettl, meiner Mitstreiterin im "big lab" danke ich besonders für ihre hilfreiche Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Stefanie Scheu für ihre Hilfe bei Computerproblemen und für die Leitung des "Hörnchenclubs".

Ein großes Dankeschön an Hilde Geerdes-Fenge für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Thomas Felkner für seine Freundschaft, seine Fürsorge, sein Verständnis und dafür, daß er immer für mich da war.

Mein allergrößter Dank gebührt meinen lieben Eltern für ihre großartige Unterstützung, für ihre Hilfe in allen Lebenslagen, für das in mich gesetzte Vertrauen und für ihre Toleranz.

Anhang 1: Nukleotidsequenz des genomischen Lokus von PUMA-G

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein 7,1 kb großes Fragment des PUMA-G genomischen Lokus kloniert und sequenziert. Die Sequenz ist im Folgenden angegeben. Das Startkodon, das Stopkodon und das Polyadenylierungssignal sind grau hinterlegt.

1	CTGCAGGGGC	TCTTTTACTT	TCAAGCCAAA	GCACATGCCC	TCAGTAAGTT	50
51	CACATTTATC	CAGGAGGAAG	GGTTACCAGC	ACCCACAGGC	AGTAAGGCAA	100
101	GCATGTGCCA	ATGCCAGCTA	ACATTCAAGG	CAATTGCAGA	GGAAGAGGCA	150
151	GTGATCTGGG	TTTGTGTCAT	AAGCCTGTAA	TCCCAGCACT	TCGTACAGAC	200
201	AGGACAATCG	TGGCCAGCAG	TGAGGCCAGG	CCAGCCTGAG	ATACATAGGG	250
251	AGATGCTGTC	TCAGAAGCCT	GTTTAAGGGG	CTGGAGATGT	CTGTCTCAGT	300
301	TAAGAACTACT	TGTTCTCGCT	GAGAACTTGA	ATTCAATTTT	TAGCATCCAG	350
351	ATCAGGTAAC	TCATATCCAT	CTGCAACTCC	TGCCTCAGGG	AACCTGGCAC	400
401	CTTCTGCTGG	TCTCCGAGGG	CACCTGTATT	CACATGCATA	TATACACAGA	450
451	CAGACACACA	AACACACAGA	CACACAGACC	CTCTCTCTCT	CCCAATTTAA	500
501	AAAAAATACA	TGTTTCAAAA	AGTCTTTTAA	AAAATACAAT	ATTATAACCAG	550
551	CACTTGGGAG	GCAGAGACCA	GGGGATTTCT	GAGTTTGAGG	CCAGTCTGGT	600
601	CTACAGAATG	AGTTCCAGGA	CAACCAGGGC	TACACAGAGA	AATCCTGCCT	650
651	TGAAAACAAA	CAAACAAACA	GAAACCCAAA	ACCAAAAAAC	AAAACAAAAC	700
701	AAAATAAACA	AACAAAAAAA	CAATATTGGA	GAGATGGCTC	AGAGGTTAAG	750
751	AGGACTGACT	ACTCTTCCGA	AGGTCCTGAG	TTCAAATCCT	AGCAACCACA	800
801	TGGCTCACCA	CCATCCATAA	TGAGATCTGA	TGCCCTCTTC	TGGTGCATTT	850
851	GAAGACAGCT	AGATTGCTCT	TACATATAAT	AATAAATAAA	TCTTTGGGCC	900
901	GGAGCAAGCG	GGGCTGGAAC	GAGCTGAGGT	CCTGAGTTCA	ATTCCCAACA	950
951	ACCATATGAT	AGCTCACAGC	TATCTGTACA	GCTACAGTAT	ACTCATATAC	1000
1001	ATAAAAAATA	ATCAATCAAT	CTTGAAAAAA	ATGGGCAAAC	ATGGAGTTTC	1050
1051	AAGACATGGA	ATTTGGAACA	CTGGAACTTG	CAATGTGGGC	ACCACCAATC	1100
1101	TCAAAGTTGT	CATCTTCATT	GTCACAGTCT	CCATGAAGTA	TCCTGATCCT	1150
1151	ATAGGATCCA	AGATCAGGTC	ACCCTGAGTC	TAGACTACAA	GGTCCGTCAA	1200
1201	ATGCCATTGA	GGATTTGGGT	AGGCAGCTAA	AGGGACACAT	TTCCTCTTTT	1250

1251	TTTTTTTTTTT	TTTGAGACAG	TTTCTCTGTC	TAGCCCTGGC	TGTCTTGGA	1300
1301	CTCGATCTGT	AGAGCAGGTA	AATTCAGAGA	TCTACCTGCT	TTCGCCTGCC	1350
1351	GAGTACTGGG	ATTAAAGGTA	TGCACCACTA	CCACCTGGCA	AATTTCCAAT	1400
1401	TTCTAATTTT	AAACTCAAAG	TAGATAGTCA	ATGGTAGATA	CTCTGTAAGA	1450
1451	TGACACTTAA	TCACACTTTA	AAAAAAAAGA	GAGAGAAAGG	AAATGTTATC	1500
1501	TTTCTGCACC	CTCTTGAGGC	TTGAAATCAG	AGCCATTTCT	ACGAATACCA	1550
1551	CACATCCAGG	TGCTGTGTCT	GCAATCCCAG	CACTCGGGAA	GAAGAAGCAG	1600
1601	GAAGATGGAG	AAGCCAGCTT	GGGAGACGTA	ACAAGAGGAG	ACATCTATCT	1650
1651	GAGAGGAAGG	AAAAAAGGAA	AAAGAGCACG	GCGCTAGAGA	ACTGAGTTGG	1700
1701	GGGTTAGGAG	CACCCGCTGC	TCCTGCAGAG	GACCTGCATT	AAGCTCCCTA	1750
1751	TCCCCACATT	GGGGTGGATG	ACAACTGTCT	TATAACTCTA	GCTCCAGGGC	1800
1801	ATCCAATAGC	CTCTGGGGCT	GTTGTTGTAT	GTACATAGCC	ACATAGACAG	1850
1851	GCATGCAAAA	ATAAAAATAA	ATCCTAGAAA	GAAAACAAGG	AGGTGGGGGA	1900
1901	GACAGAGACA	GACAGACAGA	CAGACAGAGG	AAACCGTATC	CACATAACCA	1950
1951	ATGCATAGTA	GAATTTCAACA	CGAACTCTTA	CTGCTCCTGG	AAAGCCTGAC	2000
2001	TGTTCTTTTA	GCACAGTGCA	TGGTTACTGC	CCTTGTTAAT	TTATTAATTA	2050
2051	TTGTCAGCTA	AGCAAATTGC	AGTGAATGGA	TTCTCCGAGG	CCAATCACCT	2100
2101	AGCCAGCATG	CATGCCTGCA	GCCTTCAGAA	GGAATGCCCT	CAGATCTGAC	2150
2151	TCGTCCACCT	CTGACAGTCG	GCTTGCCTAA	ACTTATCCTT	TACGTTTAGA	2200
2201	AAAATTTGTG	GGTCCCCTGC	TGCCCAGGGG	ACTTTTTTTT	ATTACTTGTT	2250
2251	TATGCAAACA	GTAAGTTGCA	TAAGAGCCTT	GCTAGCCTTT	TTTTTTTTTA	2300
2301	AATGATTTTCG	TAGTTTCCTG	GTAACCATT	AGTCATCTCT	TTCAACACCC	2350
2351	TGACATGACA	TAAAGCCGAG	GGCTGAACCA	CACGTTCCACC	ACACAGACAC	2400
2401	ACACTCGCCT	TGAGCCTTCG	CTAGGTGAGG	CACTCTGAAG	CTGGACTGGC	2450
2451	CAGATCCACT	CATGAGCAAG	TCAGACCATT	TTCTAGTGAT	AAACGGCAAG	2500
2501	AACTGCTGTG	TGTTCCGAGA	TGAAAACATC	GCCAAGGTCT	TGCCACCGGT	2550
2551	GTTGGGGCTG	GAATTTGTGT	TCGGACTCCT	GGGCAATGGC	CTTGCCCTGT	2600
2601	GGATTTTCTG	TTTCCACCTC	AAGTCCTGGA	AATCCAGCCG	GATTTTCTTG	2650
2651	TTCAACTTGG	CCGTGGCTGA	CTTTCTCCTG	ATCATCTGCC	TGCCGTTCCCT	2700
2701	GACGGACAAC	TATGTCCATA	ACTGGGACTG	GAGGTTCCGA	GGCATCCCTT	2750

2751	GCCGTGTGAT	GCTCTTCATG	TTGGCTATGA	ACCGACAGGG	CAGCATCATC	2800
2801	TTCCTCACCG	TGGTGGCTGT	GGACCGCTAC	TTCCGGGTGG	TCCATCCACA	2850
2851	CCACTTCTTG	AACAAGATCT	CCAACCGGAC	GGCGGCCATC	ATTTCTTGCT	2900
2901	TCTTGTGGGG	TCTCACCATC	GGCCTGACTG	TCCACCTCCT	CTATACAAAC	2950
2951	ATGATGACCA	AAAATGGCGA	GGCATATCTG	TGTAGCAGCT	TCAGCATCTG	3000
3001	TTACAACCTC	AGGTGGCACG	ATGCTATGTT	CCTCTTGGA	TTCTTCTTGC	3050
3051	CCCTGGCCAT	CATCTTGTTT	TGCTCAGGCA	GGATCATCTG	GAGCCTGAGG	3100
3101	CAGAGACAGA	TGGACAGACA	TGCCAAGATC	AAGAGGGCCA	TCAACTTCAT	3150
3151	CATGGTGGTG	GCTATTGTAT	TCATCATTTG	CTTCCTACCC	AGTGTGGCTG	3200
3201	TGCGCATCCG	CATCTTCTGG	CTTCTCTACA	AATATAACGT	ACGCAACTGT	3250
3251	GACATCTACT	CCTCGGTGGA	CCTGGCTTTC	TTTACCACCC	TTAGCTTTAC	3300
3301	CTACATGAAC	AGCATGCTGG	ACCCTGTGGT	CTACTATTTT	TCCAGCCCAT	3350
3351	CTTTCCCAA	CTTCTTCTCC	ACGTGTATCA	ACCGCTGCCT	TCGAAAGAAA	3400
3401	ACATTGGGTG	AACCCGATAA	TAACCGAAGC	ACTAGTGTGG	AGCTCACGGG	3450
3451	GGACCCAGC	ACAACCAGAA	GTATTCCAGG	GGCGTAATG	GCTGACCCCA	3500
3501	GTGAGCCAGG	CAGCCCCCT	TATCTGGCTT	CCACATCTCG	TTAAGTTACT	3550
3551	ATGACAAGAA	GGGAGATTGC	CGCTCAGGCC	TGTGCTCTCT	GGAGAGGCGA	3600
3601	TTTGGCCGTT	CGTTGAACAG	GGTAACATCT	TCAGATTTGG	CTTACGCTTT	3650
3651	CTTGGAACTT	CTAGATTCGG	AGAATCGAAT	TTAGAGAAAC	GGCGTGGTGC	3700
3701	AGTGAGCAGT	TTTGGTTGCG	AGGTGCAGCC	ATAGAAAATC	TCAGAGGAAC	3750
3751	AGAAAGCAGA	GTTTCCAGAC	AGTGGAAGCT	TCTCAGCCTT	CCAAGCTTAC	3800
3801	AGGACTGAAG	AAGACAGAGT	CCTGCAGAGT	TTGAGTCCCA	GATGCACCCA	3850
3851	GACACACCTC	AGTTCTGCTC	AAAGTCACGG	ATGGCTCTTC	GTCCTAGGGT	3900
3901	CCTACCTAGC	CTGTCCGTGG	GCCCCAGTGA	GGACAAGGAG	ATCCACGAAA	3950
3951	CTGGAGGGGA	TCTCTACCCA	GATGTCACTG	ATAAGCCAGT	TGGTCACTTG	4000
4001	TGTTCCGGTGG	GACCAGTATA	CCTTTCAGCC	AGACTTTAGC	AGAAATGCTA	4050
4051	AAGAGGGGAG	GAGATGCAAA	AGATTTGATT	GTTCTCCAAG	TCTCCAAGG	4100
4101	TGGTAAGAGG	GGGTTAGCCC	CAGGAGGGAC	TGAACTCAGT	GCTGGAGAGA	4150
4151	AACAATAACA	AATTCAGCTG	AGCTTTAAAA	GGCTTTGGGG	AAACAGTGGC	4200
4201	TTCCCCCTC	TGTCTGCGTT	TCTTAGTAAA	AGGAATTCAA	CTGTGTCCAT	4250

4251	GGTTGGGGGG	GGGGGGGCGG	TTCATTACTT	GGGTTTCTGT	ACTTTAACAT	4300
4301	CTACCATTTT	AATAAAATTTT	GACAGGAGAC	ACAGGCTGCT	GCAGCATTTT	4350
4351	GTCTGGGTTA	GGGTTCACAG	AAACGGTCTT	CTTACTTAAG	ACCTGGGTTA	4400
4401	TGAACTGTAT	CCTAGCAGGA	AGATCTAGTA	TACTGCAAAA	ACACAGAAGG	4450
4451	GTGCAGAAGA	GCCCTGCCTT	GAGACAGCCA	AGGGGAACGG	CACCGGTGGG	4500
4501	GAATATGTAA	GGTAGTTAGG	TTTTAAAGGC	TATACCGAAA	AGTTTACAGC	4550
4551	GGAGTTCTTC	CCTTTGCAGT	TCGGTGAACA	TTGCTATTAA	TAGCTGTATA	4600
4601	TTAAAAAAG	AATCATACCA	GAGTGGGCTT	TTTTTTTCCA	CCCCTAGGAG	4650
4651	AAGGAAGAGG	AGCTTCCTAT	GGAATGGTTT	CAGTTCCCAG	TTTAGAGCCA	4700
4701	GAAAGGAGAT	GTACCAGGTT	GCATCGTGCC	AGTTGAGAAA	CAAGAAGTTT	4750
4751	CTGTTGTACT	TTCATTTCCA	GTTTCTGTCC	CTCCTAGATC	CTTTGGCAAG	4800
4801	ATGAGGCTTT	TTTTTTTTTT	CCTCCCGAGC	TGGATACAGA	TTAAGAATTC	4850
4851	AGATACTCTA	ATTTCTCAGC	CCTCGGTAGA	TGGCAAGAAA	CCAGGGACAG	4900
4901	ACAGATGAAG	TGTCTCTTAG	TTCAAGTGTT	CCCAGTTTTC	TGTCTCTTAT	4950
4951	TACCTTCGGC	TCCTACAAGT	GGGAATTTAA	AAGCAGGGTT	TGCCTTCTTC	5000
5001	TGGAAGGCGG	CAGACAGAAG	CTCCGAGCCA	AGCAGGGATT	TCCCCATGAA	5050
5051	TCACGGGGAA	CCTGGTGGTG	AAACTCCTGG	TCCTTGATCG	ATCGGAGTTA	5100
5101	ACAGTTGACA	TTCATTTGTT	TGGTTTTTGT	GTGTTGAACA	GCAACTGTGC	5150
5151	GCCAGACACC	ATTCTGGGTG	GTGGCAATAC	GGCCAGGAGT	TAAGCAGATA	5200
5201	GATGGTCTTC	GTCACATTGA	ACCCAAATTC	AAGGCAGGGA	GGCAGGCAGG	5250
5251	AATGAAGAAA	AGATCATGGC	TGAAAAGCAA	CAGGTGTTGT	GAAACCAGCC	5300
5301	AGGTGTGACT	ATGGGAACAG	AGAGGGTGGC	TAGGGTGGGG	ATGACTGGGA	5350
5351	GGGCCTCCAG	GAGGAAGTGA	TATTGAGTTG	AGCCAGGATT	AACTAGACAG	5400
5401	AGCAAGGTAT	GAAAACCTCT	GGGCTGGGGG	TGGGGGGGCA	CAGGGAGGGG	5450
5451	AGTGAGAGCA	AAGGTCCTGA	GGTAACAAGG	AATGTGTTGG	GTATGAGTCT	5500
5501	CCTTTTTTTT	TTCATATGTT	ATATTTTATT	AGCTGATAAT	TCTTATGCCG	5550
5551	TTATGATATA	CAATGTAGTA	TAATAAATAT	TTGAATGAAT	AGATTTAGAA	5600
5601	AGCAGGTAAT	TTGGAATAAG	CATTTCAAAA	CATGGATTAA	CTTTCATTTT	5650
5651	TTTTTTTTTT	ATTGGGTATT	TATTTCTTTT	ACATTTACAA	TGCTATCCCA	5700
5701	AAAGTCCCCC	ACCCGCTCCC	CCACCCACTC	CCACTTCTTG	GCCCTGGCAT	5750

5751	TCCTTTGTAC	TGAGGCATAT	AAAGTTTGCA	CGACCAGTGG	GCCTCTCTTT	5800
5801	CCACTGATGG	CCGATTAGGC	CATCTTCTGA	TTCATATGCA	GCTAGAGACA	5850
5851	CAAGCTGGGG	GGGGGGGGGA	GGTATTGGTT	AGTTCATATT	GTTGTTCCAC	5900
5901	CTATAGGATT	GCAGATCCCT	TCAGCAACTT	GAGTACTTTC	TCTAGCTCCT	5950
5951	CCATTGGGGG	CCCTGTGATC	CATCCATTAG	CTGACTGTGA	GCATCCACTT	6000
6001	CTGTGTTTGC	TAGGCCCCAG	CATAGTCTCA	CAAGAGACAG	CCATATCTGG	6050
6051	GTCCTTTCAG	CAAAATCTTG	CTAGTGTATG	CAATGGTGTC	AGCGTTTGGA	6100
6101	AGCTGATTAT	GGGATGGATC	CCCGGATATG	GCAGTCTCTA	GATGGTCCAT	6150
6151	CCTTTCGTCT	CAGCTCCAAA	CTTTGTCTCT	GTAACCTCCTT	CCATGGGTGT	6200
6201	TTTGTTCCCA	ATTCTAAGAA	GGGGCAAAGT	GTCCCACTT	TGGCCTTCGT	6250
6251	TCTTCTTGAG	TTTCATGCGT	TTAGCAAATT	GTATCTTATA	TCTTGGGTAT	6300
6301	TCTAAGTTTC	TGGGCTAAAG	AGTTAGTCTC	CTAAGAGCTG	CCCCAACAAA	6350
6351	GAATCACAAA	CTGAGAGACT	TAAAAGAATA	GAAATTGCCA	GGCAGTGGCG	6400
6401	GCGCATGCCT	TTAATCCCAG	CACTTGGGAG	GCAGAAGCAG	GTGGATTTCT	6450
6451	GAGTTCCAGG	CCAGCCTGGT	CTACAGAGTG	AGTTCCAGGA	CAGCCAGAGC	6500
6501	TATACAGAGA	AACCCTGTCT	TGAAAAACAA	AAACAAACAA	ACAAAAAATA	6550
6551	GAAATGTATT	ATTAAGTTTT	GGGGGACATC	TACCCAGCAT	CAAAGTGTTG	6600
6601	GCCGGGTTTG	GCTCCTAGCA	CCAGCTTGCC	TCATCTTGCG	CTAACCCCTG	6650
6651	TGATTGACAG	CAATCCCTCT	GCTACTTTGC	TTGTAGAAAC	AACCCTTCAC	6700
6701	TCCCTGCCTG	CTGAGATTAC	AGACATGTAT	GCACCACCAT	GCCTGGTTTA	6750
6751	TATGGTACTA	GGAATCAAAA	CCAGGGCTTC	ATATTCTCTA	GACAAGCATC	6800
6801	CCACCCATCG	ACGCCATCAA	TGCAAATATT	GTTGAATTTA	TACAAGGGAT	6850
6851	TAGAGCATCC	TGGGATTGTG	GCCCCGTGGG	TATCCTGGAA	ACCAGTGTAT	6900
6901	GAATGCCTGT	GTGTGTAGGC	TCAGATTGGG	AAGGGCAATT	ATAATAGTTT	6950
6951	TTTTTTTATT	TTAAATTTTT	ATGTATTGTT	GTCCTTCTGT	GAATGGTGTG	7000
7001	CCTAACACCA	CTGTTTACAT	ATGGAGGTCA	GAGGACAAGT	TTGTGGGGTC	7050
7051	AAGTCTCTCC	TTTTAGTTTC	ACTCCCAGTG	CTGGGGATCA	AACTGAGCTC	7100

Anhang 2: Nukleotidsequenz des PCR-Select Fragments AS 329

1	GGAAAAACCA	CTCCAGTGTC	CTCCAGAGAT	CACCAGAGAA	AAGATAAGGA	50
51	AGACTCTCGA	GAGATGCCCC	ACAGTCCCTC	AGGACCCGAG	TCAGTGGTAA	100
101	AAGATGACTC	TCCAGCAGCA	AATGACCTGG	AAATGGCCCA	GGAAGTACCC	150
151	TGCACACCTG	CAAACAAGAA	AGCAAGAAGA	AAAAAACATC	CGAACTGGTC	200
201	AAATTCCAAA	AGAAGACAGC	AGAAAAAATA	GCCCCGTCAA	GATGAGATGA	250
251	TGGGAGTGGC	CTCACCTGGA	CATGGAGTTC	AAGAGAAGCT	CAAGGCGGTG	300
301	AGCAGGAGGA	CTTTGTGGAA	AGATGACTCA	TCTACGAACG	TGAAGGAGGT	350
351	GACCAAGACA	CAGAGAGCAA	GGATGAGGCG	TGCCCAGACA	TCCAATTCAC	400
401	AAGAGATCAG	CAAAGAGGCA	TCAAAAACAA	GTGGTAGAAA	GAGGCCCAGC	450
451	ACAGCACGAA	GAACCACACA	AGTTCCAGAG	AAGACCAAGA	ATGACGCTGT	500
501	GGATTTCTCT	CCCACACTCC	CTGTGACCTG	TGGTAAGGCC	AAAGGGACTT	550
551	TGTTCCAAGA	GAAACTGAAG	CAAGGAACCT	CAGAAAAGTG	CATTCAGAAT	600
601	GAGGCAGGAG	ATTGGCTCAC	AGTAAAGGAA	TTTTTAAATG	AAGGGGGAAG	650
651	GGCCACATCA	AAAGACTGGA	AGGGCGTTAT	ACGTTGTAAC	GGGGAGACAT	700
701	TAAGACATCT	GGAGCAGAAA	GGACTTTTGT	TCTGT		735