

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

**Transkriptomanalyse von Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor
regulierten Genen in murinen Makrophagen: Klonierung und
Charakterisierung von IRG1 und mGBP6**

Daniel Degrandi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. Klaus Dieter Pfeffer,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
3. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst

Die Dissertation wurde am 16.05.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 07.09.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Angeborene Immunität: Pathogenerkennung, Signalvermittlung und Aktivierung.....	2
1.1.1 Rezeptoren für Pathogen-assoziierte molekulare Muster	2
1.1.2 Toll-like Rezeptoren.....	4
1.2 Zytokine.....	9
1.2.1 Interferon γ	9
1.2.2 Tumor Nekrose Faktor	12
1.3 Zelluläre antimikrobielle und antivirale Effektorsysteme.....	14
1.3.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate	14
1.3.2 p47 GTPasen	16
1.3.3 p65 Guanylat-bindende Proteine.....	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Bezugsquellennachweis.....	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Radiochemikalien	24
2.1.3 Enzyme	24
2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterial	25
2.2 Geräte.....	25
2.3 Medien und Puffer.....	26
2.3.1 Stammlösungen und Puffer	26
2.3.2 Zellkulturmedien.....	27
2.3.3 Medien für die Bakterienkultur	28
2.4 Antibiotika.....	28
2.5 Bakterienstämme und Zelllinien	28
2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme	28
2.5.2 Zelllinien	29
2.6 Primer	29
2.7 Plasmidvektoren.....	31
2.7.1 Ausgangsvektoren.....	31
2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide	31

2.8	Zellbiologische Methoden	32
2.8.1	Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten	32
2.8.2	Kultivierung von Makrophagenzelllinien	33
2.8.3	Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation	33
2.8.4	In vitro Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	33
2.8.5	In vitro Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	34
2.8.6	Immunfluoreszenz-Färbung	34
2.9	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	35
2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA	35
2.9.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus 96-well Platten	35
2.9.3	Isolierung von chromosomaler DNA aus Zellpellets	35
2.9.4	Agarosegelelektrophorese.....	36
2.9.5	Restriktionsverdau von DNA	37
2.9.6	Dephosphorylierung von DNA	37
2.9.7	Ligation von DNA-Molekülen	37
2.9.8	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien	38
2.9.9	Southernblot Analyse	38
2.9.10	Amplifikation von DNA-Molekülen durch PCR	40
2.9.11	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zellen	41
2.9.12	Elektrophoretische Auftrennung von RNA.....	41
2.9.13	cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA.....	41
2.9.14	Realtime RT-PCR.....	42
2.9.15	Affymetrix Proben Markierung und Array Hybridisierung.....	42
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Microarray Experimente	47
3.1.1	Versuchsaufbau	47
3.1.2	Verwendete Auswerteverfahren	47
3.1.3	Ergebnisse	49
3.1.4	Genontologische Untersuchungen.....	59
3.2	Immunoresponsive gene 1	63
3.2.1	Allgemeines	63
3.2.2	Validierung der Microarray Daten und <i>in vitro</i> Expressionsanalysen	65
3.2.3	IRG1 Expression in Mäusen nach Infektion	68
3.2.4	Subzelluläre Lokalisation von IRG1	69
3.2.5	Inaktivierung des IRG1 Gens durch <i>Gene Targeting</i>	72
3.3	mGBP6	76
3.3.1	Allgemeines	76
3.3.2	<i>In vitro</i> Expressionsanalysen von mGBP6.....	79
3.3.3	mGBP6 Expression in Mäusen nach <i>Toxoplasma gondii</i> Infektion	80
3.3.4	Intrazelluläre Lokalisation von mGBP6.....	81
3.3.5	Subzelluläre Lokalisation von mGBP6 GTP-Bindungsmotiv Mutanten.....	87
4	DISKUSSION	91
4.1	Transkriptomanalyse von IFNγ und / oder TNF stimulierten murinen Makrophagen	91
4.1.1	IFN γ induzierte Gene (Cluster C1).....	92
4.1.2	TNF induzierte Gene (Cluster F).....	94

4.1.3	TNF / IFN γ synergistisch induzierte Gene (Cluster B und C2)	95
4.1.4	IFN γ und/oder TNF inhibierte Gene (Cluster G, H und I)	97
4.1.5	Genontologische Untersuchungen.....	98
4.2	IRG1 in der Infektionsabwehr	100
4.2.1	Expression von IRG1 <i>in vitro</i>	100
4.2.2	Expression von IRG1 <i>in vivo</i> nach Infektion	101
4.2.3	IRG1 als mitochondriales Protein und potentiell Ortholog eines bakteriellen Enzyms	102
4.3	mGBP6 in der Infektionsabwehr	105
4.3.1	Expression von mGBP6 <i>in vitro</i>	105
4.3.2	Expression von mGBP6 und weiterer mGBPs <i>in vivo</i> nach Infektion	106
4.3.3	Subzelluläre Verteilung von mGBP6 in Makrophagen	107
4.3.4	Subzelluläre Verteilung von mGBP6 in infizierten Makrophagen.....	109
4.4	Ausblick	112
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	117
	Danksagung	137
	Anhang A: Liste differentiell exprimierter Gene	139
	Anhang B: Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens von mGBP6	145

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 MyD88 abhängiger TLR Signalweg.....	7
Abb. 1.2 MyD88 unabhängiger / TRIF abhängiger TLR Signalweg am Beispiel von TLR3 gezeigt...7	
Abb. 1.3 JAK-STAT Signalweg des IFN γ Rezeptors	10
Abb. 1.4 TNF/TNFR1 Signalweg	13
Abb. 1.5 ROI und RNI Produktion durch Phox und iNOS in mammalischen Zellen.	15
Abb. 3.1 Hierarchische Cluster Analyse von differentiell exprimierten Genen	50
Abb. 3.2 Cluster A.....	51
Abb. 3.3 Cluster B	52
Abb. 3.4 Cluster C1	53
Abb. 3.5 Cluster C2	54
Abb. 3.6 Cluster C3 (oben) und C4 (unten).....	54
Abb. 3.7 Cluster C5	55
Abb. 3.8 Cluster D.....	55
Abb. 3.9 Cluster E	55
Abb. 3.10 Cluster F1.....	56
Abb. 3.11 Cluster F2.....	56
Abb. 3.12 Cluster G.....	57
Abb. 3.13 Cluster H.....	57
Abb. 3.14 Cluster I	57
Abb. 3.15 Cluster J	58
Abb. 3.16 Über- und unterrepräsentierte GO Attribute aus der Kategorie „biologische Prozesse“ .60	
Abb. 3.17 Überrepräsentiertes GO Attribut aus der Kategorie „molekulare Funktion“	60
Abb. 3.18 Überrepräsentierte GO Attribute aus der Kategorie „zelluläre Komponente“	61
Abb. 3.19 Genomischer Lokus von IRG1.....	64
Abb. 3.20 Semiquantitative RT-PCR von IRG1	65
Abb. 3.21 Expression von IRG1 nach Induktion mit verschiedenen Stimuli	67
Abb. 3.22 Expression von IRG1 in Mikroglia und Knochenmark-dendritischen Zellen (BMDC) ..67	
Abb. 3.23 IRG1 Expression in infizierten Mäusen	68
Abb. 3.24 Subzelluläre Lokalisation von IRG1-DsRed in RAW264.7.....	69
Abb. 3.25 Kofärbungen von IRG-DsRed transfizierten RAW Zellen mit Phalloidin, anti-Lamp-1 und Mitotracker.....	70

Abb. 3.26 Lokalisation von IRG1-DsRed in <i>L. monocytogenes</i> oder <i>T. gondii</i> infizierten RAW Makrophagen	71
Abb. 3.27 Targeting Strategie 1 des IRG1 Genlokus	73
Abb. 3.28 Targeting Strategie 2 des IRG1 Genlokus.	74
Abb. 3.29 Genomischer Southernblot homolog rekombinierter ES-Zell Klone.....	75
Abb. 3.30 ClustalW Alignment von mGBP1 bis mGBP10.....	77
Abb. 3.31 Phylogenetischer Baum der Proteinsequenzen von mGBP1 bis mGBP10.....	78
Abb. 3.32 Kinetik der Induktion von mGBP6 Transkripten nach Stimulation von ANA-1 Zellen für 2, 6 und 16 Stunden mit IFN γ	79
Abb. 3.33 Induktion von mGBP6 Transkripten in ANA-1 Zellen nach Stimulation mit ausgewählten Zytokinen und TLR Agonisten	80
Abb. 3.34 Induktion von mGBP1/2/3/4/5/6 RNA in Milz und Lunge von <i>T. gondii</i> infizierten Mäusen.	81
Abb. 3.35 Subzelluläre Lokalisation von mGBP6-DsRed in RAW264.7 Zellen	82
Abb. 3.36 Lokalisation des mGBP6-DsRed Fusionsproteins in <i>L. monocytogenes</i> infizierten RAW Makrophagen	83
Abb. 3.37 Lokalisation der mGBP6-DsRed Fusionsproteine in <i>T. gondii</i> infizierten RAW Makrophagen mit (+IFN γ) und ohne (-IFN γ) Präinkubation mit IFN γ	84
Abb. 3.38 Subzelluläre Lokalisation des mGBP6-DsRed Fusionsproteins in RAW Makrophagen infiziert mit hitze-inaktivierten <i>T. gondii</i> , unbehandelten <i>T. gondii</i> oder einer Mischung aus beiden	86
Abb. 3.39 Lokalisation von R46A, T73A und D182N mGBP6-DsRed Mutanten in RAW264.7 Zellen.....	88
Abb. 3.40 Lokalisation des R46A, T73A und D182N mGBP6-DsRed Fusionsproteins in <i>T. gondii</i> infizierten RAW Makrophagen nach IFN γ Stimulation.....	89
Abb. 4.1 Modell der MAVS/VISA-vermittelten Aktivierung der IFN β Expression nach viraler Infektion.....	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Toll-like Rezeptoren und bekannte Liganden.....	5
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	27
Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika	28
Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme	28
Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien.....	29
Tabelle 2.5: Primer zur Klonierung von DsRed- Fusionskonstrukten	29
Tabelle 2.6: Mutagenese Primer	29
Tabelle 2.7: Primer zur Klonierung der Targeting Vektoren für IRG1.....	30
Tabelle 2.8: Primer und Sonden Sequenzen für Realtime RT-PCR Versuche.....	30
Tabelle 2.9: Primer für semiquantitative RT-PCR von IRG1	31
Tabelle 2.10: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren	31
Tabelle 2.11: Hergestellte Plasmide	31
Tabelle 3.1 Zuordnung der überrepräsentierten Attribute zu Expressionsclustern.....	61
Tabelle 3.2 Gene mit dem Attribut „GTPase activity“ aus der Kategorie „molekulare Funktion“ ..	62
Tabelle 3.3 Durch IFN γ und TNF synergistisch induzierte Gene.....	63
Tabelle 3.4 Durch IFN γ induzierte GTPasen aus Cluster C.	76

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BAC	bacterial artificial chromosome
BMDC	aus Knochenmarkszellen gereifte dendritische Zellen
BMDM	aus Knochenmarkszellen gereifte Makrophagen
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNA)
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten
EP	Elektroporation
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
ko	knock-out
kDa	Kilodalton
LIF	leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar
min	Minute(n)
MCS	multiple cloning site
mRNA	Boten-RNA
ORF	offener Leserahmen
p.i.	nach Infektion (post infection)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
polyIC	Polyinosin-polycytidin-Säure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription und PCR
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat Lösung
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ÜN	über Nacht

ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist ein hochkomplexes System aus zellulären und löslichen Bestandteilen, welches die Lebewesen über den gesamten Lebenszeitraum vor der permanenten Gefahr einer Infektion vor pathogenen Organismen schützt. Im Laufe der Evolution haben sich im Wesentlichen zwei Prinzipien der Pathogenabwehr entwickelt, um den Organismus möglichst schnell und effektiv auf Infektionen vorzubereiten und entsprechende Gegenmaßnahmen einzuleiten. Man unterscheidet hierbei zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem.

Die adaptive Immunität ist in der Lage, durch Reifung und Expansion von Pathogen-spezifischen B- und T-Zellen, eine Immunantwort aufzubauen, welche auf den vorhandenen Erreger abgestimmt ist, und somit maximale Effektivität bei der Eliminierung des Krankheitserregers bietet. Diese Pathogenspezifität erlaubt es zusätzlich dem Immunsystem bei nachfolgenden Infektionen auf bereits „trainierte“ Zellen zurückzugreifen, und somit wesentlich schnellere und effizientere Immunantworten auszulösen. Man spricht hierbei vom „immunologischen Gedächtnis“, welches die Grundlage der medizinisch äusserst wichtigen präventiven Vakzinierung darstellt. Die primäre adaptive Immunantwort benötigt allerdings mehrere Tage, um bei einer Erstinfektion die nötige Spezifität und Effektivität aufzubauen, die zur Eliminierung des Pathogens nötig ist. In dieser Zeit muss der Organismus in der Lage sein, eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Hierbei sind Mechanismen notwendig, welche in der Lage sind, fremde Organismen möglichst schnell und breit gefächert als solche zu erkennen und den Aufbau einer adaptiven Immunität initiieren zu können. Diese Funktionen übernimmt das angeborene Immunsystem. Die erste Hauptkomponente der angeborenen Immunität besteht aus Epithelien, welche dem Pathogen zum einen eine erste mechanische Barriere entgegenstellen, zum anderen durch Oberflächen- und / oder sezernierte Proteine (Defensine) bereits aktiv antimikrobielle Effektormechanismen zur Verfügung stellen. Weiterhin spielt das Komplementsystem, bestehend aus einer hohen Anzahl löslicher Proteine, in der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle sowohl zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen zum Pathogen (Chemoattraktion), als auch zur direkten Lyse von Bakterien, Viren, Pilzen und Eukaryonten. Die zentralen Komponenten des angeborenen Immunsystems stellen jedoch dessen zelluläre Bestandteile dar, bestehend aus Phagozyten, NK Zellen und weiteren inflammatorischen Zellen. Diese können bereits vor Aufbau einer adaptiven Immunabwehr potente antimikrobielle Effektormechanismen aufbauen und tragen somit ausschlaggebend zur Eliminierung des Pathogens oder zur Verzögerung der Infektionsausbreitung bei. Phagozyten sind zusätzlich die entscheidende Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität, und dienen als wichtige Effektorzellen adaptiver Immunantworten. Das Zusammenspiel dieser zellulären Komponenten wird durch Zytokine und Chemokine gesteuert. Dies sind lösliche

Proteine, welche durch exakt geregelte transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen sekretiert werden und als Signalstoffe Immunantworten akkurat regeln können.

Aus evolutionsbiologischer Sicht gesehen, lässt sich das Immunsystem als genetische Anpassung der Wirtsorganismen auf sich ständig verändernde Krankheitserreger betrachten, welche wiederum, aufgrund des evolutionären Drucks, hohe genetische Diversität anstreben, um der Immunantwort zu entkommen. Somit ist das Studium der komplexen Interaktion von Genen des Wirtsorganismus entscheidend zum Verständnis der molekularen Ereignisse während der Wirt-Pathogen Wechselbeziehung im Rahmen einer Immunantwort.

1.1 Angeborene Immunität: Pathogenerkennung, Signalvermittlung und Aktivierung

1.1.1 Rezeptoren für Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Das angeborene Immunsystem mediiert zahlreiche Aufgaben innerhalb der Immunantwort gegen pathogene Mikroben, speziell die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (**pathogen-associated molecular patterns**, PAMPs) (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). Diese Art von Pathogenerkennung unterscheidet sich grundsätzlich von der Pathogenerkennung durch B- und T-Zellrezeptoren der adaptiven Immunantwort. Letztere erreichen erst durch ungerichtete Umordnungen der Rezeptorgene in Lymphozyten (somatische Rekombination) und, nach Kontakt mit dem Pathogen, gerichtete klonale Expansion dieser Zellen, hohe Spezifität und Effektivität um den Eindringling zu bekämpfen. Angeborene Pathogenrezeptoren hingegen sind bereits im Genom eines Organismus festgelegt und werden innerhalb einer Klasse von Zellen identisch exprimiert. Die Fähigkeit zur Pathogenerkennung hat sich über einen langen evolutionären Zeitraum gebildet, was dazu beiträgt, dass PAMP-Rezeptoren (**pattern recognition receptors**, PRRs) zum einen sehr breit gefächert unterschiedlichste Fremdorganismen erkennen können, zum anderen außerordentlich zuverlässig zwischen „Fremd“ und „Selbst“ unterscheiden können. (Hoffmann et al., 1999; Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002).

PRRs kommen auf Zelloberflächen vor, in intrazellulären Kompartimenten, werden in den Blutkreislauf oder in Gewebeflüssigkeiten sekretiert (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997). Wichtige sekretierte Pathogenrezeptoren sind das Mannan-bindende Lektin (MBL), das C-reaktive Protein (CRP) und die Serum Amyloid Proteine (SAP), welche bereits in der frühen Phase der Infektion von der Leber produziert werden (Gewurz et al., 1982; Schwalbe et al., 1992; Fraser et al., 1998). CRP und SAP gehören zur Familie der Pentraxine, und wirken opsonisierend durch Bindung von Phosphorylcholin auf bakteriellen Oberflächen. Außerdem sind sie durch Bindung des C1q Proteins in der Lage das klassische Komplementsystem zu aktivieren (Agrawal et al., 2001).

MBL gehört zur Familie der Collectine, welche durch das Vorkommen einer Kollagenartigen Region und einer C-Typ Lektin Domäne charakterisiert sind (Epstein et al., 1996; Holmskov, 2000). MBL ist in der Lage Mannose Reste zu binden, die auf Mikroorganismen in hohen Mengen

zu finden sind. Nach Assoziation von MBL mit speziellen Serinproteasen können diese die Komplement Proteine C2 und C4 spalten und somit das Lektin-abhängige Komplementsystem aktivieren (Fraser et al., 1998).

Viren und einige pathogene Mikroben können Zugang zu intrazellulären Kompartimenten der Wirtszellen erlangen, wie zum Beispiel das Zytosol, um sich dort zu replizieren. Daher existieren intrazelluläre PRRs, welche die eingedrungenen Pathogene dort erkennen können, und die Hemmung der Pathogenreplikation initiieren können. Die Protein Kinase R (PKR) wird durch Bindung von doppelsträngiger RNA, die während viraler Replikation gebildet wird, aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung und Inaktivierung des Translationsinitiationsfaktor eIF2 α und schließlich zum Abbruch der viralen und zellulären Proteinsynthese (Clemens und Elia, 1997). Aktivierte PKR ist außerdem in der Lage, NF- κ B und MAP-Kinase Signalwege zu aktivieren, was wiederum zur Induktion von antiviralen Typ-I Interferon Genen führt (Williams, 1999). Doppelsträngige virale RNA führt ebenfalls zur Aktivierung des 2'-5'-oligoadenylat Synthase (OAS)/RNaseL Signalwegs, welches zum Abbau von sowohl viraler als auch zellulärer RNA führt und somit zur Apoptose der infizierten Zelle (Kumar und Carmichael, 1998). Weitere PRRs dieser Klasse sind RIG-I und LGP-2 (Saito et al., 2007).

Eine weitere wichtige Klasse von intrazellulären PRRs stellen die NOD (**n**ucleotide-**b**inding **o**ligomerization **d**omain) Proteine dar. Diese bestehen aus einer aminoterminalen CARD (**c**aspase **r**ecruitment **d**omain) Domäne, einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) und einer carboxyterminalen LRR (**l**eucin-**r**ich **r**epet) Region. Die CARD Domäne von NOD1 und NOD2 assoziiert mit einer Protein Kinase, RIP2, welche wiederum NF- κ B und MAP-Kinase Signalwege aktiviert (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999; Ogura et al., 2001). NOD1 und NOD2 Proteine sind in der Lage, vermutlich durch Bindung an die LRR Regionen, bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane (PGN) zu erkennen (Inohara et al., 2001; Strober et al., 2006).

Die meisten PRRs, welche auf Zelloberflächen exprimiert werden, findet man auf phagozytierenden Zellen, und insbesondere auf Makrophagen. Durch Erkennung konservierter Moleküle vorwiegend auf den Oberflächen der Pathogene, führen diese Rezeptoren zur Phagozytose des Mikroorganismus und sind somit entscheidend beim Aufbau einer effektiven Immunantwort beteiligt. Wichtige Oberflächen PRRs sind der Makrophagen Mannose Rezeptor (MMR), Scavenger Rezeptoren (SR) und Toll-like Rezeptoren (TLR), letztere jedoch können auch intrazellulär vorkommen und sind dort ebenfalls an der Erkennung viraler oder bakterieller Nukleinsäuren beteiligt. TLRs werden aufgrund ihrer hohen Bedeutung im nächsten Abschnitt ausführlich diskutiert.

MMR gehört zur Familie der C-Typ Lektine und interagiert mit einer Vielzahl von gram-negativen und gram-positiven Bakterien sowie mit Pilzpathogenen (Fraser et al., 1998). Unter den SRs ist der Makrophagen Scavenger Rezeptor (MSR) am wichtigsten in der angeborenen Immunität. MSR besitzt eine ungewöhnlich breite Spezifität für polyanionische Liganden,

darunter doppelsträngige RNA, LPS und Lipoteichonsäure (LTA) (Pearson, 1996). MSR defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, Herpes Simplex Virus und Malaria (Suzuki et al., 1997; Thomas et al., 2000).

1.1.2 Toll-like Rezeptoren

Die Beteiligung von Toll Rezeptoren an der angeborenen Immunität wurde zuerst für die Taufliege *Drosophila* beschrieben. Das *Drosophila* Toll Protein (dToll) wurde ursprünglich als transmembraner Rezeptor identifiziert, welcher bei der Etablierung von dorso-ventraler Polarität im Embryo essentiell ist (Hashimoto et al., 1988). Die Signalwege, die durch dToll aktiviert werden, zeigen bemerkenswerte Ähnlichkeiten zum mammalischen Interleukin 1 (IL-1) Signalweg, welches zur Aktivierung von NF- κ B führt, ein Molekül, das wichtige Funktionen während der Immunantwort übernimmt. Auffälligerweise sind die zyttoplasmatischen Domänen des dToll und des IL-1 Rezeptors hoch konserviert, und werden folglich als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domänen bezeichnet. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass dToll in der invertebraten Immunabwehr eine Rolle spielt (Belvin und Anderson, 1996). Später konnte bestätigt werden, dass mutierte Fliegen, welche Defekte im dToll Signalweg aufweisen, hochgradig suszeptibel gegenüber bakteriellen und fungalen Infektionen sind (Lemaitre et al., 1996; Rutschmann et al., 2002). Schließlich konnten ab dem Jahr 1997 insgesamt elf zu dToll homologe mammalische Gene identifiziert werden, welche als Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet werden und wichtige Bedeutungen in der Pathogenerkennung und -abwehr besitzen (Medzhitov et al., 1997; Akira und Takeda, 2004).

TLRs sind strukturell durch eine extrazelluläre LRR Domäne und eine intrazelluläre TIR Domäne charakterisiert. Die TIR Domäne der TLRs wie auch des IL-1 Rezeptors ist von entscheidender Bedeutung bei der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle. C3H/HeJ Mäuse, die eine Mutation in der TIR Domäne des TLR4 Gens besitzen, zeigen Defekte in ihrer Fähigkeit auf LPS zu reagieren (Poltorak et al., 1998). Die LRR Domäne hingegen scheint direkt für die Interaktion mit Bestandteilen von Pathogenen verantwortlich zu sein. Bemerkenswert dabei ist, dass trotz hoher Sequenzkonservierung der verschiedenen LRR Domänen, unterschiedliche TLRs in der Lage sind eine Vielfalt nicht verwandter PAMPs zu detektieren (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Akira und Takeda, 2004). Die bisher identifizierten Liganden für die verschiedenen TLRs sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

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

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

Das TLR4 Protein wurde als erstes beschrieben und ist in der Lage LPS von gram-negativen Bakterien zu detektieren (Medzhitov et al., 1997; Hoshino et al., 1999). Dabei werden allerdings weitere Proteine benötigt. LPS bindet an das LPS-bindende Protein, welches im Serum vorhanden ist. Dieser Komplex wiederum wird von CD14 erkannt, ein durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Zellmembran verankertes Molekül, das primär von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen Zellen exprimiert wird. LPS Stimulation der Zellen resultiert in erhöhter Proximität von CD14 und TLR4, was für eine Interaktion beider Moleküle bei der LPS Erkennung spricht (Jiang et al., 2000). TLR4 ist weiterhin in der Lage, so genannte heat-shock Proteine (HSPs) zu erkennen, welche als Chaperone für neu synthetisierte und falsch gefaltete Proteine dienen. Als exogenes HSP, das TLR4 aktivierend wirkt, wurde das HSP60 Protein aus *Chlamydia pneumoniae* identifiziert, das mit der Ausbildung von Atherosklerosis bei chronischen Chlamydien Infektionen in Zusammenhang gebracht wurde (Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001). Bemerkenswerterweise sprechen einige Studien dafür, dass TLR4 (im Komplex mit TLR2) auch

endogene HSP Proteine, wie das HSP70, erkennen kann. Diese Proteine werden vermutlich als „Gefahren Signale“ erkannt, und initiieren eine Immunantwort, um Zellen, welche unter ungewöhnlichen Stress-Bedingungen stehen oder nekrotisch sind, zu eliminieren (Dybdahl et al., 2002; Vabulas et al., 2002).

TLR2 erkennt eine Vielzahl von mikrobiellen Komponenten, wie Lipoproteine aus gram-negativen Bakterien, Mykoplasmen und Spirochäten, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure aus gram-positiven Bakterien, Lipoarabinomannan aus Mykobakterien, Glykoinositolphospholipide aus *Trypanosoma cruzi*, Zymosan aus Pilzen und weitere mikrobielle Substanzen (Takeda et al., 2003). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die TLR2 vermittelte Ligandenerkennung eine Kooperation mit anderen TLR Proteinen einbezieht, insbesondere TLR1 und TLR6 (Ozinsky et al., 2000; Takeda et al., 2003).

Für das TLR5 Protein wurde gezeigt, dass es das Flagellin Protein von Bakterien, dem Hauptbestandteil der Flagellen, welche aus der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien herausragen, binden kann. (Hayashi et al., 2001).

TLR3, TLR7 und TLR9 sind in der Lage, Nukleinsäuren von Viren und Bakterien zu erkennen. Für TLR3 wird vermutet, dass es doppelsträngige RNA, welche in der Zelle bei viralen Infektionen auftritt, und synthetische Analogons wie poly(I:C) detektieren kann (Alexopoulou et al., 2001). TLR9 bindet an unmethylierten CpG Motiven doppelsträngiger DNA, die zwar selten in mammalischen Genomen zu finden sind, jedoch häufige Bestandteile bakterieller DNA darstellen (Hemmi et al., 2000). Die Erkennung der CpG Motive erfolgt dabei vermutlich intrazellulär in Endosomen nach unspezifischer Aufnahme in die Zelle (Wagner, 1999). TLR7 und TLR8 sind zu TLR9 hoch homolog, wobei TLR8 bislang nur beim Menschen gefunden wurde. Nachdem lange Zeit nur synthetische Produkte gefunden werden konnten, welche von TLR7 und TLR8 erkannt werden, konnte kürzlich einzelsträngige RNA als natürlicher Stimulus identifiziert werden (Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004). Die Liganden von TLR10 und TLR11 sind bislang unbekannt.

Die Signalwege, die von aktivierten TLRs eingeschaltet werden, sind, wie schon erwähnt, hoch homolog zum IL-1 Rezeptor (IL-1R) Signalweg. Sowohl TLRs als auch IL-1R besitzen eine intrazelluläre TIR Domäne, welche mit dem Adaptorprotein MyD88 interagiert. Nach Stimulation kann MyD88 eine Serin/Threonin Kinase, die IL-1R-assoziierte Kinase (IRAK), rekrutieren und phosphorylieren. Phosphoryliertes IRAK bindet an TRAF6, was zur Aktivierung zweier für das Immunsystem wichtiger Signalwege führt: JNK und NF- κ B (Takeda et al., 2003) (Abbildung 1.1).

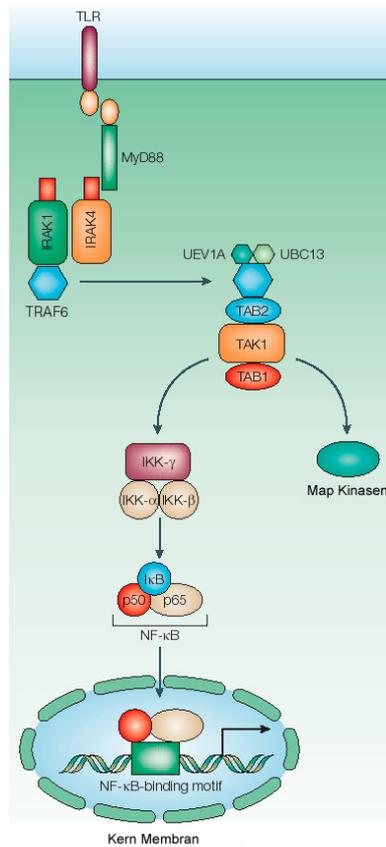


Abb. 1.1 MyD88 abhängiger TLR Signalweg. Abbildung nach Akira und Takeda, 2004.

Studien über MyD88 defiziente Mäuse konnten allerdings zeigen, dass diese nach wie vor responsiv auf LPS bleiben, jedoch mit verzögerten Kinetiken der JNK und NF-κB Aktivierung (Kawai et al., 1999). Nachfolgende Studien konnten einen alternativen, MyD88 unabhängigen Signalweg aufdecken, welcher vermutlich bei mehreren TLRs zum Tragen kommt, jedoch insbesondere im TLR3 Signalweg hohe Bedeutung erlangt. Dieser meist als TRIF-abhängig bezeichnete Signalweg ist zusätzlich in der Lage den Transkriptionsfaktor IRF3 zu aktivieren, und somit die Expression von Typ-I Interferonen zu induzieren (Akira und Takeda, 2004) (Abb. 1.2).

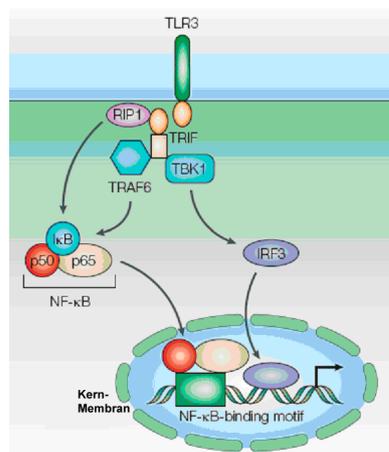


Abb. 1.2 MyD88 unabhängiger / TRIF abhängiger TLR Signalweg am Beispiel von TLR3 gezeigt. Abbildung nach Akira und Takeda, 2004.

Die Bedeutung der TLR vermittelten Antwort auf Fremdorganismen erstreckt sich somit deutlich über das Einleiten von Phagozytose hinaus. Durch Aktivierung von NF- κ B, MAP Kinasen und IRF3 wird die Expression einer Vielzahl immunrelevanter Gene induziert, welche sowohl großen Einfluss auf die unmittelbare angeborene Immunantwort haben, als auch adaptive Immunantworten regulieren können.

TLR Aktivierung konnte mit direkter Induktion antimikrobieller Aktivität in Zusammenhang gebracht werden. Wichtige Effektormechanismen, wie reaktive Stickstoffintermediate aber auch Stickstoff-unabhängige Mechanismen, werden durch TLRs induziert, was insbesondere bei Infektionen mit Mykobakterien gezeigt werden konnte (Thoma-Uszynski et al., 2001). Weiterhin induzieren aktivierte TLRs die Expression von Defensinen, antimikrobielle Peptide, die insbesondere auf epithelialen Oberflächen zu finden sind, wo das Pathogen der ersten Abwehrschranke des Wirtsorganismus begegnet (Lehrer und Ganz, 2002; Takeda et al., 2003). Außerdem wird für TLRs, insbesondere TLR2, ein Zusammenhang mit Infektions-induzierter Apoptose diskutiert (Aliprantis et al., 1999).

TLR Aktivierung hat zusätzlich weitreichende Folgen für adaptive Immunantworten. Speziell Dendritische Zellen (DCs) werden nach Erkennung von mikrobiellen Komponenten durch TLRs zur Reifung angeregt, und bilden die wichtigste Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Aktivierte DCs exprimieren kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 sowie proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 12 (IL-12). Nach Reifung wandern DCs in die peripheren Lymphknoten, wo sie über MHC II Moleküle Antigene der endozytierten Pathogene naiven T-Zellen präsentieren, und somit eine Antigen-spezifische adaptive Immunantwort auslösen (Banchereau und Steinman, 1998; Reis e Sousa, 2001). Die Qualität des TLR Stimulus auf DCs scheint zusätzlich Einfluss auf die T_H1/T_H2 Balance der adaptiven Immunantwort zu haben. Studien konnten belegen, dass ein TLR4 und TLR9 Stimulus von DCs T_H Zell-Differenzierung in Richtung T_H1 begünstigen, wohingegen ein TLR2 Stimulus zu einer T_H2 Antwort führt (Takeda et al., 2003).

1.2 Zytokine

1.2.1 Interferon γ

Interferone (IFN) sind wichtige Zytokine, die in der immunologischen Abwehr des Organismus gegen Pathogene von enormer Bedeutung sind. Man unterscheidet aufgrund ihrer Homologien zwischen Typ-I Interferonen, mit 23 Vertretern von IFN α und einem Vertreter von IFN β , und Typ-II Interferon, auch IFN γ genannt. Typ-I Interferonen wird vor allem besondere Bedeutung in der antiviralen Immunabwehr zugeschrieben, und obwohl von den meisten Zellen in niedrigen Mengen exprimiert, gelten hematopoetische Zellen und Fibroblasten als die Hauptproduzenten von IFN α und IFN β (Schroder et al., 2004). Typ-I Interferone binden an einen gemeinsamen heterodimeren Rezeptor, den IFN α Rezeptor (IFNAR).

IFN γ ist strukturell nicht mit Typ-I Interferonen verwandt und bindet an einen eigenen Rezeptor, den IFN γ Rezeptor (IFNGR). IFN γ gilt als eines der zentralen Moleküle der Immunantwort und Experimente haben ergeben, dass vermutlich mehrere hundert Gene als Folge der IFN γ Antwort in ihrer transkriptionellen Aktivität reguliert werden (Boehm et al., 1997). Obwohl zunächst vermutet wurde, dass IFN γ ausschließlich von CD4⁺ T_H1 Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten und NK Zellen produziert wird, konnten neuere Studien zeigen, dass weitere Zellen wie B-Zellen, NKT Zellen und professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) ebenfalls in der Lage sind IFN γ zu produzieren (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004). Die Produktion von IFN γ wird von Zytokinen gesteuert, welche von APCs sekretiert werden. In besonderem Maße spielen IL-12 und IL-18 dabei eine wichtige Rolle (Munder et al., 1998; Otani et al., 1999; Golab et al., 2000). Beispielsweise führt die Erkennung von Pathogenen durch Makrophagen über PRRs zur Sekretion von IL-12 und einiger Chemokine. Durch Chemoattraktion werden NK Zellen zum Ort der Entzündung geführt und das vorhandene IL-12 kann die IFN γ Sekretion in diesen Zellen stimulieren (Schroder et al., 2004).

Der IFNGR ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei Ligandbindenden IFNGR1 Untereinheiten und zwei Signaltransduzierenden IFNGR2 Untereinheiten. Der Rezeptor ist auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen (Boehm et al., 1997). Das Studium der IFN γ vermittelten Signaltransduktion führte zur Entdeckung des JAK-STAT Signalwegs, welcher von einer Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen verwendet wird (Darnell, Jr. et al., 1994; Schindler und Darnell, Jr., 1995; Ihle, 1996; Subramaniam et al., 2001).

An den Rezeptor Untereinheiten sind spezifische Janus Kinasen (JAK) konstitutiv gebunden, JAK1 an den IFNGR1 Ketten und JAK2 an den IFNGR2 Ketten. Nach Ligandenbindung erfahren die intrazellulären Rezeptordomänen gewisse Konformationsänderungen, welche zur Autophosphorylierung und Aktivierung von JAK2 führen. Aktiviertes JAK2 führt wiederum zu Transphosphorylierung der JAK1 Moleküle, die nun in der Lage sind, spezifische Tyrosinreste der

IFNGR1 Ketten zu phosphorylieren. Dies führt zur Entstehung von spezifischen Bindestellen für SH2 Domänen der latenten zytosolischen STAT1 Moleküle. Diese werden wiederum phosphoryliert, vermutlich durch JAK2, und bilden aktive Homodimere, welche schließlich vom Rezeptor dissoziieren und in den Nukleus translozieren. Die STAT1 Homodimere, auch GAF (**g**amma-**i**nterferon **a**ctivation **f**actor) genannt, können nun durch Bindung an spezifische GAS (**g**amma-**a**ctivated **s**ite) und ISRE (**i**nterferon **s**timulated **r**esponse **e**lement) Konsensussequenzen die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004) (Abbildung 1.3). Diese Gene werden als primär-responsive Gene bezeichnet und werden häufig bereits 15 bis 30 Minuten nach IFN γ Behandlung induziert (Kerr und Stark, 1991). Darunter fallen einige Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel IRF-1, welche ihrerseits weitere Gene in ihrer Transkription regulieren. Hier spricht man von sekundär-responsiven Genen.

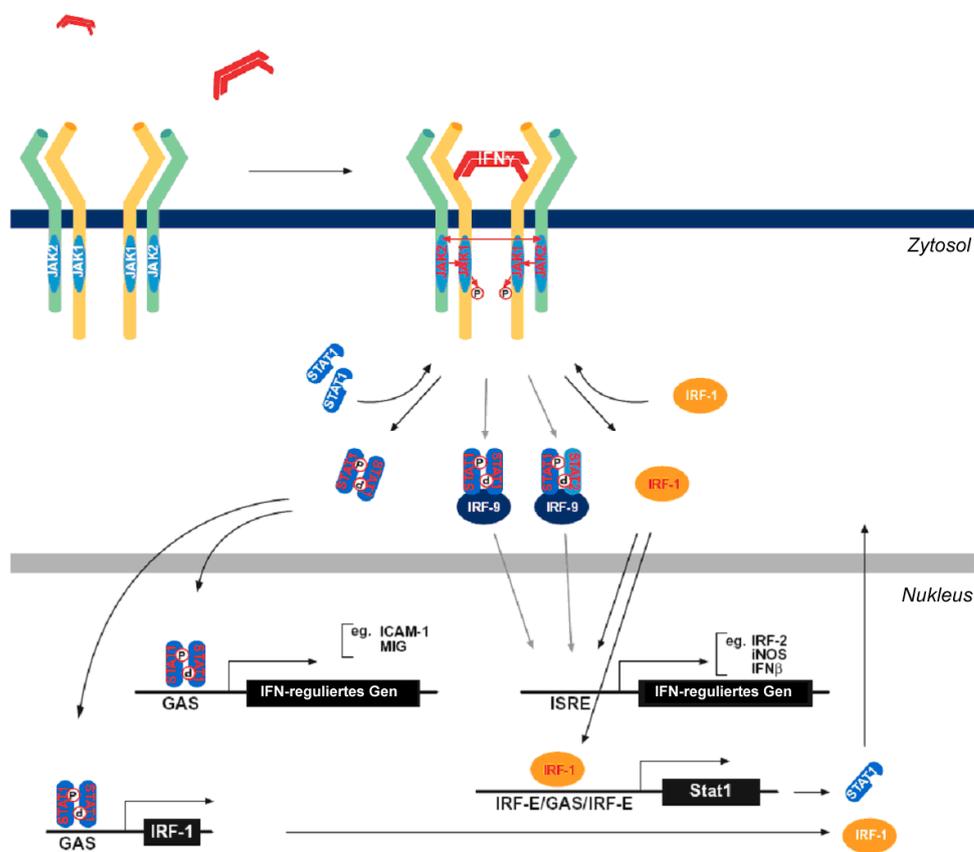


Abb. 1.3 JAK-STAT Signalweg des IFN γ Rezeptors. Abbildung nach Schroder et al., 2004.

GAF ist nicht der einzige Transkriptionsfaktor, der durch IFN γ Bindung an den Rezeptor direkt aktiviert wird. Weitere aktive Komplexe konnten identifiziert werden, wie STAT1/STAT2 Heterodimere, STAT1/STAT1/IRF-9 und STAT1/STAT2/IRF-9 Heterotrimeren, letztere werden auch ISGF3 genannt. ISGF3 galt lange Zeit als typischer Transkriptionsfaktor, der von Typ-I Interferonen aktiviert wird. Dieser bindet an sogenannte ISRE Sequenzen und reguliert ebenfalls eine Vielzahl immunrelevanter Gene, darunter auch IFN β . Jedoch konnte gezeigt werden, dass Typ-I Interferone auch über STAT1 Homodimere signalisieren können, gleichwohl kann IFN γ über ISGF3 signalisieren. Diese Überschneidungen beider Signalwege werden für viele

übereinstimmende Effekte von Typ-I und Typ-II Interferonen verantwortlich gemacht (Matsumoto et al., 1999; Schroder et al., 2004).

Verschiedene Mechanismen existieren, um die IFN γ vermittelte Signalkaskade wieder zu inhibieren um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Nach Bindung des Liganden wird der IFN γ /IFNGR Komplex internalisiert. Dies kann sowohl zur kompletten Degradation des Rezeptors führen, und somit zur Verringerung der IFN γ Responsivität der Zelle, aber auch nur zur Degradation des Liganden. Der IFNGR Rezeptor kann in diesen Fällen in seiner inaktiven Form wieder zur Zelloberfläche gelangen und für weitere Signalereignisse zu Verfügung stehen (Celada und Schreiber, 1987; Schroder et al., 2004). Weiterhin werden durch IFN γ verschiedene Proteine exprimiert, welche an unterschiedlichen Stellen der Signalkaskade interferieren und die Signalweiterleitung hemmen. So genannte SOCS Proteine (suppressor of cytokine signalling), insbesondere SOCS-1 und SOCS-3, werden durch IFN γ aktiviert und assoziieren mit JAK1 und JAK2, wodurch die Weiterleitung des Signals unterbunden wird (Endo et al., 1997; Starr et al., 1997; Song und Shuai, 1998). Zusätzlich können die Protein Tyrosin Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 den IFNGR und JAKs desphosphorylieren, und somit das IFN γ Signal inhibieren (Haque et al., 1997; You et al., 1999).

Die zellulären Effekte von IFN γ sind äußerst vielfältig und essentiell wichtig sowohl für die angeborene als auch für die adaptive Immunität. IFN γ induziert die Expression mehrerer Gene, die für die Klasse I MHC vermittelte Antigenpräsentation wichtig sind. Durch Induktion einiger proteasomaler Untereinheiten, welche als „Immunproteasom-“ Untereinheiten bezeichnet werden, wird die Quantität, Qualität und das Repertoire an Peptiden, welche auf MHC I Molekülen geladen werden, entschieden erhöht, was wiederum zu erhöhter und effektiverer Klasse I Antigenpräsentation beiträgt (Groettrup et al., 2001; Schroder et al., 2004). IFN γ induziert in APCs, wie B-Zellen, DCs und Makrophagen, die Expression von Klasse II MHC Molekülen und kann somit die Klasse II Antigenpräsentation verstärken. Dies wird zusätzlich verbessert durch Aktivierung bestimmter Gene, wie beispielsweise die Ii Kette, Cathepsine und lysosomale Proteasen, welche an der MHC Klasse II Beladung beteiligt sind (Lah et al., 1995; Mach et al., 1996). IFN γ übt weiterhin großen Einfluss auf die adaptive Immunität aus, indem es die Immunantwort in Richtung T_H1 begünstigt. Dies geschieht zum einen durch Differenzierung von CD4⁺ T_H Zellen zu T_H1 Zellen, zum anderen durch Induktion T_H1 typischer Effektor-mechanismen, wie Aktivierung von NK Zellen, Förderung spezifischer zytotoxischer Immunität und Aktivierung von Makrophagen (Boehm et al., 1997).

Die wichtigsten antiviralen Mechanismen, die von IFN γ gesteuert werden, basieren darauf die Proteinsynthese zu hemmen, und somit die virale Replikation zu inhibieren. Darunter fallen die bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnten PKR und OAS/RNaseL Signalwege, sowie auch die doppelsträngige RNA spezifische Adenosin Deaminase, welche die Desaminierung von Adenosin zu Inosin in doppelsträngiger RNA katalysiert und damit die Synthese funktioneller viraler Proteine verhindert (Boehm et al., 1997). Darüber hinaus konnte für einige 65 kDa Guanylat-

bindende Proteine (GBPs), welche hohe Induktion durch $\text{IFN}\gamma$ erfahren, eine antivirale Wirkung gezeigt werden (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005).

Eines der wichtigsten Effekte von $\text{IFN}\gamma$ auf Makrophagen besteht in der Aktivierung vielfältiger antimikrobieller Effektorfunktionen. $\text{IFN}\gamma$ aktivierte Makrophagen zeigen erhöhte Pinozytose und Rezeptor-vermittelte Phagozytose, sowie erhöhte mikrobizide Aktivität. Letztere wird insbesondere durch Induktion von iNOS und NADPH Oxidase bewirkt, Enzyme, die zur Produktion reaktiver Stickstoff und Sauerstoffintermediate benötigt werden (RNI und ROI) (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004). Darüber hinaus führt $\text{IFN}\gamma$ in humanen Zellen lokal zur Tryptophan Depletion durch Induktion der Indolamin 2,3 Dioxygenase (IDO), ein Mechanismus dem im Menschen antiparasitäre und antibakterielle Effekte zugeschrieben werden (Daubener und MacKenzie, 1999).

$\text{IFN}\gamma$ übt außerdem antiproliferative Effekte auf eine Vielzahl von Zellen aus, indem es Einfluss auf den Zellzyklus nimmt und Apoptose induzieren kann. Weiterhin beeinflusst $\text{IFN}\gamma$ den Isotyp Wechsel von B-Zellen zu IgG2a, übernimmt chemoattraktive Funktionen durch Regulation einiger Chemokine wie IP-10, MIG, MIP-1 und RANTES und verstärkt die TLR4 vermittelte Antwort auf LPS, indem es die Expression von TLR4, MyD88 und IRAK induziert (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004).

1.2.2 Tumor Nekrose Faktor

Ein weiteres essentielles proinflammatorisches Zytokin ist der Tumor Nekrose Faktor (TNF). TNF gehört zu einer großen Familie verwandter Proteine, die als TNF Superfamilie bezeichnet wird, welche essentielle biologische Funktionen in Säugetieren übernehmen (Locksley et al., 2001). Die Mitglieder der TNF Superfamilie interagieren mit einem oder mehreren spezifischen, membrangebundenen oder löslichen Rezeptoren, welche zusammen die TNF Rezeptor (TNFR) Superfamilie bilden (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Die biologischen Aktivitäten der TNF/TNFR Superfamilie umfassen eine hohe Vielfalt an Effekten, darunter wichtige Funktionen bei der Organogenese von sekundären lymphatischen Organen, während der Entzündung und der protektiven Immunantwort, aber auch bei für den Organismus negativen Effekten wie Sepsis, Fieber, Cachexia und Autoimmun-Erkrankungen. Mehr als 40 Mitglieder der TNF und TNFR Superfamilien sind bekannt, viele von ihnen sind wichtige Ziele therapeutischer Behandlung (Hehlhans und Pfeffer, 2005).

TNF, wie auch andere Mitglieder der TNF Superfamilie, ist ein membrangebundenes trimeres Molekül, was jedoch, durch proteolytische Spaltung, auch in löslicher Form vorkommt. Beide Formen sind biologisch aktiv (Idriss und Naismith, 2000). TNF bindet an zwei verschiedene Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2. Diese besitzen für die TNFR Superfamilie charakteristische Cysteinreiche Domänen (CRDs) und bilden selbstassemblierende Homotrimere (Chan et al., 2000). Der TNFR2 wird nach Bindung an den Liganden proteolytisch gespalten, zusätzlich

existieren sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre lösliche Formen des TNFR2, welche die Fähigkeit zur Bindung des Liganden trotzdem behalten (Seitz et al., 2001; Hehlhans und Mannel, 2002). Durch Bindung von TNF an den TNFR1 wird über zytosolische sogenannte „death Domänen“ (DD) das Adaptorprotein TRADD (TNFR associated death domain) rekrutiert, welches in der Lage ist, Caspasen Kaskaden zu initiieren und somit Apoptose zu induzieren. Zusätzlich interagiert TRADD mit TRAF1 und TRAF2 (TNFR associated factor) und mit RIP (receptor interacting protein), was zur Aktivierung von NF- κ B und JNK Signalwegen führt. Dies wiederum führt unter anderem zur Transkription Apoptose-inhibierender Gene. Daraus folgt, dass das TNFR1 vermittelte Signal erst bei fehlender Proteinsynthese zur Apoptose führt, im Gegensatz zu Fas, einem weiteren Mitglied der TNFR Superfamilie, welches durch Bindung an FADD (Fas associated death domain) direkt zur Caspasen Aktivierung führt (Hehlhans und Pfeffer, 2005) (Abbildung 1.4).

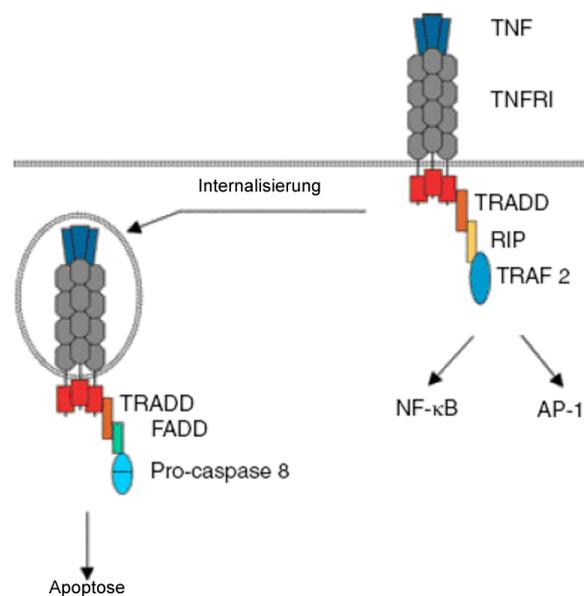


Abb. 1.4 TNF/TNFR1 Signalweg. Abbildung nach Hehlhans und Pfeffer, 2005.

Der TNFR2 besitzt keine zytosolische DD. Stattdessen erfolgt die Signalweiterleitung über ein so genanntes TRAF interagierendes Motiv (TIM), welches nach Rezeptoraktivierung ebenfalls TRAF Proteine rekrutiert und zur Aktivierung von NF- κ B und JNK, sowie p38, ERK und PI3K führt (Dempsey et al., 2003).

TNF und TNFR1 übernehmen wichtige Funktionen beim Aufbau von Immunantworten gegen Pathogene. TNFR1 defiziente Mäuse sind hochgradig suszeptibel gegenüber Infektionen mit intrazellulär replizierenden Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* und *Salmonella typhimurium* (Pfeffer et al., 1993; Ehlers et al., 2003; Hehlhans und Pfeffer, 2005). In *Listeria* infizierten Mäusen zeigt sich bemerkenswerterweise, dass wichtige antimikrobielle Effektorsysteme, welche ROI und RNI (s. Abschnitt 1.3.1) generieren, funktionsfähig sind, jedoch nicht zum Aufbau effektiver Immunität gegen das Pathogen

ausreichen (Endres et al., 1997). Infektionsstudien konnten zeigen, dass TNF entscheidend sowohl für die antimikrobiell protektive als auch für die inflammatorische Immunantwort auf *M. tuberculosis* ist. Dabei ist TNF essentiell zum einen bei der Differenzierung spezifischer T Zellen um T_H1 Zytokine zu sekretieren, zum anderen bei der Entwicklung von Granulomen, in denen das mykobakterielle Wachstum inhibiert wird (Ehlers, 2003). Entscheidend hierbei ist der Befund, dass TNF die phagozytische Aktivität von Makrophagen steigern kann, welche insbesondere im Zusammenspiel mit $IFN\gamma$, deutlich erhöhte mykobakterizide Aktivität entwickeln (Bekker et al., 2001). Weiterer wichtiger Effekt von TNF bei der Bildung von Granulomen, ist die Fähigkeit Chemokine und Adhäsionsmoleküle zu induzieren, die zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen zum Ort der Infektion führen (Roach et al., 2002).

Durch Studien von TNFR1 defizienten Mäusen konnte ein wichtiger Zusammenhang der TNF Antwort mit parasitären Infektionen gezeigt werden, wie *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* und *Toxoplasma gondii*. Interessanterweise konnten bei TNFR2 defizienten Mäusen keine Defekte in der Toxoplasmen Abwehr gezeigt werden (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Jüngere Studien legen allerdings eine Rolle des TNFR2 in humanen unreifen DCs beim Aufbau einer Toxoplasmostase nahe (Giese et al., 2004).

Einer der bedeutendsten Effekte von TNF, insbesondere in Bezug auf medizinische Behandlung, ist dessen systemische endotoxische Aktivität, was wesentlich zur Entstehung von Fieber und Schock beiträgt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass TNF, durch seine Fähigkeit proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren in ihrer Expression zu induzieren, einer der herausragendsten inflammatorischen Mediatoren ist. Diese potenten Effekte sind aber auch für Krankheitsbilder verantwortlich, wie die Sepsis, die nach wie vor eine hohe Mortalitätsrate aufweist, und für die chronische Polyarthrit und den Morbus Crohn (Hehlhans und Pfeffer, 2005).

1.3 Zelluläre antimikrobielle und antivirale Effektorsysteme

1.3.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate

Makrophagen gelten, neben zytotoxischen T-Zellen, als die wichtigsten zellulären Effektoren der angeborenen und adaptiven Immunität bei der Pathogenabwehr. Sie werden primär durch einen $IFN\gamma$ Stimulus aktiviert und vollziehen daraufhin weitreichende biochemische Veränderungen durch Induktion einer großen Zahl von Genen. Neben erhöhter Antigenpräsentation, Phagozytoserate und Responsivität auf proinflammatorische Zytokine wie TNF, führt die Aktivierung von Makrophagen, welche häufig durch aktivierte T_H1 Zellen geschieht, zu effizienterer Fusion ihrer Lysosomen mit Phagosomen. Dadurch werden intrazelluläre oder kürzlich aufgenommene Mikroben verschiedenen lysosomalen Enzymen exponiert, welche antimikrobielle Aktivität zeigen. Zusätzlich werden Makrophagen dazu angeregt verschiedene Effektorsysteme zu induzieren, wie die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-

intermediate (ROI, RNI) durch spezifische Enzymsysteme (Janeway, Jr. et al., 2005). ROI werden durch eine spezielle NADPH Oxidase gebildet, Phagozyten Oxidase (Phox) genannt, und stellen Zwischenschritte bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser dar. Mit RNI bezeichnet man verschiedene Oxidationsstufen von Stickstoffprodukten, welche durch die katalytische Wirkung der NO Synthase Typ 2 (NOS2) entstehen, auch induzierbare NO Synthase genannt (iNOS) (Nathan und Shiloh, 2000). Die ROI und RNI Produktion durch Phox und iNOS ist in Abbildung 1.5 zusammengefasst.

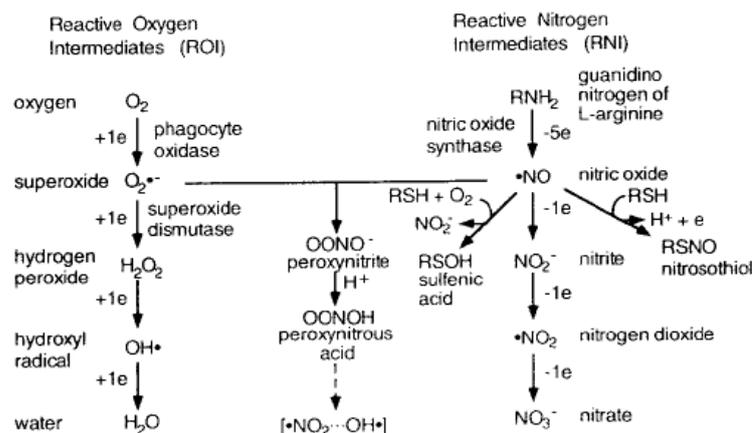


Abb. 1.5 ROI und RNI Produktion durch Phox und iNOS in mammalischen Zellen. Abbildung aus Nathan and Shiloh, 2000.

ROI und RNI sind chemisch hochreaktive Moleküle, die zur Zerstörung von Nukleinsäuren sowie einer Vielzahl chemischer Verbindungen führen. Aufgrund dieser Eigenschaften führen sie zu einer schnellen und effektiven Zersetzung des Pathogens und gelten als die wichtigsten antimikrobiellen Effektorsysteme in der Maus. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität führen ROI und RNI allerdings auch zu lokaler Zerstörung des Gewebes, weswegen ihre Aktivität erst im Rahmen einer Immunantwort freigesetzt wird und nicht konstitutiv wirkt. Diese gewebezerstörende Eigenschaft erlaubt allerdings auch die Bekämpfung von Pathogenen wie Würmer, die aufgrund ihrer Größe durch die Wirtszellen nicht phagozytiert werden können (Nathan und Shiloh, 2000; Janeway, Jr. et al., 2005).

ROI und RNI zeigen sowohl redundante als auch nicht redundante Funktionen. Mäuse mit genetischen Defekten für iNOS als auch der Phox Untereinheit gp91^{phox} sterben durch spontane Infektionen mit fakultativ pathogenen Mikroorganismen, was auch durch Antibiose oder keimfreier Haltung nicht zu verhindern ist (Shiloh et al., 1999). Einzelgen-defiziente Mäuse hingegen entwickeln nur selten spontane Infektionen, was dafür spricht, dass Phox und iNOS sich zu großen Teilen gegenseitig kompensieren können (Nathan und Shiloh, 2000). Im Gegensatz dazu lassen sich Infektionen mit verschiedenen nicht-kommensalen Mikroorganismen beobachten, bei denen entweder ROI oder RNI zu Eliminierung essentiell sind. Beispielsweise können Infektionen mit *Salmonella typhimurium* oder *Staphylococcus aureus* durch gp47^{phox} oder

gp91^{phox} defizienten Mäusen nicht kontrolliert werden. Entsprechend ist iNOS essentiell zur Abwehr gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* und *Leishmania major* (Jackson et al., 1995; Nathan, 1997; Bogdan et al., 2000). Weiterhin sind sowohl iNOS als auch Phox in der Listerien Infektion entscheidend beteiligt. Für iNOS konnte zusätzlich eine wichtige Rolle bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* sowie einigen Viren, wie murines Cytomegalie Virus, Hepatitis B Virus, Ectromelia Virus und Coxsackie Virus, gezeigt werden (Nathan und Shiloh, 2000).

1.3.2 p47 GTPasen

Interferone üben weitreichende transkriptionelle Veränderungen in Zellen aus, die über entsprechende Rezeptoren verfügen und die Signale intrazellulär weiterleiten können (s. Abschnitt 1.2.1). Seit Beginn der 1980er Jahre wurden zahlreiche GTP bindende Proteine identifiziert, die durch Interferone induzierbar sind (Cheng et al., 1983; Martens und Howard, 2006). Durch voranschreitende Sequenzierung der zugehörigen Gene, ließen sich diese, als IFN induzierbare GTPasen bezeichnete Proteine, aufgrund ihrer Sequenzhomologien in vier Familien untergliedern: Mx Proteine, die primär von Typ I IFN induzierbar sind, VLIgS (very large inducible GTPase), p47 GTPasen und p65 Guanylat-bindende Proteine (Staheli et al., 1986; Horisberger und Hochkeppel, 1987; Boehm et al., 1998; Klamp et al., 2003; Martens und Howard, 2006). Sowohl für Mx Proteine als auch für einige p65 GBPs konnten im Menschen und in der Maus antivirale Effekte gezeigt werden, p47 GTPasen gelten heute als wichtige antimikrobielle Effektorproteine in der Maus (Martens und Howard, 2006).

Die p47 GTPasen, auch „immunity-related GTPases“ (IRG) genannt, zählen zu den am besten untersuchten IFN induzierbaren GTPasen. Die p47 GTPasen haben typischerweise ein Molekulargewicht von 47 kDa, und werden in der Maus durch „single-exon“ Gene kodiert. Im Menschen existiert ein einziges homologes Gen, das jedoch nicht durch IFN induzierbar ist und vermutlich keine immunologische Funktion übernimmt (Bekpen et al., 2005). In der Maus hingegen konnten 23 homologe Gene identifiziert werden, wovon sechs Gene intensiv im Zusammenhang mit der Infektionsabwehr untersucht wurden (Boehm et al., 1998; Taylor et al., 2004; Bekpen et al., 2005).

Die meisten murinen p47 GTPasen besitzen drei konservierte Guanin-Nukleotid Bindestellen, welche als G1 (GX₄GKS), G3 (DXXG) und G4 ((N/T)KXD) bezeichnet werden. Bei drei murinen p47 GTPasen ist das G1 Motiv zu GX₄GMS verändert, daher unterscheidet man zwischen GKS und GMS p47 GTPasen. Die G2 und G5 Motive, die man häufig bei anderen GTPasen findet, sind in allen IFN induzierbaren GTPasen weniger hoch konserviert (Boehm et al., 1998; Martens und Howard, 2006).

IFN γ ist der Hauptinduktor der p47 GTPasen Expression, wenngleich gezeigt werden konnte, dass IFN α , IFN β sowie LPS ebenfalls induzierende Wirkungen zeigen. Die LPS vermittelte Induktion

ist allerdings vermutlich auf sekundäre Produktion von Interferonen zurückzuführen (Zerrahn et al., 2002; Bekpen et al., 2005; Lapaque et al., 2006).

Die Generierung von „knock-out“ Mauslinien, die für einzelne p47 GTPasen Gene defizient sind, konnte eine signifikante Bedeutung der p47 GTPasen in der Pathogenabwehr aufdecken. LRG47 (Irgm1) defiziente Mäuse sind suszeptibel für Infektionen mit *T. gondii*, *L. major*, *T. cruzi*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *L. monocytogenes* und *S. typhimurium*. IGTP (Irgm3) defiziente Mäuse wurden mit den gleichen Erregern infiziert, jedoch konnte bislang eine Suszeptibilität nur bei *T. gondii* und *L. major* Infektionen nachgewiesen werden. IRG47 (Irgd) defiziente Mäuse sind ebenfalls suszeptibel für *T. gondii* Infektionen, jedoch resistent für *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* Infektionen (Taylor et al., 2004; MacMicking, 2005; Martens und Howard, 2006). Bislang existieren keine eindeutigen Daten bezüglich der Rolle von p47 GTPasen bei viralen Infektionen. Lediglich für TGTP (Irgb6) und GTPI (Irgm2) konnte eine leicht erhöhte antivirale Wirkung gegen VSV oder Coxsackie Virus in überexprimierenden Zellen gezeigt werden (Carlow et al., 1998; Zhang et al., 2003).

Mehrere Studien haben die subzelluläre Lokalisation von p47 GTPasen nach Infektion mit intrazellulären Pathogenen untersucht. Für LRG47 konnte eine Assoziation mit mykobakteriellen Phagosomen in *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen, die mit IFN γ behandelt waren, gezeigt werden. LRG47 defiziente Mäuse zeigen verringerte und verzögerte Azidifizierung der Phagosomen, was mit Defekten in der Kontrolle mykobakterieller Infektionen korreliert (MacMicking et al., 2003). In *T. gondii* infizierten Astrozyten, embryonalen Fibroblasten und 3T3 Zellen, die mit IFN γ behandelt wurden, lässt sich eine beträchtliche Akkumulation von IIGP1, TGTP, IRG47, GTPI und IGTP um die parasitophore Vakuole (PV) des Parasiten erkennen, die mit einer Zersetzung der PV in Zusammenhang gebracht wurde (Martens et al., 2005; Martens und Howard, 2006). Interessanterweise lässt sich keine Assoziation von LRG47 mit der PV zeigen, obwohl LRG47 defiziente Mäuse suszeptibel für Infektionen mit *T. gondii* sind. Somit lassen sich die p47 GTPasen vermittelten Resistenzen für *T. gondii* Infektionen nicht durch einen einzelnen Effektormechanismus erklären. Allerdings wird für alle GMS p47 GTPasen, wozu auch LRG47 gehört, diskutiert, dass sie eine Rolle bei der korrekten subzellulären Lokalisation weiterer p47 GTPasen und somit der Fähigkeit Effektorfunktionen auszuüben, spielen (Martens und Howard, 2006).

1.3.3 p65 Guanylat-bindende Proteine

Bereits 1979 wurde die Identifizierung eines 67 kDa Proteins aus IFN behandelten humanen Fibroblasten beschrieben (Gupta et al., 1979). Wenige Jahre später konnte gezeigt werden, dass dieses Protein die ungewöhnliche Eigenschaft besitzt GTP-Agarose, GDP-Agarose und GMP-Agarose mit ähnlichen Affinitäten zu binden (Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1985), weswegen es Guanylat-bindendes Protein genannt wurde (GBP). Seitdem sind zahlreiche zu GBP homologe

Gene in verschiedenen Spezies identifiziert worden, wodurch klar wurde, dass es sich hierbei um konservierte Genfamilien handelt, die heute meist als p65 GBP Familien bezeichnet werden. Dies erfolgte aufgrund des typischen Molekulargewichts dieser Proteine von 65 – 67 kDa (Vestal, 2005). Bislang sind GBPs in Mensch, Maus, Ratte und Huhn gefunden worden (Cheng et al., 1991; Asundi et al., 1994; Schwemmle et al., 1996; Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002), jedoch sind noch keine umfangreichen und speziesübergreifenden Studien über das Vorkommen in weiteren Taxa verfügbar.

Die p65 GBPs gehören zur Superfamilie der Dynamamin-verwandten Proteine. Zu dieser Superfamilie zählt man die klassischen Dynamamine, die Dynamamin-like Proteine (Dlp), die „vacuolar protein sorting“ Proteine (Vps), die bereits oben erwähnten Mx Proteine, die ARC5-like Proteine, die bislang nur in Pflanzen identifiziert wurden, die OPA1/Mgm1 Proteine, die Mitofusin Proteine und die GBP-verwandten Proteine, bestehend aus den p65 GBPs und den Atlastinen (Praefcke und McMahon, 2004). Obwohl die Familien der Dynamamin-verwandten Proteine untereinander nur geringe Homologie in ihren Primär-Sequenzen aufweisen, zeigen sie ähnliche strukturelle Eigenschaften, wie das Vorhandensein einer großen Guanylat-Nukleotid bindenden Domäne, einer so genannten „middle domain“ und einer meist C-terminal liegenden GTPase Effektordomäne (GED), sowie die gemeinsame biochemische Eigenschaft der Oligomerisierung abhängigen GTPase Aktivität (Praefcke und McMahon, 2004).

Bislang wurden fünf Mitglieder der murinen p65 GBPs (mGBPs) beschrieben (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002). Für den Menschen existieren sieben homologe cDNA Sequenzen in der GenBank Datenbank, jedoch konzentrieren sich nahezu alle Publikationen über humane p65 GBPs (hGBPs) auf hGBP1. Bei einer Publikation zu hGBP3 handelt es sich um eine Namensverwechslung, da es sich bei dem beschriebenen Protein um das humane Atlastin-1 handelt (Luan et al., 2002).

Die p65 GBP Familien von Mensch und Maus bestehen aus untereinander auffällig hoch homologen Genen, die insbesondere in ihren N-terminalen GTPase Domänen außerordentlich zahlreiche Sequenzidentitäten aufweisen. In diesen Domänen befinden sich zwei der drei kanonischen Guanylat-Nukleotid bindenden Motive, G1 und G3. Das G4 Motiv (N/T)KXD ist hingegen nicht konserviert. Stattdessen besitzen p65 GBPs ein nicht-kanonisches RD Motiv, welches ebenfalls Guanylat-Nukleotid bindende Eigenschaften besitzt (Cheng et al., 1991; Praefcke et al., 1999). Einige GBPs (hGBP1, hGBP2, hGBP5, mGBP1, mGBP2, mGBP5) besitzen weiterhin am C-Terminus ein CaaX Motiv, welches als Signal für posttranslationale Isoprenylierung dient (Stickney und Buss, 2000). Das CaaX Motiv von mGBP2 scheint wichtig für dessen korrekte subzelluläre Lokalisation zu sein. Isoprenyliertes mGBP2 lokalisiert in granuläre oder vesikelartige Strukturen innerhalb des Zytosols, die bislang nicht näher charakterisiert werden konnten. Mutiertes mGBP2, das nicht mehr isoprenyliert werden kann, verliert diese typische subzelluläre Verteilung (Vestal et al., 2000).

Die p65 GBPs werden sowohl von Typ I als auch von Typ II IFN in vielen Zellen induziert. In murinen Makrophagen gehören einige Mitglieder der mGBPs zu den höchsten IFN γ induzierbaren Proteinen (Boehm et al., 1998). Zusätzlich führt LPS ebenfalls zu einer transienten Induktion von mGBP1-5 (Nguyen et al., 2002). Für hGBP1 konnte außerdem eine deutliche Induzierbarkeit durch IL-1 α , IL-1 β und TNF nachgewiesen werden (Guenzi et al., 2001; Lubeseder-Martellato et al., 2002).

Sowohl hGBP1 als auch mGBP2 üben regulierende Funktionen auf das Zellwachstum aus. In humanen Endothelzellen, die nach Behandlung mit IFN γ , TNF oder IL-1 β in der Lage sind, durch Wachstumsfaktoren stimulierte Zellproliferation zu inhibieren, führt Überexpression von hGBP1 zu gleichen Effekten, unabhängig von GTP Bindung (Guenzi et al., 2001). In NIH3T3 Fibroblasten hingegen, in denen IFN γ die Zellproliferation begünstigt, resultiert mGBP2 Überexpression in erhöhtem Zellwachstum, was von einer intakten GTP Bindestelle abhängig ist (Gorbacheva et al., 2002).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass hGBP1 Expression in Endothelzellen die Expression von Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1) negativ reguliert, was zu einer verringerten invasiven Kapazität der Zellen in Kollagen I Matrices führt. Auch dieser Effekt ist von einer funktionsfähigen GTP Bindestelle abhängig (Guenzi et al., 2003). Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen hGBP1 Expression und Resistenz gegenüber Paclitaxel Behandlung in ovariellen Tumorzellen aufgedeckt werden (Duan et al., 2006).

Trotz der außerordentlichen Responsivität der p65 GBPs auf proinflammatorische Zytokine sind bislang nur wenige Studien bezüglich ihrer Rolle in der Immunabwehr verfügbar. Bisher konnten nur für hGBP1 und mGBP2 antivirale Effekte nachgewiesen werden. HeLa Zellen, die hGBP1 überexprimieren, zeigen erhöhte antivirale Aktivität gegen Infektionen mit EMCV oder VSV. Mutationsanalysen konnten zeigen, dass diese Aktivität von GTP Bindung abhängig ist (Anderson et al., 1999). Gleichwohl konnte für mGBP2 überexprimierende NIH3T3 Zellen, die mit diesen Viren infiziert wurden, eine vergleichbare Reduktion viraler Partikel gezeigt werden. Hier jedoch, konnte nur in der EMCV Infektion ein Einfluss der GTP Bindestelle auf die antivirale Aktivität nachgewiesen werden (Carter et al., 2005).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zellen haben im Laufe der Evolution eine Vielfalt von Möglichkeiten entwickelt um biologische Funktionen äußerst exakt und flexibel regulieren zu können. Komplexe Metazoen sind darauf angewiesen, hoch spezialisierte Zelltypen auszubilden, die in der Lage sind, auf extrazelluläre Reize angemessen zu reagieren. So genannte Botenstoffe vermitteln Informationen, auf die, in Abhängigkeit des Zelltyps, unterschiedliche zelluläre Antworten erfolgen können.

Als zentrales Prinzip der zellulären Antwort stellt sich die Regulation der Genexpression dar, die von einfachsten Organismen wie Bakterien und Einzellern bis hin zu hoch entwickelten mehrzelligen Organismen bei der Aufrechterhaltung von grundlegenden zellulären Funktionen und bei der Ausübung zelltypspezifischer Funktionen von entscheidender Bedeutung ist. Das Studium der Genexpression ist somit von hohem wissenschaftlichem Interesse, wenn man die grundlegenden molekularen Mechanismen verstehen will, die hinter oftmals lang bekannten und gut untersuchten biologischen Prozessen stehen.

Mehrere Methoden wurden entwickelt, um eine umfassende Untersuchung der Genexpression von Zellen und Geweben unter bestimmten Bedingungen zu ermöglichen. Einige dieser Methoden, wie Differential Display und PCR Select, sind zwar in der Lage Transkripte zu identifizieren, die zuvor nicht beschrieben waren, und somit gänzlich neue Untersuchungsansätze zu öffnen, benötigen allerdings auch langwierige Klonierungs- und Sequenzierarbeiten um ein umfassendes Transkriptionsprofil des untersuchten biologischen Systems zu erstellen. Zusätzlich leiden solche Methoden häufig an mangelnder Sensitivität. Dank der fortschreitenden Sequenzierung der Genome und der Entwicklung der Microarray Technologie wurde es möglich, hocheffiziente Methoden zu entwickeln, die es erlauben in kurzer Dauer eine Vielzahl von Genen auf ihre Expressionseigenschaften zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die GeneChip Array Technologie der Firma Affymetrix verwendet werden, um die transkriptionelle Antwort von murinen Makrophagen auf $\text{IFN}\gamma$ und TNF zu untersuchen. Studien konnten belegen, dass TNFR1 defiziente Mäuse zwar normale ROI und RNI Aktivität sowie nicht auffällig veränderte Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und anderer proinflammatorischer Zytokine zeigen, jedoch hochgradig suszeptibel sind gegenüber Infektionen mit *L. monocytogenes* (Pfeffer et al., 1993; Endres et al., 1997). Diese Befunde sprechen dafür, dass die $\text{IFN}\gamma$ und TNF abhängige Antwort bislang unbekannt zelluläre Mechanismen in Gang setzt, die zu einer effektiven antimikrobiellen Aktivität führen. Dies könnten zum einen bislang unentdeckte Effektorsysteme sein, die durch diese Zytokine aktiviert werden, oder Mechanismen, die die Aktivität bekannter Effektormechanismen erst nach Induktion durch $\text{IFN}\gamma$ und/oder TNF regeln oder initiieren können.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit galt $\text{IFN}\gamma$ und TNF regulierte Gene zu identifizieren, die eine potentiell wichtige Rolle im Rahmen einer Immunabwehr gegen intrazelluläre Bakterien und

Parasiten spielen. Kandidatengene sollten, sowohl *in vitro* unter proinflammatorischen Bedingungen, als auch *in vivo* während einer Infektion, auf ihre Expressionseigenschaften untersucht werden. Zusätzlich sollte ihr subzelluläres Verhalten während Infektionen mit intrazellulären Erregern mikroskopisch analysiert werden. Ein weiteres Ziel war die Generierung einer „knock-out“ Maus für eines der Kandidatengene, um die Rolle des Gens im Verlauf einer Infektion *in vivo* zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie

AffiniPure Ziege anti-Maus IgG/IgM, Cy2
 Agarose
 Anti-SagI Antikörper
 Ampicillin Natriumsalz
 β -Merkaptoethanol
 Bactoagar
 Bromphenolblau
 BSA (Rinderserumalbumin, RIA Qualität)
 Chloroform
 CpG ODN 1668
 DAPI
 DEPC (Diethylpyrocarbonat)
 Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
 Dextransulfat
 Dinatriumhydrogenphosphat
 DMEM Medium
 EDTA
 Essigsäure
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Ficoll™ 400
 FKS (Fötales Kälberserum)
 FluoromountG
 Formaldehyd
 Formamid
 IL-1 β
 L-Glutamin
 LPS *E. coli* 055:B5
 Glyzerin
 Hefeextrakt
 Kaliumchlorid
 Kaliumdihydrogenphosphat
 Kanamycin
 Magnesiumchlorid
 Marker 1kb DNA-Leiter
 mIFN β
 mIFN γ
 mTNF α
 Mineralöl
 MESA-Puffer
 Natriumacetat

Bezugsquelle

Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
 Biozym, Hamburg
 Abcam, Cambridge, UK
 Sigma, Taufkirchen
 PAN, Aidenbach
 BD Biosciences, Heidelberg
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 TIB MolBiol, Berlin
 Invitrogen, Karlsruhe
 Sigma, Taufkirchen
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
 Amersham, Braunschweig
 Fluka, Ulm
 Invitrogen, Karlsruhe
 Riedel-de Häen, Seelze
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Amersham, Braunschweig
 PAN, Aidenbach
 Southernbiotech, Birmingham, USA
 Merck, Darmstadt
 Sigma, Taufkirchen
 R&D Systems, Mainz
 Biochrom, Berlin
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 BD Biosciences, Heidelberg
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Sigma, Taufkirchen
 Merck, Darmstadt
 Invitrogen, Karlsruhe
 PBL Biomedical, Piscataway, USA
 R&D Systems, Mainz
 R&D Systems, Mainz
 Sigma, Taufkirchen
 Sigma, Taufkirchen
 Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Poly I:C	Sigma, Taufkirchen
Polyvinylpyrrolidon	Serva, Heidelberg
RPMI Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Ultrapure H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen
Ziegenserum	DaKoCytomation, Hamburg

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.

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
DNA High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
DNA T4 Ligase	Roche, Mannheim
DNA T4 Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Pronase E	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RNAse, DNAse frei	Roche, Mannheim
RNAse H	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterial

Reagenz oder Verbrauchsmaterial

Filterpapier Whatman 3MM
 Microcon-YM50 Säulen
 NucTrap[®] Sonden-Aufreinigungssäulen
 Nylonmembran, Hybond N+
 Parafilm M
 Plastikwaren

Plasmid Isolierungskits

Rediprime DNA labelling system
 TOPO TA Cloning[®] Kit
 BioArray high-yield RNA transcript labeling kit

Bezugsquelle

Whatman, Dassel
 Millipore, Schwalbach
 Stratagene, Heidelberg
 Amersham, Braunschweig
 American National Can, Chicago, USA
 NUNC, Wiesbaden
 BD Falcon, Heidelberg
 Eppendorf, Hamburg
 QIAGEN, Hilden
 BD Biosciences, Heidelberg
 Amersham, Braunschweig
 Invitrogen, Karlsruhe
 ENZO, New York, USA

2.2 Geräte

Gerät

Brutschrank
 Elektrophorese von DNA und RNA
 Geldokumentationssystem
 Kühlzentrifugen

Microarray System

Mikroskope

Konfokalmikroskop
 PCR Maschine
 Realtime PCR Maschine
 Phosphoimager
 Photometer
 Spannungsquelle

Sterilbank
 Tischzentrifugen

Bezeichnung, Hersteller

BBD6220, Heraeus, Hanau
 Agagel Maxi/Midi, Biometra, Göttingen
 BioDocAnalyzer, Biometra, Göttingen
 Sorvall[®] RC26 PLUS, Heraeus, Hanau
 Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau
 Biofuge fresco, Heraeus, Hanau
 GeneChip Fluidics Station 400, Affymetrix,
 Santa Clara, USA
 GeneArray Scanner, Agilent- Affymetrix,
 Santa Clara, USA
 Axiovert 25, Zeiss, Jena
 TE2000, Nikon, Düsseldorf
 LSM510Meta, Zeiss, Jena
 Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen
 iCycler IQ5, Biorad, München
 FLA-3000, FujiFilm, Düsseldorf
 GeneQuant II, Pharmacia, Braunschweig
 Power Pack P25, Biometra, Göttingen
 PS 500 XT, HIS, San Francisco, USA
 HLB 2472 GS, Heraeus, Hanau
 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	
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH = 7,4
TE-Puffer	10 mM	Tris, pH = 8,0
	1 mM	EDTA, pH = 8,0
TNE-Puffer	10 mM	Tris, pH = 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA, pH = 8,0
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM	Tris, pH = 8,0
	20 mM	Eisessig
	2 mM	EDTA
6 x DNA Auftragspuffer	15 %	Ficoll Typ 400
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
RNA Elektrophoresepuffer		1 x MESA-Puffer
2 x RNA Auftragspuffer	48,0 % (v/v)	Formamid
	10,0 % (v/v)	10 x MOPS-Puffer
	17,3 % (v/v)	Formaldehyd
	14,0 % (v/v)	DEPC-H ₂ O
	5,3 % (v/v)	Glyzerin
	5,3 % (v/v)	Bromphenolblau
10 x MOPS-Puffer	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat·3H ₂ O
	10 mM	EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O
		pH = 7,2
50 x Denhardts	1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	1 % (w/v)	Ficoll
	1 % (w/v)	BSA
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat

50 x TAE	2 M	Tris, pH = 8,0
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA
Waschlösung I (Southern)	2 x	SSC
	0,05 %	SDS
Waschlösung II (Southern)	2 x	SSC
	0,1 %	SDS
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
10 x PCR-Puffer	500 mM	KCL
	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine
Fragmentierungs Puffer	200 mM	Tris-Acetat
	500 mM	KOAc
	150 mM	MgOAc
		pH = 8,1
Lysepuffer	10 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
	0,5%	Sarcosyl

2.3.2 Zellkulturmedien

Zelltypen	ES- Zellen	EF-Zellen	RAW 264.7 Makrophagen	ANA-1 Makrophagen
Grundmedium	DMEM	DMEM	RPMI 1640 VLE	RPMI 1640 VLE
FKS	15 %	5 %	10 %	10 %
LIF	1 %			
L-Glutamin	2 mM	2 mM	im Grundmedium enthalten	im Grundmedium enthalten
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	
Streptomycin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	
β-Merkaptoethanol	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

2.3.3 Medien für die Bakterienkultur

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

Das Medium wurde durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiert. Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem autoklavieren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Klone mit 50% sterilem Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Antibiotika

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

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

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika

2.5 Bakterienstämme und Zelllinien

2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen
<i>L. monocytogenes</i>	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251
<i>T. gondii</i>	obligat intrazellulär replizierender Einzeller	Stamm: ME49

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme

2.5.2 Zelllinien

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

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
BMDC	Aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen <i>in vitro</i> ausdifferenzierte Dendritische Zellen	
Mikroglia	Aus dem Gehirn von C57BL/6 Mäusen gewonnen	
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus CD1 Embryonen	
ES-Zellen	embryonale Stammzellen aus 129/Ola Mäusen	Kuhn et al. 1991

Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien

2.6 Primer

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

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
IRG1-DsRed fwd	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG	IRG1-DsRed Fusionskonstrukt
IRG1-DsRed rev	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ N ₋₁ N	IRG1-DsRed Fusionskonstrukt
mGBP6-DsRed fwd	AAA GTC GAC CAC CAT GAC CCA ACC ACA AAT G	mGBP6-DsRed Fusionskonstrukt
mGBP6-DsRed rev	GCG ACC GGT CCT AAA TGC TTT AGA TAA CGG AC	mGBP6-DsRed Fusionskonstrukt

Tabelle 2.5: Primer zur Klonierung von DsRed- Fusionskonstrukten

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
mGBP6 R46A fwd	GGC TAT TGT TGG ATT GTA CGC TAC AGG GAA GTC CTA TTT GAT G	Mutagenese von mGBP6
mGBP6 R46A rev	CAT CAA ATA GGA CTT CCC TGT AGC GTA CAA TCC AAC AAT AGC C	Mutagenese von mGBP6
mGBP6 T73A fwd	CCA CCG TGC AGT CTC AGG CCA AGG GCA TCT GGA TG	Mutagenese von mGBP6
mGBP6 T73A rev	CAT CCA GAT GCC CTT GGC CTG AGA CTG CAC GGT GG	Mutagenese von mGBP6
mGBP6 D182N fwd	GTC TGG ATT GTT CGG AAT TTC ATG CTG GAG CTG	Mutagenese von mGBP6
mGBP6 D182N rev	CAG CTC CAG CAT GAA ATT CCG AAC AAT CCA GAC	Mutagenese von mGBP6

Tabelle 2.6: Mutagenese Primer

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
KA TV1 fwd	AGG ATC CCG TAA TCA TTG TGT ATT GAT	IRG1 Targeting Vektor 1 kurzer Arm
KA TV1 rev	ATG CGG CCG CAA CGG GTC AAC GTG	IRG1 Targeting Vektor 1 kurzer Arm
LA TV1 fwd	ATA CTC GAG GGG CAG AGC TAC ACT TAT C	IRG1 Targeting Vektor 1 langer Arm
LA TV1 rev	TAT AAG CTT ACC AGC AAA GCT CTC TGT GAC	IRG1 Targeting Vektor 1 langer Arm
KA TV2 fwd	AAA GCG GCC GCA GCC CAG TGG TCT GTC GTA A	IRG1 Targeting Vektor 2 kurzer Arm
KA TV2 rev	AAA GGA TCC TTG CTC CTC CGA ATG ATA CCA TC	IRG1 Targeting Vektor 2 kurzer Arm
LA TV2 fwd	AAA CTC GAG GAG GAT GAT CCT GGA TTC TC	IRG1 Targeting Vektor 2 langer Arm
LA TV2 rev	AAA GGT ACC TGG GAG GAA AGC CTG TAG AC	IRG1 Targeting Vektor 2 langer Arm

Tabelle 2.7: Primer zur Klonierung der Targeting Vektoren für IRG1

Primername	Sequenz (5'→3')	Sonde
β-Actin fwd	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	CTCTGGCT
β-Actin rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	
IRG1 fwd	GCT GCT TTT GTT AAT GGT GTT G	CTGGGGCT
IRG1 rev	CGA TAG AGC TGT GAG GAC AGG	
mGBP1 fwd	CAG ACT CCT GGA AAG GGA CTC	GGCTGAAG
mGBP1 rev	CTT GGA TTC AAA GTA TTT TCT CAG C	
mGBP2 fwd	TGA GTA CCT GGA ACA TTC ACT GAC	AGGAGCTG
mGBP2 rev	AGT CGC GGC TCA TTA AAG C	
mGBP3 fwd	GGC TGA GGA CTG TCC CTG T	CAGAGCCA
mGBP3 rev	CAT GGT CCA CTC GGA AGC	
mGBP4 fwd	GCC AAG ATC AAG ACC CTC AG	ACTGGGAA
mGBP4 rev	CCA CGT AGG TTG TCA CCA GA	
mGBP5 fwd	TCA CTG AAG CTG AAG CAA GG	ACTGGGAA
mGBP5 rev	GCG TCA AAA ACA AAG CAT TTC	
mGBP6 fwd	ATA TTT CAA CAT TTT TTG TTC CTT GT	AGTCATGTTCAATCTT CTCCCTCTTGTC
mGBP6 rev	TGG AAG ACT TCA CTT GCC TTC AC	

Tabelle 2.8: Primer und Sonden Sequenzen für Realtime RT-PCR Versuche

Primername	Sequenz (5'→3')
IRG1 RT fwd	GGG TTC GGT GCC TTC TAT GC
IRG1 RT rev	TGG CGG GTT GTC AGG AGG AT

Tabelle 2.9: Primer für semiquantitative RT-PCR von IRG1

Die für mGBP6 spezifische Sonde wurde von der Firma TIB MolBiol, Berlin, entworfen und synthetisiert. Alle weiteren Sonden sind Teil der Universal ProbeLibrary der Firma Roche, Mannheim.

2.7 Plasmidvektoren

2.7.1 Ausgangsvektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pCR II-TOPO	Vektoren zur direkten Klonierung von PCR Produkten Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ α - Fragment	Invitrogen
pDsRed-monomer-N1	Expressionsvektor für C-terminale DsRed-Fusions-proteine, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pDsRed-monomer-C1	Expressionsvektor für N-terminale EGFP-Fusions-proteine, CMV-Promotor, Kan ^R , Neo ^R	Clontech
pEasyFlox	Klonierungsvektor zur Herstellung von Targeting Konstrukten mit loxP flankierten Homologiebereichen, TK-Kassette, Amp ^R , Neo ^R	Invitrogen
pBluescript II KS-	Klonierungsvektor, Amp ^R , Neo ^R	Invitrogen

Tabelle 2.10: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren

2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
IRG1-DsRed	pDsRed-monomer	IRG1 ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP6-DsRed	pDsRed-monomer	mGBP6 ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP6-R46A-DsRed	pDsRed-monomer	mGBP6 R46A ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP6-RT73A-DsRed	pDsRed-monomer	mGBP6 T73A ORF	für subzelluläre Lokalisation
mGBP6-D182N-DsRed	pDsRed-monomer	mGBP6 D182N ORF	für subzelluläre Lokalisation
IRG1-TV1	pEasyFlox	s. Abb. 3.27	IRG1 Targeting Vektor 1
IRG1-TV2	pBluescript II KS-	s. Abb. 3.28	IRG1 Targeting Vektor 2

Tabelle 2.11: Hergestellte Plasmide

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten

Zellkultur von ES/EF Zellen

Embryonale Stammzellen (E14) wurden auf mit Mitomycin C (10µg/ml) vorbehandelten EF-Zellen (2 h, 37°C) kokultiviert. Zusätzlich wurde den ES-Zell Kulturen LIF-Überstand (1000 U/ml Endkonzentration) zugegeben, um das Ausdifferenzieren zu verhindern.

Elektroporation von ES-Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit dem IRG1 Targeting Vektor 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: 300 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 die Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultivieren
- 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.

2.8.2 Kultivierung von Makrophagenzelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C , 8% CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. ANA-1 (Cox et al., 1989) und 264.7 RAW (Raschke et al., 1978) Makrophagen wurden täglich mit Medium von der Kulturschale abgespült und dann verdünnt umgesetzt.

2.8.3 Transfektion von 264.7 RAW Makrophagen durch Elektroporation

Die transiente Transfektion der 264.7 RAW Makrophagen erfolgte durch Elektroporation.

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-DNA zur Zellsuspension dazu pipettieren
- Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführen
- Elektroporation mit 280 V und 975 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

2.8.4 In vitro Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die transfizierten Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und im Brutschrank ÜN inkubiert. Nach ca. 24h wurden die Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ (100U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 16h wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 (Zellen:Bakterien) mit EGFP-transfizierten Listerien für 30min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, 10min im Dunkeln mit 4% PFA/PBS Lösung fixiert und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mit einer 1:2500 in PBS verdünnten DAPI Lösung für 3 min angefärbt und erneut 2 mal gewaschen. Die Glasplättchen wurden schließlich auf Objektträger geklebt und mikroskopiert.

2.8.5 In vitro Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Die transfizierten Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und im Brutschrank ÜN inkubiert. Nach ca. 24h wurden die Zellen mit IFN γ (100U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 16h wurden die Zellen im Verhältnis 1:50 (Zellen:Parasiten) mit *T. gondii* (Stamm ME49) für 2h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, 10min im Dunkeln mit 4% PFA/PBS Lösung fixiert und zwei Mal mit PBS gewaschen. Die intrazellulären Parasiten wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt (s. 2.8.6).

2.8.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Durchführung:

Permeabilisierung

Zellen in 0,02% Saponin/PBS Lösung bei Raumtemperatur langsam schwenken.

Blocken

Zellen in 0,002% Saponin/PBS + 2% Ziegen Serum 1h bei Raumtemperatur langsam schwenken.

Primärantikörper

Zellen in 0,0002% Saponin/PBS + 0,2% Ziegen Serum + Primärantikörper (1:500) 1h bei Raumtemperatur langsam schwenken.

Waschen

Zellen drei Mal 5min mit 0,0002% Saponin/PBS waschen

Sekundärantikörper

Zellen in 0,0002% Saponin/PBS + 0,2% Ziegen Serum + Sekundärantikörper (1:200) 45min bei Raumtemperatur im Dunkeln langsam schwenken.

Waschen

Zellen zwei Mal 5min mit 0,0002% Saponin/PBS waschen

Kernfärbung (optional)

Zellen in DAPI Lösung (1:2500 in PBS verdünnt) 3 min bei Raumtemperatur im Dunkeln schwenken.

Ein bis zwei Mal 5min mit PBS waschen.

Kleben

Glasplättchen mit Fluoromount G auf Objektträger kleben.

2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA Isolierung erfolgte mit Hilfe von Qiagen Kits. Je nach benötigter DNA-Menge wurden Mini-, Midi- oder Maxi-Säulchen verwendet. Bei der Isolierung von Plasmid-DNA zur Transfektion der Zelllinien sollte eine Kontamination mit Endotoxinen vermieden werden. Zu diesen Zwecken wurde das Endofree Maxi Kit von Qiagen verwendet.

Die DNA Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.9.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus 96-well Platten

Für genomische Southernblot Analyse wurde aus selektierten ES-Zellklonen die chromosomale DNA isoliert

Durchführung:

- Pro well 20 µl Lysepuffer mit 0,4 mg / ml Proteinase K hinzufügen.
- Über Nacht bei 56°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Kurz abzentrifugieren.
- Auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Pro well 100 µl 100% Ethanol hinzufügen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 2x waschen mit 70% Ethanol, anschließend trocknen und für genomischen Southern Screen verwenden.

2.9.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus Zellpellets

Durchführung:

- 5×10^7 Zellen in Verdauung aufnehmen (500 µl TNE; 50 µl 10% SDS; 7,5 µl Proteinase K 10 mg/ml; 25 µl Pronase E 10 mg/ml).
- Eine Stunde bei 37°C inkubieren.
- Über Nacht bei 56°C im Schüttler inkubieren.
- Zwei Minuten bei 14000 UpM zentrifugieren.
- Überstand in frisches Gefäß überführen
- 500 µl Phenol/Chloroform hinzufügen und vortexen.
- 5 min bei 14000 UpM zentrifugieren.
- Wässrige Phase mit abgeschnittener Pipettenspitze abnehmen und in frisches Gefäß überführen.
- 950 µl Ethanol absolut (-20°C) hinzufügen
- DNA Faden ausspinnen
- In 70% Ethanol (-20°C) tauchen und in 100-500 µl TE lösen über Nacht bei 4°C.

2.9.4 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode, die zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet wird. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nucleinsäuren 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 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
- DNA-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 DNA eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei UV-Bestrahlung (Transilluminator, 280 nm), und das Bandenmuster kann photographisch dokumentiert werden

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurden mehrere Taschen der Kämmen abgeklebt, um größere DNA-Mengen auftragen zu können. Anschließend wurde die Gelelektrophorese (s.o.) durchgeführt. Die gewünschten Banden im Gel wurden unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Die DNA wurde schließlich aus dem Gelstück mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gewonnen. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

Bestimmung von Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNA-Moleküle bestimmt werden und deren Konzentration abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der 1 kb-Leiter von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Fragmentgrößen (bp):

12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 154/134, 75

2.9.5 Restriktionsverdau von DNA

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

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

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

2.9.6 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Selbstligation des Vektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden und um eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNA-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 DNA abgetrennt.

2.9.7 Ligation von DNA-Molekülen

T4-Ligase

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

Durchführung:

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

TOPO TA Cloning® Kit

Bei Klonierungen von PCR-Produkten in den Vektor pCR II-TOPO (Kapitel 2.7.1) wird die Eigenschaft thermostabiler DNA-Polymerasen, an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenutzt. PCR-Produkte können so direkt in den Vektor kloniert werden, da sie die kompatiblen Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzen. Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.9.8 Transformation von *E. coli* Bakterien

CaCl₂ behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert werden (Cohen et al., 1972). Hierfür wurden die Bakterienstämme DH5 α (Hanahan, 1983) oder Top10 (Invitrogen) verwendet.

Durchführung:

- 100 μ l kompetente Bakterien (Lagerung bei -80°C) auf Eis auftauen lassen
- Ligationsansatz bzw. etwa 100 ng zirkuläre doppelsträngige DNA 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 plasmidkodierten Antibiotikumresistenz zu ermöglichen
- 100 μ l und 200 μ l ausplattieren und ÜN bei 37°C unter Selektionsdruck wachsen lassen

2.9.9 Southernblot Analyse

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

Alkalischer DNA-Transfer auf Nylonmembranen

Nach dem Restriktionsverdau der DNA mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen werden die DNA-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 μ g chromosomaler DNA
- DNA-Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel mit 0,2 μ g/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 H_2O_{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 DNA-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert.

- die Membran kurz in 2 x SSC waschen, um Gelreste zu entfernen
- DNA 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 DNA den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radio-aktiv markierten Nukleotiden zu unmarkierten Nukleotiden wird die neusynthetisierte DNA radioaktiv (Feinberg und Vogelstein, 1984). Verwendet wurde der "readiprime"-Kit (Amersham), mit dem bis zu 25 ng DNA unter Verwendung von 1 MBq ^{32}P -dCTP markiert werden können. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide werden mit Microspin S-200 Säulchen (Amersham) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNA/DNA Hybridisierung

Die DNA/DNA Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären nachzuweisenden chromosomalen DNA-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen doppelsträngigen DNA/DNA-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybrid-Moleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sichtbar gemacht werden.

Durchführung:

- Membran mind 1h bei 60°C in 10 ml frischer Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech) prähybridisieren
- markierte, hitzedenaturierte Sonde zugeben
- ÜN bei 60°C hybridisieren
- Waschen mit Lösung I: 3 mal 30 min bei RT
- Waschen mit Lösung II: 1 mal 15 min bei 50°C
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (FujiFilm) detektieren

2.9.10 Amplifikation von DNA-Molekülen durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um so extrem viele Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren (Mullis und Faloona, 1987). Die doppelsträngige DNA wird durch Hitze denaturiert. Anschließend können durch Abkühlung spezifische Primer an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Fragments hybridisieren. Durch Erhitzen auf 72°C kann nun die thermo-stabile Polymerase den Komplementärstrang synthetisieren. Eine zyklische Wiederholung der Temperaturänderungen führt zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration des gesuchten Fragments.

Reaktionsansatz	ca. 100 ng	DNA
	1 µl	Primer 1 (100 µM)
	1 µl	Primer 2 (100 µM)
	5 µl	10x Puffer
	10 µl	dNTP
	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 folgenden Bedingungen:
 1. DNA Denaturierung 5 min bei 95°C
 2. DNA Denaturierung 1 min bei 95°C
 3. Primerhybridisierung 30 sec bei 55-65°C
 4. Primerverlängerung 1 min 30 sec bei 72°C
 5. Lagerung bis zur Weiterverarbeitung max 24h bei 4°C

Die Schritte 2 bis 4 werden zyklisch 30 mal wiederholt.

2.9.11 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zellen

Zur Isolierung der RNA wurde das Trireagent der Firma Sigma (Taufkirchen) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidiniumthiocyanat Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.9.12 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

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

Durchführung:

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

2.9.13 cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA

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

Durchführung:

- Ansatz: 1 µg RNA in 10 µl DEPC-H₂O
1 µl oligo-dT-Primer 10 µM (Invitrogen)
- 2 Minuten bei 70°C inkubieren, anschließend auf Eis abkühlen.
- Hinzufügen: 1 µl RNaseOut
4 µl 5x First-Strand Buffer (aus M-MLV RT, Invitrogen)
1 µl 0,1 M DTT (aus M-MLV RT, Invitrogen)
1 µl dNTP Mix 10 mM
2 µl M-MLV RT (Invitrogen)

Mischen, abzentrifugieren. Eine Stunde bei 37°C inkubieren, danach abzentrifugieren und das Enzym 5 min bei 95°C inaktivieren.

80 µl H₂O hinzufügen.

Einige cDNA Proben lagen bereits vor und wurden von den folgenden Personen zur Verfügung gestellt:

cDNA-Proben aus C57BL/6 Mikroglia u cDNA Proben aus C57BL/6 Knochenmark-dendritischen Zellen: Dipl. Biol. Anne Mausberg, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

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

2.9.14 Realtime RT-PCR

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

Ansatz: 12,5 µl qPCR Mastermix – No ROX (Eurogentec)
 6,4 µl H₂O
 0,3 µl Primer 1
 0,3 µl Primer 2
 0,5 µl Sonde
 5 µl 1:5 verdünnte cDNA

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

- | | |
|---|------------------|
| 1. DNA Denaturierung | 95°C 7 Minuten |
| 2. DNA Denaturierung | 94°C 20 Sekunden |
| 3. Primerhybridisierung u.
-Verlängerung | 60°C 1 Minute |
| 4. Lagerung | 4°C unendlich |

Schritte 2 bis 3 werden zyklisch 40 Mal wiederholt

2.9.15 Affymetrix Proben Markierung und Array Hybridisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die GeneChip® Probe Array Technologie der Firma Affymetrix verwendet. GeneChip® Probe Arrays werden durch eine Kombination aus photolithographischen und chemischen Verfahren hergestellt. Auf jedem Array werden hunderttausende verschiedener Oligonukleotid-Sonden direkt synthetisiert. Jedes Oligonukleotid

ist in einem spezifischen Bereich des Arrays lokalisiert. Dieser Bereich wird „Probe cell“ genannt. In jeder „Probe cell“ befinden sich mehrere Millionen Kopien des entsprechenden Oligonukleotids oder Sonde.

Jedes Oligonukleotid ist komplementär zu einem bestimmten, meist 3' gelegenen, Sequenzabschnitt einer cDNA oder EST Sequenz, welche in der UniGene Datenbank abgelegt ist. Für jede dieser Sequenzen werden pro Array mehrere spezifische Oligonukleotid Sonden synthetisiert. Im Falle der hier verwendeten MG-U74v2 Arrays sind pro muriner cDNA oder EST Sequenz jeweils 16 spezifische Sonden vorhanden, und zusätzlich 16 entsprechende Sonden, die sich jedoch in einer Base unterscheiden. Man bezeichnet diese jeweils als „perfect match“ und „mismatch“ Sonden.

Die zu untersuchende RNA Probe wird vor Hybridisierung zunächst in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Schließlich wird in einer *in vitro* Transkriptions- Reaktion die cDNA erneut in RNA umgeschrieben, jedoch unter Verwendung Biotin-markierter Nukleotide. Die so entstehende biotinylierte cRNA stellt ein exaktes Abbild der ursprünglichen Transkriptverhältnisse dar, da bei jeder Reaktion eine lineare Amplifikation der Nukleinsäuren stattfindet.

Nach Hybridisierung der fragmentierten cRNA mit dem Array, werden die gebundenen Proben mit einem Streptavidin Phycoerythrin Konjugat fluoreszent gefärbt. Der Array wird schließlich mittels eines GeneArray® Scanners der Firma Agilent durch einen Laser bei 488 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 570 nm abgetastet. Dadurch entsteht für jede „Probe cell“ ein Fluoreszenzsignal, welches der Menge an gebundenem Transkript entspricht.

Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in der „perfect match“ und entsprechenden „mismatch“ Proben lassen sich Aussagen zur Spezifität des gemessenen Signals ableiten. Je nach verwendetem Auswerteverfahren werden mehrere oder alle für eine cDNA oder EST Sequenz vorhandenen „Probe cells“ herangezogen um ein Expressionssignal zu ermitteln. Aus dem Vergleich unterschiedlicher Experimentalbedingungen lassen sich nun Veränderungen in der Expressionsstärke der einzelnen Transkripte quantitativ messen.

Durchführung:

Erststrang-cDNA Synthese

Ansatz: 5-20 µg RNA in ≤ 9 µl
1 µl oligo-dT-T7 Primer 100 µM, PAGE aufgereinigt
(GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-T24-VN)
DEPC-H₂O ad 10 µl

10 Minuten bei 70°C inkubieren, anschließend auf Eis abkühlen.

Hinzufügen: 1 µl RNaseOut
4 µl 5x First-Strand Buffer (aus Superscript II RT, Invitrogen)
2 µl 0,1 M DTT (aus Superscript II RT, Invitrogen)
1 µl dNTP Mix 10 mM

Mischen, abzentrifugieren. Zwei Minuten bei 42°C inkubieren.

Hinzufügen: 2 µl Superscript II RT (Invitrogen)

Mischen, abzentrifugieren. Eine Stunde bei 42°C inkubieren, danach abzentrifugieren und auf Eis abkühlen.

Zweitstrang-cDNA Synthese

Hinzufügen: 91 µl DEPC-H₂O
30 µl 5x Second-Strand Buffer (aus Superscript II RT, Invitrogen)
3 µl dNTP Mix 10 mM
1 µl *E. coli* DNA Ligase, 10 U/µl
4 µl *E. coli* DNA Polymerase I, 10 U/µl
1 µl RNase H, 2U/µl

Mischen, abzentrifugieren. Zwei Stunden bei 16°C inkubieren.

Hinzufügen: 2 µl T4 DNA Polymerase, 5 U/µl
Fünf Minuten bei 16°C inkubieren.

Hinzufügen: 1,5 µl RNase, DNase frei
30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Hinzufügen: 2,5 µl Proteinase K, 10 mg/ml
30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Auf 300 µl mit DEPC-H₂O auffüllen. Dreimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahieren.

Eine Microcon-YM50 Säule (Millipore) mit 200 µl DEPC-H₂O beladen, dann die wässrige Phase aus der Extraktion hinzufügen. Acht Minuten bei 7000xg bei 25°C zentrifugieren, Durchlauf verwerfen. Die Säule mit 500 µl DEPC-H₂O waschen, acht Minuten bei 7000xg zentrifugieren, Durchlauf verwerfen. Säule umgekehrt in ein frisches Eppi setzen und für fünf Minuten bei 1000xg zentrifugieren.

In einer Vakuum Zentrifuge auf 10 bis 15 µl aufkonzentrieren.

Proben Markierung durch in-vitro Transkription

Hierfür wurde das Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix)
Zur cDNA hinzufügen: (bei Raumtemperatur, nicht auf Eis!)

3 µl 10x Reaction Buffer
3 µl 10x Biotin-Labeled Ribonucleotides
3 µl 10x DTT
3 µl RNase Inhibitor Mix
1,5 µl 20x RNA Polymerase
mit DEPC-H₂O auf 30 µl auffüllen

Vier Stunden bei 37°C in einem Inkubator oder PCR-Maschine inkubieren.

cRNA-Aufreinigung

Hierfür wurde das Qiagen RNeasy Kit verwendet.

Hinzufügen: 80 µl DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl
350 µl RLT Puffer
250 µl Ethanol abs.

Mischen, nicht abzentrifugieren. Die Probe auf eine RNeasy Säule aufbringen und in ein 2 ml Sammelröhrchen setzen. 15 Sekunden abzentrifugieren.

Die Probe erneut auf die gleiche Säule geben und zentrifugieren. Durchlauf verwerfen. Sammelröhrchen durch ein neues ersetzen.

Hinzufügen: 500 µl RPE Puffer

15 Sekunden abzentrifugieren. Durchlauf verwerfen. Sammelröhrchen wiederverwenden.

Zwei Minuten abzentrifugieren um die RNeasy Membran zu trocknen.

Säule in ein 1,5 ml Eppi überführen.

Hinzufügen: 30 µl Elution Puffer

Eine Minute bei Raumtemperatur inkubieren, eine Minute abzentrifugieren.

Elution in gleiches Sammelröhrchen wiederholen.

OD_{260/280} messen; RNA Konzentration sollte etwa 1 µg/µl sein. 1 µl der Probe auf ein denaturierendes Formaldehyd Gel überprüfen; RNA sollte etwa zwischen 0,2 kB und 4 kB einen Schmier zeigen.

Fragmentierung

Hinzufügen: 15 µg cRNA in 16 µl DEPC-H₂O

4 µl 5x Fragmentierungs Puffer

35 Minuten bei 95°C in einer PCR Maschine mit Deckelheizung inkubieren, auf Eis abkühlen.

Array Hybridisierung

15 µg fragmentierter cRNA wurden pro Array eingesetzt. Die Hybridisierung wurde anhand des von der Firma Affymetrix zur Verfügung gestellten Handbuchs durchgeführt (Eukaryotic Target Hybridization).

3 Ergebnisse

3.1 Microarray Experimente

3.1.1 Versuchsaufbau

Zu Beginn der Arbeit sollte ein Transkriptionsprofil von murinen Makrophagen erstellt werden, welche mit den proinflammatorischen Zytokinen $\text{IFN}\gamma$ und TNF stimuliert wurden. Hierzu wurde die murine Makrophagenzelllinie ANA-1 verwendet, welche aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen etabliert wurde, die mit einem v-myc/v-raf exprimierenden Retrovirus J2 immortalisiert wurden (Cox et al., 1989). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden in getrennten Ansätzen mit $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml), TNF (10 ng/ml) und $\text{IFN}\gamma$ und TNF simultan stimuliert. Dieser Versuchsansatz wurde insgesamt dreimal in unabhängigen Ansätzen wiederholt. Als Vergleichskontrollen dienten bei jedem Versuchsansatz unstimulierte Zellen, die ansonsten aber identisch behandelt wurden. Anschließend wurde aus den Zellen die RNA isoliert. Die Qualität der RNA wurde geprüft, indem jeweils 1 μg RNA auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurde (s. Abschnitt 2.9.12) und die Qualität der ribosomalen 18S und 28S RNA Banden optisch untersucht wurde. Degradierete RNA zeichnet sich durch verschmierte Bandenmuster auf dem Gel aus, was aber bei keiner der verwendeten Proben der Fall war (nicht gezeigt).

Wie in Abschnitt 2.9.15 beschrieben, wurden die RNA-Proben mit Biotin markiert und zur Hybridisierung von MG-U74Av2, MG-U74Bv2 und MG-U74Cv2 Arrays der Firma Affymetrix verwendet. Diese Arrays repräsentieren etwa 36.000 murine Gensequenzen und EST Cluster aus der UniGene Datenbank (Build 74). Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren lediglich etwa 6.000 Sequenzen als Gene annotiert, die sich ausschließlich auf dem MG-U74Av2 Array befanden. Die Firma Affymetrix bietet allerdings in regelmäßigen Abständen aktualisierte Neuauflagen der zugehörigen Datenbanken. Die in dieser Arbeit gezeigten Sequenzannotationen stellen den Standpunkt bei der Erstellung der Promotionsarbeit dar.

3.1.2 Verwendete Auswerteverfahren

Die hohe Menge an entstehenden Daten bei Microarray Experimenten, insbesondere bei Verwendung von Hochdichte- Oligonukleotidarrays der Firma Affymetrix, stellen außerordentliche Anforderungen an die Analyse und die Auswertung der Ergebnisse. Die Detektion von Expressionssignalen erfolgt anhand von Fluoreszenzintensitäten, die wiederum von der Hybridisierungseffizienz der Probe abhängen. Zusätzlich ermöglicht das Herstellungsverfahren der GeneChip Arrays der Firma Affymetrix keine vollständig vergleichbaren Produktgüten. Ebenfalls kann es zu Unregelmäßigkeiten bei dem teil-automatisierten Färbe- und Waschprozess der Arrays kommen, was sich in unterschiedlicher Ausprägung der Hintergrundfluoreszenz

äußert. Diese technischen Faktoren, gepaart mit kaum vermeidbaren Pipettierungenauigkeiten führen dazu, dass die einzelnen Arrays einer Versuchsreihe Abweichungen ihrer Fluoreszenzsignale aufzeigen, die über die zu erwartenden biologischen Unterschiede hinausgehen. Somit ist es zwingend erforderlich, Arrays aus einer Versuchsreihe gegeneinander zu normalisieren um sinnvolle Vergleichsanalysen durchführen zu können. Untersuchungen haben gezeigt, dass unterschiedliche theoretische Ansätze, die zur Normalisierung verwendet werden können, durchaus großen Einfluß auf die Detektion differentiell exprimierter Gene bei darauf folgenden Auswertungen haben (Hoffmann et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Normalisierung der Fluoreszenzintensitäten das Programm dchip verwendet, welches auf das „Invariant Feature“ Verfahren basiert (Li und Wong, 2001; Li und Hung, 2001). Dieses Verfahren beruht auf der Annahme, dass es innerhalb einer Versuchsreihe Gene gibt, die sich in ihren Expressionseigenschaften kaum verändern. Dieses sogenannte „invariant set“ muss für jedes Experiment neu ermittelt werden und dient als Referenz für die weitere Normalisierung. Das dchip Programm wurde außerdem verwendet, um aus den normalisierten Rohdaten für jedes abgefragte Transkript absolute Signalwerte zu erhalten, welche sich aus den 32 für jede Sequenz vorhandenen Messpunkten ergeben. Hierzu wurde das sogenannte „Model-based expression value“ Verfahren angewendet (Li und Wong, 2001; Li und Hung, 2001), welches gegenüber dem meist standardmäßig benutztem „average difference“ Verfahren (Lockhart et al., 1996; Wodicka et al., 1997) den Vorteil besitzt, niedrig exprimierte Gene sensitiver zu detektieren (Hoffmann et al., 2002).

Verschiedene Verfahren wurden entwickelt, um bei vergleichenden Expressionsanalysen differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, welche insbesondere bei Replikatexperimenten durch statistische Signifikanz untermauert werden können. Der in vielen biologischen Auswertungen verwendete Student's *t*- Test ist bei Microarrayanalysen nur dann hilfreich, wenn zwei Experimentalbedingungen miteinander verglichen werden. Bei sogenannten „multiclass“ Experimenten, bei denen drei oder mehrere Versuchsbedingungen verglichen werden, „versagt“ es, da mit jedem paarweisen Vergleich die Typ-I-Fehlerrate in Abhängigkeit zur Anzahl der Experimentalbedingungen exponentiell steigt, was zu einem verringertem Konfidenzlevel der Ergebnisse führt (Zar, 1999). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das „significance analysis of microarrays“ (SAM) Verfahren angewendet (Tusher et al., 2001), welches, im Vergleich mit klassischen statistischen multiclass Verfahren wie parametrische und nicht-parametrische ANOVA Verfahren, zu spezifischeren Ergebnissen zu führen scheint (Hoffmann et al., 2002).

3.1.3 Ergebnisse

Durch Verwendung oben erwähnter Auswerteverfahren konnten bei dem in 3.1.1 beschriebenen Versuchsansatz 234 Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden (s. Anhang A). Diese Zahl wurde mit einer sogenannten „false discovery rate“ (FDR) von 6% ermittelt. Die FDR ist eine Größe des SAM-Verfahrens, welche Auskunft über die Konfidenz der ermittelten Anzahl differentiell exprimierter Gene liefert. Eine FDR von 6% besagt, dass 6% der ermittelten Gene potentiell als falsch positiv detektiert wurden, was in diesem Fall einer Anzahl von etwa 14 Genen entsprechen würde.

Von allen differentiell exprimierten Genen waren 102 Transkripte durch IFN γ in ihrer Expression mindestens zweifach verändert, 18 Transkripte durch TNF und 124 Transkripte wurden durch IFN γ und TNF zusammen entweder hoch- oder runterreguliert. Da nur sieben der durch TNF regulierten Transkripte auch durch IFN γ induzierbar waren, müssen mindestens elf Transkripte ausschließlich durch synergistische Effekte bei simultaner IFN γ /TNF Stimulation induziert worden sein. Allerdings zeigten viele Transkripte deutlich größere Veränderungen bei IFN γ /TNF Stimulation als allein die Summe der Veränderungen durch die einzelnen Stimuli erwarten lassen würde, so dass solche synergistischen Effekte bei einer deutlich größeren Zahl von Genen zu erwarten ist.

Um bessere Einblicke auf das Expressionsverhalten der detektierten differentiell exprimierten Gene bezüglich der unterschiedlichen Experimentalbedingungen zu erhalten, werden üblicherweise Cluster Analysen durchgeführt (Jain und Dubes, 1988). Cluster Analysen ermöglichen es, Gene anhand ihrer Expressionsmuster über die verschiedenen untersuchten Bedingungen zu gruppieren, häufig mit dem Ziel gemeinsame Eigenschaften der Gene zu erkennen und sie anhand dieser Eigenschaften zu klassifizieren (Wen et al., 1998; Eisen et al., 1998). Häufig benutztes Verfahren in biologischen Systemen ist die hierarchische Cluster Analyse, gelegentlich auch „Eisenplot“ genannt (Eisen et al., 1998).

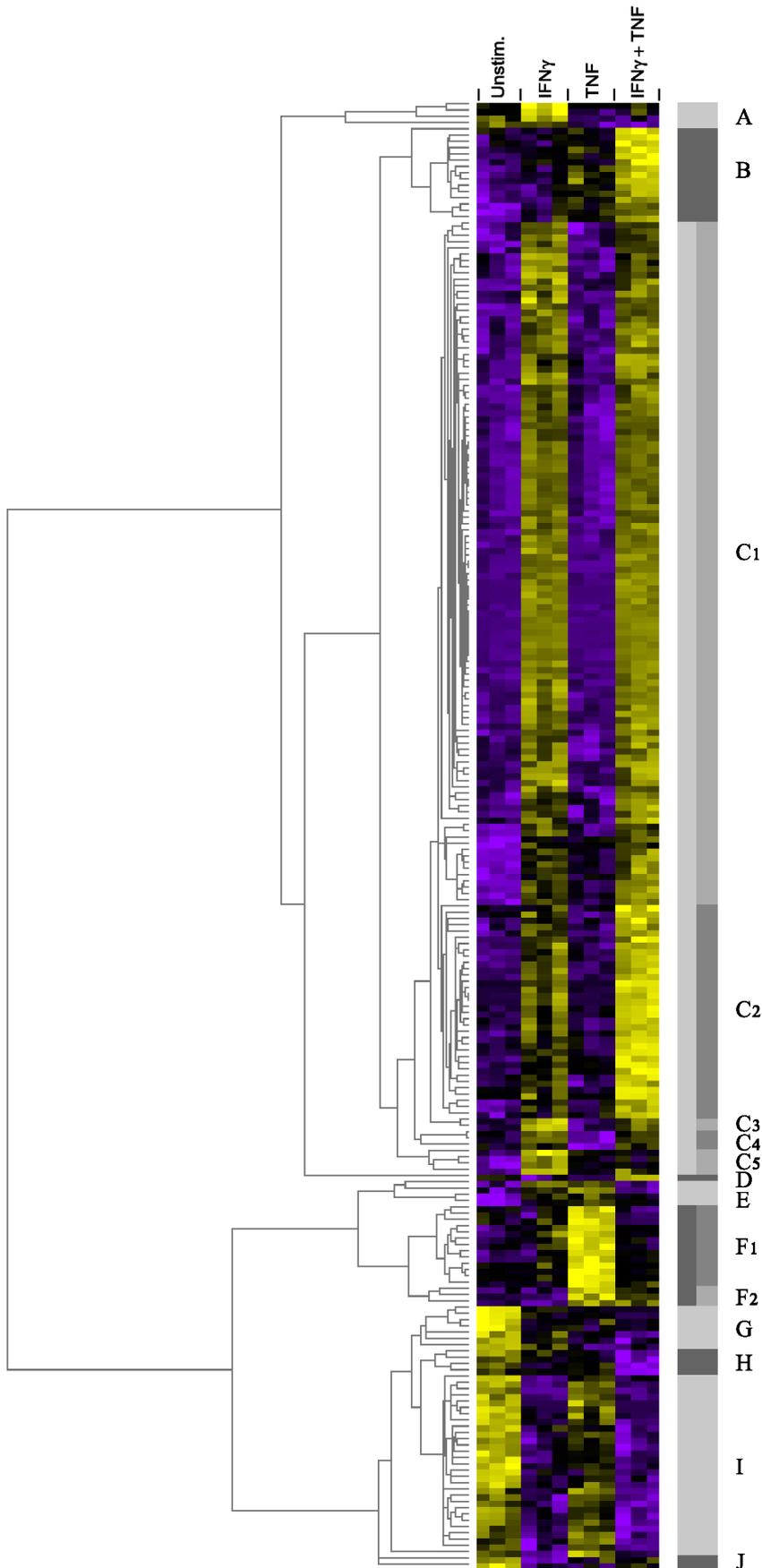


Abb. 3.1 Hierarchische Cluster Analyse von differentiell exprimierten Genen. Blau steht für niedrige Expression, Gelb für hohe Expression. Gene sind horizontal abgebildet, Microarrays sind vertikal abgebildet. Pro Stimulus sind jeweils drei unabhängige Experimente aufgeführt. Die grauen Balken repräsentieren die in dieser Arbeit vorgenommene Einteilung in Expressionscluster.

Dabei werden die Expressionsdaten so sortiert, dass Paare von Genen mit ähnlichem Verhalten zusammengefügt werden, um dann progressiv weitere Gene zum ursprünglichen Paar hinzuzufügen und Gencluster mit offenbar ähnlichen Expressionmustern zu erstellen. Daraus resultiert ein Dendrogramm, dessen Wurzel die gesamte Datenmenge beinhaltet und welches sich an jedem Knoten in jeweils zwei untergeordnete Subcluster verzweigt, soweit bis die unterste Ebene erreicht ist, die aus den einzelnen Genen besteht. Dargestellt wird dies indem die Expressionsstärke eines Gens über die verschiedenen Experimente farblich kodiert wird.

Eine solche hierarchische Cluster Analyse wurde mit den 234 differentiell exprimierten Genen mittels der Software Cluster und Treeview (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) durchgeführt (Abb. 3.1). Die Gene wurden hierbei farblich kodiert, so dass blau für niedrige Expression steht, gelb für hohe Expression und schwarz eine mittlere Expression darstellt. Die Farbintensitäten geben die Expressionsverhältnisse für ein Gen innerhalb der Versuchsreihe wieder, allerdings lassen sich daraus keine quantitativen Unterschiede zwischen den Genen bestimmen.

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, lassen sich mit Hilfe des Dendrogramms und der farblichen Kodierung mehrere Gencluster identifizieren, die gemeinsamen Expressionsmuster entsprechen. Das Gencluster A (Abb. 3.2) besteht aus vier Genen, welche durch $\text{IFN}\gamma$ schwach induzierbar sind, sowohl durch TNF als auch durch gemeinsame Gabe von $\text{IFN}\gamma$ und TNF allerdings entweder unverändert oder inhibiert wurden.



Abb. 3.2 Cluster A.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Clusters wieder.
Rechts: Annotation der vier regulierten Gene.

Gencluster B (Abb. 3.3) besteht aus 15 Genen, die nur schwach durch TNF induzierbar sind, aber deutlich synergistische Effekte der beiden Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und TNF zusammen aufzeigen, was sich durch deutlich erhöhte Expression äußert. $\text{IFN}\gamma$ allein hat auf dieses Gencluster nur geringen Einfluß.

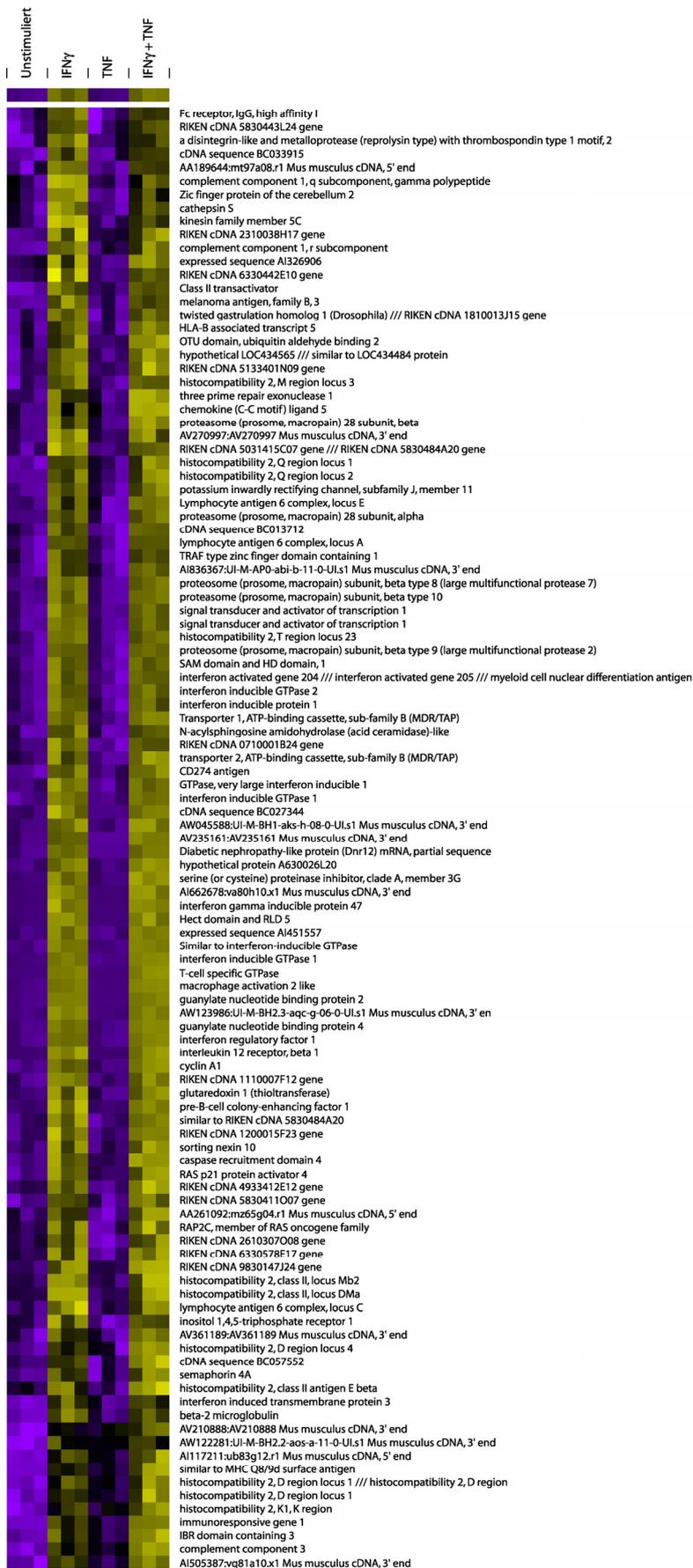


Abb. 3.4 Cluster C1.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Subclusters wieder.
 Rechts: Annotation der 109 regulierten Gene.

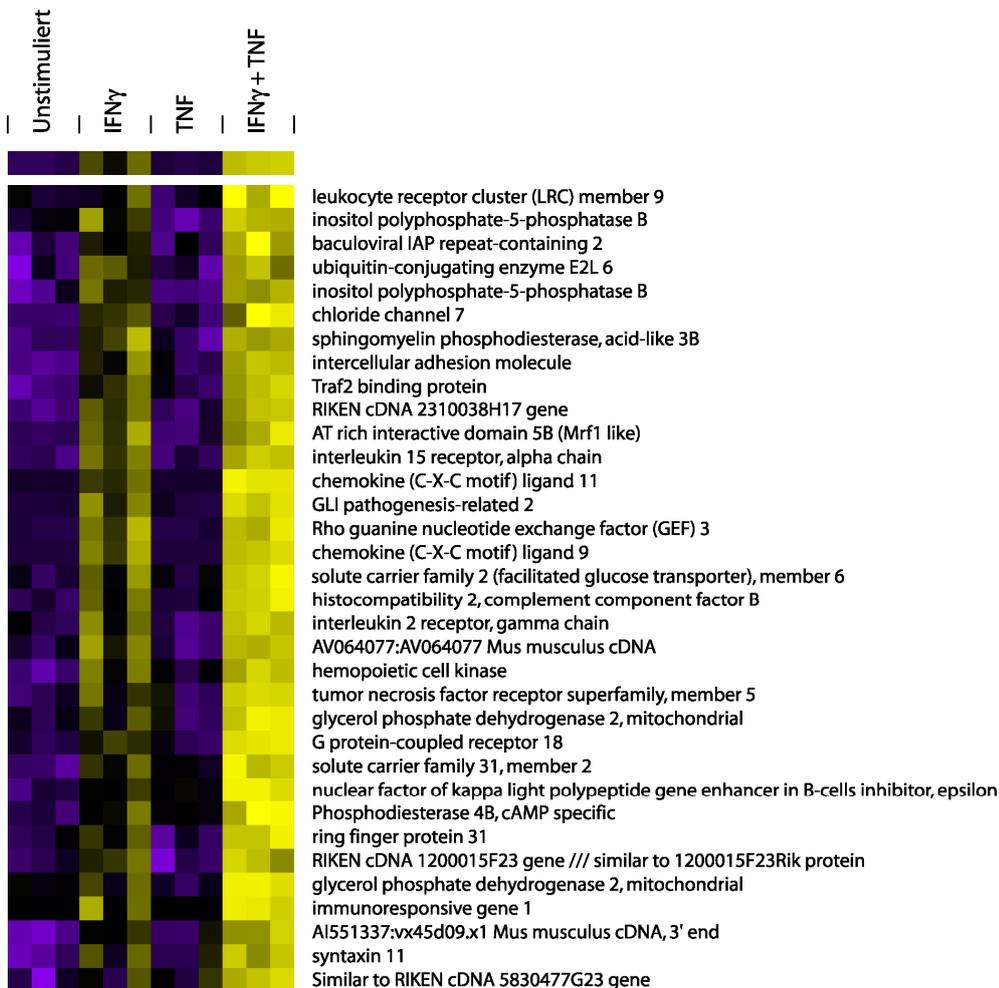


Abb. 3.5 Cluster C2.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Subclusters wieder.

Rechts: Annotation der 34 regulierten Gene

Die Cluster C3 und C4 (Abb. 3.6), jeweils bestehend aus zwei bzw. drei Genen, zeigen ähnliche Expressionseigenschaften wie Cluster A, sind allerdings im Dendrogramm deutlich von diesem entfernt und werden somit hier getrennt behandelt. Gene in C3 und C4 werden offenbar von den jeweiligen Zytokinen entgegengesetzt reguliert, was sich in erhöhter Expression durch IFN γ , Inhibition durch TNF und schwacher Induktion bei Kombination von IFN γ und TNF äußert.

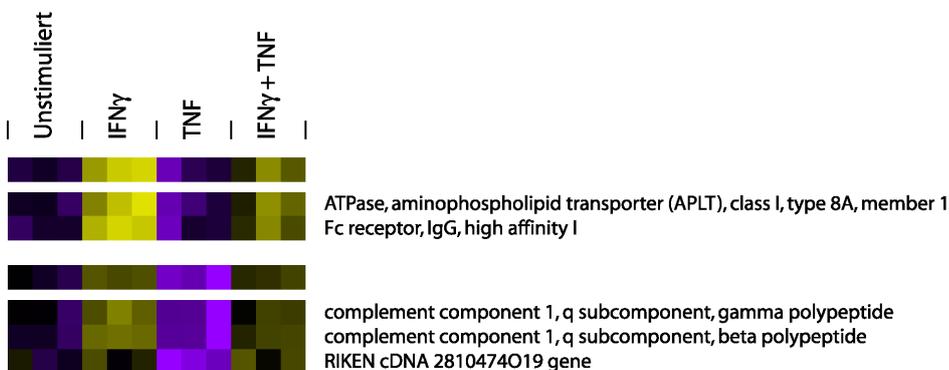


Abb. 3.6 Cluster C3 (oben) und C4 (unten).

Die jeweils erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieser Subcluster wieder.

Rechts: Annotation der regulierten Gene.

Die vier Gene in C5 (Abb. 3.7) hingegen werden sowohl von IFN γ als auch von TNF induziert, letzteres hat allerdings einen deutlich geringeren Effekt auf die Expression. Allerdings scheint die TNF vermittelte Antwort dieser Gene über den von IFN γ vermittelten Effekt zu überwiegen, da die Expression durch IFN γ /TNF auf ähnlichem Niveau wie durch TNF allein zu bleiben scheint.

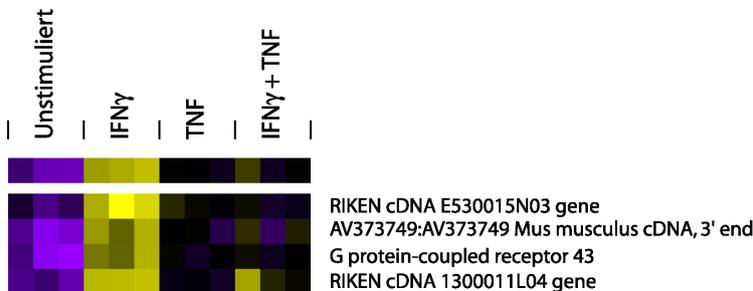


Abb. 3.7 Cluster C5.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Subclusters wieder. Rechts: Annotation der vier regulierten Gene.

Das Gen *lectin, agarose binding, soluble 1* steht als einziges Gen im Cluster D gesondert dar, da dessen Expressionsverhalten von allen anderen Genen abweicht (Abb. 3.8). Dieses Gen wird sowohl von IFN γ als auch TNF geringfügig inhibiert, beide Zytokine zusammen können allerdings die Expression leicht induzieren, verglichen mit unstimulierten Zellen.

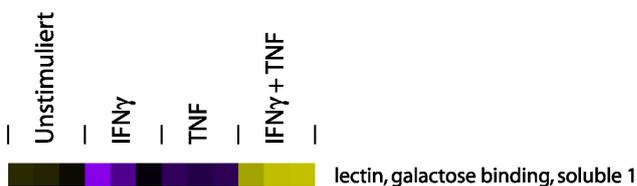


Abb. 3.8 Cluster D.

Rechts: Annotation des regulierten Gens

Diesem Verhalten eher gegenläufig stellt sich das Gencluster E dar mit vier Genen (Abb. 3.9). Diese werden von den einzelnen Zytokinen leicht induziert, beide zusammen führen zu einer Inhibition der Expression.

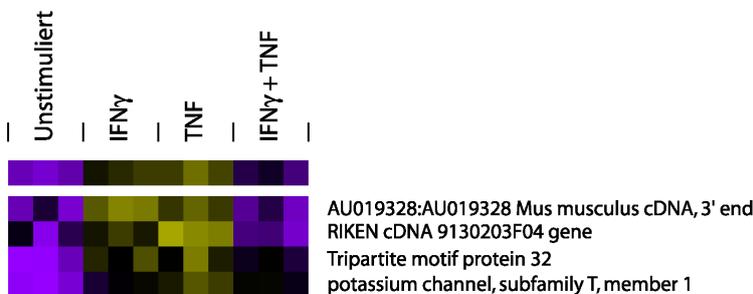


Abb. 3.9 Cluster E.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Clusters wieder. Rechts: Annotation der vier regulierten Gene.

Im Cluster F (Abb. 3.10) befinden sich Gene, welche durch TNF eine deutliche Induktion erfahren. Auch dieses Cluster lässt sich unterteilen in zwei Untergruppen. Das Cluster F1, bestehend aus 13 Genen, wird bei gemeinsamer Gabe von IFN γ und TNF wieder inhibiert, obwohl IFN γ allein hier nur geringe Effekte aufzeigt.

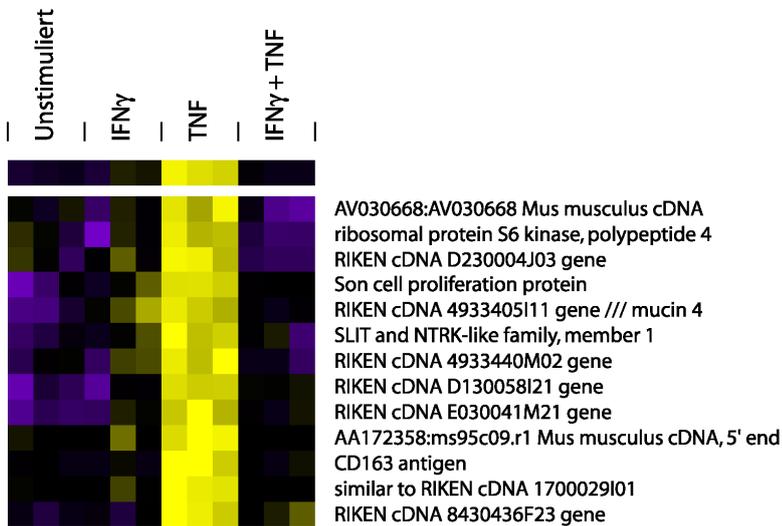


Abb. 3.10 Cluster F1.
Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Subclusters wieder.
Rechts: Annotation der 13 regulierten Gene.

Die drei Gene im F2 Cluster verhalten sich ähnlich zu F1, allerdings bleibt hier der TNF Effekt dominant, was sich in einer nur geringfügig verringerten Induktion bei IFN γ /TNF Stimulation gegenüber TNF äußert (Abb. 3.11).

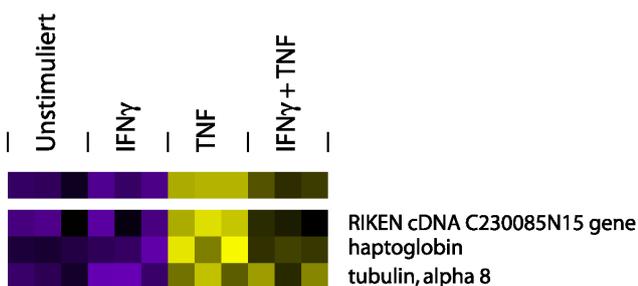


Abb. 3.11 Cluster F2.
Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Subclusters wieder.
Rechts: Annotation der drei regulierten Gene.

Die Cluster G, H und I bestehen aus Genen, auf die die Zytokine IFN γ und TNF vorwiegend inhibierend wirken, und stehen somit in ihren Expressionsmustern deutlich entfernt von den bislang beschriebenen Genclustern. Cluster G (Abb. 3.12) besteht aus sieben Genen, welche sowohl von IFN γ als auch TNF deutlich inhibiert werden. Dieser Effekt wird bei gemeinsamer Gabe der Zytokine nur noch wenig verstärkt.

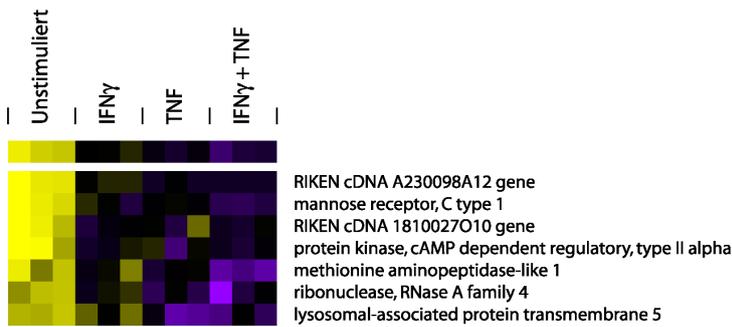


Abb. 3.12 Cluster G.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Clusters wieder.
Rechts: Annotation der sieben regulierten Gene.

Im Cluster H (Abb. 3.13) führen IFN γ und TNF synergistisch zu einer Inhibition der Transkription.

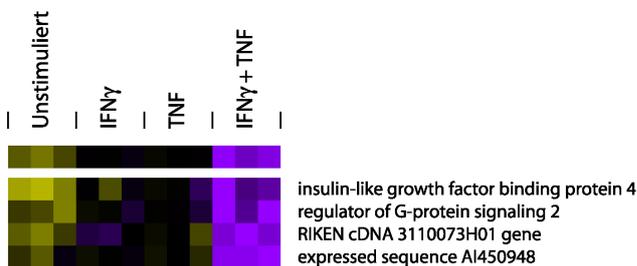


Abb. 3.13 Cluster H.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Clusters wieder.
Rechts: Annotation der vier regulierten Gene.

Die 28 Gene aus Cluster I werden primär von IFN γ inhibiert, mit nur geringem inhibitorischen Effekt von TNF (Abb. 3.14).

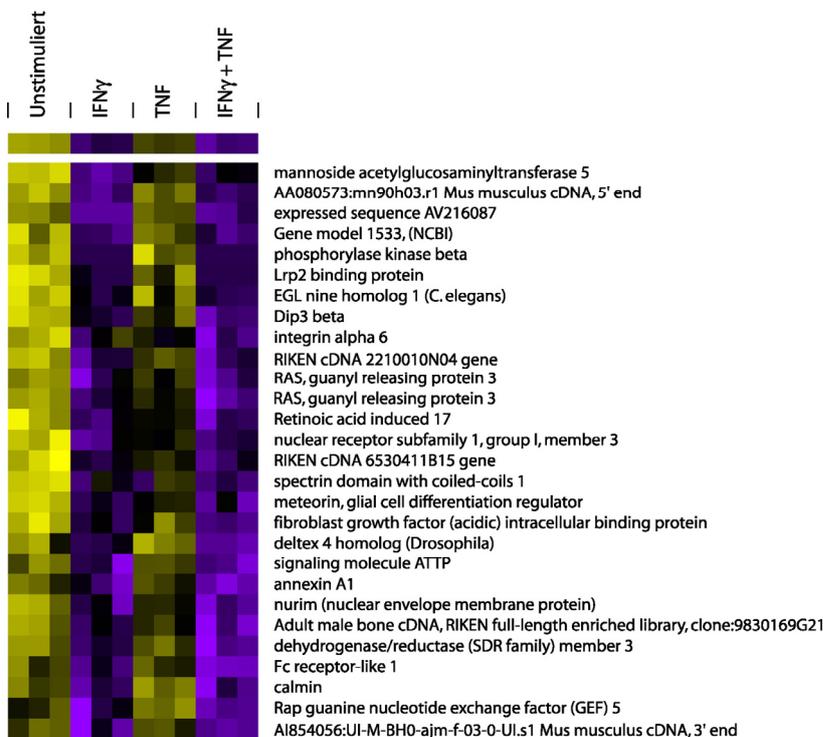


Abb. 3.14 Cluster I.

Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Clusters wieder.
Rechts: Annotation der 28 regulierten Gene.

Die drei Gene in Cluster J (Abb. 3.15) schließlich zeigen ähnliche Effekte wie Cluster I, der IFN γ Effekt scheint allerdings nicht so dominierend zu sein, was sich in nur schwacher Inhibition bei IFN γ /TNF Gabe äußert.

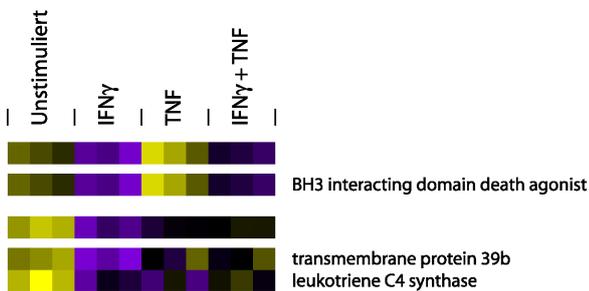


Abb. 3.15 Cluster J.
Die erste Zeile gibt den Mittelwert über die gezeigten Gene dieses Clusters wieder.
Rechts: Annotation der drei regulierten Gene.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erwartungsgemäß die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF weitreichende Veränderungen in der Expression einer Vielzahl von Genen in ANA-1 Makrophagen ausüben. Insbesondere IFN γ zeigt bei den meisten als differentiell exprimiert detektierten Genen regulatorische Funktionen. Bereits frühere Studien haben zu der Schätzung geführt, dass IFN γ die Expression mehrerer hundert Gene steuert (Boehm et al., 1997), was zu der Annahme führt, dass die hier gezeigten Ergebnisse möglicherweise nur ein Teil der tatsächlichen Expressionsveränderungen in den Zellen zum Vorschein gebracht haben, da für diese Experimente Microarrays eingesetzt wurden, die etwa ein Fünftel der Transkripte des Genoms umfassen.

Die hier verwendete hierarchische Cluster Analyse war in der Lage Gene anhand ihres Expressionsverhaltens zu heterogenen Gruppen zu katalogisieren. Hierbei ist bemerkenswert, dass die regulatorischen Effekte der einzelnen Zytokine nicht nur zu einer Überlagerung bei gemeinsamer Stimulation der Zellen mit IFN γ und TNF führen, sondern in Abhängigkeit der untersuchten Gene zu synergistischen oder antagonistischen Effekten führen. Diese Punkte werden in Abschnitt 4.1 ausführlich diskutiert.

3.1.4 Genontologische Untersuchungen

Die vorgenannten Auswerteverfahren zu Microarray Untersuchungen sind hilfreich um die zu behandelnden Datenmengen beträchtlich zu senken und um Gruppen von Genen ausfindig zu machen, die anhand ihres Expressionsverhaltens interessant sind. Sie können aber keinerlei Aussage zur biologischen Bedeutung der erzielten Ergebnisse liefern. Hypothesen aus den Transkriptionsprofilen und daraus resultierenden molekularen und physiologischen Eigenschaften der untersuchten Proben lassen sich erst durch funktionelle Annotation der differentiell exprimierten Gene aufstellen. Eine solche Annotation muss allerdings in einem Systembiologischen Kontext stehen, um Genom weite Zusammenhänge zu beleuchten (Westerhoff und Palsson, 2004). Die Gene Ontology (GO) Datenbank benutzt ein kontrolliertes Vokabular, um Gene mit Attributen zu versehen. Dabei werden Genattribute in drei verschiedene Kategorien vergeben: biologische Prozesse, molekulare Funktion und zelluläre Komponente. Diese Kategorien sind weiterhin in jeweilige „Levels“ untergliedert. Mit zunehmendem Level wird das jeweilige Genattribut spezifischer und verliert somit zunehmend an Abstraktion (Ashburner et al., 2000; Kawai et al., 2001; Hill et al., 2001; Gene Ontology Consortium, 2001).

Das Online Tool FatiGO (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>) ermöglicht es, Über- oder Unterrepräsentationen von GO Attributen innerhalb bestimmter Genlisten im Vergleich zur Gesamtliste aller Gene zu erkennen und diesen anhand von Permutationsanalysen Signifikanzwerte zuzuordnen (Al Shahrour et al., 2004). Eine solche Analyse wurde zunächst für die Gesamtheit aller als differentiell exprimiert detektieren Gene durchgeführt, wobei als Referenz alle übrigen nicht auffällig regulierten Gene aus dem MG-U74v2 Microarray Set herangezogen wurden. FatiGO ist lediglich in der Lage Gene zu testen, welche in der Ensembl Datenbank annotiert sind (Birney et al., 2006) und entsprechende GO Attribute aufweisen. Dies führte dazu, dass aus den 234 in das Programm übermittelten Genen nur noch 96 berücksichtigt werden konnten. Aus den insgesamt 36.533 Referenzgenen gingen 13.436 in die Bewertung ein.

In der Kategorie „biologische Prozesse“ wurden zehn Attribute gegenüber den Referenzgenen als Signifikant über- oder unterrepräsentiert detektiert (Abb. 3.16).

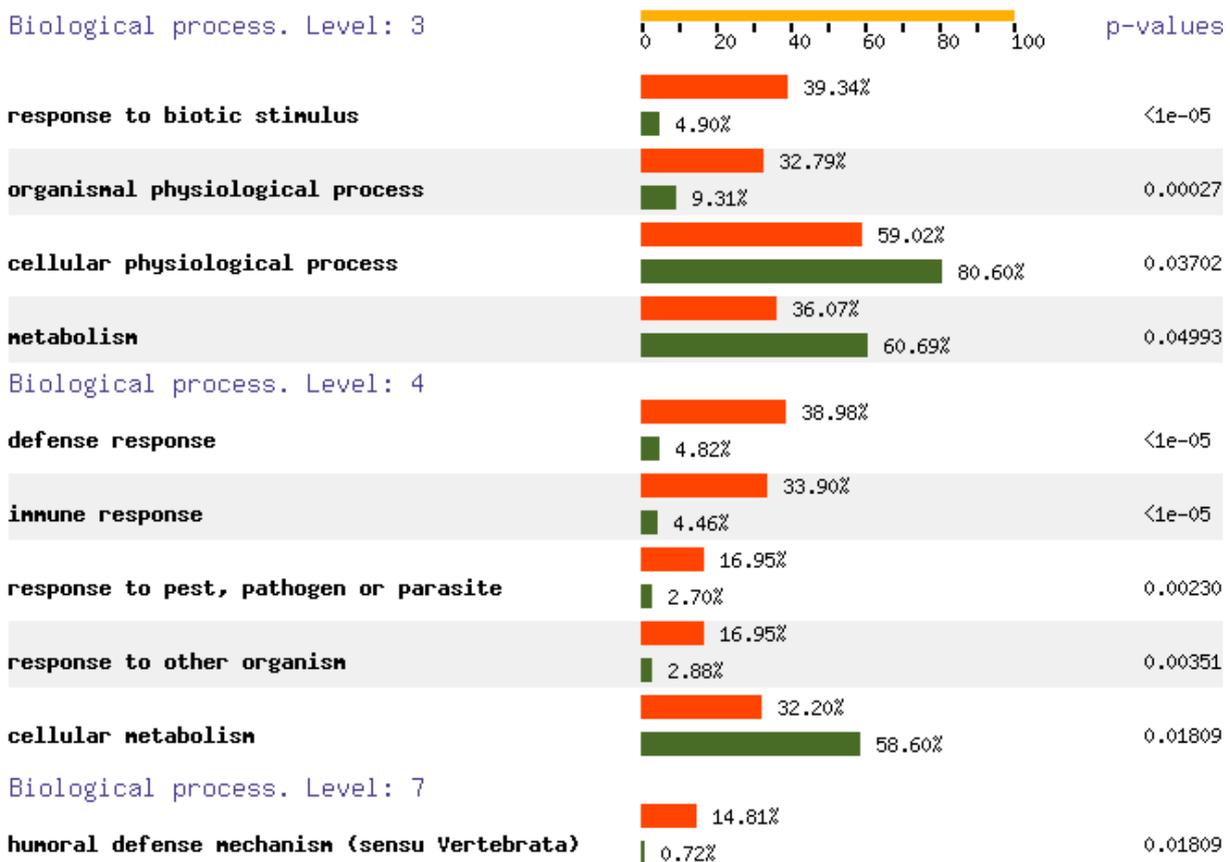


Abb. 3.16 Über- und unterrepräsentierte GO Attribute aus der Kategorie „biologische Prozesse“. Die Prozentzahlen geben den Anteil der entsprechenden Gene wieder im Verhältnis zur Menge an Genen, die mit Attributen aus dem jeweiligen Level versehen werden konnten. Rot: differenziell exprimierte Gene, Grün: Gesamtheit aller nicht regulierten Gene aus dem MG-U74v2 Array Set.

Dabei waren vier Attribute aus dem Kategorielevel 3, fünf Attribute aus Level 4 und ein Attribut aus Level 7. Die gezeigten Prozentwerte richten sich nach der Anzahl von annotierten Genen im entsprechenden Level. Sie stellen nicht den Anteil der Gene im Verhältnis zur gesamten Genliste dar. Da in der GO Datenbank viele Attribute in ihrer Aussage redundant sind, lässt sich zusammenfassend sagen, dass Gene, welche Abwehrfunktionen in der Zelle übernehmen, überrepräsentiert sind. Demgegenüber sind Gene, die metabolische Funktionen medieren, im Vergleich zur Gesamtheit aller befragten Gene unterrepräsentiert.

Weiterhin wurde die Kategorie „molekulare Funktion“ befragt. Nur das Attribut „GTPase activity“ aus dem Kategorielevel 8 ist in IFN γ und TNF regulierten Gene überrepräsentiert (Abb. 3.17). Weitere Cluster molekularer Funktionen wurden nicht detektiert.



Abb. 3.17 Überrepräsentiertes GO Attribut aus der Kategorie „molekulare Funktion“. Beschreibung siehe Abb. 3.16.

Keine signifikanten Über- oder Unterrepräsentationen konnten in der Kategorie „zelluläre Komponente“ detektiert werden, allerdings lassen sich zwei Attribute erkennen, die mit einem p-Wert knapp oberhalb der Signifikanzgrenze von $p = 0,05$ vermutlich biologische Relevanz haben (Abbildung 3.18). Das Attribut „extracellular space“ beinhaltet sowohl sekretierte als auch Oberflächenproteine.

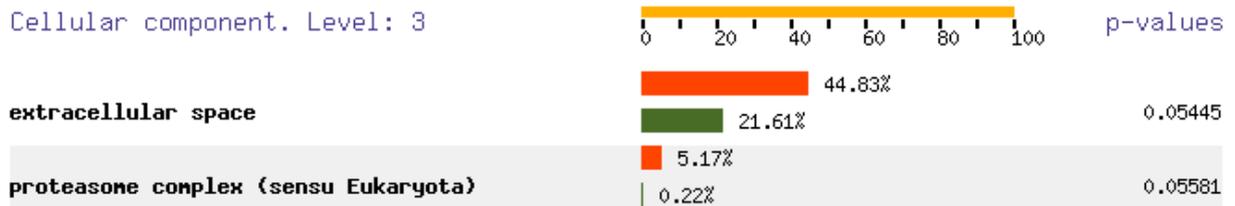


Abb. 3.18 Überrepräsentierte GO Attribute aus der Kategorie „zelluläre Komponente“. Beschreibung siehe Abb. 3.16.

Als nächstes wurde untersucht, welche, der mittels hierarchischer Cluster Analyse identifizierten Expressionscluster, für die auffälligen Attributrepräsentationen verantwortlich sind. Hierbei wurden Gene aus den größeren Clustern herangezogen, nämlich Cluster B für synergistisch hochregulierte Gene, Cluster C für IFN γ abhängig hochregulierte Gene, Cluster F für TNF induzierbare Gene, Cluster G und H gemeinsam für von beiden Zytokinen inhibierte Gene und Cluster I für primär durch IFN γ inhibierte Gene.

Tabelle 3.1 zeigt, welche der überrepräsentierten Attribute aus der Kategorie „biologische Prozesse“ zum jeweiligen Cluster zugeordnet werden konnten.

Attribut	Level	Cluster
Response to biotic stimulus	3	C
Organismal physiological process	3	C
Immune response	4	B, C
Defense response	4	B, C
Response to pest, pathogen or parasite	4	C
Response to other organism	4	C

Tabelle 3.1 Zuordnung der überrepräsentierten Attribute zu Expressionsclustern

Hierbei wird deutlich, dass primär IFN γ regulierte Gene, und solche, die mit TNF synergistisch induziert wurden, für die Überrepräsentation von immunrelevanten Genen signifikant verantwortlich sind. Die Unterrepräsentation von metabolischen Genen konnte hier zu keinem der untersuchten Cluster signifikant zugeordnet werden.

Aus der Kategorie „molekulare Funktion“ konnten 6 der 7 Gene, die zuvor mit dem überrepräsentierten Attribut „GTPase activity“ gekennzeichnet wurden, in Cluster C detektiert werden. Alle 6 Gene befinden sich im Subcluster C1, sind also ausschließlich durch IFN γ

induziert. Das siebte Gen befindet sich im Subcluster F2, und ist somit primär unter der transkriptionellen Kontrolle von TNF (Tab. 3.2).

IFNγ induziert
guanylate nucleotide binding protein 2
guanylate nucleotide binding protein 4
macrophage activation 2 like
RIKEN cDNA 5830443L24 gene
RIKEN cDNA 9830147J24 gene
interferon inducible GTPase 1
TNF induziert
tubulin, alpha 8

Tabelle 3.2 Gene mit dem Attribut „GTPase activity“ aus der Kategorie „molekulare Funktion“

Zusammenfassend konnte aus den hier erläuterten Genontologischen Untersuchungen zunächst eine deutliche Überrepräsentation von immunrelevanten Genen in ANA-1 Makrophagen bestätigt werden, welche durch die Zytokine IFN γ und TNF in ihrer Expression verändert wurden. Auffallend war eine deutliche Häufung von Genen mit GTPase Aktivität, welche zum größten Teil unter der transkriptionellen Kontrolle von IFN γ stehen. Einige dieser Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht und werden ab Kapitel 3.3 behandelt.

3.2 Immunoresponsive gene 1

3.2.1 Allgemeines

In den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Versuchen wurden Gene identifiziert, die in ANA-1 Zellen unter der transkriptionellen Kontrolle von IFN γ und/oder TNF stehen. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Hauptaugenmerk auf Gene gelegt, die durch synergistische Effekte beider Zytokine induziert wurden. In Tabelle 3.3 sind Gene aus den Clustern B und C2 mit ihren arbiträren Expressionsleveln aufgeführt, die durch synergistische oder additive Mechanismen hochreguliert waren. Hierbei werden nur Gene gezeigt, die mindestens zweifach induziert waren.

Gen	Induktion IFN γ	Induktion TNF	Induktion I + T	Acc. Nr.
immunoresponsive gene 1	33.91	5.89	73.65	AI323667
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	22.33	0.98	63.94	M34815
serum amyloid A 3	13.35	21.09	51.18	X03505
histocompatibility 2, complement component factor B	7.07	1.64	33.92	AF049850
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	4.16	0.98	24.02	AA174767
Adult male urinary bladder cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9530055M18	2.66	2.84	6.65	AI847438
C-type lectin domain family 4, member e	1.52	2.80	5.85	AB024717
inhibitor of kappaB kinase epsilon	1.63	2.65	5.20	AB016589
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	2.41	1.23	5.13	AI837819
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	1.69	1.48	4.92	AA673960
intercellular adhesion molecule	2.68	1.39	4.77	M90551
hemopoietic cell kinase	2.89	1.58	4.59	J03023
Similar to RIKEN cDNA 5830477G23 gene	1.82	1.67	4.57	AI851470
interleukin 15 receptor, alpha chain	2.80	1.07	4.38	U22339
syntaxin 11	2.35	1.57	4.01	AA267733
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.25	2.19	3.77	U57524
sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	2.37	1.35	3.66	AA895031
solute carrier family 31, member 2	2.00	1.46	3.64	AW212839
GLI pathogenesis-related 2	2.22	1.01	3.63	AV315963
AI551337:vx45d09.x1 Mus musculus cDNA, 3' end	1.95	1.51	3.33	AI551337
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.39	1.96	3.17	AV370033
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	2.25	1.01	3.08	AI853706
Traf2 binding protein	2.19	1.14	3.06	AI837648
AV064077:AV064077 Mus musculus cDNA	2.08	0.83	2.83	AV064077
lymphotoxin B	1.22	1.50	2.82	U16985
hypothetical protein A330042H22	1.37	1.95	2.81	AI845269
glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	1.42	0.97	2.79	D50430
Phosphodiesterase 4B, cAMP specific	1.55	1.27	2.72	AI847140
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	1.58	1.10	2.72	M83312
glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	1.27	0.83	2.49	AI643851
G protein-coupled receptor 18	1.40	1.00	2.37	AI549772
cytochrome b-245, beta polypeptide	1.58	1.86	2.27	AI226955
RIKEN cDNA 2700019D07 gene	1.86	1.01	2.23	AI116290
AT rich interactive domain 5B (Mrf1 like)	1.72	0.99	2.09	AI173737

Tabelle 3.3 Durch IFN γ und TNF synergistisch induzierte Gene

Eines der am höchsten regulierten Gene in dieser Gruppe ist das *immunoresponse gene 1* (IRG1). Das gleiche Gen findet sich erneut in Subcluster C1. Hierbei wurden auf den Arrays redundante Sequenzen verwendet, die erst durch fortschreitende Annotation als solche identifiziert wurden. IRG1 wurde erstmals 1995 in RAW264.7 Makrophagen als ein durch LPS induzierbares Gen kloniert (Lee et al., 1995). Dabei wurde gezeigt, dass die LPS abhängige Induktion durch den Tyrosinkinase und Proteinkinase C (PKC) Signalweg vermittelt wird. Über die Funktion von IRG1 ist nur wenig bekannt. Jüngere Untersuchungen postulieren eine kritische Rolle von IRG1 während der Blastocysten Implantation in der Maus. IRG1 ist in murinen Uterus-Epithelien durch Progesteron und LIF (Leukemia inhibitory factor) induzierbar (Cheon et al., 2003; Chen et al., 2003; Sherwin et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass IRG1 sowohl transkriptionell als auch posttranslational von LPS und Mycobakterien in murinen Makrophagen hochreguliert wird (Basler et al., 2006).

Aufgrund der außerordentlichen Induzierbarkeit von IRG1 in ANA1 Zellen durch IFN γ und TNF und der bis dato geringen Verfügbarkeit an Daten bezüglich dessen Funktion in der Immunabwehr, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Gen eingehend charakterisiert. IRG1 befindet sich bei der Maus auf Chromosom 14 und besteht aus fünf Exonen, die sich über ungefähr 9Kb erstrecken (Abb. 3.19). Der Translations-Start befindet sich am 3' Ende des ersten Exons. Die resultierende mRNA für IRG1 ist 2146 Basen lang und kodiert für ein 488 Aminosäuren langes Protein.

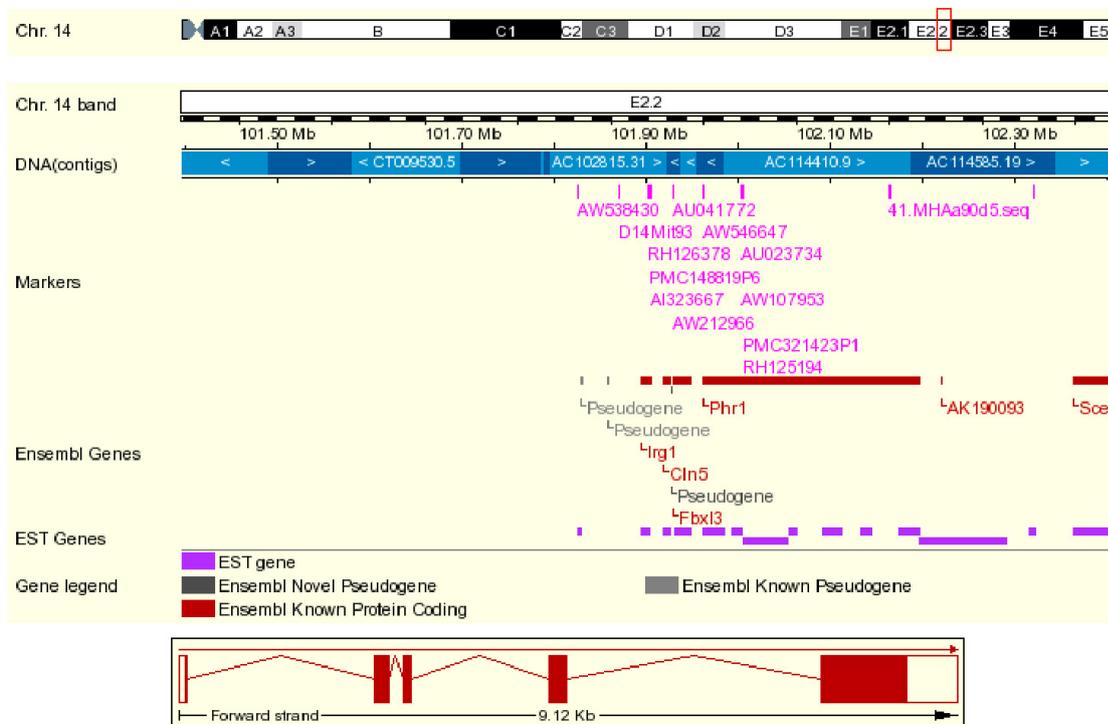


Abb. 3.19 Genomischer Lokus von IRG1. Oben: Übersicht über Chromosom 14. Der rote Rahmen gibt die Position des Lokus auf dem Chromosom wieder. Mitte: Vergrößerung des markierten Ausschnitts. Unten: schematischer Aufbau des genomischen Lokus von IRG1. Abbildung übernommen aus <http://www.ensembl.org>.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit verschiedenen Proteinsequenz Datenbanken wurde mittels des Online Tools InterProScan durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) (Mulder et al., 2005; Quevillon et al., 2005). Über nahezu die gesamte Länge des IRG1 Proteins lässt sich Ähnlichkeit zur MmgE/PrpD Domäne detektieren, welche für das bakterielle Enzym 2-Methylzitat Dehydratase (PrpD) beschrieben wurde. PrpD katalysiert in Bakterien den dritten Schritt des Methylzitatzykluses und wird für den Propionat-Katabolismus benötigt (Horswill und Escalante-Semerena, 2001). Da keine weiteren homologen Gene bei der Maus gefunden wurden, handelt es sich bei IRG1 möglicherweise um das murine Ortholog des bakteriellen Enzyms. Ob IRG1 ähnliche katalytische Aktivität wie PrpD besitzt, ist zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt.

3.2.2 Validierung der Microarray Daten und *in vitro* Expressionsanalysen

Microarrays ermöglichen es, binnen kurzer experimenteller Dauer große Mengen an Daten bezüglich des Expressionsvehaltens einer Vielzahl von Genen zu liefern. Durch Vergleich von Experimentalbedingungen mit entsprechenden Referenzen lässt sich die Änderung der Expression für einzelne Gene quantifizieren. Allerdings ist eine Bestätigung von Microarray Daten durch zusätzliche experimentelle Methoden notwendig, wie semiquantitative RT-PCR, Realtime RT-PCR, Northern Blot oder Western Blot (Chuaqui et al., 2002). Außerdem haben Untersuchungen über Microarray Validierung gezeigt, dass zwar die Aussagen qualitativ meist übereinstimmen, quantitativ aber durchaus große Abweichungen zwischen Microarray Daten und folgenden spezifischen Überprüfungen bestehen (Rajeevan et al., 2001).

Wie in Tabelle 3.3 gezeigt, wurde IRG1 nach Stimulation von ANA-1 Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ und TNF für 16 Stunden als etwa 70-fach hochreguliert detektiert. Um dies zu bestätigen wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (s. Abschnitt 2.9.13), wobei als Probe RNA aus einem unabhängig durchgeführten Experiment mit gleichen Bedingungen (s. Abschnitt 3.1.1) verwendet wurde. Die Probe wurde hierfür in acht verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt, wobei sie jeweils im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt wurde. Abbildung 3.20 zeigt, dass IRG1 auch hier als differentiell exprimiert detektiert werden konnte, und außerdem bereits basal in ANA1 Makrophagen exprimiert wird.

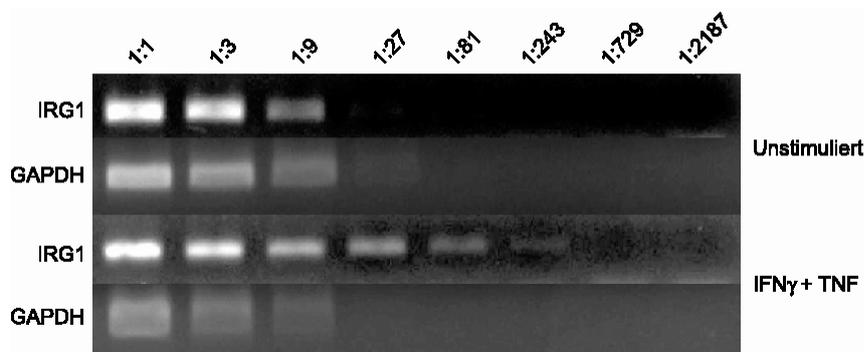


Abb. 3.20 Semiquantitative RT-PCR von IRG1. Das Template war cDNA, umgeschrieben aus RNA von 16h mit $\text{IFN}\gamma$ +TNF stimulierten ANA1 Makrophagen. Das Template wurde in serieller 1:3 Verdünnung eingesetzt. Als quantitative Referenz wurde GAPDH gemessen.

Die semiquantitative RT-PCR erlaubt es, die quantitativen Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen nur sehr ungenau abzuschätzen. Bei stimulierten ANA1 Zellen ließ sich, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Detektionseffizienz von GAPDH, bei etwa 3 bis 4 zusätzlichen Verdünnungen noch Transkript nachweisen, was bei einer jeweiligen Verdünnung von 1:3 etwa 27- bis 81-facher Induktion entspricht. Dies entspricht in der Größenordnung den Ergebnissen aus den Microarray Experimenten.

Zur weiteren Validierung der zuvor genannten Ergebnisse wurde die Expression von IRG1 mittels Realtime RT-PCR überprüft (s. Abschnitt 2.9.14). Hierbei lassen sich die molekularen Unterschiede in der Transkriptmenge des Gens wesentlich genauer quantifizieren. Gleichzeitig wurde untersucht, ob IRG1 durch weitere Stimuli induziert werden kann, die Makrophagen in ihrer Abwehrfunktion gegenüber pathogenen Organismen aktivieren können. Hierfür wurden in einem unabhängigen Experiment ANA1 Zellen über 16 Stunden mit IFN γ (100 U/ml), TNF (10 ng/ml), IFN γ +TNF, IFN β (10 ng/ml), Interleukin 1 β (IL-1 β ; 10 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Listeria LTA (1 μ g/ml), CpG ODN 1668 (1 μ M), CpG ODN 1720 Kontrolle (1 μ M), polyIC (1 μ g/ml), Resiquimod (R848; 1 μ g/ml) und als Negativkontrolle IL-2 (10 ng/ml) stimuliert. Als Referenz dienten unstimulierte Zellen, die ansonsten identisch behandelt wurden. Nach RNA Isolierung und anschließender reverser Transkription in cDNA wurden die Proben, Primern und Sonde, die für IRG1 spezifisch sind, in Realtime RT-PCR Reaktionen eingesetzt.

Abbildung 3.21 zeigt die Verhältnisse von IRG1 Transkriptmengen relativ zu unstimulierten Zellen. Diese wurden bereits anhand parallel gemessener β -Aktin Mengen normalisiert. Auch mit dieser Methode konnte die Induzierbarkeit von IRG1 durch IFN γ und TNF unabhängig bestätigt werden. Ebenfalls lässt sich auch hier ein synergistischer Effekt auf die Expression bei simultaner Stimulation mit beiden Zytokinen erkennen. Die quantitativen Verhältnisse lagen allerdings durchwegs höher als in den Microarray Versuchen. Dieses Phänomen wurde bereits früher beschrieben und liegt vermutlich an der weitaus höheren Sensitivität der Realtime RT-PCR gegenüber Array Hybridisierungen (Rajeevan et al., 2001). Abbildung 3.21 verdeutlicht auch, dass IRG1 durch weitere Zytokine und TLR- Liganden induziert werden kann. Die Induzierbarkeit des Gens durch LPS in Makrophagen wurde bereits beschrieben (Lee et al., 1995; Basler et al., 2006), hier konnte jedoch gezeigt werden, dass IFN β , IL-1 β , LTA, CpG ODN und R848 ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Expression des Gens führen. Dabei erreichten LPS und CpG 1668 stimulierte Zellen ähnlich hohe Expressionlevel wie IFN γ stimulierte Zellen. Alle anderen Stimuli zeigten deutlich geringere Induktionen.

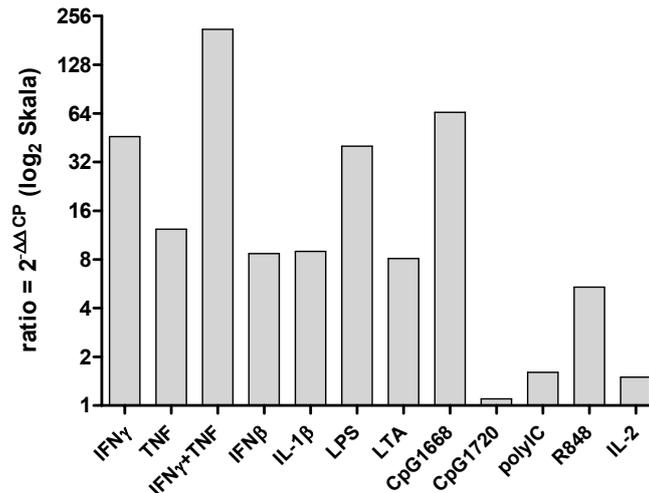


Abb. 3.21 Expression von IRG1 nach Induktion mit verschiedenen Stimuli. Die Ordinate ist als \log_2 Skala dargestellt. Die Balken geben die Verhältnisse der IRG1 Transkriptmengen zur unstimulierten Kontrolle (=1) wieder.

Weiterhin wurde geprüft, ob IRG1 in primären Zellen der Maus induzierbar ist. Hierfür wurden Mikroglia Zellen, gewonnen aus Gehirnzellen neugeborener C57BL/6 Mäuse, mit LPS, IFN γ und LPS + IFN γ stimuliert (Konzentrationen siehe oben) und mit unbehandelten Zellen verglichen. Ebenfalls wurden Knochenmarkszellen aus C57BL/6 Mäusen mit GM-CSF angereichertem Zellüberstand zu unreifen dendritischen Zellen (iDC) ausdifferenziert und mit durch LPS gereiften dendritischen Zellen verglichen (mDC) (s. Abschnitt 2.9.13) (Abb. 3.22).

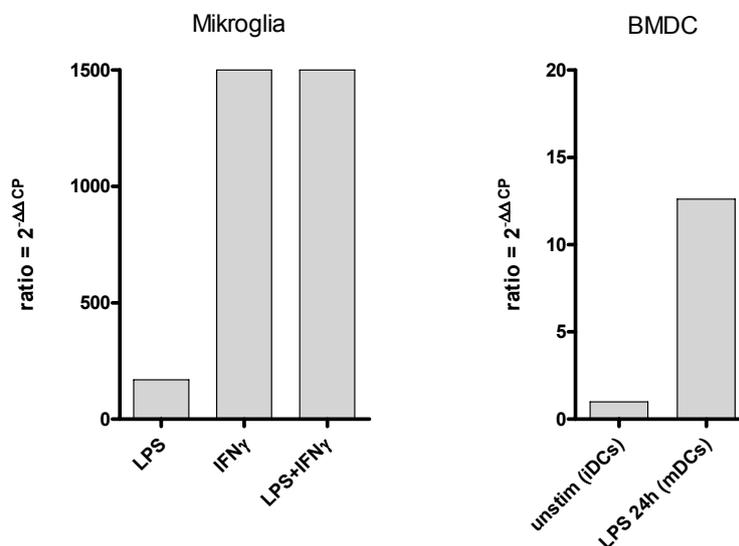


Abb. 3.22 Expression von IRG1 in Mikroglia und Knochenmark-dendritischen Zellen (BMDC). Balken geben die relativen Transkriptmengen von IRG1 zur unstimulierten Kontrolle bei Mikroglia und zu iDCs bei BMDCs wieder.

IRG1 wird in Mikroglia Zellen bereits durch LPS stark induziert, IFN γ führt in diesen Zellen zu einer äußerst hohen Induktion der Expression, die durch gemeinsame Gabe mit LPS nicht weiter verstärkt werden kann. Ebenfalls konnte eine Erhöhung der IRG1 Expression in LPS gereiften DCs gegenüber unreifen DCs nachgewiesen werden, wenngleich die Induzierbarkeit hier wesentlich niedriger war. Somit lässt sich belegen, dass die IRG1 Expression nicht nur auf

Makrophagen beschränkt ist, sondern auch in weiteren myeloiden Zellen des Immunsystems induzierbar ist.

3.2.3 IRG1 Expression in Mäusen nach Infektion

Die beschriebenen Versuche konnten bislang nachweisen, dass IRG1 in wichtigen Zellen des angeborenen Immunsystems durch proinflammatorische Zytokine und TLR- Liganden induziert wird. Speziell Makrophagen bilden, gemeinsam mit Granulozyten, die erste entscheidende Barriere bei der Bekämpfung von pathogenen Eindringlingen aus. Gene, die auf proinflammatorische Reize in diesen Zellen reagieren, stellen somit gute Kandidaten für eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Pathogenen dar. Allerdings können erst *in vivo* Untersuchungen wirkliche Rückschlüsse zur Bedeutung eines Gens liefern, um potentielle Artefakte von Zellkultur-Versuchen auszuschließen. Um eine mögliche Funktion von IRG1 in der Immunabwehr zu untersuchen, wurde daher die Expression von IRG1 in Mäusen nach Infektion mit Pathogenen gemessen. Es wurden zu diesem Zwecke zwei Modellinfektionssysteme eingesetzt, die Infektion mit *Listeria monocytogenes* und *Toxoplasma gondii*.

Die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ist ein häufig angewandtes Modell zum Studium der Abwehr von intrazellulär replizierenden Bakterien (Edelson und Unanue, 2000). C57BL/6 Mäuse wurden hierfür mit einer subletalen Dosis (0,1xLD50) *L. monocytogenes* intraperitoneal infiziert, nach jeweils 8, 24 und 48 Stunden schmerzfrei getötet und die Milz entnommen (s. Abschnitt 2.9.13). Für jeden Zeitpunkt wurden zwei Mäuse untersucht. Die Expression von IRG1 wurde mittels Realtime RT-PCR bestimmt.

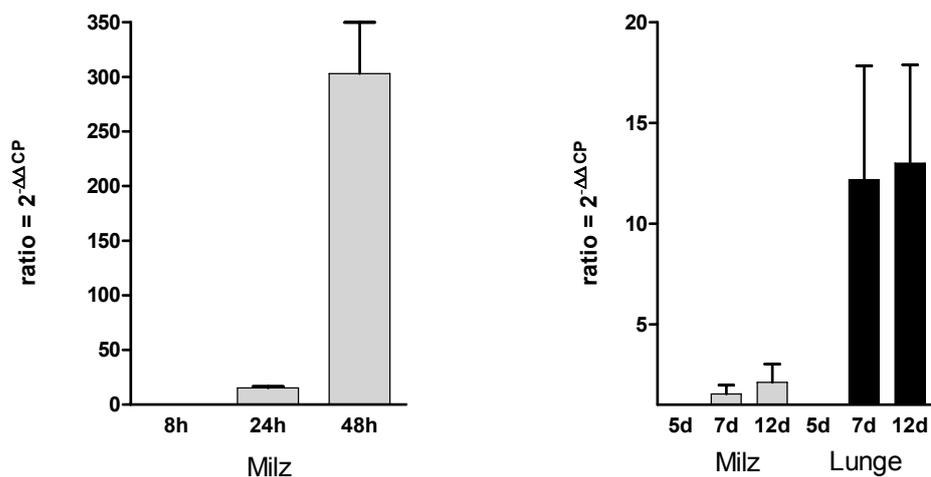


Abb. 3.23 IRG1 Expression in infizierten Mäusen. Links: Milz-RNA aus *L. monocytogenes* infizierten Mäusen. Rechts Milz- und Lungen-RNA aus *T. gondii* infizierten Mäusen.

Wie in Abbildung 3.23 links erkennbar, ist die Expression von IRG1 24 Stunden nach Infektion in der Milz bereits erhöht. Nach 48 Stunden lässt sich ein beträchtlicher Anstieg der IRG1 Transkriptmenge nachweisen.

Toxoplasma gondii ist ein Parasit, der nahezu alle Zellen und Gewebe infiziert, und wird häufig als Modellorganismus für intrazellulär replizierende protozoische Pathogene verwendet.

C57BL/6 Mäusen wurden intraperitoneal mit 20 Zysten *T. gondii* (Stamm ME49) infiziert. Nach jeweils fünf, sieben und zwölf Tagen wurden die Mäuse schmerzfrei getötet und die Milz und die Lunge entnommen. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Mäuse untersucht. Als Referenz dienten hier ebenfalls uninfizierte Mäuse. Hier konnte in der Milz keine nennenswerte Induktion von IRG1-Transkripten detektiert werden. Hingegen konnte in der Lunge nach sieben Tagen eine deutliche Induktion gemessen werden (Abb 3.23 rechts).

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation von IRG1

Zahlreiche Proteine tragen in ihrer Primärsequenz Erkennungsmotive, die die Lokalisation des Genprodukts in subzelluläre Kompartimente oder Membranen bestimmen. Ebenfalls tragen sezernierte Proteine sogenannte „Leader“ Sequenzen, welche von weiteren zellulären Bestandteilen erkannt werden und zur Ausschleusung des Proteins führen (Blobel, 2000). Die Primärsequenz von IRG1 lässt allerdings keinerlei Erkennungsmuster erkennen, die auf topologische Eigenschaften des Proteins rückschließen lassen. Das Fehlen einer „Leader“ Sequenz macht eine intrazelluläre Lokalisation zumindest wahrscheinlich.

Um die subzelluläre Lokalisation von IRG1 zu bestimmen, wurden deshalb RAW264.7 Makrophagen mit einem IRG1 Expressions-Konstrukt transient transfiziert, welches am Carboxylende des Proteins ein fluoreszentes DsRed Fusionsprotein exprimiert. Anschließend wurden die transfizierten Makrophagen im Epifluoreszenz Mikroskop und im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) analysiert (Abbildung 3.24).

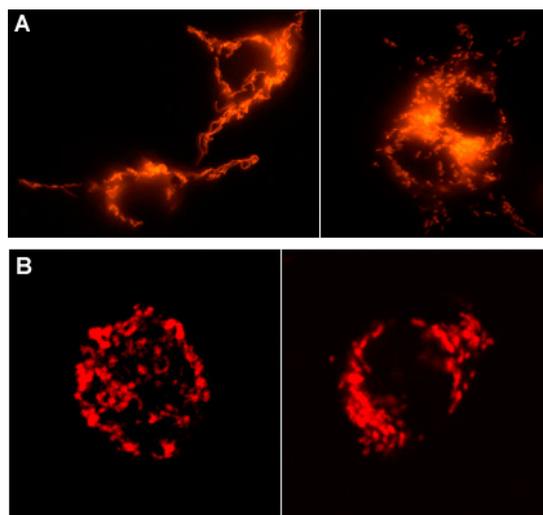


Abb. 3.24 Subzelluläre Lokalisation von IRG1-DsRed in RAW264.7. A: Epifluoreszenz Mikroskop. B: konfokales Laser Scanning Mikroskop

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass IRG1 in subzellulären Kompartimenten außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist. Diese Kompartimente lassen sich mit globulär bis filamentartig

charakterisieren. Stimulation von transfizierten Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ zeigte keine Veränderung der Lokalisation (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde versucht die Identität dieser Kompartimente genauer zu charakterisieren, indem verschiedene Zellkompartimente mittels spezifischer Farbstoffe oder Antikörper angefärbt wurden und auf Kolokalisation mit dem transfizierten IRG1 Protein untersucht wurden. Hierfür wurden RAW Makrophagen mit IRG1-DsRed transfiziert und nach 24 Stunden mit Phalloidin-Alexa488 (Aktin-Zytoskelett), anti-Lamp-1-FITC (Lysosomen) oder Mitotracker GreenFM (Mitochondrien) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im konfokalen Mikroskop untersucht.

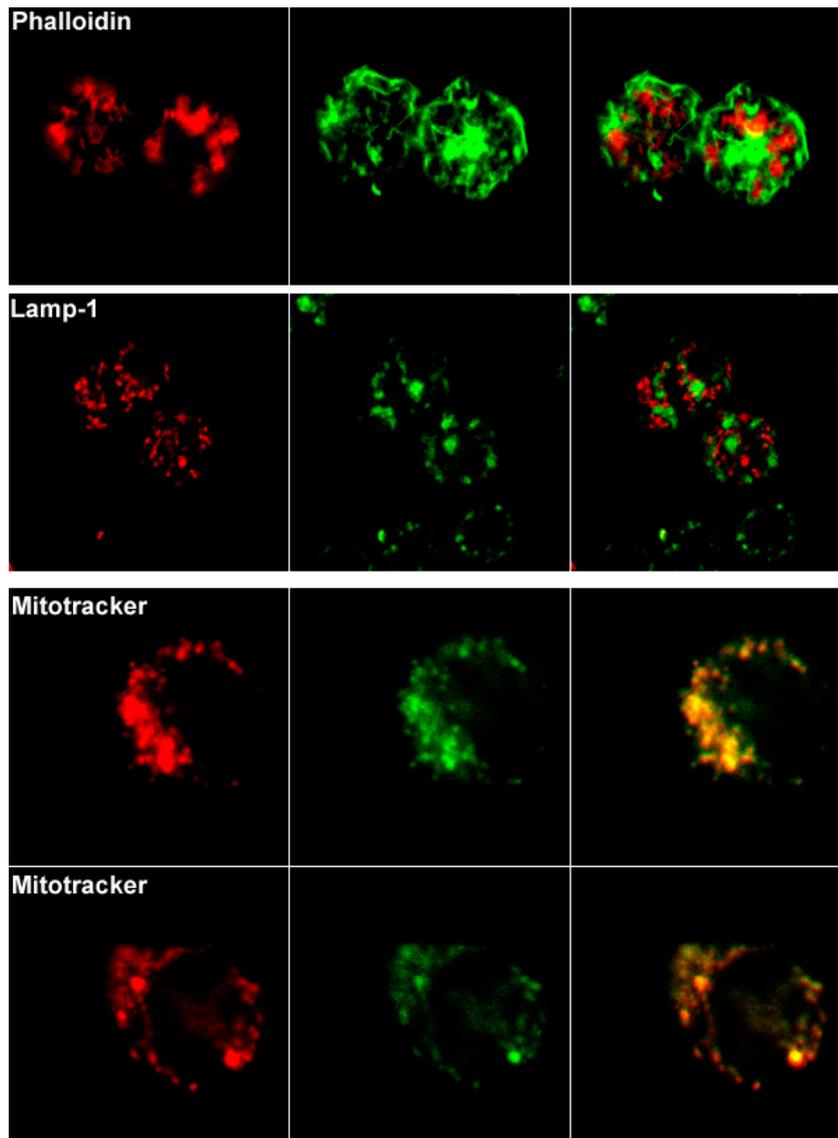


Abb. 3.25 Kofärbungen von IRG-DsRed transfizierten RAW Zellen mit Phalloidin, anti-Lamp-1 und Mitotracker. IRG1 ist jeweils in rot dargestellt, der Gegenfarbstoff in grün. Rechts ist die Überlagerung aus beiden Fluorophoren gezeigt.

Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, gibt es nur geringe Kolokalisation von IRG1 mit dem Aktin-Zytoskelett oder mit lysosomalen Kompartimenten. Allerdings lässt sich Kolokalisation von IRG1 mit dem Mitotracker Farbstoff klar erkennen, was für eine Assoziation des Proteins mit

Mitochondrien sprechen würde. Allerdings scheint die Mitotracker Färbung nicht komplett spezifisch zu sein, da auch zytosolische Hintergrundfärbung zu erkennen ist.

Weiterhin sollte überprüft werden wie sich die subzelluläre Lokalisation von IRG1 bei einer Infektion der Zellen mit intrazellulären Erregern verhält. Hierfür wurden RAW264.7 Zellen mit IRG1-DsRed transfiziert, nach 24h über Nacht mit IFN γ (100 U/ml) stimuliert und für 30 Minuten mit EGFP-exprimierenden *L. monocytogenes* (Verhältnis Zellen:Listerien 1:10) oder für zwei Stunden mit *T. gondii* (Stamm ME49; Verhältnis 1:50) inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit dem Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt. Listerien-infizierte Zellen wurden daraufhin fixiert und im konfokalen Mikroskop direkt untersucht. Toxoplasmen-infizierte Zellen wurden zunächst fixiert und permeabilisiert, dann mit einem spezifischen Antikörper gefärbt, welches das *T. gondii* Oberflächenprotein SAG1 detektiert. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls im konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 3.26).

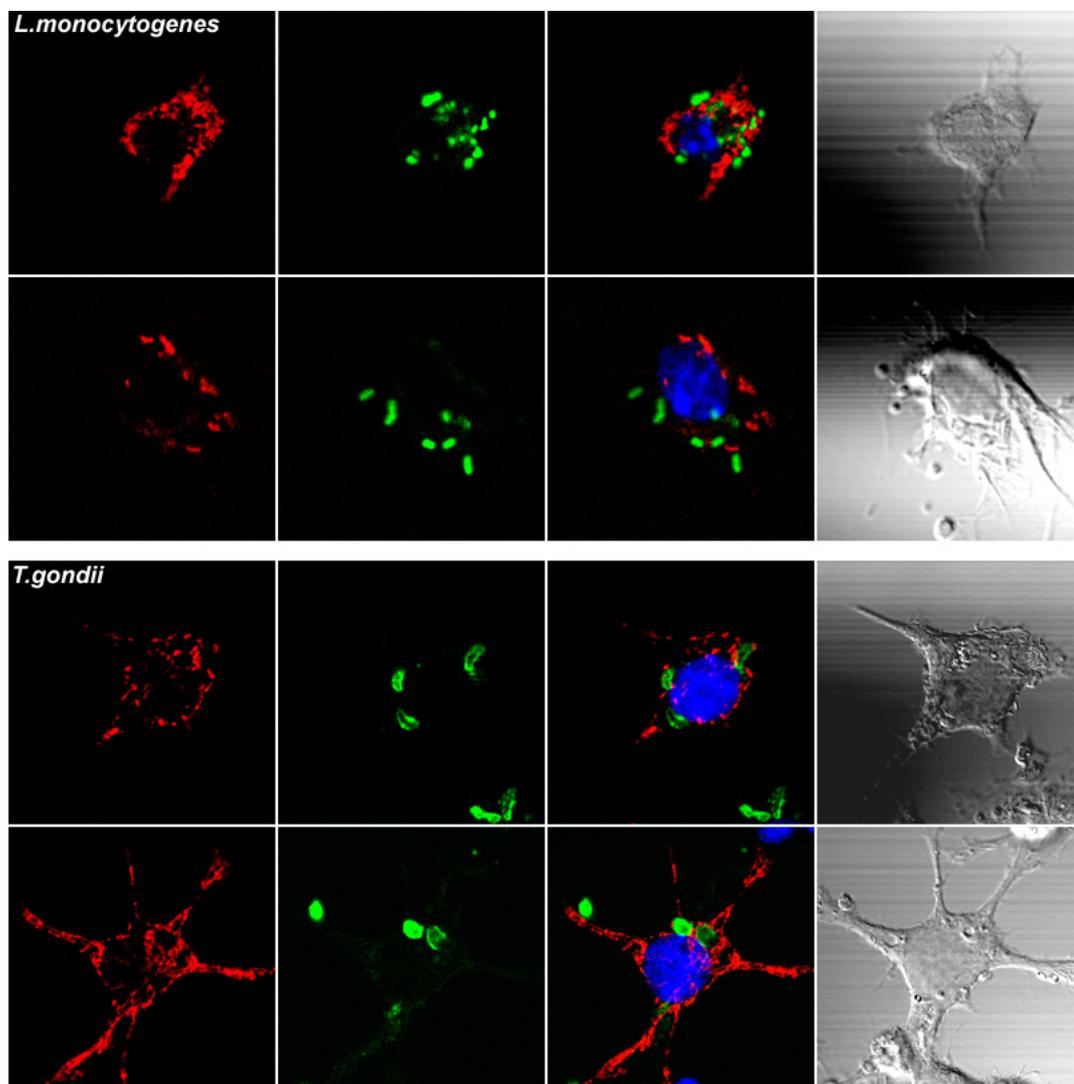


Abb. 3.26 Lokalisation von IRG1-DsRed in *L. monocytogenes* oder *T. gondii* infizierten RAW Makrophagen. Die erste Spalte zeigt in Rot das IRG1 Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün das Pathogen. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte eins und zwei mit dem Kernfarbstoff DAPI. Die vierte Spalte zeigt Differentialkontrast-Aufnahmen der Zellen.

Es konnte keine eindeutige Assoziation des IRG1-DsRed Fusionsproteins mit intrazellulären Listerien oder Toxoplasmen nachgewiesen werden. Zwar lässt sich erkennen, dass um die Toxoplasmen eine gewisse Anreicherung der DsRed Fluoreszenz vorhanden ist, allerdings ist dies vermutlich auf die Größe des Pathogens zurückzuführen, was zu einer Verdrängung zellulärer Strukturen führt. Es konnte keine Kolokalisation der Fluorophore gefunden werden, die sich bei Überlappung als gelbe Farbe zeigen würde. Infektion von Zellen, die keine Präinkubation mit IFN γ erfahren hatten, lieferten ebenfalls keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der IRG1 Lokalisation (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IRG1 in subzelluläre Kompartimente außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist. Diese Kompartimente konnten mit dem Mitochondrien Farbstoff Mitotracker angefärbt werden, jedoch bedarf dies weiterer Untersuchungen mit anderen Methoden. Weder Stimulation mit IFN γ noch Infektion mit *L. monocytogenes* oder *T. gondii* konnte die Lokalisation des Proteins verändern.

3.2.5 Inaktivierung des IRG1 Gens durch *Gene Targeting*

Das *Gene Targeting* durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus erlaubt die systematische Generierung von Mauslinien mit definierten genetischen Veränderungen. Hierdurch lässt sich die Funktion einzelner Gene *in vivo* optimal untersuchen. Beispielsweise konnten durch das *Gene Targeting* detaillierte Erkenntnisse über die Entwicklung, Selektion und Funktion von T und B Zellen sowie über Funktion von Zytokinen gewonnen werden (Pfeffer und Mak, 1994). Um die Rolle von IRG1 im Gesamtorganismus untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit vorbereitende Schritte unternommen, um eine embryonale Stammzelllinie (ES) aus 129/Ola Mäusen (Kuhn et al., 1991) in die Keimbahn von Mäusen einzuführen, welche zur Generierung von IRG1-defizienten Mauslinien führen sollte. Eine solche ES Zelle trägt dabei ein mutiertes Allel, welches durch homologe Rekombination mit einem gentechnisch veränderten Genlocus erzielt wird.

Hierbei wurden zwei unterschiedliche Strategien entwickelt, um das IRG1 Gen zu inaktivieren. Die erste „knockout“ Strategie (Abb. 3.27) wurde so gewählt, dass große Teile von Exon 2 und die kompletten Exone 3 und 4 durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette und eine Promotorlose DsRed Reporter-kassette ersetzt werden sollten, wobei letztere in gleiche Leserichtung wie das ursprüngliche IRG1 Gen kloniert wurde. Das Einbringen dieser Reporter-kassette sollte dem Nachweis der Promotor Aktivität des IRG1 Gens in der Gen-defizienten Maus dienen. Dabei sollte das Startkodon in Exon 1 inaktiviert werden, um zu gewährleisten, dass die Translation der mRNA am Startkodon der DsRed-Kassette beginnt. Sowohl die Neomycin-Kassette als auch die DsRed-Kassette wurden mit flankierenden loxP (locus of X-ing over P1 phage) Sequenzen versehen. Diese dienen dazu, durch spätere Transfektion von korrekt rekombinierten ES Klonen mit einem CRE exprimierenden Vektor oder durch Verkreuzung mit CRE-*deleter* Mäusen, die Sequenzen

zwischen den loxP-Stellen wieder zu entfernen (Sternberg und Hamilton, 1981). Durch das Entfernen der Neomycin-Kassette nach erfolgreicher Selektion soll ebenfalls die Expression des DsRed Proteins sichergestellt werden, da diese durch eigene transkriptionelle Aktivität mit dem endogenen IRG1 Promotor interferieren könnte. Das „floxed“ der DsRed-Kassette hingegen wurde als Sicherheitsmaßnahme durchgeführt, da keine gesicherten Erkenntnisse über die Toxizität des DsRed Proteins in der Maus bestehen. Ein korrekt rekombinierter Klon könnte dann nach Deletion der DsRed Kassette noch zur Generierung der „knockout“ Maus herangezogen werden, allerdings unter Verzicht auf die Reporteraktivität.

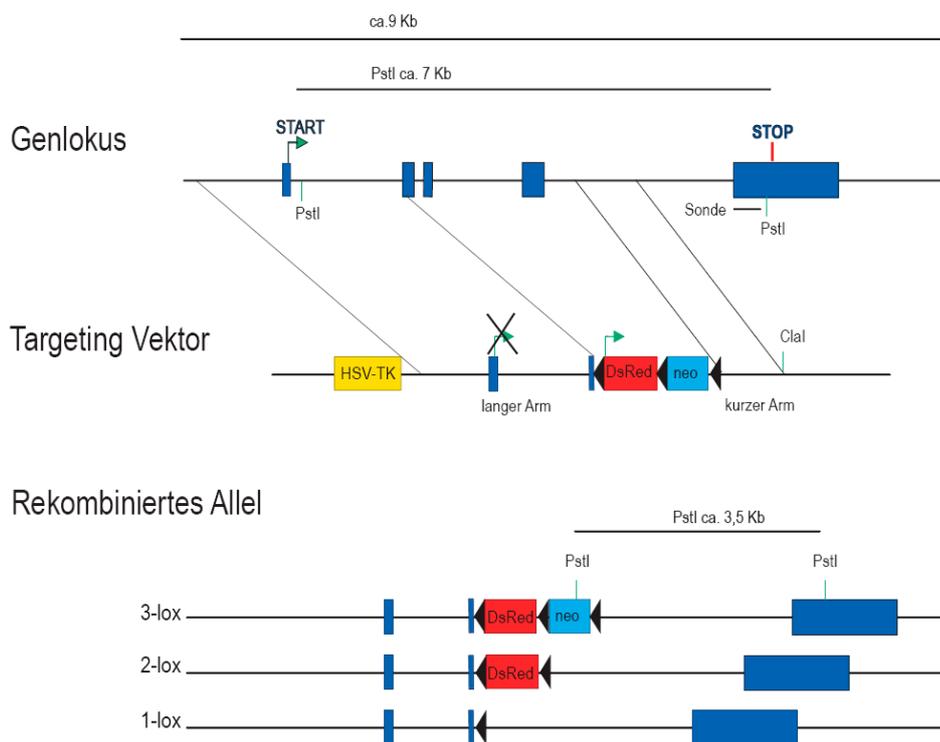


Abb. 3.27 Targeting Strategie 1 des IRG1 Genlokus

Das Restriktionsenzym ClaI schneidet im Vektor nur einmal am Ende des kurzen Arms und wurde zum Linearisieren des Vektors vor Transfektion der ES Zellen verwendet. Zur Detektion von rekombinierten Klonen wurde eine Sonde kloniert, welche ein etwa 400 bp langes Fragment von Exon 5 beinhaltet. Durch Verdau der genomischen DNA mit PstI und Detektion durch Southern Blot mittels der markierten flankierenden Probe erhält man bei Wildtyp Allelen eine etwa 7 Kb große Bande, rekombinierte Allele sollten eine etwa 3,5 Kb große Bande zeigen. Anhand der ersten *Targeting* Strategie wurden 1818 ES-Zell Klone, die nach positiver und negativer Selektion überlebten (s. Abschnitt 2.8.1), auf erfolgte homologe Rekombination getestet. Jedoch konnte bei keinem dieser Klone das „knockout“ Allel nachgewiesen werden. Diese Strategie wurde daher verworfen und nicht weiter verfolgt.

Die zweite *Targeting* Strategie (Abb. 3.28) wurde so gewählt, dass in Exon 2 eine Neomycin-Resistenz-Kassette eingesetzt wurde, ohne dabei endogene Sequenzen des IRG1 Lokus zu

deletieren. Die Neomycin Kasette wurde dabei revers zur Leserichtung des Lokus eingesetzt. Die transkriptionelle Aktivität der Neomycin Kasette, die ihren eigenen Promotor besitzt, soll dabei die Transkription des IRG1 Lokus komplett inhibieren. Diese Alternative besitzt den Vorteil, dass dadurch das potentielle Entstehen von unerwünschten trunkierten Proteinen in den mutierten Mäusen weitgehend eliminiert wird. Durch Deletion von Gensequenzen können aberrante Spleißereignisse zu neuartigen translatierbaren offenen Leserahmen führen (Beer et al., 2005). Der *Targeting* Vektor wurde hier vor Transfektion mit NotI linearisiert. Die Detektion von rekombinierten Klonen erfolgte ebenfalls über genomischen Southern Blot mit Hilfe der flankierenden Sonde. Die verwendete Sonde und das Restriktionsenzym waren identisch zur *Targeting* Strategie 1, nur dass hier die erwartete Bande bei rekombinierten Allelen 5,8 Kb groß ist.

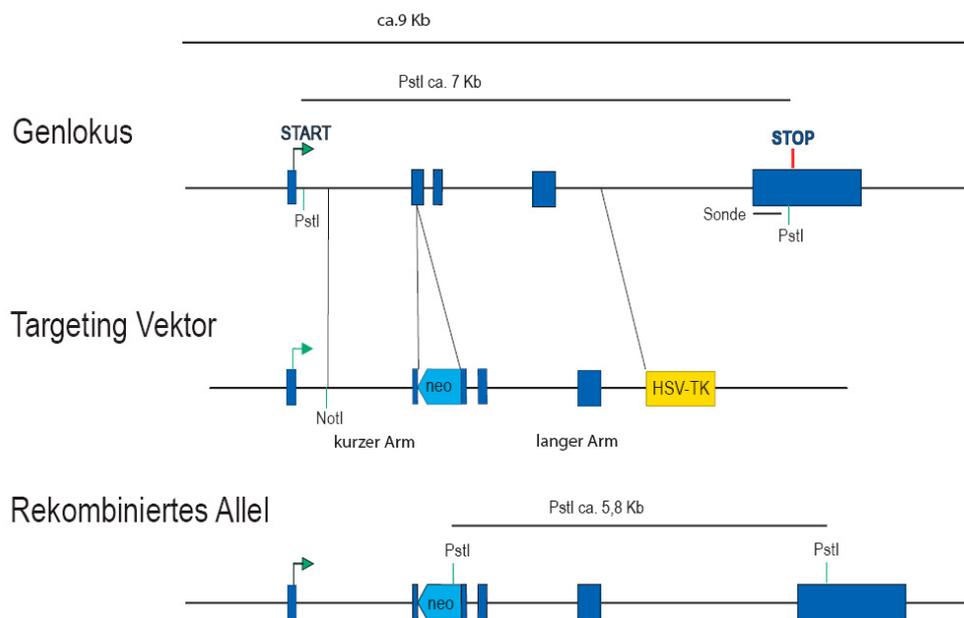


Abb. 3.28 Targeting Strategie 2 des IRG1 Genlokus.

Nach Durchführung der zweiten Strategie konnten nach Doppelsektion lediglich 12 Klone isoliert werden. Bei den Klonen 5 und 7 konnte, nach PstI Verdau der genomischen DNA und darauffolgender Southern Blot Analyse, eine Bande detektiert werden, die der Bandengröße des „knockout“ Allels von 5,8 Kb entspricht (Abb. 3.29). Zum Vergleich sind in Abbildung 3.29 Southern Blots der Klone 1 und 2 gezeigt, die nach Verdau nur das Wildtyp Allel zeigten. Eine weitere Überprüfung auf korrekte homologe Rekombination in diesen Klonen stand bei der Verfassung dieser Arbeit noch aus. Insbesondere muss noch die singuläre Integration des *Targeting* Vektors nachgewiesen werden, was mit Southern Blot unter Verwendung einer Neomycin-spezifischen Sonde durchgeführt wird.

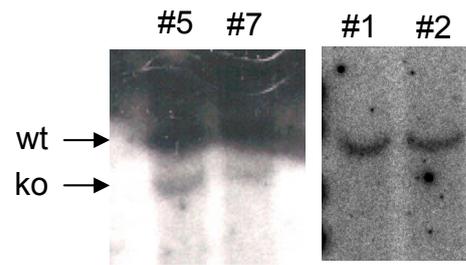


Abb. 3.29 Genomischer Southernblot homolog rekombinierter ES-Zell Klone.

3.3 mGBP6

3.3.1 Allgemeines

Bei den in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Microarray Expressionsstudien konnten zahlreiche Transkripte identifiziert werden, welche durch IFN γ in ihrer Expression beträchtlich induziert wurden und in ihrer Proteinsequenz GTP-Bindungsmotive aufwiesen (s. Abschnitt 3.1.4). In Tabelle 3.4 sind diese Gene mit den entsprechenden Messwerten und Induktionsraten aufgeführt.

Gen	Unstim	IFN γ	TNF	I + T	ratio IFN γ	ratio TNF	ratio I + T	Acc. Nr.
guanylate nucleotide binding protein 2	26.81	2910.73	28.91	2771.46	108.55	1.08	103.36	AJ007970
macrophage activation 2 like	24.85	1250.48	26.51	1602.35	50.31	1.07	64.47	AI847177
guanylate nucleotide binding protein 4	29.83	1031.26	30.82	1264.76	34.58	1.03	42.41	AW047476
interferon inducible GTPase 1	66.95	1804.55	56.76	2227.80	26.96	0.85	33.28	AJ007971
RIKEN cDNA 9830147J24 gene	38.08	571.21	50.53	842.26	15.00	1.33	22.12	AI021374
RIKEN cDNA 5830443L24 gene	94.22	1495.31	133.68	1307.06	15.87	1.42	13.87	AI006929

Tabelle 3.4 Durch IFN γ induzierte GTPasen aus Cluster C (s. 3.1.3). I + T = IFN γ + TNF.

Das Gen *interferon inducible GTPase 1* gehört zur Familie der p47 IFN induzierbaren GTPasen (Abschnitt 1.3.2), die Gene *guanylate nucleotide binding protein 2* (mGBP2) und *guanylate nucleotide binding protein 4* (mGBP4) sind bekannte Vertreter der p65 Guanylat-bindenden Proteine und wurden in Abschnitt 1.3.3 beschrieben. Bei dem Gen *macrophage activation 2 like* (mpa2l) und den cDNAs 9830147J24 und 5830443L24 handelt es sich um zuvor nicht charakterisierte Gene, welche anhand von Sequenzmotiven in der GO Datenbank als Gene mit potentieller GTPase Aktivität annotiert wurden. Alle drei Gensequenzen weisen sehr hohe Homologien zu bereits beschriebenen murinen p65 GBPs (mGBPs), wobei mpa2l und 9830147J24 hohe Sequenzhomologie zu mGBP4 besitzen und 5830443L24 am höchsten mit mGBP3 verwandt ist. Im Folgenden werden mpa2l, 9830147J24 und 5830443L24 jeweils mit den Namen mGBP6, mGBP7 und mGBP8 bezeichnet. Zusätzlich konnten innerhalb der Arbeitsgruppe durch *in silico* Analyse zwei weitere zu den mGBPs homologe Gene identifiziert werden, die als mGBP9 und mGBP10 bezeichnet wurden (Alexandra Kresse, Diplomarbeit). Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Expression und subzelluläre Lokalisation von mGBP6 näher charakterisiert werden.

Durch Klonierung und Sequenzierung der voll-Längen mGBP6 cDNA aus IFN γ stimulierten ANA-1 Zellen, liesen sich vereinzelte Abweichungen der Sequenz gegenüber den bereits verfügbaren mpa2l Genebank Eintrags detektieren. Diese sind vermutlich auf frühere Sequenzierfehler zurückzuführen, da die neu ermittelte Sequenz durch Vergleich verschiedenener cDNA Klone, welche wiederum aus unabhängigen PCR Ansätzen stammten, bestätigt wurde. Dies konnte ebenfalls durch Vergleich der ermittelten cDNA Sequenz mit öffentlichen Genom Datenbanken bestätigt werden, da der genomische Locus von mpa2l die gleiche Sequenz wie das hier klonierte

Transkript aufwies (nicht gezeigt). Die komplette mGBP6 cDNA Sequenz ist in Anhang B aufgeföhrt.

Um weiterhin zu bestätigen, dass es sich bei mGBP6, mGBP7 und mGBP8 um neue Mitglieder der murinen p65 GBP Familie handelt, wurden aus den zur Verfügung stehenden cDNA Sequenzen *in silico* die putativen offenen Leserahmen ermittelt und daraus die zugehörigen Aminosäure Sequenzen bestimmt. Abbildung 3.30 zeigt das ClustalW Alignment (Thompson et al., 1994) der putativen mGBP1 bis mGBP10 Proteinsequenzen.

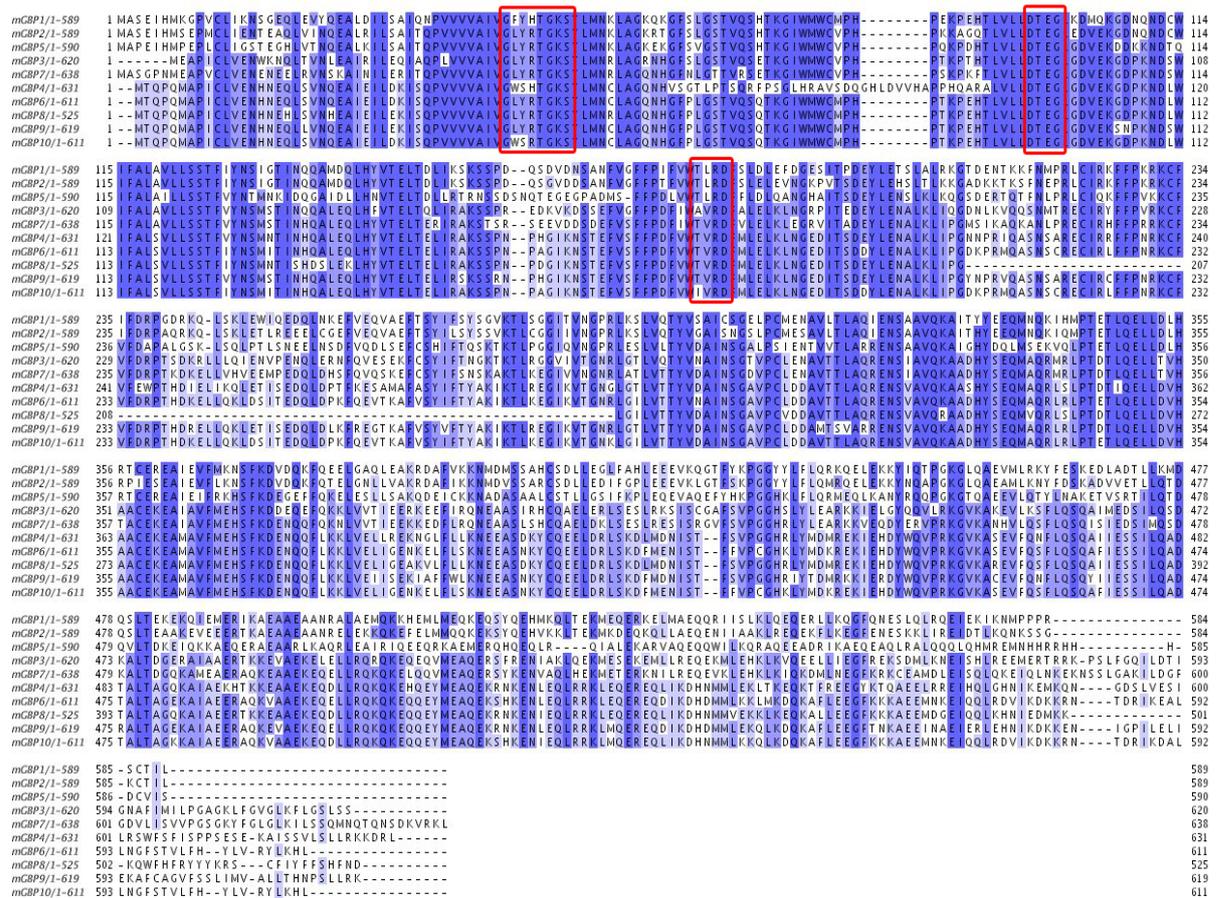


Abb. 3.30 ClustalW Alignment von mGBP1 bis mGBP10. Farbige hinterlegte Aminosäuren sind bei 50% oder mehr der gezeigten Proteine identisch. Dabei sind höher konservierte Aminosäuren dunkler hinterlegt. Die roten Quadrate markieren die konservierten G1, G3 und G4 GTP Bindemotive.

Hierbei wird deutlich, dass alle zehn mGBP Sequenzen besonders in der aminoterminalen Hälfte der Proteine hohe Homologien aufweisen, wohingegen sich die Gene im carboxyterminalen Bereich deutlich unterscheiden. Ebenfalls lassen sich die charakteristischen GTP Bindestellen in allen gezeigten Proteinsequenzen eindeutig identifizieren. Diese Sequenzmerkmale sprechen eindeutig dafür, dass mGBP6, mGBP7 und mGBP8 neue Mitglieder der murinen p65 Guanylatbindenden Proteine sind.

Durch Verwendung der „maximum likelihood“ Methode (Fisher, 1922) wurde ein phylogenetischer Stammbaum aller zehn mGBPs erstellt. Wie in Abbildung 3.31 leicht zu erkennen ist, lassen sich mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9 und mGBP10 zu einem differenzierten Homologieclustern vereinen. Diese fünf Gene sind untereinander höher verwandt als die restlichen

mGBPs, was sich anhand der Länge der Genzweige bezüglich der übergeordneten Knoten bestimmen lässt. Mittels der Software BlastAnalyzer (Dr. Jan Würthner, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene) konnten die genomischen Loci von mGBP6 und mGBP8 auf Chromosom 5 in der Maus identifiziert werden, wohingegen mGBP7 auf Chromosom 3 kodiert ist. Da sich mGBP4, mGBP9 und mGBP10 ebenfalls auf Chromosom 5 befinden, lässt sich eine eindeutige Korrelation der Sequenz Homologien zwischen mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9 und mGBP10 sowie deren chromosomaler Lokalisation finden.

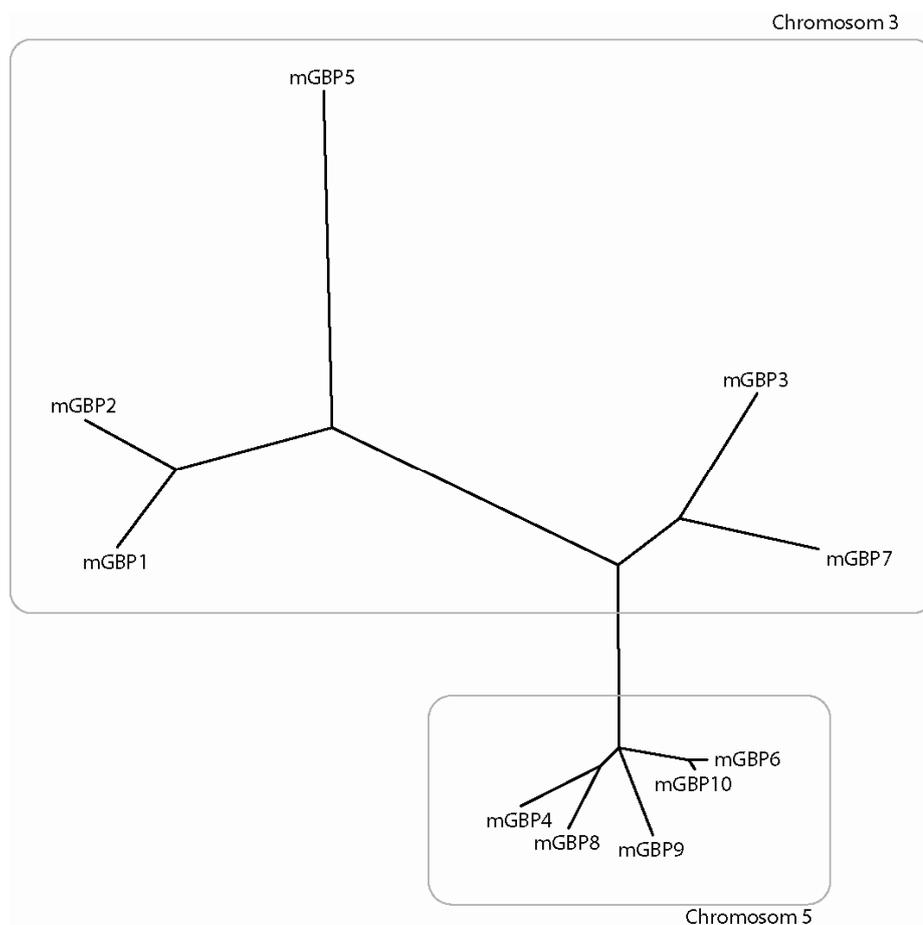


Abb. 3.31 Phylogenetischer Baum der Proteinsequenzen von mGBP1 bis mGBP10. Die Rahmen verdeutlichen die chromosomale Lokalisation der entsprechenden Genloci.

3.3.2 *In vitro* Expressionsanalysen von mGBP6

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, ist es notwendig, Microarray Daten durch alternative Methoden zu bestätigen, um zuverlässige Aussagen zu den primär erhaltenen Ergebnissen zu treffen. Daher wurde die Induzierbarkeit von mGBP6 durch $\text{IFN}\gamma$ mittels Realtime RT-PCR geprüft. Hierzu wurden in einem unabhängigen Experiment ANA-1 Zellen für zwei, sechs und 16 Stunden mit $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) stimuliert, die RNA präpariert und die daraus resultierende cDNA in einer Realtime RT-PCR Reaktion eingesetzt, welche ein für mGBP6 spezifisches Primerpaar und eine Sonde besaß. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

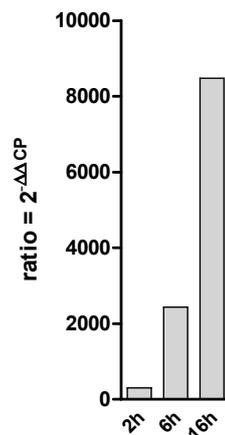


Abb. 3.32 Kinetik der Induktion von mGBP6 Transkripten nach Stimulation von ANA-1 Zellen für 2, 6 und 16 Stunden mit $\text{IFN}\gamma$. Die Balken geben die Verhältnisse der mGBP6 Transkriptmengen zur unstimulierten Kontrolle wieder.

mGBP6 ist bereits nach zwei Stunden beträchtlich induzierbar, und bis 16 Stunden nach Beginn der Stimulation ist ein kontinuierlicher Anstieg der Transkriptmengen nachweisbar. Auch hier lässt sich feststellen, dass die gemessenen Induktionsraten bei Verwendung von Realtime RT-PCR deutlich höher sind als der bei den Microarrays durchschnittlich gemessene Anstieg von etwa 50-facher Induktion nach 16 Stunden $\text{IFN}\gamma$ Gabe gegenüber unstimulierten Zellen. Zum einen ist dies vermutlich auf die höhere Sensitivität der PCR Reaktion zurückzuführen (Rajeevan et al., 2001), zum anderen könnten die sehr hohen Expressionsraten von mGBP6 nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation zu einer Sättigung der auf den Arrays vorhandenen Sonden geführt haben, wodurch ein höherer Anstieg nicht mehr messbar wird.

Weiterhin wurde geprüft, ob mGBP6 durch weitere Zytokine und TLR-Liganden in der Expression veränderbar ist. Hierfür wurden, analog zu dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Versuch, ANA-1 Zellen in unabhängigen Experimenten über 16 Stunden mit $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml), TNF (10 ng/ml), $\text{IFN}\gamma$ +TNF, $\text{IFN}\beta$ (10 ng/ml), Interleukin 1 β (IL-1 β ; 10 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Listerien LTA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CpG ODN 1668 (1 μM) und polyIC (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Als Referenz dienten unstimulierte Zellen, die ansonsten identisch behandelt wurden. (Abbildung 3.33).

Hierbei wurde deutlich, dass TNF allein nur geringe Auswirkungen auf die Expression des Gens aufzeigt, Kostimulation mit $\text{IFN}\gamma$ führt zu einer weiteren Steigerung der Transkriptmengen

gegenüber IFN γ stimulierten Zellen, welche in den Ergebnissen aus den Microarray Experimenten nicht signifikant erschien. Zusätzlich lässt sich erkennen, dass die Zytokine IFN β und IL-1 β , welche ebenfalls aktivierend auf Makrophagen wirken, zu einer deutlichen Induktion des Gens führen. Für IL-1 β jedoch ist die Induktion deutlich schwächer ausgeprägt als für IFN β . Die TLR-Liganden LTA, LPS, CpG und polyIC waren ebenfalls in der Lage, die Expression des Gens zu erhöhen, wobei LPS den größten und polyIC den geringsten Effekt aufwiesen.

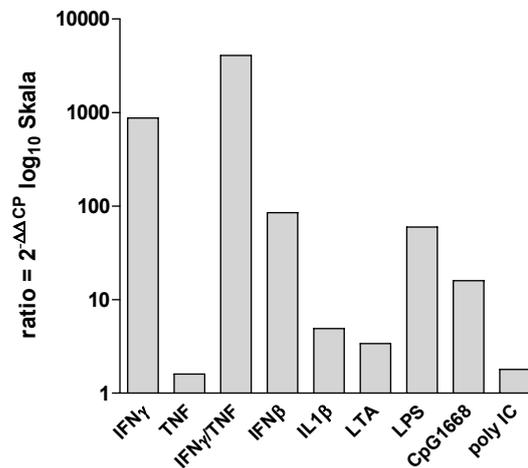


Abb. 3.33 Induktion von mGBP6 Transkripten in ANA-1 Zellen nach Stimulation mit ausgewählten Zytokinen und TLR Agonisten. Die Ordinate ist als log₁₀ Skala dargestellt. Die Balken geben die Verhältnisse der mGBP6 Transkriptmengen zur unstimulierten Kontrolle wieder.

3.3.3 mGBP6 Expression in Mäusen nach *Toxoplasma gondii* Infektion

In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass humanes GBP1 (hGBP1) und mGBP2 schwache antivirale Funktionen bei Infektion von HeLa oder NIH3T3 Zellen mit VSV oder EMCV übernehmen können (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Gene aus der Familie der p65 GBPs bei muriner Listeriose transkriptionell aktiviert werden (Degrandi, Konermann, Beuter-Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht), was bereits durch frühere Studien angedeutet wurde (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Infektionen mit dem intrazellulär replizierenden Parasiten *T. gondii* Einfluß die auf mGBP Expression nehmen können. Hierfür wurden die in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Proben zur Bestimmung der mGBP6 Expression in Lunge und Milz von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit *T. gondii* mittels Realtime RT-PCR eingesetzt. Zusätzlich wurde zum Vergleich die Expression der bereits früher publizierten mGBP 1/2/3/4/5 (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002) ebenfalls untersucht. Als Kontrolle dienten uninfizierte Mäuse (Abb. 3.34).

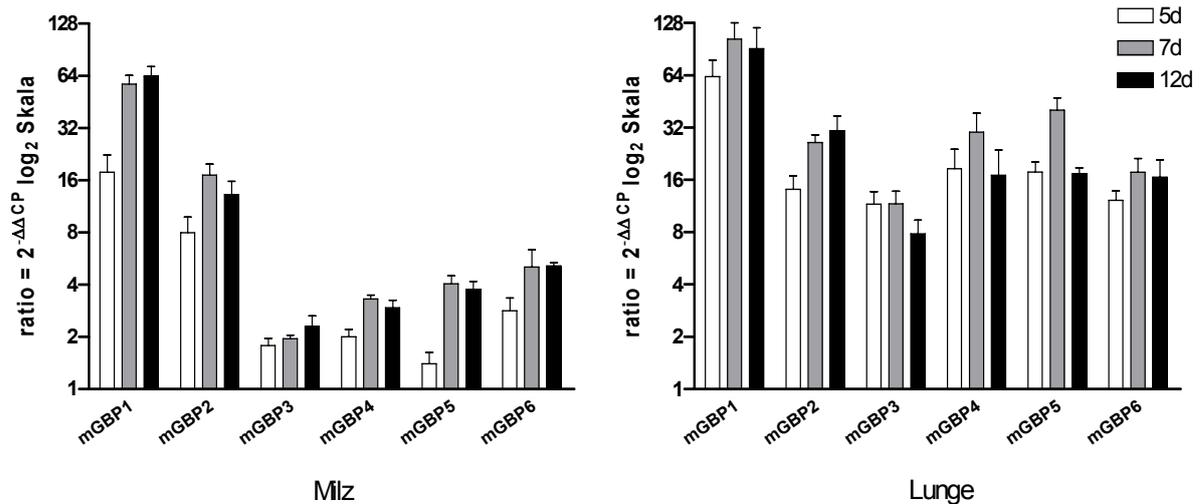


Abb. 3.34 Induktion von mGBP1/2/3/4/5/6 RNA in Milz und Lunge von *T. gondii* infizierten Mäusen.

Sowohl in der Milz als auch in der Lunge konnte bereits nach fünf Tagen Infektion nachgewiesen werden, dass mGBP6 durch *T. gondii* induziert wird. Dabei lässt sich in der Lunge eine deutlich höhere Induzierbarkeit des Gens feststellen. Die Expression von mGBP6 war nach sieben Tagen Infektion in beiden Organen etwa um den Faktor zwei gegenüber fünf Tage Infektion erhöht und blieb bis zwölf Tage nach Infektion konstant. Abbildung 3.34 zeigt allerdings auch, dass weitere mGBPs nach *T. gondii* Infektion in beiden Organen induzierbar sind. Auffällig hierbei ist, dass sich die Induktionsraten zwischen den Genen in der Milz deutlich stärker unterscheiden als in der Lunge. Das mGBP1 Transkript konnte in beiden Organen mit den höchsten Raten induziert werden, wohingegen mGBP3 und mGBP4 in der Milz nur geringe Veränderungen in ihrer Expression aufwiesen. In der Lunge hingegen konnten alle untersuchten mGBPs induziert werden, wobei nach sieben Tagen Infektion bereits die höchsten Transkriptmengen gemessen wurden, welche bei mGBP3, mGBP4 und mGBP5 nach zwölf Tagen Infektion wieder rückläufig waren.

3.3.4 Intrazelluläre Lokalisation von mGBP6

In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass das Genprodukt von mGBP2 in subzellulären Strukturen angeordnet ist, welche häufig als granulär oder vesikelartig charakterisiert wurden. Die genaue Identität dieser Strukturen konnte allerdings bislang nicht näher bestimmt werden (Vestal et al., 2000). Als neu identifiziertes Mitglied der mGBP Familie sollte die subzelluläre Lokalisation von mGBP6 untersucht werden, wobei insbesondere die Wirkungen intrazellulärer Infektionserreger wie Listerien und Toxoplasmen in Makrophagen auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins untersucht wurde. Da zunächst keine für mGBP6 spezifischen Antikörper oder Seren zur Verfügung standen, wurde ein cDNA Fusionskonstrukt kloniert, welches am 3' Ende des offenen

Leserahmens von mGBP6 zusätzlich die DsRed Sequenz besitzt. Nach transienter Transfektion des so generierten Expressionsvektors, sollte von den Zellen ein mGBP6 Protein gebildet werden, welches am Carboxylterminus das rot-fluoreszierende DsRed Protein aufweist. Im Gegensatz zu mGBP2 besitzt mGBP6 am C-Terminus keine Isoprenylierungssequenz. Somit ist nicht zu erwarten, dass die DsRed-Markierung die Lokalisation innerhalb der Zelle nennenswert verändert. Trotzdem wurde zur Kontrolle zusätzlich ein N-terminal markiertes Fusionskonstrukt kloniert. Dieses zeigte sowohl in RAW264.7 als auch in 293T Zellen sehr ähnliche Lokalisationseigenschaften wie das C-terminal markierte Protein, führte allerdings zu geringeren Fluoreszenzintensitäten (Daten nicht gezeigt), weswegen in den folgenden Experimenten stets das C-terminal markierte Konstrukt verwendet wurde.

Um die subzelluläre Lokalisation von mGBP6 in Makrophagen zu bestimmen, wurden RAW264.7 Zellen anhand des in Abschnitt 2.8.3 beschriebenen Protokolls mit dem mGBP6-DsRed Konstrukts transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit dem Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt, fixiert und im Konfokalmikroskop untersucht (Abb. 3.35). Das mGBP6-DsRed Fusionsprotein war in RAW Zellen granulär bzw. vesikelartig lokalisiert. Es waren nur sporadisch Überlappungen mit dem DAPI Farbstoff zu erkennen, was dafür spricht, dass das mGBP6 Protein sich im Zytosol und nicht im Zellkern befindet.

Gleichermaßen wurden transfizierte RAW Zellen untersucht, welche 24 Stunden nach Transfektion für weitere 24 Stunden mit IFN γ stimuliert wurden, jedoch zeigte sich keine signifikante Veränderung der intrazellulären Lokalisation von mGBP6 (Daten nicht gezeigt).

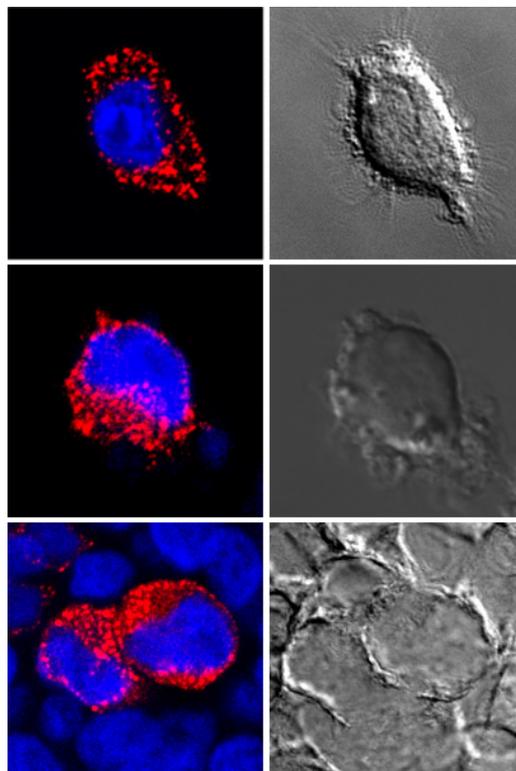


Abb. 3.35 Subzelluläre Lokalisation von mGBP6-DsRed in RAW264.7 Zellen. Die erste Spalte zeigt in rot das mGBP6-DsRed Protein und in blau den Kernfarbstoff DAPI. Die zweite Spalte zeigt Differentialkontrastaufnahmen der Zellen.

Um zu prüfen, ob während der Infektion mit intrazellulären Erregern die Lokalisation des mGBP6 Proteins innerhalb der Zellen beeinflusst wird, wurde zunächst das Modell der Listerien Infektion gewählt, welches routinemäßig als Modellsystem für Infektionen mit intrazellulären Bakterien verwendet wird. Dafür wurden RAW264.7 Zellen mit mGBP6-DsRed transfiziert, nach 24 Stunden mit IFN γ stimuliert (100 U/ml) und nach weiteren 16 Stunden die Zellen für 30 Minuten mit EGFP-exprimierenden Listerien (Verhältnis Zellen:Listerien 1:10) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen und Gegenfärbung mit DAPI wurden die Zellen im Konfokalmikroskop untersucht (Abbildung 3.36). Es konnte keine auffällige Veränderung der Lokalisation von mGBP6-DsRed beobachtet werden, diese ist wie vorher beschrieben in granulären bzw. vesikelartigen Strukturen, die jedoch nicht mit der EGFP Fluoreszenz der Listerien assoziiert zu sein scheinen. Auch Zellen, welche keine Präinkubation mit IFN γ erfahren hatten zeigten keine veränderte Lokalisation des mGBP6-DsRed Fusionsproteins nach Listerieninfektion.

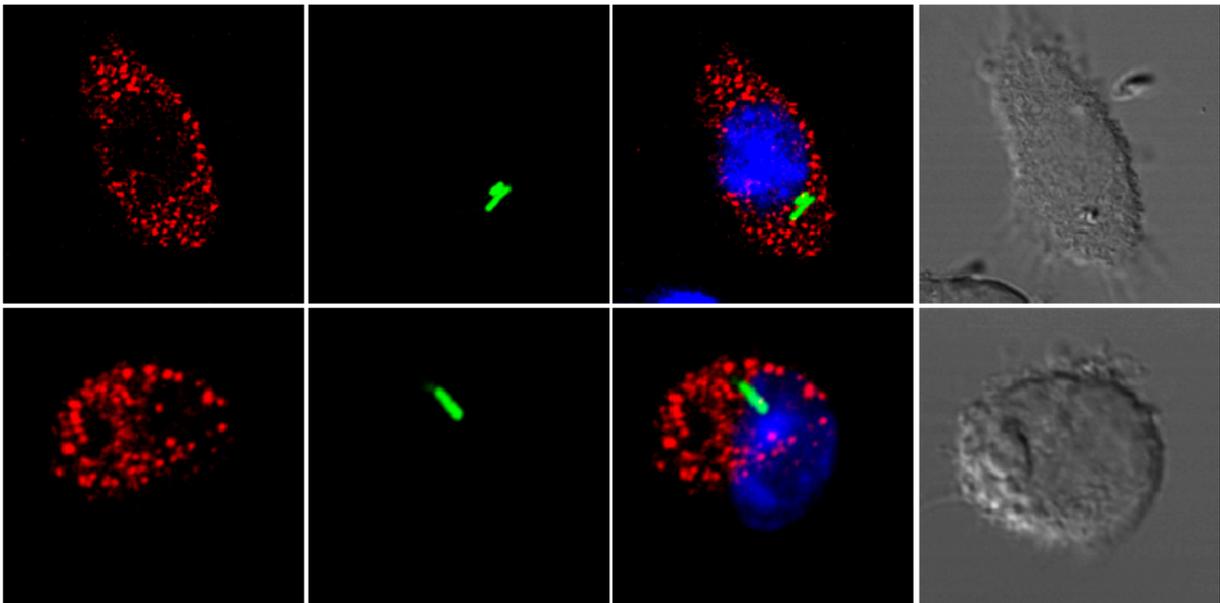


Abb. 3.36 Lokalisation des mGBP6-DsRed Fusionsproteins in *L. monocytogenes* infizierten RAW Makrophagen. Die erste Spalte zeigt in Rot das mGBP6 Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün das Pathogen. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte eins und zwei mit dem Kernfarbstoff DAPI. Die vierte Spalte zeigt Differentialkontrastaufnahmen der entsprechenden Zellen.

Weiterhin wurde getestet, ob *Toxoplasma gondii*, als Modellorganismus für intrazelluläre parasitäre Infektionen, Einfluß auf die mGBP6 Verteilung in RAW264.7 Zellen ausübt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit mGBP6-DsRed transfiziert, nach 24 Stunden für weitere 16 Stunden mit IFN γ stimuliert und schließlich mit Toxoplasmen (Stamm ME49, Verhältnis Zellen:Parasiten 1:50) für zwei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und permeabilisiert, dann mit einem spezifischen Antikörper gefärbt, welcher das *T. gondii* Oberflächenprotein SAG1 detektiert. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls im konfokalen Mikroskop analysiert (Abbildung 3.37).

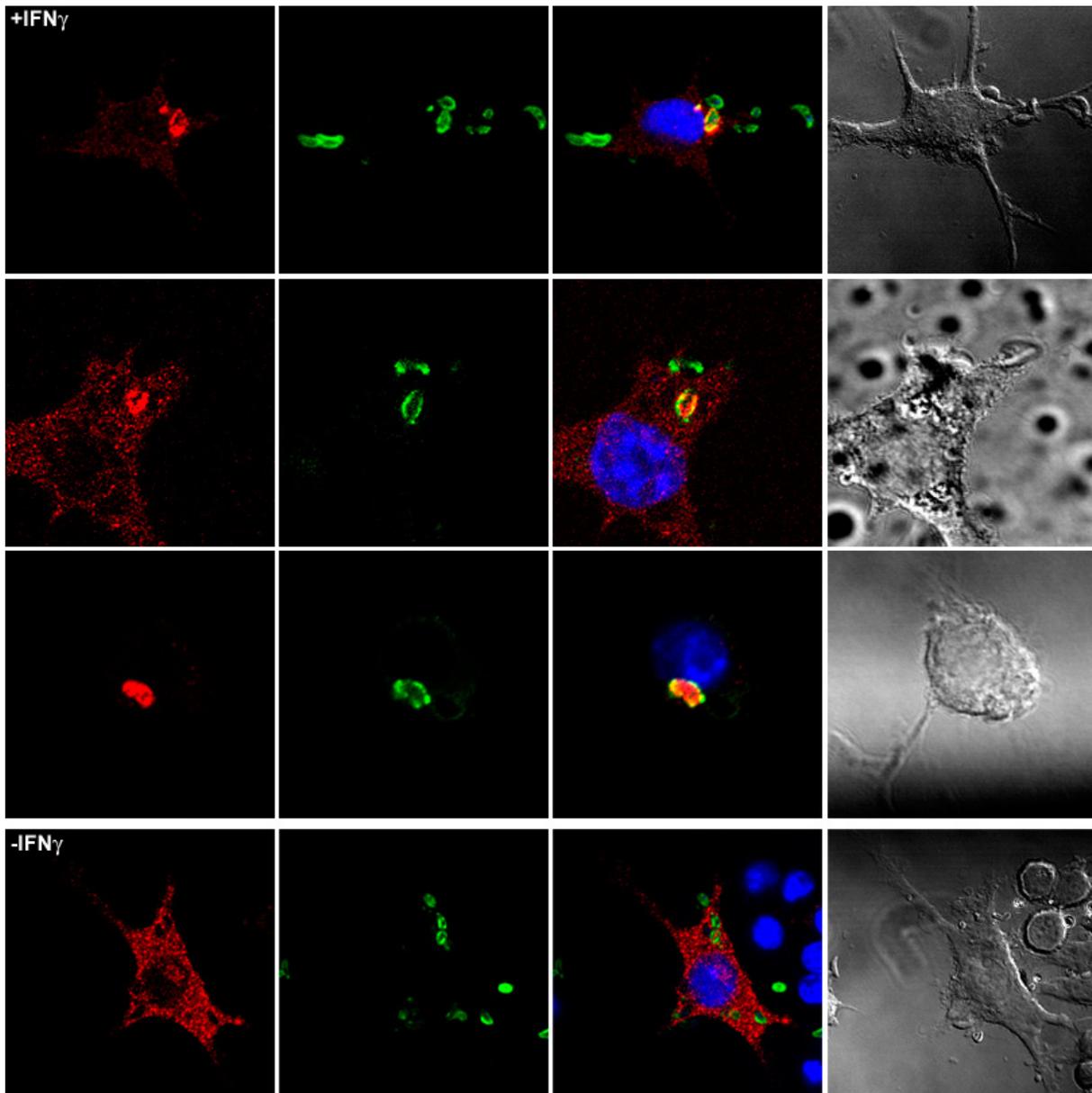


Abb. 3.37 Lokalisation der mGBP6-DsRed Fusionsproteine in *T. gondii* infizierten RAW Makrophagen mit (+IFN γ) und ohne (-IFN γ) Präinkubation mit IFN γ . Die erste Spalte zeigt in Rot das mGBP6 Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün das Pathogen. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte eins und zwei mit dem Kernfarbstoff DAPI. Die vierte Spalte zeigt Differentialkontrastaufnahmen der entsprechenden Zellen.

In diesen Experimenten ließ sich ein klarer Effekt der Toxoplasmen Infektion auf mGBP6 feststellen. Die zytosolische DsRed Fluoreszenz war in den meisten Zellen deutlich geringer als bei nicht-infizierten Zellen. Außerdem konnte eine klare Kolokalisation von mGBP6-DsRed mit der Toxoplasmen Oberfläche detektiert werden, welche sich durch die gelbe Farbe in der Überlagerung der LSM-Einzelbilder erkennen lässt.

In Abbildung 3.37 sind zusätzlich infizierte Zellen gezeigt, welche vor Infektion keine Präinkubation mit IFN γ erfahren haben. In diesen Zellen konnte interessanterweise keine Umverteilung der mGBP6-DsRed Fluoreszenz detektiert werden. Wurde IFN γ gleichzeitig mit den Toxoplasmen zu den Zellen hinzugegeben, war ebenfalls keine Umverteilung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Toxoplasmen sind in der Lage, aktiv in Zellen einzudringen. Nach erfolgter Invasion der Zellen bilden Toxoplasmen eine sogenannte parasitophore Vakuole (PV) aus, ein Membranschlossenes Kompartiment innerhalb der Zelle, worin sich der Parasit teilen und vermehren kann. Dabei handelt es sich um Zellmembran der Wirtszelle, welche beim Eindringen des Pathogens ins Zytosol eingestülpt wird, und sich schließlich innerhalb der Zelle von der restlichen Zellmembran abschnürt und das Toxoplasma einschließt. Dieser Prozess wird aktiv vom Parasit gesteuert und ermöglicht es ihm weitgehend inert im Zytosol zu persistieren (Beyer et al., 2002). Jedoch können Toxoplasmen auch passiv durch phagozytierende Zellen aufgenommen werden, wie beispielsweise durch Makrophagen. Phagozytierte Toxoplasmen befinden sich in Phagosomen, welche schließlich durch Fusion mit Lysosomen zur Lyse des Pathogens führen (siehe Abschnitt 1.2.1). Aus Abbildung 3.37 ist nicht ersichtlich, ob das mGBP6 Protein Assoziation mit der PV zeigt oder Teil des phagolysosomalen Komplexes ist. Daher wurden mGBP6-DsRed transfizierte RAW Makrophagen mit Toxoplasmen infiziert, welche zuvor 15 Minuten bei 65°C inkubiert wurden. Dabei wird ein Großteil der Parasiten inaktiviert. Inaktivierte Toxoplasmen können nicht mehr aktiv die Zelle invadieren und werden von Makrophagen phagozytiert. Der Versuch wurde analog zu oben durchgeführt, jedoch wurde auf eine direkte Färbung des Parasiten verzichtet. Um phagozytierte Toxoplasmen von aktiv eingedrungenen zu unterscheiden, wurde als Gegenfärbung ein Lamp-1 reaktiver Antikörper verwendet, welcher spezifisch Lysosomen anfärbt. Als Vergleich wurden parallel Zellen mit unbehandelten Toxoplasmen infiziert, und in einem unabhängigen Ansatz die Zellen mit einer Mischung aus unbehandelten und inaktivierten Toxoplasmen (1 zu 1) infiziert. Alle Zellen wurden vor Infektion über Nacht mit IFN γ stimuliert und zwei Stunden lang mit den Parasiten inkubiert.

Wie in Abbildung 3.38 dargestellt ist, war keine Kollokalisierung von mGBP6-DsRed mit phagozytierten hitzeinaktivierten Toxoplasmen nachweisbar, welche allerdings durch Färbung mit anti-Lamp-1 „sichtbar“ wurden. Lebende Parasiten konnten nicht in Lamp-1 positiven Kompartimenten gefunden werden, was dafür spricht, dass diese sich in einer PV befinden und nicht in Phagolysosomen. Werden die Zellen mit einer Mischung aus hitzeinaktivierten und unbehandelten Toxoplasmen infiziert, lässt sich auch hier feststellen, dass das mGBP6 Fusionsprotein nur mit Lamp-1 negativen Parasiten kollokalisiert.

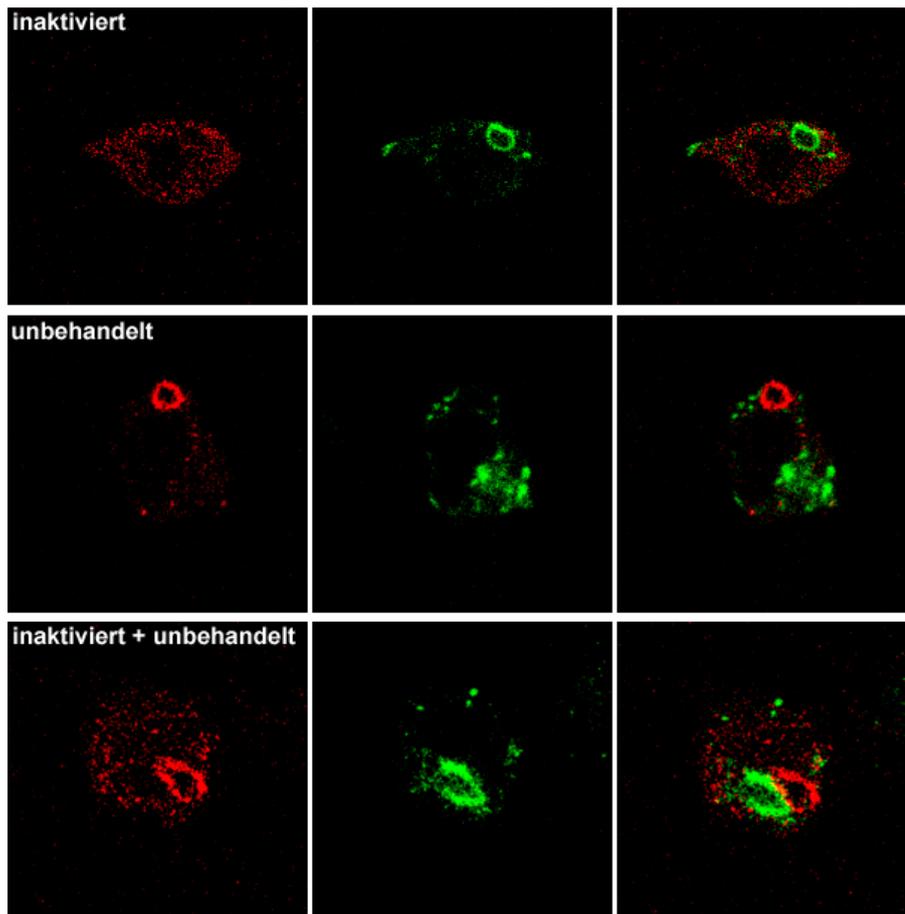


Abb. 3.38 Subzelluläre Lokalisation des mGBP6-DsRed Fusionsproteins in RAW Makrophagen infiziert mit hitze-inaktivierten *T. gondii*, unbehandelten *T. gondii* oder einer Mischung aus beiden. Die erste Spalte zeigt in Rot das mGBP6 Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün Lamp-1 Färbung. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte eins und zwei.

Aufgrund der in diesem Abschnitt vorgestellten Beobachtungen lässt sich zusammenfassend schließen, dass mGBP6 in RAW264.7 Zellen granulär bis vesikelartig verteilt ist. Nach Infektion der Zellen mit *Toxoplasma gondii* erfolgt eine Umverteilung des Proteins innerhalb der Zelle, was zu einer Assoziation von mGBP6 mit der parasitophoren Vakuole des Parasiten führt. Dieser Prozess ist von einer Präinkubation der Zellen mit IFN γ abhängig. Aufnahme von Toxoplasmen durch Phagozytose durch die Makrophagen führt zu keiner subzellulären Umverteilung von mGBP6. Die Infektion von RAW264.7 Zellen mit *Listeria monocytogenes* führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der mGBP6 Lokalisation in der Zelle.

3.3.5 Subzelluläre Lokalisation von mGBP6 GTP-Bindungsmotiv Mutanten

Aufgrund der Aminosäure Sequenz von mGBP6, konnten im Protein drei putative GTP-Bindestellen identifiziert werden, welche hohe Motivhomologien zu den früher beschriebenen mGBP1 bis mGBP5 GTP-Bindestellen besitzen (s. Abb. 3.30). Diese Bindestellen sind in der Lage, GTP sowohl zu GDP als auch zu GMP zu hydrolysieren, eine einzigartige Eigenschaft der mGBP Familie (s. Abschnitt 1.3.3). Aufgrund der bis dato geringen Verfügbarkeit an Daten bezüglich der molekularen Funktion von mGBPs konnte bislang die Bedeutung der mGBP GTP Bindung und GTPase Aktivität nicht aufgeklärt werden. Studien über GTP-Bindestellen Mutanten von hGBP1, welche nicht mehr in der Lage waren GTP zu binden oder zu hydrolysieren, haben gezeigt, dass GTP Bindung, jedoch nicht Hydrolyse, essentiell zur Assoziation des Proteins mit dem Golgi-Apparat notwendig ist (Modiano et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass mGBP6, nach IFN γ Behandlung der Zellen, mit intrazellulären Toxoplasmen assoziiert. Um den Effekt der GTP Bindung und der GTP-Hydrolyse auf diesen Prozess zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche mGBP6 Mutanten kloniert, welche jeweils eine Punktmutation innerhalb der beschriebenen GTP Bindestellen besaßen.

Zur gezielten Punktmutation von einzelnen Aminosäuren wurde das „QuikChange site-directed mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Als Ausgangsvektor wurde der in Abschnitt 3.3.4 beschriebene mGBP6-DsRed Vektor verwendet. Somit konnten die entstehenden Vektoren direkt zur Transfektion von Zellen und Visualisierung der mutanten Proteine im Konfokalmikroskop verwendet werden. Die Mutagenese Reaktion wurde anhand der vom Hersteller bereitgestellten Anleitung durchgeführt. Die verwendeten Mutagenese Primer sind in Abschnitt 2.6 aufgelistet.

Um die zu mutierenden Aminosäuren auszuwählen, wurden publizierte Studien bezüglich der GTP-Bindungs- und Hydrolyse-Eigenschaften von hGBP1 Mutanten herangezogen (Praefcke et al., 2004). In der ersten Mutante wurde die Aminosäure Arginin 46 zu Alanin (R46A) mutiert. Das mGBP6-Arginin 46 entspricht im hGBP1 Protein dem Arginin 48. Für diese hGBP1 Mutante wurde beschrieben, dass das Protein ähnlich hohe GTP Affinität wie das Wildtyp Protein besitzt, jedoch deutlich verringerte GTP Hydrolyse Aktivität aufweist, vermutlich durch Verhinderung der beschriebenen GTP-abhängigen Oligomerisierung des Proteins. In der zweiten Mutante wurde die Aminosäure Threonin 73, welche sich in der sogenannten „switch I“ Region befindet, zu Alanin (T73A) mutiert. Dieser Aminosäure wird zugeschrieben, dass sie zwar zur GTP Bindung beiträgt, jedoch entscheidender zur Bindung von Magnesium Ionen beiträgt, welche als Kofaktoren bei GTP-Bindung und Hydrolyse dienen. Die entsprechende hGBP1 Mutante weist verringerte GTP-Bindungs- und Dissoziationsraten auf. Die GTP-Hydrolyse Rate ist auch hier

stark eingeschränkt. Als dritte Mutante wurde die Aminosäure Aspartat 182 zu Asparagin (D182N) mutiert. Die entsprechende D184N Mutante in hGBP1 zeigt stark verminderte Affinität zu GTP, die Hydrolyseraten sind jedoch ähnlich zum Wildtyp.

Alle drei Mutanten wurden zur transienten Transfektion von RAW264.7 Zellen verwendet. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gegengefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht (Abbildung 3.39).

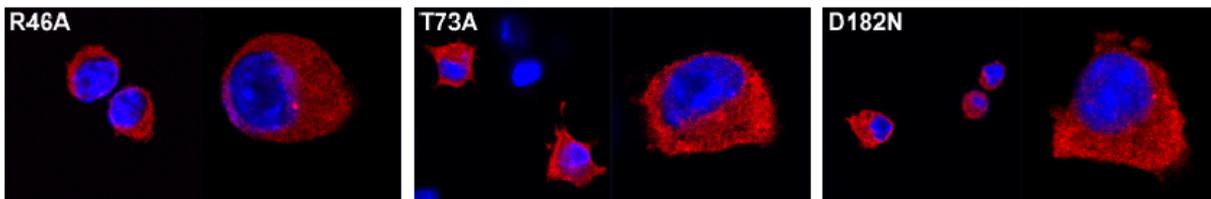


Abb. 3.39 Lokalisation von R46A, T73A und D182N mGBP6-DsRed Mutanten in RAW264.7 Zellen. Es sind jeweils zwei Abbildungen pro Mutante gezeigt. Rot: mGBP6-DsRed Mutanten. Blau: Kernfarbstoff DAPI.

Alle drei Mutationen führen zu einer homogenen Lokalisation des mGBP6 Proteins im Zytosol, das heisst die granuläre bzw. vesikelartige Verteilung des Wildtyp mGBP6 Proteins war hier komplett aufgehoben.

Als nächstes wurde untersucht, wie sich die beschriebenen GTP-Bindestellen Mutanten bei Infektion der transfizierten Zellen mit *T. gondii* verhalten. Hierfür wurden RAW264.7 Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert, nach 24 Stunden für weitere 16 Stunden mit IFN γ (100 U/ml) stimuliert und schließlich zwei Stunden lang mit Toxoplasmen inkubiert (Stamm ME49, Verhältnis Zellen:Parasiten 1:50). Schließlich wurden die Präparate mit anti-SAG-1 Antikörper und DAPI gegengefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht (Abb. 3.40).

Die Mutanten R46A und T73A zeigten bei keiner der untersuchten Zellen eine Assoziation des Proteins mit intrazellulären Toxoplasmen. Nach Infektion blieb die Fluoreszenz homogen im Zytosol verteilt. Bei der Mutante D182N hingegen ließ sich eine Umverteilung des Proteins zum Pathogen erkennen. Bei einigen Zellen jedoch, schien das mutante mGBP6 Protein das Pathogen nicht vollständig zu umschließen (Abbildung 3.40, unterste Reihe), wozu jedoch Wildtyp mGBP6 in der Lage war. Weiterhin ließ sich beobachten, dass, trotz teilweiser Umverteilung des D182N Proteins, die homogene zytosolische Fluoreszenz des mutanten mGBP6 Proteins weitgehend erhalten blieb.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich zusammenfassend schließen, dass alle gezeigten Mutationen in den GTP-Bindestellen Veränderungen der natürlichen subzellulären Lokalisation von mGBP6 bewirken. Die Fähigkeit zur IFN γ abhängigen Umverteilung des Proteins nach *T. gondii* Infektion scheint jedoch von den molekularen Auswirkungen bezüglich GTP-Affinität und Hydrolyse der beschriebenen Mutationen abzuhängen. Diese Punkte werden in Abschnitt 4.3.4 ausführlicher diskutiert.

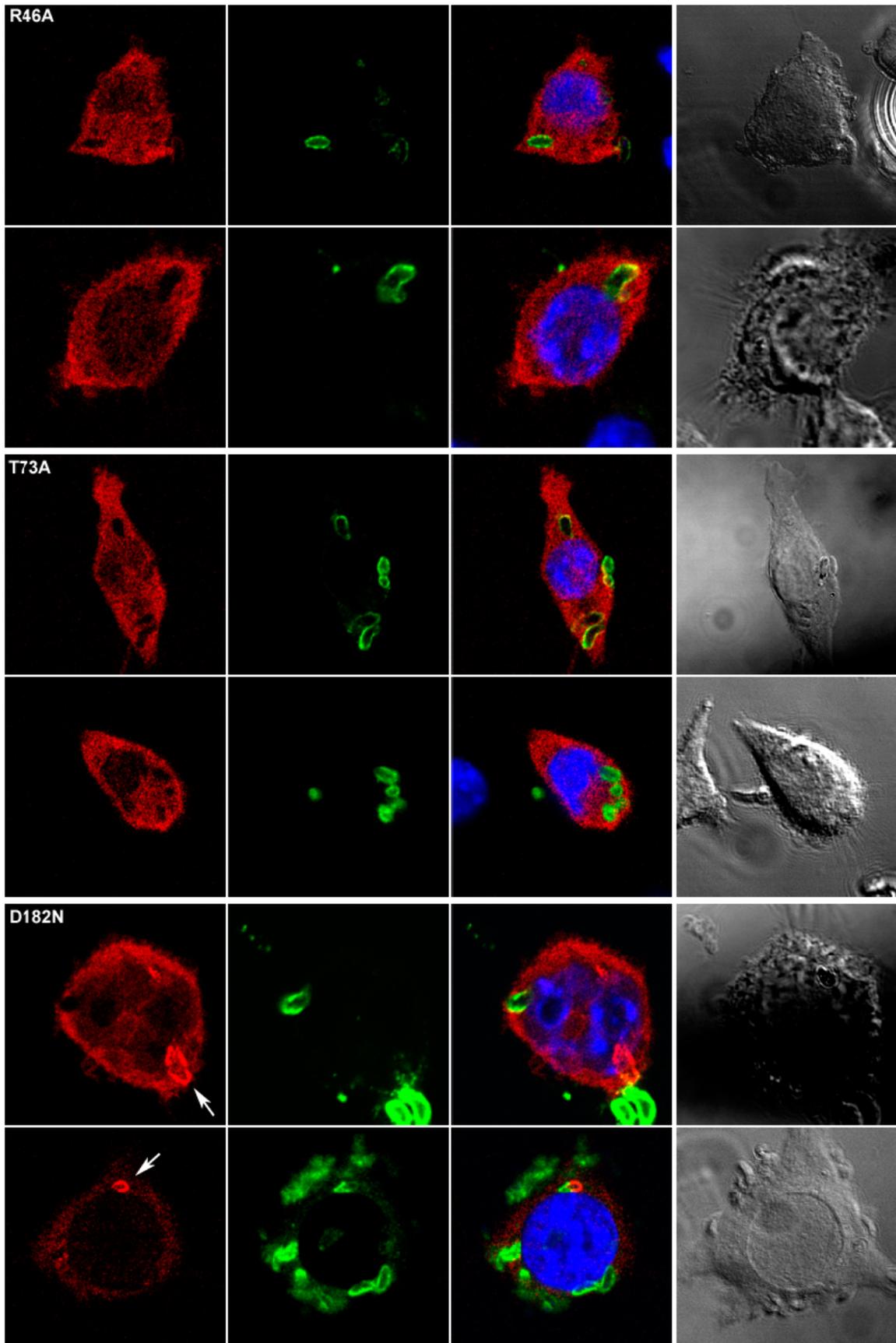


Abb. 3.40 Lokalisation des R46A, T73A und D182N mGBP6-DsRed Fusionsproteins in *T. gondii* infizierten RAW Makrophagen nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation. Die erste Spalte zeigt in Rot das mGBP6 Protein. Die zweite Spalte zeigt in Grün das Pathogen. Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung aus Spalte eins und zwei mit dem Kernfarbstoff DAPI. Die vierte Spalte zeigt Differentialkontrast Aufnahmen der Zellen. Pfeile: Akkumulation der D182N mGBP6-DsRed Fusionsproteine um die Toxoplasmen PV.

4 Diskussion

4.1 Transkriptomanalyse von IFN γ und / oder TNF stimulierten murinen Makrophagen

Microarrayanalysen erlauben es, in einem relativ kurzen Zeitraum, Einblick in das transkriptionelle Verhalten von Zellpopulationen oder Geweben zu erlangen. Die grundlegenden Prinzipien dieser Technik entstanden aus dem Interesse, Gene zu identifizieren, die unter bestimmten experimentellen Bedingungen oder im Rahmen klinischer Studien, differentiell exprimiert werden, um die zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge besser verstehen zu können. Microarrays sind heutzutage nicht mehr aus der medizinisch-biologischen Forschung wegzudenken und haben zu einem beträchtlichen Anteil dazu beigetragen, Organismen und Zellen von einem systembiologischen Kontext heraus zu betrachten. Dank öffentlich zugänglicher Genomdatenbanken und einer wachsender Zahl an Transkriptomanalysen kennen wir nicht nur den Großteil der Gene des Menschen, der Maus und vieler anderer Organismen, sondern können auch zunehmend Aussagen zu genomweiten Interaktions- und Regulationsnetzwerken treffen. Durch Microarrays können wir auch die Wechselbeziehungen zwischen Genomen unterschiedlicher Organismen betrachten, wie zum Beispiel im Rahmen einer Immunabwehr bei der Wirt-Pathogen Interaktion.

Die hier vorgelegte Arbeit konzentrierte sich auf das transkriptionelle Verhalten muriner Makrophagen in der Antwort auf die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF, die als essentiell gelten, um antipathogene Funktionen zu aktivieren (Buchmeier und Schreiber, 1985; Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993; Leenen et al., 1994). Dafür wurden ANA-1 Zellen mit IFN γ , TNF oder einer Kombination aus beiden Zytokinen stimuliert und deren Transkriptionsverhalten, mittels der GeneChip Array Technologie der Firma Affymetrix, mit unstimulierten Zellen verglichen. Die Stimulation der Zellen mit beiden Zytokinen sollte dazu dienen, Gene zu identifizieren, die durch synergistische Effekte beider Zytokine reguliert werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein solcher Synergismus im Rahmen einer Immunantwort vorhanden sein muss. Ding et al. konnten zeigen, dass iNOS in peritonealen Makrophagen durch Synergismus von IFN γ und TNF hochreguliert wird (Ding et al., 1988). Endres et al. konnten in peritonealen Exudat Zellen aus TNFR1 defizienten Mäusen bestätigen, dass *in vitro* keine Induktion von iNOS durch IFN γ und TNF mehr möglich ist (Endres et al., 1997). In murinen Hepatozyten konnten Haponsaph et al. zeigen, dass ein Zusammenwirken beider Zytokine benötigt wird, um das intrazelluläre Wachstum von *L. monocytogenes* zu inhibieren, jedoch unabhängig von RNI oder ROI Generierung (Haponsaph und Czuprynski, 1996).

TNFR1 defiziente Mäuse sind nicht in der Lage Infektionen mit *L. monocytogenes* zu kontrollieren (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993). Bemerkenswerterweise kann man *in vivo*

nach Infektion jedoch iNOS und Phox Aktivität nachweisen. Trotz dieser aktiven essentiellen Effektormechanismen, können Listerien ungehemmt wachsen (Endres et al., 1997). Diese Befunde sprechen dafür, dass proinflammatorische Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ und TNF, bislang unentdeckte Mechanismen in Gang setzen, möglicherweise durch Regulation von Effektorgenen, um effektive bakterizide Aktivität der Effektorzellen zu erreichen. Entsprechend war ein Ziel dieser Arbeit eben solche Gene zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

Insgesamt konnten 234 Gene identifiziert werden, die durch $\text{IFN}\gamma$ und/oder TNF in ANA-1 Makrophagen differentiell exprimiert werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine Anzahl von 14 Genen, aufgrund der verwendeten mathematischen Detektionsverfahren, als potentiell falsch positiv zu bewerten ist. In Anhang A sind alle als differentiell exprimiert detektierten Gene aufgelistet. Einige dieser Gene zeigen, über die verschiedenen Experimentalbedingungen, nur marginale Änderungen in ihrer Expression. Erst eine Überprüfung dieser Ergebnisse mit alternativen experimentellen Techniken erlaubt es, zuverlässige Aussagen über das Expressionsverhalten dieser Gene zu treffen. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit für die meisten Gene nicht durchgeführt werden, und muss daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Durch die in Abschnitt 3.1.3 beschriebene Cluster Analyse wurde das Expressionsverhalten der differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit des verwendeten Stimulus aufgedeckt. Ein Großteil dieser Gene wird von $\text{IFN}\gamma$ induziert oder inhibiert. Es wird vermutet, dass $\text{IFN}\gamma$ die Expression mehrerer hundert Gene reguliert (Boehm et al., 1997). Somit ist dieser Befund zunächst nicht überraschend, zeigt jedoch auch, dass die Anzahl der von $\text{IFN}\gamma$ reguliert detektierten Gene weitaus geringer ist als allgemein angenommen. Verschiedene Ursachen kommen hierfür in Betracht. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass in Abhängigkeit des untersuchten Zelltyps, Unterschiede in der $\text{IFN}\gamma$ Responsivität der Gene zu erwarten ist, zum anderen hat das Design der verwendeten Microarrays großen Einfluß auf die Detektion exprimierter Transkripte, was darauf zurückzuführen ist, dass nur ein Teil des Genoms auf den Arrays repräsentiert ist oder die Detektionssonden qualitativ unzureichend sind, um eine spezifische Expression zu detektieren.

4.1.1 $\text{IFN}\gamma$ induzierte Gene (Cluster C1)

Unter den Genen, die von $\text{IFN}\gamma$ induziert werden (Cluster C; s. Abb. 3.1), findet man zahlreiche GTPasen aus der Gruppe der IFN-induzierbaren GTPasen. Da die Untersuchung einiger dieser Gene wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist, werden sie später in den Abschnitten 4.1.5 und 4.3 ausführlicher diskutiert. Weiterhin lassen sich zahlreiche Gene erkennen, die den typischen von $\text{IFN}\gamma$ induzierten transkriptionellen Effekten zugeordnet werden können. Darunter fällt die Erhöhung der Antigenpräsentation durch Induktion von MHC Klasse I und II Loci, $\beta 2$

Mikroglobulin, Immunoproteasom Untereinheiten (proteasome subunit 8, 9, 10) und Proteasom Aktivator PA28 (proteasome subunit 28), TAP Transporter sowie lysosomale Proteasen wie Cathepsin S, die Induktion von Chemokinen (CCL5, CXCL9, CXCL11), die Induktion von Komplement Komponenten (z.B. complement component 3) sowie von Transkriptionsfaktoren wie IRF-1 und STAT1 (s. Abschnitt 1.2.1; Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004).

Die Induktion von STAT1 zeugt von einem positiven „feedback loop“ des IFN γ Signalwegs in ANA-1 Zellen. In der Tat konnten Hu et al. zeigen, dass ein niedrig dosierter IFN γ Stimulus auf Makrophagen zu einer zusätzlichen Sensitivität der Zellen auf nachfolgende IFN γ Behandlungen führt (Hu et al., 2002). STAT1 ist für die Bildung zweier in JAK-STAT Signalwegen wichtiger Transkriptionsfaktoren nötig, dies sind GAF und ISGF3 (s. Abschnitt 1.2.1). In Typ I IFN resistenten humanen Melanoma Zellen konnte gezeigt werden, dass die Induktion von ISGF3 Untereinheiten durch IFN γ , insbesondere von STAT1, die Typ I IFN Responsivität dieser Zellen erhöht (Wong et al., 1998). Diese Effekte sind in den hier verwendeten ANA-1 Zellen ebenfalls durchaus denkbar, wenngleich keine Induktion von STAT2 und IRF-9 als weitere Untereinheiten von ISGF3, detektierbar war.

Wie in Abb. 3.4 und Anhang A zu sehen ist, induziert IFN γ eine etwa vierfach erhöhte Expression des *traf type zinc finger domain containing 1* Gens, auch *fln29* genannt. FLN29 wurde kürzlich als durch IFN und LPS induzierbares Protein publiziert, welches bei Überexpression in RAW264.7 Zellen als Suppressor der TLR-vermittelten NF- κ B und MAP-Kinasen Aktivierung fungiert (Mashima et al., 2005). Bemerkenswerterweise gilt IFN γ als eines der potentesten Verstärker der LPS mediierten Antwort in Makropagen (Jurkovich et al., 1991; Lorsbach et al., 1993). Auch wenn nicht alle Mechanismen verstanden sind, die zu diesem JAK-STAT / TLR Signalweg „cross-talk“ führen, so kennt man mehrere molekulare Effekte von IFN γ auf den TLR Signalweg (zusammengefasst in Schroder et al., 2004). Diese Diskrepanz zwischen der TLR Signal Verstärkung zum einen, und der FLN29 Induktion und somit Suppression des TLR Signals zum anderen, ließe sich erklären, wenn man hier einen negativen „feedback loop“ annimmt. Interessant dabei wäre es, die Kinetik der FLN29 Induktion in ANA-1 Zellen zu beobachten. Eine verzögerte Induktion von FLN29 könnte die „negative feedback loop“ Theorie zusätzlich untermauern.

Sowohl Typ I als auch Typ II Interferone üben tiefgreifende Effekte auf das Zellwachstum aus. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass IFN γ den Zellzyklus von Makrophagen inhibieren kann, meist indem es den Übergang von der G1 zur S Phase blockiert, gelegentlich als Übergang in eine G0 Phase beschrieben (Lundblad und Lundgren, 1981; Xaus et al., 1999; Schroder et al., 2004). Zwei IFN γ induzierte Gene lassen sich in Cluster C1 erkennen, die direkten Einfluß auf den Zellzyklus ausüben. Das Genprodukt zu *interferon activated gene 205* (auch *interferon activated gene 204* und *myeloid cell nuclear differentiation antigen* genannt) interagiert mit multiplen Transkriptionsfaktoren, die den Zellzyklus hemmen, einschließlich der Rb- und p53-medierten Signalwege der Zellwachstumsinhibition (Asefa et al., 2006). Für das zweite Gen, *cyclin A1*,

hingegen existieren heterogene Daten über dessen Rolle im Zellzyklus. Ji et al. konnten zeigen, dass Cyclin A1 in somatischen Zellen den Übergang aus der G1 in die S Phase und somit die Zellproliferation begünstigt. Dies wird gestützt durch Untersuchungen in Cyclin A1 defizienten Mäusen (Ji et al., 2005). Rivera et al. hingegen zeigten, dass Cyclin A1 zu einem Arretieren von Tumorzellen in der G2/M Phase führt und proapoptotisch wirkt (Rivera et al., 2006). Es ist dabei anzumerken, dass IFN γ durchaus gegensätzliche Effekte auf das Zellwachstum und die Apoptose von Zielzellen bewirken kann. Studien konnten zeigen, dass die proapoptotische und antiproliferative Wirkung von IFN γ von der intrazellulären STAT1 und IRF-1 Konzentration abhängen (Bernabei et al., 2001). Hohe STAT1 und IRF-1 Levels führen verstärkt zu Apoptose wohingegen niedrige STAT1 und IRF-1 Levels zur Proliferationsinduktion führen. Es ist somit denkbar dass weitere IFN γ gesteuerte Faktoren die Cyclin A1 Effekte regulieren können.

4.1.2 TNF induzierte Gene (Cluster F)

Lediglich 16 Gene aus dem Microarray Set MG-U74v2 wurden durch TNF allein in ihrer Expression signifikant induziert (Cluster F, Abb. 3.10 und 3.11). Bemerkenswerterweise wurden alle von TNF induzierten Gene nach gemeinsamer Gabe beider Zytokine nicht induziert, was dafür spricht, dass IFN γ hier einen dominanten, reprimierenden Effekt ausübt. Die große Mehrheit der TNF induzierten Gene ist bis dato funktionell wenig charakterisiert oder nur als cDNA Klone in der GeneBank Datenbank registriert. Gene, über die beschränkt Informationen vorliegen werden im Folgenden diskutiert.

Das Genprodukt zu *ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 4* ist allgemein unter den Namen MSK2 bekannt (**m**itogen and **s**tress-activated protein **k**inase). Die MSK1/2 Proteine sind bei der Aktivierung von so genannten „immediate early“ Genen wie *c-fos* involviert. Dieser Vorgang ist mit einer H3-Histon-Phosphorylierung verknüpft und geht vermutlich einher mit CREB Phosphorylierung (**c**AMP-**r**esponse **e**lement-**b**inding) (Davie, 2003; Duncan et al., 2006). Für die MSK1/2 Proteine wurde außerdem beschrieben, dass sie das Überleben von RAW264.7 Zellen nach LPS Stimulation steuern. Inhibition der Kinasen oder Transfektion der Zellen mit dominant-negativen MSK1 Klonen führt zu rascher Apoptose der Zellen (Mu et al., 2005). TNF übt über den TNFR1 sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Effekte aus, indem es unterschiedliche Signalwege aktiviert (s. Abschnitt 1.2.2). Durch NF- κ B und JNK Aktivierung wird die Expression von anti-apoptotischen Genen induziert, welche der, ebenfalls über TNFR1 mediierten, Caspasen Aktivierung entgegenwirken (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Die Hochregulation von MSK2 als potentielle anti-apoptotische Kinase nach TNF Behandlung von ANA-1 Zellen passt sehr gut zu diesen früheren Beobachtungen.

Ein weiteres von TNF induziertes Gentranskript ist CD163, mit etwa zweifacher Hochregulation. CD163 gehört zur Familie der Scavenger Rezeptoren, und gilt als effektiver Bindepartner von Hämoglobin:Haptoglobin (Hb:Hp) Komplexen im Plasma. Diesem Vorgang wird zum einen

enttoxifizierende Wirkung zugeschrieben, zum anderen gilt die CD163 vermittelte Endozytose von Hb:Hp Komplexen als wirksame Form der Eisenaufnahme in die Zelle (Graversen et al., 2002; Fabriek et al., 2005). Dies führt außerdem zur Entstehung von Häm Metaboliten, die potente antiinflammatorische Effekte besitzen (Moestrup und Moller, 2004). Außerordentlich bemerkenswert ist dabei, dass TNF ebenfalls die Expression von Haptoglobin induziert (Cluster F2; Abb. 3.11). Eisen gilt als wichtiger Kofaktor bei oxidativen Prozessen, welche auch bei der Generierung von ROI und RNI benötigt werden. Eine erhöhte Eisenaufnahme durch Makrophagen könnte also dem Zwecke dienen, antimikrobielle Effektormechanismen aufzubauen (Schaible und Kaufmann, 2004). Zusätzlich könnte eine erhöhte Eisenaufnahme in die Zellen zu einer lokalen Eisendepletion im extrazellulären Raum führen. In der Tat wird Eisendepletion als eigenständiges antimikrobielles Effektorsystem diskutiert (Ong et al., 2006).

4.1.3 TNF / IFN γ synergistisch induzierte Gene (Cluster B und C2)

Bei zahlreichen Genen lässt sich eine synergistische Induktion durch IFN γ und TNF erkennen. Obwohl Synergismen zwischen IFN γ und TNF bei der Aktivierung der Gentranskription einiger Gene schon lange bekannt ist, konnten erst in den letzten Jahren einige molekulare Mechanismen aufgeklärt werden, die diese Effekte vermitteln. Die am besten untersuchte Hypothese basiert darauf, dass synergistisch regulierte Gene in ihren Promotorregionen sowohl STAT1/IRF-1 Bindestellen (GAS/ISRE) als auch NF- κ B Erkennungsmotive besitzen. Beide Transkriptionsfaktoren wirken vermutlich kooperativ in der Regulation der Genexpression (Paludan, 2000). Einige Studien konnten *in vitro* zeigen, dass IRF-1 direkt mit den p50 und p65 Untereinheiten von NF- κ B interagieren kann (Neish et al., 1995; Drew et al., 1995). Die Bindung eines solchen Komplexes an ISRE und NF- κ B Motive könnte entsprechende Konformationsänderungen der DNA bewirken, um die Transkription zu bewirken. Solche multifaktoriellen Transkriptionskomplexe sind für mehrere Gene beschrieben worden, man bezeichnet sie meist als Enhanceosome (Paludan, 2000).

In Cluster B (s. Abb. 3.3) findet man 15 Gene, die nahezu ausschließlich durch beide Zytokine induziert wurden, wohingegen Einzelbehandlung nur geringe Effekte zeigte. Die 34 Gene in Cluster C2 (s. Abb. 3.5) werden von IFN γ induziert, durch Behandlung mit beiden Zytokinen ist die Expression allerdings deutlich verstärkt, obwohl TNF allein hier kaum Wirkung zeigt. Eines der am höchsten induzierten Gene ist das *immunoresponse gene 1*. Dieses Gen wird gesondert in Abschnitt 4.2 eingehend diskutiert werden.

Auffälligerweise lassen sich einige typische, bereits vorher beschriebene synergistisch induzierte Gene in diesen Gruppen nicht finden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass iNOS in Makrophagen durch IFN γ und TNF induziert wird (Ding et al., 1988). Ebenfalls gilt das Zytokin IL-6 als ein typischerweise synergistisch induziertes Gen (Sanceau et al., 1995). Beide Gene sind auf den verwendeten Microarrays aufgebracht. Bei Betrachtung der Rohdaten (nicht gezeigt) lässt sich

feststellen, dass eine iNOS Expression überhaupt nicht detektierbar war. Jedoch konnte innerhalb der Arbeitsgruppe mittels Realtime RT-PCR eindeutig bestätigt werden, dass iNOS durch IFN γ und TNF in ANA-1 Zellen induzierbar ist. Es ist zu vermuten, dass die iNOS spezifischen Sonden auf den verwendeten Microarrays qualitativ ungenügend waren, um die Expression des Gens zu detektieren. Bei IL-6 hingegen kann man nach Gegenprüfung der Rohdaten feststellen, dass durchaus Induktion messbar war, jedoch die Messwerte über die verschiedenen Replikate recht inkonsistent waren, weswegen die verwendete Auswerte-Software SAM (s. Abschnitt 3.1.2) dieses Gen vermutlich als nicht signifikant induziert deklariert hat. Die SAM Software wendet ein durchaus sehr stringentes mathematisches Verfahren an, um die Signifikanz der differentiellen Expression zu bewerten (Hoffmann et al., 2002), dies kann jedoch in Einzelfällen, wie hier am Beispiel von IL-6 angeführt, zu Datenverlusten führen. Einige Genprodukte, bei denen eine synergistische Induktion in der Literatur beschrieben wurde, lassen sich auch in den hier ermittelten Ergebnissen finden, wie zum Beispiel ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) (Jahnke und Johnson, 1995), Mig (CXCL9) und I-TAC (CXCL11) (Ohmori et al., 1997).

In den Cluster B und C2 konnten mehrere Gene detektiert werden, die Einfluß auf den NF- κ B Signalweg ausüben. Das Genprodukt zu *inhibitor of kappaB kinase epsilon*, auch induzierbare I κ B Kinase (IKK-i) genannt, wurde zunächst als LPS induzierbare Kinase beschrieben, welche aktivierenden Einfluß auf den kanonischen NF- κ B Signalweg ausübt (Shimada et al., 1999). Durch Untersuchungen in IKK-i defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass IKK-i wichtig ist für die Induktion von IFN responsiven Genen in Virus-infizierten embryonalen Fibroblasten, wie IFN β , IRG1 oder IP-10 (Hemmi et al., 2004). Ebenfalls ist das Genprodukt zu *traf2 binding protein*, auch TIFA genannt, in ANA-1 Zellen durch IFN γ und TNF induziert. TIFA wurde als Adaptorprotein beschrieben, das durch Interaktion mit TRAF6 und TRAF2 zur IKK Aktivierung führt, und somit ebenfalls das NF- κ B Signal begünstigt (Ea et al., 2004). Weiterhin ist in ANA-1 Zellen I κ B α , das als Inhibitor des NF- κ B Signals gilt, durch IFN γ und TNF induziert, und wird vermutlich in Folge eines negativen „feedback loops“ induziert (Ghosh und Karin, 2002). Es ist interessant festzustellen, dass in ANA-1 Zellen sowohl NF- κ B Signal aktivierende als auch inhibierende Proteine hochreguliert werden. Wietek et al. konnten zeigen, dass IKK-i in der Lage ist durch Phosphorylierung von p52 durch Transaktivierung über p65 den alternativen NF- κ B Signalweg zu aktivieren (Wietek et al., 2006). Der alternative NF- κ B Signalweg ist unabhängig von I κ B und wird durch Phosphorylierung von p100 durch IKK α aktiviert (Senftleben et al., 2001). Studien sprechen dafür, dass der alternative Signalweg in erster Linie an adaptiven Immunantworten und der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe beteiligt ist und vom kanonischen Signalweg abweichende Gene aktiviert (Bonizzi und Karin, 2004). Man könnte somit die hier gezeigte Geninduktion so deuten, dass ANA-1 Zellen, nach 16stündiger Stimulation mit IFN γ und TNF, durch Induktion von I κ B α den kanonischen NF- κ B Signalweg herunterregulieren, um durch Hochregulation von IKK-i den alternativen Signalweg zu begünstigen, und somit ein anderes Set

von Genen zu aktivieren. Dies ist jedoch momentan rein hypothetisch und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein weiteres interessantes Genprodukt, das von IFN γ und TNF synergistisch hochreguliert wurde, ist Syntaxin 11. Die Syntaxine gehören zur Gruppe der SNARE Proteine, wichtigen Regulatoren des intrazellulären Proteintransports. Man glaubt, dass SNARE Proteine in der Lage sind vesikuläre Transporte und Vesikelfusion spezifisch steuern zu können, indem sie die Membrankomplexe, mit denen sie assoziiert sind, mit weiteren Membrankomplexen zusammenführen, die wiederum spezifische „Ziel-SNAREs“ besitzen (Teng et al., 2001). Syntaxin 11 ist das einzige bekannte Syntaxin, das keine Transmembrandomäne besitzt. Trotzdem ist es in späten Endosomen und dem Trans-Golgi Netzwerk lokalisiert und wird hauptsächlich in Geweben des Immunsystems exprimiert (Valdez et al., 1999; Prekeris et al., 2000). Mutationen des Syntaxin 11 Gens wurden mit der seltenen Krankheit Hämophagozytische Lymphohistiozytose in Zusammenhang gebracht, die sich durch Immundefekte bemerkbar macht, wie reduzierte NK-Zell- und zytotoxische T-Zellaktivität, übermäßige Lymphozyten- und Makrophagen-Proliferation sowie erhöhte Zytokinlevels (Ishii et al., 2005; zur Stadt et al., 2005). Es erscheint wahrscheinlich, dass Syntaxin 11 am intrazellulären Vesikeltransport während einer Immunantwort beteiligt ist. Zahlreiche Prozesse kommen hierfür in Betracht, wie Fusion von Phagosomen und Lysosomen, Erkennung von Pathogenen durch endosomale TLRs oder Autophagosom vermittelte antimikrobielle Aktivität. Als weitere interessante Option, könnte Syntaxin 11 daran beteiligt sein, intrazellulären Pathogenen essentielle Metabolite zu entziehen. Es wird diskutiert, dass manche Pathogene sich intrazelluläre Transportvorgänge zu nutzen machen, um an Metabolite wie Aminosäuren oder Ionen zu gelangen und somit ihr Überleben in der Zelle sichern (Appelberg, 2006). Syntaxin 11 könnte, durch Modulation von Vesikelfusion, aktiv daran beteiligt sein, solche Vorgänge zu inhibieren.

4.1.4 IFN γ und/oder TNF inhibierte Gene (Cluster G, H und I)

Obwohl die große Mehrheit, der als differentiell reguliert detektierten Gene, in ihrer Expression induziert war, findet man einige Gene, die sowohl durch IFN γ als auch durch TNF herabreguliert waren. Eines der in seiner Expression am stärksten inhibierten Gene ist *regulator of G-protein signaling 2* (RGS2). RGS Proteine können *in vitro* die GTPase Aktivität von G α Protein Untereinheiten beschleunigen, und somit die Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren negativ regulieren (Watson et al., 1996; Ingi et al., 1998). RGS2 gilt als wichtiges Protein in Zusammenhang mit Bluthochdruck Erkrankungen sowie verhaltensbiologischen Auffälligkeiten wie Angst oder Aggressivität (Oliveira-Dos-Santos et al., 2000; Heximer et al., 2003; Yalcin et al., 2004). In RGS2-defizienten Mäusen wurde zusätzlich eine verringerte T-Zell Proliferation und IL-2 Produktion gefunden, was sich in beeinträchtigter antiviraler Immunität äusserte (Oliveira-Dos-Santos et al., 2000). Die Rolle von RGS2 in aktivierten Makrophagen ist

unklar. Es erscheint jedoch denkbar, dass durch Herunterregulation von RGS2, G-Protein vermittelte Signalwege induziert werden, da RGS2 als ein Inhibitor solcher gilt. Mögliche Signalwege wären Chemokine oder Wachstumsfaktoren vermittelte Signale, die häufig über Siebentransmembran Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine signalisieren.

In diesem Zusammenhang ist ein weiteres Gen interessant, das durch $\text{IFN}\gamma$ und TNF transkriptionell inhibiert wurde: *insulin-like growth factor binding protein 4* (Igfbp4). Igfbp4 ist ein sekretiertes Protein, von dem bekannt es, dass es die „insulin-like growth factors“ (IGFs) IGF-I und IGF-II binden kann und deren Funktionen als wachstumsinduzierende Moleküle inhibieren kann (Zhou et al., 2003). Die Rezeptoren für IGF-I und IGF-II, IGF-IR und IGF-IIR, letzterer ist ein G-Protein gekoppelter Siebentransmembran Rezeptor, werden auf sehr vielen verschiedenen Zellen exprimiert. Studien in Igfbp4-transgenen Mäusen, die das Protein konstitutiv exprimieren, zeigten, dass Igfbp4 antiproliferative Wirkungen auf lymphoide Gewebe wie den Thymus, jedoch keine Effekte auf die T- und B-Zellentwicklung zeigt (Zhou et al., 2004). Es erscheint daher interessant, dass ANA-1 Makrophagen in Folge der Aktivierung durch $\text{IFN}\gamma$ und TNF, das wachstumsinhibierende Protein Igfbp4 herunterregulieren. Wenn Makrophagen *in vivo* den gleichen Effekt zeigen sollten, bleibt allerdings unklar, welche Zellen dadurch in ihrer Proliferation beeinflusst werden. Bekannt ist allerdings, dass peritoneale Makrophagen, jedoch nicht prämyeloide Zellen aus dem Knochenmark, *in vitro* hohe Mengen an IGF-I exprimieren (Arkins et al., 1993). Diese Befunde postulieren, dass sowohl ruhende als auch aktivierte Makrophagen möglicherweise wichtige Funktionen bei der Wachstumsregulation anderer Körperzellen übernehmen können.

4.1.5 Genontologische Untersuchungen

Durch Benutzung der online Software FatiGO konnten die Gene, die durch $\text{IFN}\gamma$ und/oder TNF als differentiell exprimiert gefunden wurden, anhand ihrer genontologischen Annotation mit den nicht-regulierten Genen verglichen werden. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, Über- oder Unterrepräsentationen ontologischer Merkmale innerhalb einer Liste von Genen, schnell und statistisch gestützt zu erkennen und somit eine erste Näherung bezüglich des funktionellen und physiologischen Zustands der untersuchten Zellpopulationen oder des untersuchten Gewebes zu erlangen, noch bevor einzelne Gene oder Gengruppen durch Literatursuche charakterisiert werden.

In der Kategorie „biologische Prozesse“ zeigte sich bei der Analyse der $\text{IFN}\gamma$ / TNF-regulierten Transkripte eine deutliche Überrepräsentation von Transkripten, die in der Immunabwehr und als Folge von Fremdstimulus eine Rolle spielen. Diese Überrepräsentation wurde insbesondere durch die Transkriptionsaktivierung nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation bewirkt. Dies liegt zunächst einmal daran, dass dies die zahlenmässig größte Gruppe an regulierten Genen ausmachte, und somit am ehesten statistische Signifikanz erreichte. Zum anderen muss bedacht werden, dass die Mehrheit, der von

TNF induzierten Gene, zum jetzigen Zeitpunkt funktionell noch nicht ausreichend charakterisiert ist, und somit auch nicht ontologisch annotiert ist. Dies trifft jedoch auf die Gruppe synergistisch induzierter Gene weniger zu, weswegen auch hier eine Überrepräsentation immunrelevanter Gene detektiert wurde. Das Ergebnis ist insgesamt sicherlich nicht überraschend, sondern eine exzellente Bestätigung des experimentellen Ansatzes, da die immunaktivierenden Effekte von IFN γ und TNF auf Makrophagen gut beschrieben sind und auch, als Grundlage therapeutischer Behandlung, vielfache Bedeutung in der Medizin erlangt haben. Es zeigt somit auch, dass das gewählte Untersuchungsmodell sinnvoll erscheint, um angeborene immunologische Effekte dieser Zytokine auf Makrophagen untersuchen zu können.

Eher unerwartet war die Erkenntnis, dass Gene, die im zellulären Metabolismus wirken, unter den differentiell exprimierten Genen unterrepräsentiert waren. Man könnte diesen Befund so deuten, dass Makrophagen im Rahmen einer inflammatorischen Aktivierung zwar durchaus metabolische Gene regulieren, diese allerdings ganz spezifische physiologische Prozesse übernehmen, die für die Immunantwort benötigt werden.

In der Kategorie „molekulare Funktion“ zeigte sich, dass Gene mit GTPase Aktivität insbesondere durch IFN γ deutlich induziert wurden. FatiGO erkennt dabei sechs IFN γ induzierte Gene, wovon fünf zur Familie der p65 GBPs gehören, und das sechste, IIGP1, zur Familie der p47 GTPasen zuzuordnen ist. Bei genauerer Betrachtung der IFN γ induzierten Transkripte lassen sich jedoch deutlich mehr Gene erkennen, welche für Proteine mit GTPase Aktivität kodieren, wie die p65 GBPs mGBP2 und mGBP4, die p47 GTPasen GTPI (interferon inducible GTPase 2), IRG-47 (interferon gamma inducible protein 47) und LRG-47 (interferon inducible protein 1), das VLIG Protein VLIG-1 (GTPase, very large interferon inducible 1) sowie die kleine RAS GTPase RAP2c. Bis auf RAP2c gehören alle hier genannten GTPasen zu den IFN induzierbaren GTPasen (Boehm et al., 1998; Martens und Howard, 2006). Warum der Algorithmus von FatiGO nicht in der Lage war, diese Gene zu detektieren ist nicht nachvollziehbar, zeigt jedoch, dass eine manuelle Überprüfung der Ergebnisse nicht umgehbar ist. Die durchgeführten Microarray Experimente erlaubten die Identifizierung von drei neuen murinen p65 GBPs, nämlich mGBP6, mGBP7 und mGBP8. Im Abschnitt 4.3 wird die potentielle Rolle von mGBP6 in der Immunabwehr ausführlicher diskutiert.

4.2 IRG1 in der Infektionsabwehr

4.2.1 Expression von IRG1 *in vitro*

Durch Stimulation von ANA-1 Makrophagen mit $\text{IFN}\gamma$ und TNF mit nachfolgender Transkriptomanalyse dieser Zellen mittels Microarrays wurde das Genprodukt des *irg1* Gens als etwa 70-fach synergistisch induziert gefunden. Dies konnte durch semiquantitative RT-PCR bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daraufhin Untersuchungen durchgeführt, um die Rolle von IRG1 im Rahmen der Infektionsabwehr zu charakterisieren, da das Gen zuvor diesbezüglich kaum untersucht wurde.

Zunächst wurden *in vitro* Untersuchungen unternommen, um in ANA-1 Zellen die Responsivität des Gens auf proinflammatorische Stimuli zu analysieren. $\text{IFN}\gamma$ und TNF zeigten nach 16 Stunden Stimulation bereits eine deutliche Induktion des IRG1 Transkripts, zusätzlich wurde durch die in dieser Arbeit verwendeten Realtime RT-PCR bestätigt, dass durch synergistische Wirkung beider Zytokine, die Expression von IRG1 beträchtlich verstärkt wird. Eine Untersuchung der Promotor Region des *irg1* Lokus zeigte, dass weder Konsensus -GAS Sequenzen noch -NF- κ B Bindemotive vorhanden sind. Stattdessen befindet sich etwa 300 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart eine IRF-1 Konsensussequenz. Dies spricht dafür, dass IRG1 ein $\text{IFN}\gamma$ sekundär-responsives Gen ist. Um dies zu überprüfen, müsste die Expression von IRG1 in IRF-1 defizienten Zellen untersucht werden. Allerdings bleibt dann weiterhin unklar, wie die synergistische Wirkung beider Zytokine zustande kommt. Es ist beschrieben, dass die IRF-1 Expression durch synergistische Wirkung von $\text{IFN}\gamma$ und TNF verstärkt wird (Ohmori et al., 1997). Angenommen die IRG1 Expression würde direkt von IRF-1 gesteuert werden, könnte dies die synergistische Induktion erklären. Allerdings konnte in ANA-1 Zellen nicht beobachtet werden, dass IRF-1 synergistisch induziert wird, da TNF keine Wirkung auf die Induzierbarkeit des Gens zeigte. Hierzu müsste, anhand einer Kinetik, die IRF-1 Expression bei Einzelstimulation verglichen mit kombinierter Stimulation untersucht werden. Es ist denkbar, dass der synergistische Effekt auf Transkriptebene nach 16 Stunden nicht mehr nachweisbar ist, jedoch durch frühe synergistische Effekte höhere Proteinnengen von IRF-1 trotzdem noch vorhanden sind. Unklar bleibt allerdings, über welche Transkriptionsfaktoren die Induktion von IRG1 nach alleiniger TNF Stimulation erfolgte.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IRG1 auch durch die Zytokine $\text{IFN}\beta$ und $\text{IL-1}\beta$ sowie durch die TLR-Agonisten LPS, LTA, CpG und in geringerem Maße R848 induziert werden kann. Stimulation mit LPS und CpG erreichte sogar ähnliche Expressionslevels wie $\text{IFN}\gamma$. Studien haben gezeigt, dass LPS Stimulation in Makrophagen die Expression von IRF-1 induziert (Barber et al., 1995). Ebenfalls kann LPS die Expression von $\text{IFN}\gamma$ induzieren, was möglicherweise zu einem autokrinen „loop“ führen könnte, welches die IRG1 Expression verstärken würde (Fultz et al., 1993). Ob LPS zusätzlich zu einer direkten Induktion von IRG1 führt ist unklar. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht erklärt werden, warum CpG zu einer solch hohen Induktion

des Genprodukts führt, da eine ausführliche Untersuchung des IRG1 Promotors noch aussteht. Allerdings gelten TLR9 Agonisten wie CpG als potente Induktoren der IFN β Expression, was auch hier zu einer autokrinen Aktivierung führen könnte.

Die IRG1 Expression konnte auch in primären murinen Zellen direkt nachgewiesen werden, speziell am Beispiel von IFN γ /LPS stimulierten Mikroglia und reifen Dendritischen Zellen (aus Knochenmark generiert) gezeigt. Sowohl Mikroglia als auch Dendritische Zellen gelten als wichtige APCs. Da Makrophagen ebenfalls wichtige antigenpräsentierende Funktionen übernehmen, ist es denkbar, dass IRG1 hierbei von Bedeutung ist. Dies soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.2.2 Expression von IRG1 *in vivo* nach Infektion

Um die Expression von IRG1 *in vivo* im Laufe einer Infektion zu untersuchen, wurden Mäuse mit *Listeria monocytogenes* oder *Toxoplasma gondii* infiziert, welche als Modellorganismen für intrazellulär replizierende Bakterien und Parasiten verwendet werden.

Nach peritonealer Infektion von Mäusen akkumulieren Listerien primär in der Leber und in der Milz, wo sie sich intrazellulär vermehren (Hof et al., 1997). Bevor eine adaptive Immunantwort eingeleitet werden kann, wird in diesen Organen die Ausbreitung der Infektion in erster Linie durch Granulozyten wie Neutrophile Zellen eingedämmt, die an die infektiösen Foci rekrutiert werden (Conlan, 1999). Jedoch scheint den Neutrophilen Zellen in der Milz eine geringere Bedeutung zuzukommen als in der Leber (Conlan und North, 1994). Ab zwei Tagen nach Infektion, findet auch eine verstärkte Einwanderung von Makrophagen in die Milz statt, die entscheidend zur Begrenzung der Infektion und zur Aktivierung einer adaptiven Immunantwort gegen Listerien beitragen (Mandel und Cheers, 1980; Portnoy, 1992; Endres et al., 1997). 24 Stunden nach peritonealer Infektion mit *L. monocytogenes* konnte in der Milz eine Induktion der Genexpression von IRG1 gemessen werden, die im Verlauf nach 48 Stunden noch beträchtlich stärker ausgeprägt war. Es ist somit denkbar, dass IRG1 von weiteren Splenozyten bereits vor Einwanderung von Makrophagen exprimiert wird. Dies könnten sowohl residente Makrophagen sein, aber auch Granulozyten oder residente Lymphozyten sein. Ob IRG1 in Granulozyten, T- und B-Zellen induzierbar ist, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Bei Infektion von Mäusen mit *T. gondii* stellt sich zunächst eine akute Infektionsphase ein, wobei in verschiedenen Organen, wie Milz, Leber und Lunge, Toxoplasmen intrazellulär replizieren. Nach ca. zwölftägiger Infektion stellt sich schließlich die so genannte chronische Infektionsphase ein, in der Toxoplasmen primär im Gehirn persistieren. Während der akuten Infektionsphase konnte in der Lunge nach fünf Tagen keine Veränderung der IRG1 Expression gemessen werden, sieben und zwölf Tage nach Infektion waren jedoch die IRG1 Transkriptmengen deutlich induziert. Interessanterweise lassen sich aber fünf Tage nach Infektion bereits gesteigerte IFN γ Transkriptmengen in der Lunge messen (etwa zehnfach induziert) (Degrandi, Konermann, Beuter-

Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht). In der Milz war keine nennenswerte Induktion des IRG1 Transkripts messbar, obwohl auch hier IFN γ Expression und Induktion IFN γ responsiver Gene zu finden war (s. Abb. 3.34; Degrandi, Konermann, Beuter-Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht). Es ist somit wahrscheinlich, dass die IRG1 Expression *in vivo*, während einer Toxoplasmen Infektion, von weiteren Faktoren zeitlich und organspezifisch reguliert wird. Möglich ist auch, dass in der Immunantwort auf Toxoplasmen nur distinkte Zellen IRG1 exprimieren, die erst nach sieben Tagen in die Lunge einwandern. Diese Fragestellung soll durch *in situ* Hybridisierungen mit IRG1 spezifischen Sonden an Gewebeschnitten der Lunge untersucht werden und, nach Etablierung eines spezifischen Antikörpers, immunhistologisch bestätigt werden.

4.2.3 IRG1 als mitochondriales Protein und potentiell Ortholog eines bakteriellen Enzyms

Die Kenntniss über die subzelluläre Lokalisation eines Proteins kann wichtige Erkenntnisse über dessen Funktion liefern. Beispielsweise finden sich Transkriptionsfaktoren häufig im Kern wieder, oder werden nach Aktivierung durch aktiven Transport dahin importiert. Häufig beinhalten zelluläre Antworten die Verschiebung von Proteinen innerhalb der Zelle, was für eine weitere molekulare Regulationsmöglichkeit biologischer Prozesse sorgt (Schwoebel und Moore, 2000; Smith und Koopman, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass einige intrazelluläre Abwehrmechanismen direkten Kontakt mit dem Pathogen benötigen, um ihre Funktion auszuüben (Miller et al., 2004). Daher wurde mittels DsRed Fusionsproteinen die subzelluläre Lokalisation von IRG1 analysiert. Dabei wurde untersucht, ob intrazelluläre Pathogene Einfluß auf die Verteilung des Proteins innerhalb der Zellen ausüben können.

IRG1-DsRed Fusionsproteine sind in RAW264.7 Makrophagen mit subzellulären Kompartimente assoziiert, die mit dem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff Mitotracker anfärbbar sind. Nach Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* oder *T. gondii* konnte keine Assoziation des IRG1 Proteins mit den Pathogenen beobachtet werden. Es erscheint somit unwahrscheinlich, dass IRG1 direkten Kontakt mit dem Pathogen benötigt, um eine potentielle anti-mikrobielle Funktion auszuüben.

Eine sehr interessante Fragestellung ist, welche Rolle IRG1, das durch zahlreiche inflammatorische Stimuli und während einer Infektion stark induziert wird, als mitochondriales Molekül in der Infektionsabwehr übernehmen kann. Mitochondrien galten lange Zeit in erster Linie als Kraftwerke der Zellen, da sie durch oxidative Phosphorylierung für die Produktion von ATP verantwortlich sind und weiterhin für die Synthese wichtiger Moleküle wie Cytochrome und Steroide benötigt werden. Heute weiß man, dass Mitochondrien innerhalb eines dichten Retikulums agieren und äußerst dynamisch mit zellulären Komponenten interagieren indem sie an zahlreichen Signalkaskaden beteiligt sind, unter anderem an Apoptose-induzierenden

Kaskaden (McBride et al., 2006). Das heutige Verständnis der Bedeutung von Mitochondrien im Rahmen einer angeborenen Immunantwort ist jedoch noch sehr vage. Kürzlich konnte eine überraschende Verbindung zwischen Mitochondrien und der Regulation von intrazellulären Signalwegen als Folge viraler Infektionen entdeckt werden (McWhirter et al., 2005). Zwei unabhängige Gruppen konnten zeigen, dass das mitochondriale Protein MAVS/VISA, nach intrazellulärer Erkennung doppelsträngiger RNA durch das Protein RIG-I, zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege führt, die zur Induktion der IFN β Expression führen (Seth et al., 2005; Xu et al., 2005) (Abb. 4.1).

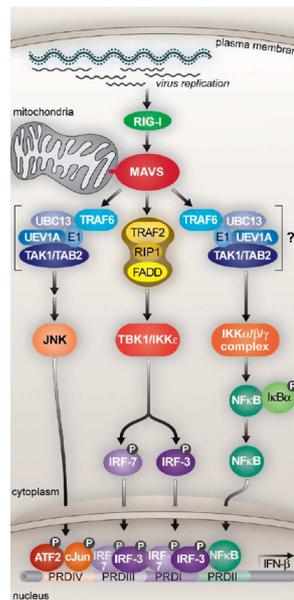


Abb. 4.1 Modell der MAVS/VISA-vermittelten Aktivierung der IFN β Expression nach viraler Infektion. Abbildung aus McWhirter et al., 2005.

Dieser Befund eröffnet eine interessante neue Sichtweise auf Mitochondrien als Regulatoren von Transkriptionseignissen im Rahmen einer angeborenen Immunantwort. Es ist durchaus plausibel anzunehmen, dass ähnliche Regulationsereignisse auch in Folge mikrobieller Infektionen stattfinden. Es ist somit denkbar, dass IRG1, als mitochondriales Protein, ebenfalls an der Aktivierung oder Regulation von Signalwegen beteiligt ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde begonnen, eine IRG1-defiziente Mauslinie zu generieren. Bei Verfügbarkeit einer solchen Linie soll durch Untersuchung verschiedener Signalwege, die während der inflammatorischen Antwort aktiviert werden, geklärt werden, welchen Einfluß das Protein darauf nehmen kann. Ein weiterer Hinweis für die Funktion des IRG1 Proteins könnte aus dessen Homologie zum bakteriellen MmgE/PrpD Enzym gezogen werden. PrpD ist eine Methylzitat Dehydratase und katalysiert die Umwandlung von 2-Methylzitat zu 2-Methylaconitat als dritten Schritt des Methylzitratszyklus (Horswill und Escalante-Semerena, 2001). Eine mammalische Entsprechung des Methylzitratszyklus, der Bakterien zur Umwandlung von Propionat zu Pyruvat dient, ist nicht beschrieben, ebensowenig ist bekannt, ob IRG1 ähnliche katalytische Aktivität zeigt. IRG1 und

PrpD aus *Salmonella typhimurium* zeigen über eine Länge von 355 Aminosäuren 22% Identität. Eine phylogenetische Verwandtschaft ist also vorhanden, allerdings muss man aufgrund der mäßigen Sequenzidentität von einer beträchtlichen Funktionsabweichung ausgehen. Methylzitat akkumuliert im Urin von Patienten, die an den Erberkrankungen Propionische Acidemie oder Methylmalonische Acidurie leiden, verursacht durch Mutationen in Enzymen des Propionyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA Metabolismus (Thompson und Chalmers, 1990). Studien haben gezeigt, dass Methylzitat einige mitochondriale Enzyme des Zitratzyklus inhibieren kann, welche von zentraler Bedeutung für den zellulären Energiestoffwechsel und Biosynthese sind. Patienten mit Methylmalonischer Acidurie zeigen unter anderem extreme Immundefizienzen und Neutropenie (Wong et al., 1992; Guerra-Moreno et al., 2003). Ebenfalls wurde Methylzitat als toxisch für Bakterien beschrieben, indem es das Bakterienwachstum stark inhibiert (Horswill et al., 2001). Ein erhöhtes Auftreten von Methylzitat bei Infektionen ist nicht beschrieben, doch könnte die Hochregulation von IRG1 ein Mechanismus sein, um für die Zelle potentiell toxische Metabolite abzubauen, oder aber um für das Pathogen toxische Produkte zu synthetisieren. Um diese Fragestellung zu klären muss zunächst bestimmt werden, ob IRG1 enzymatische Aktivität besitzt und welche Metabolite dabei verstoffwechselt werden. Schließlich müssten diese Metabolite auf ihre Toxizität für Mikroorganismen und Zellen des Immunsystems untersucht werden.

4.3 mGBP6 in der Infektionsabwehr

Nach Stimulation von ANA-1 Makrophagen mit IFN γ konnten, durch Transkriptomanalyse dieser Zellen mittels Microarrays, zahlreiche GTPasen detektiert werden, die zum Teil beträchtlich induziert waren. Bis auf RAP2c gehören alle diese Gene zur Gruppe der IFN induzierbaren GTPasen. Boehm et al. konnten bereits früher zeigen, dass insbesondere zwei Familien von GTPasen die transkriptionelle Antwort von Makrophagen auf IFN γ Stimulus dominieren: die p47 GTPasen und die p65 GBPs (Boehm et al., 1998). Durch die hier beschriebenen Microarray Untersuchungen wurden drei neue Mitglieder der murinen p65 GBPs (mGBPs) identifiziert. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden durch *in silico* Untersuchungen genomischer Datenbanken zusätzlich zwei weitere mGBPs identifiziert, so dass die bekannte mGBP Familie, von zuvor fünf publizierten Genen, auf insgesamt zehn Familienmitglieder angewachsen ist (Alexandra Kresse, Diplomarbeit; Degrandi, Konermann, Beuter-Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht). Eine phylogenetische Untersuchung aller zehn mGBPs zeigte, dass die Proteine mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9 und mGBP10 untereinander sehr hoch homolog sind, und sich deutlich von den restlichen Familienmitgliedern abgrenzen. Dies korreliert mit der genomischen Organisation der zugehörigen Genloci. Die Genloci *mgbp4*, *mgbp6*, *mgbp8*, *mgbp9* und *mgbp10* liegen alle in physikalischer Nähe zueinander auf Chromosom 5 der Maus, wohingegen die anderen Gene der mGBP Familie auf Chromosom 3 liegen. Die vorhergesagten Proteinsequenzen der mGBPs auf Chromosom 5 sind untereinander so hoch homolog, dass es wahrscheinlich erscheint, dass dieses Gencluster evolutionär gesehen erst vor kurzer Zeit durch Genduplikation entstanden ist. Die bisher bekannten humanen p65 GBPs (hGBPs) befinden sich alle auf Chromosom 1 und weisen untereinander ähnlich hohe Homologien auf, wie die Genprodukte des murinen Chromosom 3 mGBP-Gencluster untereinander (Olszewski et al., 2006). Nach derzeitiger Erkenntnis hat sich also im Menschen ein solches zweites Gencluster nicht entwickelt. Es wäre interessant festzustellen, ob dieses Cluster in weiteren Spezies vorhanden ist, oder auf die Mausart *Mus musculus* beschränkt ist. Dies sollen künftige *in silico* Untersuchungen klären, insbesondere unter Berücksichtigung von Genomdatenbank der Ratte (*Rattus norvegicus*) und sofern verfügbar anderer Mausarten wie *Mus caroli* sowie von weiteren Primaten.

In dieser Arbeit wurde primär mGBP6 analysiert und die Daten werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.3.1 Expression von mGBP6 *in vitro*

Das Gentranskript zu *mgbp6* (*macrophage activation 2 like*) wurde nach 16stündiger IFN γ Stimulation durch Microarrayanalysen als etwa 50fach induziert detektiert. Durch Realtime RT-PCR konnte nach zwei Stunden IFN γ Behandlung noch keine Induktion des Genprodukts gemessen werden. Deutliche Induktion von mGBP6 war nach sechs Stunden Stimulation messbar, die nach 16 Stunden weiter beträchtlich erhöht war. Diese verzögerte Induktion lässt vermuten,

dass mGBP6 ein IRF-1 abhängig sekundär-responsives Gen ist, wie bereits für mGBP1, mGBP2 und mGBP4 beschrieben (Briken et al., 1995; Boehm et al., 1998), da viele primär-responsive Gene bereits 15 bis 30 Minuten nach IFN γ Stimulation hochreguliert werden (Kerr und Stark, 1991). Durch Kostimulation mit TNF konnte ein weiterer synergistischer Effekt von IFN γ und TNF in der Induktion von mGBP6 bei Realtime RT-PCR Analyse beobachtet werden, der in der Größenordnung durch Microarrays nicht messbar war. Ein solcher synergistischer Effekt ist für alle weiteren mGBPs nicht erkennbar (Degrandi, Konermann, Beuter-Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht). Es ist also durchaus denkbar, dass mGBP6 andere regulatorische Sequenzen in der Promotorregion aufweist.

Das mGBP6 Transkript wurde ebenfalls durch IFN β , LPS und CpG nach 16 Stunden induziert, und, in deutlich geringerem Maße durch IL-1 β , LTA und polyIC. Nguyen et al. haben gezeigt, dass die Induktion von mGBP1-5 in RAW264.7 nach LPS Stimulation transient ist, und bereits nach zwölf Stunden auf Basalwerte zurückfällt (Nguyen et al., 2002). Weitere Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe haben bestätigt, dass mGBP6 als einziges mGBP nach 16 Stunden Stimulation mit LPS hochreguliert ist (Degrandi, Konermann, Beuter-Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht), was auch hier für unterschiedliche Regulationen des Gens spricht. Die Induzierbarkeit von p65 GBPs durch Typ I Interferone wie IFN β war bislang nur für hGBP1 und mGBP2 beschrieben (Cheng et al., 1986; Vestal et al., 2000; Gorbacheva et al., 2002). In der Promotorregion von hGBP1 befindet sich in der Tat sowohl eine ISRE als auch eine GAS Sequenz, die die Induzierbarkeit durch Typ I und Typ II IFN vermitteln (Decker et al., 1991; Lew et al., 1991). Die verfügbaren genomischen Sequenzen von mGBP6 „upstream“ des Transkriptionsstarts sind bislang noch sehr lückenhaft, so dass eine gründliche Untersuchung des mGBP6 Promotors noch aussteht. Es bleibt interessant festzustellen, ob mGBP6 in der Promotorregion NF- κ B Bindemotive aufweist. Diese wurden ebenfalls für hGBP1 beschrieben und vermitteln dessen Responsivität auf IL-1 β und TNF Stimulus (Naschberger et al., 2004). Allerdings sind sowohl IL-1 β und TNF sehr potente Induktoren der hGBP1 Expression, für mGBP6 konnte hier nur ein geringer Effekt gezeigt werden.

4.3.2 Expression von mGBP6 und weiterer mGBPs *in vivo* nach Infektion

Nach Infektion von Mäusen mit *Toxoplasma gondii* wurde die Expression von mGBP6 in der Milz und in der Lunge im Vergleich zu uninfizierten Mäusen untersucht. Zum Vergleich wurde parallel die Expression der früher publizierten mGBP1-5 gemessen (Boehm et al., 1998; Nguyen et al., 2002). Es zeigte sich, dass die mGBP6 Expression in der Lunge nach fünf Tagen bereits deutlich induziert war, und nach sieben und zwölf Tagen noch geringfügig höher lag. Die weiteren gemessenen mGBPs waren ebenfalls mit ähnlichen Verhältnissen induziert, mit Ausnahme von mGBP1, welches deutlich höhere Induktionsraten aufwies. Bemerkenswerterweise sprechen frühere Studien dafür, dass mGBP1 nur in bestimmten Mausstämmen exprimiert wird, die ein

responsives Allel tragen, jedoch nicht in dem hier verwendeten C57BL/6 Stamm. Staeheli et al. haben dies durch *in vitro* Stimulation mit IFN von primären Zellen aus unterschiedlichen Mausstämmen festgestellt, Nguyen et al. hingegen konnten in der Lunge von LPS behandelten C57BL/6 Mäusen keine Expression von mGBP1 detektieren, jedoch deutliche Induktion in BALB/c Mäusen (Staeheli et al., 1984; Vestal et al., 1998; Nguyen et al., 2002). Über die Ursache dieser Diskrepanz kann zum jetzigen Kenntnisstand nur spekuliert werden. Man kann hierbei in Betracht ziehen, dass im Rahmen einer Infektion möglicherweise zusätzliche Faktoren, wie Zytokine oder TLR Agonisten, die Expression von mGBP1 herbeiführen. Allerdings haben *in vitro* Studien innerhalb der Arbeitsgruppe eine Induzierbarkeit von mGBP1 durch IFN γ in ANA-1 Zellen, welche aus C57BL/6 Mäusen stammen (Cox et al., 1989), ebenfalls zeigen können (Degrandi, Konermann, Beuter-Gunia, Kresse, Beer und Pfeffer, unveröffentlicht). Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Beobachtungen zu erklären.

Ein von der Lunge abweichendes Bild der mGBP Induktion zeigt sich in der Milz von *T. gondii* infizierten Mäusen. Die Transkripte von mGBP3, mGBP4, mGBP5 und mGBP6 waren in den beobachteten Zeitpunkten nur geringfügig induziert, wobei mGBP6 nach sieben Tagen Infektion immerhin vierfach erhöhte Expression zeigte. Hingegen waren auch hier sowohl mGBP1 als auch mGBP2 deutlich induziert. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass für mGBP3-6 bereits basale Transkriptmengen in uninfizierten Mäusen messbar waren, wohingegen mGBP1 und mGBP2 in der Milz nicht-infizierter Mäuse nicht exprimiert waren. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass eine organspezifische differentielle Regulation der mGBPs vorliegt, die möglicherweise auf unterschiedliche regulatorische Sequenzen in den Promotorregionen zurückzuführen ist. Alternativ denkbar ist aber, dass unterschiedliche Zellen für die Expression einzelner mGBP Familienmitglieder verantwortlich sind. mGBP1 und mGBP2 könnten zum Beispiel durch einwandernde Makrophagen und nicht in residenten Splenozyten exprimiert werden, wodurch keine basale Expression in uninfizierten Mäusen messbar ist. Diese Fragestellung wird in Kürze durch immunhistologische Untersuchungen geklärt werden. Es bleibt allerdings interessant zu klären, warum einige mGBPs, jedoch nicht alle, bereits basal in der Milz als Transkript vorliegen. Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Funktionen einzelner mGBPs in Abhängigkeit des Pathogens sein.

4.3.3 Subzelluläre Verteilung von mGBP6 in Makrophagen

In der vorliegenden Studie wurde die subzelluläre Lokalisation von mGBP6 in Makrophagen mittels eines mGBP6-DsRed Fusionskonstrukts untersucht. Durch transiente Transfektion von RAW264.7 Zellen konnte für mGBP6 eine granuläre Verteilung des Proteins innerhalb des Zytoplasmas festgestellt werden. Eine sehr ähnliche Verteilung wurde bereits früher für mGBP2 beschrieben, bei der eine Lokalisation von mGBP2 in Granula und in Vesikeln von heterogener Größe gezeigt wurde (Vestal et al., 2000). Die Lokalisation in Vesikel ist bei mGBP2 abhängig von

einer Isoprenylierung, die durch ein carboxyterminales CaaX Motiv vermittelt wird. Für das mGBP1 Protein hingegen wurde, trotz Vorhandensein eines CaaX Motivs, eine homogene zytoplasmatische Verteilung beschrieben, die nicht mit Vesikeln assoziiert war (Vestal et al., 2000). Es ist unklar, ob mGBP6 ebenfalls mit Vesikeln assoziiert ist. mGBP6 besitzt kein C-terminales CaaX Motiv. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere posttranslationale Modifikationen stattfinden, die auf die Verteilung des Proteins Einfluß haben.

Durch gentechnisch eingefügte Punktmutationen in den G1, Switch I und G4 Regionen der GTP-Bindedomäne, wurde die granuläre Verteilung des Proteins vollständig aufgehoben. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Nukleotidbindung oder Hydrolyse für die korrekte Lokalisation des Proteins essentiell sind. Bei Mutation eines Arginins in der G1 Region von hGBP1 (bei mGBP6: R46) wurde normale GTP Affinität beschrieben, jedoch dramatisch reduzierte GTP Hydrolyse Aktivität gemessen, die zu einer deutlich verringerten GMP Produktion führte. Diese Mutation führt bei hGBP1 zusätzlich zum vollständigen Verlust der Fähigkeit zur Nukleotid-abhängigen Oligomerisierung des Proteins. Mutation des Threonins in der Switch I Region von hGBP1 (bei mGBP6: T73) führte zu etwas verringerter GTP Bindeaffinität und erneut deutlich verringerter GTP Hydrolyse Fähigkeit, jedoch nur wenig veränderter GMP Produktion. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese Mutante GDP mit normaler Affinität binden kann und vermutlich zu GMP hydrolysieren kann. Auch hier wurde keine Oligomerisierung beobachtet. Eine Mutation des Aspartat zu Asparagin in der G4 Region von hGBP1 (bei mGBP6: D182) schließlich, zeigte deutlich verminderte GTP Affinität, jedoch normale Hydrolyseraten und GMP Produktion, zusätzlich konnte hier nur leicht verringerte Fähigkeit zur Oligomerisierung gemessen werden (Praefcke et al., 2004). Die Auswirkungen der Mutationen auf die GTPase Aktivität sind für mGBP6 bislang nicht untersucht, jedoch lassen sich, aufgrund der Tatsache, dass die GTP Bindedomänen aller p65 GBPs hochkonserviert sind, und alle funktionellen Regionen in mGBP6 vorhanden sind, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ähnliche biochemische Eigenschaften der mutierten Proteine postulieren. Da jedoch alle Mutationen, trotz unterschiedlicher Eigenschaften, zu einem Verlust der granulären Lokalisation führten, lässt sich nicht eindeutig klären, welcher molekulare Mechanismus dafür verantwortlich ist.

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 beschrieben, werden die p65 GBPs zur Superfamilie der Dynamin-verwandten Proteine gezählt, die allesamt eine GTPase Domäne aufweisen. Die Dynamin-verwandten Proteine unterscheiden sich von den kleinen GTPasen wie Ras dadurch, dass sie sehr geringe GTP Affinität besitzen und ihre Hydrolyserate mit steigender Oligomerisierung erhöht wird (Praefcke und McMahon, 2004). In der Tat konnte für hGBP1 gezeigt werden, dass durch Bildung von Oligomeren höherer Ordnungszahl, die GTP Hydrolyserate mindestens 20fach erhöhbar war. Gleichzeitig sprechen die Studien dafür, dass GTP Bindung und Hydrolyse zur Oligomerisierung führen, wohingegen GDP gebundenes hGBP1 im monomeren Zustand vorliegt (Prakash et al., 2000a). Es ist vorstellbar, dass die Aggregation von mGBP6 in zytosolischer

Granula als Folge von GTP-abhängigen Oligomerisierungsprozessen erfolgt, die durch eine nicht funktionelle GTPase Domäne unterbunden werden.

Kleine Ras-ähnliche GTPasen besitzen eine hohe intrinsische GTP Hydrolyserate. Diese wird durch Bindung von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) gesteuert. GAPs konnten bislang für Dynamin-verwandte Proteine nicht identifiziert werden, stattdessen wird angenommen, dass die Selbst-Oligomerisierung an sich der regulierende Prozess ist (Praefcke und McMahon, 2004). Dafür sprechen auch Kristallstrukturen von hGBP1 in Gegenwart des GTP Analogons GppNHp, die zeigten, dass die Switch I Region, welche in anderen GTPasen die Interaktion mit GAPs ausmacht, in hGBP1 verdeckt ist und keine Interaktion mit anderen Proteinen oder mit eigenen Domänen erlaubt (Prakash et al., 2000b). Bei Dynamin wird die Oligomerisierung reguliert, indem das Protein an Membranen rekrutiert wird und mit Lipiden interagiert, was die Oligomerisierung des Proteins begünstigt. Erst diese Oligomerisierung bewirkt eine ausreichend hohe Avidität des Proteinkomplexes für Lipide, um eine feste Bindung an die Membranen zu ermöglichen (Praefcke und McMahon, 2004). Auch für andere Dynamin-verwandte Proteine wie Dlps, MxA, OPA1 oder mGBP2 wurde gezeigt, dass sie mit Membranen assoziiert sind. Daraus lässt sich für mGBP6 die Hypothese aufstellen, dass durch gestörte GTP Bindung und Hydrolyse infolge einer mutierten GTPase Domäne, keine Oligomerisierung mehr möglich ist und dadurch die Bindekapazität des Proteins an Membranen nicht ausreicht, um mit entsprechenden Vesikeln zu assoziieren. Um diese Hypothese zu bestätigen, muss zunächst untersucht werden, ob mGBP6 in der Zelle ähnlich wie mGBP2 mit Membranen assoziiert ist, um schließlich die Bedeutung der GTPase Aktivität auf diese potentielle Assoziation zu untersuchen.

4.3.4 Subzelluläre Verteilung von mGBP6 in infizierten Makrophagen

Für mehrere Mitglieder der p47 GTPasen wurde gezeigt, dass sie nach Infektion von Zellen mit Mikroorganismen, in physikalische Nähe des Pathogens akkumulieren. LRG-47 assoziiert mit Phago lysosomen, die phagozytierte Mykobakterien enthalten (MacMicking et al., 2003). IIGP1, TGTP, IRG47, GTPI und IGTP akkumulieren um die parasitophore Vakuole (PV) von aktiv eingedrungenen Toxoplasmen (Martens et al., 2005; Martens und Howard, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Infektion von RAW264.7 Makrophagen mit *L. monocytogenes* oder *T. gondii* einen Einfluß auf die Lokalisation von transient exprimierten mGBP6-DsRed Fusionsproteinen zeigt.

Die Lokalisation von mGBP6 war nach 30 minütiger Inkubation mit *L. monocytogenes* der transfizierten Zellen nicht auffällig verändert, noch ließ sich durch Präinkubation mit IFN γ ein Effekt beobachten. In transfizierten Zellen, die nach 16stündiger Präinkubation mit IFN γ mit dem avirulenten *T. gondii* Stamm Me49 infiziert wurden, zeigte sich eine auffällige Akkumulation von mGBP6 um das Pathogen. Diese Akkumulation wurde nicht beobachtet, wenn die Zellen keine Präinkubation mit IFN γ erfahren hatten oder erst mit der Infektion stimuliert wurden. Es konnte

außerdem gezeigt werden, dass das mGBP6 Protein mit Toxoplasmen assoziiert war, die aktiv in die Zelle eingedrungen waren und somit in einer PV residierten, und nicht in phagozytierten Toxoplasmen, die sich in Phagolysosomen befanden. Diese Beobachtungen, gemeinsam mit der deutlichen Hochregulation von mGBP6 nach *T. gondii* Infektion, implizieren, dass mGBP6 eine potentielle Funktion in der angeborenen Immunantwort gegen *T. gondii* ausübt. Es ist vorstellbar, dass eine direkte Assoziation des Proteins mit der PV einen antimikrobiellen Effekt auslöst, der die Replikation des Pathogens inhibiert. Eine solche Funktion wurde für manche Mitglieder der p47 GTPasen postuliert. Martens et al. haben gezeigt, dass IIGP1 und andere p47 GTPasen direkt mit der PV aktiv eingedrungener Toxoplasmen assoziieren und vermutlich zur Zersetzung der PV Membran (PVM) und schließlich des Parasiten selbst führen. Dieser Vorgang war abhängig von IFN γ Behandlung der Zellen (Martens et al., 2005). IIGP1 positive PVs zeigten in fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen diverse Stufen der PVM Zersetzung, die als „rough“ und „disrupted“ bezeichnet wurden. Einige der mGBP6 positiven PVs zeigen ebenfalls eine auffällige Morphologie, die der „rough“ Morphologie am ehesten entsprach (s. Abb. 3.37, zweite und dritte Reihe). Es muss dabei jedoch bedacht werden, dass durch Inkubation der Zellen mit IFN γ , IIGP1 und weitere p47 GTPasen ebenfalls hochreguliert werden. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden, ob mGBP6 an der Zersetzung der PVM beteiligt ist oder andere antiparasitäre Funktionen übernimmt. Ein jedoch sehr interessanter Hinweis auf eine potentielle molekulare Funktion könnte erneut aus der Verwandtschaft von mGBP6 zu Dynaminen und Dynamin-verwandten Proteinen gezogen werden. Zahlreiche Dynamin-verwandte Proteine sind an Membranfusionen oder -Abschnürungen beteiligt. Dynamin gilt als mechanochemisches Enzym, das in Abhängigkeit der GTP Hydrolyserate zur Spaltung oder Streckung von Lipidvesikel führt. Ebenso wurde ein klarer Zusammenhang von Dlp, OPA1 und Mitofusin bei der Teilung oder Fusion von Mitochondrien gezeigt (Praefcke und McMahon, 2004). Es kann somit durchaus postuliert werden, dass mGBP6, und vielleicht andere p65 GBPs, mechanochemische Modulationen an der PVM ausüben könnten und so zur Zerstörung des Pathogens beitragen könnten.

Bei Untersuchung der Lokalisation der GTP Bindestellen Mutanten in *T. gondii* infizierten Zellen zeigte sich ein heterogenes Bild. Die mGBP6 Proteine, die in den G1 oder Switch I Regionen (R46A und T73A) mutiert waren, waren nicht mehr mit der PV des Parasiten assoziiert. Proteine, die in der G4 Region (D182N) mutiert waren, behielten die Fähigkeit eine Assoziation mit der PV einzugehen, was jedoch nur zu einem partiellen Einschließen der PV führte und in deutlich verringerter Häufigkeit zu beobachten war. Auch dieser Prozess war abhängig von IFN γ Präinkubation. Geht man von einer biochemischen Entsprechung der hier durchgeführten Mutationen mit dem Phänotyp der hGBP1 Mutanten aus, ist die D182N Mutante die einzige, die noch in der Lage ist, GTP abhängige Oligomerisierung einzugehen, wenngleich mit verringerter Rate (Praefcke et al., 2004). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Oligomerisierung benötigt wird, damit das Protein mit der PVM assoziieren kann, möglicherweise durch Erhöhung der

Lipid-Avidität der Proteinkomplexe. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass die Mutationen in den G1 oder Switch I Regionen potentiell zu einem drastischen Verlust der Hydrolyserate führen, sicherlich auch durch fehlende Oligomerisierung bedingt. Es ist vorstellbar, dass die GTPase Aktivität an sich Prozesse steuert, die zu einer Akkumulierung von mGBP6 an der PV führen. Zellulärer Transport von Proteinen, Lipiden und Organellen ist ein streng regulierter Prozess, der häufig von Mikrotubuli abhängig ist (Hirokawa, 1998). Für zahlreiche GTPasen konnte eine Interaktion mit Mikrotubuli nachgewiesen werden, und einige sind an der Regulation von Transportprozessen oder Mikrotubuli Dynamik beteiligt (Takai et al., 2001; Okai et al., 2004; Kahn et al., 2005). Interessanterweise lassen sich früh nach Invasion von *T. gondii* in Zellen umfangreiche Umlagerungen von zellulären Mikrotubuli beobachten, die zu einem vollständigen Einschließen der PV in ein dichtes Mikrotubuli Netzwerk führt (Melo et al., 2001). Es ist durchaus vorstellbar, dass die GTPase Aktivität von mGBP6 benötigt wird, um eine Mikrotubuli-abhängige Umlagerung des Proteins in Richtung PV zu ermöglichen. Ein faszinierender möglicher Zusammenhang zwischen p65 GBPs und Mikrotubuli Dynamik erschließt sich aus der Beobachtung, dass einige Taxol (Paclitaxel) resistente Tumorzelllinien eine beträchtliche Überexpression von hGBP1 aufweisen, und forcierte Überexpression von hGBP1 in einer Taxol sensitiven ovarialen Tumorzelllinie eine Taxol Resistenz induzierte (Duan et al., 2006). Taxol übt antimitotische Wirkung auf Tumoren aus, indem es Einfluß auf die Polymerisierungseigenschaft und Stabilität von Mikrotubuli ausübt (Wilson et al., 1999). In künftigen Experimenten soll unter anderem untersucht werden, ob Taxol die Lokalisation von mGBP6 und anderen mGBPs modulieren kann. Es erscheint äußerst spannend mögliche Interaktionen und Regulationen zwischen p65 GBPs und Mikrotubuli zu untersuchen, um vielleicht neuartige Kenntnisse über die molekularen Funktionen dieser Proteinfamilie zu ergründen.

4.4 Ausblick

Um die Funktion von IRG1 in der Immunabwehr eingehend zu untersuchen, werden sich die unmittelbaren künftigen Arbeiten darauf konzentrieren, eine IRG1-defiziente Mauslinie zu generieren. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits vorbereitende Schritte unternommen. Zunächst wird es nötig sein, die zwei für das IRG1-defiziente Allel putativ positiven ES-Zellklone durch weitere Southern Blot Analysen auf korrekte homologe Rekombination zu überprüfen. Hierzu muss durch Hybridisierung mit einer *Neomycin*-spezifischen Sonde überprüft werden, ob das IRG1-defiziente Allel nur einmal homolog integriert ist und keine zusätzlichen nicht-homologen Integrationen ins Genom vollzogen hat. Korrekt rekombinierte Klone werden dann in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert und anschließend in pseudoschwangere Weibchen transferiert. Die entstehenden chimären Mäusen werden schließlich mit C57BL/6 Mäusen verpaart und auf Keimbahntransmission getestet. Agoutifarbene Nachkommen haben eine 50%-ige Wahrscheinlichkeit das mutierte Allel zu tragen.

IRG1-defiziente Mäuse sollen dann in künftigen Studien auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Infektionen mit verschiedenen Pathogenen zu kontrollieren. Ein Hauptaugenmerk wird dabei auf die Rolle von IRG1 in der Abwehr gegen *L. monocytogenes*, *T. gondii* sowie virale Infektionen mit VSV und CMV gelegt werden.

Mittels IRG1-defizienter Mäusen soll untersucht werden, ob und an welchen Signalwegen IRG1 beteiligt sein könnte. Diese Arbeiten werden sich zunächst auf die Untersuchung von TLR, MAP Kinasen und NF- κ B Signalwegen konzentrieren.

Weiterhin soll durch rekombinanter Expression und Aufreinigung des IRG1 Proteins untersucht werden, ob IRG1 enzymatische Aktivität zeigt, ähnlich zum bakteriellen Ortholog PrpD. Sollte sich dies bestätigen, wird es eine interessante Aufgabe sein, die entstehenden Metabolite auf ihre Wirkung auf Zellen und Mikroorganismen zu charakterisieren.

Die Bedeutung von mGBP6 in der Immunabwehr soll ebenfalls durch Generierung einer mGBP6-defizienten Mauslinie untersucht werden. Hierzu soll zunächst der genomische Locus von *mgbp6* anhand von genomischen Datenbanken, BAC-Klonen und Southern Blot Analysen exakt charakterisiert werden, um schließlich ein nicht-funktionelles Allel von *mgbp6* klonieren zu können.

Die infektiologischen Untersuchungen der mGBP6-defizienten Mauslinie werden sich in besonderem Maße darauf konzentrieren, die Rolle von mGBP6 in der *T. gondii* Abwehr aufzuklären. Zusätzlich wird überprüft werden, ob das Fehlen von mGBP6 zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber viralen Infektionen führt.

Konfokale Laser Scanning Mikroskopische und Elektronenmikroskopische Untersuchungen in mGBP6 defizienten Zellen sollen klären, ob mGBP6 für eine effektive Zersetzung der PV von invadierten *T. gondii* benötigt wird.

Die Prozesse, die zur Akkumulierung von mGBP6 an der PV führen, sollen näher charakterisiert werden, indem mikroskopische Zeitrafferaufnahmen nach Invasion von *T. gondii* in mGBP6-DsRed exprimierenden Zellen erstellt werden. Dabei soll analysiert werden, ob diese Umlagerungsprozesse mit mikrotubulärem Transport assoziiert sind.

Weiterhin wird es eine anspruchsvolle und zugleich spannende Aufgabe, sein die molekulare Funktion des mGBP6 Proteins zu charakterisieren. Hierzu wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestimmt werden, in welcher Art und Weise mGBP6 mit der PVM interagiert und eine potentielle mechanochemische Aktivität ausübt.

5 Zusammenfassung

Interferon γ (IFN γ) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) sind inflammatorische Zytokine, die essentiell für die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen sind und somit für die effektive Eliminierung von intrazellulären Erregern wesentliche Bedeutung haben. Mittels Microarray basierten Transkriptomanalysen wurde die transkriptionelle Regulation in murinen Makrophagen nach Stimulation mit IFN γ und TNF untersucht. Dabei konnten 234 Gene identifiziert werden, die *in vitro* durch diese Zytokine signifikant reguliert werden. Durch hierarchische Clusteranalysen wurde ersichtlich, dass die Mehrheit dieser Gene unter der transkriptionellen Kontrolle von IFN γ stehen. Zusätzlich ließ sich jedoch bei zahlreichen Genen eine synergistische Wirkung von IFN γ und TNF auf die Expression in der verwendeten Zelllinie nachweisen. Umfassende genontologische Untersuchungen der differentiell exprimierten Gene konnten die frühere Beobachtung bestätigen, dass IFN γ in murinen Makrophagen zahlreiche Transkripte hochreguliert, welche für Proteine mit GTPase Aktivität kodieren. Dabei wurden drei neue Mitglieder der murinen 65 kDa Guanylat bindenden Protein-Familie identifiziert. Dies waren mGBP6, mGBP7 und mGBP8.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von mGBP6 in murinen Makrophagen charakterisiert. Zusätzlich zu IFN γ , war mGBP6 durch weitere Zytokine, wie IFN β und IL-1 β , sowie durch TLR Agonisten, wie LPS und CpG 1668 induzierbar. In Milz und Lunge von *T. gondii* infizierten Mäusen ließ sich ebenfalls eine deutliche Induktion der mGBP6 Transkriptmengen nachweisen. Die Überexpression und mikroskopische Analyse von mGBP6-DsRed Fusionskonstrukten in RAW264.7 Zellen zeigte, dass das mGBP6 Protein in granulären bzw. vesikelartigen Strukturen im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach Infektion von mGBP6-DsRed exprimierenden Zellen mit *T. gondii*, lässt sich eine Akkumulation des mGBP6 Proteins an der parasitophoren Vakuole des Parasiten beobachten, jedoch nicht an phagozytierten Toxoplasmen. Gezielte Punktmutationen der putativen GTP-Bindestellen von mGBP6 führten zu einer Fehllokalisierung des mGBP6 Proteins und zu einer gestörten Fähigkeit des Proteins an intrazellulären *T. gondii* zu akkumulieren.

Ein weiteres durch IFN γ und TNF in murinen Makrophagen als differentiell exprimiert identifiziertes Gen war Immunoresponsive Gene 1 (IRG1). Die Expression von IRG1 war in Makrophagen ebenfalls durch IFN β , IL-1 β sowie durch mehrere TLR Agonisten induzierbar. Außerdem konnte eine Hochregulation von IRG1 in murinen Mikroglia- und dendritischen Zellen nach *in vitro* Aktivierung durch IFN γ und LPS gezeigt werden. In *L. monocytogenes* infizierten Mäusen konnte in der Milz bereits nach 24h eine Induktion von IRG1 Transkripten gemessen werden. In *T. gondii* infizierten Mäusen konnte eine Hochregulation von IRG1 nur in der Lunge beobachtet werden. Durch Kofärbungen von IRG1-DsRed Fusionskonstrukten mit

zellulären Markern konnte IRG1 als Mitochondrien-assoziiertes Protein identifiziert werden. Um die Rolle von IRG1 in der Infektionsabwehr zu definieren, wurde eine ES-Zelllinie etabliert, welche ein nicht funktionelles IRG1 Allel besitzt. Diese soll in künftigen Arbeiten zur Generierung einer IRG1 defizienten Mauslinie verwendet werden, die zur Charakterisierung der biologischen Funktion von IRG1 essentiell sein wird.

6 Literaturverzeichnis

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

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

Al Shahrour,F., Diaz-Uriarte,R., and Dopazo,J. (2004). FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics.* *20*, 578-580.

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

Aliprantis,A.O., Yang,R.B., Mark,M.R., Suggett,S., Devaux,B., Radolf,J.D., Klimpel,G.R., Godowski,P., and Zychlinsky,A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* *285*, 736-739.

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

Appelberg,R. (2006). Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 1117-1128.

Arkins,S., Rebeiz,N., Biragyn,A., Reese,D.L., and Kelley,K.W. (1993). Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology* *133*, 2334-2343.

Asefa,B., Dermott,J.M., Kaldis,P., Stefanisko,K., Garfinkel,D.J., and Keller,J.R. (2006). p205, a potential tumor suppressor, inhibits cell proliferation via multiple pathways of cell cycle regulation. *FEBS Lett.* *580*, 1205-1214.

Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M., Davis,A.P., Dolinski,K., Dwight,S.S., Eppig,J.T., Harris,M.A., Hill,D.P., Issel-Tarver,L., Kasarskis,A., Lewis,S., Matese,J.C., Richardson,J.E., Ringwald,M., Rubin,G.M., and Sherlock,G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* *25*, 25-29.

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

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.

Barber,S.A., Fultz,M.J., Salkowski,C.A., and Vogel,S.N. (1995). Differential expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2, and interferon consensus sequence binding protein genes in lipopolysaccharide (LPS)-responsive and LPS-hyporesponsive macrophages. *Infect. Immun.* *63*, 601-608.

Basler,T., Jeckstadt,S., Valentin-Weigand,P., and Goethe,R. (2006). Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium smegmatis, and lipopolysaccharide induce different

- transcriptional and post-transcriptional regulation of the IRG1 gene in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 628-638.
- Beer,S., Scheikl,T., Reis,B., Huser,N., Pfeffer,K., and Holzmann,B. (2005). Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Mol. Cell Biol.* *25*, 9646-9660.
- Bekker,L.G., Freeman,S., Murray,P.J., Ryffel,B., and Kaplan,G. (2001). TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J. Immunol.* *166*, 6728-6734.
- Bekpen,C., Hunn,J.P., Rohde,C., Parvanova,I., Guethlein,L., Dunn,D.M., Glowalla,E., Leptin,M., and Howard,J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* *6*, R92.
- Belvin,M.P. and Anderson,K.V. (1996). A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *12*, 393-416.
- Bernabei,P., Coccia,E.M., Rigamonti,L., Bosticardo,M., Forni,G., Pestka,S., Krause,C.D., Battistini,A., and Novelli,F. (2001). Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J. Leukoc. Biol.* *70*, 950-960.
- Bertin,J., Nir,W.J., Fischer,C.M., Tayber,O.V., Errada,P.R., Grant,J.R., Keilty,J.J., Gosselin,M.L., Robison,K.E., Wong,G.H., Glucksmann,M.A., and DiStefano,P.S. (1999). Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *274*, 12955-12958.
- Beyer,T.V., Svezhova,N.V., Radchenko,A.I., and Sidorenko,N.V. (2002). Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). *Cell Biol. Int.* *26*, 861-871.
- Birney,E., Andrews,D., Caccamo,M., Chen,Y., Clarke,L., Coates,G., Cox,T., Cunningham,F., Curwen,V., Cutts,T., Down,T., Durbin,R., Fernandez-Suarez,X.M., Flicek,P., Graf,S., Hammond,M., Herrero,J., Howe,K., Iyer,V., Jekosch,K., Kahari,A., Kasprzyk,A., Keefe,D., Kokocinski,F., Kulesha,E., London,D., Longden,I., Melsopp,C., Meidl,P., Overduin,B., Parker,A., Proctor,G., Prlic,A., Rae,M., Rios,D., Redmond,S., Schuster,M., Sealy,I., Searle,S., Severin,J., Slater,G., Smedley,D., Smith,J., Stabenau,A., Stalker,J., Trevanion,S., Ureta-Vidal,A., Vogel,J., White,S., Woodwark,C., and Hubbard,T.J. (2006). Ensembl 2006. *Nucleic Acids Res.* *34*, D556-D561.
- Blobel,G. (2000). Protein targeting (Nobel lecture). *Chembiochem.* *1*, 86-102.
- 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., Rollinghoff,M., and Diefenbach,A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 64-76.

- Bonizzi,G. and Karin,M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* *25*, 280-288.
- 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.
- Buchmeier,N.A. and Schreiber,R.D. (1985). Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 7404-7408.
- Carlow,D.A., Teh,S.J., and Teh,H.S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J. Immunol.* *161*, 2348-2355.
- Carter,C.C., Gorbacheva,V.Y., and Vestal,D.J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch. Virol.* *150*, 1213-1220.
- Celada,A. and Schreiber,R.D. (1987). Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J. Immunol.* *139*, 147-153.
- Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L., and Lenardo,M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* *288*, 2351-2354.
- Chen,B., Zhang,D., and Pollard,J.W. (2003). Progesterone regulation of the mammalian ortholog of methylcitrate dehydratase (immune response gene 1) in the uterine epithelium during implantation through the protein kinase C pathway. *Mol. Endocrinol.* *17*, 2340-2354.
- Cheng,Y.S., Becker-Manley,M.F., Chow,T.P., and Horan,D.C. (1985). Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J. Biol. Chem.* *260*, 15834-15839.
- Cheng,Y.S., Becker-Manley,M.F., Nguyen,T.D., DeGrado,W.F., and Jonak,G.J. (1986). Nonidentical induction of the guanylate binding protein and the 56K protein by type I and type II interferons. *J. Interferon Res.* *6*, 417-427.
- Cheng,Y.S., Colonno,R.J., and Yin,F.H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J. Biol. Chem.* *258*, 7746-7750.
- Cheng,Y.S., Patterson,C.E., and Staeheli,P. (1991). Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol. Cell Biol.* *11*, 4717-4725.
- Cheon,Y.P., Xu,X., Bagchi,M.K., and Bagchi,I.C. (2003). Immune-responsive gene 1 is a novel target of progesterone receptor and plays a critical role during implantation in the mouse. *Endocrinology* *144*, 5623-5630.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.

- Chuaqui,R.F., Bonner,R.F., Best,C.J., Gillespie,J.W., Flaig,M.J., Hewitt,S.M., Phillips,J.L., Krizman,D.B., Tangrea,M.A., Ahram,M., Linehan,W.M., Knezevic,V., and Emmert-Buck,M.R. (2002). Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.* *32 Suppl*, 509-514.
- Clemens,M.J. and Elia,A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* *17*, 503-524.
- 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. (1999). Early host-pathogen interactions in the liver and spleen during systemic murine listeriosis: an overview. *Immunobiology* *201*, 178-187.
- 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.
- 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. *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.
- Daubener,W. and MacKenzie,C.R. (1999). IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* *467*, 517-524.
- Davie,J.R. (2003). MSK1 and MSK2 mediate mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3: a controversy resolved. *Sci. STKE.* *2003*, E33.
- Decker,T., Lew,D.J., and Darnell,J.E., Jr. (1991). Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol. Cell Biol.* *11*, 5147-5153.
- Dempsey,P.W., Doyle,S.E., He,J.Q., and Cheng,G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 193-209.
- Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.
- Ding,A.H., Nathan,C.F., and Stuehr,D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* *141*, 2407-2412.

- Drew, P.D., Franzoso, G., Becker, K.G., Bours, V., Carlson, L.M., Siebenlist, U., and Ozato, K. (1995). NF kappa B and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* *15*, 1037-1045.
- Duan, Z., Foster, R., Brakora, K.A., Yusuf, R.Z., and Seiden, M.V. (2006). GBP1 overexpression is associated with a paclitaxel resistance phenotype. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *57*, 25-33.
- Duncan, E.A., Anest, V., Cogswell, P., and Baldwin, A.S. (2006). The kinases MSK1 and MSK2 are required for epidermal growth factor-induced, but not tumor necrosis factor-induced, histone H3 Ser10 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *281*, 12521-12525.
- Dybdahl, B., Wahba, A., Lien, E., Flo, T.H., Waage, A., Qureshi, N., Sellevold, O.F., Espevik, T., and Sundan, A. (2002). Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* *105*, 685-690.
- Ea, C.K., Sun, L., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2004). TIFA activates IkappaB kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 15318-15323.
- Edelson, B.T. and Unanue, E.R. (2000). Immunity to Listeria infection. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 425-431.
- Ehlers, S. (2003). Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann. Rheum. Dis.* *62 Suppl 2*, ii37-ii42.
- Ehlers, S., Holscher, C., Scheu, S., Tertilt, C., Hehlhans, T., Suwinski, J., Endres, R., and Pfeffer, K. (2003). The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Listeria monocytogenes. *J. Immunol.* *170*, 5210-5218.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 14863-14868.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., and Yoshimura, A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* *387*, 921-924.
- 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.
- Epstein, J., Eichbaum, Q., Sheriff, S., and Ezekowitz, R.A. (1996). The collectins in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 29-35.
- Fabriek, B.O., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* *210*, 153-160.
- 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.

- Fisher, R.A. (1922). On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philos. Trans. Roy. Soc.* *222*, 309-368.
- Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *10*, 363-372.
- Fultz, M.J., Barber, S.A., Dieffenbach, C.W., and Vogel, S.N. (1993). Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *Int. Immunol.* *5*, 1383-1392.
- Gene Ontology Consortium (2001). Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome Res.* *11*, 1425-1433.
- Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J., and Fiedel, B. (1982). C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Intern. Med.* *27*, 345-372.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* *109 Suppl*, S81-S96.
- Giese, A., Stuhlsatz, S., Daubener, W., and MacKenzie, C.R. (2004). Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF-alpha receptor 2. *J. Immunol.* *173*, 3366-3374.
- Golab, J., Zagodzón, T., Stokłosal, T., Kaminski, R., Kozar, K., and Jakobisiak, M. (2000). Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunol. Lett.* *72*, 153-157.
- Gorbacheva, V.Y., Lindner, D., Sen, G.C., and Vestal, D.J. (2002). The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J. Biol. Chem.* *277*, 6080-6087.
- Graversen, J.H., Madsen, M., and Moestrup, S.K. (2002). CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *34*, 309-314.
- Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K., and Schmidtke, G. (2001). Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* *83*, 367-372.
- Guenzi, E., Topolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmle, M., Hohenadl, C., Barillari, G., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., and Sturzl, M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* *20*, 5568-5577.
- Guenzi, E., Topolt, K., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Naschberger, E., Benelli, R., Albini, A., and Sturzl, M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* *22*, 3772-3782.
- Guerra-Moreno, J., Barrios, N., and Santiago-Borrero, P.J. (2003). Severe neutropenia in an infant with methylmalonic acidemia. *Bol. Asoc. Med. P. R.* *95*, 17-20.
- Gupta, S.L., Rubin, B.Y., and Holmes, S.L. (1979). Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4817-4821.

- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-580.
- Haponsaph,R. and Czuprynski,C.J. (1996). Inhibition of the multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line (ATCC TIB73) by IFN-gamma and TNF-alpha. *Microb. Pathog.* *20*, 287-295.
- Haque,S.J., Wu,Q., Kammer,W., Friedrich,K., Smith,J.M., Kerr,I.M., Stark,G.R., and Williams,B.R. (1997). Receptor-associated constitutive protein tyrosine phosphatase activity controls the kinase function of JAK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 8563-8568.
- Hashimoto,C., Hudson,K.L., and Anderson,K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Hehlhans,T. and Mannel,D.N. (2002). The TNF-TNF receptor system. *Biol. Chem.* *383*, 1581-1585.
- Hehlhans,T. and Pfeffer,K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* *115*, 1-20.
- Heil,F., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Kirschning,C., Akira,S., Lipford,G., Wagner,H., and Bauer,S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Hemmi,H., Takeuchi,O., Sato,S., Yamamoto,M., Kaisho,T., Sanjo,H., Kawai,T., Hoshino,K., Takeda,K., and Akira,S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* *199*, 1641-1650.
- Heximer,S.P., Knutsen,R.H., Sun,X., Kaltenbronn,K.M., Rhee,M.H., Peng,N., Oliveira-dos-Santos,A., Penninger,J.M., Muslin,A.J., Steinberg,T.H., Wyss,J.M., Mecham,R.P., and Blumer,K.J. (2003). Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J. Clin. Invest* *111*, 445-452.
- Hill,D.P., Davis,A.P., Richardson,J.E., Corradi,J.P., Ringwald,M., Eppig,J.T., and Blake,J.A. (2001). Program description: Strategies for biological annotation of mammalian systems: implementing gene ontologies in mouse genome informatics. *Genomics* *74*, 121-128.
- Hirokawa,N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* *279*, 519-526.
- Hof,H., Nichterlein,T., and Kretschmar,M. (1997). Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 345-357.

- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313-1318.
- Hoffmann, R., Seidl, T., and Dugas, M. (2002). Profound effect of normalization on detection of differentially expressed genes in oligonucleotide microarray data analysis. *Genome Biol.* *3*, RESEARCH0033.
- Holmskov, U.L. (2000). Collectins and collectin receptors in innate immunity. *APMIS Suppl* *100*, 1-59.
- Horisberger, M.A. and Hochkeppel, H.K. (1987). IFN- α induced human 78 kD protein: purification and homologies with the mouse Mx protein, production of monoclonal antibodies, and potentiation effect of IFN- γ . *J. Interferon Res.* *7*, 331-343.
- Horswill, A.R., Dudding, A.R., and Escalante-Semerena, J.C. (2001). Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* *276*, 19094-19101.
- Horswill, A.R. and Escalante-Semerena, J.C. (2001). In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochemistry* *40*, 4703-4713.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* *162*, 3749-3752.
- Hu, X., Herrero, C., Li, W.P., Antoniv, T.T., Falck-Pedersen, E., Koch, A.E., Woods, J.M., Haines, G.K., and Ivashkiv, L.B. (2002). Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat. Immunol.* *3*, 859-866.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. *Science* *259*, 1742-1745.
- Idriss, H.T. and Naismith, J.H. (2000). TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* *50*, 184-195.
- Ihle, J.N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* *84*, 331-334.
- Ingi, T., Krumin, A.M., Chidiac, P., Brothers, G.M., Chung, S., Snow, B.E., Barnes, C.A., Lanahan, A.A., Siderovski, D.P., Ross, E.M., Gilman, A.G., and Worley, P.F. (1998). Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J. Neurosci.* *18*, 7178-7188.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* *274*, 14560-14567.
- Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A., and Nunez, G. (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* *276*, 2551-2554.

- Ishii,E., Ohga,S., Imashuku,S., Kimura,N., Ueda,I., Morimoto,A., Yamamoto,K., and Yasukawa,M. (2005). Review of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in children with focus on Japanese experiences. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *53*, 209-223.
- Jackson,S.H., Gallin,J.I., and Holland,S.M. (1995). The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* *182*, 751-758.
- Jahnke,A. and Johnson,J.P. (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is synergistically activated by TNF-alpha and IFN-gamma responsive sites. *Immunobiology* *193*, 305-314.
- Jain,A.K. and Dubes,R.C. (1988). *Algorithms for Clustering Data.* (Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall).
- Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197-216.
- Janeway,C.A., Jr., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease.* 6th Edition. (New York and London: Garland Science), pp. 358-359.
- Ji,P., Agrawal,S., Diederichs,S., Baumer,N., Becker,A., Cauvet,T., Kowski,S., Beger,C., Welte,K., Berdel,W.E., Serve,H., and Muller-Tidow,C. (2005). Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells. *Oncogene* *24*, 2739-2744.
- Jiang,Q., Akashi,S., Miyake,K., and Petty,H.R. (2000). Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J. Immunol.* *165*, 3541-3544.
- Jurkovich,G.J., Mileski,W.J., Maier,R.V., Winn,R.K., and Rice,C.L. (1991). Interferon gamma increases sensitivity to endotoxin. *J. Surg. Res.* *51*, 197-203.
- Kahn,R.A., Volpicelli-Daley,L., Bowzard,B., Shrivastava-Ranjan,P., Li,Y., Zhou,C., and Cunningham,L. (2005). Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1269-1272.
- Kawai,J., Shinagawa,A., Shibata,K., Yoshino,M., Itoh,M., Ishii,Y., Arakawa,T., Hara,A., Fukunishi,Y., Konno,H., Adachi,J., Fukuda,S., Aizawa,K., Izawa,M., Nishi,K., Kiyosawa,H., Kondo,S., Yamanaka,I., Saito,T., Okazaki,Y., Gojobori,T., Bono,H., Kasukawa,T., Saito,R., Kadota,K., Matsuda,H., Ashburner,M., Batalov,S., Casavant,T., Fleischmann,W., Gaasterland,T., Gissi,C., King,B., Kochiwa,H., Kuehl,P., Lewis,S., Matsuo,Y., Nikaido,I., Pesole,G., Quackenbush,J., Schriml,L.M., Staubli,F., Suzuki,R., Tomita,M., Wagner,L., Washio,T., Sakai,K., Okido,T., Furuno,M., Aono,H., Baldarelli,R., Barsh,G., Blake,J., Boffelli,D., Bojunga,N., Carninci,P., de Bonaldo,M.F., Brownstein,M.J., Bult,C., Fletcher,C., Fujita,M., Gariboldi,M., Gustincich,S., Hill,D., Hofmann,M., Hume,D.A., Kamiya,M., Lee,N.H., Lyons,P., Marchionni,L., Mashima,J., Mazzarelli,J., Mombaerts,P., Nordone,P., Ring,B., Ringwald,M., Rodriguez,I., Sakamoto,N., Sasaki,H., Sato,K., Schonbach,C., Seya,T., Shibata,Y., Storch,K.F., Suzuki,H., Toyooka,K., Wang,K.H., Weitz,C., Whittaker,C., Wilming,L., Wynshaw-Boris,A., Yoshida,K., Hasegawa,Y., Kawaji,H., Kohtsuki,S., and Hayashizaki,Y. (2001). Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* *409*, 685-690.
- Kawai,T., Adachi,O., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* *11*, 115-122.

- Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett.* **285**, 194-198.
- Klamp, T., Boehm, U., Schenk, D., Pfeffer, K., and Howard, J.C. (2003). A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *J. Immunol.* **171**, 1255-1265.
- Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* **254**, 707-710.
- Kumar, M. and Carmichael, G.G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1415-1434.
- Lah, T.T., Hawley, M., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1995). Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett.* **363**, 85-89.
- Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyon, I., Howard, J.C., and Gorvel, J.P. (2006). Differential inductions of TNF-alpha and IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol.* **8**, 401-413.
- Lee, C.G., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and O'Brien, W.E. (1995). Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics* **41**, 263-270.
- 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.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boedtke, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Lehrer, R.I. and Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 96-102.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Lew, D.J., Decker, T., Strehlow, I., and Darnell, J.E. (1991). Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol. Cell Biol.* **11**, 182-191.
- Li, C. and Hung, W.W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0032.
- Li, C. and Wong, W.H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 31-36.
- 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. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1675-1680.

- Locksley,R.M., Killeen,N., and Lenardo,M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Lorsbach,R.B., Murphy,W.J., Lowenstein,C.J., Snyder,S.H., and Russell,S.W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* *268*, 1908-1913.
- Luan,Z., Zhang,Y., Liu,A., Man,Y., Cheng,L., and Hu,G. (2002). A novel GTP-binding protein hGBP3 interacts with NIK/HGK. *FEBS Lett.* *530*, 233-238.
- Lubeseder-Martellato,C., Guenzi,E., Jorg,A., Topolt,K., Naschberger,E., Kremmer,E., Zietz,C., Tschachler,E., Hutzler,P., Schwemmle,M., Matzen,K., Grimm,T., Ensoli,B., and Sturzl,M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am. J. Pathol.* *161*, 1749-1759.
- Lundblad,D. and Lundgren,E. (1981). Block of glioma cell line in S by interferon. *Int. J. Cancer* *27*, 749-754.
- Mach,B., Steimle,V., Martinez-Soria,E., and Reith,W. (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 301-331.
- MacMicking,J.D. (2005). Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 74-82.
- MacMicking,J.D., Taylor,G.A., and McKinney,J.D. (2003). Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* *302*, 654-659.
- 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.
- Martens,S. and Howard,J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 559-589.
- Martens,S., Parvanova,I., Zerrahn,J., Griffiths,G., Schell,G., Reichmann,G., and Howard,J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS. Pathog.* *1*, e24.
- Mashima,R., Saeki,K., Aki,D., Minoda,Y., Takaki,H., Sanada,T., Kobayashi,T., Aburatani,H., Yamanashi,Y., and Yoshimura,A. (2005). FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 41289-41297.
- Matsumoto,M., Tanaka,N., Harada,H., Kimura,T., Yokochi,T., Kitagawa,M., Schindler,C., and Taniguchi,T. (1999). Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol. Chem.* *380*, 699-703.
- McBride,H.M., Neuspiel,M., and Wasiak,S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* *16*, R551-R560.

- McWhirter,S.M., Tenover,B.R., and Maniatis,T. (2005). Connecting mitochondria and innate immunity. *Cell* *122*, 645-647.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 4-9.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Melo,E.J., Carvalho,T.M., and De Souza,W. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell* *25*, 53-59.
- Miller,B.H., Fratti,R.A., Poschet,J.F., Timmins,G.S., Master,S.S., Burgos,M., Marletta,M.A., and Deretic,V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun.* *72*, 2872-2878.
- Modiano,N., Lu,Y.E., and Cresswell,P. (2005). Golgi targeting of human guanylate-binding protein-1 requires nucleotide binding, isoprenylation, and an IFN-gamma-inducible cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 8680-8685.
- Moestrup,S.K. and Moller,H.J. (2004). CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann. Med.* *36*, 347-354.
- Mu,M.M., Koide,N., Hassan,F., Islam,S., Sugiyama,T., Ito,H., Mori,I., Yoshida,T., and Yokochi,T. (2005). A role of mitogen and stress-activated protein kinase 1/2 in survival of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *43*, 277-286.
- Mulder,N.J., Apweiler,R., Attwood,T.K., Bairoch,A., Bateman,A., Binns,D., Bradley,P., Bork,P., Bucher,P., Cerutti,L., Copley,R., Courcelle,E., Das,U., Durbin,R., Fleischmann,W., Gough,J., Haft,D., Harte,N., Hulo,N., Kahn,D., Kanapin,A., Krestyaninova,M., Lonsdale,D., Lopez,R., Letunic,I., Madera,M., Maslen,J., McDowall,J., Mitchell,A., Nikolskaya,A.N., Orchard,S., Pagni,M., Ponting,C.P., Quevillon,E., Selengut,J., Sigrist,C.J., Silventoinen,V., Studholme,D.J., Vaughan,R., and Wu,C.H. (2005). InterPro, progress and status in 2005. *Nucleic Acids Res.* *33*, D201-D205.
- 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.
- Naschberger,E., Werner,T., Vicente,A.B., Guenzi,E., Topolt,K., Leubert,R., Lubeseder-Martellato,C., Nelson,P.J., and Sturzl,M. (2004). Nuclear factor-kappaB motif and interferon-alpha-stimulated response element co-operate in the activation of guanylate-binding protein-1 expression by inflammatory cytokines in endothelial cells. *Biochem. J.* *379*, 409-420.
- Nathan,C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest* *100*, 2417-2423.
- Nathan,C. and Shiloh,M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 8841-8848.

- Neish,A.S., Read,M.A., Thanos,D., Pine,R., Maniatis,T., and Collins,T. (1995). Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2558-2569.
- Nguyen,T.T., Hu,Y., Widney,D.P., Mar,R.A., and Smith,J.B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* *22*, 899-909.
- Ogura,Y., Inohara,N., Benito,A., Chen,F.F., Yamaoka,S., and Nunez,G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *276*, 4812-4818.
- Ohashi,K., Burkart,V., Flohe,S., and Kolb,H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* *164*, 558-561.
- 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.
- Okai,T., Araki,Y., Tada,M., Tateno,T., Kontani,K., and Katada,T. (2004). Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. *J. Cell Sci.* *117*, 4705-4715.
- Oliveira-Dos-Santos,A.J., Matsumoto,G., Snow,B.E., Bai,D., Houston,F.P., Whishaw,I.Q., Mariathasan,S., Sasaki,T., Wakeham,A., Ohashi,P.S., Roder,J.C., Barnes,C.A., Siderovski,D.P., and Penninger,J.M. (2000). Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 12272-12277.
- Olszewski,M.A., Gray,J., and Vestal,D.J. (2006). In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J. Interferon Cytokine Res.* *26*, 328-352.
- Ong,S.T., Ho,J.Z., Ho,B., and Ding,J.L. (2006). Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* *211*, 295-314.
- Otani,T., Nakamura,S., Toki,M., Motoda,R., Kurimoto,M., and Orita,K. (1999). Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cell Immunol.* *198*, 111-119.
- Ozinsky,A., Underhill,D.M., Fontenot,J.D., Hajjar,A.M., Smith,K.D., Wilson,C.B., Schroeder,L., and Aderem,A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 13766-13771.
- Paludan,S.R. (2000). Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 18-25.
- Pearson,A.M. (1996). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 20-28.
- 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.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- Portnoy, D.A. (1992). Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 20-24.
- Praefcke, G.J., Geyer, M., Schwemmle, M., Robert, K.H., and Herrmann, C. (1999). Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J. Mol. Biol.* **292**, 321-332.
- Praefcke, G.J., Kloep, S., Benschaid, U., Lilie, H., Prakash, B., and Herrmann, C. (2004). Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **344**, 257-269.
- Praefcke, G.J. and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133-147.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2000a). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **403**, 567-571.
- Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G.J., Herrmann, C., and Wittinghofer, A. (2000b). Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J.* **19**, 4555-4564.
- Prekeris, R., Klumperman, J., and Scheller, R.H. (2000). Syntaxin 11 is an atypical SNARE abundant in the immune system. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 771-780.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., and Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* **33**, W116-W120.
- Rajeevan, M.S., Vernon, S.D., Taysavang, N., and Unger, E.R. (2001). Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.* **3**, 26-31.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**, 261-267.
- Reis e Sousa (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity.* **14**, 495-498.
- Rivera, A., Mavila, A., Bayless, K.J., Davis, G.E., and Maxwell, S.A. (2006). Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1425-1439.

- Roach,D.R., Bean,A.G., Demangel,C., France,M.P., Briscoe,H., and Britton,W.J. (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.* *168*, 4620-4627.
- 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.
- Rutschmann,S., Kilinc,A., and Ferrandon,D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J. Immunol.* *168*, 1542-1546.
- Saito,T., Hirai,R., Loo,Y.M., Owen,D., Johnson,C.L., Sinha,S.C., Akira,S., Fujita,T., and Gale,M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 582-587.
- Sanceau,J., Kaisho,T., Hirano,T., and Wietzerbin,J. (1995). Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* *270*, 27920-27931.
- Schaible,U.E. and Kaufmann,S.H. (2004). Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 946-953.
- Schindler,C. and Darnell,J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 621-651.
- Schroder,K., Hertzog,P.J., Ravasi,T., and Hume,D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163-189.
- Schwalbe,R.A., Dahlback,B., Coe,J.E., and Nelsestuen,G.L. (1992). Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* *31*, 4907-4915.
- Schwemmle,M., Kaspers,B., Irion,A., Staeheli,P., and Schultz,U. (1996). Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J. Biol. Chem.* *271*, 10304-10308.
- Schwoebel,E.D. and Moore,M.S. (2000). The control of gene expression by regulated nuclear transport. *Essays Biochem.* *36*, 105-113.
- Seitz,C., Muller,P., Krieg,R.C., Mannel,D.N., and Hehlhans,T. (2001). A novel p75TNF receptor isoform mediating NFkappa B activation. *J. Biol. Chem.* *276*, 19390-19395.
- Senftleben,U., Cao,Y., Xiao,G., Greten,F.R., Krahn,G., Bonizzi,G., Chen,Y., Hu,Y., Fong,A., Sun,S.C., and Karin,M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* *293*, 1495-1499.
- Seth,R.B., Sun,L., Ea,C.K., and Chen,Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* *122*, 669-682.

Sherwin,J.R., Freeman,T.C., Stephens,R.J., Kimber,S., Smith,A.G., Chambers,I., Smith,S.K., and Sharkey,A.M. (2004). Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol. Endocrinol.* *18*, 2185-2195.

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.

Shimada,T., Kawai,T., Takeda,K., Matsumoto,M., Inoue,J., Tatsumi,Y., Kanamaru,A., and Akira,S. (1999). IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int. Immunol.* *11*, 1357-1362.

Smith,J.M. and Koopman,P.A. (2004). The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet.* *20*, 4-8.

Song,M.M. and Shuai,K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J. Biol. Chem.* *273*, 35056-35062.

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

Staehele,P., Danielson,P., Haller,O., and Sutcliffe,J.G. (1986). Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol. Cell Biol.* *6*, 4770-4774.

Staehele,P., Prochazka,M., Steigmeier,P.A., and Haller,O. (1984). Genetic control of interferon action: mouse strain distribution and inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology* *137*, 135-142.

Starr,R., Willson,T.A., Viney,E.M., Murray,L.J., Rayner,J.R., Jenkins,B.J., Gonda,T.J., Alexander,W.S., Metcalf,D., Nicola,N.A., and Hilton,D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* *387*, 917-921.

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

Stickney,J.T. and Buss,J.E. (2000). Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2191-2200.

Strober,W., Murray,P.J., Kitani,A., and Watanabe,T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 9-20.

Subramaniam,P.S., Torres,B.A., and Johnson,H.M. (2001). So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* *15*, 175-187.

Suzuki,H., Kurihara,Y., Takeya,M., Kamada,N., Kataoka,M., Jishage,K., Ueda,O., Sakaguchi,H., Higashi,T., Suzuki,T., Takashima,Y., Kawabe,Y., Cynshi,O., Wada,Y., Honda,M., Kurihara,H., Aburatani,H., Doi,T., Matsumoto,A., Azuma,S., Noda,T., Toyoda,Y., Itakura,H., Yazaki,Y.,

- Kodama,T., and . (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* *386*, 292-296.
- Takai,Y., Sasaki,T., and Matozaki,T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* *81*, 153-208.
- Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 335-376.
- Taylor,G.A., Feng,C.G., and Sher,A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 100-109.
- Teng,F.Y., Wang,Y., and Tang,B.L. (2001). The syntaxins. *Genome Biol.* *2*, REVIEWS3012.
- Thoma-Uszynski,S., Stenger,S., Takeuchi,O., Ochoa,M.T., Engele,M., Sieling,P.A., Barnes,P.F., Rollinghoff,M., Bolcskei,P.L., Wagner,M., Akira,S., Norgard,M.V., Belisle,J.T., Godowski,P.J., Bloom,B.R., and Modlin,R.L. (2001). Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* *291*, 1544-1547.
- Thomas,C.A., Li,Y., Kodama,T., Suzuki,H., Silverstein,S.C., and El Khoury,J. (2000). Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J. Exp. Med.* *191*, 147-156.
- Thompson,G.N. and Chalmers,R.A. (1990). Increased urinary metabolite excretion during fasting in disorders of propionate metabolism. *Pediatr. Res.* *27*, 413-416.
- 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.
- Tusher,V.G., Tibshirani,R., and Chu,G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 5116-5121.
- Vabulas,R.M., Ahmad-Nejad,P., da Costa,C., Miethke,T., Kirschning,C.J., Hacker,H., and Wagner,H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 31332-31339.
- Vabulas,R.M., Ahmad-Nejad,P., Ghose,S., Kirschning,C.J., Issels,R.D., and Wagner,H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 15107-15112.
- Valdez,A.C., Cabaniols,J.P., Brown,M.J., and Roche,P.A. (1999). Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans-Golgi network. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 6)*, 845-854.
- Vestal,D.J. (2005). The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 435-443.
- Vestal,D.J., Buss,J.E., McKercher,S.R., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Kelner,G.S., Asundi,V.K., and Maki,R.A. (1998). Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* *18*, 977-985.

- Vestal,D.J., Gorbacheva,V.Y., and Sen,G.C. (2000). Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J. Interferon Cytokine Res.* *20*, 991-1000.
- Wagner,H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv. Immunol.* *73*, 329-368.
- Watson,N., Linder,M.E., Druet,K.M., Kehrl,J.H., and Blumer,K.J. (1996). RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature* *383*, 172-175.
- Wen,X., Fuhrman,S., Michaels,G.S., Carr,D.B., Smith,S., Barker,J.L., and Somogyi,R. (1998). Large-scale temporal gene expression mapping of central nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 334-339.
- Westerhoff,H.V. and Palsson,B.O. (2004). The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1249-1252.
- Wietek,C., Cleaver,C.S., Ludbrook,V., Wilde,J., White,J., Bell,D.J., Lee,M., Dickson,M., Ray,K.P., and O'neill,L.A. (2006). IKK epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65. *J. Biol. Chem.*
- Williams,B.R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* *18*, 6112-6120.
- Wilson,L., Panda,D., and Jordan,M.A. (1999). Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct. Funct.* *24*, 329-335.
- Wodicka,L., Dong,H., Mittmann,M., Ho,M.H., and Lockhart,D.J. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* *15*, 1359-1367.
- Wong,L.H., Hatzinisiriou,I., Devenish,R.J., and Ralph,S.J. (1998). IFN-gamma priming up-regulates IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) components, augmenting responsiveness of IFN-resistant melanoma cells to type I IFNs. *J. Immunol.* *160*, 5475-5484.
- Wong,S.N., Low,L.C., Lau,Y.L., Nicholls,J., and Chan,M.Y. (1992). Immunodeficiency in methylmalonic acidemia. *J. Paediatr. Child Health* *28*, 180-183.
- Xaus,J., Cardo,M., Valledor,A.F., Soler,C., Lloberas,J., and Celada,A. (1999). Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity.* *11*, 103-113.
- Xu,L.G., Wang,Y.Y., Han,K.J., Li,L.Y., Zhai,Z., and Shu,H.B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* *19*, 727-740.
- Yalcin,B., Willis-Owen,S.A., Fullerton,J., Meesaq,A., Deacon,R.M., Rawlins,J.N., Copley,R.R., Morris,A.P., Flint,J., and Mott,R. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat. Genet.* *36*, 1197-1202.
- You,M., Yu,D.H., and Feng,G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2416-2424.
- Zar,J. (1999). *Biostatistical Analysis*. (Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall).

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

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

Zhou,R., Diehl,D., Hoeflich,A., Lahm,H., and Wolf,E. (2003). IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J. Endocrinol.* *178*, 177-193.

Zhou,R., Flawinkel,H., Schneider,M.R., Lahm,H., Hoeflich,A., Wanke,R., and Wolf,E. (2004). Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of the thymus in transgenic mice. *J. Mol. Endocrinol.* *32*, 349-364.

zur Stadt,U., Schmidt,S., Kasper,B., Beutel,K., Diler,A.S., Henter,J.I., Kabisch,H., Schneppenheim,R., Nurnberg,P., Janka,G., and Hennies,H.C. (2005). Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 827-834.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer, der meine Doktorarbeit über die Jahre stets exzellent betreut hat und es geschafft hat, trotz Laborumzugs und der damit verbundenen Schwierigkeiten, ein stets angenehmes Arbeiten und ein freundschaftliches Laborklima zu ermöglichen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Gierl für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

Mein großer Dank geht an Dr. Sandra Beer für das Korrekturlesen des Manuskripts und für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und Ideen.

Dankeschön an Dr. Reinhard Hoffmann für die Einführung und Unterstützung bei den Microarray Analysen.

Vielen Dank an Conny Beuter-Gunia, für die Bereitstellung von cDNA Proben, und vor allem für die exzellente Zusammenarbeit und die aufrichtige Freundschaft.

Ein großes Dankeschön an Dr. Jan Würthner für die intensive Unterstützung bei den bioinformatischen Analysen und für die vielen anregenden Gesprächen mit oder ohne guten Wein.

Vielen Dank an Christian Wufka für die konstruktive Zusammenarbeit im Labor und für das sorgenfreie und entspannte WG Dasein (Originalzitat: „Wer ist dran mit spülen?“).

Ein riesen Dankeschön an Silke Stuhlsatz und Anne Mausberg, die parallel WG, für die intensive Freundschaft und für die aufheiternde Stimmung im Schreibraum.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mich stets unterstützt und motiviert hat und mir in allen Lebenslagen Halt und Geborgenheit gegeben hat.

Anhang A: Liste differentiell exprimierter Gene

Liste aller in ANA-1 Zellen nach IFN γ und/oder TNF Stimulation als differentiell exprimiert detektierten Gene. Die Gennamen sind mit ihren arbiträren Expressionswerten und Accession Nummern angegeben. Die Genliste ist absteigend nach den Induktionsraten bei IFN γ + TNF Stimulation sortiert. I+T = IFN γ + TNF.

Gen	Induktion IFN γ	Induktion TNF	Induktion I+T	Acc. Nr.
guanylate nucleotide binding protein 2	108.55	1.08	103.36	AJ007970
T-cell specific GTPase	72.04	0.98	87.93	L38444
immunoresponsive gene 1	33.91	5.89	73.65	AI323667
macrophage activation 2 like	50.31	1.07	64.47	AI847177
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	22.33	0.98	63.94	M34815
serum amyloid A 3	13.35	21.09	51.18	X03505
guanylate nucleotide binding protein 4	34.58	1.03	42.41	AW047476
Similar to interferon-inducible GTPase	36.56	1.11	38.69	AI449282
Diabetic nephropathy-like protein (Dnr12) mRNA, partial sequence	33.75	0.71	36.78	AA816121
histocompatibility 2, complement component factor B	7.07	1.64	33.92	AF049850
interferon inducible GTPase 1	26.96	0.85	33.28	AJ007971
lymphocyte antigen 6 complex, locus A	24.41	1.08	24.96	X04653
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	4.16	0.98	24.02	AA174767
chemokine (C-C motif) ligand 5	9.99	1.58	23.69	AF065947
RIKEN cDNA 9830147J24 gene	15.00	1.33	22.12	AI021374
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3G	14.28	1.00	19.08	M64085
AV235161:AV235161 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=4732402N03 /clone_end=3' /gb=AV235161 /gi=6187674 /ug=Mm.49325 /len=307 /NOTE=replacement for probe set(s) 139376_f_at, 139377_r_at on MG-U74C	12.67	0.67	18.04	AV235161
AI662678:va80h10.x1 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=IMAGE-737731 /clone_end=3' /gb=AI662678 /gi=4766261 /ug=Mm.98614 /len=276	16.43	0.98	17.23	AI662678
CD274 antigen	14.69	1.59	16.98	AI645624
complement component 3	6.91	3.60	15.10	K02782
interferon inducible GTPase 1	15.52	1.17	14.51	AA914345
interferon regulatory factor 1	11.81	0.98	14.06	M21065
RIKEN cDNA 5830443L24 gene	15.87	1.42	13.87	AI006929
interferon inducible GTPase 2	12.40	0.81	12.45	AJ007972
interferon gamma inducible protein 47	11.21	0.98	10.55	M63630
Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	8.93	1.07	10.31	U60020
signal transducer and activator of transcription 1	11.75	1.04	9.71	U06924
interleukin 12 receptor, beta 1	9.86	0.98	9.32	U23922
interferon inducible protein 1	10.42	0.94	9.21	U19119
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)	7.76	0.98	8.09	D44456
AW123986:UI-M-BH2.3-aqc-g-06-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end	8.57	1.01	7.67	AW123986
immunoresponsive gene 1	2.83	0.98	7.57	L38281
histocompatibility 2, T region locus 23	8.26	0.86	7.06	Y00629
IBR domain containing 3	4.41	1.86	7.01	AW125713
Adult male urinary bladder cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9530055M18 product:unknown EST, full insert sequence	2.66	2.84	6.65	AI847438
C-type lectin domain family 4, member e	1.52	2.80	5.85	AB024717
inhibitor of kappaB kinase epsilon	1.63	2.65	5.20	AB016589
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	2.41	1.23	5.13	AI837819
hypothetical protein A630026L20	4.52	1.05	5.02	AA655780
SAM domain and HD domain, 1	5.23	0.91	5.01	U15635
AW045588:UI-M-BH1-aks-h-08-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=UI-M-BH1-aks-h-08-0-UI /clone_end=3' /gb=AW045588 /gi=5906117 /ug=Mm.45230 /len=455	4.40	0.98	4.96	AW045588
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	1.69	1.48	4.92	AA673960
GTPase, very large interferon inducible 1	5.87	0.90	4.91	AI596717
interferon activated gene 204 /// interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen /// similar to Interferon-activatable protein 205 (IFI-205) (D3 protein)	5.40	0.82	4.87	M74123

Gen	Induktion IFN γ	Induktion TNF	Induktion I+T	Acc. Nr.
intercellular adhesion molecule	2.68	1.39	4.77	M90551
A1836367:UI-M-AP0-abi-b-11-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=UI-M-AP0-abi-b-11-0-UI /clone_end=3' /gb=A1836367 /gi=5470580 /ug=Mm.4975 /len=332	4.33	1.09	4.64	A1836367
hemopoietic cell kinase	2.89	1.58	4.59	J03023
cyclin A1	3.87	1.13	4.58	X84311
Similar to RIKEN cDNA 5830477G23 gene	1.82	1.67	4.57	A1851470
caspase recruitment domain 4	3.83	1.27	4.57	AW121595
histocompatibility 2, class II, locus DMA	5.25	0.83	4.41	U35323
interleukin 15 receptor, alpha chain	2.80	1.07	4.38	U22339
transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	3.65	0.73	4.34	U60091
AV361189:AV361189 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=7530422K18 /clone_end=3' /gb=AV361189 /gi=6408477 /ug=Mm.96448 /len=252 /NOTE=replacement for probe set(s) 99736_f_at on MG-U74A	3.20	1.09	4.20	AV361189
expressed sequence A1451557	4.21	0.95	4.17	A1593556
syntaxin 11	2.35	1.57	4.01	AA267733
TRAF type zinc finger domain containing 1	4.31	0.82	3.98	AW049897
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.25	2.19	3.77	U57524
complement component 1, r subcomponent	3.80	1.48	3.67	A1132585
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	3.79	0.95	3.66	Y10875
sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	2.37	1.35	3.66	AA895031
solute carrier family 31, member 2	2.00	1.46	3.64	AW212839
GLI pathogenesis-related 2	2.22	1.01	3.63	AV315963
signal transducer and activator of transcription 1	3.94	1.00	3.49	AA960121
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta	2.88	1.04	3.45	U60329
similar to RIKEN cDNA 5830484A20	3.73	0.90	3.41	AA691049
A1551337:vx45d09.x1 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=IMAGE- 1278161 /clone_end=3' /gb=A1551337 /gi=4483700 /ug=Mm.35249 /len=447	1.95	1.51	3.33	A1551337
three prime repair exonuclease 1	2.31	1.04	3.27	AW060269
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.39	1.96	3.17	AV370033
RIKEN cDNA 5133401N09 gene	2.85	1.07	3.16	AW048291
RIKEN cDNA 1110007F12 gene	3.27	1.06	3.11	A1838258
N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	3.39	0.99	3.09	A1838972
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	2.25	1.01	3.08	A1853706
Traf2 binding protein	2.19	1.14	3.06	A1837648
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7)	3.26	0.97	3.03	U22033
RIKEN cDNA 5830411O07 gene	2.56	1.11	2.97	AA856503
glutaredoxin 1 (thioltransferase)	3.10	0.97	2.93	AB013137
Hect domain and RLD 5	2.94	0.98	2.84	A1852111
AV064077:AV064077 Mus musculus cDNA /clone=2010009G02 /clone_end=3' /gb=AV064077 /gi=5183905 /ug=Mm.45914 /len=205 /NOTE=replacement for probe set(s) 140074_f_at on MG-U74C	2.08	0.83	2.83	AV064077
lymphotoxin B	1.22	1.50	2.82	U16985
hypothetical protein A330042H22	1.37	1.95	2.81	A1845269
glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	1.42	0.97	2.79	D50430
RAS p21 protein activator 4	2.64	1.19	2.78	AA163960
Phosphodiesterase 4B, cAMP specific	1.55	1.27	2.72	A1847140
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	1.58	1.10	2.72	M83312
cDNA sequence BC013712	2.61	0.74	2.71	AA170203
histocompatibility 2, class II, locus Mb2	2.60	0.95	2.69	U35330
complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	3.89	0.35	2.65	M22531
RIKEN cDNA 1200015F23 gene	2.81	0.99	2.65	A1841400
pre-B-cell colony-enhancing factor 1	2.99	1.01	2.64	A1852144
histocompatibility 2, D region locus 4	1.91	1.23	2.62	X52914
histocompatibility 2, Q region locus 2	2.34	1.19	2.56	X58609
proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	2.41	0.93	2.52	AB007136
RIKEN cDNA 5031415C07 gene /// RIKEN cDNA 5830484A20 gene /// similar to RIKEN cDNA 5830484A20 /// similar to RIKEN cDNA 5830484A20	3.27	1.01	2.50	A1121807
glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	1.27	0.83	2.49	A1643851
Fc receptor, IgG, high affinity I	3.18	0.83	2.47	AV092959
melanoma antigen, family B, 3	2.88	1.16	2.46	U19033
AV270997:AV270997 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=4931404D21 /clone_end=3' /gb=AV270997 /gi=6259034 /ug=Mm.50548 /len=236 /NOTE=replacement for probe set(s) 110869_at on MG-U74B	2.81	1.13	2.46	AV270997

Gen	Induktion IFN γ	Induktion TNF	Induktion I+T	Acc. Nr.
histocompatibility 2, Q region locus 1 /// similar to MHC class I histocompatibility antigen H-2 Q4 alpha chain precursor - mouse	2.17	1.25	2.45	M18837
Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	2.20	0.96	2.42	AI467596
AA261092:mz65g04.r1 Mus musculus cDNA, 5' end /clone=IMAGE-718326 /clone_end=5' /gb=AA261092 /gi=1895413 /ug=Mm.21239 /len=448	1.88	0.78	2.42	AA261092
sorting nexin 10	2.39	1.04	2.39	AI746846
G protein-coupled receptor 18	1.40	1.00	2.37	AI549772
cytochrome b-245, beta polypeptide	1.58	1.86	2.27	AI226955
RIKEN cDNA 2700019D07 gene	1.86	1.01	2.23	AI116290
Class II transactivator	2.24	1.25	2.12	AI390598
hypothetical LOC434565 /// similar to LOC434484 protein	1.98	1.06	2.10	AW214598
potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	2.03	1.06	2.09	D50581
AT rich interactive domain 5B (Mrf1 like)	1.72	0.99	2.09	AI173737
tumor necrosis factor	0.98	1.09	1.97	D84196
similar to Nur77 downstream protein 1	1.20	1.23	1.88	AA636966
RIKEN cDNA 2610307O08 gene	1.85	0.69	1.86	AV300716
chloride channel 7	1.39	1.05	1.84	AI850563
ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	1.54	1.06	1.83	AW048912
baculoviral IAP repeat-containing 2	1.31	1.09	1.82	U88909
complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	2.66	0.34	1.81	X66295
kinesin family member 5C	2.91	0.98	1.80	AI842555
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	0.91	1.02	1.79	AF030896
RIKEN cDNA 1200015F23 gene /// similar to 1200015F23Rik protein	1.39	0.89	1.78	AI842428
interleukin 2 receptor, gamma chain	1.37	0.90	1.75	AV145474
AA764261:vv49f08.r1 Mus musculus cDNA, 5' end /clone=IMAGE-1225767 /clone_end=5' /gb=AA764261 /gi=2811783 /ug=Mm.2322 /len=320	1.23	1.13	1.73	AA764261
inositol polyphosphate-5-phosphatase B	1.44	0.99	1.73	AI843172
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A	1.54	1.03	1.71	X85991
RIKEN cDNA 0710001B24 gene	1.90	0.86	1.71	AV314126
interferon induced transmembrane protein 3	1.76	1.21	1.70	AW125390
expressed sequence AI326906	1.69	0.87	1.69	AI852022
RIKEN cDNA 1810036H07 gene	1.13	1.29	1.68	AA027452
lymphocyte antigen 6 complex, locus C	1.81	1.04	1.66	D86232
histocompatibility 2, D region locus 1 /// histocompatibility 2, D region similar to MHC Q8/9d surface antigen	1.54	1.28	1.66	X52490
RIKEN cDNA 4933412E12 gene	1.43	1.24	1.66	X16202
inositol polyphosphate-5-phosphatase B	1.50	0.91	1.65	AV323678
RIKEN cDNA 6330578E17 gene	1.28	0.80	1.60	AF040094
histocompatibility 2, D region locus 1	1.56	0.87	1.59	AW210195
complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	1.41	1.22	1.57	M69069
cDNA sequence BC027344	2.15	0.93	1.57	AI893770
AI117211:ub83g12.r1 Mus musculus cDNA, 5' end /clone=IMAGE-1395142 /clone_end=5' /gb=AI117211 /gi=3517535 /ug=Mm.86632 /len=464	1.61	0.96	1.55	AI427543
AV210888:AV210888 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=1700127C05 /clone_end=3' /gb=AV210888 /gi=6151357 /ug=Mm.59325 /len=308 /NOTE=replacement for probe set(s) 137424_f_at on MG-U74C	1.45	1.24	1.55	AI117211
RIKEN cDNA 6330442E10 gene	1.36	1.36	1.55	AV210888
histocompatibility 2, M region locus 3	1.98	0.94	1.55	AI844839
Fc receptor, IgG, high affinity I	1.59	1.02	1.55	AA163474
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	2.09	0.92	1.54	M31314
OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2	1.08	1.08	1.53	AI451314
leukocyte receptor cluster (LRC) member 9	1.40	1.03	1.52	AA611133
twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila) /// RIKEN cDNA 1810013J15 gene	1.10	0.97	1.52	AW046284
histocompatibility 2, K1, K region	1.57	0.98	1.52	AW060819
histocompatibility 2, class II antigen E beta	1.36	1.25	1.50	V00746
cDNA sequence BC057552	1.33	0.91	1.50	X00958
a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	1.29	0.97	1.50	AI851954
RAP2C, member of RAS oncogene family	1.68	1.13	1.47	AW123862
haptoglobin	1.44	0.89	1.47	AI842515
potassium channel, subfamily T, member 1	0.84	2.31	1.46	M96827
ring finger protein 31	1.41	1.59	1.44	AW046907
RIKEN cDNA 1300011L04 gene	1.16	0.95	1.43	AI157932
	1.69	1.19	1.41	AW121604

Gen	Induktion IFN γ	Induktion TNF	Induktion I+T	Acc. Nr.
AA189644:mt97a08.r1 Mus musculus cDNA, 5' end /clone=IMAGE-637814 /clone_end=5' /gb=AA189644 /gi=1776398 /ug=Mm.30630 /len=269	1.55	0.96	1.41	AA189644
cathepsin S	1.58	0.94	1.40	AJ223208
RIKEN cDNA 2310038H17 gene	1.45	1.11	1.40	AW121629
lectin, galactose binding, soluble 1	0.72	0.78	1.37	AV015233
AI505387:Vq81a10.x1 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=IMAGE-1108698 /clone_end=3' /gb=AI505387 /gi=4403238 /ug=Mm.31172 /len=169	1.29	1.13	1.36	AI505387
RIKEN cDNA D130058I21 gene	1.14	2.26	1.35	AI326813
HLA-B associated transcript 5	1.29	1.00	1.34	AF109905
Zic finger protein of the cerebellum 2	1.62	0.86	1.33	AW049464
beta-2 microglobulin	1.37	1.09	1.32	X01838
ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	1.53	0.90	1.31	AW125151
tubulin, alpha 8	0.90	1.33	1.30	AI848983
AV373749:AV373749 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=9130001E12 /clone_end=3' /gb=AV373749 /gi=6421396 /ug=Mm.99828 /len=234 /NOTE=replacement for probe set(s) 109286_f_at on MG-U74B	1.57	1.25	1.29	AV373749
inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	1.36	0.90	1.28	X15373
AW122281:UI-M-BH2.2-aos-a-11-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=UI-M-BH2.2-aos-a-11-0-UI /clone_end=3' /gb=AW122281 /gi=6097760 /ug=Mm.82627 /len=292	1.27	1.21	1.27	AW122281
RIKEN cDNA 4933405I11 gene /// mucin 4	1.67	2.28	1.25	AV259716
RIKEN cDNA C230085N15 gene	0.97	1.63	1.21	AI510345
cDNA sequence BC033915	1.24	1.04	1.21	AW121881
RIKEN cDNA E030041M21 gene	1.17	1.76	1.19	AI849642
Son cell proliferation protein	1.25	1.82	1.19	AV166116
G protein-coupled receptor 43	1.32	1.18	1.18	AI450742
Tripartite motif protein 32	1.21	1.22	1.15	AU023939
RIKEN cDNA E530015N03 gene	1.83	1.22	1.14	AU022474
RIKEN cDNA 2810474O19 gene	1.10	0.72	1.14	AI157102
RIKEN cDNA 8430436F23 gene	1.01	1.35	1.09	AI480695
SLIT and NTRK-like family, member 1	1.21	2.02	1.09	AW125006
CD163 antigen	1.00	1.99	1.03	AI450439
AU019328:AU019328 Mus musculus cDNA, 3' end /clone=J0516B07 /clone_end=3' /gb=AU019328 /gi=3374912 /ug=Mm.26163 /len=440	1.54	1.43	1.01	AU019328
AV258812 Mus musculus cDNA, 3' end	1.36	0.98	1.01	AV258812
protein-tyrosine sulfotransferase 2	1.38	0.88	1.00	AF049890
similar to RIKEN cDNA 1700029I01	1.07	2.12	0.98	AA414083
AA172358:ms95c09.r1 Mus musculus cDNA, 5' end	1.06	1.53	0.98	AA172358
transmembrane protein 39b	0.81	0.92	0.93	AI448379
RIKEN cDNA 4933440M02 gene	1.16	2.20	0.92	AI504108
RIKEN cDNA 9130203F04 gene	1.34	1.64	0.92	AI851384
RIKEN cDNA D230004J03 gene	1.06	1.50	0.87	AA067995
lysosomal-associated protein transmembrane 5	0.94	0.84	0.86	AV330551
BH3 interacting domain death agonist	0.77	1.10	0.85	AV376592
AV030668:AV030668 Mus musculus cDNA /clone=1500015F05 /clone_end=3' /gb=AV030668 /gi=4830216 /ug=Mm.52462 /len=329 /NOTE=replacement for probe set(s) 139860_f_at on MG-U74C	0.95	1.63	0.79	AV030668
peptidase D	1.14	0.79	0.77	U51014
mannoside acetylglucosaminyltransferase 5	0.69	0.84	0.77	AI854578
phosphorylase kinase beta	0.75	0.95	0.75	AA647555
RIKEN cDNA 1810027O10 gene	0.74	0.78	0.74	AV063183
methionine aminopeptidase-like 1	0.88	0.83	0.73	AI448931
fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein	0.76	0.88	0.71	AI843393
leukotriene C4 synthase	0.58	0.60	0.70	U27195
protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha	0.71	0.71	0.69	AW123545
RIKEN cDNA A230098A12 gene	0.75	0.70	0.69	AA114630
signaling molecule ATTP	0.72	0.95	0.68	AI462732
ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 4	0.84	2.29	0.68	AV212839
AI591852:mt23c03.y1 Mus musculus cDNA, 5' end	0.96	0.72	0.67	AI591852
expressed sequence AV216087	0.63	0.94	0.66	AI048029
EGL nine homolog 1 (C. elegans)	0.69	0.88	0.65	AW124440
deltex 4 homolog (Drosophila)	0.74	1.03	0.64	AW122183
nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	0.62	0.74	0.63	AW049159
expressed sequence AI450948	0.94	0.97	0.62	AI156068
RIKEN cDNA 6530411B15 gene	0.67	0.76	0.62	AI842351
nurim (nuclear envelope membrane protein)	0.68	0.83	0.62	AI853320
calmin	0.67	1.08	0.62	AA683822

Gen	Induktion IFN γ	Induktion TNF	Induktion I+T	Acc. Nr.
meteorin, glial cell differentiation regulator	0.64	0.74	0.60	AI848066
Fc receptor-like 1	0.71	0.95	0.59	AI153874
Retinoic acid induced 17	0.63	0.75	0.58	AI846059
Gene model 1533, (NCBI)	0.57	0.86	0.58	AI036798
RIKEN cDNA 3110073H01 gene	0.77	0.89	0.56	AI846580
spectrin domain with coiled-coils 1	0.63	0.69	0.56	AA683785
AA080573:mn90h03.r1 Mus musculus cDNA, 5' end /clone=IMAGE-551381 /clone_end=5' /gb=AA080573 /gi=1619579 /ug=Mm.27048 /len=118	0.47	0.87	0.51	AA080573
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	0.56	1.29	0.47	AI413822
insulin-like growth factor binding protein 4	0.73	0.66	0.46	X76066
RIKEN cDNA 2210010N04 gene	0.48	0.76	0.45	AW060479
Lrp2 binding protein	0.47	0.74	0.45	AW046035
Dip3 beta	0.53	0.73	0.43	AW124910
Adult male bone cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9830169G21 product:unknown EST, full insert sequence	0.57	0.76	0.41	AI116109
integrin alpha 6	0.58	0.60	0.40	X69902
AI854056:UI-M-BH0-ajm-f-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end	0.37	0.92	0.35	AI854056
ribonuclease, RNase A family 4	0.53	0.41	0.34	AI840339
RAS, guanyl releasing protein 3	0.39	0.66	0.32	AA718634
mannose receptor, C type 1	0.40	0.40	0.30	Z11974
annexin A1	0.42	0.87	0.30	AV003419
regulator of G-protein signaling 2	0.66	0.62	0.26	U67187
RAS, guanyl releasing protein 3	0.37	0.57	0.23	AI447816
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	0.32	0.77	0.19	X95281

Anhang B: Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens von mGBP6

1	ATG	ACC	CAA	CCA	CAA	ATG	GCT	CCC	ATT	TGC	CTT	GTG	GAA	AAC	CAC	45
46	AAT	GAA	CAG	CTG	TCA	GTG	AAC	CAG	GAA	GCC	ATA	GAG	ATT	CTG	GAC	90
91	AAG	ATT	TCT	CAG	CCA	GTG	GTA	GTC	GTG	GCT	ATT	GTT	GGA	TTG	TAC	135
136	CGT	ACA	GGG	AAG	TCC	TAT	TTG	ATG	AAC	TGT	TTG	GCG	GGA	CAG	AAT	180
181	CAC	GGC	TTT	CCT	CTG	GGC	TCC	ACC	GTG	CAG	TCT	CAG	ACC	AAG	GGC	225
226	ATC	TGG	ATG	TGG	TGC	ATG	CCA	CAC	CCC	ACC	AAG	CCA	GAG	CAC	ACC	270
271	CTG	GTC	CTC	CTG	GAC	ACT	GAG	GGC	CTG	GGG	GAT	GTG	GAA	AAG	GGT	315
316	GAT	CCT	AAG	AAC	GAC	TTG	TGG	ATC	TTT	GCC	CTC	AGC	GTG	CTT	CTG	360
361	AGC	AGC	ACC	TTC	ATC	TAC	AAC	AGC	ATG	ATC	ACC	ATC	AAC	CAC	CAG	405
406	GCC	CTG	GAG	CAG	CTG	CAT	TAT	GTC	ACA	GAA	CTC	ACA	GAG	CTG	ATC	450
451	AGA	GCA	AAG	TCT	TCC	CCA	AAT	CCT	GCT	GGA	ATA	AAG	AAT	TCC	ACA	495
496	GAG	TTT	GTG	AGT	TTC	TTT	CCA	GAC	TTT	GTC	TGG	ACT	GTT	CGG	GAT	540
541	TTC	ATG	CTG	GAG	CTG	AAG	TTA	AAT	GGG	GAA	GAC	ATC	ACA	AGT	GAT	585
586	GAC	TAC	CTG	GAG	AAT	GCC	TTG	AAG	CTG	ATC	CCA	GGT	GAC	AAA	CCC	630
631	AGA	ATG	CAA	GCA	TCC	AAT	TCA	TGC	AGG	GAA	TGC	ATC	AGA	CTT	TTC	675
676	TTT	CCT	AAC	CGG	AAG	TGT	TTT	GTC	TTT	GAC	CGG	CCA	ACG	CAT	GAC	720
721	AAA	GAA	CTT	TTA	CAA	AAA	CTT	GAT	TCT	ATC	ACA	GAA	GAC	CAA	CTG	765
766	GAT	CCT	AAG	TTC	CAG	GAA	GTA	ACA	AAG	GCT	TTT	GTT	TCT	TAC	ATC	810
811	TTC	ACT	TAT	GCC	AAG	ATC	AAG	ACC	CTA	AAA	GAG	GGA	ATT	AAG	GTC	855
856	ACT	GGG	AAT	AGA	CTA	GGG	ATT	CTG	GTG	ACA	ACC	TAT	GTG	AAT	GCC	900
901	ATC	AAC	AGT	GGA	GCA	GTG	CCT	TGT	CTG	GAT	GAT	GCT	GTG	ACA	ACT	945
946	CTG	GCC	CAG	CGT	GAG	AAC	TCA	GTA	GCT	GTG	CAG	AAA	GCA	GCC	GAC	990
991	CAC	TAT	AGT	GAG	CAG	ATG	GCC	CAG	CGA	CTG	AGG	CTT	CCT	ACA	GAA	1035
1036	ACG	CTC	CAG	GAG	CTG	CTG	GAT	GTG	CAT	GCA	GCC	TGC	GAG	AAG	GAA	1080
1081	GCC	ATG	GCT	GTC	TTC	ATG	GAG	CAT	TCC	TTC	AAG	GAC	GAA	AAT	CAG	1125
1126	CAA	TTC	CTG	AAG	AAG	CTG	GTG	GAA	TTA	ATA	GGA	GAG	AAC	AAA	GAG	1170
1171	CTT	TTC	CTG	TCG	AAG	AAT	GAA	GAG	GCA	TCA	AAT	AAA	TAC	TGT	CAA	1215
1216	GAA	GAA	CTG	GAT	CGA	CTT	TCA	AAG	GAT	TTT	ATG	GAA	AAT	ATT	TCA	1260
1261	ACA	TTT	TTT	GTT	CCT	TGT	GGA	CAC	AAG	CTT	TAC	ATG	GAC	AAG	AGG	1305
1306	GAG	AAG	ATT	GAA	CAT	GAC	TAC	TGG	CAG	GTT	CCC	AGG	AAA	GGG	GTG	1350
1351	AAG	GCA	AGT	GAA	GTC	TTC	CAG	AGC	TTT	CTG	CAG	TCA	CAG	GCC	TTC	1395
1396	ATC	GAG	AGT	TCC	ATC	TTG	CAG	GCA	GAT	ACA	GCG	CTC	ACT	GCT	GGG	1440
1441	GAG	AAG	GCC	ATT	GCA	GAG	GAG	CGT	GCC	CAG	AAG	GTG	GCG	GCA	GAG	1485
1486	AAG	GAG	CAA	GAG	CTG	CTA	AGA	CAG	AAG	CAG	AAG	GAG	CAG	CAG	GAG	1530
1531	TAT	ATG	GAG	GCT	CAA	GAG	AAA	AGT	CAC	AAG	GAA	AAC	CTA	GAG	CAA	1575
1576	CTG	AGA	AGG	AAG	CTG	GAG	CAG	GAG	AGA	GAG	CAG	GAC	ATC	AAA	GAC	1620
1621	CAT	GAT	ATG	ATG	CTG	AAG	AAG	CTA	ATG	AAG	GAT	CAA	AAG	GCT	TTC	1665
1666	CTT	GAG	GAA	GGA	TTT	AAG	AAG	AAA	GCT	GAA	GAA	ATG	AAC	AAA	GAG	1710
1711	ATA	CAG	CAA	CTG	AGA	GAT	GTC	ATC	AAG	GAT	AAG	AAA	AGA	AAC	ACT	1755
1756	GAT	CGA	ATT	AAG	GAG	GCT	CTC	TTA	AAT	GGA	TTT	TCT	ACA	GTT	CTT	1800
1801	TTT	CAT	TAC	CTT	GTC	CGT	TAT	CTA	AAG	CAT	TTA	TAG				1836

