

**Charakterisierung Interferon-gamma-induzierter Gene:
Interferon-induzierbares Protein 35,
Nociceptin/Orphanin FQ
und
humanes Guanylat-bindendes Protein 3**

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Anke Meyerdierks

geboren am 17. November 1968, in Osterholz-Scharmbeck

1998
(Druckjahr)

Referent: Prof. Dr. E.C. Böttger

Korreferent: Prof. Dr. G.-F. Gerlach

Tag der Promotion: 16. Dezember 1998

Zusammenfassung

Stichworte: IFP 35; Nociceptin/OFQ; hGBP-3

Interferon-gamma (IFN- γ) spielt innerhalb des Immunsystems eine zentrale Rolle als Regulator zellvermittelter Immunreaktionen. Es beeinflusst neben der Aktivierung von Makrophagen auch die Antigenpräsentation und vermittelt sowohl antivirale als auch antimikrobielle Effekte. Bis heute sind über 200 IFN- γ -induzierte Gene beschrieben worden; vielen konnte bisher noch keine Funktion innerhalb der Immunantwort zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei IFN- γ -induzierte Genprodukte charakterisiert: Interferon-induzierbares Protein 35 (IFP35), Nociceptin/Orphanin FQ (Nociceptin/OFQ) und das humane Guanylat-bindende Protein 3 (hGBP-3).

- IFP35 ist ein Leuzin-Zipper-Protein, dessen Expression durch Interferone reguliert wird. Es ist im Zytoplasma lokalisiert und zeigt in der Immunfluoreszenz nach IFN- γ -Induktion ein punktförmig über das Zytoplasma verteiltes Muster. Mit Hilfe von Doppelimmunfluoreszenzen, subzellulären Fraktionierungen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß IFP35 weder mit einer Zellorganelle noch mit einem Zellkompartiment assoziiert ist. IFP35, dessen theoretisches Molekulargewicht 31,74 kDa beträgt, eluierte in der Gelfiltration bei einem Molekulargewicht von 150-440 kDa, was auf die Bildung von Homo- oder Heteromultimeren hindeutet. Sowohl die Homodimerisierung von IFP35 als auch die Interaktion von IFP35 mit dem IFN-induzierbaren Nmi-Protein wurde mit Hilfe von Transfektionsexperimenten nachgewiesen. In der Immunfluoreszenz wurde eine partielle Kolo-kalisierung von IFP35 und Zytokeratin 19 beobachtet. Des weiteren kolokalisiert IFP35 mit einem noch unbekanntem Protein, mit dem der gegen p53 gerichtete Antikörper pAb1801 kreuzreagiert. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß IFP35 ein Bestandteil zytoplasmatisch verteilter Proteinkomplexe ist, an deren Ausbildung unterschiedliche Proteine beteiligt sind.

- Nociceptin/OFQ ist ein Neuropeptid, das an der Schmerzempfindung beteiligt ist. Ein cDNA-Klon von Nociceptin/OFQ, isoliert aus einer Genbank, die aus mRNAs der Makrophagen-Vorläuferzelllinien THP-1 und U937 hergestellt worden war, wurde charakterisiert. Northern Blot-Analysen ergaben, daß die mRNA vorrangig in B-Lymphozyten des peripheren Blutes exprimiert wird; die Expression der mRNA des Nociceptin/OFQ-Rezeptors hORL1 wurde in Monozyten und Granulozyten nachgewiesen. Eine Expression der mRNA des Rezeptors wurde nur in Zellen beobachtet, in denen die mRNA des Liganden nicht exprimiert wurde, so daß eine autokrine Funktion von Nociceptin/OFQ ausgeschlossen werden kann.

- Humanes GBP-3 wurde als vollständiger cDNA-Klon aus einer Genbank isoliert, die für cDNAs IFN- γ - und 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)-induzierter mRNAs angereichert war. Die 2419 bp lange cDNA kodiert für ein 66,6 kDa großes Protein. Sowohl die Nukleinsäure- als auch die Aminosäuresequenz weisen eine signifikante Homologie zu den Sequenzen der humanen Guanylat-bindenden Proteine hGBP-1 und hGBP-2 auf; zusätzlich wurden zwei für Guanylat-bindende Proteine charakteristische Konsensusmotive identifiziert. Die durch IFN- γ und PHA (Phytohämagglutinin) induzierbare Expression der 2,4 kb großen mRNA wurde vorrangig in Monozyten sowie in Milzgewebe nachgewiesen. Die Untersuchung der Expression des hGBP-3-Proteins mit Hilfe eines Antiserums, das gegen eine Peptidsequenz des hGBP-3 gerichtet ist, bestätigte die Ergebnisse der Northern Blot-Untersuchungen weitgehend. Die Bindung von rekombinantem hGBP-3-Protein an Agarose-gekoppeltes GTP, ein charakteristisches Merkmal der GBP-Proteine, wurde nachgewiesen.

Abstract

Keywords: IFP 35; Nociceptin/OFQ; hGBP-3

Interferon-gamma (IFN- γ) plays a central role as a regulator of cell mediated immunity affecting activation of macrophages and presentation of antigens. In addition IFN- γ mediates antiviral as well as antimicrobial activities. At present, more than 200 IFN- γ -induced genes have been described; for most of them, no function within the immune response has yet been described.

In this study three IFN- γ -induced gene products were characterized: Interferon-inducible protein 35 (IFP35), Nociceptin/Orphanin FQ (Nociceptin/OFQ) and human guanylate-binding protein 3 (hGBP-3).

- IFP35 is a leucine zipper protein, whose expression is regulated by interferons. IFP35 is localized in the cytoplasm; following IFN- γ -induction a speckled-like staining pattern of IFP35 was observed in immunofluorescence studies. Using double immunofluorescence, subcellular fractionation and electron microscopy it was demonstrated that IFP35 does not associate with specific cell organelles or compartments. IFP35, a protein with a theoretical molecular mass of 31,74 kDa, eluted at a molecular mass of 150-440 kDa in gelfiltration experiments, indicating the formation of homo- or heteromultimeric complexes. Homodimerisation of IFP35 as well as interaction of IFP35 with the IFN-inducible Nmi-protein was shown by transfection studies. In immunofluorescence studies a partial colocalization of IFP35 with cytokeratin 19 was observed. In addition IFP35 colocalizes with an unknown protein, which is recognized by the cross reacting antibody pAb 1801 originally raised against p53. These results indicate that IFP35 is a part of cytoplasmic protein aggregates; in the formation of the aggregates a number of different proteins seems to be involved.

- Nociceptin/OFQ is a neuropeptide involved in nociception. A cDNA clone of Nociceptin/OFQ isolated from a library, prepared from the macrophage precursor cell lines THP-1 and U937, was characterized. Northern blot analyses revealed, that the mRNA of Nociceptin/OFQ is predominantly expressed in B-lymphocytes of the peripheral blood; the mRNA of the Nociceptin/OFQ receptor hORL1 was detected in monocytes and granulocytes. Expression of the receptor mRNA was only observed in cells not expressing the mRNA of the ligand; thus an autocrine function of Nociceptin/OFQ can be excluded.

- Human GBP-3 was isolated as a full length cDNA clone from a library enriched for cDNAs of IFN- γ - and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mRNAs. The 2419 bp cDNA encodes a protein with a molecular mass of 66,6 kDa. The nucleic acid as well as the amino acid sequence are significantly homologous to the sequences of the human guanylate-binding proteins hGBP-1 and hGBP-2; in addition two consensus motives characteristic for guanylate-binding proteins were found. The expression of the 2,4 kb mRNA could be induced by IFN- γ and phytohemagglutinin (PHA) and was predominantly observed in monocytes as well as in the spleen. The results of the northern blot analyses were confirmed by investigating the expression of the hGBP-3 protein, using a specific antiserum raised against a peptide sequence of hGBP-3. Binding of recombinant hGBP-3 protein to agarose-coupled GTP, a characteristic feature of GBP-proteins, was shown.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT.....	4
INHALTSVERZEICHNIS.....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	10
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	12
TABELLENVERZEICHNIS.....	14
1 EINLEITUNG	15
1.1 ZYTOKINE	15
1.2 INTERFERONE	15
1.2.1 <i>Interferon-Rezeptoren und Signaltransduktion.....</i>	<i>16</i>
1.2.2 <i>Immunregulatorische Funktionen von IFN-γ.....</i>	<i>18</i>
1.2.2.1 <i>Produktion von Immunglobulinen und Expression von Immunglobulin-</i> <i>Rezeptoren</i>	<i>19</i>
1.2.2.2 <i>Antigenpräsentation und Expression von Gewebshistokompatibilitätsantigenen</i>	<i>19</i>
1.2.2.2.1 <i>Antivirale Effekte von IFN-γ</i>	<i>20</i>
1.2.2.2.2 <i>Antimikrobielle Effekte von IFN-γ</i>	<i>21</i>
1.2.2.3 <i>Interaktion von Leukozyten und Endothel</i>	<i>22</i>
1.2.2.4 <i>Aktivierung von Makrophagen</i>	<i>23</i>
1.2.2.5 <i>IFN-γ-induzierte Gene mit unbekannter Funktion</i>	<i>23</i>
1.3 ZIELSETZUNG	25
2 MATERIALIEN	26
2.1 CHEMIKALIEN	26
2.2 ENZYME, ENZYMSYSTEME UND REAKTIONSZUSÄTZE	26
2.3 GRÖSSENSTANDARDS, ISOLIERUNGS- UND ENTWICKLUNGSSYSTEME	27
2.4 MATERIALIEN FÜR DIE KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	28
2.5 MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG EUKARYONTER ZELLEN...28	
2.6 GERÄTE.....	28
2.7 VERBRAUCHSMATERIAL	30
2.8 ANTIKÖRPER	31
2.8.1 <i>Primärantikörper (ungekoppelt).....</i>	<i>31</i>
2.8.2 <i>Primärantikörper (konjugiert).....</i>	<i>32</i>
2.8.3 <i>Sekundärantikörper.....</i>	<i>33</i>
2.9 OLIGODESOXYNUKLEOTIDE	33
2.10 VEKTOREN, PLASMIDE UND GENBANKEN	34
2.11 BAKTERIENSTÄMME.....	36
2.12 ZELLINIEN	36
2.13 PUFFER UND ANDERE LÖSUNGEN	37

3 METHODEN	38
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	38
3.1.1 Kultivierung von Säugetierzellen.....	38
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	38
3.1.3 Zellzahlbestimmung	38
3.1.4 Transienter Gentransfer in eukaryontische Zellen	38
3.1.5 Induktion von Zellen mit unterschiedlichen Agentien.....	39
3.1.6 Isolierung von peripheren Blutzellsubpopulationen.....	40
3.1.6.1 Trennung von mononukleären und polymorphkernigen Blutzellen	40
3.1.6.2 Immunmagnetische Aufreinigung von Monozyten, B- und T-Lymphozyten.....	41
3.1.6.3 Präparation von Monozyten über Adhärenz	41
3.1.6.4 Präparation von Granulozyten	42
3.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.2.1 Allgemeines.....	42
3.2.2 Elektrotransformation von Bakterien	42
3.2.2.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien	42
3.2.2.2 Elektrotransformation	43
3.2.3 Phagenkompetente Bakterien.....	43
3.2.4 Phagentiterbestimmung	43
3.2.5 Ausplattieren der Phagen und Plaquettransfer	43
3.2.6 Isolierung von Phagen.....	44
3.2.7 In vivo Exzision.....	44
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	45
3.3.1.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit	45
3.3.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA	45
3.3.2 Präparation und Analyse von Plasmiden	46
3.3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA	46
3.3.2.1.1 Plasmid-Mini-Präparation von DNA nach Birnboim	46
3.3.2.1.2 Plasmid-Midi-Präparation von DNA nach QIAGEN.....	46
3.3.2.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen.....	46
3.3.2.3 QIAquick-Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	47
3.3.2.4 QIAquick-Aufreinigung von PCR-Produkten	47
3.3.2.5 Präzipitation von DNA	47
3.3.2.6 Hydrolyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.....	48
3.3.2.7 Dephosphorylierung von DNA	48
3.3.2.8 Ligation von DNA	48
3.3.2.9 Aufarbeitung von Ligationen für die Elektrotransformation	49
3.3.2.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion	49
3.3.2.11 Mutagenese-PCR	49
3.3.2.12 RT-PCR	51
3.3.2.13 Sequenzierung von DNA	51
3.3.3 Präparation und Analyse von eukaryontischer RNA.....	52
3.3.3.1 Allgemeines	52
3.3.3.2 Gesamt-RNA-Präparation.....	52
3.3.3.2.1 Gesamt-RNA-Präparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation ...	52

3.3.3.2.2 Gesamt-RNA-Präparation unter Anwendung der „Single Step“-Methode.....	53
3.3.3.2.3 Gesamt-RNA-Präparation mit Hilfe des RNeasy Mini Kits	53
3.3.3.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese	54
3.3.3.4 Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran (Northern Blot).....	54
3.3.4 Northern- und Plaque-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Sonden	55
3.3.4.1 Herstellung von Digoxigenin markierten cRNA-Sonden	55
3.3.4.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden	56
3.3.4.3 Northern-Hybridisierung	56
3.3.4.4 Plaquehybridisierung	56
3.3.4.5 Immunologischer Nachweis mittels Chemiluminiszenz.....	57
3.4 PROTEINBIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	57
3.4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper	57
3.4.1.1 Immunisierung	57
3.4.1.2 Zellfusion	58
3.4.1.3 Untersuchung auf antikörperproduzierende Hybridomazellklone	58
3.4.1.4 Klonierung	59
3.4.1.5 Gewinnung von Zellkulturüberstand des monoklonalen Antikörpers	59
3.4.1.6 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mittels Protein G-Säule	59
3.4.1.7 Ascitesproduktion	60
3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	60
3.4.3 Coomassiefärbung von Proteingelen.....	61
3.4.4 Immunblot (Western Blot) und Immundetektion	61
3.4.4.1 „Semi-dry“ Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western Blot).....	61
3.4.4.2 Immundetektion	62
3.4.5 Indirekter ELISA zur Detektion spezifischer Antikörper	62
3.4.6 Elektronenmikroskopie	63
3.4.7 Direkte Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie	63
3.4.8 Indirekte Immunfluoreszenz.....	64
3.4.9 Immunpräzipitation.....	65
3.4.10 In vitro Synthese von Proteinen	66
3.4.10.1 In vitro Transkription.....	66
3.4.10.2 In vitro Translation	66
3.4.11 Expression und Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen	66
3.4.11.1 Isolierung von MBP-Fusionsproteinen	67
3.4.11.2 Konzentrierung und Umpufferung Proteinen	67
3.4.11.3 Bestimmung der Protein-Konzentration	67
3.4.12 Gelfiltration	67
3.4.13 Subzelluläre Fraktionierung.....	68
3.4.13.1 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation	68
3.4.13.2 Subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation	69
3.4.14 „NP-40-Präparation“ von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten.....	69
3.4.15 GTP-Bindungsassay.....	70

4 ERGEBNISSE	71
4.1 IFP 35	71
4.1.1 <i>Bestimmung der Nuklein- und Aminosäuresequenz von IFP 35</i>	71
4.1.2 <i>Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen IFP 35</i>	74
4.1.3 <i>Subzelluläre Lokalisierung von IFP 35 in der Immunfluoreszenz</i>	77
4.1.4 <i>Kolokalisierungsexperimente mit Organellen- und Kompartiment-spezifischen Antikörpern</i>	80
4.1.5 <i>Subzelluläre Lokalisierung von IFP 35 mittels subzellulärer Fraktionierung</i>	81
4.1.6 <i>Elektronenmikroskopische Analyse der IFP 35-Strukturen</i>	85
4.1.7 <i>Bestimmung des Molekulargewichts der IFP 35-enthaltenden Aggregate</i>	87
4.1.8 <i>Nachweis der IFN-unabhängigen Bildung der IFP 35-enthaltenden Aggregate und der Homodimerisierung von IFP 35</i>	88
4.1.9 <i>Abhängigkeit des spezifischen IFP 35-Verteilungsmusters von der Proteinbiosynthese</i>	89
4.1.10 <i>Abhängigkeit des zytoplasmatischen IFP 35-Verteilungsmusters von Substanzen, die das Zytoskelett beeinträchtigen</i>	91
4.1.11 <i>IFP 35 und Zytokeratine</i>	92
4.1.12 <i>Interaktion von IFP 35 und B-ATF</i>	93
4.1.13 <i>Interaktion von IFP 35 und Nmi</i>	94
4.1.14 <i>Interaktion von IFP 35 mit einer vom anti-p53 Antikörper pAb1801 erkannten antigenen Determinante</i>	96
4.2 <i>UNTERSUCHUNG DER AUS EINER SUBTRAHIERTEN MAKROPHAGEN-GENBANK ISOLIERTEN CDNA-KLONE VON NOCICEPTIN/OFQ UND hGBP-3</i>	99
4.2.1 <i>Nociceptin/OFQ: ein von B-Zellen sezerniertes immunologisch wirksames Peptid?</i>	99
4.2.1.1 <i>Sequenzierung des Vollängklons</i>	99
4.2.1.2 <i>Expressionsmuster von Nociceptin/OFQ und seinem Rezeptors ORL 1 in THP-1-und U 937-Zellen</i>	101
4.2.1.3 <i>Expression von Nociceptin/OFQ und ORL 1-Rezeptor in Zellpopulationen des peripheren Blutes</i>	106
4.2.2 <i>Humanes GBP-3: ein Interferon-γ-induziertes Guanylat-bindendes Protein</i>	109
4.2.2.1 <i>Isolierung und Sequenzierung des Vollängklons</i>	109
4.2.2.2 <i>Sequenzvergleich mit bereits bekannten Guanylat-bindenden Proteinen</i>	112
4.2.2.3 <i>Expressionsmuster von hGBP-3 in verschiedenen Zelllinien und Blutzellpopulationen</i>	113
4.2.2.4 <i>Nachweis der hGBP-3-mRNA in unterschiedlich induzierten Leukozyten des peripheren Blutes und verschiedenen Geweben</i>	117
4.2.2.5 <i>Nachweis der IFN-γ-Induzierbarkeit der hGBP-3 Proteinexpression</i>	118
4.2.2.6 <i>Nachweis der GTP-Bindung von hGBP-3</i>	122

5 DISKUSSION	124
5.1 IFP 35 UND ZYTOPLASMATISCHE MULTIPROTEINKOMPLEXE	124
5.1.1 IFP 35, ein Leuzin-Zipper-Protein.....	124
5.1.2 Lokalisierung von IFP 35 im Zytoplasma IFN- γ -induzierter Zellen.....	125
5.1.3 IFP 35 ist in Proteinkomplexen organisiert.....	127
5.1.4 Identifizierung der Interaktionspartner von IFP 35 und potentieller Kompo- nenten des postulierten Multiproteinkomplexes	127
5.1.5 Zusammenfassung und Ausblick	129
5.2 NOCICEPTIN/OFQ, EIN NEUROPEPTID MIT IMMUNOLOGISCHER FUNKTION?.....	130
5.2.1 Nociceptin/OFQ und sein Rezeptor ORL 1.....	130
5.2.2 Expression von Nociceptin/OFQ und vom ORL 1-Rezeptor in Zellen hämato- poetischen Ursprungs.....	131
5.2.3 Immunologische Funktion von Neuropeptiden	133
5.3 HUMANES GBP-3: KLONIERUNG, EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG EINES IFN- γ -INDUZIERBAREN GUANYLAT-BINDENDEN PROTEINS	135
5.3.1 Guanylat-bindende Proteine: eine Gruppe IFN-induzierbarer Proteine unbe- kannter Funktion	135
5.3.2 Humanes GBP-3 trägt alle wichtigen Sequenzmerkmale von GBP-Proteinen.....	135
5.3.3 Humanes GBP-3: ein membrangebundenes Protein?	137
5.3.4 Humanes GBP-3: ein Protein, dessen Expression nicht nur durch IFN- γ regu- liert wird.....	138
5.3.5 Humanes GBP-3: ein Guanylat-bindendes Protein.....	139
5.3.6 Ausblick.....	140
5.3.7 Welche Funktion haben GBP-Proteine?.....	141
5.4 SCHLUSSWORT	142
6 ANHANG	143
6.1 VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER IFP 35-NUKLEINSÄURESEQUENZEN	143
6.2 VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER IFP 35-AMINOSÄURESEQUENZEN	147
6.3 VERGLEICH DER NUKLEINSÄURESEQUENZEN VON HGBP-1, HGBP-2 UND HGBP-3.....	148
6.4 VERGLEICH DER AMINOSÄURESEQUENZEN VON HGBP-1, HGBP-2 UND HGBP-3.....	153
6.5 VERGLEICH DER NUKLEINSÄURESEQUENZEN VON KLON 2107 UND 2107/18-1	154
7 LITERATURVERZEICHNIS	157
VERZEICHNIS EIGENER PUBLIKATIONEN	174
LEBENS LAUF	175
DANKSAGUNGEN	176
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	177

Abkürzungsverzeichnis

λ	Bakteriophage Lambda	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
°C	Grad Celsius	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
μ	mikro	eIF2	eukaryontischer Initiationsfaktor 2
2-5A Synthetase	2'-5' Oligoadenylat-Synthetase	ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
³⁵ S	radioaktives Isotop des Schwefels	FACS	„Fluorescence-activated cell sorter“
A	Adenin	FCS	fetales Kälberserum
Abb.	Abbildung	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Amp	Ampicillin	FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
APS	Ammoniumpersulfat	g	Gramm oder Zentrifugalbeschleunigung
As	Aminosäure	G	Guanin
ATP	Adenosintriphosphat	GAF	„gamma-interferon activation factor“
Blot	Transfer von DNA, RNA oder Protein auf Nylon oder Nitrozellulosemembranen	GAS	„gamma activated site“
bp	Basenpaar	GBP	Guanylat-bindendes Protein
BSA	Rinderserumalbumin	GCN	Guanidinium-Isothiocyanat
c	zenti	h	Stunde
C	Cytosin	HA	Hämagglutinin
CD	„cluster of differentiation“	HAT-Medium	DMEM-Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin, Penicillin und Streptomycin
cDNA	komplementäre (copy) DNA	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
CHX	Cycloheximid	HT-Medium	DMEM-Medium mit Hypoxanthin, Thymidin, Penicillin und Streptomycin
Ci	Curie	ICAM	„intracellular adhesion molecule“
C/I-Extraktion	Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion	IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
CIITA	„class II transactivator“	IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
CK	Zytokeratin	IFN	Interferon
CMV	Zytomegalie-Virus	IFP	Interferon-induzierbares Protein
CO ₂	Kohlendioxid	IP-10	„interferon- γ -induced protein 10“
cpm	Zählimpulse pro Minute („counts per minute“)	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
C-Terminus	Carboxyl-Ende einer Aminosäuresequenz	IRF	„interferon regulatory factors“
Da	Dalton	ISG	„interferon stimulated gene“
dBcAMP	Di-butyryl-cAMP	ISGF	„interferon stimulated gene factor“
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ISRE	„interferon stimulated response elements“
DIG	Digoxigenin	JAK	Janus Kinase
DMEM	Dulbecco's MEM mit Glutamax I™; 4500 mg/l Glucose	kb	Kilobase(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid	kDa	Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNase	Desoxyribonuklease		
dNTP	nicht spezifiziertes Desoxyribonukleotid		
ds	doppelsträngig		
dsRAD	dsRNA-spezifische Adenosin Desaminase		
DTT	Dithiothreitol		
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“		

l	Liter	RANTES	„regulated by activation, normal T-cell expressed and secreted“
LPS	Lipopolysaccharid	RNA	Ribonukleinsäure
M	Molar	RNase	Ribonuklease
MB	Megabyte	rpm	Umdrehungen pro Minute
MBP	„maltose binding protein“	RPMI	RPMI 1640 mit Glutamax I™
MCP	„monocyte chemotactic protein“	RT	Raumtemperatur
MCS	multiple Klonierungsstelle	SDS	Natriumdodecylsulfat
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
min	Minute	sek	Sekunde
MIP	„monocyte inflammatory protein“	SHP-1	SH2-Domäne enthaltende Phosphatase-1
mRNA	messenger (Boten-) RNA	ss	einzelsträngig
MW	relatives Molekulargewicht	STAT	„signal transducers and activators of transcription“
n	nano	T3	T3-Promotor
NK-Zellen	„natural killer“-Zellen	T7	T7-Promotor
NO	Stickstoffmonoxid	TAP	„transporter in antigen processing“
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase	Tc-Zelle	zytotoxische T-Zelle
NP-40	Nonidet P-40	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
N-Terminus	Aminoterminus einer Aminosäuresequenz	Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
OD _{xxx}	optische Dichte bei xxx nm	Tm	Schmelztemperatur
Oligo (dT)	Oligodesoxythymidylat	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ori	Replikationsursprung	TNF-RE	„TNF response element“
ORL1	„opioid receptor-like receptor 1“	TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
p	pico	TPA/IFN	für 24 h mit TPA und anschließend für 24 h mit TPA und IFN- γ induziert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TPA/IFN/CHX	für 24 h mit TPA und anschließend für 12 h mit TPA, IFN- γ und CHX behandelt
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
P/C/I-Extraktion	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion	TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
PE	Phycoerythrin	U	Einheit („Unit“)
PEG	Polyethylenglycol	UV	ultraviolett
PFA	Paraformaldehyd	V	Volt
pfu	„plaque forming unit“	VCAM	„vascular cell adhesion molecule“
PHA	Phytohämagglutinin	„well“	Vertiefung; Loch
Phage	Bakteriophage	v/v	Volumen/Volumen
PKR	„interferon-induced dsRNA-activated protein kinase“	w/v	Masse/Volumen
PLA2	Phospholipase A2	WRS	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid	ZNS	zentrales Nervensystem
Poly (A)	Polyriboadenylat		
Primer	Starter-Desoxyoligonukleotid		
PTP	Protein-Tyrosin Phosphatase		
PVP	Polyvinylpyrrolidon		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersicht über die IFN-induzierte Signaltransduktion.....	18
Abb. 2:	Mutagenese PCR: Schematische Darstellung der Lage von Primern und Restriktionsschnittstellen	50
Abb. 3:	IFP 35: Nuklein- und Aminosäuresequenz nach Korrektur	73
Abb. 4:	Titerbestimmung von unterschiedlichen Aufarbeitungen des monoklonalen Antikörpers IEB5IIA12	76
Abb. 5:	Nachweis der Spezifität des monoklonalen anti-IFP 35-Antikörpers IEB5IIA12 im Western Blot.....	76
Abb. 6:	Induktion des IFP 35-Verteilungsmusters durch IFN- α und IFN- γ in HeLa S3-Zellen.....	78
Abb. 7:	Typisches IFN- γ -induziertes Verteilungsmuster von IFP 35 in verschiedenen Zelllinien.....	79
Abb. 8:	Untersuchung der Kolokalisierung von IFP 35 und Mitochondrien bzw. Peroxisomen.....	81
Abb. 9:	Subzelluläre Fraktionierung unter Verwendung eines Percoll-Gradienten mit einer Anfangsdichte von 1,05 g/cm ³	83
Abb. 10:	Subzelluläre Fraktionierung unter Verwendung eines Percoll-Gradienten mit einer Anfangsdichte von 1,04 g/cm ³	84
Abb. 11:	Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation	85
Abb. 12:	Lokalisierung von IFP 35 in der Elektronenmikroskopie.....	86
Abb. 13:	Bestimmung des nativen Molekulargewichts von IFP 35 mit Hilfe der Gelfiltration ...	87
Abb. 14:	Aggregatbildung von IFP 35 in transfizierten HeLa S3-Zellen.....	88
Abb. 15:	Koimmunpräzipitation von endogenem und HA-markiertem IFP 35	89
Abb. 16:	Behandlung IFN- γ -induzierter HeLa S3-Zellen mit Cycloheximid (Immunfluoreszenz).....	90
Abb. 17:	Behandlung IFN- γ -induzierter Zellen mit Cycloheximid (Western Blot).....	91
Abb. 18:	Partielle Kolokalisierung von IFP 35 und CK 19 in IFN- γ -induzierten SW 1573-Zellen.....	92
Abb. 19:	Versuch der Koimmunpräzipitation von IFP 35 und B-ATF	94
Abb. 20:	Kolokalisierung von IFP 35 und Nmi in SW 1573-Zellen.....	95
Abb. 21:	Koimmunpräzipitation von IFP 35 und Nmi.....	96
Abb. 22:	Nachweis der Kolokalisierung von IFP 35 und dem vom Antikörper pAb1801 erkannten Protein in der Immunfluoreszenz.....	97
Abb. 23:	Nuklein- und Aminosäuresequenz von Klon U	101
Abb. 24:	Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA in U 937-, THP-1- und HeLa S3-Zellen....	103
Abb. 25:	Expression der ORL 1-Rezeptor-mRNA in THP-1- und U 937-Zellen.....	104
Abb. 26:	Expression der ORL 1-Rezeptor-mRNA in Zelllinien hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Ursprungs.....	105
Abb. 27:	Regulation der ORL 1-Rezeptor-mRNA Expression durch TPA, IFN- γ und dBcAMP in verschiedenen Makrophagen-Vorläuferzelllinien	106
Abb. 28:	Expression der mRNA von Nociceptin/ OFQ und vom ORL 1-Rezeptor in Zellen des peripheren Blutes	108
Abb. 29:	Humanes GBP-3: Nuklein- und Aminosäuresequenz	112

Abb. 30: Nachweis der Spezifität der hGBP-3-cRNA-Sonde.....	114
Abb. 31: Expression der hGBP-3-mRNA in U 937- und THP-1-Zellen	115
Abb. 32: Untersuchung des Einflusses von IFN- γ und IFN- α auf die hGBP-3-mRNA- Expression in THP-1- und HL-60-Zellen.....	116
Abb. 33: Nachweis der IFN- γ -induzierten hGBP-3-mRNA-Expression in Zelllinien hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Ursprungs.....	117
Abb. 34: Expression der hGBP-3-mRNA in humanem Gewebe	117
Abb. 35: Expression der hGBP-3-mRNA in Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes	118
Abb. 36: Nachweis der Spezifität des Antiserums gegen hGBP-3.....	120
Abb. 37: Expression des hGBP-3-Proteins in unterschiedlich induzierten U 937- und THP-1- Zellen.....	121
Abb. 38: Expression des hGBP-3-Proteins in Zellen des peripheren Blutes	122
Abb. 39: Bindung von hGBP-3 an Agarose-gekoppeltes GTP	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Transfektion von eukaryontischen Zellen mit SuperFect	39
Tab. 2: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gelmatrix für unterschiedliche Trennbereiche....	61
Tab. 3: Vergleich von verschiedenen, veröffentlichten Amino- und Nukleinsäuresequenzen von IFP 35	74
Tab. 4: Liste mit in der Doppelimmunfluoreszenz verwendeten Antikörpern gegen Organellen- bzw. Kompartiment-spezifische Leitproteine.....	80
Tab. 5: Zusammenfassung der mit den unterschiedlichen Antikörpern gegen p53 erhaltenen Ergebnisse	98
Tab. 6: Vergleich von verschiedenen, beschriebenen, humanen Nociceptin/OFQ-Sequenzen.....	100
Tab. 7: Vergleich charakteristischer Daten der beschriebenen GBP-Proteine.....	136

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Das Immunsystem ist ein funktionelles System, welches den Wirtsorganismus sowohl vor potentiellen Pathogenen wie z.B. Viren und Bakterien als auch vor körpereigenen entarteten Zellen schützt. Es besteht hauptsächlich aus drei Komponenten: den Organen des lymphatischen Systems, den im Blut- und Lymphsystem zirkulierenden Immunzellen und verschiedenen nicht zellulären Bestandteilen [1;253].

Zur letzten Gruppe gehören die Zytokine, die ein komplexes Netzwerk kleiner interzellulär wirkender Proteine bilden und an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Bei den Zytokinen handelt es sich um eine sehr uneinheitliche Gruppe von Proteinen, die bestimmte gemeinsame Merkmale aufweist: So werden sie in Folge eines immunologischen Stimulus kurzfristig von Zellen sezerniert und können autokrin, parakrin oder endokrin auf Zielzellen wirken. Zytokine können synergistisch oder antagonistisch wirken und unter anderem die Synthese anderer Zytokine wie auch ihrer Rezeptoren beeinflussen. Dabei ist die Reaktion der Zelle auf einen Zytokinstimulus häufig von der Synthese neuer mRNA und von neu synthetisierten Proteinen abhängig. Zytokine beeinflussen die Zellteilung und Differenzierung von Zellen [1;79]. Zu den Zytokinen gehören unter anderem Interleukine, Tumor Nekrose Faktor, Lymphotoxine, Kolonie-stimulierende Faktoren, Chemokine und Interferone [79].

1.2 Interferone

Vor ca. 40 Jahren wurde beobachtet, daß mit hitzeinaktiviertem Influenzavirus inkubierte Hühnerzellen eine Substanz produzieren, die anderen Zellen eine Resistenz gegenüber viraler Infektion verleiht. Die Substanz wurde als Interferon (IFN) bezeichnet, abgeleitet vom Begriff der viralen Interferenz, d.h. der Einflußnahme auf den Ablauf von Virusinfektionen [147;219].

Heute sind zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Gruppen von Interferonen bekannt, die Typ I- bzw. Typ II-Interferon genannt werden. Die Interferone sind Mitglieder der Zytokinsuperfamilie von sekretierten Proteinen und üben ihre biologischen Effekte über spezifische Rezeptoren aus.

Zu den Typ I-Interferonen gehören IFN- α und - β . IFN- α und - β wurden ursprünglich als Produkte von Leukozyten bzw. virusinfizierten Fibroblasten charakterisiert und dementsprechend Leukozyten- bzw. Fibroblasten-Interferon genannt. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen produziert. Der wichtigste native Induktor für die Synthese von Typ I-Interferonen ist eine virale Infektion. Ihre wichtigsten biologischen Funktionen sind die Inhibition viraler Replikation, die Inhibition der Zellproliferation, die Aktivierung von NK-Zellen („natural killer“-Zellen) und die Modulation der Expression von MHC („major histocompatibility complex“; Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse I Molekülen [1;79].

Zu den Typ II-Interferonen gehört nur das IFN- γ , welches anfänglich als Immun-Interferon bezeichnet wurde. Sezerniert wird es vorrangig von aktivierten NK-Zellen, aktivierten T-Hel-

fer-Zellen der Th1-Subklasse und aktivierten CD8⁺-zytotoxischen Zellen des Tc1-Phänotyps [1;31;79;323]. Die Sekretion wird auf unterschiedliche Art und Weise initiiert: Bei T-Zellen erfolgt die Induktion der IFN- γ -Expression vorrangig als Folge einer Antigen- oder Mitogen-Stimulation; in NK-Zellen wird die Produktion durch Zytokine wie TNF- α und IL-12 stimuliert, die von Makrophagen sezerniert werden. Biologisch aktives IFN- γ besteht aus einem nicht kovalent gebundenen Homodimer [31]. Die von IFN- γ ausgeübten Effekte sind mannigfaltig. Sie umfassen u.a. die Aktivierung von mononukleären Phagozyten, die Stimulierung der Expression von Gewebshistokompatibilitätsantigenen, die Differenzierung von T-Lymphozyten und die Aktivierung von NK-Zellen.

1.2.1 Interferon-Rezeptoren und Signaltransduktion

Interferone vermitteln ihre Wirkung über Rezeptoren in der Zytoplasmamembran. Die Bindung des Zytokins an den Rezeptor führt zur Aktivierung des JAK (Janus Kinase)/STAT („signal transducers and activators of transcription“)-Signaltransduktionsweges und zur Induktion der Expression einer Reihe IFN-stimulierter Gene (ISG's). Die ISG's vermitteln die biologischen Effekte der Interferone (Abb. 1).

Der IFN- γ -Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, der α -Untereinheit (IFN- γ R1), die eine hohe Affinität zum Liganden hat und der β -Untereinheit (IFN- γ R2), die für die Signaltransduktion benötigt wird. Jede Kette ist konstitutiv mit einer spezifischen Janus Kinase, einer Protein Tyrosin Kinase, assoziiert: IFN- γ R1 mit JAK1 und IFN- γ R2 mit JAK2. Bei der Signaltransduktion bindet IFN- γ zunächst an zwei α -Untereinheiten des Rezeptors und induziert eine Dimerisierung von IFN- γ R1. Anschließend assoziieren zwei β -Untereinheiten mit dem Komplex und es kommt zu einer Transphosphorylierung und reziproken Aktivierung der Janus Kinasen. Die aktivierten Janus Kinasen bewirken eine Tyrosinphosphorylierung der α -Untereinheiten. An die phosphorylierten α -Untereinheiten bindet zytosolisches STAT1 α , auch p91 genannt. STATs bilden eine Familie von Proteinen, die Signale von verschiedenen Zelloberflächen-Rezeptoren in den Zellkern leiten, wo sie die Transkription von Genen regulieren. STAT1 α wird ebenfalls phosphoryliert, dissoziiert vom Rezeptor-Komplex ab und bildet Homodimere. Das STAT1 α -Homodimer, welches GAF („gamma-interferon activation factor“) genannt wird, transloziert in den Nukleus, bindet an GAS („gamma activated site“)-Konsensussequenzen in den Promotoren bestimmter Gene und aktiviert deren Transkription [129;240;323]. Die Menge an phosphoryliertem STAT1 α wird negativ durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg reguliert [162].

Die Regulation der IFN-induzierten Genexpression kann zum einen im Rahmen der Primärantwort über GAS-Elemente erfolgen; sie kann zum anderen aber auch als Sekundärantwort über Faktoren wie die Mitglieder der IRF („interferon regulatory factors“)-Familie DNA bindender Proteine vermittelt werden, die im Rahmen der Primärantwort verstärkt exprimiert werden. Zur IRF-Familie von Transkriptionsfaktoren gehören IRF-1, IRF-2, ISGF3 β (= p48) und ICSBP. Das IRF-1-Gen weist z.B. GAS-Elemente in der Promotorregion auf und ist durch

IFN- γ induzierbar; IRF-1 kann an ISRE („interferon stimulated response elements“-)Elemente binden [248] und ist an der Aktivierung unterschiedlicher Gene beteiligt.

Der IFN- α Rezeptor besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten: IFNAR1 und IFNAR2. IFNAR2 bindet den Liganden und ist konstitutiv mit JAK 1 assoziiert, während IFNAR1 mit der Janus Kinase Tyk2 interagiert. Die Signaltransduktion wird durch die Bindung von IFN- α oder - β an den Rezeptor initiiert. Die α - und β -Untereinheiten assoziieren, es kommt zur Transphosphorylierung und Aktivierung der Janus Kinasen sowie zur Phosphorylierung der α -Untereinheit. STAT2 kann daraufhin an die α -Untereinheit binden und wird phosphoryliert. An das phosphorylierte STAT2 bindet STAT1, das dadurch ebenfalls phosphoryliert wird. Anschließend können STAT2/STAT1-Heterodimere oder STAT1-Homodimere in den Zellkern wandern. STAT2/STAT1-Heterodimere binden ISGF3 γ ; zusammen bilden sie den ISGF3 („interferon stimulated gene factor 3“-)Komplex, der an ISRE-Elemente binden kann [129].

Die durch IFN- α und - γ induzierten Signaltransduktionswege sind miteinander verbunden. Während bei beiden Transduktionswegen STAT1-Homodimere gebildet werden, die an GAS-Sequenzen binden können, können sowohl ISGF3, IRF-1 als auch das STAT1-Homodimer in Assoziation mit p48 an ISRE-Elemente binden [30].

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg wird von vielen Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren genutzt. Wie die Spezifität auf ein bestimmtes Signal, wie z.B. die IFN- γ -Induktion, erhalten wird, ist noch weitgehend unbekannt. Diskutiert werden verschiedene Faktoren. So sind an der Signaltransduktion eine Reihe von STAT-Proteinen mit unterschiedlichen DNA-Bindungsaffinitäten beteiligt. Durch eine Variabilität in der Sequenz der GAS- und ISRE-Elemente könnte die Bindung bestimmter STAT-Komplexe an die DNA bevorzugt erfolgen. Außerdem könnte das Zusammenspiel mehrerer aktivierter Faktoren die Spezifität des Signals beeinflussen. Weiterhin wird auch eine Beteiligung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges, der Phospholipase A2 (PLA2), einer Protein Kinase (PKR), verschiedener Phosphatasen wie der Protein-Tyrosin Phosphatase (PTP) und der eine SH2-Domäne enthaltenden Phosphatase-1 (SHP-1) an der IFN-induzierten Signaltransduktion vermutet. Wahrscheinlich sind mehrere Signaltransduktionswege an der Regulation der biologischen Effekte beteiligt [129;240;323].

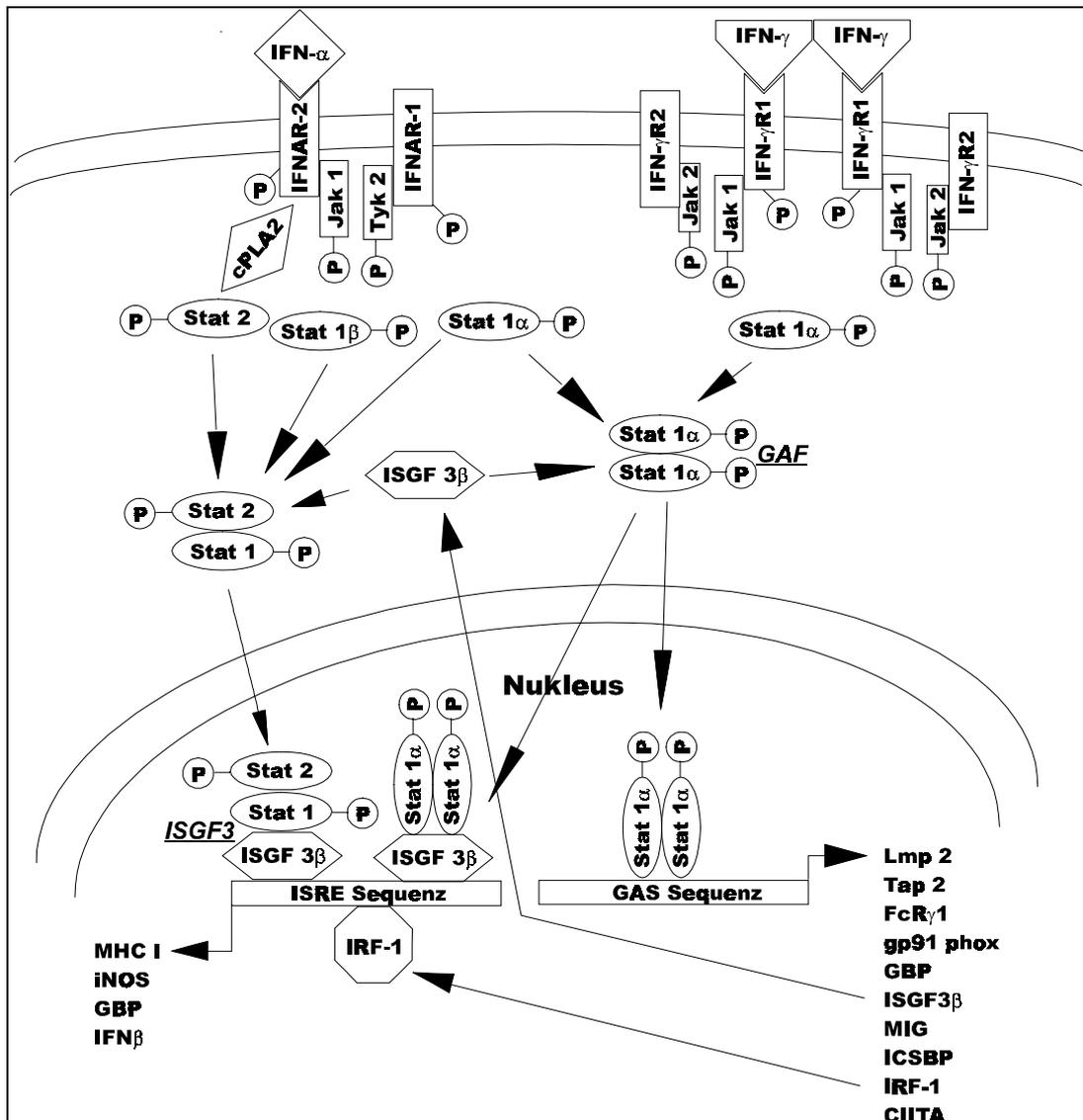


Abb. 1: Übersicht über die IFN-induzierte Signaltransduktion

Dargestellt sind die IFN-Rezeptoren in der Zytoplasmamembran mit ihren Induktoren und den Rezeptor-assoziierten JAKs sowie die durch das jeweilige IFN aktivierten STAT-Proteine. Die sich im Rahmen der IFN-induzierten Signalleitung bildenden Transkriptionsfaktorkomplexe mit der von ihnen erkannten Konsensussequenz und einer Reihe exemplarisch ausgewählter, über diese Konsensussequenzen regulierte Gene sind aufgeführt (Nach Boehm et al. sowie Haque und Williams; abgewandelt [31;129]).

1.2.2 Immunregulatorische Funktionen von IFN- γ

Die Erforschung der IFN- γ -induzierten Genexpression ist von großem Interesse für die medizinische Forschung. Die potenten immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN- γ wurden bereits hinsichtlich der Therapie von Krebsbehandlungen untersucht: Interferone in Kombination mit zytotoxischen Pharmaka waren effektiv in der Behandlung von Haarzell-Leukämien [10] und chronischen myelogenen Leukämien [172]. Erste Studien, die IFN- γ in der Behand-

lung von Nierenzellkarzinomen [44], Brustkrebs [235], Melanomen [163] und Gliomen [188] einsetzen waren erfolgversprechend. Die molekularen Mechanismen, die den therapeutischen Effekten von IFN- γ zugrunde liegen, sind erst wenig erforscht [183;277].

Bis heute sind mehr als 200 IFN- γ -induzierte Gene bekannt, welche die vielfältige Wirkung von IFN- γ widerspiegeln (zur Übersicht: <http://198.94.213.64/ari/sup/im/im15/im15a.htm>). Die wichtigsten Effekte von IFN- γ werden im folgenden exemplarisch dargestellt, um die Komplexität der IFN- γ -vermittelten Effekte zu skizzieren.

1.2.2.1 Produktion von Immunglobulinen und Expression von Immunglobulin-Rezeptoren

IFN- γ ist an der Kontrolle der Immunglobulinproduktion beteiligt. IFN- γ ist in der Maus wichtigster Faktor beim Antikörperklassenwechsel zur IgG2a-Subklasse [73;287]. Die Wirkung von IFN- γ auf die B-Zelle ist abhängig von IL-2 und der B-Zell-Aktivierung durch den B-Zell-Immunglobulin-Rezeptor; sie wird durch IL-1 verstärkt [288]. IFN- γ ist ein Antagonist des IL-4-vermittelten Antikörperklassenwechsels zur IgG γ 1- und ϵ -Subklasse, während IL-4 Antagonist des IFN- γ -vermittelten Klassenwechsels ist. Vermutlich findet dabei eine Konkurrenz zwischen STAT 1 und STAT 6 um die Bindung an GAS-Elemente statt [27].

IFN- γ induziert ebenfalls die Expression des für IgG2a-Moleküle hochaffinen Fc γ RI-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen [31;237].

Der Antikörperklassenwechsel zur IgG2a-Subklasse und die Induktion der Expression des Fc γ RI-Rezeptors fördert Opsonierung und Phagozytose von potentiellen Pathogenen. Mit der Bindung von IgG-Antikörper-Komplexen an den Fc γ RI-Rezeptor werden die Phospholipase A2 und die Arachidonsäurekaskade wie auch der respiratorische „Burst“ aktiviert [167].

1.2.2.2 Antigenpräsentation und Expression von Gewebshistokompatibilitätsantigenen

Interferone sind an der Regulation der Expression von MHC Klasse I- und Klasse II-Genen beteiligt. MHC Klasse I-Gene werden in den meisten Geweben mehr oder weniger stark konstitutiv exprimiert und durch IFN- α , - β und - γ induziert. Die Induktion der Expression wird durch Enhancer-Elemente mit ISRE- und NF- κ B-Bindungsstellen kontrolliert [284]. Während an die ISRE-Konsensussequenz IFN- γ -induziertes IRF-1 binden kann, bindet an die NF- κ B-Konsensussequenz der NF- κ B-Transkriptionsfaktor. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt unter anderem nach TNF- α -Stimulation von Zellen [14]. TNF- α übt einen synergistischen Effekt auf die IFN- γ -induzierte Expression von MHC Klasse I-Molekülen aus [96;148;149].

Die MHC Klasse I-vermittelte Antigenexpression ist darüber hinaus von weiteren Faktoren abhängig, deren Expression ebenfalls durch IFN- γ reguliert wird. So wird die Expression des β 2m-Gens, welches für die Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche notwendig ist (zur Übersicht: York et al.; [333]), durch IFN- α , - β , - γ sowie durch TNF- α induziert [31;164]. Auch die beiden Ketten des Transporters, der mit der Antigenprozessierung assoziiert ist (TAP; „transporter in antigen processing“), TAP1 und TAP2, werden konstitutiv exprimiert; ihre Expression kann durch IFN- γ [101;303] sowie durch TNF- α [101] gesteigert

werden. Darüber hinaus wird die Synthese von drei β -Untereinheiten der Proteasomen (LMP-2, LMP-7 und MECL-1) durch IFN- γ induziert. Proteasomen sind Endopeptidasen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und für die Generierung von Peptiden für die Beladung von MHC Klasse I-Komplexen notwendig sind [333]. Die IFN- γ -induzierten Proteine verdrängen β -Untereinheiten, die konstitutiv in neu assoziierten Proteasomen Komplexen vorkommen [124] und bewirken eine Veränderung der proteolytischen Eigenschaften des Proteasoms. LMP-2 und TAP1 werden ausgehend von einem einzigen bidirektionalen Promotor transkribiert; ihre Expression kann durch TNF- α und IFN- γ induziert werden. Der gemeinsame Promotor enthält neben ISRE-Elementen und einem NF- κ B-Element unter anderem auch eine GAS-Konsensussequenz [23;210;326].

Die Expression von MHC Klasse II-Komplexen wird durch IFN- γ beeinflusst. Der MHC Klasse II-Komplex wird in antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, konstitutiv exprimiert. Seine Expression kann darüber hinaus in nahezu allen Zellen, wie z.B. Makrophagen [165], durch IFN- γ induziert werden. Alle wichtigen Gene für den MHC Klasse II-Antigenpräsentationsweg (Klasse II α - und β -Kette, invariante Kette, li, DMA- und DMB-Kette) werden für die normale Expression von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche benötigt und ihre Expression wird von einem einzigen IFN- γ -induzierbaren Transkriptionsfaktor, CIITA („class II transactivator“), kontrolliert. Eine DNA-Konsensussequenz, an die der CIITA-Faktor bindet, wurde noch nicht identifiziert. Der Faktor besitzt eine stark transaktivierende Domäne, die in Verbindung mit der heterologen DNA-bindenden Domäne eines anderen Proteins aktivierend auf die Transkription wirken könnte. Es wird angenommen, daß CIITA als Koaktivator wirkt [31;194].

Der MHC Klasse II-Expressionsweg ist abhängig von der Anwesenheit von Peptiden im lysosomalen/endosomalen Kompartiment [130]. Die Expression von drei lysosomalen Cathepsinen, die mit der Generierung von Peptiden für die Antigenpräsentation in Makrophagen in Verbindung stehen, ist durch IFN- γ induzierbar [178;179].

1.2.2.2.1 Antivirale Effekte von IFN- γ

Die antivirale Wirkung von IFN- γ wird vorrangig durch die Induktion der Expression von drei Genen vermittelt: die durch dsRNA aktivierte Protein Kinase (PKR), die 2'-5' Oligoadenylat-Synthetase (2-5A Synthetase) und die dsRNA-spezifische Adenosin Desaminase (dsRAD).

Die PKR ist eine Serin-Threonin-Kinase [144]. Sie wird durch dsRNA aktiviert, die sowohl von RNA- als auch DNA-Viren als Intermediärprodukt gebildet wird. Der Aktivierung der Kinase folgt eine Autophosphorylierung mit anschließender Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryontischen Initiationsfaktors 2 (eIF-2). Die Phosphorylierung verhindert die Regenerierung von aktivem eIF-2-GTP aus eIF-2-GDP und somit die Bildung des Translations-Initiationskomplexes. Die PKR wird in vielen Zelltypen in geringem Maße konstitutiv exprimiert; die Expression kann sowohl durch Typ I- als auch durch Typ II-Interferone induziert werden. In der Promotorregion sind GAS-, ISRE- und NF- κ B-Elemente vorhanden [31;296].

Die 2-5A Synthetase wird ebenfalls durch dsRNA aktiviert und setzt ATP zu 2'-5'-verknüpftem Adenylat um. Dieses aktiviert die RNase L, die einzelsträngige virale und zelluläre RNA abbaut und somit Proteinsynthese und Virusvermehrung inhibiert [31;31;143].

Die dsRNA-spezifische Adenosin Desaminase katalysiert die Desaminierung von Adenosin zu Inosin unter Verwendung von dsRNA als Substrat. Es wird angenommen, daß die Adenosin Desaminase für die Entstehung modifizierter mRNA verantwortlich ist, die nicht mehr in ein funktionelles Protein translatiert werden kann. Die Expression des Gens erfolgt nach Induktion durch IFN- α und - γ [21;31;190].

1.2.2.2 Antimikrobielle Effekte von IFN- γ

Neben der Induktion antiviraler Aktivität, stimuliert IFN- γ auch die antimikrobielle Aktivität von Phagozyten und anderen Zellen. Die wirksame Bekämpfung von Mikroorganismen kann dabei auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen wird durch IFN- γ die Synthese von toxischen Effektormolekülen wie aktivierten Sauerstoffmolekülen und Stickstoffmonoxid (NO) in Phagozyten induziert. Zum anderen wird die Expression von Enzymen induziert, die für eine Depletion wichtiger Wachstumsbestandteile, wie z.B. essentieller Aminosäuren oder Eisen, in den infizierten Zellen sorgen und somit das Wachstum von Parasiten inhibieren.

Der sogenannte „Respiratory Burst“ ist einer der immunologischen Vorgänge, der zur Abtötung phagozytierter Mikroorganismen führt. Er ist charakterisiert durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der phagozytierenden Zelle und resultiert in der Bildung von Superoxid-anionen als reaktivem Sauerstoff-Zwischenprodukt. Das Zwischenprodukt wird zu weiteren reaktiven Sauerstoffmetaboliten (Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikal und Singulett-Sauerstoff) umgesetzt. Diese reagieren mit unterschiedlichen Zellbestandteilen (Aminosäuren, Lipide etc.) der phagozytierten Zelle und beeinflussen die Lebensfähigkeit des phagozytierten Mikroorganismus. Die Produktion von Superoxydanionen wird durch die Membran-assoziierte NADPH-abhängige Oxidase vermittelt, ein Multikomponenten-Flavozytochrom-Enzymkomplex [233]. Die Expression einer Komponente des Enzymkomplexes, das gp91-phox, wird durch IFN- γ im Rahmen der Primärantwort induziert [58]. Auch die Expression weiterer Komponenten des Komplexes (p47-phox und p67-phox) wird durch IFN- γ reguliert [126].

Stickstoffmonoxid ist eines der kleinsten sekretierten Produkte in Säugetierzellen und u.a. an der Vermittlung antimikrobieller und antiviraler Aktivität beteiligt [223]. Die zytotoxische Wirkungsweise des NO ist noch nicht vollständig geklärt, aber eine Interaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffmolekülen wird diskutiert [1]. Synthetisiert wird NO in einer durch das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysierten Reaktion aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff. Das Gen der NO-Synthase (iNOS) wird in nahezu allen Geweben nach geeigneter Induktion exprimiert. Die Promotorregion von iNOS weist u.a. drei GAS-Elemente, zwei NF- κ B-, zwei ISRE- und zwei AP-1-Konsensussequenzen sowie zwei TNF-Response-Elemente (TNF-RE) auf [329]. Die Expression des iNOS-Gens wird durch IFN- γ induziert, IL-4, -10 und -13 wie auch IFN- β wirken antagonistisch [85]; IRF-1 ist essentiell für die IFN- γ -vermittelte Induktion [157]. Parallel zur Induktion der Expression der NO-Synthase

wird auch die Expression von zwei Genen, die in die Substrat- und Kofaktor-Synthese involviert sind durch IFN- γ induziert. Für die NO-Synthese wird Tetrahydrobiopterin/BH4 als Kofaktor benötigt [13]; IFN- γ induziert die Expression von GTP-Zyklohydroxylase I, welches das limitierende Enzym in der *de novo* Synthese des BH4 aus GTP ist. BH4 wird zwar in hohem Maße konstitutiv in Makrophagen exprimiert [174], ist aber in anderen Zellen limitierend [91]. Außerdem wird die Expression der Argininosuccinat-Synthetase, dem limitierenden Enzym bei der Synthese des einzigen physiologischen Stickstoffdonors Arginin, durch IFN- γ induziert [218].

Ein Beispiel für die IFN- γ -induzierte Depletion einer für intrazelluläre Pathogene essentiellen Wachstumskomponente, stellt der Tryptophanstoffwechsel dar. Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) und die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase (WRS) sind zwei Proteine des Tryptophanmetabolismus und werden stark durch IFN- γ induziert. Die IDO setzt Tryptophan zu N-Formylkynurein um. Sie wird mit Ausnahme der Leber in allen Geweben exprimiert und ihre Expression durch LPS, Virusinfektion oder durch IFN- γ induziert [54;135]. Es wird vermutet, daß durch die Entfernung von frei verfügbarem Tryptophan aus der infizierten Zelle das Wachstum von Parasiten reguliert wird [246]. Die WRS ist ein „Housekeeping“-Gen und für die Aminoacylierung von tRNA^{Trp} im Verlauf der Proteinsynthese verantwortlich. Sie wird ebenfalls in nahezu allen Zellen exprimiert und die Expression durch IFN- γ induziert. Ob die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase auch zur Tryptophan Depletion beiträgt ist nicht klar [15; 106;108;166]. Eine andere Wirkung der WRS könnte auch die Bereitstellung notwendiger Vorstufen für die Synthese Tryptophan-reicher Proteine, z.B. von Proteinen der IRF-Familie, sein [331]. Die Induktion der WRS-Synthese wird durch GAS-Elemente reguliert [293].

1.2.2.3 Interaktion von Leukozyten und Endothel

Die Interaktion von Leukozyten und Endothel spielt eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Diese Wechselwirkung wird durch IFN- γ beeinflusst. Liegt kein immunologischer Stimulus vor, so zirkulieren die Leukozyten im Blut und Lymphsystem [122]. Tritt eine Infektion, Entzündung oder Verletzung des Gewebes ein, kommt es zu einem Auswandern von Immunzellen in das Gewebe. Ein Vorgang, der durch die Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Lymphozyten ausgelöst wird. Die aktivierten T-Lymphozyten sezernieren Zytokine, wie z.B. TNF. Diese wirken auf Endothelzellen ein und stimulieren die Produktion von vasodilatatorischen Substanzen wie NO und Prostazyklin sowie die Expression von Leukozyten-Zelladhäsionsmolekülen (E-Selektin, VCAM-1 [„vascular cell adhesion molecule-1“], ICAM-1 [„intracellular adhesion molecule-1“]). Leukozyten binden über die Zelladhäsionsmoleküle locker an die Endothelzellen der postkapillaren Venulen und bewegen sich rollend an den Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen entlang. Die Endothelzellen sezernieren Chemokine, die an die Zelloberfläche der Endothelzellen binden und Leukozyten aktivieren. Über hochaffine Integrine erfolgt eine festere Bindung der Leukozyten an das Endothel. Erreichen die Leukozyten Zell-Zell-Kontaktstellen des Endothels treten sie in das Gewebe über [1].

IFN- γ stimuliert die Wanderung von Lymphozyten und Monozyten, aber nicht die von Granulozyten. IFN- γ beeinflusst dabei vermutlich sowohl die Sezernierung chemotaktisch wirkender Substanzen als auch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und somit die hochaffine Bindung von Leukozyt und Endothelzelle. IFN- γ induziert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen. Die Expression einiger chemotaktisch wirkender Faktoren, wie IP-10 („interferon- γ -induced protein 10“), MIP-1 α („monocyte inflammatory protein 1 α “) und MIP-1 β , RANTES („regulated by activation, normal T-cell expressed and secreted“) und MCP-1 („monocyte chemotactic protein 1“), die von Lymphozyten, Makrophagen und Gewebezellen, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten sezerniert werden, wird stark durch IFN- γ induziert. Diese wirken als chemoattraktive Substanzen für Lymphozyten und Monozyten, aber nicht – oder nur kaum – für Granulozyten: RANTES und IP-10 wirken auf T-Lymphozyten und Monozyten; MCP-1 wirkt primär auf Monozyten, MIP-1 β und evtl. auch MIP-1 α wirken vorrangig auf CD8+-Zellen chemotaktisch. Eine synergistische Wirkung von IFN- γ und TNF- α konnte unter anderem für RANTES, IP-10 und MCP-1 beschrieben werden [31;79].

IFN- γ spielt somit eine entscheidende Rolle bei der für die zellvermittelte Immunreaktion wichtigen Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen und beeinflusst, welche Zellen in das Gewebe übertreten und an den Ort der Infektion gelangen.

1.2.2.4 Aktivierung von Makrophagen

IFN- γ ist einer der wirksamsten Aktivatoren von Makrophagen. Makrophagen sind in der Lage Pathogene zu phagozytieren und Proteine zu prozessieren, d.h. in Peptide zu spalten [307]. Die Peptide werden von den Makrophagen im Rahmen der Antigenpräsentation in Verbindung mit MHC Klasse I- bzw. MHC Klasse II-Molekülen präsentiert. Die präsentierten Antigene führen, zusammen mit Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ , zur Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten zum Th1-Subtyp [1;320]. Th1-Zellen sind die Hauptproduzenten von IFN- γ , dem wichtigsten Aktivator von Makrophagen. Eine weitere Aktivierung von Makrophagen kann über eine Stimulation mit LPS erreicht werden [2;238].

Makrophagen sind wichtige Effektorzellen bei der Bekämpfung intrazellulärer und extrazellulärer Parasiten, viral infizierter Zellen und Tumorzellen. Sie sezernieren Chemokine, die zur Rekrutierung von Entzündungszellen am Infektionsort führen. Außerdem sind Makrophagen für die systemischen Folgen der Infektion, wie z.B. die Fieberreaktion, verantwortlich. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren und Komplementkomponenten [1].

1.2.2.5 IFN- γ -induzierte Gene mit unbekannter Funktion

Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Gene stellen nur einen kleinen Teil der beschriebenen Gene dar, deren Expression durch IFN- γ induziert wird. Sie spiegeln die pleiotropen Effekte wieder, an deren Regulation IFN- γ beteiligt ist. Die biologischen Zusammenhänge sind in vielen Fällen noch nicht vollständig geklärt. So ist beispielsweise ein großer Teil der IFN- γ -induzierten intrazellulären Signalleitung aufgeklärt worden, die Interaktion der ein-

zellen, von unterschiedlichen Zytokinen induzierten Signaltransduktionswege aber z.T. noch unbekannt. Auch die Erhaltung der Zytokinspezifität, trotz der von unterschiedlichen Zytokinen gemeinsam genutzten Komponenten der intrazellulären Signalleitung, ist noch nicht geklärt. Viele der komplexen Vorgänge innerhalb des Immunsystems sind auch heute noch nicht bekannt. So werden ständig neue Komponenten, wie z.B. Zytokine, beschrieben, ihre Wirkungsweise auf die Immunantwort untersucht und als Folge dessen Kenntnisse über andere Komponenten des Immunsystems revidiert oder ergänzt.

Von vielen Genen, deren Expression durch IFN- γ induziert werden kann, ist bis heute noch nicht bekannt, welche Funktion sie ausüben. Für andere Gene ist zwar eine Funktion beschrieben worden, aber es ist noch nicht bekannt, welche Bedeutung die Regulation der Expression durch IFN hat.

So wurde z.B. die Induktion der Zytokeratin 17 (CK17)-Expression durch IFN- γ nachgewiesen. Was dies letztendlich bedeutet, konnte allerdings noch nicht geklärt werden [32;109;304;312;313].

Ein weiteres klassisches Beispiel für IFN- γ -induzierte Gene, deren Funktion noch unbekannt ist, sind die Guanylat-bindenden Proteine (GBP). Es sind mittlerweile sieben Mitglieder dieser Proteinfamilie beschrieben und ihre GTP-spaltende Aktivität nachgewiesen worden. Ihre Stellung innerhalb der IFN- γ -vermittelten Effekte ist allerdings bis heute ein Rätsel [41;62-64;84;222;224;274;275].

Ein Beispiel für ein Protein, dessen Expression in vielen Zellen durch IFN induziert wird, und dessen Wirkungsweise und Funktion noch unbekannt ist, ist das Leuzin-Zipper Protein IFP35. Aufgrund des Leuzin-Zipper Motivs wird vermutet, daß IFP35 mit anderen Proteinen interagiert. [16;18;43;319].

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Genen, die an der Makrophagendifferenzierung beteiligt sind bzw. deren Expression durch IFN- γ induziert wird. In diesem Rahmen sollten drei IFN- γ -induzierte Genprodukte näher untersucht werden:

- Das IFN-induzierbare Leuzin-Zipper-Protein IFP 35 sollte proteinchemisch charakterisiert und seine subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Aufgrund des Leuzin-Zipper-Motivs, das Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln kann, wurde vermutet, daß IFP 35 mit anderen Proteinen interagiert. Mögliche Bindungspartner von IFP 35 sollten identifiziert werden.
- Die cDNA des Neuropeptids Nociceptin/OFQ war aus einer für IFN- γ - und TPA-induzierte Genprodukte angereicherten Genbank aus Makrophagen-Vorläuferzellen isoliert worden. Die Untersuchung der mRNA-Expression von Nociceptin/OFQ und seinem Rezeptor, dem ORL 1-Rezeptor, sollte zur Identifizierung von Zelllinien bzw. Zellpopulationen des peripheren Blutes führen, die den Liganden bzw. den Rezeptor exprimieren. Die Daten sollten eine Eingrenzung der Funktion von Nociceptin/OFQ in der Peripherie ermöglichen.
- Die partielle cDNA eines Gens, welches für ein intrazelluläres Protein mit einer großen Homologie zu den bekannten IFN-induzierbaren humanen Guanylat-bindenden Proteinen hGBP-1 und hGBP-2 kodiert, war aus einer für IFN- γ - und TPA-induzierte Genprodukte angereicherten Genbank isoliert worden. In der vorliegenden Arbeit sollte der vollständige cDNA-Klon, der aufgrund seiner Homologie zu GBP-Proteinen hGBP-3 genannt wurde, isoliert und charakterisiert werden. Die Expression in unterschiedlichen Zelllinien sowie in peripheren Geweben sollte analysiert werden. Des weiteren sollte die Funktion des Proteins untersucht werden, d.h. die Bindung an Guanin-Nukleotide, die an Agarose immobilisiert wurden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Albumin, Fraktion V	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Aqua Roti®-Phenol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid	GibcoBRL, Eggenstein
Dextranblau	Sigma, Deisenhofen
Dextransulfat	Pharmacia, Freiburg
Diethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidinium-Isothiocyanat (GCN)	GibcoBRL, Eggenstein
HEPES [N-2-Hydroxyethyl)Piperazin-N-(2-Ethansulfon- säure)]	Sigma, Deisenhofen
Hexammincobalt(III)chlorid	Sigma, Deisenhofen
Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
L-[³⁵ S]-Methionin (10 μ Ci/ μ l]	Amersham, Braunschweig
tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Riedel de Haën, Seelze
p-Nitrophenyl-Phosphat Tabletten (20 mg)	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Fluka, Deisenhofen
Phenylmethanmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Roti®-Phenol	Roth, Karlsruhe
rotiphorese® Gel 29:1 (40%)	Roth, Karlsruhe
rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	ICN, Meckenheim
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween®20, pure	AppliChem, Darmstadt
Weitere Laborchemikalien in p.A. Qualität	Merck, Darmstadt

2.2 Enzyme, Enzymsysteme und Reaktionszusätze

BSA, aufgereinigt (10 mg/ml)	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Desoxyribonukleotide: Ultrapure dNTP Set (100 mM)	Pharmacia, Freiburg

DIG RNA Labeling Mix (10x)	Boehringer, Mannheim
DIG Oligonucleotide Tailing Kit	Boehringer, Mannheim
DNase I, RNase frei (10 U/μl)	Boehringer, Mannheim
Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
m ⁷ G(5')ppp(5')G (Cap-Nukleotidanalogue)	Pharmacia, Freiburg
Oligo d(T): pd(T) ₁₂₋₁₈ , 5 U = 5 μg/μl	Pharmacia, Freiburg
Pfu-DNA-Polymerase, kloniert	Stratagene, Hoofddorp, Niederl.
Phosphatase, alkalische aus Kälberdarm (1 U/μl)	Boehringer, Mannheim
rATP; rCTP, rGTP, rUTP (10 mM)	Promega, Heidelberg
Rabbit Reticulocyte Lysat Systems, Nuclease Treated	Promega, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen:	
Bam HI, Hind III, Nco I, Sca I, Stu I, Xba I, Xho I	Pharmacia, Freiburg
Afl III, Eco NI,	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Restriktionsendonuklease-Puffer: SuRE™/Cut Buffer Set	Boehringer, Mannheim
Reverse Transkriptase: SuperScript™ II RT (200 U/μl)	GibcoBRL, Eggenstein
Ribonuklease-Inhibitor: RNasin® (40 U/μl)	Promega, Heidelberg
RNA-Polymerase: T3-, T7-Polymerase (20 U/μl)	Boehringer, Mannheim
RNase A (100 mg/ml)	QIAGEN, Hilden
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	GibcoBRL, Eggenstein
Twelve Paq Ampli Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Perkin Elmer, Vaterstetten

2.3 Größenstandards, Isolierungs- und Entwicklungssysteme

Systeme zur RNA- und DNA-Isolierung:

QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden

Systeme zur Aufreinigung von Proteinen

Superose 6-Säule	Pharmacia, Freiburg
Percoll	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose-4 Fast Flow	Pharmacia, Freiburg

Entwicklungssysteme:

Blocking-Reagenz	Boehringer, Mannheim
CSPD®	Boehringer Mannheim
ECL Western Blot Nachweis-Reagenz	Amersham, Braunschweig
ECL+plus Western Blot Nachweis-Reagenz	Amersham, Braunschweig
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt

Größenstandards:

λ DNA/Hind III-Fragmente	GibcoBRL, Eggenstein
1 kb DNA-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
0,24-9,5 kb RNA-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
Density Marker Beads	Pharmacia, Freiburg
Molekulargewichtsmarker für die Gelfiltration (29000-700000)	Sigma, Deisenhofen
Rekombinanter Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham, Braunschweig

RNA-Molekulargewichtsmarker I	Boehringer, Mannheim
RNA- Molekulargewichtsmarker I, Digoxigenin-markiert	Boehringer, Mannheim

2.4 Materialien für die Kultivierung von Bakterien

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg

2.5 Medien und Zusätze für die Isolierung und Kultivierung eukaryonter Zellen

Aminopterin (100 x)	GibcoBRL, Eggenstein
Balb/c-Maus	Charles River, Extertal
Buffy Coat	Blutbank, MH Hannover
Cycloheximid (CHX)	Sigma, Deisenhofen
Cytochalasin D	Sigma, Deisenhofen
Dibutyryl-A-3:5-MP, zyklisch (dBcAMP)	Boehringer, Mannheim
Dulbecco's MEM mit Glutamax I TM ; 4500 mg/l Glucose (DMEM)	GibcoBRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein
Ficoll Separating Solution; isotonische Lösung; Dichte 1,077 g/ml	Biochrom, Berlin
Freund'sches Adjuvans, inkomplett (IFA)	Difco, Augsburg
Heparin: Liquemin N2500 (Heparin Na.; 2500 i.E.)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
HT-Supplement (50 x)	GibcoBRL, Eggenstein
Interferon γ -1b: Imukin®; human, rekombinant (100 μ g=3 Mio. IE)	Thomae, Biberach
Interferon- α : IFN- α 2b; Intron A 1x10 ⁸ U/mg	Essex, München
Interleukin-6, humanes rekombinantes	Boehringer, Mannheim
Nocodazol	Sigma, Deisenhofen
Penicillin (10000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Plasmasteril; durchschnittl. MW: 450000	Fresenius, Bad Homburg
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA)	Sigma, Deisenhofen
Phytohämagglutinin (PHA)	Murex, Dartford, England
Polyethylenglycol 1500 (PEG 1500)	Boehringer, Mannheim
RPMI 1640 mit Glutamax I TM (RPMI)	GibcoBRL, Eggenstein
SuperFect Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden

2.6 Geräte

Blotapparatur: „Semi-Dry“-Blot „Pegasus“	PHASE, Lübeck
Brutschrank: Modell B5110E, B5090E und KB 500	Heraeus, Osterode
DNA-Sequencer 373 A	Applied Biosystems, Weiterstadt
Durchflußzytometer: FACScan TM	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer	
DNA Sub Cell TM und Wide Mini Sub Cell TM (K)	Bio-Rad, München
Minigel Twin	Biometra, Göttingen

Elektroporationsgerät:	
Gene Pulser, Modell 1652077	Bio-Rad, München
Gene Controller, Modell 1652098	Bio-Rad, München
ELISA-Reader: Titertek Multiskan® MCC/340	Gelaire, Flow Laboratories, Meckenheim
Geltrockner:	
Modell 583	Bio-Rad, München
Homogenator:	
Dounce-Homogenator mit S-Pistel	Braun, Melsungen
Ultra-Turrax T25	Janke&Kunkel, Staufen
Hybridisierungssofen: OV-1	Biometra, Göttingen
Magnetseparator: Vario-MACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mikroskope:	
Konfokales Laser Scan Mikroskop: Biorad MRC1024 System mit Argon/Krypton Laser und E2/UBHS Filter Set	Biorad, München
Axiophot, IDO3 und Elektronenmikroskop EM910	Zeiss, Oberkochen
PCR-Thermo-Cycler: Gene Amp™ PCR System 9600	Perkin Elmer, Vaterstetten
Photodokumentation:	
UV-Kontaktlampe: Chroma 43, 302 nm	Vetter, Wiesloch
Kamera: E.A.S.Y. 429 K	Herolab, Wiesloch
Videodokumentation E.A.S.Y. RH-3 mit Video Copy Prozessor p68E	Herolab, Wiesloch
Photometer: Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg
Quarzküvette: Typ 105202-QS, Schichtdicke 1 cm, 60 µl	Hellma, Müllheim
Röntgenfilmentwicklung: RP X-Omat Processor M6B	Kodak, Rochester, USA
Röntgenfilmkassetten: X-Omat mit Verstärkerfolie	Kodak, Rochester, USA
Schüttelinkubator:	
KS 10	Bühler, Tübingen
G25	New Brunswick, Edison, USA
Spannungsgerät:	
Power Supply 200/2.0	Bio-Rad, München
PHERO-stab 500	Biotech-Fischer, Reiskirchen
Speedvac-Concentrator SVC 100	Savant, Farmingdale, NY, USA
Spezielle Software für EDV	
373 DNA Sequencer Data Analysis Program Vers. 1.2.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
373 DNA Sequencer Data Collection Program Vers. 1.2.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
Blast Search, Datenbankrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Microsoft Office 95	Microsoft, Redmond, WA, USA
PC/GENE™ Version 6.8.5	Intelligenetics, Mountain View, CA, USA
PubMed Advanced MEDLINE Search, Literatursuche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html
Sequence Retrieval System, Sequenzinformation	http://www.embl-heidelberg.de/srs5/
SeqEd™ Vers. 1.0.3	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sterilbank:	
Lamin Air, HA 2448	Heraeus, Osterode

TC A60	Gelaire, Flow Laboratories, Meckenheim
Thermomixer: 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät: Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
UV-Crosslinker: UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene, Hoofddorp, Niederl.
Vakuumkammer und -pumpe	
Typ D8B mit Lyovac GT 2	Leybold, Köln
Typ XF54 23050	Millipore, Eschborn
Vakuumschrank: Typ VTR 5022	Heraeus, Osterode
Waagen: 2002MP1 und 3719MP	Sartorius, Göttingen
Wasserbad: Typ 1002 und 1012	GFL, Burgwedel
Wipptisch: WT 12	Biometra, Göttingen
Zählkammer (Neubauer-)	Assistent, Sondheim/Rhön
Zentrifuge:	
Hochgeschwindigkeitszentrifuge JS-21	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Ultrazentrifuge L5 65	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Sepatech Biofuge 13	Heraeus, Osterode
Minifuge GL	Heraeus, Osterode

2.7 Verbrauchsmaterial

Acrylküvetten 67.740, 10x4x45 mm	Sarstedt, Nürnberg
ALKONOX®	ALKONOX®, New York, NY, USA
Centricon-30 und 100	Amicon, Witten
Combitips (50 ml; 12,5 ml; 2,5 ml; 0,05 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen Ø 12 mm	Assistent, Sondheim/Rhön
Kryoröhrchen	NUNC, Wiesbaden
Elektroporationsküvetten: Gene Pulser™ Cuvette; 0,2 cm	Bio-Rad, München
ELISA-Platten: PS Mikroplatte, U 96	Greiner, Nürtingen
Filterpapier: Whatman® 3MM Chr (46 x 57 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebeblot: Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN™) Blot	Clontech, Heidelberg
Gewebekulturflaschen, TC-Qualität (75 cm ² , 182 cm ²)	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturplatten (6-, 24-Loch-Platten)	Greiner, Nürtingen
Kollodiumhülsen und Vakuumglasapparatur	Sartorius, Göttingen
Nitrozellulosemembran: Protran® BA 85, 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Nylonmembran: Hybond™-N	Amersham, Braunschweig
PCR Softstripes 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Permafluor	Immunotech, Hamburg
Petrischalen (Ø 92 mm; Ø 145 mm)	Greiner, Nürtingen
Petrischalen für die Zellkultur (145 x 20 mm; 60 x 15 mm)	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen (10 µl; 200 µl; 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Plastikpipetten Sterilin (1 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner, Nürtingen
Polyallomer Zentrifugenröhrchen (14x95 mm; 11x60 mm)	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Reagenz-Röhrchen: Polystyrol; 18,0/95 mm; TC-Qualität	Greiner, Nürtingen
Reagenz-Röhrchen: Propylen, 17,0/100 mm, steril	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt, Nürnberg

Röntgenfilm: Hyperfilm™-MP	Amersham, Braunschweig
Spritzen, Kanülen und Dreiwegehähne	Braun, Melsungen
Sterilfilter: MILLEX®-GV, Porengröße 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter: Sartolab-V150, Porengröße 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Suspensionkulturflaschen (250 ml, 550 ml)	Greiner, Nürtingen
Suspensionskulturplatten (96-Loch-Platten)	Greiner, Nürtingen
Teströhrchen: PP-Röhrchen; konisch, steril (15 ml; 50ml)	Greiner, Nürtingen
Vernichtungsbeutel, Polypropylen	Brand, Wertheim/Main

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper (ungekoppelt)

anti-Catalase (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen humane Erythrozyten-Catalase

anti-Cathepsin D

- 1.) Polyklonales Antiserum aus Ziege gegen humanes Cathepsin D (zur Verfügung gestellt von K. v. Figura; [134])
- 2.) Muriner monoklonaler Antikörper (IgG2a) gegen das Cathepsin D-Protein (Oncogene, Cambridge, MA, USA)

anti-CK 7 Klon OV-TL12/30 (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1κ) gegen humanes Zytokeratin 7

anti-CK 8 (Boehringer, Mannheim)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen humanes Zytokeratin 8

anti-CK 17 (Boehringer, Mannheim)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen humanes Zytokeratin 17

anti-CK 18 (Boehringer, Mannheim)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen humanes Zytokeratin 18

anti-CK 19 (Boehringer, Mannheim)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen humanes Zytokeratin 19

anti-FLAG M5 (Integra Biosciences, Fernwald)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen das FLAG-Marker Oktapeptid (N-DYKDDDDK-C)

anti-Galaktosyltransferase (zur Verfügung gestellt von E.G. Berger)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG3) gegen humane Milch-Galaktosyltransferase [25]

anti-Golgi βCOP Protein Klon M3A5 (Sigma, Deisenhofen)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen ein Epitop des 110 kDa großen Golgi βCOP-Proteins [3]

anti-HA Klon 12CA5 (Boehringer, Mannheim)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG2b) gegen die vom humanen Influenza Hämagglutinin (HA)-Protein abgeleitete HA-Epitop Sequenz (YPYDVPDYA)

anti-IFP 35

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein aus Maltose-Bindungsprotein und IFP35 [16]

anti-KDEL (zur Verfügung gestellt von M. Rohde)

Muriner, monoklonaler Antikörper gegen das KDEL-Peptid

anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (zur Verfügung gestellt von K. v. Figura)

Polyklonales Antiserum aus Ziege gegen den humanen 300 kDa großen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor

anti-MBP

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen bakterielles Maltose-Bindungsprotein [16].

anti-mitochondriales Antigen Klon 113-1 (BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen ein 60 kDa großes Protein humaner Mitochondrien

Anti-Nmi (zur Verfügung gestellt von L. Naumovski)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen die Aminosäuren 1-68 des Nmi-Proteins

anti-S26 (zur Verfügung gestellt von J. Stahl)

Polyklonales Antiserum aus Schaf gegen das ribosomale S26 Protein [193].

anti-S3a (zur Verfügung gestellt von J. Stahl)

Polyklonales Antiserum aus Ziege gegen das ribosomale S3a Protein [193].

anti-Transferrin-Rezeptor Klon T56/14 (Oncogene, Uniondale, NY, USA)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen den humanen 90 kDa großen Transferrin-Rezeptor [302]

BP53-12 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG2a) gegen die Aminosäuren 20-25 des humanen p53-Proteins [20]

CM-1 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das humane p53-Protein [207]

DO-1 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG2a) gegen die Aminosäuren 20-25 des humanen p53-Proteins [314]

pAb1801 (Oncogene, Cambridge, MA, USA)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen die Aminosäuren 46-55 des humanen p53-Proteins [17]

pAb240 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)

Muriner, monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen die Aminosäuren 213-217 des humanen p53-Proteins [113]

pAb421 (Oncogene, Cambridge, MA, USA)

Muriner, monoklonaler Antikörper (Subklasse IgG2a) gegen die Aminosäuren 371-380 des humanen p53-Proteins [131]

2.8.2 Primärantikörper (konjugiert)

Anti-Digoxigenin-AP; Fab-Fragmente

CD3-, CD14- und CD19- Micro Beads

CD3-FITC/CD19-PE

Simultest™ Control $\gamma 1/\gamma 1$

Boehringer, Mannheim

Miltenyi, Bergisch Gladbach

Pharmingen, Hamburg

Becton Dickinson, Heidelberg

2.8.3 Sekundärantikörper

Alle Sekundärantikörper wurden von der Firma Jackson Immunity, West Grove, PA, USA, bezogen.

Alkalische Phosphatase-konjugierte Antikörper:

Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)

Ziege-anti-Maus IgG (H+L)

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierte Antikörper:

Esel-F(ab')₂-Fragmente-anti-Kaninchen IgG (H+L), präadsorbiert gegen Serumproteine von Rind, Huhn, Ziege, Meerschweinchen, Hamster, Pferd, Mensch, Maus, Ratte, Schaf

Peroxidase-konjugierte Antikörper:

Kaninchen-anti-Ziege IgG (H+L) präadsorbiert gegen Serumproteine des Menschen

Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L), präadsorbiert gegen Serumproteine von Menschen, Maus und Ratte

Ziege-F(ab')₂-Fragmente-anti-Maus IgG (H+L); präadsorbiert gegen Serumproteine von Mensch, Rind und Pferd

Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-konjugierte Antikörper:

Esel-F(ab')₂-Fragmente-anti-Maus IgG (H+L), präadsorbiert gegen Serumproteine von Rind, Huhn, Ziege, Meerschweinchen, Hamster, Pferd, Mensch, Kaninchen, Schaf

Esel-F(ab')₂-Fragmente-anti-Ziege IgG (H+L), präadsorbiert gegen Serumproteine von Huhn, Meerschweinchen, Hamster, Pferd, Mensch, Maus, Kaninchen, Ratte

Ziege-F(ab')₂-Fragmente-anti-Kaninchen IgG (H+L), präadsorbiert gegen Serumproteinen des Menschen

Ziege-F(ab')₂-Fragmente-anti-Maus IgG (H+L), präadsorbiert gegen Serumproteine von Mensch, Rind und Pferd

2.9 Oligodesoxynukleotide

(Nicht homologe Bereiche für Mutagenese oder Klonierung sind unterstrichen dargestellt)

Vektorspezifische Primer für den pBluescript® SK (-) Vektor

#329	: 5'- ACCATGATTACGCCAAGC -3'	Position 813 - 796
#612	: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'	Position 626 - 645
#701	: 5'- GTAAAACGACGGCCAGTGAA -3'	Position 603 - 622
#702	5'- TAGGGCGAATTGGGTA -3'	Position 641 - 656
#703	: 5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'	Position 791 - 772
#829	5'- GCTATGACCATGATTACGC -3'	Position 819 - 801
#830	: 5'- GTAAAACGACGGCCAGTG -3'	Position 603 - 620

Primer für IFP 35

#370	: 5'- TTCTCAGCTGCTGCAGGTCC -3'	Position 196 - 177
#389	: 5'- TCCTATATGGGCACCCAAGC -3'	Position 941 - 922
#390	: 5'- GACCCGGAAGTGCCTAAGTC -3'	Position 280 - 299
#390R	: 5'- GACTTAGGCACTTCCGGGTC -3'	Position 299 - 280
#391	: 5'- ACTTGCTGCCCACCCAGT -3'	Position 725 - 708
#392	: 5'- TCGGGAGCTACTGCCAGG -3'	Position 618 - 635
#395	: 5'- CCATGGGCAGCTCCAAGG -3'	Position 466 - 449
#396	: 5'- ACATTCTGATATCTTGG -3'	Position 815 - 832
#618	: 5'- GCCACTGTGCCAGCTCTGAA -3'	Position 53 - 73

Primer für Klon U

#763	:5'- GCGGTTTCAGTGAGTTTATG -3'	Position 489 - 507
#789	:5'- ATCACCTGGACGCTCATG -3'	Position 639 - 622
#825	:5'- ACTGACAGCTCTCAGCAC -3'	Position 11 - 28
#826	:5'- AACCATTTGCTCAGTAGAAG -3'	Position 1034 - 1015

Primer für den hORL1-Rezeptor („Accession“-Nr. X77130)

#831	:5'- CCGTTCTGGGAGGTTATC -3'	Position 199 - 216
#832	:5'- AACGGGAACACCGACAAC -3'	Position 732 - 715

Primer für hGBP-3

#843	:5'- CCCAACTTGAAACACTGCC -3'	Position 1259 - 1277
#845	:5'- CTGTGAACAAAATTGATCAGGGTG -3'	Position 911 - 934
#847	:5'- CTCGGATTATTGCTCGGC -3'	Position 1725 - 1742
#848	:5'- CTTGCCTTGAGCAGATCTGTCAG -3'	Position 986 - 964
#849	:5'- CAACCTTTGCGCTTCAGC -3'	Position 2034 - 2017
#850	:5'- CCAGGCTCTCACAGAGAC -3'	Position 1953 - 1970
#851	:5'- CACCAATCCGGACACGC -3'	Position 379 - 396
#852	:5'- CTAGAAAGATATGGGCACC -3'	Position 440 - 422
#853	:5'- GAAGCCCTTGTTCTTCCC -3'	Position 717 - 700
#854	:5'- CTCTCACTGGTCCTGTGC -3'	Position 1601 - 1584
#855	:5'- CAGTCCTCTGGGCGTGC -3'	Position 2251 - 2235
#863	:5'- <u>CGCGGATCC</u> GCTTTAGAGATCCACATGTC -3'	Position 526 - 545
#864	:5'- <u>CGCGGATCC</u> GAGTAAACACATGGATCATCG -3'	Position 2280 - 2259
#865	:5'- CGCACTGGCAAAA <u>AA</u> CTACCTGATGAA -3'	Position 664 - 689
#866	:5'- TTCATCAGGTAG <u>TT</u> TTTGCCAGTGCG -3'	Position 689 - 664
#867	:5'- <u>TCCCCGCGGTCGAC</u> AAAGTAACATCCTAGACATGG-3'	Position 507 - 526

2.10 Vektoren, Plasmide und Genbanken**pBluescript® SK (-)** (Stratagene, Hoofddorp, Niederl.)

Phagemid-Derivat des pUC19, das durch *in vivo* Exzision aus LambdaZAPII/Uni-ZAP™ XR hervorgeht

pBS Klon U

pBluescript® SK (-) Vektor mit in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) eingefügter vollständiger cDNA-Sequenz von Klon U (5' – T7 – KlonU cDNA – T3 – 3')

pBS 1383

pBluescript® SK (-) mit in der MCS eingefügter cDNA-Sequenz von hGBP-1 ab Position 1913 (5' – T7 – hGBP-1 cDNA – T3 – 3')

pBS 1989

Vektor pBluescript® SK (-) mit in der MCS eingefügter cDNA-Sequenz von hGBP-2 von Base 1381 bis 2030 (5' – T7 – hGBP-2 cDNA – T3 – 3')

pCEP 4 FLAG (zur Verfügung gestellt von L. Naumovski)

Eukaryontischer Expressionsvektor, basierend auf dem Vektor pCEP4 (Invitrogen, NV Leek; Niederl.); in die BamHI-Restriktionsschnittstelle wurde 3' vom CMV-Promotor eine für das FLAG-Epitop kodierende Sequenz eingefügt (5' – CMV – NheI – FLAG – BamHI – 3')

pCEP 4 FLAG Nmi (zur Verfügung gestellt von L. Naumovski)

Eukaryontischer Expressionsvektor pCEP4 FLAG mit zwischen BamHI- und XhoI-Restriktionsschnittstelle eingefügter cDNA-Sequenz von Nmi, die für das Nmi-Protein ab Aminosäure 2 kodiert

pDCR (zur Verfügung gestellt von E. J. Taparowsky)

Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor und 3' vom Promotor eingefügter für das HA-Epitop kodierender Sequenz, gefolgt von einer MCS mit SalI- und BamHI-Restriktionsschnittstelle (Amp^R, Neo^R; pBR322 Ori [94])

pDCR B-ATF (zur Verfügung gestellt von E. J. Taparowsky)

Eukaryontischer Expressionsvektor pDCR mit in der SalI-Restriktionsschnittstelle eingefügter B-ATF-cDNA-Sequenz, die für Aminosäure 1-125 des B-ATF-Proteins kodiert; die SalI-Restriktionsschnittstelle wurde bei der Klonierung zerstört [94]

pDCR IFP 35 (zur Verfügung gestellt von E. J. Taparowsky)

Eukaryontischer Expressionsvektor pDCR mit in die SalI-Restriktionsschnittstelle eingefügter IFP 35-cDNA-Sequenz [319]

pEVREFO-HA

Eukaryontischer Expressionsvektor pEVREFO [202] mit zwischen BamHI- und KpnI-Restriktionsschnittstelle eingefügter für das HA-Epitop kodierender Sequenz

pGEM 135 komplett

Klonierungsvektor pGEM4Z (Promega, Heidelberg) mit in der MCS eingefügter IFP35-cDNA-Sequenz von Base 46 bis 1128 (5' – EcoRI – IFP35 – SphI – 3' [16])

pHMC 1.2/pBS (zur Verfügung gestellt von D. K. Grandy)

Klonierungsvektor pBluescript mit in der MCS zwischen HindIII- und XbaI-Restriktionsschnittstelle eingefügter hORL1-cDNA-Sequenz von Base 158 bis 1339 des HSORL1 („Accession“-Nr.: X77130; 5' – T7 – hORL1-cDNA – T3 – 3')

pMALTM-c (New England Biolabs; Schwalbach/Taunus)

Plasmidvektor zur Expression von MBP-Fusionsproteinen

pMalc 135

Plasmidvektor pMALTM-c mit 3' vom pmalE-Gen über StuI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen eingefügter aus pGEM 135 komplett isolierter für Aminosäure 2 bis 288 kodierender cDNA-Sequenz von IFP35 mit einer Deletion von 2 Aminosäuren an Position 127 und 128 [16]

ExAssistTMHelferphage (Stratagene)

Filamentöser Helferphage für die Superinfektion von *E. coli* XL-1 Blue bei der Umwandlung von rekombinantem Uni-ZAPTMXR Klon in ein pBluescript-Phagemid

LambdaZAPII[®] /Uni-ZAPTMXR (Stratagene)

Phagenvektor, der die directionale Klonierung von DNA-Fragmenten zwischen EcoRI- und XhoI-Restriktionsschnittstelle des pBluescript[®] SK (-) erlaubt. Über *in vivo* Exzision kann ein das cDNA-Fragment tragendes pBluescript-Phagemid isoliert werden [281].

Unidirektionale für IFN- γ induzierte cDNAs angereicherte Genbank

Von Dr. B. Denecke hergestellte cDNA-Genbank, die aus je 1/3 mRNAs folgender Zellen hergestellt wurde: 1.) für 24 h mit 10 nM TPA behandelte und anschließend zusätzlich für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induzierte U937-Zellen, 2.) für 24 h mit 20 nM TPA behandelte und anschließend zusätzlich für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induzierte THP-1-Zellen, 3.) für 24 h mit 20 nM TPA behandelte und anschließend zusätzlich für 12 h mit 1000 U/ml IFN- γ und 50 μ g/ml CHX behandelte THP-1-Zellen. Die Genbank wurde im Lambda ZAPII[®]-Vektor kloniert.

2.11 Bakterienstämme

E. coli DH5 α (GibcoBRL)

Genotyp: *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* [128]

E. coli HB 101 (Promega)

Genotyp: *supE44* *ara-14* *galK2* *lacY1* Δ (*gpt-proA*)62 *rpsL20* (Str^r) *xyl-5* *mtl-1* *recA13* Δ (*mcrC-mrr*) *hsdS*^(r-m). Wirtsstamm zur Subklonierung von cDNA-Sequenzen [38]

E. coli JM 109 (Promega)

Genotyp: F' *traD36* *lacI*^q Δ (*lacZ*)M15 *proA*⁺*B*⁺/*e14*⁻(*McrA*⁻) Δ (*lac-proAB*) *thi* *gyrA96* (*Nal*^r) *endA1* *hsdR17*(*r_K-m_K*⁺) *relA1* *supE44* *recA1* [332]

E. coli TB-1

Genotyp: F' *ara* Δ (*lac-proAB*)*rpsL* (Str^r)[ϕ 80 *dlac* Δ (*lacZ*)M15]*thi* *hsdR* (*r_K-m_K*⁺) [151]

E. coli XL1-Blue (Stratagene)

Genotyp: *recA1* *end A1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F' *proAB* *lacI*^q*Z* Δ M15 Tn10(Tet^r)]^C [125]

E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene)

Genotyp: Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *end A1* *supE44*, *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* [F' *proAB* *lacI*^q*Z* Δ M15 Tn10(Tet^r)]^C

E. coli SOLRTM (Stratagene)

Genotyp: *e14*⁻(*mcrA*⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *sb**c*, *recB* *recJ* *uvrC* *umuC*::Tn5 (Kan^r) *lac* *gyrA96* *relA*, *thi-1* *endA1* λ ^R [F' *proAB* *lacI*^q*Z* Δ M15]^C Su⁻ (nonsuppressing)

2.12 Zelllinien

A 549 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

Aus einem Alveolarzell-Karzinom abgeleitete humane Zelllinie, die Typ II-Alveolarzell-Epithelzellmerkmale aufweist (DSM ACC 107; [116;189])

X63Ag8.653 (I. Steinmetz)

Von einem Balb/c-Myelom abgeleitete murine Myelom-Zelllinie

GLC4 (zur Verfügung gestellt von R. J. Scheper)

aus einem kleinzelligen Lungenkarzinom abgeleitete humane Zelllinie [336]

GM637 (zur Verfügung gestellt von S. L. Gupta)

Humane Fibroblasten-Zelllinie, die über SV40-Transformation von Hautfibroblasten erhalten wurde [171]

HaCaT (zur Verfügung gestellt von N. E. Fusenig)

Spontan transformierte, schnell proliferierende humane Keratinozyten-Zelllinie auf niedrigem Differenzierungsniveau [34]

HeLa S3 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

Klonales Derivat der aus einem Zervixkarzinom abgeleiteten HeLa-Adenokarzinomzelllinie. Die Zelllinie ist HPV-18 transformiert und enthält eine deletierte Kopie des HPV-18 Genoms in die chromosomale DNA integriert (DSM ACC 161; [115;152;255; 273])

HL-60 (American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA)

Aus einer akuten myeloiden Leukämie abgeleitete humane Zelllinie (ATCC CCL 240; [75; 80])

Jurkat (American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA)

Humane T-Zell-Leukämiezelllinie (ATCC TIB 152; [117])

Raji (zur Verfügung gestellt von R. Schwinzer)

Humane Burkitt-Lymphomzelllinie [102;256]

SW.1573 (zur Verfügung gestellt von R. J. Scheper)

Von einem squamösen Lungenkarzinom abgeleitete Zelllinie [317]

THP-1 (American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA)

Aus einer akuten monozytären Leukämie abgeleitete humane Monozyten-Zelllinie (ATCC TIB 202; [12;305])

U937 (zur Verfügung gestellt von M. Goppelt-Strübe)

Humane histiozytäre Lymphoma-Zelllinie [294]

WISH (zur Verfügung gestellt von P. v. Wussow)

Von humanem Amniongewebe abgeleitete Zelllinie [136]

2.13 Puffer und andere Lösungen

Agarplatten	1,5% (w/v) Bacto-Agar im entsprechenden Medium
DEPC- ddH ₂ O	0,01% (v/v) Diethylpyrocarbonat; über Nacht bei RT inkubiert und 20 min lang bei 121°C inaktiviert
HAT-Medium	DMEM-Medium mit 100 mM Hypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin
HT-Medium	DMEM-Medium mit 100 mM Hypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin
LB-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,5
NZY-Medium	0,5% (w/v) NaCl; 0,2% (w/v) MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NZ-Amin (Casein-Hydrolysat); pH 7,5
Paraformaldehyd, 3% (3% PFA)	3% (w/v) Paraformaldehyd bei 80°C in PBS gelöst, filtriert (Porengröße 0,45 µm) und bei -20°C gelagert
PBS (10x)	26,9 mM KCl; 14,7 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,37 M NaCl; 80,6 mM Na ₂ HPO ₄
SDS-PAGE-Ladelösung (2x)	73,2% (v/v) 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8; 12,2% (v/v) Glycerin; 1,95% (w/v) SDS; 4,88% (v/v) β-Mercaptoethanol; Bromphenolblau ad libitum
SM-Puffer	100 mM NaCl; 10 mM MgSO ₄ ; 50 mM TRIS-HCl pH 7,5; 0,01% Gelatine
SSC (20x)	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,0-8,0
Topagarose	0,7% (w/v) Agarose im entsprechenden Medium

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien A549, GM 637, HaCaT, HeLaS3, SW1573, WISH und X63Ag8.653 wurden in DMEM-Medium kultiviert. Die leicht adhärent wachsende Zelllinie GLC 4 sowie die Suspensionszelllinien HL-60, Jurkat, Raji, THP-1 und U937 erhielten RPMI-Medium. Alle Kultivierungsmedien enthielten 862 mg/l L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax I), 10% (v/v) FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Adhärent wachsende Zellen wurden sobald sie einen konfluenten Zellrasen bildeten einmal mit PBS gewaschen und unter Einsatz von Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension gebracht; GLC 4-Zellen wurden bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens durch intensives Klopfen abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in Kultivierungsmedium (0,12-0,3 ml/cm²) aufgenommen.

Suspensionszellen wurden bei einer Zelldichte von ca. 0,5-1x10⁶ Zellen/ml mit dem 2 bis 5fachen Volumen an frischem Kultivierungsmedium verdünnt.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden Suspensionszellen bzw. in Suspension gebrachte adhärent wachsende Zellen (Kap. 3.1.1) zentrifugiert (5-10 min; 100xg; RT), das Zellsediment in Kultivierungsmedium suspendiert, ein Volumen Kultivierungsmedium mit 30% (v/v) FCS, und 20% (v/v) DMSO zugegeben und die Zellsuspension zu je 1 ml auf Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff über Nacht eingefroren; Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad inkubiert, in 50 ml Kultivierungsmedium überführt, zentrifugiert (5-10 min; 100xg; RT) und das Zellsediment in Kultivierungsmedium suspendiert. Die Zellen wurden in Kulturgefäße überführt (siehe Kap. 3.1.1); nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte nach 1:2 Verdünnung der Zellen in 0,4%iger Trypanblau-Lösung; tote Zellen sollten nach 5 min den blauen Farbstoff, der sich an Proteine anlagert, aufgenommen haben und lebende noch nicht. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durch Zählen der Zellen in den außen liegenden Großquadraten (Fläche: 1 mm², Tiefe: 0,1 mm; Volumen: 10⁻⁴ cm³) die Zellzahl bestimmt.

3.1.4 Transienter Gentransfer in eukaryontische Zellen

Der transiente Gentransfer in eukaryontische Zellen (Transfektion) erfolgte mit Hilfe von eukaryontischen Expressionsplasmiden. Von den zur Verfügung stehenden Transfektions-

agentien und -methoden, zeigte das polykationische SuperFect-Transfektionsreagenz die höchste Transfektionseffizienz bei HeLaS3-Zellen (SuperFect Transfection Reagent Handbook 11/97, QIAGEN).

In Suspension gebrachte Zellen (Kap. 3.1.1) wurden in einer entsprechenden Zelldichte (Tab. 1) auf Gewebekulturplatten ausgesät und ca. 20 h später transfiziert: Für die Transfektion von Zellen in einer 6-„well“-Schale wurden 4 µg Expressionsplasmid in 100 µl Kultivierungsmedium ohne Antibiotikum und FCS suspendiert, 10 µl SuperFect-Reagenz zugegeben und es wurde 10 sek intensiv gemischt. Nach 10-20 minütiger Inkubation bei RT wurden 600 µl Kultivierungsmedium mit FCS und Antibiotika zum Transfektionsgemisch gegeben und das Ganze auf dem einmal mit PBS gewaschenen Zellrasen verteilt. Nach maximal 18 h langer Inkubation mit dem Transfektionsgemisch wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Kultivierungsmedium versorgt. Für die Transfektion von Zellen in einer 24-„well“-Schale wurden die in Tab. 1 aufgeführten Mengen verwendet.

Multiwell-Platten	Zellzahl pro „well“	Kultivierung der Zellen		Transfektion der Zellen			
		Kultivierungsmedium [ml]	PBS [ml]	serumfreies Medium [µl]	DNA/„well“ [µg]	SuperFect [µl]	Kultivierungs-Medium [µl]
24-„well“-Platte	5×10^4	1	1	60	1	5	350
6-„well“-Platte	2×10^5	3	3	100	4	10	600

Tab. 1: Transfektion von eukaryontischen Zellen mit SuperFect

Mengen- und Voluminaangaben für Kultivierung und Transfektion von Zellen in einer 24- bzw. 6-„well“-Schale.

3.1.5 Induktion von Zellen mit unterschiedlichen Agentien

Für die Behandlung von Zellen mit unterschiedlichen Agentien wurden adhärent wachsende Zellen am Vortag der Induktion so ausplattiert, daß bei der Induktion am folgenden Tag ein 70-80% konfluenter Zellrasen vorlag. Bei transfizierten Zellen erfolgte die Induktion nach Abschluß der Transfektion (Kap. 3.1.4). Suspensionszellen wurden am Tag der Aussaat behandelt.

Cycloheximid wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml (Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol) eingesetzt. Soweit nichts anderes erwähnt wird, betrug die Induktionszeit 12 h.

Cytochalasin D (Stammlösung: 10 mM in DMSO) bzw. Nocodazol (Stammlösung: 50 mM in DMSO) wurden in einer Endkonzentration von 10 µM, 5 µM und 2 µM (Cytochalasin D) bzw. 50 µM, 10 µM und 0,1 µM (Nocodazol) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde stets ein mit dem Lösungsmittel behandelter Ansatz mitgeführt. Für Immunfluoreszenzen wurden 1×10^5 Zellen/„well“ ausplattiert. Die Zugabe von Cytochalasin D bzw. Nocodazol erfolgte kurz vor der Induktion mit IFN-γ; als Kontrolle für die Wirkung von Cytochalasin D wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit Phalloidin und als Kontrolle für die Nocodazol-Wirkung eine mit anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Antiserum durchgeführt. Für

die Präparation nukleärer und zytoplasmatischer Extrakte aus Cytochalasin D- bzw. Nocodazol-behandelten Zellen, wurden die Zellen zunächst für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induziert und anschließend für 4 h zusätzlich mit 10 μ M Cytochalasin D bzw. Nocodazol behandelt.

Di-butyryl-cAMP (dBcAMP; Stammlösung: 0,1 M in PBS) wurde in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 72 h.

IFN- γ wurde in einer Endkonzentration von 1000 U/ml (Stammlösung: 6000 U/ml in ddH₂O) und IFN- α (Stammlösung: 5000 U/ml in ddH₂O) in einer Konzentration von 500 U/ml eingesetzt. Die Induktion erfolgte jeweils für 24 h. Bei Induktion von in Kulturflaschen ausgesäten Zellen wurde IFN direkt in das Medium gegeben. Wurden in Gewebekulturplatten kultivierte Zellen induziert, wurde das Kultivierungsmedium gegen Medium mit IFN ausgetauscht.

Lipopolysaccharid (LPS; Stammlösung: 1 mg/ml in PBS) wurde in einer Endkonzentration von 33 ng/ml (Monozyten), 10 μ g/ml (B-Lymphozyten) bzw. 1 μ g/ml (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) eingesetzt; die Inkubationszeit betrug 20-48 h.

Phytohämagglutinin (PHA; Stammlösung: 1 mg/ml in RPMI-Medium) wurde in einer Konzentration von 8 μ g/ml (T-Zellen des peripheren Blutes) bzw. 2 μ g/ml (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 24 bzw. 48 h.

TPA (Stammlösung: 1,62 mM in DMSO) wurden in einer Endkonzentration von 20 nM (THP-1; HL-60) bzw. 10 nM (U937) eingesetzt; die Induktionszeit betrug 48 h. Monozyten des peripheren Blutes wurden mit 25 nM TPA für 20-24 h behandelt. Bei Behandlung von HL-60-Zellen, die bei einer DMSO-Konzentration von mehr als 1% zu einem Granulozyten-ähnlichen Phänotyp differenzieren [74;133] wurde die TPA-Stammlösung mit wässriger Lösung (ddH₂O bzw. Medium) auf die Endkonzentration verdünnt. Wurden THP-1- und U937-Zellen mit TPA behandelt, so wurde von einer Verdünnung der TPA-Stammlösung in DMSO (10 μ M TPA) ausgegangen. Wurde mit TPA und IFN- γ induziert (TPA/IFN-Behandlung), so wurden die Zellen für 24 h mit TPA vorbehandelt; anschließend wurde für weitere 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induziert. Für die Induktion mit TPA, IFN- γ und CHX (TPA/IFN/CHX-Behandlung) wurden die Zellen für 24 h mit TPA behandelt und anschließend für 12 h mit IFN- γ (1000 U/ml) und CHX (50 μ g/ml).

3.1.6 Isolierung von peripheren Blutzellsubpopulationen

3.1.6.1 Trennung von mononukleären und polymorphkernigen Blutzellen

Die Trennung von mononukleären und polymorphkernigen Zellen erfolgte aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Dichte der einzelnen Blutzellpopulationen im Ficoll-Hypaque Dichtegradienten [39].

Die Präparation erfolgte aus frischen „Buffy Coats“ (aus ca. 450 ml Blut gewonnen; [253]) von gesunden Spendern. Zum „Buffy Coat“ wurde 1 ml Heparin als Gerinnungshemmer und anschließend das 4fache Volumen (200 ml) PBS gegeben; 15-20 ml Ficoll-Lösung (1,077g/l) wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit dem verdünnten „Buffy Coat“ überschichtet und zentrifugiert (20 min; 800xg; RT; ohne Bremse). Anschließend befanden sich die Granulozyten und Erythrozyten im Sediment, gefolgt von einer schmalen dem Ficoll aufliegenden

Ringfraktion, welche vorwiegend mononukleäre Zellen enthält, und der darüberliegenden Thrombozytenschicht.

3.1.6.2 Immunmagnetische Aufreinigung von Monozyten, B- und T-Lymphozyten

Die Immunmagnetische Präparation von Monozyten, B- und T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe von Antikörper-konjugierten paramagnetischen Partikeln (MACS-MicroBeads) mit einem Durchmesser von < 100 nm. Zellpopulationen können mit zellspezifischen Antikörpern markiert und mit Hilfe einer Säule mit magnetisierbarer, ferromagnetischer Matrix unter Einsatz eines starken Permanentmagneten isoliert werden [208;209].

Mononukleäre Zellen der Ringfraktion (Kap. 3.1.6.1) wurden isoliert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen (200xg; 10 min; mit Bremse), um Thrombozyten und restliches Ficoll zu entfernen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10^7 Zellen/90 µl in Absättigungslösung (2 mM EDTA und 0,5% (w/v) BSA in PBS) suspendiert und 10^7 Zellen/10 µl Antikörper-konjugierte MACS-Beads zugegeben (verwendete Antikörper: anti-CD14 für Monozyten, anti-CD19 für B-Lymphozyten; anti-CD3 für T-Lymphozyten). Es wurde 15 min lang bei 6-12°C inkubiert, auf ein Volumen von 50 ml mit Absättigungslösung aufgefüllt, zentrifugiert (10 min; 300xg), der Überstand entfernt und das Sediment in einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml in Absättigungslösung aufgenommen. Eine VS⁺-Trennsäule wurde in das Magnetfeld eines Vario MACS-Separators eingesetzt, mit 3 ml Absättigungslösung äquilibriert und die Zellsuspension über die Säule gegeben. Es wurde viermal mit je 3 ml Absättigungslösung gewaschen und anschließend die Säule dem Magnetfeld entnommen. Die Zellen wurden mit 5 ml Absättigungslösung nach Angaben des Herstellers eluiert, gezählt und Zellen für eine FACS-Analyse zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Zellfraktion entnommen (Kap. 3.4.7). Restliche Zellen wurden sedimentiert und entweder in RPMI-Medium mit 10% (v/v) FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert und mit unterschiedlichen Agentien behandelt (Kap. 3.1.5) oder direkt für die RNA-Präparation (Kap.3.3.3.2) im entsprechenden Lysispuffer bzw. für die Untersuchung der Proteinexpression in SDS-PAGE-Ladelösung (1×10^7 Zellen/100 µl) aufgenommen.

3.1.6.3 Präparation von Monozyten über Adhärenz

Die Isolierung von Monozyten basiert auf der Fähigkeit dieser Zellen, an Plastikmaterialien zu adhären [72].

Mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isolierte mononukleäre Zellen (Kap. 3.1.6.1) wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen (200xg; 10 min; RT; ohne Bremse) und in einer Konzentration von $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI-Medium mit 5% (v/v) AB-Serum, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin aufgenommen; je 30 ml Zellsuspension wurden in eine Gewebekulturschale (Ø 145 mm) gegeben und die Zellen 1 h lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit 37°C warmem PBS solange gewaschen bis alle nicht adhären, abgerundeten Zellen entfernt worden waren. Bei den auf den Platten verbliebenen Zellen handelte es sich um die peripheren Blutmonozyten, die anschließend mit 20 ml RPMI-Medium mit 5% AB-Serum, Penicillin und Streptomycin versorgt, evtl. mit verschiedenen Agentien behandelt (Kap. 3.1.5) oder direkt für die RNA-Präparation (Kap. 3.3.3.2) im

entsprechenden Lysispuffer bzw. für die Untersuchung der Proteinexpression in SDS-PAGE-Ladelösung (1×10^7 Zellen/100 μ l) aufgenommen wurden.

3.1.6.4 Präparation von Granulozyten

Für die Präparation von Granulozyten aus der Sedimentfraktion des Ficoll-Gradienten (Kap. 3.1.6.1), wurden Thrombozytenschicht und mononukleäre Schicht entfernt. Die Sedimentfraktion wurde mit 1:2 PBS verdünnt und mit dem gleichen Volumen Plasmasteril vermischt. Der Ansatz wurde 30 min lang bei RT inkubiert, wobei sich der größte Teil der Erythrozyten absetzte. Die obere Granulozyten-reiche Fraktion wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10 min; 400xg; RT). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Sediment mit mindestens 10 ml ddH₂O/2 ml Sedimentfraktion versetzt. Zur Lyse restlicher Erythrozyten wurde 30 sek lang durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 10 ml zweifach konzentriertes PBS zugegeben, um wieder eine isotonische Lösung zu erhalten. Es wurde wiederum mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, zentrifugiert (5 min; 200xg) und zweimal mit PBS gewaschen. Die Granulozyten wurden direkt in der RNA-Präparation eingesetzt (Kap. 3.3.3.2).

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Allgemeines

Zur dauerhaften Lagerung wurde flüssige Bakterienkultur mit Bakterien der logarithmischen Wachstumsphase im Verhältnis 1:2 mit 2x Hogness-Lösung (7,2 mM K₂HPO₄; 2,6 mM KH₂PO₄; 4 mM Natriumcitrat; 2 mM MgSO₄; 8,8% [v/v] Glycerin) vermischt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Elektrotransformation von Bakterien

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in eukaryontische und prokaryontische Zellen. Sie beruht auf einer vorübergehenden Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität, hervorgerufen durch kurze elektrische Impulse hoher Feldstärke. Dies ermöglicht es der DNA in die Zellen einzudringen [279]. Die Methode erlaubt ein hocheffizientes Einbringen von superhelikaler Plasmid-DNA in Bakterienzellen (10^{10} Transformanden/ μ g Plasmid DNA; [33;51;95]).

3.2.2.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Voraussetzung für eine effiziente Elektrotransformation von Bakterien ist die Entfernung exogener Ladungsträger, die den Aufbau des elektrischen Feldes stören würden. Aus diesem Grund wurden exponentiell wachsende Bakterien mehrfach mit einem HEPES-Puffersystem gewaschen [33].

Für die Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden 700 ml LB-Medium mit 10 ml einer über-Nacht-Kultur angeimpft, bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) inkubiert und 15 min im Eisbad abgekühlt; alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Bakterien wurden zentrifugiert (15 min; 3500xg) und einmal in 500 ml

und einmal in 200 ml 1 mM HEPES (pH 7,5) gewaschen. Abschließend wurde einmal mit 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Das Sediment wurde in 1,5 ml 10% Glycerin resuspendiert, in Portionen zu je 150 µl abgefüllt, 5 min lang auf Eis inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Elektrotransformation

Zu 40 µl auf Eis aufgetauten elektrokompenten Bakterien (Kap. 3.2.2.1) wurden entweder 1 ng Supercoil-Plasmid-DNA oder 0,5-2 µl aufgereinigte Ligation (Kap. 3.3.2.9) gegeben und es wurde 5 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in Elektroporationsküvetten gegeben und bei 400 Ω, 25 µF und 2,5 kV elektroporiert. Die Bakterien wurden in 1 ml SOC (2% [w/v] Bacto-Trypton; 0,5% [w/v] Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose) suspendiert und 1 h lang bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl unverdünnte, 1:100 bzw. 1:1000 in SOC verdünnte Bakteriensuspension auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Phagenkompetente Bakterien

Um eine optimale Adsorption des λ-Phagen an das Wirtsbakterium zu erreichen werden Bakterien in Medium, welches mit Maltose und Mg²⁺-Ionen supplementiert ist, kultiviert. Maltose induziert die Expression des *lamB*-Proteins, des λ-Rezeptors, der auch für den Maltosetransport notwendig ist. Magnesiumionen unterstützen die Phagenadsorption. Da Phagen auch an tote Bakterien adsorbieren, in denen sie nicht replizieren können, werden Zellen in der logarithmischen Phase verwendet.

E. coli XL1-Blue MRF'-Bakterien wurden in 50 ml LB-Medium mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄ angezogen, zentrifugiert (10 min; 800xg) und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.

3.2.4 Phagentiterbestimmung

Bei der Phagentiterbestimmung wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Phagensuspension der entsprechenden Phagenbank wurde 1:10 bis 1:100000 in SM-Puffer verdünnt; jeweils 2,5 µl Phagenverdünnung wurden zusammen mit 240 µl phagenkompetenten Bakterien 15 min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,4 ml 48°C warme NZY-Topagarose zugegeben und das Ganze auf NZY-Agarplatten (Ø 92 mm) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert; am folgenden Tag wurde der Bakterientiter bestimmt.

3.2.5 Ausplattieren der Phagen und Plaquetransfer

Für die Suche nach bestimmten in der Genbank vorhandenen cDNAs wurden 600 µl phagenkompetente Bakterien mit 50000 pfu in SM-Puffer für 15 min auf den Schüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 6 ml auf 48°C vorgewärmte NZY-Topagarose zugegeben; das Ganze wurde auf NZY-Agarplatten (Ø145 mm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Plaquetransfer wurden die Agarplatten auf 4°C abgekühlt, ein QIAbrane-Nylon-

membranfilter für 2 min aufgelegt und die Lage des Filters mit Hilfe einer in Bromphenolblau-Lösung getauchten Kanüle markiert. Der Filter wurde anschließend mit der Phagenseite nach oben 2 min lang in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Natriumhydroxid), 5 min lang in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS-HCl pH 8,0) und 30 sek lang in Äquilibriumslösung (2x SSC; 0,2 M TRIS-HCl pH 7,6) inkubiert. Wurden nacheinander mehrere Filter auf dieselbe Platte gelegt (Replikas), wurde der erste Filter 2 min, der zweite 4 min und der dritte 8 min lang auf dem Agar belassen. Im Anschluß an die Äquilibriumslösung wurde der Filter getrocknet und im UV-Stratalinker von beiden Seiten bestrahlt (Automatik-Einstellung).

Bei der Phagenvereinzellung wurden die aus dem Agar ausgestochenen Phagenplaques vor dem Ausplattieren 30-60 min lang bei 4°C und 200 rpm geschüttelt und 5 µl einer 1:1000 bzw. 2 oder 5 µl einer 1:10000 Verdünnung der Phagen in SM-Puffer zusammen mit 240 µl phagenkompetenten Bakterien inkubiert; es wurden 2,4 ml NZY-Topagarose zugegeben und es wurde auf NZY-Agarplatten (Ø 92 mm) ausplattiert. Darüber hinausgehend entspricht das Vorgehen dem im vorangegangenen Absatz beschriebenen.

3.2.6 Isolierung von Phagen

Phagen, die in der Hybridisierung (Kap. 3.3.4.4) ein positives Signal gaben wurden mit einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestochen, in 500 µl SM-Puffer mit 20 µl Chloroform überführt und bei 4°C gelagert.

3.2.7 *In vivo* Exzision

Das LambdaZAPII[®]-Vektorsystem erlaubt eine Konversion des rekombinanten Lambda-ZAPII[®]-Klons in ein pBluescript-Phagemid. Bedingung für diese sogenannte *in vivo* Exzision ist eine Superinfektion des Wirtsbakteriums mit einem filamentösen Helferphagen. Die vom Helferphagen gebildeten Proteine erkennen den f1-Ori auf der Phagen-DNA, initiieren eine Einzelstrangsynthese sowie die Rezirkularisierung und Verpackung der einzelsträngigen DNA. In einem nicht supprimierenden Bakterienstamm, in dem der filamentöse Helferphage, der eine Amber-Mutation trägt, nicht replizieren kann, erfolgt die Zweitstrangsynthese [11;311].

Je 50 ml LB-Medium mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄ wurden mit *E. coli* XL1-Blue MRF'- bzw. *E. coli* SOLR- Bakterien angeimpft, über Nacht bei 30°C oder für 3 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert, zentrifugiert (10 min; 800xg; 4°C) und mit 10 mM MgSO₄-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Es wurden 200 µl *E. coli* XL1-Blue MRF'-Bakterien, 20 µl Phagensuspension und 2 µl ExAssist-Helferphage zusammengegeben und 15 min lang bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Es wurden 3 ml 2x YT-Medium (1% [w/v] NaCl; 1% [w/v] Hefeextrakt, 1,6% [w/v] Bacto-Trypton; pH 7,0) zugegeben und es wurde 3 h lang bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert; 1,5 ml der Suspension wurden 20 min lang bei 70°C inkubiert und zentrifugiert (15 min; 4000xg; RT). Der Überstand enthielt die Phagemide. Es wurden 200 µl der o.g. *E. coli* SOLR-Bakterien mit 1 µl (a) bzw. 50 µl Phagemidsuspension (b), 15 min lang bei 37°C und 200 rpm inkubiert und 2 µl aus (a), 4 µl aus (b) bzw. 100 µl aus (b) auf einer LB-Agarplatte (Ø 92 mm) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden drei Klone isoliert und eine Plasmid-Mini-Präparation (Kap. 3.3.2.1.1) durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}), einer Wellenlänge, bei der die in den Nukleinsäuren enthaltenen Basen ihr Absorptionsmaximum aufweisen, im Spektralphotometer bestimmt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach dem Lambert Beer'schen Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ (E : Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$], c : Konzentration der DNA [mol/l], d : Schichtdicke der Lösung [cm]). Dabei beträgt der Koeffizient (ϵ) für dsDNA 20 und für ssRNA 25. Abgeleitet von diesem Gesetz erfolgte die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration nach folgender Regel: Eine OD_{260} von 1,0 entsprach einer Konzentration von 50 $\mu g/ml$ dsDNA bzw. 40 $\mu g/ml$ ssRNA.

Mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} wurde die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation bestimmt; Bei einem Quotienten von 1,8-1,9 bzw. 1,9-2,0 liegt eine hochreine Präparation von DNA bzw. RNA vor [11].

Für die Messung wurde eine Verdünnung der Nukleinsäurelösung im Lösungsmittel (TE-Puffer oder ddH_2O) vorgenommen und gegen das Lösungsmittel als Referenz im Spektralphotometer in einer Quarzküvette gemessen. Der lineare Bereich für die Messung der Absorption lag zwischen OD_{260} von 0,08 bis 0,9.

3.3.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Nukleinsäuren entsprechend ihrer Nettoladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Das Wanderungsverhalten im Gel hängt von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, der Ionenstärke, der Porengröße der Matrix und der Temperatur sowie von Nettoladung, Form und Größe der aufzutrennenden Moleküle ab. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und bei einer Anregungswellenlänge im UV-Bereich Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich emittiert, werden die DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht [145;204;290].

Die DNA-Probe wurde 1:5 bis 1:10 in 10x HSE (4 M Harnstoff; 50% [w/v] Saccharose; 20 mM EDTA pH 7,8; 0,04% [w/v] Bromphenolblau) suspendiert und in einem horizontalen 0,8-2%igen Agarosegel mit 0,2 $\mu g/ml$ Ethidiumbromid in 1x TAE (40 mM TRIS-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0) und 1x TAE als Elektrophoresepuffer bei 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente die 1 kb DNA-Leiter; zur DNA-Mengenabschätzung wurden λ DNA/Hind III-Fragmente in der Elektrophorese mitgeführt. Die Banden wurden auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Sofern es sich um eine präparative Gelelektrophorese handelte wurden anschließend eine oder mehrere Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels QIAquick Gel Extraction Purification Kit isoliert (Kap. 3.3.2.3).

3.3.2 Präparation und Analyse von Plasmiden

3.3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Beide im folgenden beschriebenen Methoden basieren auf dem Prinzip der alkalischen Hydrolyse [28;29;145].

3.3.2.1.1 Plasmid-Mini-Präparation von DNA nach Birnboim

Die Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly eignet sich für die schnelle Präparation von Plasmiden aus einer großen Anzahl transformierter Bakterien. Die DNA kann sowohl in Sequenzierungen als in der Restriktionsanalyse eingesetzt werden [28;29].

Es wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Bakterienkolonie angeimpft und entweder für 3-4 h oder über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert; 1,5 ml der Kultur wurden zentrifugiert (15 sek; 15000xg). Nachdem das Sediment in 100 µl Lösung A (25 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert worden war, wurden 200 µl Lösung B (0,2 M Natriumhydroxid; 1% [w/v] SDS) zugegeben. Bevor und nachdem zusätzlich 150 µl Lösung C (3 M Kaliumacetat pH 4,8) dem Ansatz hinzugefügt worden waren, wurde durch Invertieren gemischt. Es wurde 10 min lang auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 min; 15000xg; RT). Der Überstand wurde einer P/C/I-Extraktion (Kap. 3.3.2.2) unterzogen. Zur Präzipitation der DNA wurde die resultierende wäßrige Phase mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt und nochmals zentrifugiert. Das plasmidhaltige Sediment wurde mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A resuspendiert.

Es wurden 5 µl der Präparation in den Restriktionsverdau (Kap. 3.3.2.6) und 1 µg DNA (ca. 5-11 µl) in der Sequenzierreaktion eingesetzt.

3.3.2.1.2 Plasmid-Midi-Präparation von DNA nach QIAGEN

Bei dieser Methode schließt sich an die alkalische Hydrolyse eine Aufreinigung der DNA über eine Anionenaustauscher-Säule unter entsprechenden niedrigen Salz- und pH-Bedingungen an. Verbliebene RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschlösung mittleren Salzgehaltes entfernt und die Plasmid-DNA mit einem Hochsalz-Puffer eluiert (QIAGEN Plasmid Purification Handbook, 01/97, QIAGEN). Diese Plasmidpräparation hat den Vorteil, daß reinere DNA in größeren Mengen isoliert werden kann. Die DNA wurde für Restriktionsverdau, Sequenzierungen und Transfektionen verwendet.

Es wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit entsprechend transformierten Bakterien angeimpft, über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert und die Bakterien bei 7500xg und 4°C für 15 min sedimentiert. Die anschließende Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers für die Verwendung von QIAGEN-tip 100 Säulen (QIAGEN Plasmid Purification Handbook, 01/97, QIAGEN); die DNA wurde in 100 µl ddH₂O aufgenommen.

3.3.2.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen

Die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (P/C/I-Extraktion) diente der Entfernung kontaminierender Proteine aus wäßrigen Lösungen. Hierbei denaturiert Phenol Proteine.

Chloroform denaturiert ebenfalls Proteine und ist für eine bessere Trennung von wäßriger und phenolischer Phase verantwortlich. Isoamylalkohol verhindert ein Schäumen der Lösung und unterstützt ebenfalls die Phasentrennung. Denaturiertes Protein ist an der Interphase zu finden [11].

Bei der P/C/I-Extraktion wurde das gleiche Volumen P/C/I-Lösung (50% [v/v] TE-gesättigtes Phenol pH 7,5-8,0; 48% [v/v] Chloroform; 2% [v/v] Isoamylalkohol) zur wäßrigen Nukleinsäure-haltigen Lösung gegeben, kurz intensiv geschüttelt und für 5 min (DNA) bzw. 10 min (RNA) bei 15000xg zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es schloß sich in der Regel eine Präzipitation der DNA (Kap.3.3.2.5) bzw. RNA an.

Bei der Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (C/I-Extraktion) wurde anstelle der P/C/I-Lösung ein Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (96% Chloroform; 4% Isoamylalkohol) eingesetzt. Darüber hinausgehend war die Vorgehensweise identisch.

3.3.2.3 QIAquick-Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Bei dieser Methode werden ein in Agarose immobilisierte DNA-Fragmente (Kap. 3.3.1.2) in einem chaotrope Salze enthaltenden Puffer solubilisiert, der optimale Bedingungen für die Bindung der DNA an die Matrix einer QIAquick-Zentrifugationssäule bietet. Kontaminierende Agentien werden in einem Waschschrift entfernt und die DNA kann effektiv unter Niedrigsalz-Bedingungen im neutralen oder leicht basischen pH-Wert-Bereich eluiert werden (QIAquick Handbook, 09/95, QIAGEN).

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde DNA im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Präparation erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers für das QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAquick Handbook, 09/95, QIAGEN). Die DNA wurde mit 30 µl ddH₂O eluiert.

3.3.2.4 QIAquick-Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Methode der Aufreinigung von PCR-Produkten über QIAquick-Zentrifugationssäulen beruht auf dem bereits in Kap. 3.3.2.3 erwähnten Prinzip, allerdings mit der Ausnahme, daß hier bei der Bindung ein Puffer eingesetzt wird, der die effektive Bindung von PCR-Produkten von mehr als 100 bp und die Entfernung von Primern bis zu 40 nt begünstigt (QIAquick Handbook, 09/95, QIAGEN).

Die Aufreinigung wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers für das QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt (QIAquick Handbook, 09/95, QIAGEN). Eluiert wurde die DNA mit 30 µl ddH₂O, welches vor der Zentrifugation eine Minute auf der Säule belassen wurde. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in der Klonierung und Sequenzierung eingesetzt.

3.3.2.5 Präzipitation von DNA

Eine Präzipitation von DNA wurde vorgenommen, um nach einer Aufreinigung der DNA mittels P/C/I-Extraktion (Kap. 3.3.2.2) restliches Phenol und Chloroform zu entfernen, eine Entsalzung vorzunehmen oder um DNA zu konzentrieren. Die Methode beruht darauf, daß in der Gegenwart einer hohen Konzentration (0,1-0,5 M) monovalenter Kationen Ethanol eine strukturelle Veränderung der Nukleinsäuremoleküle und somit ihre Aggregation und Präzipita-

tion bewirkt [98]. Kleine organische Moleküle und Salze werden mit Hilfe von 70%igem Ethanol entfernt.

Bei der Präzipitation wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 und das 2,5fache Volumen 100%igen Ethanols zur DNA-haltigen wäßrigen Lösung gegeben und entweder für 1 h bei -80° C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde 30 min lang bei 4°C und 15000xg zentrifugiert, mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und die DNA vakuumgetrocknet.

3.3.2.6 *Hydrolyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen*

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde mit Hilfe handelsüblicher Restriktionsendonukleasen durchgeführt (Restriktionsverdau). Die bei einer Restriktion einzusetzende Enzymaktivität ist abhängig von der Temperatur, von der Menge der zu spaltenden DNA (**A**), der Anzahl der vorhandenen Restriktionsschnittstellen auf dem Plasmid (**B**), der Plasmidlänge (**C**) der Länge der Referenz-DNA (**D**; vom Hersteller angegeben), der Anzahl der Schnittstellen der gewählten Endonuklease auf der Referenz-DNA (**E**) und der Menge an Referenz-DNA (**F**); sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität [U]} = (\mathbf{A} [\mu\text{g}] \times \mathbf{B} \times \mathbf{D} [\text{bp}]) / (\mathbf{C} [\text{bp}] \times \mathbf{F} [\mu\text{g}] \times \mathbf{E})$$

Der Restriktionsverdau erfolgte in der Regel in 20-50 µl Reaktionsvolumen. Es wurde das SuRE™-Enzympuffersystem der Firma Boehringer verwendet; war dies nicht möglich wurden die vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt. Der Anteil des Enzyms am gesamten Reaktionsvolumen betrug maximal 10%; die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Anschließend wurde entweder eine P/C/I-Extraktion (Kap. 3.3.2.2) durchgeführt oder die DNA im Agarosegel aufgetrennt und einzelne DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Kap. 3.3.2.3) aufgereinigt.

3.3.2.7 *Dephosphorylierung von DNA*

Bei der Dephosphorylierung wird mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase eine freie Phosphatgruppe am 5'-Terminus linearer DNA entfernt [59]. Die Dephosphorylierung verhindert die Religation von linearisierten Vektoren, da für die Ligation von DNA eine freie 5'-Phosphatgruppe benötigt wird [11].

Für die Dephosphorylierung wurden 1-5 µg linearisierter Vektor, 2 µl 10x Alkalische Kälber-Phosphatase-Puffer (vom Hersteller der Phosphatase), und 1 U Alkalische Kälber-Phosphatase (1 U/µl) zusammengegeben, auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt, für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Phosphatase 15 min lang bei 75°C inaktiviert. Es schloß sich eine Aufreinigung (Kap. 3.3.2.2) und Präzipitation (Kap. 3.3.2.5) der DNA an.

3.3.2.8 *Ligation von DNA*

Die DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarter 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe doppelsträngiger DNA [247;337].

Für die Ligation wurden 10 ng Vektor, ein 3 bis 10facher molarer Überschuß an Fragment, 4 µl 5x Ligase-Puffer (vom Hersteller der Ligase mitgeliefert), 1 µl 20 µM Hexammincobalt-

chlorid und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) zusammengegeben, auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.3.2.9 Aufarbeitung von Ligationen für die Elektrotransformation

Eine Aufarbeitung der Ligation erfolgte, um Proteine und Salze aus dem Ligationsansatz zu entfernen, da diese eine effektive Elektrotransformation von Bakterien verhindern würden.

Nach Zugabe von 100 µl TE-Puffer zum Ligationsansatz wurde eine P/C/I-Extraktion vorgenommen (3.3.2.2) und zur Entfernung von restlichem Phenol und Chloroform das 4fache Volumen wassergesättigten Ethers zugegeben, 4 sek lang geschüttelt, zentrifugiert (1 min; 15000xg), die obere Etherphase abgezogen und restlicher Ether verdampft. Die Präzipitation der DNA erfolgte mit 1/10 Volumen 200 µg/ml Acrylamid und 1/10 Volumen 5 M Natriumchlorid als Fällungshilfe sowie dem 3fachen Volumen Ethanol für 1 h bei -80°C. Es wurde für 30 min bei 4°C und 15000xg zentrifugiert, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und das vakuumgetrocknete Sediment in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Vom Ligationsansatz wurde 1/10 in die Elektrotransformation eingesetzt (Kap. 3.2.2.2).

3.3.2.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Doppelsträngige DNA, zwei Oligonukleotide (Primer), Desoxyribonukleotide und eine DNA-Polymerase werden zusammengegeben; die zu amplifizierende DNA wird durch Erhitzen denaturiert (Denaturierungsphase), in der nachfolgenden Abkühlungsphase (Annealingphase) binden die Primer an die beiden Elternstränge und in der Elongationsphase findet die Synthese von DNA komplementär zur DNA-Matrize statt. Die Annealingtemperatur entsprach immer der Schmelztemperatur (T_m) des Oligonukleotids mit der niedrigsten T_m und wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet: $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$ [11;265].

Für die PCR wurden 8 µl 1,25 mM dNTP-Mix, 5 µl 10x Ampli Taq PCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM TRIS-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl₂; 0,01% Gelatine), 3 µl 10 pmol/µl Primer 1, 3 µl 10 pmol/µl Primer 2, 0,25 µl 5 U/µl Ampli Taq DNA-Polymerase und 20,75 µl ddH₂O zusammengegeben; der Ansatz auf 72°C erhitzt und es wurden 10 µl in ddH₂O gelöste, zu amplifizierende DNA zugegeben (Hot Start). Bei der Amplifikation von Plasmid-DNA wurden 1-10 pg, bei der Amplifikation von RT-Produkten 1/20 des Produktes (Kap. 3.3.2.12) und bei der Amplifikation von Phagen-DNA 2,5 µl eingesetzt. Die Phagen wurden vorher für 10 min zur Zerstörung der Proteinhülle bei 95°C hitzeinaktiviert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen fortgesetzt: es wurden 2 Zyklen mit 20 sek langer Denaturierung bei 96°C, 2 min langem Annealing bei T_m und 3 min langer Elongation bei 72°C durchgeführt. Es folgten 38 Zyklen bei einer Denaturierungstemperatur von 94°C und darüber hinaus gleichbleibenden Bedingungen sowie ein abschließender Elongationsschritt bei 72°C für 10 min.

3.3.2.11 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR setzt sich aus zwei Schritten zusammen; die Lage von Primern und Restriktionsschnittstellen ist in Abb. 2 dargestellt: In einer ersten PCR wird mit je einem den zu amplifizierenden Bereich flankierenden Primer und einem die Mutation tragenden Primer eine PCR durchgeführt (Primer 1+3 bzw. Primer 2+4). Dabei sind die beiden Primer, welche

die Mutation (Stern), tragen homolog zueinander (Primer 2 und 3). In einer zweiten PCR (Fusions-PCR) werden die Produkte der beiden ersten PCRs in äquimolaren Mengen zusammengegeben und bei niedriger Annealing-Temperatur die PCR-Produkte im Bereich der die Mutation tragenden Primer (Primer 2 und 3) kondensiert. In Gegenwart der beiden außenliegenden Primer (Primer 1 und 4) wird eine PCR durchgeführt, so daß eine Amplifikation zum Vollängenfragment von einem äußeren Primer bis zum nächsten erfolgen kann. Voraussetzung für die erfolgreiche Mutagenese ist eine Spaltung der in die PCR eingesetzten DNA (R2 bei PCR1 mit Primer 1 und 3; R1 bei PCR 2 mit Primer 2 und 4; Kap. 3.3.2.6), um eine Amplifikation nicht mutierter DNA zu vermeiden [114]. In der Mutagenese-PCR wurde die Pfu-Polymerase eingesetzt, die eine geringere Fehlerrate als die sonst verwendete Ampli Taq DNA-Polymerase aufweist [105;192].

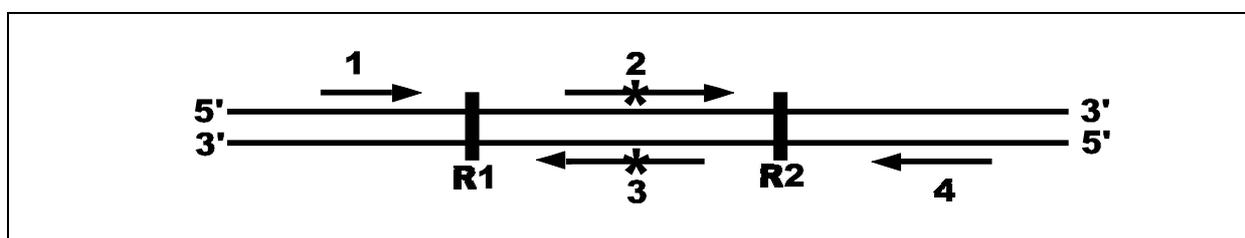


Abb. 2: Mutagenese PCR: Schematische Darstellung der Lage von Primern und Restriktionsschnittstellen

Dargestellt ist der DNA-Strang (mit 5' und 3' markiert) mit der Lage der für die Mutagenese-PCR notwendigen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen (R1 und R2) sowie der Lage der Primer (Pfeile) und ihrer Orientierung (Pfeilspitze markiert 3' Ende des Primers); die Position der Mutation ist durch einen Stern markiert.

Für die PCR wurde die Matrizen-DNA einmal 5' von der Mutation gespalten (R1) und in die PCR mit dem Mutagenese-Primer 2 und dem 3'-lokalisierten Primer 4 eingesetzt und einmal 3' von der Mutation (R2) für die PCR mit Mutagenese-Primer 3 und 5'-flankierendem Primer 1. Das Produkt wurde mittels Agarosegel (Kap. 3.3.1.2) und QIAquick-Säule (Kap. 3.3.2.4) aufgereinigt. Für die PCR wurden 8 µl 1,25 mM dNTP-Mix, 5 µl 10x Pfu-DNA-Polymerase-Puffer, 3 µl 10 pmol/µl Primer A (5' bzw. 3' flankierender Primer), 3 µl 10 pmol/µl Primer B (mit Mutation), 0,5 µl 2,5 U/µl Pfu-DNA-Polymerase und 20,5 µl ddH₂O zusammengegeben. Der Ansatz wurde auf 72°C erhitzt und es wurden 10 pg linearisierte in 10 µl ddH₂O gelöste DNA zugegeben (Hot Start). Es schlossen sich zwei Zyklen mit 30 sek langer Denaturierung bei 96°C, 2 min langem Annealing bei T_m und 2 min langer Elongation bei 72°C an, gefolgt von 28 Zyklen mit einer Denaturierungstemperatur von 94°C und einer Elongationsdauer von 3 min bei darüber hinaus gleichbleibenden Bedingungen. Abschließend wurde für 10 min ein Elongationsschritt bei 72°C durchgeführt.

Für die Fusions-PCR wurden 8 µl 1,25 mM dNTP-Mix, 5 µl 10x Pfu-DNA-Polymerase-Puffer, 3 µl 10 pmol/µl Primer 1 (5' flankierender Primer), 3 µl 10 pmol/µl Primer 2 (3' flankierender Primer), 0,5 µl 2,5 U/µl Pfu-DNA-Polymerase und 20,5 µl ddH₂O zusammengegeben. Der Ansatz wurde auf 72° erhitzt und je ca. 10-30 ng PCR-Produkt aus den beiden PCRs gelöst in 10 µl ddH₂O zugegeben; die beiden Amplifikate wurden in äquimolaren Mengen ein-

gesetzt. Es schlossen sich fünf Zyklen mit 30 sek langer Denaturierung bei 94°C, 2 min langem Annealing bei 35°C und 3 min langer Elongation bei 72°C an, gefolgt von 25 Zyklen mit einer Annealingtemperatur bei T_m und einer Elongationsdauer von 3 min bei darüber hinaus gleichbleibenden Bedingungen. Ein abschließender Elongationsschritt wurde bei 72°C für 10 min durchgeführt.

3.3.2.12 RT-PCR

Die RT-PCR setzt sich aus zwei Reaktionsschritten zusammen: In der reversen Transkription unter Verwendung einer reversen Transkriptase, die vorrangig als RNA-abhängige DNA-Polymerase wirkt, wird komplementäre DNA (cDNA) generiert; die cDNA wird anschließend in einer PCR amplifiziert [11].

In der Gesamt-RNA-Präparation enthaltene genomische DNA wurde mit Hilfe eines DNase-Verdau entfernt. Dabei wurden 5 µg RNA, 1 µl 10x DNase I-Puffer, 0,5 µl 40 U/µl RNasin, 1 µl 10 U/µl DNase I zusammengegeben und auf 10 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt; es wurde 15 min lang bei 37°C sowie zur Hitzeinaktivierung der DNase 10 min lang bei 65°C inkubiert, der Ansatz auf Eis abgekühlt, auf 100 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt und die DNA mit 100 µl P/C/I-Lösung extrahiert (siehe Kap. 3.3.2.2), wobei die phenolische Phase nochmals mit 100 µl DEPC-ddH₂O rückextrahiert und die aus dieser Extraktion resultierende wäßrige Phase mit der wäßrigen Phase der ersten Extraktion vereinigt wurde. Die RNA wurde präzipitiert (Kap. 3.3.2.5), das RNA-Sediment getrocknet und die RNA anschließend in 10 µl DEPC-ddH₂O suspendiert. Die Qualität der RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung von 1 µl RNA im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel überprüft (Kap. 3.3.3.3).

Die RT-Reaktion wurde alternativ mit einem Oligo d(T)-Primer oder einem klonspezifischen Primer durchgeführt. Es wurden 1-5 µg RNA, 1 µl 500 ng/µl Oligo d(T)- bzw. 0,7-1 µg 3'-Primer zusammengegeben. Nachdem mit DEPC-ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt worden war, wurde der Ansatz 10 min lang bei 70°C zum Auflösen von Sekundärstrukturen inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5x RT-Puffer (vom Hersteller der Polymerase mitgeliefert), 2 µl 0,1 M DTT, 2 µl 1:10 verdünntes RNasin (40 U/µl) und 1 µl 10 mM dNTP zugegeben. Nach 2minütiger Inkubation bei 42°C wurde, 1 µl SuperScript II (200 U/µl) zugefügt, die Probe 50 min bei 42°C und anschließend 15 min bei 70°C inkubiert.

Mit diesen RT-Produkten als Matrize wurde eine PCR-Reaktion wie in Kap. 3.3.2.10 beschrieben durchgeführt. In die PCR wurde 1/20 des RT-Produktes eingesetzt und als Kontrolle auf DNA-Kontamination eine RT-Probe mitgeführt, die keine Reverse Transkriptase erhalten hatte.

3.3.2.13 Sequenzierung von DNA

Die hier verwendete Methode beruht auf der Didesoxy-Methode nach Sanger [268;269]. Es wird ein „Taq-Cycle-Sequencing“ durchgeführt, bei dem an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelte Didesoxynukleotide für einen Abbruch der Elongation sorgen. Das aufgereinigte Produkt wird elektrophoretisch im Acrylamidgel aufgetrennt. Die Reihenfolge, in der die Fluorochrom-gekoppelten PCR-Produkte das Gel passieren, gibt die Nukleotidsequenz an [276].

Es wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNA bzw. 30-180 ng PCR-Produkt (5-11 µl des aufgereinigten PCR-Produktes; Kap. 3.3.2.4), 10 pmol Oligonukleotid und 8 µl Dye Terminator Mix

zusammengegeben; das Reaktionsvolumen wurde auf 20 μ l mit ddH₂O aufgefüllt. Beim „Taq Cycle Sequencing“ wurden 25 Zyklen mit folgenden Bedingungen durchlaufen: 96°C für 10 sek (Denaturierung), 50°C für 5 sek (teilweise auch bei 56°C; Annealing) und 60°C für 4 min (Elongation). Zum PCR-Produkt wurden 2 μ l 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5.2 und 50 μ l 95% Ethanol gegeben; es wurde 10 min lang auf Eis inkubiert, zentrifugiert (20 min; 15000xg), das Sediment mit 250 μ l 70%igem Ethanol gewaschen, 3 min vakuumgetrocknet, in 3 μ l Sequenzierladelösung (5 Teile Formamid; 1 Teil 25 mM EDTA, pH 8,0; 50 mg/ml Dextran Blau) aufgenommen, für 2 min bei 90°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und das unten angegebene Sequenziergel beladen.

Das Sequenziergel wurde nach Angaben des Herstellers präpariert: die Sequenzierglasplatten (34 cm) wurden vor dem Zusammenbau mit ALKONOX und entmineralisiertem Wasser gereinigt, mit 90%igem Isopropanol nachbehandelt und getrocknet. Für die Gelmatrix wurden 30 g Harnstoff bei 37°C in 23,5 ml ddH₂O gelöst, 7,5 ml rotiphorese Gel 29/1 (40%) und 6 ml 10x TBE (890 mM TRIS-Base; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8,0) zugeben, die Flüssigkeit filtriert (0,22 μ m Porengröße), 350 μ l 10% (w/v) APS und 15 μ l TEMED zugegeben. Die Gelmatrix polymerisierte 1-2 h bei RT aus. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die Proben wurden während eines 15stündigen Sequenzierlaufs bei 27 Watt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte am Apple-Computer mit ABI-Software.

3.3.3 Präparation und Analyse von eukaryontischer RNA

3.3.3.1 Allgemeines

Zur Vermeidung des RNA-Abbaus durch RNasen wurde mit DEPC-ddH₂O gearbeitet. Alle Puffer wurden, soweit sie kein TRIS enthielten, ebenfalls mit DEPC behandelt oder mit DEPC-ddH₂O hergestellt.

3.3.3.2 Gesamt-RNA-Präparation

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden drei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Die Wahl der Methode war abhängig von der für die Präparation zur Verfügung stehenden Menge an eukaryontischen Zellen.

3.3.3.2.1 Gesamt-RNA-Präparation mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

Diese Präparationsmethode wurde eingesetzt, wenn mehr als 5×10^7 Zellen zur Verfügung standen. Die Zellen wurden zunächst mit einer Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Lösung lysiert und Proteine denaturiert [65;78;306]. Die Aufreinigung der RNA über einen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten beruht darauf, daß RNA eine höhere Dichte aufweist als DNA und Proteine; sie kann somit im Gradienten von anderen zellulären Makromolekülen abgetrennt werden [65;119].

Suspensionszellen wurden in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in GCN-Lösung (4 M GCN; 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5% [w/v] N-Lauroylsarcosin, 0,1 M β -Mercaptoethanol)

aufgenommen und adhärenente Zellen durch Zugabe der Guanidiniumlösung lysiert und von der Gewebekulturschale abgelöst. Je 5 ml Lysat wurden zur Scherung der DNA bei 2400 rpm für 20-25 sek mit dem Ultra Turrax-Gerät behandelt und auf Eis abgekühlt. In Polyallomer Zentrifugenröhrchen wurden 2 ml 5,7 M CsCl-Lösung (5,7 M CsCl; 20 mM TRIS-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA pH 8,0; die Lösung entspricht der 100%igen CsCl-Lösung), 1,5 ml 40% CsCl-Lösung, 1,5 ml 30% CsCl-Lösung, 1,5 ml 20% CsCl-Lösung (Verdünnungen der 100%igen CsCl-Lösung in 20 mM TRIS-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA pH 8,0) und 5 ml Zellhomogenat übereinander geschichtet und 18 h lang bei 36000 rpm im SW 40 „swing-out“-Rotor bei 18°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl DEPC-ddH₂O 5 min lang bei 37°C gelöst, und eine P/C/I-Extraktion gefolgt von einer C/I-Extraktion vorgenommen (Kap. 3.3.2.2). Zur wäßrigen Phase wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,7 und das 2,5fache Volumen Ethanol gegeben, es wurde für 2 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert, zentrifugiert (30 min; 4°C; 15000xg), das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-ddH₂O aufgenommen.

3.3.3.2.2 Gesamt-RNA-Präparation unter Anwendung der „Single Step“-Methode

Diese Präparation wurde eingesetzt, wenn zwischen 1×10^7 und 5×10^7 Zellen zur Verfügung standen. Die Methode beruht darauf, daß RNA in 4 M GCN Lösung bei pH 4,0 in Gegenwart einer organischen Phenol/Chloroform-Phase wasserlöslich bleibt, während Proteine und kleinere DNA-Fragmente in die organische Phase übergehen und größere DNA-Fragmente und manche Proteine in der Interphase verbleiben. Mit der Methode läßt sich schnell aus einer größeren Anzahl von Proben Gesamt-RNA in ausreichender Reinheit für die Northern-Analyse gewinnen [66].

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, in Lösung D (4 M Guanidinium-Isocyanat; 0,025 M Natriumcitrat; 0,5% [w/v] N-Lauroylsarkosin; 0,1 M β -Mercaptoethanol; pH 7,0) aufgenommen (1×10^7 Zellen/ml) und die genomische DNA durch 10maliges Auf- und Abziehen der Lösung durch eine 0,9x40 mm Kanüle geschert. Zu 4 ml Zell-Lysat wurden nacheinander 400 µl 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0), 4 ml wassergesättigtes Phenol und 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol gegeben; nach Zugabe der ersten beiden Lösungen wurde durch Invertieren gemischt und nach Zugabe der letzten 10 sek intensiv geschüttelt. Es wurde 15 min lang auf Eis inkubiert, im Festwinkelrotor zentrifugiert (15 min; 4°C; 9700xg), zur oberen wäßrigen Phase das gleiche Volumen Isopropanol gegeben und die RNA eine Stunde lang bei -20°C präzipitiert, im "swing-out"-Rotor zentrifugiert (30 min; 4°C; 15000xg) und das Sediment in 400 µl Lösung D gelöst. Nach Zugabe von 40 µl 2 M Natriumacetat-Lösung pH 4,0 und 440 µl Isopropanol wurde 2-16 h lang bei -20°C inkubiert, zentrifugiert (20 min; 15000xg; 4°C), das Sediment 10-15 min lang bei RT mit 200 µl 70%igem Ethanol inkubiert und 15 min lang bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde getrocknet und in 50-100 µl DEPC-ddH₂O aufgenommen.

3.3.3.2.3 Gesamt-RNA-Präparation mit Hilfe des RNeasy Mini Kits

Diese Methode wurde angewendet, wenn nicht mehr als 1×10^7 Zellen für die RNA-Präparation zur Verfügung standen. Die Methode basiert auf einer Lyse der Zellen in GCN- und β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer; das Lysat wird durch Zentrifugation durch eine biopolymere

Matrix homogenisiert, die RNA unter Hochsalz-Bedingungen an eine Membran gebunden, Kontaminationen mit Hilfe eines GCN-haltigen Waschpuffer entfernt und die RNA mit DEPC-ddH₂O eluiert (RNeasy Mini Handbook, 1996, QIAGEN).

Die Zellen wurden bei 300xg für 5 min sedimentiert, in 600 µl RLT-Lysis-Puffer suspendiert, das Lysat auf eine QIAshredder-Säule gegeben, für 1 min bei 15000xg zentrifugiert und die weitere Präparation exakt nach den Angaben des Herstellers für die Verwendung von RNeasy Mini in der Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen durchgeführt (RNeasy Mini Handbook, 1996, QIAGEN). Die RNA wurde mit 30 µl DEPC-ddH₂O eluiert.

3.3.3.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Um RNAs entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch auftrennen zu können, müssen durch Zugabe von denaturierenden Agentien (z.B. Formaldehyd) Sekundärstrukturen, die das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld beeinflussen, aufgelöst werden [182].

Für die Gelmatrix wurden 1-1,5% (w/v) Agarose in 1x Laufpuffer (20 mM MOPS pH 7,0; 8 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt, Ethidiumbromid und Formaldehyd in einer Endkonzentration von 0,15 µg/ml bzw. 0,22 M zugegeben und das Ganze wurde in eine Flachbett-Gelelektrophoreseapparatur gegeben. Als Elektrophoresepuffer diente 1x Laufpuffer. 1-15 µg Gesamt-RNA wurden in DEPC-ddH₂O suspendiert; es wurde 1/5 Volumen 5x RNA-Ladelösung (50% [v/v] deionisiertes Formamid; 20% [v/v] Glycerol; 2,2 M Formaldehyd; 10 mM EDTA; 0,2% [w/v] Bromphenolblau; 40% [v/v] 10x MOPS-Puffer [200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7,0]) zugegeben, 5 min lang bei 56°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und die Probe im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größenstandards wurden je nach Herstellerangaben z.T. bei 65°C für 10 min denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 3-5 V/cm. Die Banden wurden auf dem UV-Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und das Bandenmuster dokumentiert.

3.3.3.4 Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran (Northern Blot)

Bei dieser Methode wird im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennte RNA (Kap. 3.3.3.3) unter Hochsalz-Bedingungen, welche die Bindung der RNA an die Membran fördern, durch Kapillarkräfte auf eine ungeladene Nylonmembran transferiert [4;11].

Das Formaldehyd-Agarosegel (Kap. 3.3.3.3) wurde zweimal 15 min lang in 20x SSC auf dem Kippschüttler gewaschen und der Kapillarblot nach der „Whatman 3MM filter paper wick“-Methode [11] aufgebaut; dabei wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf den Blot gelegt. Als Transferpuffer wurde 20x SSC verwendet; die RNA wurde auf Hybond N-Nylonmembran transferiert (24 h). Anschließend wurde die Membran in 6x SSC gewaschen, getrocknet und anschließend die RNA im UV-Stratalinker bei automatischer Quervernetzung kovalent an die Membran gebunden; dabei wurde die Membran von beiden Seiten bestrahlt. Die Lagerung der Membran erfolgte bei RT.

3.3.4 Northern- und Plaque-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Sonden

Digoxigenin (DIG) ist ein Steroid-Hapten, welches aus Digitalis-Pflanzen isoliert werden kann. Die DIG-Markierung von Sonden für die Hybridisierung basiert in der Regel auf dem enzymatischen Einbau von DIG-markiertem UTP, dUTP oder ddUTP in die Sonde. Nach der Hybridisierung wird die DIG-markierte Sonde durch einen gegen DIG gerichteten Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper detektiert und mittels enzymkatalysierter Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht [11].

3.3.4.1 Herstellung von Digoxigenin markierten cRNA-Sonden

Bei der Herstellung von cRNA-Sonden wurden DIG-markierte „run off“-Transkripte, homolog zum nicht kodierenden Strang der DNA, unter Einsatz von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen hergestellt. Die verwendeten Plasmide trugen 3' von der zu transkribierenden cDNA einen T7-, T3- oder SP6-Promotor und wurden 5' vom cDNA-Fragment oder im Fragment mit einer Restriktionsendonuklease, welche keine 3'-überhängenden Enden hervorrief, linearisiert. Zur Herstellung der Sonde wurden 1-2 µg Plasmid-DNA linearisiert (Kap. 3.3.2.6). Die DNA wurde mittels P/C/I-Extraktion (Kap. 3.3.2.2) aufgereinigt, präzipitiert (Kap. 3.3.2.5) und in 14 µl DEPC-ddH₂O gelöst. Es wurden 1 µl RNasin, 2 µl 10x DIG RNA Labeling Mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer (vom Polymerasehersteller mitgeliefert) sowie 2 µl 20 U/µl RNA-Polymerase zugegeben. Das Ganze wurde 2 h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl 10 U/µl RNase freie DNase I zugegeben; es wurde nochmals 15 min lang bei 37°C inkubiert und die DNase-Reaktion mit 2 µl 200 mM EDTA pH 8,0 abgestoppt. Die Sonde wurde mit 2,4 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl 100%igem Ethanol für 2 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C präzipitiert, zentrifugiert (15 min; 15000xg; 4°C), das Sediment mit 50 µl 70%igem kaltem Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und in 100 µl DEPC-ddH₂O für 20 min bei 37°C gelöst.

Die Qualität der Sonde wurde überprüft, indem zum einen 5 µl der Sonde im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden und zum anderen ein Vergleich der Sonde mit einer RNA-Sonde definierter Konzentrationen erfolgte. Für die Standardreihe wurde eine 200 µg/µl konzentrierte cRNA-Sonde in RNA-Dilution-Buffer (50% [v/v] DEPC-ddH₂O; 30% [v/v] 20x SSC; 20% [v/v] Formaldehyd) 1/20 bis 1/20000 verdünnt; von der neu hergestellten Sonde wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe erstellt. Je 1 µl der Standardreihe bzw. der Sondenverdünnung wurde auf Hybond N-Membran getropft, getrocknet, von beiden Seiten im UV-Stratalinker (Automatik) bestrahlt, entwickelt (Kap. 3.3.4.5) und die Signalintensitäten verglichen.

Für die Herstellung einer für Nociceptin/OFQ spezifischen cRNA-Sonde wurde das Plasmid pBS Klon U mit der Restriktionsendonuklease Eco RI gespalten und eine RT-Reaktion mit einer T7-RNA-Polymerase durchgeführt; für die Herstellung der ORL1-Rezeptor-spezifischen Sonde wurde das pHMC1.2/pBS-Plasmid mit HindIII geschnitten und die reverse Transkription mit Hilfe der T3-RNA-Polymerase durchgeführt. Die hGBP-1-spezifische Sonde wurde durch Schneiden des pBS 1389-Plasmids mit NcoI und eine RT-Reaktion mit T3-RNA-Polymerase hergestellt; für die Synthese der hGBP-2-spezifischen Sonde wurde das Plasmid pBS 1989 mit EcoNI geschnitten und die RT-Reaktion ebenfalls mit einer T3-RNA-Poly-

merase durchgeführt. Die hGBP-3-spezifische Sonde wurde durch reverse Transkription (T7-RNA-Polymerase) des mit Sca I geschnittenen pBS 2107-Plasmids erhalten.

3.3.4.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden

Die Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin wurde mit Hilfe des DIG-Oligonukleotid Tailing Kits durchgeführt. Hierbei werden enzymatisch nicht markierte und DIG-11-dUTP markierte Nukleotide an den 3'-Hydroxyl-Terminus des Oligonukleotids mit Hilfe der Terminalen Transferase angehängt [86].

Es wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 4 µl 25 mM CoCl₂-Lösung, 100 pmol Oligonukleotid, 1 µl 1 mM DIG-dUTP in ddH₂O, 1 µl 10 mM dATP-Lösung in TRIS-Puffer und 1 µl 50 U/µl Terminale Transferase zusammengegeben. Nachdem mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt worden war, wurde der Ansatz 25 min lang bei 37°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Zur Präzipitation und Aufreinigung der Sonde wurden 2 µl Glycogen/EDTA-Lösung, 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl Ethanol in den Ansatz gegeben, und es wurde 1 h lang bei -80°C präzipitiert, 30 min lang bei 4°C und 15000xg zentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, das Sediment getrocknet und die DNA in 40 µl ddH₂O suspendiert.

Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte mit Hilfe eines Oligonukleotids definierter Konzentration (2,5 pmol/µl) nach der in Kap. 3.3.4.1 beschriebenen Methode; als Lösungsmittel für die Verdünnungsreihe diente ddH₂O.

3.3.4.3 Northern-Hybridisierung

Bei der Northern-Hybridisierung werden RNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und bestimmte mRNAs mit Hilfe von genspezifischen Sonden nachgewiesen sowie ihre Größe bestimmt [155].

Northern Blots (Kap. 3.3.3.4) wurden 30 min lang in High-SDS-Hybridisierungspuffer (7% [w/v] SDS; 50% [v/v] deionisiertes Formamid; 5x SSC; 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0; 2% [w/v] Blocking Reagenz; 0,1% [w/v] N-Lauroylsarkosin) bei 68°C und kontinuierlicher Rotation prähybridisiert; die DIG-markierte cRNA-Sonde (Kap. 3.3.4.1) wurde in 20-50 µl DEPC-ddH₂O 10 min lang gekocht, auf Eis abgekühlt und in die Prähybridisierungslösung gegeben (Endkonzentration von 30 ng/ml). Die Hybridisierung erfolgt bei 68°C über Nacht. Die Membran wurde im folgenden zweimal 15-20 min lang mit Puffer 1 (2x SSC; 0,1% [w/v] SDS) bei RT und zweimal 20-30 min lang in Puffer 2 (0,1x SSC; 0,1% [w/v] SDS) bei 68°C gewaschen. Anschließend wurde mit der Detektion fortgefahren (Kap. 3.3.4.5).

Zur Nachhybridisierung mit einer anderen Sonde wurde der Northern Blot nach der Entwicklung zweimal in 2x SSC geschwenkt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4.4 Plaquehybridisierung

Die Plaquehybridisierung mit DIG-markiertem Oligonukleotid wurde im Standardpuffer mit poly (A) (5x SSC, 1% [w/v] Blocking-Reagenz, 0,1% [w/v] N-Lauroylsarkosin, 0,02% [w/v] SDS, 0,1 mg/ml poly[A]) vorgenommen. Es wurde für 1 h bei 48°C unter ständiger Rotation prähybridisiert (20 ml/100 cm²). Die Hybridisierung fand bei einer Sondenkonzentration von

0,5 pmol/ml, einem Hybridisierungsvolumen von 2,5 ml pro 100 cm² Filterfläche und 48°C über Nacht statt. Der Filter wurde anschließend zweimal 15 min lang in 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 48°C gewaschen und mittels Chemiluminiszenz entwickelt (Kap. 3.3.4.5).

3.3.4.5 Immunologischer Nachweis mittels Chemiluminiszenz

Grundlage des Nachweises mittels Chemiluminiszenz ist eine enzymatische Reaktion in der das Substrat CSPD[®] dephosphoryliert wird, wodurch ein metastabiles Phenolat-Anion entsteht, welches unter Emission von Lichtquanten zerfällt [24;270].

Für die Entwicklung wurde die Membran kurz mit DIG-Waschpuffer (0,3% [w/v] Tween 20; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5) gewaschen, 30 min lang bei RT auf dem Schüttler mit 1x Blocking Reagenz (1% [w/v] Blocking-Reagenz; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5) und für weitere 30 min mit 1:10000 in 1x Blocking Reagenz verdünntem alkalische Phosphatase-konjugiertem anti-DIG-Antikörper (vorher 5 min lang bei 15000xg zentrifugiert) inkubiert. Es wurde zweimal 15 min lang mit DIG-Waschpuffer gewaschen, die Membran 2 min lang in DIG-Detektionspuffer (100 mM TRIS-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl) äquilibriert, für 5 min bei RT in 1:100 in Detektionspuffer verdünntem CSPD inkubiert, die Membran in Polypropylen-Beutel eingeschweißt und 10 min lang bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die Membran gegenüber einem Röntgenfilm exponiert.

3.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Das von Köhler und Milstein beschriebene Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper basiert auf der Fusion einer Antikörper-produzierenden begrenzt teilungsfähigen B-Zelle, die über das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) verfügt, mit einer sich kontinuierlich teilenden HGPRT-defizienten Myelomzelle; die dabei entstehende Hybridomazelle ist unbegrenzt teilungsfähig, produziert einen spezifischen Antikörper und exprimiert die HGPRT. Die HGPRT befähigt die Zelle, bei Blockierung der *de novo* Purinsynthese durch Aminopterin, in Gegenwart von Hypoxanthin und Thymidin einen alternativen Syntheseweg zu nutzen und zu überleben; das Prinzip ist Grundlage des Selektionsverfahrens auf entstandene Hybridomazellen nach der Klonierung [11;132;169].

3.4.1.1 Immunisierung

Zur Herstellung der Immunisierungslösung wurden 500 µl PBS, in denen eine entsprechende Menge MBP-IFP35-Fusionsprotein suspendiert war und 500 µl inkomplettes Freund'sches Adjuvans (IFA) zusammengegeben. Mit Hilfe von zwei Spritzen und einem Dreiwegehahn wurde eine Emulsion hergestellt; ein Tropfen der Immunisierungslösung durfte nicht mehr verlaufen, wenn man ihn auf eine Wasseroberfläche tropfte. Einer weiblichen ca. 7 Wochen alten Balb/c-Maus wurden viermal 500 µl der Immunisierungslösung intraperitoneal mit einer 0,55x25 mm Kanüle appliziert. Beim ersten Mal wurden 30 µg Antigen und 2,5 Wochen, 5,5 Wochen und 8 Wochen nach der ersten Immunisierung jeweils 40 µg Antigen injiziert. Sieben Tage nach der letzten Injektion wurden der Maus wenige Tropfen Blut aus dem Augen-

winkel entnommen, 1 h lang bei RT inkubiert und zentrifugiert (10 min; 1400xg; 4°C). Der Überstand wurde kurz bei 15000xg zentrifugiert und das erhaltene Serum im ELISA („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“) auf seinen Antikörpertiter überprüft. Die Zellfusion (Kap. 3.4.1.2) wurde neun Tage nach der letzten Injektion von Immunisierungslösung durchgeführt.

3.4.1.2 Zellfusion

Die getötete Maus wurde mit 70%igem techn. Ethanol desinfiziert und die Milz soweit möglich ohne Fettgewebe entnommen. Die Milz wurde mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Sieb in eine kleine Petrischale mit 5 ml kaltem DMEM-Medium gepreßt. Milzzellen und Medium wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min lang zum Absetzen von Gewebeteilen auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, auf 50 ml mit DMEM-Medium aufgefüllt und zentrifugiert (10 min; 300xg). Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellsediment vorsichtig in 20 ml DMEM-Medium resuspendiert und die Anzahl lebender Milzzellen (Kap. 3.1.3) bestimmt; sie betrug 35×10^6 Zellen. Die gleiche Anzahl (35×10^6 Zellen) X63Ag8.653-Myelomzellen, die 1-2 Wochen vor Gebrauch frisch in Kultur genommen worden waren, wurde zentrifugiert (10 min; 300xg), in 20 ml DMEM-Medium suspendiert, mit den Milzzellen in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereint und 10 min lang bei 130xg und RT zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß mit dem Zellsediment wurde in ein Becherglas mit 37°C warmem Wasser gehalten und das Zellsediment durch Klopfen gegen den Becherglasrand gelockert. Innerhalb von einer Minute wurden 560 µl PEG 1500 (800 µl/50 Mio. Milzzellen) tropfenweise unter ständigem Klopfen des Reaktionsgefäßes an die Becherglaswand zu den Zellen gegeben (1. Minute der Fusion). Es wurde 1 min lang vorsichtig resuspendiert (2. Minute der Fusion). Anschließend wurden 10 ml auf 37°C temperiertes DMEM-Medium zugegeben; dabei wurde in Minute 3 und 4 der Fusion je 1 ml zugegeben, in der 5. und 6. Minute je 4 ml. Das Reaktionsgefäß wurde auf 22 ml mit warmem DMEM-Medium aufgefüllt und zum Herauswaschen des PEG's 10 min lang bei 130xg und RT zentrifugiert. Das Zellsediment wurde 5-10 min lang bei RT inkubiert und in 88 ml HAT-Medium (DMEM-Medium mit 100 µM Hypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) mit 100 U/ml IL-6 und 20% (v/v) FCS aufgenommen. Abschließend wurden in die Vertiefungen einer 96-„well“-Platte für Suspensionszellen je 2 Tropfen Zellsuspension aus einer 10 ml Pipette gegeben; die äußeren Vertiefungen wurden dabei frei gelassen. Die Zellen wurden bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert und nach 9 Tagen mit 2 Tropfen HAT-Medium mit IL-6 und 20% FCS aufgefüllt. Zwölf Tage nach der Fusion war das Wachstum von Zellklonen zu beobachten und die Untersuchungs- und Klonierungsphase begann.

3.4.1.3 Untersuchung auf antikörperproduzierende Hybridomazellklone

Die Untersuchung von Hybridomazellen auf Sezernierung von IFP35-spezifischen Antikörpern erfolgte zuerst im ELISA und dann im Western Blot.

Der ELISA wurde entsprechend der Anleitung in Kap. 3.4.5 durchgeführt; dabei wurde zur Bestimmung der IFP35-Spezifität des Antikörpers sowohl die Reaktion der Hybridomazellkulturüberstände mit MBP-IFP35-Fusionsprotein als auch die Reaktion mit MBP-Protein

untersucht. Als Erstantikörper wurden im ELISA 50 µl Zellkulturüberstand eingesetzt. Für die Untersuchung der Zellkulturüberstände im Western Blot wurden 5×10^6 IFN- γ -induzierte HeLaS3-Zellen in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen, im SDS-PAGE mit präparativem Kamm aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert, die Membran in Streifen geschnitten und eine Immundetektion (Kap. 3.4.4.2) mit Hybridomazellkulturüberstand als Erstantikörper durchgeführt.

Klongruppen, die im ELISA und Western Blot vorrangig mit MBP-IFP35-Fusionsprotein reagierten, wurden auf eine 24-, „well“-Platte überführt. Als Medium diente HAT-Medium mit 100 U/ml IL-6 und 20% FCS. Nach 6 Tagen wurde ein Teil der Zellen eines jeden Vorklones kryokonserviert (Kap. 3.1.2), restliche Zellen auf eine 6-, „well“-Platte überführt und eine Klonierung vorgenommen.

3.4.1.4 Klonierung

Um einen reinen Hybridomazellklon zu erhalten, wurde ca. vier Wochen nach der Fusion kloniert. Die Zellen wurden in einer theoretischen Zelldichte von 5 Zellen, 1 Zelle bzw. 0,5 Zellen pro Vertiefung auf einer 96-, „well“-Platte in HT-Medium (DMEM-Medium mit Hypoxanthin, Thymidin, Penicillin und Streptomycin) mit IL-6 und 20% FCS ausplattiert. Es wurden jeweils zwei Klonierungsplatten angelegt.

Positive Klone wurden mittels ELISA und Western Blot ermittelt (siehe Kap.3.4.5 und 3.4.4) und nochmals subkloniert. Abschließend wurden drei Einzelklone kryokonserviert (Kap. 3.1.2).

3.4.1.5 Gewinnung von Zellkulturüberstand des monoklonalen Antikörpers

Mit der Gewinnung von Zellkulturüberstand von Hybridomazellen können Antikörper in größeren Mengen in geringer Konzentration und Reinheit gewonnen werden; theoretisch sind Antikörperkonzentrationen von 1 mg/ml mit einem Anteil von 5% spezifischem Antikörper in 10% FCS-haltigem Medium möglich [132].

Hybridomazellen wurden in HT-Medium mit 10% (v/v) FCS kultiviert, bis die Zellen begannen abzusterben. Die Zellen wurden 10 min lang bei 200xg zentrifugiert, der Überstand mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei -20°C gelagert. Der Überstand wurde anschließend entweder direkt in Versuchen eingesetzt oder über Protein G aufgereinigt und konzentriert (Kap. 3.4.1.6).

3.4.1.6 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mittels Protein G-Säule

Die Methode basiert darauf, daß Antikörper mit ihrem Fc-Teil unter neutralen oder basischen Bedingungen an den Protein G-Bestandteil einer Protein G-Sepharose-Gelmatrix binden, kontaminierende Komponenten durch Waschen entfernt und die Antikörper mit Hilfe eines Elutionspuffer mit saurem pH-Wert-Bereich wieder von der Matrix eluiert werden können.

Für die Aufreinigung wurde eine Säule mit ca. 2 ml Protein G-Sepharose-4 Fast Flow Gelmatrix in 20%igem Ethanol gegossen, an das „Fast Performance Liquid Chromatography“-System (FPLC-System) angeschlossen und mit 10 Säulenvolumina Puffer A (20 mM Natriumphosphat pH 7,0) äquilibriert; 450 ml Hybridomazellkulturüberstand wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0,22 µm) und der pH-Wert kontrolliert (> pH 7,0). Es wurden jeweils 90 ml

Zellkulturüberstand über die Säule gegeben (1 ml/min); anschließend wurde solange mit Puffer A gewaschen, bis nahezu kein Protein mehr im Durchfluß nachzuweisen war. Eluiert wurde mit Puffer B (100 mM Glycin pH 2,7; 1 ml/min); dabei wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und die Hauptfraktionen sofort mit 1 M TRIS pH 8,5 neutralisiert. Zur Reinigung der Säulenmatrix wurde dreimal abwechselnd mit je 5 Säulenvolumina Puffer B und A gewaschen (1,3 ml/min) und abschließend mit 10 Säulenvolumina 20%igem Ethanol äquilibriert (1 ml/min).

Die Hauptfraktionen wurden vereint und mittels Kollodiumhülse und Vakuumpumpe bei 4°C ankonzentriert und umgepuffert: Die Kollodiumhülse wurde mehrfach mit ddH₂O gespült, nach Herstelleranleitung in die dazu gehörende Apparatur eingebaut und an Vakuum angeschlossen. Das Eluat wurde mittels Kollodiumhülse unter Vakuum auf 4 ml eingeeengt. Es wurde zweimal das halbe Hülsenvolumen PBS zugegeben und ebenfalls auf 4 ml eingeeengt. Über Nacht wurde die Apparatur mit PBS gefüllt und ohne Vakuum dialysiert. Am folgenden Tag wurden erneut unter Vakuum zwei halbe Hülsenvolumen zugegeben und auf ca. 4 ml eingeeengt und über Nacht dialysiert. Abschließend wurde die Hülse mit PBS vollständig gefüllt und die Flüssigkeit auf ein Volumen von 4 ml eingeeengt. Die Antikörperlösung wurde anschließend 10 min lang bei 800xg zentrifugiert, der Überstand mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei -20°C gelagert.

3.4.1.7 Ascitesproduktion

Die Ascites-Produktion stellt eine Möglichkeit dar, monoklonale Antikörper in hoher Konzentration zu erhalten; theoretisch sind Antikörperkonzentrationen von 1-10 mg/ml mit einem Anteil von 90% spezifischem Antikörper möglich [132].

Für die Ascitesproduktion wurden 4 weiblichen 10-12 Wochen alten Balb/c-Mäusen je 300-400 µl IFA intraperitoneal appliziert. Drei Tage später wurden 8×10^6 Hybridomazellen aus der Zellkultur einmal mit PBS gewaschen, in 1,2 ml PBS aufgenommen und je 300 µl jeder Maus i.p. appliziert. Ca. 21 Tage nach Beginn des Versuches wurde eine leichte Ascitesbildung beobachtet. Innerhalb der folgenden 5 Tage wurden insgesamt 7 ml Ascites mit einer 1,10x50 mm Kanüle abgenommen. Die Ascitesflüssigkeit wurde für 1 h bei RT stehen gelassen, über Nacht bei 4°C gelagert, zentrifugiert (10 min; 800xg), der Überstand mit 0,05% Azid versetzt und bei -20°C gelagert. Vor Verwendung des Ascites wurde er z.T. bei 15000xg 10 min lang zentrifugiert; mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen angewandte Gelelektrophorese findet in einer Matrix aus polymerisiertem Acrylamid, quervernetzt durch N,N'-Methylen-Bisacrylamid statt. Die hier angewendete Methode basiert auf der denaturierenden diskontinuierlichen Methode nach Laemmli [11;177;295].

Abhängig vom gewünschten Auftrennungsbereich wurden entsprechend Tab. 1 Lösung A (rotiphorese Gel 30), Lösung B (1,5 M TRIS-HCl pH 8,8), Lösung C (10% [w/v] SDS), ddH₂O, 10% (w/v) APS und TEMED, zusammengegeben: Das Trenngel wurde zwischen Glasscheiben der Minigelapparatur bis ca. 1,5 cm unter den Rand der U-Platte gegeben und für

1 h mit ddH₂O überschichtet. Für des Sammelgel wurden 5 ml Sammelgellösung (10% [v/v] Lösung A; 25% [v/v] 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8; 1% [v/v] Lösung C), 50 µl 10% APS und 5 µl TEMED zusammengegeben, das Wasser vom Trenngel entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden in SDS-PAGE-Ladelösung 1:2 bis 1:5 verdünnt, 10 min lang bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V im Sammelgel und bei 180-200 V, sobald die Proben in das Trenngel eingetreten waren. Als Laufpuffer diente SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer (50 mM TRIS; 383,7 mM Glycin; 0,1% [v/v] SDS).

	5 %	6 %	7,5 %	9,5 %	12 %	15 %
Lösung A [ml]	3	3,3	5	6,3	8	10
Lösung B [ml]	5	5	5	5	5	5
Lösung C [ml]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
ddH ₂ O [ml]	11,7	11	10	8,5	7	5
TEMED [ml]	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
10% APS [ml]	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18

Tab. 2: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gelmatrix für unterschiedliche Trennbereiche

3.4.3 Coomassiefärbung von Proteingelen

Die Methode der Coomassiefärbung beruht auf der unspezifischen Bindung des blauen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an Proteine; die Nachweisgrenze liegt bei 0,3-1 µg Protein [324].

Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder 30-45 min lang bei RT oder 10 min lang bei 56°C in Coomassie-Färbelösung (0,045% [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250; 9,1% [v/v] Eisessig; 45,5% [v/v] Methanol) inkubiert und anschließend zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs auf dem Schüttler bei RT in Entfärber (7,5% [v/v] Eisessig, 5% [v/v] Methanol) inkubiert. Die Entfärberlösung wurde mehrfach gewechselt und die alte Entfärberlösung mittels Aktivkohle regeneriert.

3.4.4 Immunblot (Western Blot) und Immundetektion

Der Immunblot stellt eine Methode zur Detektion von Proteinen in Lösung dar und basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Methode umfaßt zwei Schritte: die elektrophoretische Auftrennung von löslichen Proteinen im SDS-PAGE und den Transfer der Proteine auf eine Nylon- oder PVDF-Membran [49;300], sowie die Markierung eines Proteins durch einen spezifischen Antikörper und die Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes.

3.4.4.1 „Semi-dry“ Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western Blot)

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben (Kap. 3.4.2) wurden unter Verwendung eines Drei-Puffer-Systems in Anlehnung an Kyhse-Andersen auf Nitrozellulose-Membran transferriert [175].

Auf die Kathode der Blotapparatur wurden drei in Kathodenpuffer (25 mM TRIS-Base; 40 mM 6-Aminohexansäure; 20% [v/v] Ethanol) angefeuchtete Whatman 3 MM-Papiere, das in Kathodenpuffer äquilibrierte Trenngel und die in Anode 1-Puffer (30 mM TRIS-Base; 20% [v/v] Ethanol) äquilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt. Es folgten drei in Anode 1-Puffer angefeuchtete Whatman 3 MM-Filter, drei in Anode 2-Puffer (300 mM TRIS-Base; 20% [v/v] Ethanol) äquilibrierte Whatman 3 MM-Filter und die Anode. Der Transfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt (Stammlösung: 20% [w/v] Ponceau S in 30% TCA; Gebrauchslösung: 2% in ddH₂O; [266]) und Markerbanden markiert; zur Entfernung des Ponceau S-Farbstoffs wurde die Membran in ddH₂O geschwenkt. Die Lagerung der Membran erfolgte bei -20°C in PBS.

3.4.4.2 Immundetektion

In der Immundetektion wird ein auf Nitrozellulose-Membran immobilisiertes Antigen von einem spezifischen Antikörper erkannt, der spezifische Erstantikörper mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper markiert und der entstandene Immunkomplex in einer enzymatischen Reaktion, die auf der Oxidierung von Luminol beruht, sichtbar gemacht [11;321].

Die mit Proteinen beladene Nitrozellulose (Kap. 3.4.4.1) wurde 30 min lang bei RT oder über Nacht bei 4°C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Absättigungslösung (5% [w/v] Magermilchpulver, 0,1% [v/v] Tween 20 in PBS) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 1 h lang in Absättigungslösung mit Erstantikörper geschwenkt, überschüssiger Antikörper durch 3 bis 4maliges Waschen mit Waschpuffer (0,1% [v/v] Tween 20 in PBS) entfernt, mit 1/2500-1/5000 in Absättigungslösung verdünntem Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper für 0,5-1 h inkubiert und überschüssiger Antikörper durch 4 bis 5maliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Entwicklung erfolgte mit dem ECL („Enhanced Chemiluminescence“)- oder ECL+plus-System nach Herstellerangaben.

3.4.5 Indirekter ELISA zur Detektion spezifischer Antikörper

Der indirekte ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; [11;72]) wurde bei der Untersuchung von Hybridomazellen auf Sezernierung spezifischer Antikörper sowie bei der Bestimmung von Antikörpertitern eingesetzt.

Es wurden 5 ng/ μl MBP- bzw. MBP-IFP35-Fusionsprotein, gelöst in 50 μl Beschichtungspuffer (0,16% [w/v] Di-Natriumcarbonat; 0,29% [w/v] Natriumhydrogencarbonat; pH 9,4), in die Vertiefungen einer Rundboden Mikrotiterplatte gegeben. Die Beschichtung mit dem Antigen erfolgte für 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C ; anschließend wurde dreimal mit 150-200 μl Waschpuffer (0,5% [v/v] Tween 20 in PBS) gewaschen. Mit 150 μl Waschpuffer wurden bei 37°C für 90 min oder über Nacht bei 4°C unspezifische Bindungsstellen abgesättigt und es wurde nochmals dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Erstantikörpers: Es wurden entweder 50 μl Hybridomazellkulturüberstand, HAT-Medium mit 20% FCS, Waschpuffer oder 50 μl einer Verdünnung eines zu testenden Antikörpers gelöst in Waschpuffer eingesetzt; die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 h bei 37°C . Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 50 μl 1/5000 in Waschpuffer

verdünnter alkalische Phosphatase-konjugierter Zweitantikörper zugegeben und es wurde 1 h lang bei 37°C inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit Waschpuffer. Danach wurde mit 100 µl auf 37°C vorgewärmtem Diethanolaminpuffer (9,7% [v/v] Diethanolamin; 0,08% [w/v] MgCl₂·6H₂O) mit 20 mg/ml para-Nitrophenylphosphat 15 min lang bei 37°C lichtgeschützt inkubiert und die enzymatische Reaktion mit 100 µl 0,5%iger Natriumhydroxid-Lösung abgestoppt. Der Nachweis erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte bei 405 nm im ELISA-Reader bestimmt.

3.4.6 Elektronenmikroskopie

Für die Analyse der IFP35-Aggregate mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Zellen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/6 cm Schale auf Zellkulturschalen ausgesät, am folgenden Tag mit 1000 U/ml IFN- γ für 24 h induziert, dreimal mit PBS gewaschen, mit Fixierungslösung (0,15% [v/v] Glutaraldehyd, 0,2% [v/v] Formaldehyd in PBS) für 1 h auf Eis inkubiert und dreimal mit PBS mit 0,01% [w/v] Glycin zum Absättigen freier Aldehydgruppen gewaschen. Die folgenden Schritte wurden von Herrn Dr. Rohde durchgeführt: Die Zellen wurden von der Schale abgeschabt und in 1,5% Agar in PBS eingebettet. Nach Erstarren der Masse wurden kleine Würfel ausgeschnitten und in LRWhite nach folgendem Protokoll eingebettet: die Würfel wurden mit 30%igem, 50%igem, 70%igem und 90%igem Ethanol 30 min lang auf Eis dehydriert, mit einer 2:1 Mischung aus LRWhite mit 1,5 µl Beschleuniger/ml Einbettmaterial und 90%igem Ethanol 1 h lang auf Eis infiltriert, gefolgt von zwei einstündigen und einer über-Nacht-Inkubation im reinen Einbettmaterial. Anschließend wurden die Proben in Gelatine-Kapseln mit frischem Einbettmaterial überführt und bei 50°C für 24 h auspolymerisiert. Alternativ wurden die Proben entsprechend der Methode der progressiven Temperaturniedrigung (PLT) unter Verwendung von Lowicryl K4M-Säulenmaterial eingebettet [263]. Die Proben wurden zurechtgeschnitten und ultradünne Schnitte mit dem Glasmesser erstellt. Die Schnitte wurden auf Formvar-beschichtete Nickel 300-Gitternetze gegeben und vor der Antikörperreaktion auf PBS-Tropfen gelagert. Die Antikörpermarkierung des IFP35 erfolgte mit Protein G-aufgereinigtem polyklonalem anti-IFP35-Antiserum in einer Konzentration von 250 bzw. 125 µg IgG Protein/ml. Das Antiserum war vor Verwendung 10 min lang bei 20000xg zentrifugiert worden, um Antikörperaggregate zu entfernen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, gefolgt von einem 30 sek langen Waschgang mit PBS. Zur Sichtbarmachung des Erstantikörpers wurde anschließend mit Protein A-Gold-Komplexen (10 nm Goldpartikelgröße) inkubiert; auch die Protein A-Gold-Suspension war vorher zur Entfernung von Aggregaten bei 15000xg zentrifugiert worden. Die Schnitte wurden abschließend mit 0,01% (v/v) Tween 20 in PBS und ddH₂O gewaschen und luftgetrocknet. Es wurde 10 min lang mit 4% Uranylacetat in wässriger Lösung (pH 4,5) gegengefärbt und die Schnitte unter dem Zeiss Elektronenmikroskop EM910 bei auf 60 kV ansteigender Spannung untersucht.

3.4.7 Direkte Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt eine Möglichkeit dar Zellpopulationen hinsichtlich Größe und Granularität der enthaltenen Zellen zu charakterisieren; bei Verwendung Fluoreszenz-markier-

ter Antikörper kann eine Zellpopulation auch in Bezug auf die Expression bestimmter Antigene, wie z.B. Rezeptoren, charakterisiert werden [72;257].

Zur Bestimmung der Reinheit präparierter von T- und B-Lymphozyten wurden 1×10^5 - $2,5 \times 10^5$ Zellen zentrifugiert (1-2 min; 300xg), mit 100 μ l PBS gewaschen, in PBS mit 10% (v/v) FCS suspendiert, 10 min lang auf Eis inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS mit 10% FCS aufgenommen. Dem Ansatz wurden 10 μ l eines Gemisches aus Phycoerythrin (PE)-markierten anti-CD19- und FITC-markierten anti-CD3-Antikörpern bzw. 10 μ l Fluoreszenz-markierter Kontrollantikörper (Simultest™Control γ 1/ γ 1) zugefügt und es wurde 30 min lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 3% PFA suspendiert und bis zur FACS-Messung bei 4°C gelagert.

Die Reinheit von Granulozyten- und Monozyten-Präparationen wurde aufgrund der Größe und Granularität dieser Zellen bestimmt. Die Zellen wurden in der o.g. Konzentration in 3% PFA suspendiert und im FACS-Gerät über „Forward“- und „Side“-Scatter analysiert.

3.4.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden zelluläre Proteine mittels spezifischer Antikörper markiert und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen den Erstantikörper, sichtbar gemacht. Zur Detektion von intrazellulären Molekülen werden die Zellen vor der Immunfluoreszenz fixiert und permeabilisiert. Werden hierbei Alkohole oder Azeton verwendet, so findet eine Koagulation von Proteinen und eine Solubilisierung von Lipiden statt; sie fixieren und permeabilisieren gleichzeitig [22]. Werden Aldehyde verwendet, so findet eine Quervernetzung von Proteinen statt [254]; Zur Markierung intrazellulärer Proteine muß hier eine Permeabilisierung der Membranen vorgenommen werden [70].

Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen in einer 24-, „well“-Platte auf Deckgläschen ausgesät, evtl. transfiziert oder induziert, zweimal mit PBS gewaschen, fixiert und permeabilisiert; dabei wurden die Deckgläschen vor Verwendung durch 10maliges Waschen mit Leitungswasser, 10maliges Waschen mit ddH₂O, einmaligem Waschen mit Methanol und einmaligem Waschen mit Azeton entfettet. Die Fixierung und Permeabilisierung war abhängig vom verwendeten Primärantikörper: Bei Verwendung des anti-mitochondrialen, des anti-KDEL- und des anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörpers wurden die Zellen 10 min lang mit 3% PFA fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und 15 min lang mit 0,2% (v/v) Triton-X-100 in PBS permeabilisiert; bei Einsatz des anti-S3a-Antiserums wurden die Zellen 30 min lang mit 3% PFA und 15 min lang mit 0,2% (v/v) Triton-X-100 in PBS behandelt. Bei Benutzung des anti-Cathepsin D- und des anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Antikörpers wurde nur mit 3% PFA fixiert. In Vorbereitung auf den Einsatz des anti-Catalase- und des anti- β COP-Antikörpers wurden die Zellen 10 min lang mit kaltem Methanol (-20°C) fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 min lang mit kaltem Azeton (-20°C) behandelt. Bei Verwendung des polyklonalen anti-IFP35-Antiserums konnte mit jeder der oben angegebenen Methoden fixiert und permeabilisiert werden, wobei allerdings das Signal bei Verwendung von Methanol und Azeton schwächer war. Der monoklonale anti-IFP35-Antikörper IEB5IIA12 konnte nur bei Zellen eingesetzt werden, die mit Methanol und Azeton fixiert worden waren.

Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit Absättigungslösung A (0,1% [w/v] Saponin, 10% [v/v] FCS in PBS) bzw. Absättigungslösung B (0,05% [v/v] NP-40, 10% [v/v] FCS in PBS) wurde für 10-30 min bei RT inkubiert, gefolgt von 30-60 min Inkubation bei RT mit dem entsprechenden Erstantikörper, verdünnt in der verwendeten Absättigungslösung. Es folgten zweimaliges Waschen mit PBS und eine 30-60 min lange Inkubation bei RT mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper gegen Antikörper der Spezies, aus welcher der Erstantikörper isoliert wurde. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, mit Permafluor eingedeckt und der Deckglasrand mit Nagellack versiegelt. Bei Verwendung von Saponin in nicht Triton-X-100 permeabilisierten Zellen wurde jeweils einmal bzw. beim letzten Waschgang zweimal mit Absättigungslösung A gewaschen, da die Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin reversibel ist und ohne Saponin im Waschpuffer keine ausreichende Entfernung von überschüssigen Antikörpern aus dem Zellinneren erfolgen könnte [267].

Die Immunfluoreszenzen wurden an einem Zeiss Axiophot mit Plan Neofluar 63x Objektiv ausgewertet, welches die Möglichkeit bot, FITC- und TRITC-Moleküle separat oder auch gleichzeitig anregen zu können; somit konnten potentiell kolokalisierende Strukturen ermittelt werden. Wurde eine Kolokalisierung beobachtet, so wurde dies von Dr. M. Rohde mit Hilfe der konfokalen Laser Scan Mikroskopie überprüft; die optischen Schnitte erfolgten in 0,25 µm Intervallen und kombinierte Z-Serien wurden auf einem Tektronix Phase 440 gedruckt.

3.4.9 Immunpräzipitation

Die Methode basiert auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, die über den Fc-Teil der Antikörper an Protein A bzw. Protein G, welche an Agarose immobilisiert wurden, binden können. Die Immobilisierung des Komplexes erlaubt eine leichte Entfernung kontaminierender Agentien und somit eine Reinigung des Komplexes [132].

Es wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-, „well“-Schale ausgesät. Die Zellen wurden transfiziert und/oder induziert, für die Immunpräzipitation in Suspension gebracht (Kap. 3.1.1), zweimal mit PBS gewaschen, in einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml in Lysispuffer (50 mM TRIS-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 1% NP-40; 0,1 mM PMSF; in Anlehnung an Wadzinski et al. [316]) suspendiert, 45 min bis 3 h lang bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert und 5 min lang bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Über Nacht wurden 50-200 µl des Überstands und eine entsprechende Menge Antikörper auf dem Kippschüttler bei 4°C inkubiert; dabei wurden bei 200 µl Präzipitationsvolumen 5-25 µg monoklonaler Antikörper, 1-2 µl polyklonales Antiserum bzw. 100 µl Hybridomazellkulturüberstand eingesetzt. Anschließend wurden 40-50 µl 50% Protein G-Sepharose (in Lysispuffer) zugegeben, es wurde zwei weitere Stunden lang auf dem Kippschüttler inkubiert, zentrifugiert (5 min; 550xg), der Überstand abgezogen, 3-6 Mal mit je 1 ml Lysispuffer ohne NP-40 gewaschen und das Sediment in 30 µl SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen; 5-10 µl wurden im Western Blot (Kap. 3.4.4) untersucht.

3.4.10 *In vitro* Synthese von Proteinen

Die *in vitro* Synthese von Proteinen setzt sich aus zwei Schritten zusammen: *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation. Bei der *in vitro* Transkription werden ausgehend von Bakteriophagenpromotoren mit Hilfe von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus Bakteriophagen „run off“-Transkripte erstellt [11]. Die Transkripte werden in der *in vitro* Translation eingesetzt, die unter Einsatz von Retikulozytenlysaten stattfindet [167;239].

3.4.10.1 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurden 3 µg Plasmid-DNA mit einer Restriktionsendonuklease, welche keine 3'-überhängenden Enden ergab, hydrolysiert (Kap. 3.3.2.6) und anschließend mittels P/C/I-Extraktion (Kap. 3.3.2.2) und Ethanol-fällung (Kap. 3.3.2.5) aufgereinigt. Für die Transkription wurden 3 µg linearisierte DNA, 10 µl 10x Transkriptionspuffer (vom Hersteller mitgeliefert), 5 µl 100 mM DTT, 1,25 µl 40 U/µl RNasin, 10 µl 2,5 mM rNTP's sowie 1,0 µl T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase zusammengegeben und auf 50 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,25 µl DNase I zugegeben, nochmals 15 min lang bei 37°C inkubiert, 150 µl DEPC-ddH₂O zugefügt und eine P/C/I-Extraktion gefolgt von einer C/I-Extraktion (Kap. 3.3.2.2) durchgeführt. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C präzipitiert (Kap. 3.3.2.5), gewaschen, vakuumgetrocknet und in 30 µl DEPC-ddH₂O suspendiert. Zur Kontrolle der Transkription wurden 3 µl auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.3.3.3).

Bei Synthese von „gecapter“ RNA wurden 5 µg linearisierte DNA, 5 µl 10x Transkriptionspuffer, 5 µl 0,1 M DTT, 5 µl 1 mg/ml BSA, 1,25 µl 40 U/µl RNasin, 2,5 µl 10 mM ATP, 2,5 µl 10 mM CTP, 2,5 µl 10 mM UTP, 2,5 µl 1 mM GTP, 5 µl 5 mM m⁷G(5')ppp(5')G, 2 µl 20 U/µl RNA-Polymerase und 1,75 µl DEPC-ddH₂O zusammengegeben und auf 50 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt.

3.4.10.2 *In vitro* Translation

In der Translation wurde die in Kap 3.4.10.1 erwähnte *in vitro* transkribierte RNA eingesetzt. Der Translationsansatz setzte sich aus 1-2 µg *in vitro* transkribierte RNA, 1 µl 40 U/µl RNasin, 1 µl 1 mM Aminosäuremix ohne Methionin, 1 µl 1 mM Aminosäuremix ohne Leuzin (beide vom Hersteller des Lysates mitgeliefert) und 35 µl Retikulozytenlysate zusammen und wurde auf 50 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt. Hierbei war die RNA zunächst in DEPC-ddH₂O für 10 min bei 67°C denaturiert und auf Eis abgekühlt worden, bevor die anderen Reagenzien zugegeben wurden. Nachdem der Ansatz 1 h lang bei 30°C inkubiert worden war, wurden 0,2 mg/ml RNase A zugegeben und es wurde 5 min lang bei 30°C inkubiert; im Western Blot wurden 5 µl des *in vitro* Translationsansatzes eingesetzt.

Zur Synthese von radioaktiv-markierten *in vitro* translatierten Proteinen wurde anstelle von 1 µl 1 mM Aminosäuremix ohne Leuzin 2 µl ³⁵S-Methionin zugegeben.

3.4.11 Expression und Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Das pMAL-c-Vektorsystem erlaubt eine leichte, schnelle und effiziente Expression und Aufreinigung von Proteinen. Das Gen für das zu exprimierende Protein wird im richtigen

Leserahmen 3' vom für das Maltose-Bindungsprotein (MBP) kodierenden malE-Gen von *E. coli* kloniert und kann als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* in großen Mengen exprimiert und aufgrund der Affinität des MBP-Fusionsproteinanteils zu Amylose bzw. Maltose affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des tac-Promotors, dessen Aktivität durch den lac-Repressor reguliert wird [5;90;97;161;196].

3.4.11.1 Isolierung von MBP-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen wurden 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit 8 ml Bakteriensuspension einer über-Nacht-Kultur angeimpft und auf dem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde der Kultur 0,3 mM IPTG zugesetzt. Die Bakterien wurden weitere 2 h lang bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend sedimentiert (20 min; 8000xg; 4°C). Das Sediment wurde in 25 ml Column-Buffer (20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 200 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM β-Mercaptoethanol) suspendiert und über Nacht bei -20°C gelagert. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 0,1 mM PMSF unter fließendem, kaltem Wasser aufgetaut, mit fünf 15 sek langen Impulsen im Ultraschallgerät aufgeschlossen, die Suspension zentrifugiert (30 min; 14000xg; 4°C) und der Überstand mit dem 4fachen Volumen Column-Buffer verdünnt. Eine Amylosesäule (ca. 5 ml Bettvolumen; Ø 2,5 cm Säulendurchmesser) wurde mit 50 ml Column-Buffer äquilibriert, der Überstand über die Säule gegeben (1 ml/min) und die Säule mit 40 ml Column-Buffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Maltose in Column-Buffer bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und im SDS-PAGE untersucht.

3.4.11.2 Konzentrierung und Umpufferung Proteinen

Eine Ankonzentrierung des Proteins erfolgte mittels Centricon-30. Es handelt sich bei der Methode um eine Ultrafiltration der Probe durch eine anisotrope Membran mit einem Ausschlußvolumen von 30 kDa mittels Zentrifugalkraft.

Das Centricon wurde mit 1 ml ddH₂O bei 5000xg und 4°C nach Herstelleranleitung gewaschen. Anschließend wurden je 2 ml der vereinigten Hauptfraktionen über ein Centricon bei 5000xg und 4°C gegeben. Zum Wechsel des Lösungsmittels wurden zunächst 1 ml und anschließend zweimal 2 ml PBS durch das Centricon zentrifugiert. Die Rezentrifugation erfolgte zweimal mit je 100 µl PBS.

3.4.11.3 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Konzentration des Fusionsproteins wurde photometrisch durch die Bestimmung der OD₂₈₀ im Spektralphotometer bestimmt. Hierbei entsprach eine OD₂₈₀ von 1,0 einer Proteinkonzentration von 0,65 µg/µl.

3.4.12 Gelfiltration

Mittels Gelfiltration können Proteine ihrer Größe nach getrennt werden [6;11;104;251]. Die hier verwendete Superose 6 ist eine auf Agarose basierende, stark quervernetzte Matrix.

HeLa S3-Zellen wurden ausplattiert (1×10^7 Zellen/182 cm²), am folgenden Tag für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induziert, in Suspension gebracht (Kap. 3.1.1), dreimal mit PBS gewaschen, in PBS oder Intrazellularpuffer ohne Magnesium (3 mM NaCl; 140 mM KCl; 11 mM EGTA pH 7,3; 10 mM HEPES pH 7,2; pH-Wert mit Kaliumhydroxid einstellen auf pH 7,2) in einer Dichte von 3×10^7 Zellen/ml aufgenommen und im Dounce-Homogenator mit 20-25 Schlägen aufgeschlossen. Zelldebris und Nuklei wurden durch 10 min lange Zentrifugation bei 800xg sedimentiert; anschließend wurde, bei Verwendung von Intrazellularpuffer, der Überstand auf eine Konzentration von 1 mM MgCl₂ eingestellt und 10 min lang auf Eis inkubiert. Der so erhaltene postnukleäre Überstand wurde durch einen Sterilfilter (0,22 μ m Porengröße) filtriert; das gleiche Volumen PBS oder vollständiger Intrazellularpuffer (3 mM NaCl; 140 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 11 mM EGTA pH 7,3; 10 mM HEPES pH 7,2; pH-Wert mit Kaliumhydroxid einstellen auf pH 7,2) wurde zugegeben und 100 μ l wurden auf einer Superose 6-Säule (HR 10/30) unter Einsatz des FPLC-Systems aufgetrennt. Äquibriert und eluiert wurde mit PBS bzw. Intrazellularpuffer bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,25 ml/min. Es wurden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt und im Western Blot analysiert (Kap. 3.4.4). Kalibriert wurde die Säule mit Molekulargewichtsmarkern für die Gelchromatographie: Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase aus Hefe (150 kDa), Albumin (66 kDa) und Rinder-Carboanhydrase (29 kDa).

3.4.13 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung hat den Aufschluß von Zellen in ihre Organellen und Kompartimente zum Ziel. Für die Fraktionierungen wurden HeLa S3-Zellen ausgesät ($7,5 \times 10^6$ Zellen/182 cm²), am folgenden Tag für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induziert, in Suspension gebracht (Kap. 3.1.1) und zweimal mit PBS gewaschen. Die weitere Präparation erfolgte jeweils bei 4°C.

3.4.13.1 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation

Bei der differentiellen Zentrifugation werden die Zellen in einer isoosmotischen Lösung homogenisiert und Organellen und Kompartimente bei unterschiedlicher Beschleunigung und Dauer der Zentrifugation sequentiell aus dem Homogenat entfernt [81]. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Singh et al. [285].

Die Zellen wurden in 0,25 M Sucrose in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml aufgenommen (ca. 4 ml Gesamtvolumen) und im Dounce-Homogenator mechanisch aufgeschlossen. Durch 10 min lange Zentrifugation bei 300xg wurden Zelldebris und Nuklei entfernt. Die Nuklei wurden mit 0,25 M Sucrose gewaschen; der Überstand wurde mit dem postnukleären Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt und zur Sedimentation der Mitochondrien 20 min lang bei 6000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde dreimal mit 0,25 M Sucrose gewaschen und in 400 μ l 0,25 M Sucrose aufgenommen. Zur Sedimentation der Peroxisomen wurde der postmitochondriale Überstand 20 min bei 23000xg zentrifugiert, daß Sediment dreimal gewaschen und in 400 μ l 0,25 M Sucrose aufgenommen. Der postperoxisomale Überstand wurde zur Sedimentation von Mikrosomen und Membranen 20 min lang bei 100000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 400 μ l 0,25 M Sucrose aufgenommen; der Überstand (ca. 4 ml) stellte den

zytoplasmatischen Überstand dar. Die Fraktionen wurden im Western Blot untersucht; von den Sedimentfraktionen wurde nur 1/10 des Volumens eingesetzt, das bei Lysat bzw. zytoplasmatischem Überstand aufgetragen wurde.

3.4.13.2 Subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation

Percoll ist eine mit Polyvinylpyrrolidon beschichtete Matrix, die im Zentrifugalfeld sigmoidal isometrische Gradienten ausbildet, deren Dichteverteilung von der Zentrifugalkraft und der Zentrifugationszeit abhängig ist [26;242;243;264].

Die Zellen wurden in 0,25 M Sucrose mit 0,1 mM PMSF und 10 µg/ml Aprotinin suspendiert ($1,5 \times 10^7$ Zellen/ml) und im Dounce-Homogenator mechanisch aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde mikroskopisch verfolgt und dann beendet, wenn die Mehrzahl der Zellen einen Großteil ihrer Mitochondrien freigesetzt hatten (ca. 10 Stöße). Zur Entfernung von Nuklei und Zelltrümmern wurde 10 min lang bei 600-800xg zentrifugiert.

Die Percoll-Gradientenlösungen wurden auf zwei unterschiedliche Arten nach Anleitung des Herstellers hergestellt: 1.) ausgehend von einer Percoll-Lösung der Dichte 1,129 g/ml wurde für den 30%igen und den 15%igen Gradienten eine isotonische Stammlösung (SIP) aus 9 Teilen Percoll (1,129 g/ml) und einem Teil 2,5 M Sucrose hergestellt. Von dieser SIP wurde die Percoll-Lösung für den Gradienten mit 1,05 g/ml Anfangsdichte durch Mischen von 1,67 ml SIP und 8,33 ml 0,25 M Sucrose und für den Gradienten mit 1,07 g/ml Anfangsdichte durch Mischen von 3,31 ml SIP und 6,69 ml 0,25 M Sucrose hergestellt; 2.) für die Herstellung eines Percoll-Gradienten mit einer Ausgangsdichte von 1,04 g/ml wurden 6,51 ml Percoll (1,129 g/ml) und 10 ml 2,5 M Sucrose zusammengegeben, auf 100 ml mit ddH₂O aufgefüllt und mit je 100 µl 0,1 M PMSF und 10 mg/ml Aprotinin versetzt.

Für den Gradienten wurden 10 ml Percoll-Lösung der entsprechenden Anfangsdichte vorgelegt und mit 600-750 µl des postnukleären Überstands bzw. 600-700 µl Density Marker Beads-Lösung (500-600 µl 0,25 M Sucrose mit je 10 µl eines jeden Density Marker Beads) überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 27000xg für 1,5-2 h im JA 20-Festwinkelrotor. Anschließend wurden Fraktionen zu je 1 ml von oben vom Gradienten abgenommen und 10 µl im Western Blot analysiert (Kap. 3.4.4).

3.4.14 „NP-40-Präparation“ von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten

Die Methode wurde in Anlehnung an Dignam et al. und Cox und Goding durchgeführt [77;93].

Für die Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten wurden Zellen in Suspension gebracht (Kap. 3.1.1) und zweimal mit PBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Zellsediment wurde in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml in NP-40 Puffer (10 mM TRIS-HCl pH 7,4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,5% [v/v] NP-40) aufgenommen, 5-10 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 5 min lang bei 800xg zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (15 min; 15000xg) und der resultierende Überstand als zytoplasmatischer Extrakt bezeichnet. Das Sediment aus der 800xg Zentrifugation wurde in Puffer C (20 mM HEPES pH 7,8; 420 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA pH 8,0; 25% [v/v] Glycerin; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin) in einer theore-

tischen Konzentration von 1×10^7 Zellen/75 μ l aufgenommen, 45 min lang unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und abschließend 5 min lang bei 15000xg zentrifugiert. Der resultierende Überstand stellte den nukleären Extrakt dar.

3.4.15 GTP-Bindungsassay

Der GTP-Bindungsassay beruht darauf, daß Guanylat-bindende Proteine *in vitro* an Agarose-gebundenes GTP binden und die über das GTP an die Agarosematrix gekoppelten Proteine von anderen Proteinen durch einfaches Waschen getrennt werden können. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Cheng et al. [63].

Zellen wurden in Suspension gebracht (Kap. 3.1.1), zweimal mit PBS gewaschen, bei -80°C eingefroren, in CSK-Puffer (1% [v/v] Triton-X-100; 10 mM PIPES pH 6,8; 100 mM KCl; 300 mM Sucrose; 2,5 mM MgCl_2 ; 1 mM CaCl_2 ; 1 mM PMSF) aufgenommen (2×10^7 Zellen/ml), für 1 h bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert und zentrifugiert (30 min; 15000xg); 100-200 μ l Überstand (gleiche Mengen innerhalb des selben Versuches) wurden zusammen mit 100 μ l 50% GTP-Agarose (in CSK-Puffer äquilibriert) 1 h lang auf dem Kippschüttler bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min lang bei 4°C und 550xg zentrifugiert. Die GTP-Agarose wurde viermal mit je 1 ml GTP-Waschpuffer (150 mM NaCl; 20 mM TRIS-HCl; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; pH 7,2) gewaschen und das Sediment in 30 μ l SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen. Eine Analyse der Fraktionen erfolgte im Western Blot (Kap. 3.4.4).

4 Ergebnisse

4.1 IFP35

IFP35 wurde ursprünglich von Bange et al. aus einer cDNA-Genbank IFN-induzierter HeLa-Zellen isoliert. Die mRNA-Expression wird sowohl durch Typ I- als auch durch Typ II-Interferone induziert. Die Expression der mRNA von IFP35 ist dosisabhängig und weist ein Maximum bei 1000 U/ml IFN- γ auf. In unbehandelten Zellen ist nur eine geringe Expression der mRNA zu verzeichnen. Eine Expression der mRNA konnte nicht nur in HeLa-Zellen nachgewiesen werden; sie wird ebenfalls in U937-Makrophagen-Vorläuferzellen, der von Amniongewebe abgeleiteten Epithelzelllinie WISH, mononukleären peripheren Blut-Leukozyten und humanen primären Fibroblasten durch IFN- γ induziert. Das IFP35-Protein enthält N-terminal ein Leuzin-Zipper-Motiv. Eine Homodimerisierung von IFP35-Molekülen konnte *in vitro* nachgewiesen werden. In einer Präparation zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte, unter Einsatz des Detergens NP-40, wurde IFP35 nach IFN- γ -Induktion primär in der nukleären Fraktion wiedergefunden [16]. IFP35 ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert [43].

4.1.1 Bestimmung der Nuklein- und Aminosäuresequenz von IFP35

Im Verlauf der Arbeit wurden von zwei anderen Arbeitsgruppen Nuklein- und Aminosäuresequenzen von IFP35 veröffentlicht, die von der von Bange et al. veröffentlichten IFP35-Aminosäuresequenz [16] und der ihr zugrunde liegenden Sequenz des aus der HeLa-Genbank isolierten IFP35-cDNA-Klons abweichen: die abweichenden Sequenzen wurden zum einen durch Sequenzierung eines aus einer humanen B-Zell-cDNA-Genbank isolierten Klons [319] und zum anderen durch Sequenzierung des genomischen Klons von IFP35 („Accession“-Nummer: L78833; [43;286]) bestimmt. Die IFP35-Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit noch einmal überprüft.

Zur Überprüfung der Sequenz wurde eine RT-PCR mit anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte durchgeführt. RNA von TPA/IFN- γ /CHX-induzierten THP-1-Zellen und von IFN- γ -induzierten HeLaS3-Zellen wurde isoliert und die reverse Transkription mit Hilfe von Oligo (dT)-Primern durchgeführt. Die erhaltenen RT-Produkte wurden in einer PCR (Primer: #618 und #389) eingesetzt und anschließend das PCR-Produkt sequenziert (Primern: #391, #392, #618, #389). Parallel dazu wurde der ursprünglich von Bange et al. aus der HeLa-Genbank isolierte, im pGEM4Z-Vektor subklonierte, cDNA-Klon von IFP35 (pGEM135 komplett; [16]) sequenziert.

Die von Wang et al. [319] ermittelte cDNA-Sequenz weicht von der Sequenz, die der von Bange et al. [16] veröffentlichten Aminosäuresequenz zu Grunde lag, in mehreren Punkten ab. Dabei muß berücksichtigt werden, daß ein Teil der Differenzen auf die Anwendung unterschiedlicher genetischer Codes zurückzuführen ist. So sind die in der Veröffentlichung von Wang et al. erwähnten Abweichungen an Aminosäureposition 69, 103, 166 und 201 im Vergleich zu der von Bange et al. publizierten Aminosäuresequenz, darauf zurückzuführen,

daß von Wang et al. nicht der universelle genetische Kode angewendet wurde; die Nukleinsäuresequenzen stimmen an diesen Stellen überein (vgl. Kap. 6.1 und Kap. 6.2).

Weitere Sequenzunterschiede wirkten sich auf die Aminosäuresequenz aus. Es zeigte sich, daß an Position 80 der Aminosäuresequenz die von Bange et al. ermittelte Aminosäure Serin und an Position 111 das Valin richtig ist. Von Wang et al. [319] war an diesen Stellen ein Tyrosin bzw. Lysin beschrieben worden. Als weiterer Unterschied wurde von Wang et al. zwischen Aminosäure 126 und 127 der von Bange et al. veröffentlichten Sequenz eine Insertion von zwei Aminosäuren (Methionin und Valin) beschrieben. Diese Aminosäuren fehlen in der von Bange et al. veröffentlichten Sequenz, sind aber, wie sich mittels Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigte, in der Aminosäuresequenz des nativen IFP35-Proteins vorhanden. Eine Sequenzierung des pGEM 135 komplett zeigte, daß bereits die aus der HeLa-Genbank isolierte cDNA von IFP35 diese Deletion aufweist. Damit weisen alle Plasmid-Konstrukte, die auf dem pGEM 135 komplett aufbauend konstruiert wurden diese Deletion auf.

Vollständig differieren die von Wang et al. und Bange et al. publizierten Aminosäuresequenzen ab Position 276. Dabei stellte sich heraus, daß die von Bange et al. ermittelte Sequenz ab dieser Position falsch ist; die von Wang et al. beschriebene Insertion von zwei Guanin-Nukleotiden zwischen Position 897 und 898 der Nukleinsäuresequenz, die der von Bange et al. veröffentlichten Aminosäuresequenz zugrunde lag, wurde mit Hilfe der Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigt. Der daraus resultierende Leserahmenwechsel führt zu unterschiedlichen C-Termini. Eine Sequenzierung des pGEM 135 komplett ergab, daß die aus der HeLa-Genbank isolierte cDNA diese Insertion trägt und somit ein Sequenzierfehler zur Veröffentlichung der fehlerhaften Aminosäuresequenz führte.

Eine letzte Differenz der Nukleinsäuresequenzen gibt es außerhalb des kodierenden Bereichs an Position 1004. Es stellte sich heraus, daß das von Bange et al. veröffentlichte Adenin auf einen Sequenzierfehler zurückzuführen ist.

Alle Korrekturen der Nukleinsäuresequenz stehen im Einklang mit der Sequenz des genomischen Klons, wobei die Insertion der sechs Nukleotide an Position 483 (Aminosäure 126) genau an einem Intron-Exon-Übergang liegt und bei der Bestimmung der Aminosäuresequenz nicht berücksichtigt wurde [43;286]. Eine Übersicht über die Sequenzunterschiede ist in Tab. 3 dargestellt; die korrigierte IFP35 Nuklein- und Aminosäuresequenz ist in Abb. 3 zu sehen. Vergleiche der erwähnten Nuklein- und Aminosäuresequenzen sind in Kap. 6.1 und Kap. 6.2 dargestellt.

Die korrigierte Sequenz enthält einen 864 bp langen offenen Leserahmen und kodiert für ein 864 As langes Protein mit etwas größerem Molekulargewicht (31,74 kDa), als ursprünglich von Bange et al. veröffentlicht (31,13 kDa; [16]).

AGACCACAGC	CCTTTGGGGG	GTACAAACAA	GAGTTCAGTT	GCTGTGAATT	CTGCCACTGT	60
GCCCAGCTCT	GAAGCCTCAG	CTCTTGCCAA	ACAGACCCGA	GACCCATGTC	AGCCCCACTG	120
				M S	A P L	5
GATGCCGCCC	TCCACGCCCT	TCAGGAGGAG	CAGGCCAGAC	TCAAGATGAG	GCTGTGGGAC	180
D A A	L H A L	Q E E	Q A R	L K M R	L W D	25
CTGCAGCAGC	TGAGAAAGGA	GCTCGGGGAC	TCCCCCAAAG	ACAAGGTCCC	ATTTTCAGTG	240
L Q Q	L R K E	L G D	S P K	D K V P	F S V	45
CCCAAGATCC	CCCTGGTATT	CCGAGGACAC	ACCCAGCAGG	ACCCGGAAGT	GCCTAAGTCT	300
P K I	P L V F	R G H	T Q Q	D P E V	P K S	65
TTAGTTTCCA	ATTTGCGGAT	CCACTGCCCT	CTGCTTGCGG	GCTCTGCTCT	GATCACCTTT	360
L V S	N L R I	H C P	L L A	G S A L	I T F	85
GATGACCCCA	AAGTGGCTGA	GCAGGTGCTG	CAACAAAAGG	AGCACACGAT	CAACATGGAG	420
D D P	K V A E	Q V L	Q Q K	E H T I	N M E	105
GAGTGCCGGC	TGCGGGTGCA	GGTCCAGCCC	TTGGAGCTGC	CCATGGTCAC	CACCATCCAG	480
E C R	L R V Q	V Q P	L E L	P M V T	T I Q	125
GTGATGGTGT	CCAGCCAGTT	GAGTGGCCGG	AGGGTGTGG	TCACTGGATT	TCCTGCCAGC	540
V M V	S S Q L	S G R	R V L	V T G F	P A S	145
CTCAGGCTGA	GTGAGGAGGA	GCTGCTGGAC	AAGCTAGAGA	TCTTCTTTGG	CAAGACTAGG	600
L R L	S E E E	L L D	K L E	I F F G	K T R	165
AACGGAGGTG	GCGATGTGGA	CGTTCGGGAG	CTACTGCCAG	GGAGTGCAT	GCTGGGGTTT	660
N G G	G D V D	V R E	L L P	G S V M	L G F	185
GCTAGGGATG	GAGTGGCTCA	GCGTCTGTGC	CAAATCGGCC	AGTTCACAGT	GCCACTGGGT	720
A R D	G V A Q	R L C	Q I G	Q F T V	P L G	205
GGGCAGCAAG	TCCCTCTGAG	AGTCTCTCCG	TATGTGAATG	GGGAGATCCA	GAAGGCTGAG	780
G Q Q	V P L R	V S P	Y V N	G E I Q	K A E	225
ATCAGGTCGC	AGCCAGTTCC	CCGCTCGGTA	CTGGTGCTCA	ACATTCTTGA	TATCTTGAT	840
I R S	Q P V P	R S V	L V L	N I P D	I L D	245
GGCCCCGAGC	TGCATGACGT	CCTGGAGATC	CACTTCCAGA	AGCCCACCCG	CGGGGGCGGG	900
G P E	L H D V	L E I	H F Q	K P T R	G G G	265
GAGGTAGAGG	CCCTGACAGT	CGTACCCCAA	GGACAGCAGG	GCCTAGCAGT	CTTCACCTCT	960
E V E	A L T V	V P Q	G Q Q	G L A V	F T S	285
GAGTCAGGCT	AGGGGCCTCC	CCTTCTCATC	CTCCCCACCC	CCCCGCCAAG	GTTCTCACAC	1020
E S G	-					288
TGGCCTGGGC	TTGGGTGCC	ATATAGGAGG	TCTGTATGTT	CACCAACAGT	GCGGAGGGGT	1080
CACACATTGC	AAAACACTGC	CCAGAACAGT	AAAAAGAGCC	TGCATGCCAA	AAAAAAAA	1138

Abb. 3: IFP 35: Nuklein- und Aminosäuresequenz nach Korrektur

Amino- bzw. Nukleinsäure-Position	Sequenz nach Bange et al.	Sequenz nach Wang et al.	Sequenz nach Smith et al. und Brown et al.	Änderung der Aminosäuresequenz von Bange et al.	Fehler im pGEM 135 komplett
As 69	N	D/N	N	nein	nein
As 103	N	D/N	N	nein	nein
As 166	N	D/N	N	nein	nein
As 201	T	R/T	T	nein	nein
As 80	S	Y	S	nein	nein
As 111	V	L	V	nein	nein
As 127	fehlt	M	fehlt (Splice Übergang)	M Insertion	ja
As 128	fehlt	V	fehlt (Splice Übergang)	V Insertion	ja
bp 897	fehlt	G	G	Ja (falscher C-Terminus)	nein
bp 898	fehlt	G	G	Ja (falscher C-Terminus)	nein
bp1004	A	fehlt	fehlt	nein	nein

Tab. 3: Vergleich von verschiedenen, veröffentlichten Amino- und Nukleinsäuresequenzen von IFP 35

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen den von Bange et al. [16], Wang et al. [319] und Smith et al. [286] bzw. Brown et al. [43] veröffentlichten Sequenzen sowie deren Einfluß auf die von Bange et al. veröffentlichte Proteinsequenz. Ebenfalls dargestellt ist, inwiefern der aus der HeLa-Genbank isolierte cDNA-Klon (pGEM135komplett) mit der mittels Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigten Sequenz übereinstimmt. Im oberen Bereich der Tabelle sind die Aminosäurepositionen angegeben, an denen ein Sequenzunterschied aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen genetischen Codes auftritt; bei Wang et al. ist links die in der Veröffentlichung aufgeführte Proteinsequenz und rechts daneben die Sequenz, die sich bei der Translation der von Wang et al. veröffentlichten Nukleinsäuresequenz unter Verwendung des universellen genetischen Codes ergibt, aufgeführt.

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen IFP 35

Wichtige Werkzeuge bei der Charakterisierung von Proteinen sind monoklonale Antikörper. Sie weisen eine höhere Antigenspezifität als polyklonale Seren auf. Daher wurde zusätzlich zu dem bereits vorhandenen polyklonalen Antiserum gegen IFP35 [16] ein monoklonaler Antikörper gegen IFP35 generiert. Dieser Antikörper sollte sowohl in der Immunfluoreszenz, im Western Blot wie auch in der Immunpräzipitation einsetzbar sein.

Zur Generierung des Antikörpers wurde eine Balb/c-Maus über einen Zeitraum von 10 Wochen viermal mit aufgereinigtem MBP-IFP35-Fusionsprotein immunisiert und neun Tage nach der letzten Injektion die Zellfusion durchgeführt. Nach einer Wachstums- und Selektionsphase wurden die erhaltenen Hybridomazellklone auf Sekretion eines spezifischen Antikörpers gegen

IFP35 untersucht. Dabei wurden in der Regel Klongruppen eingesetzt. Bei der ersten Untersuchung wurden potentiell positive Klongruppen im ELISA ermittelt. Hierbei wurde zur Differenzierung von Antikörpern, die gegen den MBP-Teil, und Antikörpern, die gegen den IFP35-Teil des MBP-IFP35-Fusionsproteins gerichtet sind, MBP-Protein bzw. MBP-IFP35-Fusionsprotein als Antigen eingesetzt. Es wurden zwei Klongruppen identifiziert, die mehr als 2fach stärker mit MBP-IFP35-Fusionsprotein als mit MBP-Protein allein reagierten: Klongruppe ICB2, die 3fach stärker und Klongruppe IEB5, die 5,4fach stärker mit MBP-IFP35-Fusionsprotein reagierte. Sämtliche mindestens schwach positiven Klongruppen wurden im Western Blot mit Zellextrakt aus IFN- γ -induzierten HeLaS3-Zellen getestet. Alle potentiell positive Klongruppen wurden subkloniert. In der zweiten Untersuchung konnte nur noch ein positiver Klon ermittelt werden: Klon IEB5IIA12. Dieser wurde nochmals subkloniert und drei Klone wurden isoliert (IEB5IIA12I, IEB5IIA12II und IEB5IIA12III). Eine nähere Charakterisierung des Hybridomazellklons IEB5IIA12I ergab, daß er Antikörper der IgG1-Subklasse sezernierte.

Im folgenden wurde der Hybridomazellklon IEB5IIA12 in Zellkultur angezogen. Zellkulturüberstand wurde gewonnen und z.T. affinitätschromatographisch unter Einsatz von Protein G-Sepharose aufgereinigt und ankonzentriert. Ein Teil der Zellen des IEB5IIA12I-Subklons wurde für die Ascitesproduktion herangezogen.

Anschließend wurde der monoklonale Antikörper näher charakterisiert. Es wurde im ELISA mit MBP-IFP35-Fusionsprotein eine Titration von unterschiedlichen Aufarbeitungen (Zellkulturüberstand, Protein G-aufgereinigter Antikörper und Ascites) des Antikörpers vorgenommen. Dabei wurde für den Zellkulturüberstand ein Titer [253] von 1/3200, für den Protein G-aufgereinigten Antikörper ein Titer von 1/102400 und für die Ascitesflüssigkeit ein Titer von 1/409600 bestimmt (Abb. 4).

Die Spezifität des Antikörpers wurde im Western Blot untersucht. Hierzu wurden Extrakte von IFN- γ -induzierten HeLaS3-Zellen und *in vitro* translatiertes IFP35 herangezogen. Es zeigte sich, daß der monoklonale Antikörper eine spezifische IFP35-Bande bei ca. 35 kDa sowohl bei Zellextrakten unbehandelter als auch IFN- γ -induzierter HeLaS3-Zellen erkennt (Abb. 5; Spur 5 und 6; vergleiche Bange et al. [16]). Wie auch bei Verwendung des bereits vorher charakterisierten polyklonalen Antiserum [16] war die Bande bei nicht induzierten Zellen schwächer als bei induzierten (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde vom monoklonalen Antikörper *in vitro* translatiertes IFP35 erkannt (Abb. 5; Spur 1). Das *in vitro* translatierte IFP35 konnte mit Hilfe des IEB5IIA12-Antikörpers präzipitiert werden (Abb. 5; Spur 2). Die spezifische IFP35-Bande wurde nicht mehr beobachtet, wenn der monoklonale Antikörper mit 1 mg/ml MBP-IFP35-Fusionsprotein präabsorbiert wurde (Abb. 5; Spur 3 und 4); ein Hinweis auf die Spezifität des Antikörpers.

Der IEB5IIA12-Antikörper erkennt das IFP35-Protein darüber hinaus auch spezifisch in der Immunfluoreszenz (siehe Kap 4.1.3).

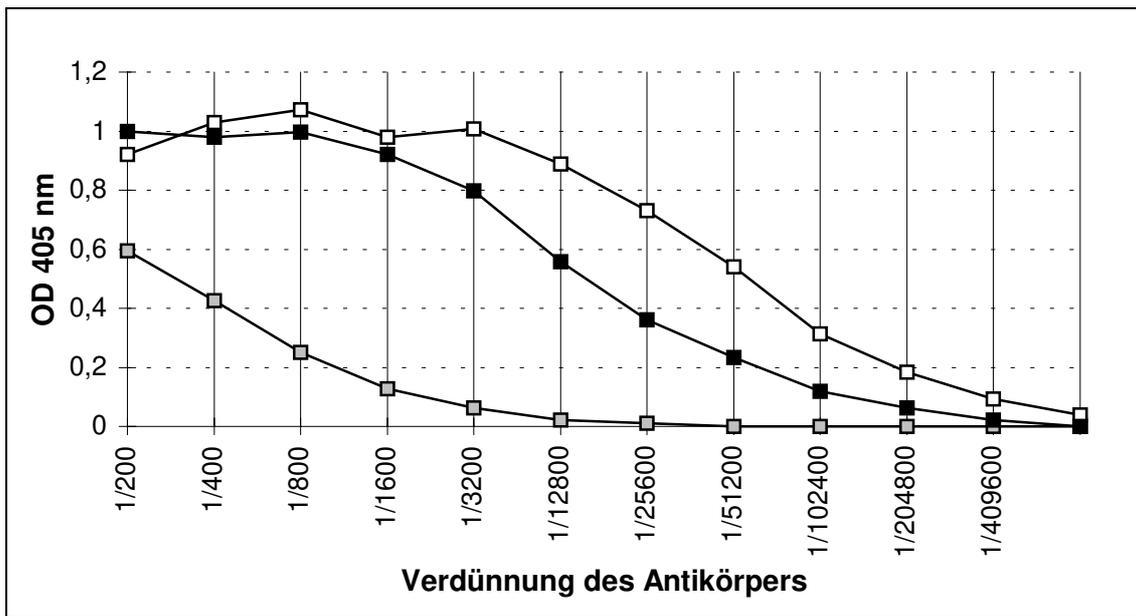


Abb. 4: Titerbestimmung von unterschiedlichen Aufarbeitungen des monoklonalen Antikörpers IEB5IIA12

Mikrotiterplatten wurden mit MBP-IFP35-Fusionsprotein 2 h lang bei 37°C beschichtet. Die Erstantikörper wurden 1/200 in Waschpuffer vorverdünnt und dann jeweils 1:2 seriell verdünnt. Die Entwicklung erfolgte mit Alkalischer Phosphatase-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper und einer Farbreaktion. Für den Zellkulturüberstand (grau) konnte ein Titer von 1/3200, für den über ProteinG aufgereinigten Antikörper (schwarz) einer von 1/102400 und für den Ascites (weiß) ein Titer von 1/409600 bestimmt werden.

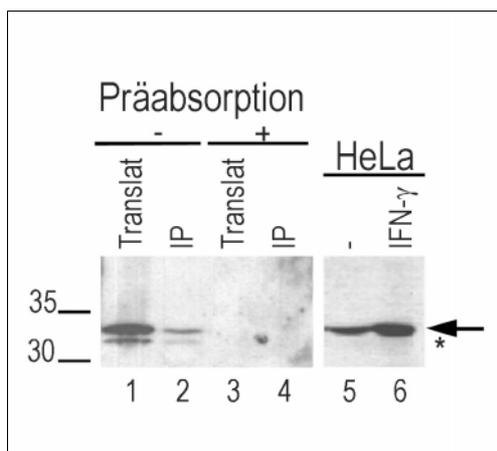


Abb. 5: Nachweis der Spezifität des monoklonalen anti-IFP35-Antikörpers IEB5IIA12 im Western Blot

Dargestellt ist ein Western Blot mit *in vitro* translatiertem IFP35 (Spur 1 und 3), mit vom Antikörper IEB5IIA12 präzipitiertem *in vitro* translatiertem IFP35 (Spur 2 und 4) sowie mit Gesamtextrakt von unbehandelten (Spur 5) und IFN- γ -induzierten HeLa S3-Zellen (Spur 6); der Blot wurde mit dem monoklonalen Antikörper IEB5IIA12 (Spur 1, 2, 5 und 6), bzw. mit präabsorbiertem IEB5IIA12-Antikörper (Spur 3 und 4) entwickelt. Mit einem Pfeil ist die Bande, die das vollständige IFP35-Protein repräsentiert, markiert und mit einem Stern das ausgehend vom zweiten Startkodon des IFP35-Gens alternativ translatierte IFP35-Protein (Spur 1 und 2; vergleiche Bange et al. [16]). Bei der *in vitro* Translation wurde das Plasmid pGEM135 komplett eingesetzt; unter Einsatz der SP6-RNA-Polymerase wurden *in vitro* Transkripte synthetisiert. HeLa S3-Zellextrakt wurde gewonnen, indem die Zellen nach der Induktion in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen wurden. Die Präabsorption des anti-IFP35-Antikörpers IEB5IIA12 wurde mit 1 mg/ml MBP-IFP35-Fusionsprotein 0,5 h lang bei 4°C durchgeführt.

4.1.3 Subzelluläre Lokalisierung von IFP 35 in der Immunfluoreszenz

Von Bange et al. waren bereits Versuche zur subzellulären Lokalisierung von IFP35 beschrieben worden. Dabei waren nukleäre und zytoplasmatische Extrakte IFN-behandelter HeLaS3-Zellen untersucht worden. IFP35 wurde hierbei vor IFN- γ -Induktion sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion nachgewiesen. Nach IFN- γ -Induktion war IFP35 vorrangig in der nukleären Fraktion zu finden [16]. Die nukleäre Lokalisierung von IFP35 wurde mit einer anderen Methode, der Immunfluoreszenz, überprüft.

HeLaS3-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induziert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Anschließend wurde mit polyklonalem anti-IFP35-Antiserum inkubiert, gefolgt von einem Fluorochrom-markierten Zweitantikörper. In den Immunfluoreszenzen wurde nach IFN- γ -Stimulation ein zytoplasmatisch verteiltes Punktmuster beobachtet. Es bestand aus 6-20 großen Punkten, begleitet von einer Reihe kleinerer Punkte. Meistens waren die Punkte locker über das Zytoplasma verteilt (Abb. 6; Abb. 16). In manchen Versuchen waren sie dagegen in einem Kreis um den Zellkern angeordnet (Daten nicht dargestellt). Eine Abhängigkeit des Musters von den Versuchsbedingungen konnte nicht festgestellt werden. Vor IFN- γ -Induktion wurden lediglich in manchen Zellen vereinzelt kleine Punkte im Zytoplasma beobachtet. Darüber hinaus war eine schwache Grundfärbung des Zytoplasmas zu beobachten; bei induzierten Zellen schien das Zytoplasma stärker als bei nicht induzierten Zellen zu fluoreszieren (Abb. 6).

Zur Bestätigung der Spezifität des beobachteten zytoplasmatischen Punktmusters wurde der Versuch mit dem monoklonalen Antikörper gegen IFP35 durchgeführt. Bei Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd konnte zunächst kein Punktmuster bei IFN- γ -induzierten Zellen beobachtet werden. Es wurden daraufhin unterschiedliche Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen ausprobiert, da die Fixierung der Zellen die Strukturhaltung des Antigens beeinflussen kann; dies beeinflusst wiederum die Erkennung und Bindung des Antikörpers an das Antigen. Der monoklonale Antikörper IEB5IIA12 zeigte bei Methanol-Azeton-Fixierung das gleiche zytoplasmatische IFN- γ -induzierte Punktmuster wie das polyklonale Antiserum. Die zytoplasmatische und nukleäre Basisfärbung war deutlich geringer als beim polyklonalen Antiserum. Mit Hilfe einer Doppelimmunfluoreszenz mit monoklonalem Antikörper und polyklonalem Antiserum gegen IFP35 konnte nachgewiesen werden, daß beide Antikörper dieselben Strukturen erkennen.

Ein weiterer Hinweis auf die Spezifität des Antikörpers war, daß bei Präabsorption des Antikörpers mit 1 mg/ml MBP-Fusionsprotein kein Punktmuster mehr zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob das charakteristische IFP35-Muster spezifisch für HeLaS3-Zellen ist wurden Immunfluoreszenzen mit Zelllinien, die sich aus unterschiedlichen Geweben und Zelltypen ableiteten, durchgeführt. Ein ähnliches, aber feineres Punktmuster wurde in der humanen Fibroblasten-Zelllinie GM 637 (Abb. 7a und b) und der von Amnionzellen abgeleiteten WISH-Zelllinie (Daten nicht gezeigt) nach IFN- γ -Induktion beobachtet. In der Makro-

phagen-Vorläuferzelllinie THP-1 trat dieses Muster nach IFN- γ -Induktion TPA-behandelter Zellen auf (Abb. 7e und f). Ein feines Punktmuster in teilweise „perlschnurartiger“ Anordnung wurde in Zellen der Lungenkarzinom-Zelllinien SW1573 (Abb. 20) und A549 (Abb. 7c und d) beobachtet.

Der zeitliche Verlauf der Ausbildung und die Stabilität des IFP35-Verteilungsmusters wurde anschließend untersucht. Zellen wurden entweder unterschiedlich lange mit IFN- γ induziert oder es wurde 24 h lang mit IFN- γ induziert und anschließend der Induktionsstimulus entfernt. In HeLaS3-Zellen wurde bereits 6-12 h nach IFN- γ -Induktion das typische IFP35-Verteilungsmuster beobachtet. Die Strukturen waren allerdings noch wesentlich kleiner als nach 24 h; 48 h nach Induktion war das IFP35-Muster intensiver als nach 24 h. Im Verlauf der Induktion schien nur die Intensität des Musters zuzunehmen. Die Anzahl der Aggregate nahm kaum zu. Entfernte man den Induktionsreiz 24 h nach IFN- γ -Induktion, so blieb das typische Verteilungsmuster mehr als 96 h erhalten (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob das IFP35-Verteilungsmuster nur durch TypII-Interferon oder auch durch TypI-Interferone induzierbar ist, wurden HeLaS3-Zellen mit IFN- α induziert. Die Induktion des spezifischen Punktmusters wurde auch in IFN- α induzierten Zellen beobachtet; das Muster war allerdings weniger intensiv als in IFN- γ -induzierten Zellen (Abb. 6).

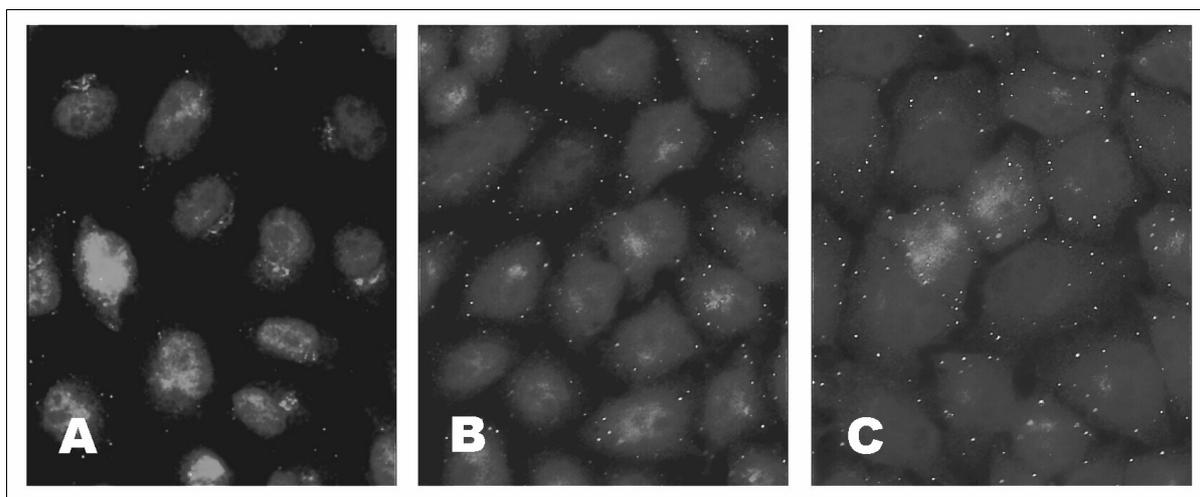


Abb. 6: Induktion des IFP 35-Verteilungsmusters durch IFN- α und IFN- γ in HeLa S3-Zellen

Zu sehen sind unbehandelte HeLa S3-Zellen (A), für 24 h mit 500 U/ml IFN- α (B) bzw. für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induzierte Zellen (C). Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen 10 min lang mit 3% PFA fixiert, mit 0,1% Triton-X-100 5 min lang permeabilisiert und mit 0,1% Saponin, 10% FCS in PBS abgesättigt. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-IFP35-Antiserum und FITC-konjugiertem anti-Kaninchen-Antikörper (Spezies: Esel) durchgeführt. Die Immunfluoreszenzen wurden am Zeiss Axiophot ausgewertet.

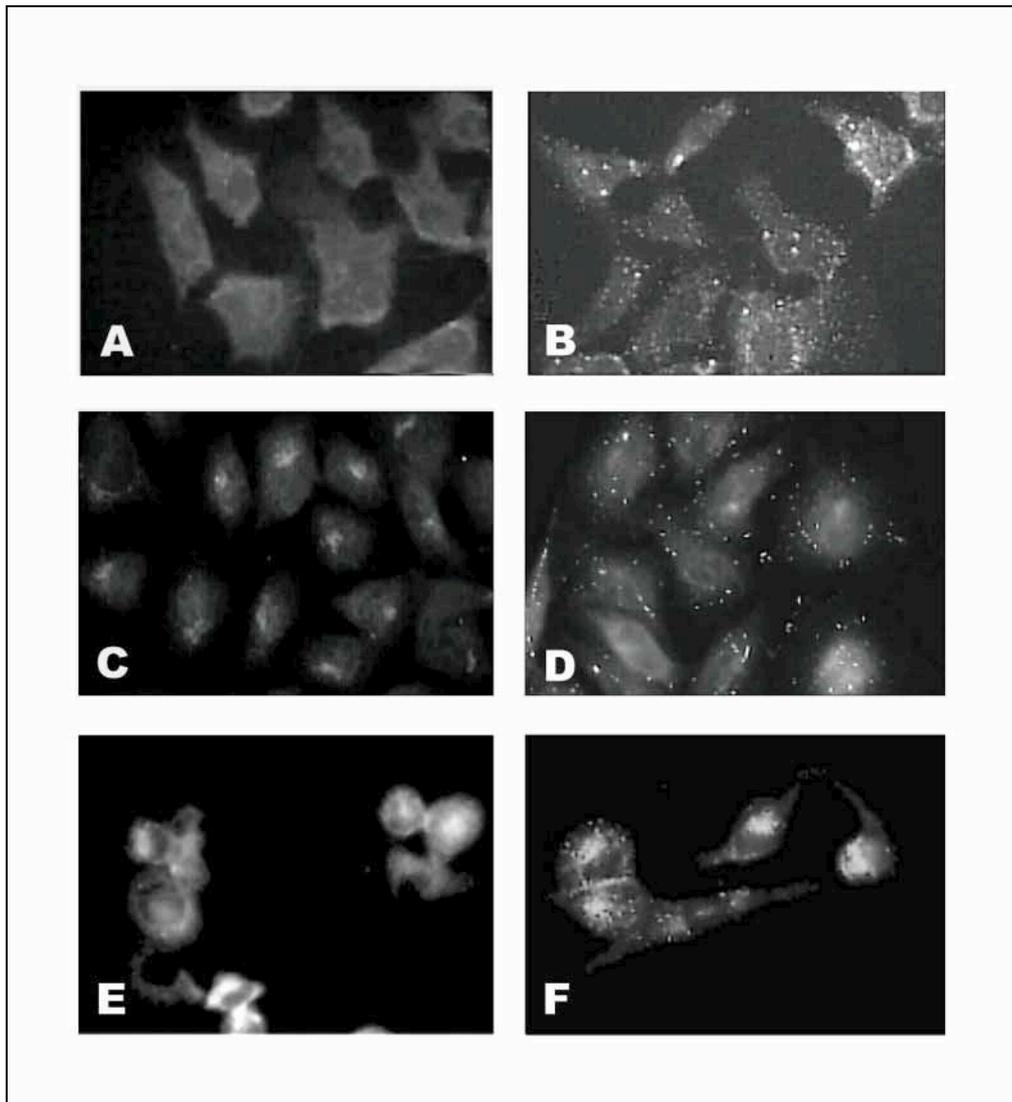


Abb. 7: Typisches IFN- γ -induziertes Verteilungsmuster von IFP 35 in verschiedenen Zelllinien

Dargestellt sind jeweils nicht induzierte (A,C,E) und IFN- γ -induzierte (B,D,F) humane Fibroblasten (GM637; A und B), Alveolarzell-Karzinomzellen (A549; C und D) und Makrophagen-Vorläuferzellen (THP-1; E und F). Die GM637- und A549-Zellen wurden für die Immunfluoreszenz auf Deckgläschen ausplattiert und für 24 h mit IFN- γ induziert. Bei THP-1-Zellen wurden sowohl die nicht IFN- γ -induzierten als auch die IFN- γ -induzierten Zellen vor Induktion für 24 h mit 20 nM TPA behandelt. Im Anschluß an die Induktion wurden die Zellen entweder 30 min lang mit PFA fixiert, mit 10% FCS, 0,1% Saponin in PBS abgesättigt und mit anti-IFP35-Antiserum und FITC-konjugiertem anti-Kaninchen-Antikörper (Spezies: Ziege) gefärbt (THP-1) oder mit Methanol und Azeton fixiert mit 0,5% Saponin in PBS abgesättigt und die indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalem anti-IFP35-Antikörper und FITC-konjugiertem anti-Maus-Antikörper (Spezies: Ziege) durchgeführt (GM637). Die A549-Zellen wurden 10 min lang mit PFA fixiert, mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert, mit 0,05% NP-40, 10% FCS in PBS abgesättigt und es wurde mit polyklonalem anti-IFP35-Antiserum und FITC-konjugiertem anti-Kaninchen-Antikörper (Spezies: Esel) entwickelt. Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte am Zeiss Axiophot.

4.1.4 Kolokalisierungsexperimente mit Organellen- und Kompartiment-spezifischen Antikörpern

Das IFN-induzierte IFP35-Punktmuster erinnert stark an eine Lokalisierung von Proteinen in einem bestimmten Zellkompartiment oder einem Organell. Zur Prüfung, ob IFP35 in einem Organell oder einem Kompartiment lokalisiert ist, wurden im folgenden Doppelimmunfluoreszenzen mit anti-IFP35-Antikörpern und Antikörpern gegen Leitproteine bestimmter Zellkompartimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden HeLaS3-Zellen 24 h lang mit IFN- γ induziert, anschließend fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit einem Antikörper, der ein Organellen- bzw. Kompartiment-spezifisches Leitprotein erkennt (Tab. 4), und einem anti-IFP35-Antikörper. Je nachdem, aus welcher Spezies (Schaf, Ziege, Kaninchen oder Maus) der Organellen- bzw. Kompartiment-spezifische Antikörper stammte, wurde der monoklonale Antikörper oder das polyklonale Antiserum gegen IFP35 eingesetzt. Die verwendeten Zweitantikörper waren mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert.

Antikörper	Kompartiment / Organelle
anti- β COP und anti-Galactosyltransferase	Golgi-Komplex
anti-Catalase	Peroxisomen
anti-Cathepsin D	Lysosomen
anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	späte Endosomen und trans-Golgi Netzwerk
anti-KDEL Peptid	Endoplasmatisches Retikulum
anti-Mitochondriales Antigen	Mitochondrien
anti-S3a	Ribosomen
anti-Transferrin Rezeptor	frühe Endosomen und Zytoplasmamembran

Tab. 4: Liste mit in der Doppelimmunfluoreszenz verwendeten Antikörpern gegen Organellen- bzw. Kompartiment-spezifische Leitproteine

Aufgeführt sind die Antikörper gegen Leitproteine bestimmter Kompartimente und Organellen sowie das Kompartiment, für welches das Leitprotein spezifisch ist.

Bei den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Organellen- und Kompartiment-spezifischen Antikörpern konnten die entsprechenden Zellorganellen und -kompartimente dargestellt werden, es ergab sich aber keine Kolokalisation mit dem charakteristischen IFP35-Verteilungsmuster. Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie bzw. der konfokalen Laser Scan Mikroskopie konnte eine Kolokalisierung von IFP35 mit folgenden Organellen bzw. Kompartimenten ausgeschlossen werden: Golgi-Apparat (anti- β COP-Antikörper; [3]), Endosomen, Zytoplasmamembran und trans-Golgi-Netzwerk (anti-Transferrin-Rezeptor- und anti-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Antikörper; [272;302]), Mitochondrien (anti-mitochondriales Antigen-Antikörper; [139]), Lysosomen (anti-Cathepsin D-Antikörper; [134]) und Peroxisomen (anti-Catalase-Antikörper; [138]). Eine Kolokalisierung mit dem endoplasmatischen Reti-

kulum (anti-KDEL-Antikörper; [309b]) oder Ribosomen (anti-S3a-Antikörper; [193]) war ebenfalls nicht zu beobachten.

Die konfokale Laser Scan Mikroskopie wurde in den Fällen eingesetzt, in denen mit der konventionellen Mikroskopie keine eindeutige Entscheidung über eine Kolo-kalisierung getroffen werden konnte. Beispielhaft sind Ergebnisse für Mitochondrien und Peroxisomen in Abb. 8 dargestellt.

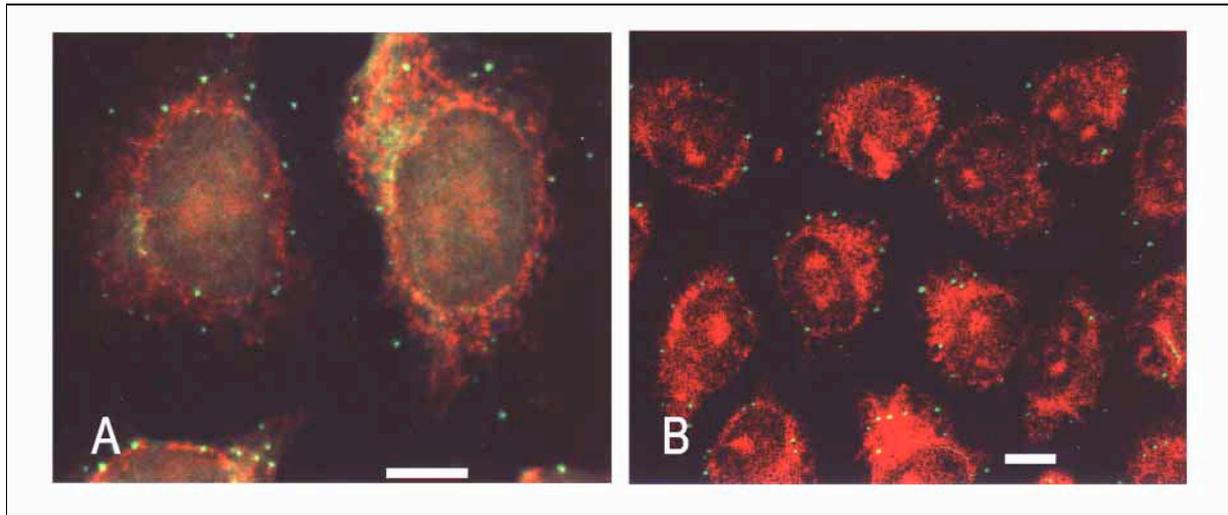


Abb. 8: Untersuchung der Kolo-kalisierung von IFP 35 und Mitochondrien bzw. Peroxisomen

Bei gleichzeitiger Anfärbung mitochondrialer Antigene (A) und des IFP35-Proteins liegen die IFP35-beinhaltenen punktartigen Strukturen (grün) abseits der Mitochondrienfärbung. Bei der Färbung der Catalase (B) als peroxisomalem Leitprotein, wurden in der konfokalen Mikroskopie mehrere Ebenen übereinander gelegt, so daß hier an manchen Stellen Catalase und IFP35 scheinbar kolo-kalisieren (gelbe Punkte). Die Zellen wurden für die Färbung mit dem Mitochondrienmarker 10 min lang mit PFA fixiert und 15 min lang mit 0,2% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert; für die Färbung der Catalase wurde mit Methanol und Azeton fixiert. Es wurde mit 10% FCS, 0,1% Saponin in PBS abgesättigt und die Immunfluoreszenz mit anti-mitochondrialem Antigen-Antikörper und polyklonalem anti-IFP35-Antiserum (A) bzw. mit anti-Catalase-Antiserum und monoklonalem anti-IFP35-Antikörper (B) durchgeführt. Als Zweitantikörper dienten bei der Mitochondrienfärbung FITC-konjugierter anti-Kaninchen- bzw. TRITC-konjugierter anti-Maus-Antikörper (Spezies: Ziege) und bei der Peroxisomenfärbung TRITC-konjugierter anti-Kaninchen- bzw. FITC-konjugierter anti-Maus-Antikörper (Spezies: Ziege). Die Aufnahme erfolgte am konfokalen Laser Scan Mikroskop in Intervallen von 0,25 μm ; dargestellt sind kombinierte Z-Serien. Der Marker entspricht 10 μm .

4.1.5 Subzelluläre Lokalisierung von IFP 35 mittels subzellulärer Fraktionierung

Die Ergebnisse der Kolo-kalisierungsexperimente deuteten auf eine Lokalisierung von IFP35 im Zytoplasma hin. Um dies näher zu untersuchen, wurden Zellextrakte von IFN- γ -induzierten HeLaS3-Zellen hergestellt und subzelluläre Fraktionierungen durchgeführt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet: zum einen die differentielle Zentrifugation, bei der die Organellen und Kompartimente ihrem Sedimentationskoeffizienten entsprechend bei unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung sedimentiert werden und zum anderen die Gleich-

gewichts-Dichtegradientenzentrifugation, bei der eine Auftrennung der Organellen und Kompartimente entsprechend ihrer Dichte erfolgt.

Zunächst wurden Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. HeLa S3-Zellen wurden mit IFN- γ induziert, im Dounce-Homogenator mechanisch aufgeschlossen und Zelltrümmer und Nuklei durch Zentrifugation entfernt. Der postnukleäre Überstand wurde auf eine Percoll-Lösung mit einer Dichte von 1,07 g/ml, 1,05 g/ml bzw. 1,04 g/ml geschichtet und zentrifugiert. Die Entladung erfolgte von oben und die Analyse der gesammelten Fraktionen mittels Western Blot. Dabei wurde der Western Blot zum einen mit anti-IFP35-Antikörpern entwickelt, um die Lokalisierung von IFP35 zu ermitteln. Zum anderen wurde mit Antikörpern gegen Organellen- bzw. Kompartiment-spezifische Leitproteine entwickelt; dies diente, zusammen mit Markern („Density Marker Beads“), die bei der Zentrifugation zur Bestimmung des Dichteverlaufs des Gradienten mitgeführt wurden, der Kontrolle der Zellfraktionierung.

Die Auftrennung von zytoplasmatischem Extrakt im Percoll-Gradienten einer Ausgangsdichte von 1,07 g/ml ergab keine ausreichende Trennung von Zellorganellen und zytoplasmatischen Proteinen. Bei Einsatz eines Percoll-Gradienten mit einer Ausgangsdichte von 1,05 g/ml ergab sich eine verbesserte Trennung der Fraktionen. Nach Beendigung der Zentrifugation hatte sich ein Dichtegradient von ca. 1,0 g/ml bis 1,9 g/ml eingestellt (Abb. 9 oben). Die Kompartiment-spezifischen Leitproteine sedimentierten vorrangig in den erwarteten Fraktionen. Die Mitochondrien sedimentierten sowohl in den Fraktionen der geringsten als auch der größten Dichte. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß die Mitochondrien aufgrund ihrer Größe sehr leicht im Rahmen des mechanischen Zellaufschlusses partiell zerstört werden und somit ein Teil der mitochondrialen Proteine in der zytoplasmatischen Fraktion zu finden ist. Ein partieller Aufschluß dieser großen Organellen ließ sich mit den zur Verfügung stehenden Mitteln, d.h. Einsatz von hypotonischen Aufschlußpuffern und kürzerem mechanischem Aufschluß, nicht vollständig verhindern. Auch der lysosomale Marker Cathepsin D war in geringen Mengen in der Fraktion geringster Dichte anzutreffen, sedimentiert aber vorrangig in Fraktionen größter Dichte. Transferrin als Endosomen- und Plasmamembranmarker, sowie Catalase als Peroxisomenmarker und Ribosomen (anti-S26 Antikörper) sedimentierten zusammen mit IFP35 in den beiden Fraktionen geringster Dichte (Abb. 9 unten).

Um eine bessere Trennung des IFP35-Proteins von Peroxisomen und Endosomen zu erreichen, wurde ein Percoll-Gradient mit einer Dichte von 1,04 g/ml gewählt. IFP35 und S26 sedimentierten wiederum in den Fraktionen geringster Dichte, während der peroxisomale Marker vorrangig in Fraktionen größerer Dichte anzutreffen war. Der endosomale Marker fand sich in der zweiten Fraktion wieder (Abb. 10). Aufgrund der Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation konnte eine Kollokalisierung mit Zellorganellen und definierten Kompartimenten ausgeschlossen werden, da IFP35 zusammen mit dem ribosomalen Marker in der Fraktion geringster Dichte kosedimentiert.

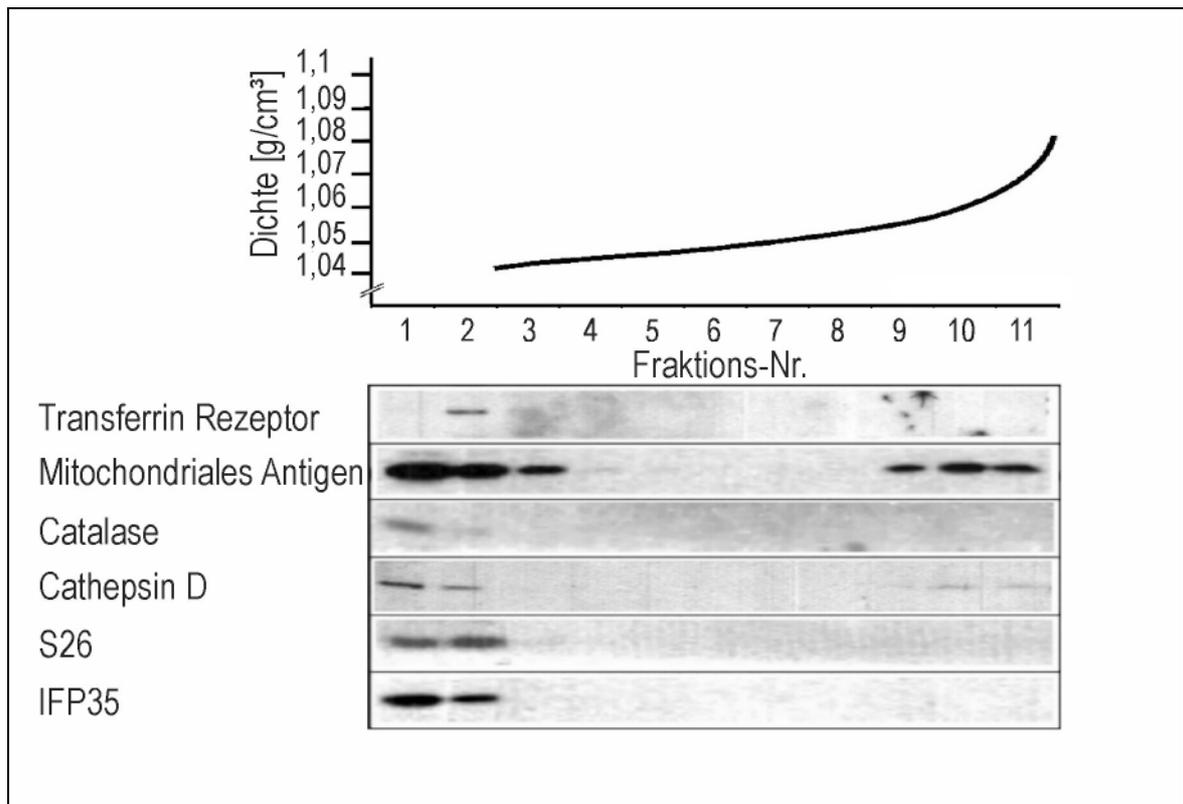


Abb. 9: Subzelluläre Fraktionierung unter Verwendung eines Percoll-Gradienten mit einer Anfangsdichte von $1,05 \text{ g/cm}^3$

Abgebildet ist ein Western Blot mit Fraktionen einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation, in der postnukleärer Überstand aufgetrennt wurde (unten); der Western Blot wurde mit unterschiedlichen Antikörpern, spezifisch für Leitproteine bestimmter Zellorganellen und -kompartimente, entwickelt. Im oberen Teil ist der Dichteverlauf des Gradienten, bestimmt über die Verteilung von Marker-Partikeln im Gradienten, zu sehen. HeLS3-Zellen wurden für 24 h mit $\text{IFN-}\gamma$ induziert und mechanisch aufgeschlossen; postnukleärer Überstand wurde über Percoll-Lösung einer Dichte von $1,05 \text{ g/cm}^3$ geschichtet und zentrifugiert. Die Entladung des dabei entstehenden Gradienten erfolgte von oben. Für den Western Blot wurden die Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit unterschiedlichen Antikörpern entwickelt: anti-Transferrin-Rezeptor, anti-mitochondriales Antigen, anti-Catalase, anti-Cathepsin D, anti-S26 und anti-IFP35.

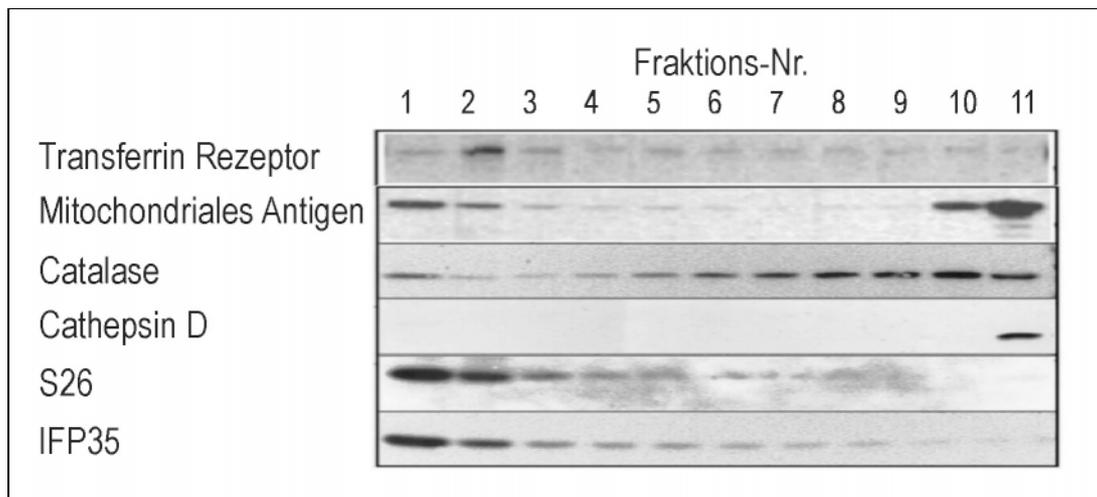


Abb. 10: Subzelluläre Fraktionierung unter Verwendung eines Percoll-Gradienten mit einer Anfangsdichte von $1,04 \text{ g/cm}^3$

Zu sehen ist ein Western Blot mit Fraktionen einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation, in der postnukleärer Überstand aufgetrennt wurde (unten); der Western Blot wurde mit unterschiedlichen Antikörpern, spezifisch für Leitproteine bestimmter Zellorganellen und Zellkompartimente, entwickelt. HeLa S3-Zellen wurden 24 h lang mit IFN- γ induziert und mechanisch aufgeschlossen; postnukleärer Überstand wurde über Percoll-Lösung einer Dichte von $1,04 \text{ g/cm}^3$ geschichtet und zentrifugiert. Die Entladung des dabei entstehenden Dichtegradienten erfolgte von oben. Die Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und der Western Blot mit unterschiedlichen Antikörpern entwickelt: anti-Transferrin-Rezeptor, anti-mitochondriales Antigen, anti-Catalase, anti-Cathepsin D, anti-S26 und anti-IFP35.

Eine Differenzierung zwischen zytoplasmatischer Lokalisierung von IFP35 und Bindung an die Zytoplasmamembran wurde mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation vorgenommen. Hierbei wurden HeLa S3-Zellen in $0,25 \text{ M}$ Sucrose im Dounce-Homogenator aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Reihe von Zentrifugationsschritten bei denen sukzessiv Nuklei und Zelltrümmer, Mitochondrien, Peroxisomen, Mikrosomen und Membranen sedimentiert wurden. IFP35 konnte bei dieser Form der subzellulären Fraktionierung zu einem gewissen Anteil in der mitochondrialen Fraktion und in der mikrosomalen Fraktion isoliert werden; vorrangig wurde IFP35 in der zytoplasmatischen Fraktion, dem $100000\times\text{g}$ -Überstand, vorgefunden (Abb. 11). Die vorrangige Lokalisierung von IFP35 im $100000\times\text{g}$ -Überstand, wiederum zusammen mit dem ribosomalen Marker S26 (Daten nicht gezeigt), bestätigt die Vermutung, daß der größte Teil des Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion anzutreffen ist.

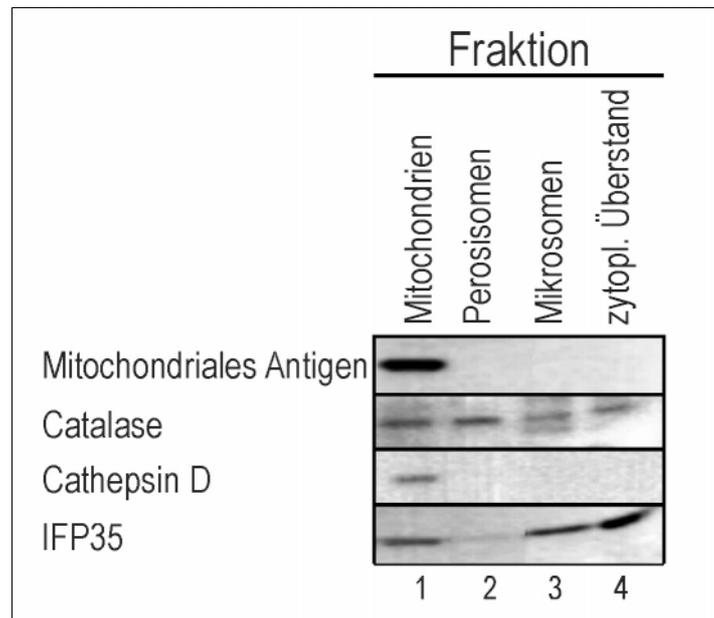


Abb. 11: Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation

Dargestellt ist ein Western Blot mit Fraktionen der differentiellen Zentrifugation: mitochondriale (Spur 1), peroxisomale (Spur 2), mikrosomale Fraktion (Spur 3) sowie 100000xg-Überstand (Spur 4); der Blot wurde mit unterschiedlichen, für Leitproteine von Organellen bzw. Kompartimenten spezifischen, Antikörpern entwickelt. HeLa S3-Zellen wurden für 24 h mit IFN- γ induziert, mechanisch aufgeschlossen und sukzessiv Nuklei, Mitochondrien, Peroxisomen und Mikrosomen sedimentiert. Der bei einer Zentrifugation bei 100000xg erhaltene Überstand wird als 100000xg-Überstand bezeichnet und enthält vorrangig zytoplasmatische Proteine. Die einzelnen Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Der Western Blot wurde mit folgenden Antikörpern entwickelt: anti-mitochondriales Antigen, anti-Catalase, anti-Cathepsin D und anti-IFP35.

4.1.6 Elektronenmikroskopische Analyse der IFP 35-Strukturen

Zur Bestätigung der Vermutung, daß IFP35 zytoplasmatisch lokalisiert ist, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Die Zellen wurden fixiert und von Dr. M. Rohde der „postembedding labeling“-Technik unterzogen. Dabei wurden Protein G-aufgereinigtes anti-IFP35-Antiserum und Protein A-Gold-Komplexe (10 nm Goldpartikelgröße) eingesetzt. Es zeigte sich, daß IFP35 weder mit einem Zellkompartiment noch mit einer Organelle assoziiert ist. Die Goldpartikel waren in Aggregaten über das Zytoplasma verteilt. Diese Aggregate enthielten im Durchschnitt 6-12 Goldpartikel, was auf eine Aggregation von IFP35 im Zytoplasma hindeutet (Abb. 12); nicht induzierte Zellen waren annähernd ohne Goldpartikel (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung verschiedener Einbettmedien (LRWhite und Lowicryl K4M) ergab gleiche Ergebnisse. Eine Gegenfärbung der Schnitte mit Uranylacetat zeigte, daß die Aggregate nicht von einer Membran umgeben sind. Bei der Auszählung von 50 Clustern fand sich nur ein Cluster, welches an der Zytoplasmamembran lokalisiert war und zwei Cluster, die in der Nähe der Zellkernmembran lagen.

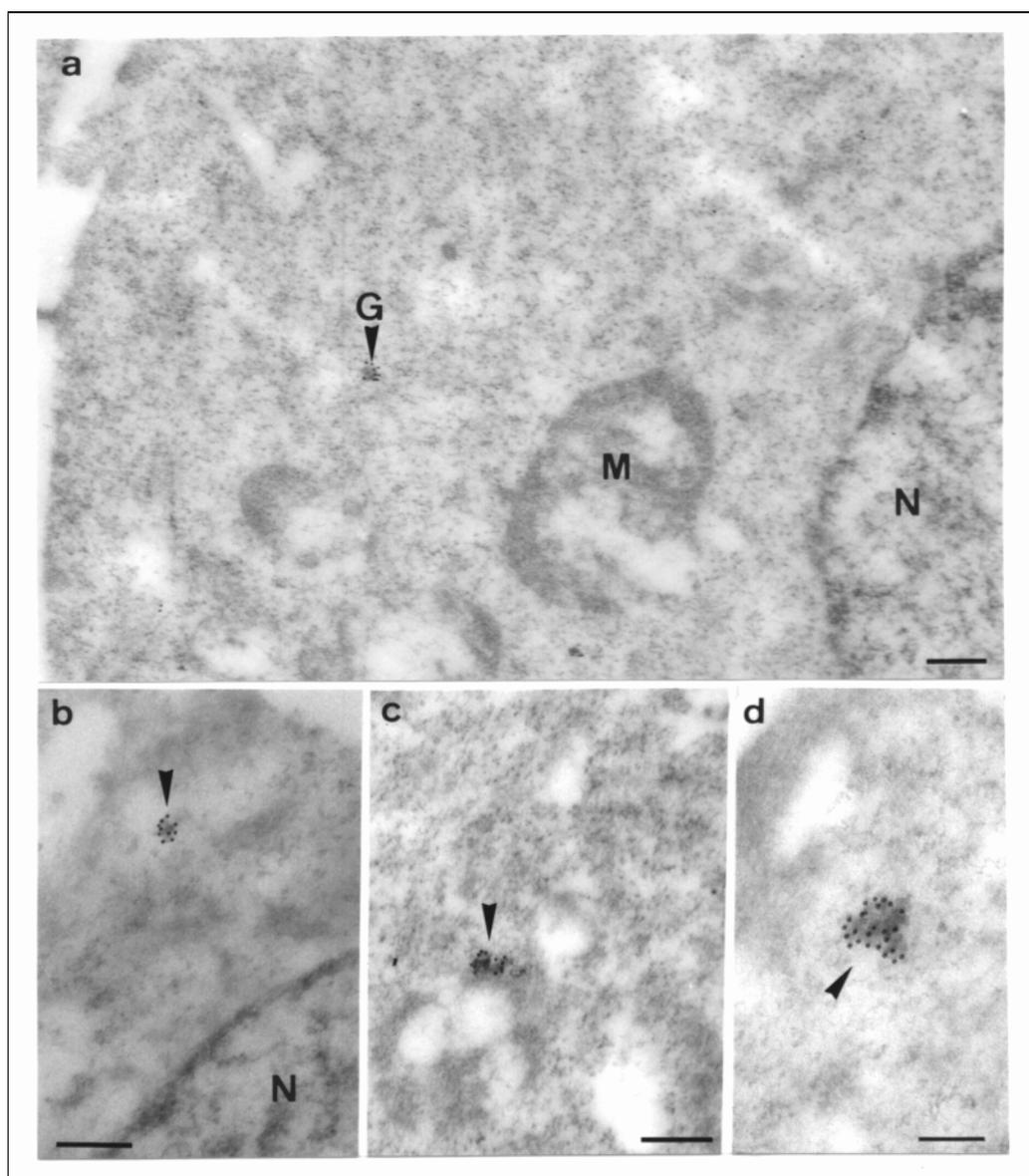


Abb. 12: Lokalisierung von IFP 35 in der Elektronenmikroskopie

Bild **a** zeigt einen Überblick, wobei der Pfeil auf ein Goldpartikelaggregat zeigt. In **b** und **c** sind repräsentative Aggregate zu sehen; hierbei wurden $125 \mu\text{g IgG/ml}$ Erstantikörper eingesetzt. Bei der Auszählung von 50 Clustern konnten im Durchschnitt $8,8 \pm 1,8$ Goldpartikel pro Aggregat gezählt werden. Bild **d** zeigt repräsentative Aggregate, die bei Einsatz von $250 \mu\text{g IgG/ml}$ Erstantikörper beobachtet werden können. Zellen, die zur Kontrolle mit polyklonalem anti-MBP Antiserum, gefolgt von Protein A-Komplexen, behandelt worden waren, zeigten keine Goldkomplexe. Die Balken repräsentieren 200 nm. Mit G bzw. Pfeilen sind die Goldpartikelkomplexe gekennzeichnet, mit M Mitochondrien und mit N der Nukleus.

Aufgrund der Ergebnisse aus Immunfluoreszenz, subzellulärer Fraktionierung und Elektronenmikroskopie kann gefolgert werden, daß IFP35 zytoplasmatisch lokalisiert ist, nicht mit einer Membran assoziiert ist und vermutlich Aggregate im Zytoplasma bildet.

4.1.7 Bestimmung des Molekulargewichts der IFP 35-enthaltenden Aggregate

Mit Hilfe der Gelfiltration wurde im folgenden untersucht, wie groß das native Molekulargewicht von IFP35 bzw. der IFP35-Aggregate ist.

Zu diesem Zweck wurden IFN- γ -induzierte HeLaS3-Zellen mechanisch aufgeschlossen, postnukleärer Überstand auf einer Superose6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen im Western Blot untersucht. IFP35, dessen theoretisches Molekulargewicht ca. 31,74 kDa beträgt, eluierte bei einem Molekulargewicht von 150-440 kDa, dem 5 bis 12fachen des Molekulargewichts von IFP35 (Abb. 13). Die ordnungsgemäße Auftrennung der Proteine wurde mittels Silbergel überprüft (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz eines Zellaufschußpuffers, der eine Zusammensetzung aufwies, die intrazellulären Salzkonzentrationen entspricht (Intrazellularpuffer), anstelle des PBS, ergab das gleiche Ergebnis. Die Ergebnisse zeigen, daß IFP35 in der Zelle Aggregate bildet.

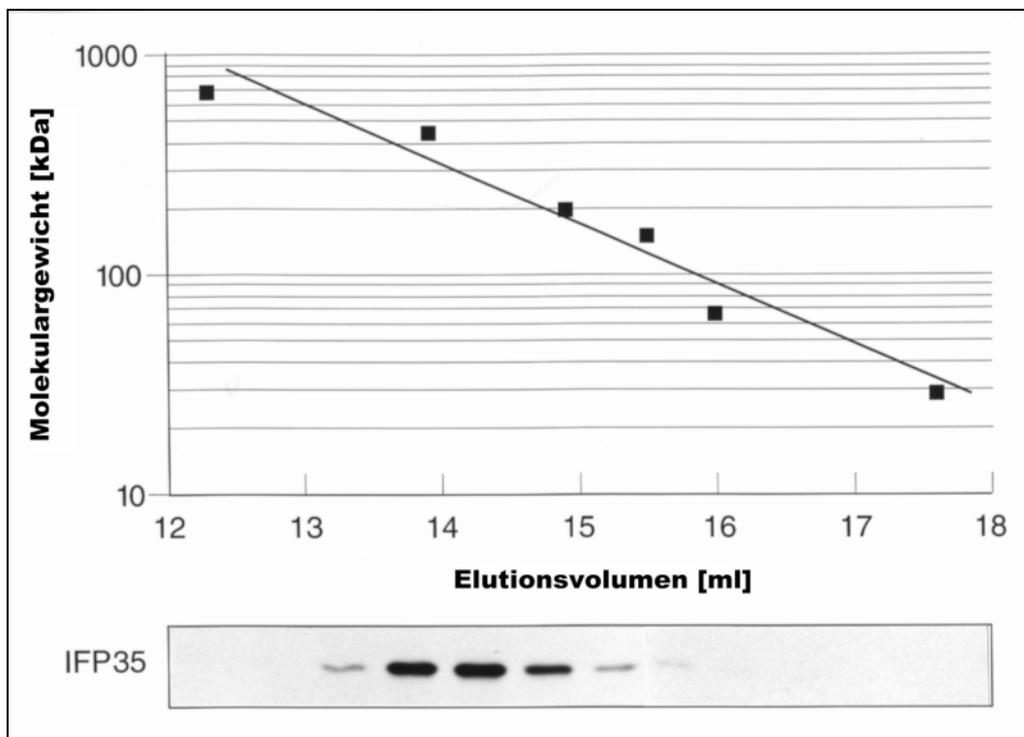


Abb. 13: Bestimmung des nativen Molekulargewichts von IFP35 mit Hilfe der Gelfiltration

IFP35 eluiert vorrangig bei einem Molekulargewicht von 150-440 kDa. HeLaS3-Zellen wurden mit 1000 U/ml IFN- γ für 24 h induziert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in PBS aufgenommen, homogenisiert und Zelltrümmer und Nuklei durch Zentrifugation entfernt. Der postnukleäre Überstand wurde auf eine Superose6-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit PBS bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,25 ml/min; es wurden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt und im Western Blot mit anti-IFP35-Antiserum analysiert. Die Säule wurde mit Molekulargewichtsmarkern kalibriert: Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), beta-Amylase (200 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa).

4.1.8 Nachweis der IFN-unabhängigen Bildung der IFP 35-enthaltenden Aggregate und der Homodimerisierung von IFP 35

Um zu untersuchen, ob die Bildung des punktförmigen IFP35-Expressionsmusters von einer IFN-Induktion und somit evtl. von der Expression eines ebenfalls nach IFN-Induktion vermehrt exprimierten Faktors abhängig ist, wurden transiente Transfektionen durchgeführt. HeLaS3-Zellen wurden transient mit einem eukaryontischen Expressionsplasmid transfiziert, das für HA-markiertes rekombinantes IFP35 kodiert. Die Zellen wurden mit IFN- γ induziert und eine Doppelimmunfluoreszenz mit anti-HA-Antikörper und polyklonalem anti-IFP35-Antiserum durchgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob sich das rekombinante HA-markierte IFP35 genauso in der IFN- γ -induzierten Zelle verhält wie das endogene IFP35. Bei Betrachtung der IFN- γ -induzierten mit dem IFP35-Expressionskonstrukt transfizierten Zellen wurde beobachtet, daß sich das mit einer HA-Markierung versehene rekombinante IFP35 genauso in der Zelle verteilt wie das endogene IFP35 (vergleiche Abb. 6 und Abb. 14); bei Durchführung einer Doppelimmunfluoreszenz mit anti-HA-Antikörper und anti-IFP35-Antiserum wurden keine Punkte registriert, die vom anti-IFP35-Antiserum aber nicht vom anti-HA-Antikörper erkannt werden (Daten nicht gezeigt); ein Indiz für die Interaktion von rekombinatem und endogenem IFP35.

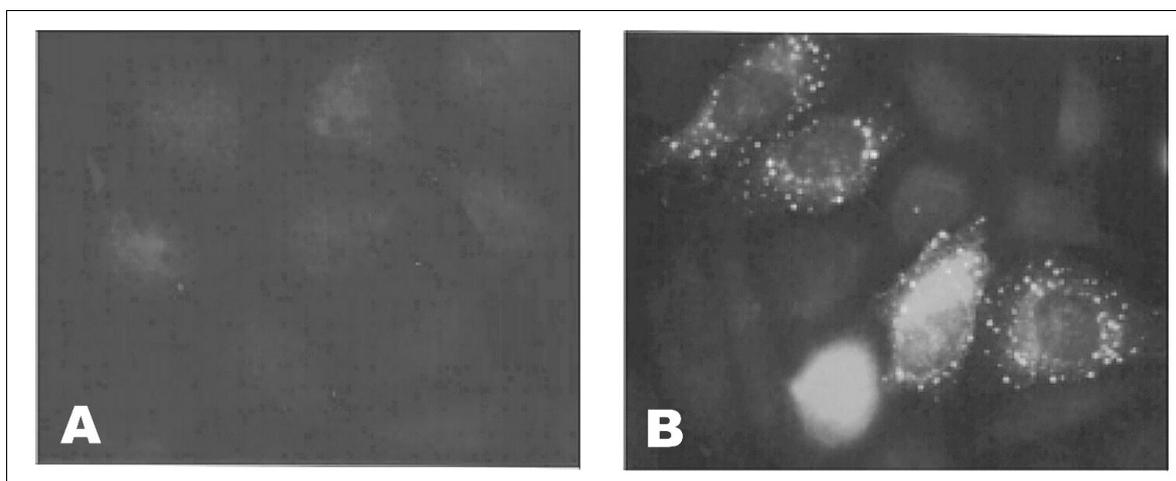


Abb. 14: Aggregatbildung von IFP 35 in transfizierten HeLa S3-Zellen

Dargestellt sind nur mit dem Vektor transfizierte Zellen (A) und Zellen, die HA-markiertes rekombinantes IFP35 exprimieren (B). Für den Versuch wurden HeLaS3-Zellen mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pDCR (A) bzw. mit dem pDCRIFP35-Konstrukt (B), welches für HA-markiertes rekombinantes IFP35 kodiert, transfiziert und mit 1000 U/ml IFN- γ 24 h lang induziert. Anschließend erfolgte für 10 min eine Fixierung der Zellen mit PFA, eine Behandlung mit 100 mM Ammoniumchlorid in PBS für 15 min und eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 10% FCS, 0,05% NP-40 in PBS. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit monoklonalem anti-HA-Antikörper durchgeführt. Als Zweitantikörper diente TRITC-konjugierter anti-Maus-Antikörper (Spezies: Ziege). Die Aufnahme erfolgte an Zeiss Axiophot.

Darüber hinaus wurde beobachtet, daß das spezifische IFP35-Muster auch in transfizierten Zellen auftritt, die nicht mit IFN- γ induziert worden waren.

Der definitive Beweis für die Kolo-kalisierung von rekombinantem und endogenem IFP35 und für die Homodimerisierung der beiden Proteine wurde mit Hilfe von Immunpräzipitations-experimenten erbracht. HeLaS3-Zellen wurden mit einem Expressionskonstrukt, kodierend für rekombinantes HA-markiertes IFP35, transfiziert und mit IFN- γ induziert. Die Zellen wurden lysiert und der postnukleäre Überstand in eine Immunpräzipitation mit anti-HA-Antikörper eingesetzt. Dabei konnte das endogene IFP35 mit dem HA-markierten rekombinanten IFP35 präzipitiert werden (Abb. 15).

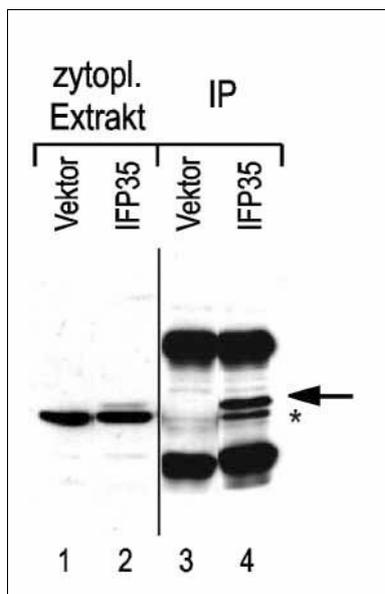


Abb. 15: Koimmunpräzipitation von endogenem und HA-markiertem IFP 35

Gezeigt ist zytoplasmatischer Extrakt (Spur 1 und 2) bzw. Immunpräzipitat (Spur 3 und 4) von mit Vektor (pDCR; Spur 1 und 3), bzw. IFP35-Expressionskonstrukt (pDCRIFP35; Spur 2 und 4) transfizierten Zellen. HeLaS3-Zellen wurden transfiziert und anschließend für 24 h mit IFN- γ induziert. Die Zellen wurden abgelöst, lysiert und zentrifugiert. 130 μ l Gesamtlysat und 12,5 μ l 0,4 mg/ml anti-HA-Antikörper wurden auf 200 μ l mit Lysispuffer aufgefüllt. Die ProteinG-Sepharose wurde 4x gewaschen und in 30 μ l SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mit dem Antikörper gegen IFP35. Die Bande des rekombinanten IFP35 (Pfeil) in Spur 2 ist nur sehr schwach zu sehen, da das rekombinante IFP35 nur gering größer ist als das endogene IFP35 (Stern) und vom stark exprimierten endogenen IFP35 schlecht abgetrennt werden kann.

Es wurde somit die Aggregatbildung von IFP35 in transfizierten Zellen gezeigt. Ob es sich dabei um Homomultimere oder um Heteromultimere unter Mitwirkung anderer Proteine handelt, ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht zu entscheiden.

4.1.9 Abhängigkeit des spezifischen IFP 35-Verteilungsmusters von der Proteinbiosynthese

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bildung der IFP35-Aggregate von der Expression anderer Proteine abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden HeLaS3-Zellen zum einen für Immunfluoreszenzstudien und parallel dazu für die Gewinnung von Zellextrakten ausplattiert. Die Zellen wurden entweder parallel mit CHX und IFN- γ 24 h lang behandelt oder zuerst 24 h lang mit IFN- γ induziert und anschließend unterschiedlich lange zusätzlich mit CHX behandelt. Die Immunfluoreszenz wurde mit polyklonalem anti-IFP35-Antiserum entwickelt und die für die Gewinnung von Gesamtextrakt vorgesehenen Zellen in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen und im Western Blot mit anti-IFP35-Antiserum analysiert.

Es zeigte sich, daß die Aggregatbildung von IFP35 und die vermehrte Expression von IFP35 nach IFN- γ -Induktion ausblieben, wenn parallel zur IFN- γ -Induktion die Proteinbiosynthese mit CHX inhibiert wurde. Außerdem wurde beobachtet, daß Zellen, die für 24 h mit IFN- γ induziert worden waren, die typische IFP35-Struktur zeigten, diese Aggregate aber bereits 0,5 h nach Zugabe von CHX an Intensität verloren. Im Verlauf der CHX Behandlung verlor das Punktmuster kontinuierlich an Intensität, bis nach 2 h nur noch einzelne Punkte zu erkennen waren. Drei Stunden nach Zugabe von CHX zu den IFN- γ -induzierten Zellen konnte die spezifische IFN-induzierte IFP35-Struktur nicht mehr beobachtet werden (Abb. 16).

Im Western Blot zeigte sich, daß die Menge an IFP35 in dieser Zeit nicht abnahm (Abb. 17).

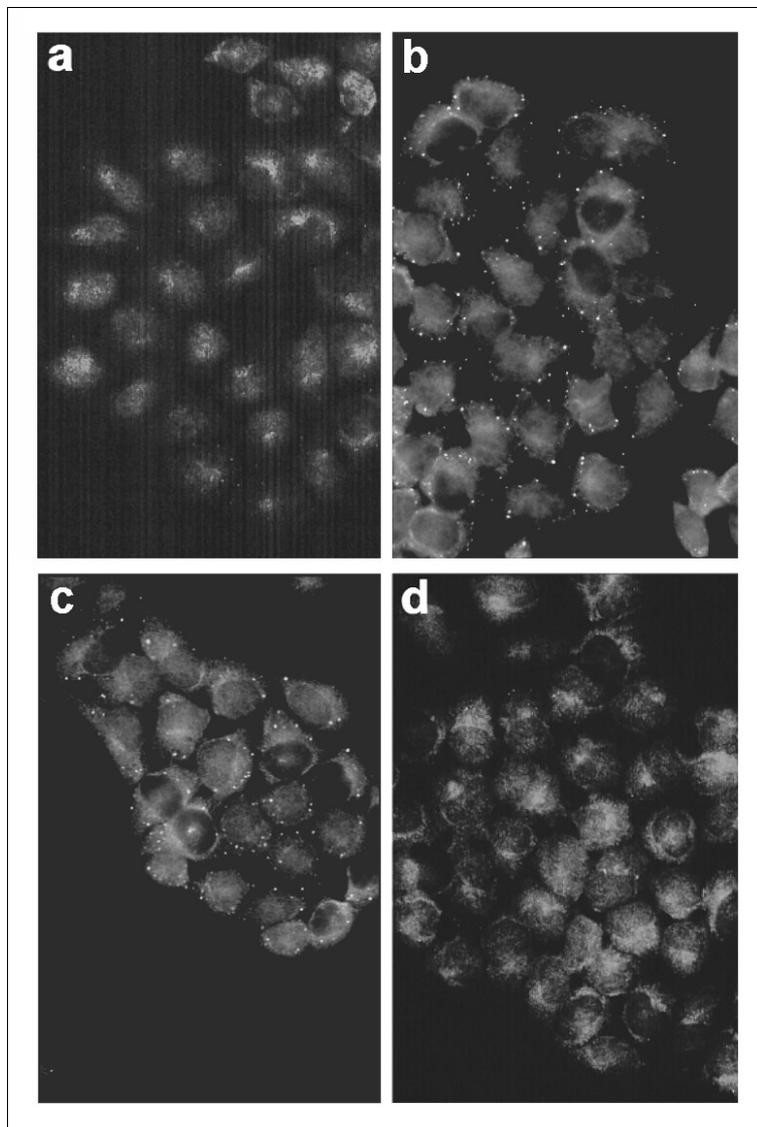


Abb. 16: Behandlung IFN- γ -induzierter HeLa S3-Zellen mit Cycloheximid (Immunfluoreszenz)

HeLa S3-Zellen wurden für 24 h mit IFN- γ induziert (b-d) und anschließend für 1 h (c) bzw. 3 h (d) mit Cycloheximid behandelt; unbehandelte Kontrollzellen (a). Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit IFN- γ (1000 U/ml) induziert; 24 h später erfolgte der Zusatz von 50 μ g/ml CHX. Alle Ansätze wurden 30 min lang mit PFA fixiert und über Nacht mit 10% FCS, 0,1% Saponin in PBS abgesättigt. Als Erstantikörper wurde das polyclonale anti-IFP35-Antiserum und als Zweitantikörper FITC-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege verwendet. Die Aufnahme erfolgte am Zeiss Axiophot.

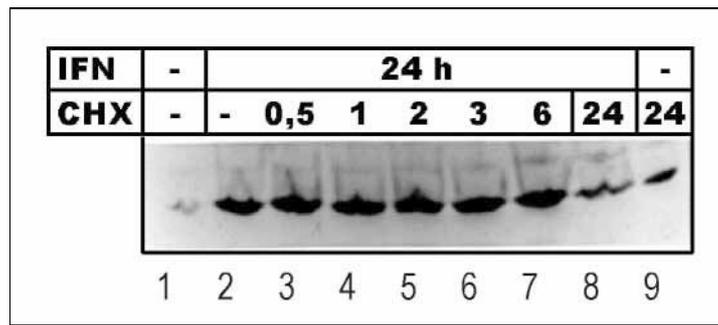


Abb. 17: Behandlung IFN- γ -induzierter Zellen mit Cycloheximid (Western Blot)

Für den parallel zur Immunfluoreszenz durchgeführten Western Blot wurden HeLa S3-Zellen ausplattiert, am folgenden Tag mit IFN- γ (1000 U/ml; Spur 2-7) bzw. mit IFN- γ (1000 U/ml) und CHX (50 μ g/ml) gleichzeitig (Spur 8) oder nur mit CHX (50 μ g/ml; Spur 9) behandelt; 24 h später wurden die mit IFN- γ induzierten Zellen für 0,5 h (Spur 3), 1 h (Spur 4), 2 h (Spur 5), 3 h (Spur 6) oder 6 h (Spur 7) mit 50 μ g/ml CHX behandelt; nicht behandelte Zellen (Spur 2); Zellen, die weder mit CHX noch mit IFN- γ behandelt wurden sind in Spur 1 zu sehen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen und 15 μ l im Western Blot unter Verwendung des polyklonalen anti-IFP35-Antiserums analysiert.

4.1.10 Abhängigkeit des zytoplasmatischen IFP35-Verteilungsmusters von Substanzen, die das Zytoskelett beeinträchtigen

Die Beobachtung, daß IFP35 nicht wie viele andere zytoplasmatische Proteine mehr oder weniger homogen im Zytoplasma verteilt ist, sondern in Aggregaten im Zytoplasma auftritt und in einer Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten unter Verwendung von NP-40 vorrangig in der nukleären Fraktion vorzufinden ist (in der auch Teile des Zytoskeletts lokalisieren), führte zu der Vermutung, daß IFP35 mit dem Zytoskelett assoziiert sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit anti-IFP35-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin durchgeführt. Phalloidin lagert sich an die F-Aktin-Elemente in der Zelle an und dient dementsprechend als Marker für die Lokalisierung des Aktins [327]. Die Immunfluoreszenz wurde unter Einsatz der konfokalen Laser Scan Mikroskopie analysiert. Eine Kolokalisierung mit dem Aktinskelett konnte nicht beobachtet werden (Abb. 18a).

Darüber hinaus wurden HeLa S3-Zellen mit Cytochalasin D bzw. Nocodazol behandelt. Cytochalasin D ist ein Agens, welches das Aktinskelett zerstört [250], Nocodazol depolymerisiert Mikrotubuli [259;335]. Dabei wurde zuerst Cytochalasin D bzw. Nocodazol zu den Zellen gegeben; anschließend wurden die Zellen mit IFN- γ 24 h lang induziert. Abgesehen von einer starken Beeinträchtigung der Zellmorphologie konnte kein Effekt auf die Bildung der IFP35-Aggregate beobachtet werden. Die Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten aus IFN- γ -induzierten Zellen, die im Anschluß an eine 24stündige IFN- γ -Induktion zusätzlich 4 h lang mit Cytochalasin D bzw. Nocodazol behandelt worden waren, ergab keine

Änderung der Lokalisierung von IFP35; IFP35 wurde immer noch vorrangig aus der nukleären Fraktion isoliert (Daten nicht gezeigt).

4.1.11 IFP 35 und Zytokeratine

Nachdem eine Interaktion von IFP35 mit dem Aktinskelett und dem Mikrotubulinnetz nicht beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob IFP35 in HeLa S3-Zellen mit Intermediärfilamenten interagiert. Doppelimmunfluoreszenzstudien mit IFP35 und den in HeLa S3-Zellen exprimierten Zytokeratinen 7, 8, 17 und 18 [213] zeigten keine eindeutige Kolo-kalisierung.

Da in SW1573- und A549-Zellen ein etwas anderes IFP35-Verteilungsmuster beobachtet werden konnte, bei dem die IFP35-Aggregate sich z.T. entlang von „Bögen“ formierten (Pfeile in Abb. 18b), wurde auch in diesen Zellen eine Kolo-kalisierung mit Zytokeratinen untersucht. SW1573- und A549-Zellen exprimieren u.a. Zytokeratin 19 und es wurde dementsprechend eine Doppelimmunfluoreszenz mit anti-IFP35 und anti-Zytokeratin 19 in IFN- γ -induzierten Zellen durchgeführt. In der Epifluoreszenzmikroskopie war zu beobachten, daß der Teil der IFP35-Aggregate, der die bogenförmigen Strukturen formt, mit Zytokeratin 19 kolo-kalisiert (Abb. 18).

IFP35 ist somit, wie es auch das Verhalten in der „NP-40-Präparation“ von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten vermuten läßt, zumindest zum Teil mit dem Zytoskelett assoziiert.

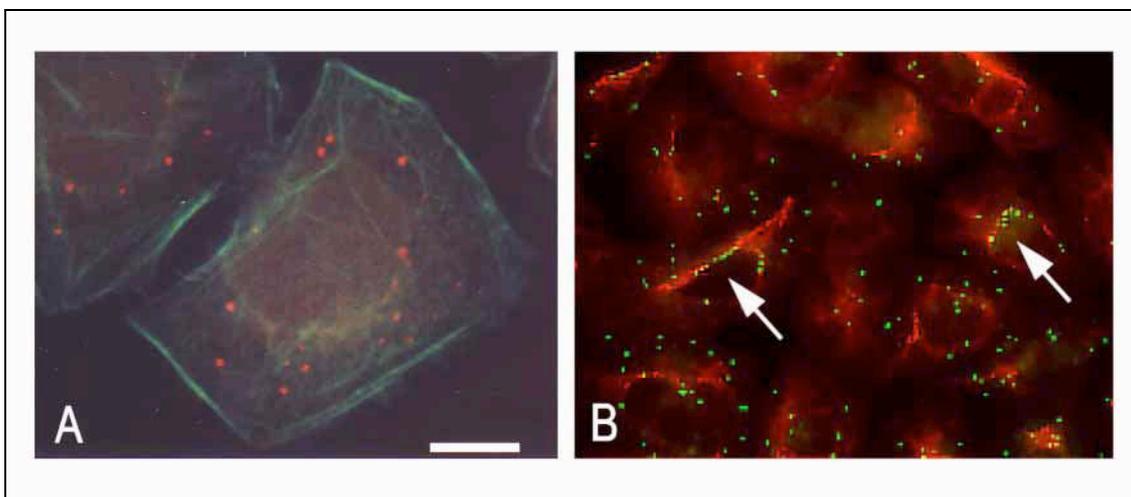


Abb. 18: Partielle Kolo-kalisierung von IFP 35 und CK 19 in IFN- γ -induzierten SW1573-Zellen

Die Doppelimmunfluoreszenz von Aktinskelett (grün) und IFP35 (rot) ist in Abbildung A dargestellt. Die Doppelimmunfluoreszenz von IFP35 (grün) und CK 19 (rot) ist in B zu sehen; Bereiche in denen IFP35 und CK 19 kolo-kalisieren sind exemplarisch mit einem Pfeil markiert worden. Die Zellen wurden für die Immunfluoreszenz auf Deckgläschen ausplattiert und am folgenden Tag für 24 h mit IFN- γ (1000 U/ml) induziert. Die Zellen wurden 10 min lang mit PFA fixiert, 5 min lang mit 0,1% (B) bzw. 0,2% (A) Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Die indirekte Immunfluoreszenz fand unter Einsatz des polyklonalen anti-IFP35-Antiserums (A und B), FITC-markiertem Phalloidin (A) bzw. eines monoklonalen Antikörpers gegen CK 19 (B) statt. Als Sekundärantikörper wurden ein TRITC-konjugierter anti-Maus- und ein TRITC- (A) bzw. FITC-konjugierter (B) anti-Kaninchen-Antikörper aus Esel eingesetzt. Die Aufnahme erfolgte am Zeiss Axiophot.

4.1.12 Interaktion von IFP 35 und B-ATF

Während der Arbeit an der subzellulären Lokalisierung von IFP 35 wurde eine Interaktion von IFP35 mit B-ATF berichtet [319].

B-ATF wurde von Dorsey et al. aus einer cDNA-Genbank isoliert, die aus mRNAs Eppstein Barr Virus-stimulierter B-Zellen generiert worden waren. Die B-ATF-cDNA kodiert für ein 125 Aminosäuren großes Protein, welches in transfizierten COS 1-Zellen eine nukleäre Verteilung aufweist. B-ATF weist am Aminoterminus eine Serin-reiche Region gefolgt von einem Leuzin-Zipper mit basischer Region, auf. Eine Homodimerisierung von B-ATF konnte nicht nachgewiesen werden. B-ATF bildet Heterodimere mit Jun-B, c-Jun und c-Fos und bindet in Verbindung mit c-Jun an die AP-1-Erkennungssequenz. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß B-ATF mit anderen Proteinen interagieren und dadurch entweder Einfluß auf die Transkription bestimmter Gene nehmen oder durch die Bindung an Leuzin-Zipper-Proteine als negativer Regulator wirken könnte [94;319].

B-ATF und IFP35 werden in B- und T-Zelllinien koexprimiert. Die beiden Proteine zeigen in einer Präparation zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte ein gleiches Verteilungsmuster. Eine Interaktion von B-ATF und IFP35 konnte sowohl im Rahmen des interaktiven Klonierens im „Two Hybrid“ System [11] als auch durch Kopräzipitation von Fusionsproteinen *in vitro* nachgewiesen werden. Eine Bindung von IFP35 mit Jun-B oder eine transaktivierende Wirkung von IFP35 konnte im Hefesystem nicht beobachtet werden. In HeLaS3-Zellen, auf die sich die vorangegangenen Arbeiten konzentrierten, wird B-ATF nicht exprimiert [94;319].

Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von IFP35 und B-ATF wurden HeLaS3-Zellen mit einem eukaryontischen Expressionsplasmid, das für HA-markiertes rekombinantes IFP35 bzw. B-ATF kodiert, transfiziert. Es wurde zytoplasmatischer Extrakt gewonnen und eine Immunpräzipitation mit anti-HA-Antikörper bzw. polyklonalem anti-IFP35-Antiserum durchgeführt. Eine Interaktion der beiden Proteine ließ sich nicht nachweisen. Während mit dem anti-HA-Antikörper aus Zellextrakten von Zellen, die mit dem IFP35-Expressionskonstrukt transfiziert worden waren, das endogene IFP35 präzipitiert werden konnte (Abb. 19; Spur 5), konnte aus Extrakten von Zellen, die rekombinantes B-ATF exprimierten, weder mit anti-IFP35-Antiserum das HA-markierte rekombinante B-ATF (Abb. 19; Spur 9) noch mit dem anti-HA-Antikörper das endogene IFP35 kopräzipitiert werden (Abb. 19; Spur 6).

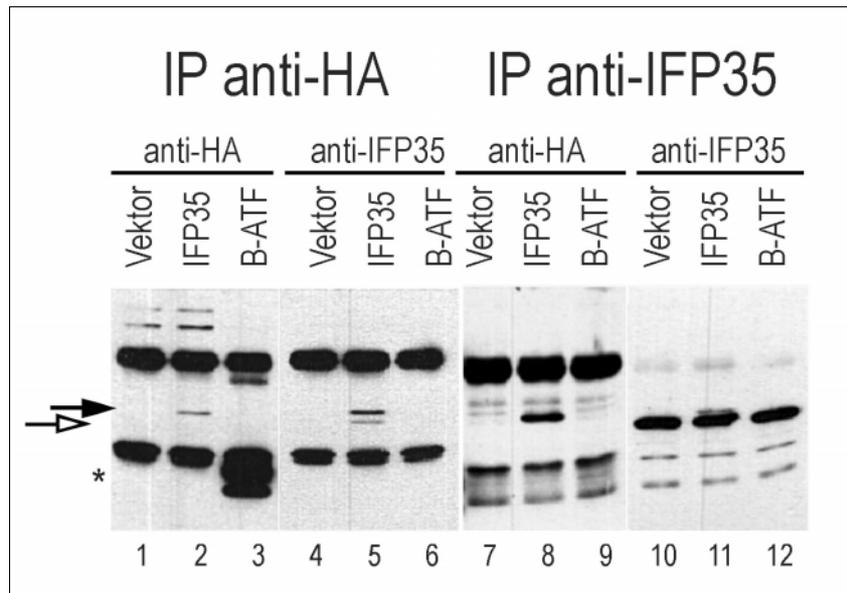


Abb. 19: Versuch der Koimmunpräzipitation von IFP 35 und B-ATF

Gezeigt ist die Koimmunpräzipitation von endogenem IFP35 (offener Pfeil) und rekombinantem IFP35 (schwarzer Pfeil) aus HeLa S3-Zellen, die mit einem Expressionskonstrukt, kodierend für HA-markiertes rekombinantes IFP35, transfiziert worden waren; des weiteren ist der Versuch der Koimmunpräzipitation von IFP35 und B-ATF (Stern) aus Zellen dargestellt, die mit einem für HA-markiertes B-ATF kodierenden Expressionskonstrukt transfiziert worden waren (Spur 6 und 9). HeLa S3-Zellen wurden mit dem pDCR-Vektor (Spur 1, 4, 7 und 10), mit dem pDCRIFP35- (Spur 2, 5, 8 und 11) bzw. mit dem pDCR B-ATF-Konstrukt (Spur 3, 6, 9 und 12) transfiziert, 24 h lang mit 1000 U/ml IFN- γ induziert, lysiert und anschließend zentrifugiert; 110 μ l Gesamtlysat wurden in die Immunpräzipitation eingesetzt. Zum Gesamtlysat wurden 12,5 μ l 0,4 mg/ml anti-HA-Antikörper (Spur 1-6) bzw. 2 μ l anti-IFP35-Antiserum gegeben (Spur 7-12); bei der Immunpräzipitation mit anti-IFP35-Antiserum wurde auf 200 μ l mit Lysispuffer aufgefüllt. Die Protein G-Sepharose wurde 5x gewaschen, in 30 μ l SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen und der Western Blot mit anti-HA-Antikörper (Spur 1-3 und 7-9) bzw. monoklonalem anti-IFP35-Antikörper (Spur 4-6 und 10-12) entwickelt.

4.1.13 Interaktion von IFP 35 und Nmi

Ein weiterer potentieller Bindungspartner von IFP35 ist Nmi, ein ebenfalls IFN-induziertes Protein.

Nmi wurde von Bao und Zervos im Rahmen des interaktiven Klonierens im „Two Hybrid“ System [11] isoliert. Das Protein weist im N-Terminus eine Homologie zur „coiled-coil“-Struktur des *C. elegans* Proteins CEF59 und im C-Terminus eine Homologie zu IFP35 auf. Die Nmi-mRNA wird ebenso wie die mRNA von IFP35 in einer Reihe von Zellen exprimiert; Nmi wird u.a. in A549- und HeLa S3-Zellen exprimiert. Nmi interagiert mit N-Myc, C-Myc, Max, Mxi1 und diversen anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. Fos. Dabei hat Nmi keine basische Region und auch keine andere gut definierte Struktur. Es wird vermutet, daß Nmi als eine Art Adaptermolekül funktioniert, wobei es die Interaktion von Zip- und/oder HLH-Proteindomänen enthaltenden Proteinen unterstützt, wie z.B. das HTLV-1 Tax-Protein oder das HMG-1-Protein [18].

Von der Arbeitsgruppe von L. Naumovski wurde in Immunfluoreszenzstudien zur subzellulären Lokalisierung von Nmi vorwiegend ein zytoplasmatisch verteiltes Punktmuster in IFN-induzierten Zellen beobachtet [181].

Zur Untersuchung der Interaktion von Nmi und IFP35 wurde zunächst eine Doppelimmunfluoreszenz mit anti-Nmi- und anti-IFP35-Antikörpern durchgeführt. Hierbei konnte in SW 1573- (Abb. 20) und HeLa S3-Zellen (Daten nicht gezeigt) eine weitgehend Kolokalisierung von IFP35 und Nmi beobachtet werden; lediglich die vielen kleinen, bei Verwendung des polyklonalen anti-Nmi-Antiserums auftretenden, Punkte schienen nur zum Teil mit IFP35 zu kolokalisieren. Bestätigen ließ sich dieses Ergebnis Hilfe einer Doppelimmunfluoreszenz mit monoklonalem anti-FLAG-Antikörper und anti-IFP35-Antiserum in IFN- γ -induzierten HeLa S3-Zellen, die mit einem für FLAG-markiertes rekombinantes Nmi kodierenden Expressionskonstrukt (pCEP4 FLAG Nmi) transfiziert worden waren. Hier wiesen das endogene IFP35 und das rekombinante HA-markierte Nmi eine nahezu vollständige Kolokalisierung auf (nicht gezeigte Daten).

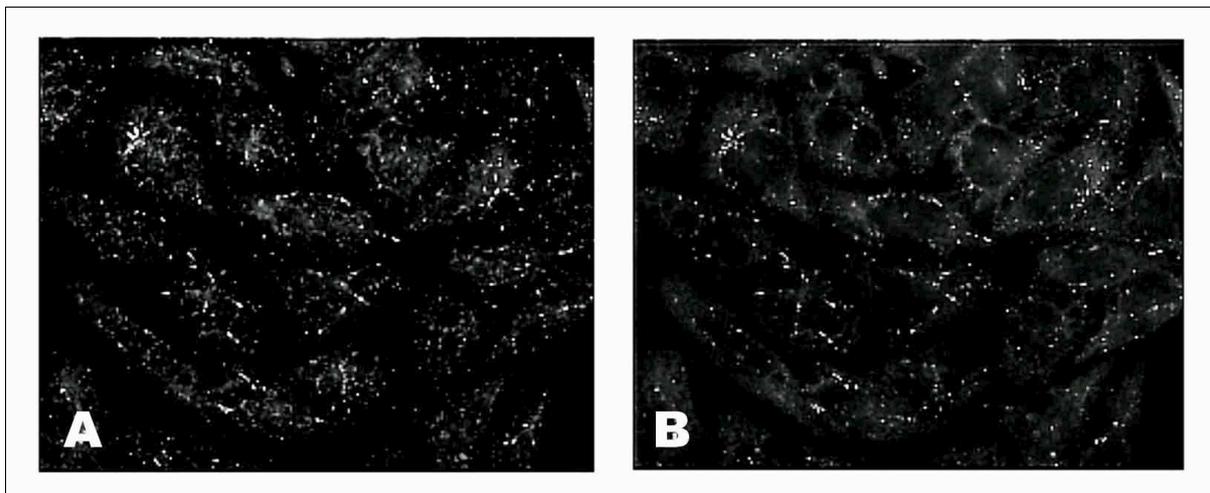


Abb. 20: Kolokalisierung von IFP 35 und Nmi in SW 1573-Zellen

Abgebildet ist eine Doppelimmunfluoreszenz mit SW 1573-Zellen und anti-Nmi-Antiserum (A) sowie monoklonalem anti-IFP35-Antikörper (B). Für die Immunfluoreszenz wurden SW 1573-Zellen 24 h lang mit 1000 U/ml IFN- γ induziert und anschließend 10 min lang mit Methanol und 1 min lang mit Azeton fixiert. Es wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalem anti-IFP35-Antikörper und polyklonalem anti-Nmi-Antiserum durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden ein TRITC-konjugierter anti-Maus- und ein FITC-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (Spezies: Esel) eingesetzt. Die Aufnahme erfolgte am Zeiss Axiophot.

Des Weiteren wurden HeLa S3-Zellen mit einem für FLAG-markiertes rekombinantes Nmi kodierenden Expressionskonstrukt transfiziert; Zell-Lysat wurde generiert und eine Immunpräzipitation mit dem anti-IFP35-Antikörper durchgeführt. Dabei wurde eine Koimmunpräzipitation von IFP35 und FLAG-markiertem rekombinantes Nmi nachgewiesen (Abb. 21).

Darüber hinaus wurde beobachtet, daß die Menge von Nmi-Protein in IFN- γ -induzierten Zellen nach CHX-Gabe nicht abnimmt, während das Nmi-spezifische Muster, wie bei IFP35

(Kap. 4.1.9), nach 3stündiger CHX-Behandlung der Zellen nicht mehr zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt).

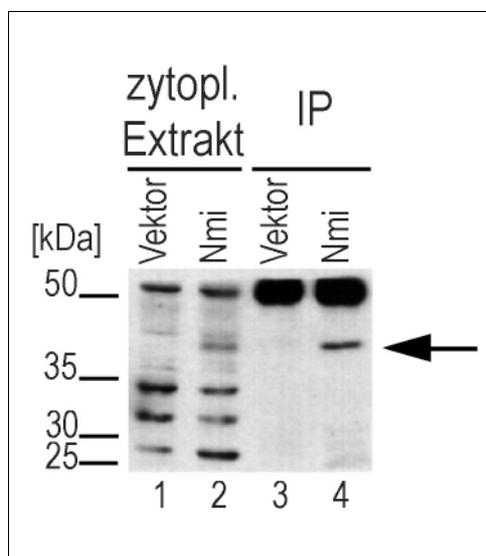


Abb. 21: Koimmunpräzipitation von IFP35 und Nmi

HeLa S3-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pCEP4 FLAG (Spur 1 und 3) bzw. mit dem Konstrukt pCEP4 FLAG Nmi, das für FLAG-markiertes rekombinantes Nmi kodiert, (Spur 2 und 4) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 24 h lang mit 1000 U/ml IFN- γ induziert, 1 h lang bei 4°C lysiert und zentrifugiert; 150 μ l des Überstands (Gesamtlysate; Spur 1 und 2), 50 μ l Lysispuffer und 2 μ l anti-IFP35-Antiserum wurden in die Immunpräzipitation eingesetzt (Spur 3 und 4). Die Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe fand unter Einsatz von Protein G-Sepharose statt. Die Sepharose wurde nach mehrmaligem Waschen in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen und die Proben im Western Blot mit anti-FLAG M5-Antikörper untersucht. Der Pfeil zeigt das FLAG-markierte rekombinante Nmi-Protein.

4.1.14 Interaktion von IFP35 mit einer vom anti-p53 Antikörper pAb1801 erkannten antigenen Determinante

Bei einer Literatursuche konnte ein nicht IFN-induziertes Protein gefunden werden, das in der Immunfluoreszenz ein genauso wahllos verteiltes zytoplasmatisches Punktmuster aufweist wie IFP35. Es handelt sich dabei um p53, ein Tumorsuppressorprotein [215].

Es wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit anti-IFP35-Antiserum und dem gegen p53 gerichteten Antikörper pAb1801 in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dabei konnte in HeLa S3-Zellen (Abb. 22A) sowie in SW1573-Zellen (Abb. 22 B) eine Kolokalisierung von IFP35 und den vom Antikörper pAb1801 erkannten Strukturen beobachtet werden. Während in HeLa S3-Zellen in der konfokalen Laser Scan Mikroskopie eine nahezu 100%ige Kolokalisierung beobachtet wurde, kolokalisierten in SW1573-Zellen nur 10-20 Prozent. Auch die kleinen IFP35-Aggregate, die in manchen nicht induzierten Zellen auftraten, kolokalisierten (Daten nicht gezeigt). Nach 3stündiger CHX-Behandlung von HeLa S3-Zellen mit anschließender Immunfluoreszenz konnte eine Auflösung des mit dem pAb1801-Antikörper nachgewiesenen Punktmusters beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das p53-Punktmuster war in induzierten wie auch nicht induzierten HeLa S3-Zellen sowie bei Anwendung unterschiedlicher Fixierungsbedingungen (Paraformaldehyd; Methanol und Azeton) nachweisbar, was das Auftreten von fixierungsbedingten Artefakten ausschließt.

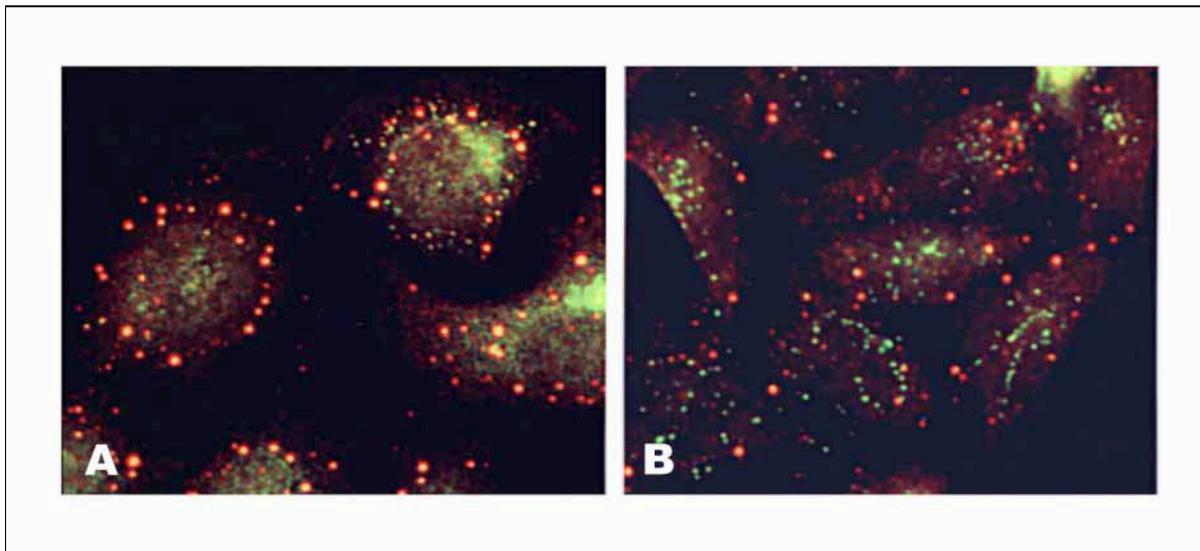


Abb. 22: Nachweis der Kolokalisierung von IFP35 und dem vom Antikörper pAb1801 erkannten Protein in der Immunfluoreszenz

Abgebildet ist eine Doppelimmunfluoreszenz in HeLa S3- (A) und SW 1573-Zellen (B). IFP35 ist grün markiert und das vom pAb1801-Antikörper erkannte Protein rot; kolokalisierende Bereiche sind gelb. Die Zellen wurden für die Präparation 10 min lang mit PFA fixiert, 5 min lang mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und mit 0,05% NP-40, 10%FCS in PBS abgesättigt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit polyklonalem anti-IFP35-Antiserum und dem anti-p53-Antikörper pAb1801. Als Zweitantikörper wurden FITC-konjugierter anti-Kaninchen- und TRITC-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus Esel eingesetzt. Die Aufnahme erfolgte am konfokalen Laser Scan Mikroskop.

Bei Verwendung anderer monoklonaler Antikörper gegen p53 (DO-1, BP53-12, pAb421, pAb240) sowie eines polyklonalen gegen p53 gerichteten Antiserums (CM-1) konnte dieses Punktmuster nicht beobachtet werden. Auch der Einsatz unterschiedlicher Zellfixierungsmethoden brachte kein anderes Ergebnis (Tab. 5).

Von Bartek et al. war eine Kreuzreaktion von Antikörper pAb1801 mit einem unbekanntem Protein beschrieben worden [20]. Es wurde dementsprechend die Spezifität des pAb1801-Antikörpers überprüft. Bei allen Antikörpern gegen p53 wurde untersucht, ob sie spezifisch *in vitro* translatiertes p53 erkennen und in der Lage sind [³⁵S]-Methionin markiertes p53 zu präzipitieren. Dies war bei allen Antikörpern der Fall. Außerdem wurde im Western Blot mit Zellextrakten unterschiedlicher Zelllinien geprüft, welche Banden von den einzelnen Antikörpern im Bereich zwischen 50-60 kDa, d.h. im Bereich des Molekulargewichts von p53, erkannt werden. Alle Antikörper zeigten bei SW 1573-Zellen eine Bande bei 50 kDa, die dem p53-Protein entspricht. Mit Ausnahme des Antikörpers pAb1801 erkannten die Antikörper in den anderen Zelllinien keine oder nur eine sehr schwache Bande im entsprechenden Bereich; nur vom Antikörper pAb1801 wurde zusätzlich in allen Zelllinien eine Bande bei 55 kDa detektiert (Tab. 5).

Anti-körper	Epitop [As]	Immun-fluoreszenz	Immun-präzipitation	Western <i>in vitro</i> Translat	Blot mit:		
					HeLa	SK-N-SH	SW 1573
BP53-12	20-25	–	+	50 kDa	(55 kDa)	n.d.	50 kDa; (55 kDa)
CM-1		–	+	50 kDa	(50 kDa)	∅	50 kDa
DO-1	20-25	–	+	50 kDa	(50 kDa)	n.d.	50 kDa
pAb1801	46-55	+	+	50 kDa	(50 kDa); 55 kDa;	55 kDa	50 kDa; 55 kDa
pAb240	213-217	–	+	50 kDa	∅	n.d.	50 kDa
pAb421	371-380	–	+	∅	∅	n.d.	∅

Tab. 5: Zusammenfassung der mit den unterschiedlichen Antikörpern gegen p53 erhaltenen Ergebnisse

Aufgeführt sind die verwendeten Antikörper und die Lage des Epitops, welches vom Antikörper im p53-Protein erkannt wird. Die Antikörper wurden in Bezug auf verschiedene Charakteristika untersucht: a.) die Fähigkeit *in vitro* translatiertes p53-Protein zu präzipitieren, b.) die Erkennung einer bestimmten Struktur in der Immunfluoreszenz mit HeLa S3-Zellen und c.) die Erkennung spezifischer p53-Banden im Western Blot mit *in vitro* translatiertem p53 und dem Gesamtextrakt unterschiedlicher Zelllinien. Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt. In Klammern gesetzte Werte bedeuten, daß nur eine sehr schwache Bande bei diesem Molekulargewicht beobachtet wurde.

Zusammengefaßt, kreuzreagiert der monoklonale Antikörper pAb1801 gegen p53 mit einem Protein, welches nicht p53 ist und das mit IFP35 abhängig von der untersuchten Zelllinie mehr oder weniger stark kolokalisiert. Das unbekannte Protein wird auch in unbehandelten Zellen exprimiert und seine Expression wird nicht durch IFN- γ beeinflusst.

4.2 Untersuchung der aus einer subtrahierten Makrophagen-Genbank isolierten cDNA-Klone von Nociceptin/OFQ und hGBP-3

Neben den Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von IFP35 und der Identifikation möglicher Bindungspartner, wurden im Rahmen der Arbeit auch andere IFN- γ -induzierte bzw. an der Differenzierung von Monozyten beteiligte Genprodukte untersucht. Es handelt es sich zum einen um einen cDNA-Klon, der für das Neuropeptid Nociceptin/OFQ kodiert und zum anderen um einen cDNA-Klon mit großer Homologie zu den humanen Guanylat-bindenden Proteinen hGBP-1 und hGBP-2. Beide cDNA-Klone wurden aus einer Genbank isoliert, die für cDNAs TPA- und IFN- γ -induzierter mRNAs angereichert war; die Genbank wurde aus entsprechend behandelten THP-1- und U937-Makrophagen-Vorläuferzellen erstellt.

4.2.1 Nociceptin/OFQ: ein von B-Zellen sezerniertes immunologisch wirksames Peptid?

Nociceptin/OFQ ist ein ursprünglich aus Ratten [206] bzw. Schweinehirn [258] isoliertes Neuropeptid und Ligand des ORL1-Rezeptors [216]. Nociceptin/OFQ weist eine große Homologie zum Neuropeptid Dynorphin auf und beeinflusst die Schmerzempfindung [206;258].

4.2.1.1 Sequenzierung des Vollängenklons

Als erstes wurde der isolierte noch unbekanntes cDNA-Klon von „Klon U“ (im Konstrukt pBS Klon U) mit Hilfe der pBluescript SK(-) Vektorprimer #703 und #612 sequenziert. Ein Sequenzvergleich mit der EMBL- und GENBANK-Datenbank ergab, daß die isolierte cDNA fast vollständig mit der eines bereits bekannten Neuropeptids, dem Nociceptin/OFQ, übereinstimmt.

Um zu überprüfen, ob der aus Makrophagen-Vorläuferzellen isolierte cDNA-Klon, mit der Nukleinsäuresequenz des bereits beschriebenen Neuropeptids [217;228] vollständig übereinstimmt, wurde die cDNA von Klon U mit den Primern #664, #763, #789 doppelsträngig sequenziert. Außerdem wurde untersucht, ob der isolierte cDNA-Klon Sequenzfehler enthält: Es wurde eine RT-PCR mit Gesamt-RNA von THP-1-Zellen, die mit TPA und IFN- γ induziert worden waren, durchgeführt und die PCR-Produkte sequenziert; die RT-Reaktion wurde mit Primer #826 und die PCR mit den Primern #825 und #826 durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern #763, #789, #825 und #826.

Die mit Hilfe der Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigte Sequenz von Klon U weicht an zwei Positionen von allen in der EMBL-, GENBANK- oder EST-Datenbank beschriebenen Nociceptin/OFQ-Sequenzen ab (Tab. 6): an Position 313 und 967 befindet sich in der cDNA-Sequenz von Klon U eindeutig ein Adenin anstelle eines Guanin. Während die Transition an Position 967 keine Auswirkung auf die Proteinsequenz hat, führt die Transition an Position 313 zu einem Austausch von Threonin gegen Alanin an Aminosäureposition 89.

An Nukleinsäureposition 192 weisen die cDNA-Sequenzen von Klon U, Prepronociceptin (ID Nr.: HSPNMRNA) und dem Exon 3 des Prepronociceptins (ID Nr.: HSPNEX3) ein Thymidin auf, während in der Sequenz des Preproorphanin FQ (ID Nr.: HSU48263) an dieser

Stelle ein Cytosin zu finden ist. Für beide Nukleotide läßt sich in der EST-Datenbank je eine Bestätigung finden (Pro: ID Nr.: AA282862, Kontra: ID Nr.: Z20405). Der Nukleotid austausch würde nicht zu einem Aminosäureaustausch führen und ist dementsprechend eine stille Mutation.

An Nukleinsäureposition 662, außerhalb des kodierenden Bereichs, ist bei Klon U ein Adenin zu finden, welches sich mit einer Ausnahme (ID Nr.: AA80635) in allen der EST-Datenbank entnommenen Sequenzen wiederfindet. In zwei Sequenzen aus der EMBL- bzw. GENBANK-Datenbank gibt es an dieser Stelle ein Cytosin und bei einer Sequenz ist das Nukleotid nicht eindeutig definiert (ID Nr.: HSU48263: M).

Die Unterschiede zwischen der cDNA-Sequenz von Klon U und den verschiedenen in den Datenbanken beschriebenen Nociceptin/OFQ-Sequenzen sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Die mittels Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigte cDNA-Sequenz von Klon U ist in Abb. 23 dargestellt.

ID Nr.	Position 192	Position 313	Position 662	Position 967
Klon U/RT-PCR	T	A	A	A
HSPPNMRNA	T	G	C	G
HSU48263	C	G	M	G
HSPPNEX3	T	G	-	-
HSPPNEX4	-	-	C	G
AA282757	-	-	A	G
AA282862	T	G	-	-
AA283020	-	-	A	G
AA283106	-	-	A	-
AA648997	-	-	A	G
AA760677	-	-	-	G
AA806350	-	-	C	G
AA809444	-	-	-	G
AA845221	-	-	-	G
HSAAACBIR	C	G	-	-
HUM116DO4A	-	-	-	G
R45100	-	-	-	G

Tab. 6: Vergleich von verschiedenen, beschriebenen, humanen Nociceptin/OFQ-Sequenzen

Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenz von Klon U (oberer Teil) mit den in der EMBL- bzw. GENBANK-Datenbank veröffentlichten Sequenzen (mittlerer Teil) und den in der EST-Datenbank beschriebenen Teilsequenzen von Nociceptin/OFQ (unterer Teil).

GGAGCCGGGG	ACTGACAGCT	CTCAGCACCT	GCTTCCTGCT	CCTGCACCAT	GAAAGTCCTG	60
					M K V L	4
CTTTGTGACC	TGCTGCTGCT	CAGTCTCTTC	TCCAGTGTGT	TCAGCAGTTG	TCAGAGGGAC	120
L C D	L L L L	S L F	S S V	F S S C	Q R D	24
TGTCTCACAT	GCCAGGAGAA	GCTCCACCCA	GCCCTGGACA	GCTTCGACCT	GGAGGTGTGC	180
C L T	C Q E K	L H P	A L D	S F D L	E V C	44
ATCCTCGAGT	G T GAAAGAGAA	GGTCTTCCCC	AGCCCCCTCT	GGACTCCATG	CACCAAGGTC	240
I L E	C E E K	V F P	S P L	W T P C	T K V	64
ATGGCCAGGA	GCTCTTGGCA	GCTCAGCCCT	GCCGCCCCAG	AGCATGTGGC	GGCTGCTCTC	300
M A R	S S W Q	L S P	A A P	E H V A	A A L	84
TACCAGCCGA	GAGCTTCGGA	GATGCAGCAT	CTGCGGCGAA	TGCCCCGAGT	CCGGAGCTTG	360
Y Q P	R A S E	M Q H	L R R	M P R V	R S L	104
TTCCAGGAGC	AGGAAGAGCC	CGAGCCTGGC	ATGGAGGAGG	CTGGTGAGAT	GGAGCAGAAG	420
F Q E	Q E E P	E P G	M E E	A G E M	E Q K	124
CAGCTGCAGA	AGAGATTTGG	GGGCTTCACC	GGGGCCCCGA	AGTCGGCCAG	GAAGTTGGCC	480
Q L Q	K R <u>F G</u>	<u>G F T</u>	<u>G A R</u>	<u>K S A R</u>	<u>K L A</u>	144
AATCAGAAGC	GGTTCAGTGA	GTTTATGAGG	CAATACTTGG	TCCTGAGCAT	GCAGTCCAGC	540
<u>N Q K</u>	<u>R F S E</u>	<u>F M R</u>	<u>Q Y L</u>	<u>V L S M</u>	<u>Q S S</u>	164
CAGCGCCGGC	GCACCCTGCA	CCAGAATGGT	AATGTGTAGC	CGGAAGGGGC	GCTCCTCCCA	600
Q R R	R T L H	Q N G	N V -			176
GCTGTACCGG	CCACTGCAAC	CCATGAGCGT	CCAGGTGATC	CCCCAAACAG	CATGTGCTCA	660
G ACCCAGACC	TGCCGCCTGG	GAATCAGGAT	TCCTTCTTCC	CCAAGGCACT	GAGCGCCTGC	720
AGATCCCGCA	GGCTTCGTTT	GCCTCCAGAA	CCTTCCCCTC	TGATTGTTCC	TCCCCAGCCC	780
CCTGGCATGT	TTCACCACAA	CCCTGTTGCT	ACATCAGAGT	GTATTTTTGT	AATTCTCTTA	840
GCTACCATT	CAATAGCCCC	ATCTCTCCTG	CTCACCCGCC	TCTTGCCCCT	TCTAGGGGCA	900
GGTCAAAGGA	ATAGGAAATT	GAACCTGGGG	TTTTGACTTG	CCACTGCCAT	AACTTGTTTG	960
TAAAAG A GCT	GTTCTTTTTG	ACTGATTGTT	TAAACAACG	ATTTCTCCAT	TAAACTTCTA	1020
CTGAGCAAAT	GGTTAATAAA	AAAAAAAAAA	AAAAA			1055

Abb. 23: Nuklein- und Aminosäuresequenz von Klon U

Dargestellt ist die vollständige, mittels Sequenzierung von RT-PCR-Produkten überprüfte, cDNA-Sequenz von Klon U. Der Bereich des Nociceptin/OFQ Peptides ist unterstrichen dargestellt; Nukleinsäurepositionen in denen sich die cDNA-Sequenz von Klon U von bereits veröffentlichten Nociceptin/OFQ-Sequenzen unterscheidet, sind fett gedruckt.

4.2.1.2 Expressionsmuster von Nociceptin/OFQ und seinem Rezeptors ORL1 in THP-1- und U937-Zellen

Nachdem bekannt war, um welches Gen es sich bei dem isolierten cDNA-Klon handelt, wurde untersucht, ob die Expression der mRNA von Nociceptin/OFQ durch IFN- γ induziert wird und ob die Expression durch TPA oder CHX reguliert wird.

Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA von THP-1- und U937-Zellen isoliert, die unterschiedlich behandelt worden waren:

1. U937-Zellen (unbehandelt)
2. U937-Zellen 48 h TPA (10 nM)
3. U937-Zellen 24 h IFN- γ (1000 U/ml)
4. U937-Zellen 24 h TPA (10 nM) und anschließend 24 h IFN- γ (1000 U/ml)
5. THP-1-Zellen (unbehandelt)
6. THP-1-Zellen 48 h TPA (20 nM)
7. THP-1-Zellen 24 h IFN- γ (1000 U/ml)
8. THP-1-Zellen 12 h CHX
9. THP-1-Zellen 24 h TPA (20 nM); anschließend für 24 h TPA und IFN- γ (1000 U/ml); (TPA/IFN- γ)
10. THP-1 Zellen 24 h TPA (20 nM); anschließend für 12 h TPA, IFN- γ (1000 U/ml) und CHX (50 μ g/ml); (TPA/IFN- γ /CHX)

Außerdem wurde die Regulation der mRNA-Expression durch IFN- γ in einer Zelllinie nicht hämatopoetischen Ursprungs, der Adenokarzinomzelllinie HeLa S3, untersucht; es wurde Gesamt-RNA von unbehandelten bzw. für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ -induzierten Zellen eingesetzt.

Die RNA wurde im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung fand mit einer Nociceptin/OFQ-spezifischen cRNA-Sonde statt.

Die Northern-Hybridisierung mit der Nociceptin/OFQ-Sonde ergab, daß die mRNA dieses Neuropeptids ausschließlich in THP-1-Zellen, die mit TPA und IFN- γ behandelt worden waren, exprimiert wird; die Expression in TPA/IFN- γ -induzierten Zellen ist CHX sensibel. In U937-Zellen wurde eine Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA weder bei IFN- γ noch bei TPA/IFN- γ -induzierten Zellen beobachtet (Abb. 24).

Als nächstes wurde die mRNA-Expression des ORL1-Rezeptors untersucht. Als Positivkontrolle diente Raji-RNA, da aus der Literatur bekannt war, daß Raji-Zellen den Rezeptor exprimieren [322].

Es wurde eine cRNA-Sonde hergestellt, die nur den kodierenden Bereich des ORL1-Rezeptors umfaßte, da aus Vorversuchen bekannt war, daß bei Einschluß des 3' nicht translatierten Bereichs in die Sonde unspezifische Banden in den Vordergrund treten (Daten nicht gezeigt). Die nur den kodierenden Bereich umfassende Sonde erkannte in der Hybridisierung eine einzelne Bande bei 3,5 kb (Abb. 25), die der theoretischen Größe der mRNA entspricht [322].

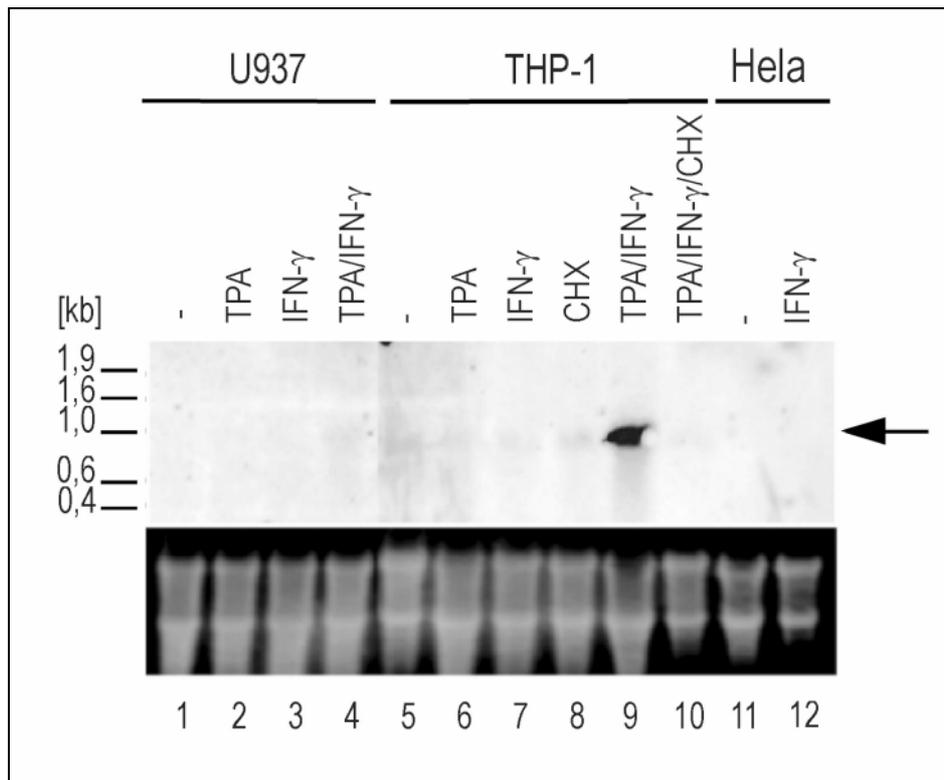


Abb. 24: Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA in U937-, THP-1- und HeLa S3-Zellen

Abgebildet ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 μ g/Spur) unterschiedlich behandelter Zellen. U937-Zellen: unbehandelt (Spur 1), TPA- (Spur 2), IFN- γ - (Spur 3) und TPA/IFN- γ - behandelt (Spur 4); THP-1-Zellen: unbehandelt (Spur 5), TPA- (Spur 6), IFN- γ - (Spur 7), CHX- (Spur 8), TPA/IFN- γ - (Spur 9) und TPA/IFN- γ /CHX-behandelt (Spur 10); HeLa S3-Zellen: unbehandelt (Spur 11) und mit IFN- γ induziert (Spur 12). Die Hybridisierung (oben) erfolgte mit einer für Nociceptin/OFQ-mRNA spezifischen cRNA-Sonde; die spezifische Bande ist mit einem Pfeil markiert. Zur Darstellung von Qualität und Menge der im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA ist das Ethidiumbromidgel vor dem Transfer abgebildet (unten).

Der Northern Blot mit RNAs unterschiedlich behandelter U937- und THP-1-Zellen zeigt, daß die mRNA des ORL 1-Rezeptors konstitutiv in U937- und THP-1-Zellen exprimiert wird. Die Expression der ORL 1-Rezeptor-mRNA wurde darüber hinaus in U937-Zellen beobachtet, die mit TPA, IFN- γ bzw. TPA/IFN- γ behandelt worden waren; in THP-1-Zellen war keine Expression der mRNA zu verzeichnen, wenn die Zellen mit TPA behandelt worden waren (TPA, TPA/IFN- γ und TPA/IFN- γ /CHX). CHX hat keinen Einfluß auf die Expression der mRNA des ORL 1-Rezeptors in THP-1-Zellen (Abb. 25).

Vergleicht man das Expressionsmuster von Ligand und Rezeptor, zeigt sich, daß in U937- und THP-1-Zellen die mRNA von Nociceptin/OFQ und dem ORL 1-Rezeptor gegenläufig exprimiert werden, d.h., die mRNA des Liganden wird nur dort exprimiert, wo die mRNA des Rezeptors nicht exprimiert wird (Abb. 24; Abb. 25).

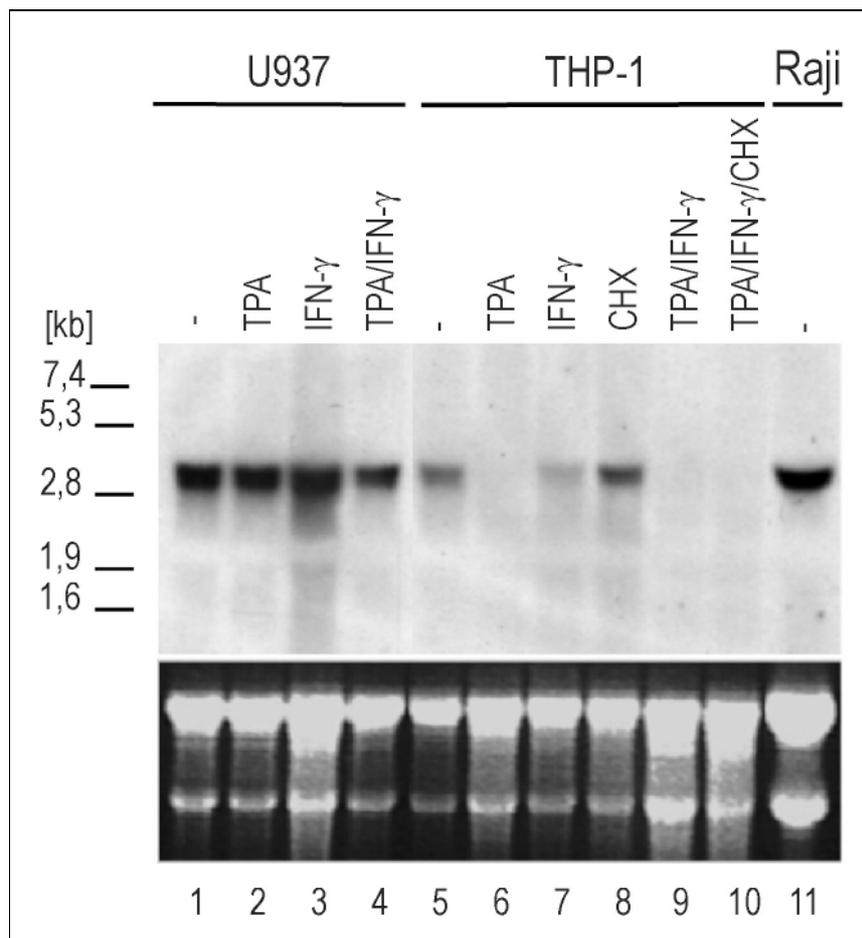


Abb. 25: Expression der ORL 1-Rezeptor-mRNA in THP-1- und U937-Zellen

Dargestellt ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 μ g/Spur) unterschiedlich behandelter U937- und THP-1-Zellen. U937-Zellen: unbehandelt (Spur 1), TPA- (Spur 2), IFN- γ - (Spur 3) und TPA/IFN- γ -behandelt (Spur 4); THP-1-Zellen: unbehandelt (Spur 5), TPA- (Spur 6), IFN- γ - (Spur 7), CHX- (Spur 8), TPA/IFN- γ - (Spur 9) und TPA/IFN- γ /CHX-behandelt (Spur 10); Raji-Zellen (unbehandelt, Spur 11) dienen als Positivkontrolle. Die Hybridisierung erfolgte mit einer cRNA-Sonde, welche für die ORL 1-Rezeptor-mRNA spezifisch ist (oben). Zur Darstellung von Qualität und Menge der im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA ist das Ethidiumbromidgel vor dem Transfer abgebildet (unten).

Im folgenden wurde die Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA in unterschiedlichen Zelllinien untersucht und die Induzierbarkeit der Rezeptor-mRNA-Expression durch IFN- γ überprüft. Es zeigte sich, daß die mRNA des ORL 1-Rezeptors sowohl in der Lungenkarzinom-Zelllinie SW1573 als auch in der von einem kleinzelligen Lungenkarzinom abgeleiteten Zelllinie GLC 4 exprimiert wird; eine schwache Expression der ORL 1-Rezeptor-mRNA wurde in Jurkat-Zellen nachgewiesen. IFN- γ hat keinen signifikanten Einfluß auf die Expression der mRNA des Rezeptors (Abb. 26).

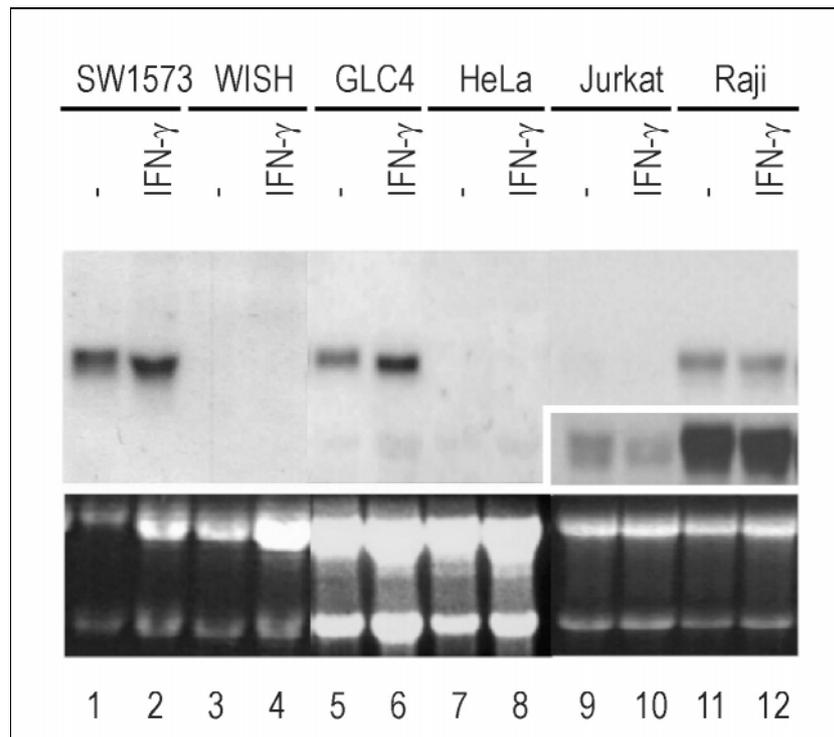


Abb. 26: Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA in Zelllinien hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Ursprungs

Für den Nachweis der Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA in unterschiedlichen Zelllinien wurde ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (Spur 1-4: unbestimmte Menge; Spur 5-12: 15 µg/Spur) von verschiedenen unbehandelten (Spur 1, 3, 5, 7, und 11) oder für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ (Spur 2, 4, 6, 8, 10 und 12) induzierten Zellen hämatopoetischen (Jurkat, Raji) und nicht hämatopoetischen (GLC4, HeLa S3, SW1573 und WISH) Ursprungs durchgeführt und mit einer für die ORL1-Rezeptor-mRNA-spezifischen cRNA-Sonde hybridisiert. Zur Darstellung der schwachen mRNA-Expression in Jurkat-Zellen, im Vergleich zur Expression in Raji-Zellen, wurde eine längere Exposition unterhalb der eigentlichen Banden eingefügt (kleines Bild). Zur Abschätzung von Qualität und Menge der im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA ist das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel vor dem Transfer abgebildet (unten).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die mRNA des ORL1-Rezeptors auch in einer anderen monozytären Zelllinie (HL-60), die ein früheres Entwicklungsstadium der Monozytenentwicklung darstellt, exprimiert wird; es wurde ebenfalls überprüft, welchen Einfluß IFN- γ auf die Expression hat und ob – wie in THP-1-Zellen – TPA einen reprimierenden Effekt auf die Expression der Rezeptor-mRNA ausübt. Eine Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA fand sich auch in dieser Makrophagen-Vorläuferzelllinie. TPA hat auch in dieser Zelllinie einen stark reprimierenden Effekt auf die Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA (Abb. 27).

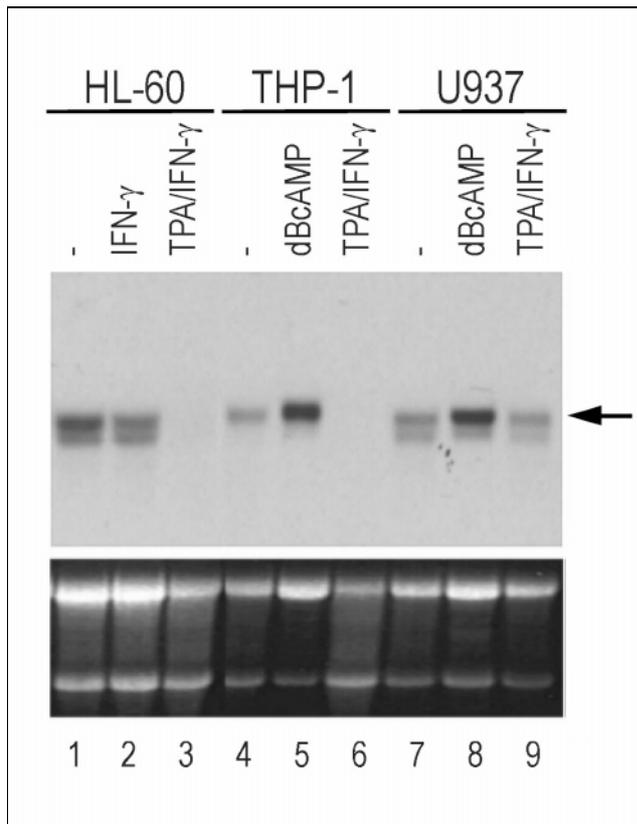


Abb. 27: Regulation der ORL1-Rezeptor-mRNA Expression durch TPA, IFN- γ und dBcAMP in verschiedenen Makrophagen-Vorläuferzelllinien

Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 μ g/Spur) unterschiedlich behandelter HL-60- (Spur 1-3), THP-1- (Spur 4-6) und U937-Zellen (Spur 7-9): unbehandelt (Spur 1, 4 und 7), IFN- γ - (Spur 2), dBcAMP- (Spur 5 und 8) und TPA/IFN- γ - (Spur 6 und 9) behandelt. Der Blot wurde mit einer für die ORL1-Rezeptor-mRNA spezifischen Sonde hybridisiert; die spezifische Bande ist mit einem Pfeil markiert. Das Ethidiumbromid-gefärbte, denaturierende Agarosegel vor dem Northern-Transfer ist zur Abschätzung der aufgetragenen RNA-Menge und deren Qualität unten abgebildet.

Darüber hinaus wurde der Einfluß von Di-butyryl-cAMP (dBcAMP) auf die Expression der Rezeptor-mRNA untersucht. Di-butyryl-cAMP erhöht die Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf der Zytoplasmamembran [48]. Eine Erhöhung der Rezeptordichte kann von entscheidender Bedeutung für spätere funktionelle Studien sein. Es wurde sowohl in THP-1- als auch in U937-Zellen eine vermehrte Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA nach dBcAMP-Behandlung festgestellt (Abb. 27).

Als Ergebnis der Northern-Hybridisierungen läßt sich abschließend festhalten, daß die Nociceptin/OFQ-mRNA nur in TPA/IFN- γ -induzierten THP-1-Zellen vermehrt exprimiert wird. Die mRNA des Rezeptors wird dagegen konstitutiv sowohl in nicht induzierten U937-, THP-1- und HL-60-Makrophagen-Vorläuferzelllinien als auch in B- (Raji) und schwach in T-(Jurkat) Zell-Lymphomzelllinien exprimiert; auch in Zelllinien nicht hämatopoetischen Ursprungs (GLC 4 und SW1573) ist eine Expression der mRNA des ORL1-Rezeptors nachzuweisen. TPA führt in THP-1- und HL-60-Zellen zu einer nahezu vollständigen Reprimierung der Expression des ORL1-Rezeptors; in U937-Zellen hat TPA dagegen keinen Einfluß auf die Expression. Die Expression von Ligand und Rezeptor ist gegenläufig; beide werden nicht zur gleichen Zeit in der Zelle exprimiert.

4.2.1.3 Expression von Nociceptin/OFQ und ORL1-Rezeptor in Zellpopulationen des peripheren Blutes

Nachdem die Nociceptin/OFQ-mRNA in TPA/IFN- γ -induzierten Makrophagen-Vorläuferzellen und die mRNA des Rezeptors sowohl in Makrophagen-Vorläuferzellen als auch in Raji-

Zellen nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, in welchen Zellen des peripheren Blutes Ligand und Rezeptor exprimiert werden.

Zunächst wurden periphere Blutmonozyten auf Expression des Liganden untersucht. Monozyten wurden aus peripherem Blut isoliert und anschließend für 24 h mit IFN- γ , für 48 h mit TPA oder für 24 h mit TPA und anschließend 24 h lang mit IFN- γ induziert. Dabei wurde eine geringere TPA-Konzentration als in den Experimenten mit den Zelllinien verwendet; bei zu hoher TPA-Konzentration war die Sterblichkeitsrate der Monozyten zu hoch.

Es wurde beobachtet, daß die Nociceptin/OFQ-mRNA schwach in Monozyten des peripheren Blutes exprimiert wird und die Expression nicht durch TPA (5 nM) oder IFN- γ (250 U/ml) beeinflußt wird. Auch die Behandlung der Zellen für 24 h mit TPA und anschließend für 24 h mit IFN- γ hatte keinen signifikanten Einfluß auf die mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt).

Nachdem in Monozyten nur eine sehr schwache Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA beobachtet werden konnte, obwohl in der Makrophagen-Vorläuferzelllinie THP-1 die Nociceptin/OFQ-mRNA exprimiert wird (Abb. 24), wurde die Untersuchung der Expression der mRNA von Ligand und Rezeptor in anderen Zellen des peripheren Blutes fortgesetzt.

Hierzu wurden mononukleäre Zellen mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten von Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Die einzelnen mononukleären Zellpopulationen wurden mit Hilfe von Antikörper-konjugierten Magnetpartikeln immunmagnetisch aufgereinigt. Zur weiteren Aufreinigung der Granulozyten wurden Erythrozyten aufgrund ihrer spezifischen Dichte abgetrennt; restliche in der granulozytären Fraktion verbliebene Erythrozyten wurden lysiert. Die Reinheit der isolierten Zellfraktionen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt; sie lag für B-Lymphozyten bei 90%, für T-Lymphozyten bei 98%, für Monozyten bei 96% und für Granulozyten bei über 95%.

Als Ergebnis der Northern-Analysen mit RNAs von peripheren Blutzellen läßt sich festhalten, daß Nociceptin/OFQ vorrangig in nicht induzierten B-Lymphozyten exprimiert wird; eine geringe Expression ist in Monozyten zu verzeichnen. Der ORL1-Rezeptor wird nahezu ausschließlich in Monozyten und Granulozyten exprimiert; eine geringe Expression ist in B-Zellen festzustellen. LPS und PHA üben in peripheren mononukleären Blutzellen keinen Einfluß auf die Expression des Rezeptors aus (Abb. 28).

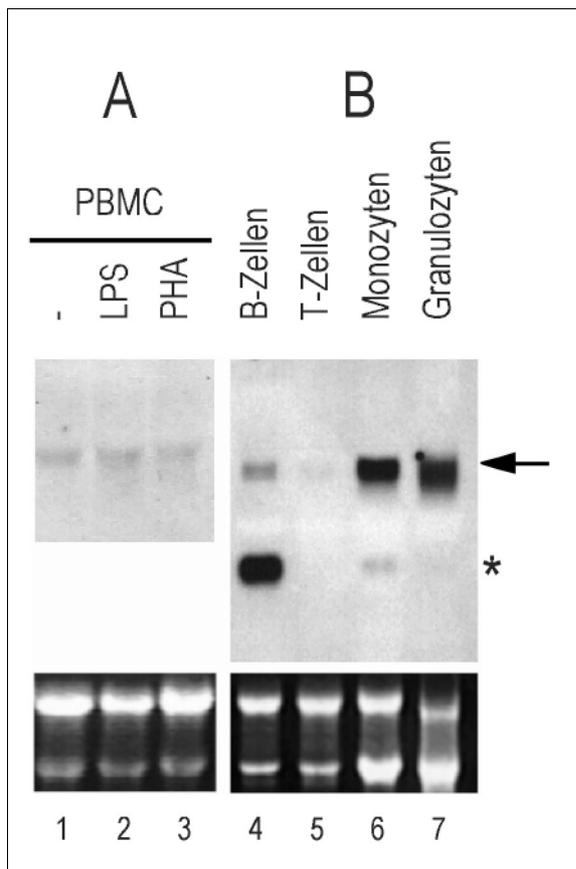


Abb. 28: Expression der mRNA von Nociceptin/OFQ und vom ORL1-Rezeptor in Zellen des peripheren Blutes

In A ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 µg/Spur) von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) zu sehen, der mit einer für die ORL 1-Rezeptor-mRNA spezifischen cRNA-Sonde hybridisiert wurde: die Zellen wurden für die Präparation in RPMI mit 5% AB-Serum entweder 48 h lang unbehandelt in Kultur gehalten (Spur 1) oder 48 h lang mit 1 µg/ml LPS (Spur 2) bzw. 2 µg/ml PHA (Spur 3) behandelt. In B ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (9 µg/Spur) von immunmagnetisch aufgereinigten unbehandelten B-Lymphozyten (Spur 4), T-Lymphozyten (Spur 5) und Monozyten (Spur 6) sowie von Granulozyten (Spur 7) abgebildet, der parallel mit der Nociceptin/OFQ-spezifischen (Stern) und der ORL 1-Rezeptor-spezifischen (Pfeil) cRNA-Sonde hybridisiert wurde. Zur Darstellung von Qualität und Menge der im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA ist das Ethidiumbromidgel vor dem Transfer abgebildet (unten).

4.2.2 Humanes GBP-3: ein Interferon- γ -induziertes Guanylat-bindendes Protein

Bei „Klon 2107“ handelt es sich um eine cDNA, die ebenfalls aus der subtrahierten Genbank isoliert wurde. Von Klon 2107 wurde eine PCR mit Phagen und den Primern #701 und #329 durchgeführt und das ca. 1,8 kb große PCR Produkt mit dem Primer #703 sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit der EMBL- und GENBANK-Datenbank verglichen. Hier ergab sich eine große Homologie zu den beiden IFN-induzierbaren humanen Guanylat-bindenden Proteinen hGBP-1 und hGBP-2 [63;291]. Klon 2107 wurde aufgrund dieser Homologie und weiterer im folgenden beschriebenen Charakteristika später in hGBP-3 umbenannt.

4.2.2.1 Isolierung und Sequenzierung des Vollängenklons

Aufgrund der großen Homologie zu den beiden Guanylat-bindenden Proteinen, deren IFN-Induzierbarkeit bereits beschrieben worden war, wurde eine weitere Untersuchung von hGBP-3 vorgenommen. Zunächst wurde eine *in vivo* Exzision und eine Sequenzierung der erhaltenen cDNA (pBS 2107) vorgenommen. Die Sequenz umfaßt 1668 Nukleotide. Bei Analyse der cDNA wurde festgestellt, daß es einen größeren Leserahmen gibt, der allerdings kein ATG mit vorausgehendem Stopkodon umfaßt. Es wurde vermutet, daß es sich bei Klon 2107 um einen Partialklon handelt und die cDNA im 5'-Bereich unvollständig ist.

Zur Isolierung eines vollständigen cDNA-Klons wurde eine unidirektionale Oligo (dT)-geprimte Lambda ZapII cDNA-Genbank aus mRNAs TPA- und IFN- γ -induzierter Makrophagen-Vorläuferzelllinien eingesetzt. Dabei wurden zwei Oligonukleotide (#845 und #848) verwendet, deren Spezifität in einem Vortest untersucht wurde: Im Vortest wurde neben dem Phagen von Klon 2107, der Phage 1989 verwendet. Der Phage 1989 enthält die partielle cDNA-Sequenz des humanen GBP-2 von Base 1381 bis 2030 und ist in diesem Bereich partiell homolog zur cDNA-Sequenz von hGBP-3 (Kap. 6.3). Es wurde eine Plaquehybridisierung unter Verwendung beider Phagen durchgeführt, um optimale Hybridisierungsbedingungen festzulegen. Das Oligonukleotid #848 hybridisierte spezifisch mit hGBP-3 und wurde zur Isolierung des 5'-Terminus von hGBP-3 eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Für die Isolierung des 5'-Terminus wurden 258350 pfu ausplattiert und 73 positive Klone isoliert. Anschließend wurde eine PCR mit 29 der isolierten Klone durchgeführt. Mit Hilfe des Vektorprimers #829 und des klonspezifischen Primers #848 wurde untersucht, welche die längste unter den isolierten cDNAs ist. Mit den klonspezifischen Primern #843 und #849 wurde anschließend überprüft, ob die in der ersten PCR erhaltenen Amplifikate auch tatsächlich spezifisch sind. Von 29 untersuchten Klonen enthielten 28 spezifisch hGBP-3 cDNA. Von 11 Phagenklonen wurde eine Phagenvereinzellung vorgenommen. Auch hier wurde wiederum das Oligonukleotid #848 bei der Hybridisierung eingesetzt. Von allen vereinzelt Klone wurden je 3 Klone isoliert und anschließend wieder in der PCR analysiert. Die PCR-Produkte der beiden Klone, welche die längste cDNA-Sequenz im 5'-Bereich von hGBP-3 aufwiesen, wurden anschließend sequenziert. Der Klon 2107/8-1 ist ein Partialklon und beinhaltet die cDNA-Sequenz von hGBP-3 von Base 611 bis zum 3'-Ende der cDNA.

Der aus der Genbank isolierte cDNA-Klon 2107/18-1 ist im 5'-Bereich 750 bp länger als der ursprüngliche hGBP-3-Klon und umfaßt an Position 523 den Translationsstart. Der Translationsstart wurde dadurch ermittelt, daß ihm der längste offene Leserahmen folgt, ihm ein Stopkodon vorausgeht und die Proteinsequenz ebenso wie die Nukleinsäuresequenz stark homolog zu den bereits publizierten Sequenzen für hGBP-1 und hGBP-2 ist. Auch dieser Klon (pBS 2107-18/1) wurde wiederum einer Vollängensequenzierung unterzogen. Hierbei stellte sich heraus, daß der Klon im Bereich zwischen Base 1349 bis 1420 des Ursprungsklons (pBS 2107) anstelle der 78 bp des 2107-Ursprungsklons eine Sequenz von 114 bp beinhaltet, die keine Homologie zum Ursprungsklon aufweist (siehe Alignment in Kap. 6.5).

Um festzustellen, welche cDNA-Sequenz – 2107 oder 2107/18-1 – korrekt ist, wurde eine RT-PCR mit RNA aus TPA/IFN- γ -induzierten HL-60-Zellen und IFN- γ -induzierten THP-1-Zellen durchgeführt. Die mRNA wurde unter Einsatz von Oligo (dT)-Primern revers transkribiert und eine PCR mit den Primern #863 und #864 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit den Primern #850 und #855 sequenziert. Es stellte sich dabei heraus, daß die im ursprünglichen 2107-cDNA-Klon (pBS 2107) enthaltene Sequenz im 3'-Bereich diejenige ist, die der cDNA-Sequenz der untersuchten Zellen entspricht.

Um für weitere Arbeiten ein fehlerfreies Vollängenkonstrukt von hGBP-3 zur Verfügung zu haben, wurde ein Vollängenklon aus den Konstrukten pBS 2107 und pBS 2107/18-1 erstellt. Das pBS 2107-Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease BamHI in der multiplen Klonierungssequenz 5' von der Klonierungsstelle und mit NcoI an Position 1553 der vollständigen 2107-cDNA (5' vom nicht homologen Bereich) geschnitten. Das 3821 bp Fragment des hydrolysierten pBS 2107-Konstrukts, welches vorrangig den Vektoranteil und den 3'-Terminus von hGBP-3 umfaßt, und das 1551 bp Fragment des pBS 2107/18-1-Konstrukts, welches den 5'-Terminus der 2107-cDNA und einen geringen Teil der Vektorsequenz im 5'-Bereich des cDNA-Fragmentes enthält, wurden isoliert und zum pBS 2107 V-Konstrukt ligiert.

Das pBS 2107 V-Konstrukt enthält die vollständige cDNA-Sequenz von hGBP-3 von Base 1 bis 2419. Der Translationsstart befindet sich an Position 523 und das Terminationskodon an Position 2281 (Abb. 29). Im Bereich von Base 510 bis 2109 weist der Klon eine Homologie von bis zu 78% zu den beiden humanen GBPs, hGBP-1 und hGBP-2, auf. Die Homologie im 3' nicht translatierten Bereich sowie im Bereich ab Base 2109 ist gering. Im 5' nicht translatierten Bereich zwischen Base 1 und 510 läßt sich keine signifikante Homologie zwischen der hGBP-3-cDNA und den Sequenzen der anderen humanen GBP-Proteine feststellen (Kap. 6.3).

CCAGGCTGTG	GAACCTTTGT	TCTTTCACTC	TTTGCAATAA	ATCTTGCTGC	TGCTCACTCT	60
TTGGGTCCAC	ACTGCCTTTA	TGAGCTGTAA	CACTCACTGG	GAATGTCTGC	AGCTTCACTC	120
CTGAAGCCGG	CGAGACCACG	AACCCACCAG	GAGGAACAAA	CAACTCCAGA	CGCGCAGCCT	130
TAAGAGCTGT	AACACTCACC	GCGAAGGTCT	GCAGCTTCAC	TCCTGAGCCA	GCCAGACCAC	240
GAACCCACCA	GAAGGAAGAA	ACTCCAAACA	CATCCGAACA	TCAGAAGGAG	CAAACCTCCTG	300
ACACGCCACC	TTTAAGAACC	GTGACACTCA	ACGCTAGGGT	CCGCGGCTTC	ATTCTTGAAG	360
TCAGTGAGAC	CAAGAACCCA	CCAATTCCGG	ACACGCTAAT	TGTTGTAGAT	CATCACTTCA	420
AGGTGCCCAT	ATCTTTCTAG	TGGAAAAATT	ATTCTGGCCT	CCGCTGCATA	CAAATCAGGC	480
AACCAGAATT	CTACATATAT	AAGGCCAAAGT	AACATCCTAG	ACATGGCTTT	AGAGATCCAC	540
				M A L E I H		6
ATGTCAGACC	CCATGTGCCT	CATCGAGAAC	TTTAATGAGC	AGCTGAAGGT	TAATCAGGAA	600
M S D P M C L	I E N F N E	Q L K V N Q E				26
GCTTTGGAGA	TCCTGTCTGC	CATTATGCAA	CCTGTAGTTG	TGGTAGCGAT	TGTGGGCCCTC	660
A L E I L S A	I M Q P V V	V V A I V	G L			46
TATCGCACTG	GCAAATCCTA	CCTGATGAAC	AAGCTGGCTG	GGAAGAACAA	GGGCTTCTCT	720
Y R T G K S Y	L M N K L A	G K N K G F S				66
GTTGCATCTA	CGGTGCAGTC	TCACACCAAG	GGAATTTGGA	TATGGTGTGT	GCCTCATCCC	780
V A S T V Q S	H T K G I W	I W C V P H P				86
AACTGGCCAA	ATCACACATT	AGTTCTGCTT	GACACCGAGG	GCCTGGGAGA	TGTAGAGAAG	840
N W P N H T L	V L L D T E G	L G D V E K				106
GCTGACAACA	AGAATGATAT	CCAGATCTTT	GCACCTGGCAC	TCTTACTGAG	CAGCACCTTT	900
A D N K N D I	Q I F A L A	L L L S S T F				126
GTGTACAATA	CTGTGAACAA	AATTGATCAG	GGTGTATCG	ACCTACTGCA	CAATGTGACA	960
V Y N T V N K I D Q	G A I D L L H	N V T				146
GAACTGACAG	ATCTGCTCAA	GGCAAGAAAC	TCACCCGACC	TTGACAGGGT	TGAAGATCCT	1020
E L T D L L K	A R N S P D	L D R V E D P				166
GCTGACTCTG	CGAGCTTCTT	CCCAGACTTA	GTGTGGACTC	TGAGAGATTT	CTGCTTAGGC	1080
A D S A S F F	P D L V W T L R D	F C L G				186
CTGGAAATAG	ATGGGCAACT	TGTCACACCA	GATGAATACC	TGGAGAATTC	CCTAAGGCCA	1140
L E I D G Q L	V T P D E Y	L E N S L R P				206
AAGCAAGGTA	GTGATCAAAG	AGTTCAAAAAT	TTCAATTTGC	CTCGTCTGTG	TATACAGAAG	1200
K Q G S D Q R	V Q N F N L	P R L C I Q K				226
TTCTTTCCAA	AAAAGAAATG	CTTTATCTTT	GACTTACCTG	CTCACAAAA	AAAGCTTGCC	1260
F F P K K K C	F I F D L P	A H Q K K L A				246
CAACTTGAAA	CACTGCCTGA	TGATGAGCTA	GAGCCTGAAT	TTGTGCAACA	AGTGACAGAA	1320
Q L E T L P D	D E L E P E	F V Q Q V T E				266
TTCTGTTTCT	ACATCTTTAG	CCATTCTATG	ACCAAGACTC	TTCCAGGTGG	CATCATGGTC	1380
F C S Y I F S	H S M T K T	L P G G I M V				286
AATGGATCTC	GTCTAAAGAA	CCTGGTGCTG	ACCTATGTCA	ATGCCATCAG	CAGTGGGGAT	1440
N G S R L K N	L V L T Y V	N A I S S G D				306
CTGCCTTGCA	TAGAGAATGC	AGTCCTGGCC	TTGGCTCAGA	GAGAGAACTC	AGCTGCAGTG	1500
L P C I E N A	V L A L A Q	R E N S A A V				326
CAAAAGGCCA	TTGCCCACTA	TGACCAGCAA	ATGGGCCAGA	AAGTGCAGCT	GCCCATGGAA	1560
Q K A I A H Y	D Q Q M G Q	K V Q L P M E				346
ACCCTCCAGG	AGCTGCTGGA	CCTGCACAGG	ACCAGTGAGA	GGGAGGCCAT	TGAAGTCTTC	1620
T L Q E L L D	L H R T S E	R E A I E V F				366
ATGAAAAACT	CTTTCAAGGA	TGTAGACCAA	AGTTTCCAGA	AAGAATTGGA	GACTCTACTA	1680
M K N S F K D	V D Q S F Q	K E L E T L L				386

GATGCAAAAC	AGAATGACAT	TTGTAAACGG	AACCTGGAAG	CATCCTCGGA	TTATTGCTCG	1740
<u>D</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>I</u>
<u>C</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>A</u>
<u>S</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	406
GCTTTACTTA	AGGATATTTT	TGGTCCTCTA	GAAGAAGCAG	TGAAGCAGGG	AATTTATTCT	1800
<u>A</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>F</u>
<u>G</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>V</u>
<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	426
AAGCCAGGAG	GCCATAATCT	CTTCATTTCAG	AAAACAGAAG	AACTGAAGGC	AAAGTACTAT	1860
<u>K</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>L</u>
<u>F</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
<u>L</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	446
CGGGAGCCTC	GGAAAGGAAT	ACAGGCTGAA	GAAGTTCTGC	AGAAATATTT	AAAGTCCAAG	1920
<u>R</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>I</u>
<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>
<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	466
GAGTCTGTGA	GTCATGCAAT	ATTACAGACT	GACCAGGCTC	TCACAGAGAC	GGAAAAAAG	1980
<u>E</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>I</u>
<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>L</u>
<u>T</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	486
AAGAAAGAGG	CACAAGTGAA	AGCAGAAGCT	GAAAAGGCTG	AAGCGCAAAG	GTTGGCGGCG	2040
<u>K</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>K</u>
<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>E</u>
<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	506
ATTCAAAGGC	AGAACGAGCA	AATGATGCAG	GAGAGGGAGA	GACTCCATCA	GGAACAAGTG	2100
<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>
<u>M</u>	<u>M</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>R</u>
<u>L</u>	<u>H</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	526
AGACAAATGG	AGATAGCCAA	ACAAAATTGG	CTGGCAGAGC	AACAGAAAAT	GCAGGAACAA	2160
<u>R</u>	<u>Q</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>K</u>
<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>
<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>
546						
CAGATGCAGG	AACAGGCTGC	ACAGCTCAGC	ACAACATTCC	AAGCTCAAAA	TAGAAGCCTT	2220
<u>Q</u>	<u>M</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>
<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	566
CTCAGTGAGC	TCCAGCACGC	CCAGAGGACT	GTTAATAACG	ATGATCCATG	TGTTTTACTC	2280
<u>L</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>H</u>	<u>A</u>
<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>D</u>
<u>D</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>
586						
TAAAGTGCTA	AATATGGGAG	TTTCCTTTTT	TTACTCTTTG	TCACTGATGA	CACAACAGAA	2340
-						
AAGAAACTGT	AGACCTTGGG	ACAATCAACA	TTTAAATAAA	CTTTATAATT	ATTTTTTCAA	2400
ACTTTAAAAA	AAAAAAAAAA					2419

Abb. 29: Humanes GBP-3: Nuklein- und Aminosäuresequenz

Dargestellt ist die vollständige cDNA-Sequenz von hGBP-3 mit 2419 Basen, die einen Leserahmen für ein 586 Aminosäuren großes Protein umfaßt. Unterstrichen dargestellt sind potentielle Konsensussequenzen für Guanylat-bindende Proteine; innerhalb dieser Sequenzen sind die konservierten Nukleotide fett gedruckt. Daneben ist der Bereich, der für die Herstellung eines anti-Peptid-Antikörpers ausgewählt wurde, durchbrochen, unterstrichen dargestellt.

4.2.2.2 Sequenzvergleich mit bereits bekannten Guanylat-bindenden Proteinen

Die isolierte cDNA kodiert im Bereich von Position 523 bis 2280 für ein 586 As langes Protein, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 66,6 kDa aufweist.

Ein Vergleich des hGBP-3 Proteins mit den beiden beschriebenen GBP-Proteinen („Accession“-Nummer: M55542 [hGBP-1], M55543 [hGBP-2]; [64]) ergab 57% gleiche und 30,4% ähnliche Aminosäuren. Die Homologie ist im N-terminalen Bereich besonders ausgeprägt. Im C-terminalen Bereich ab Aminosäure 495 ist die Homologie dagegen gering (siehe Kap. 6.4).

Wie auch hGBP-1 und hGBP-2 weist die hGBP-3-Aminosäuresequenz zwei von drei für GTP-bindende Proteine publizierte Konsensussequenzen [88] auf (Position 45-52 und 97-100). Die dritte Konsensussequenz, die normalerweise den GBP-Proteinen fehlt [64], könnte in hGBP-3 vorhanden sein (Position 132-135); allerdings ist ein Abstand von nur 32 Aminosäuren zwischen der zweiten und dritten Konsensussequenz ungewöhnlich [88] und somit die

Funktion dieser potentiellen Konsensussequenz in der Guanylat-Bindung fraglich (Abb. 29; Kap. 6.4). Auch die von Schwemmler et al. [274] und Han et al. [127] postulierte möglicherweise die Guanylat-Spezifität der GBP-Proteine beeinflussende TLRD-Sequenz ist in der Aminosäuresequenz von hGBP-3 an Position 179-182 zu finden.

4.2.2.3 Expressionsmuster von hGBP-3 in verschiedenen Zelllinien und Blutzellpopulationen

Auch beim hGBP-3 wurde – wie bereits bei Klon U – zunächst das Expressionsverhalten in THP-1- und U937-Zellen näher untersucht.

Eine hGBP-3-Sonde, die nicht mit hGBP-1- und hGBP-2-mRNA kreuzhybridisiert, wurde hergestellt. Zu diesem Zweck wurde ein Sequenzvergleich der drei cDNAs vorgenommen; es wurden Bereiche gesucht, die eine geringe Homologie aufweisen. Dies ist im 3'-Bereich der cDNA-Sequenzen gegeben. Es wurden dementsprechend drei Sonden hergestellt:

- Für die hGBP-1-Sonde wurde Phagenklon 1389 (#863), isoliert aus der subtrahierten Genbank, verwendet. Der Klon enthält die cDNA von hGBP-1 von Base 1913 bis 2881. Das aus der *in vivo* Exzision hervorgegangene Konstrukt wurde für die Herstellung der cRNA-Sonde mit der Restriktionsendonuklease NcoI (Position 2413) geschnitten. Anschließend erfolgte die Synthese eines „run off“-Transkripts mit der T3-RNA-Polymerase.
- Die hGBP-2-Sonde wurde ebenfalls mit Hilfe einer aus der subtrahierten Genbank isolierten cDNA hergestellt. Es handelte sich dabei um den Phagenklon 1989 (#865), der die hGBP-2-cDNA von Base 1381 bis 2030 umfaßt. Hier wurde nach *in vivo* Exzision das Plasmid mit EcoNI (Position 1831) geschnitten und die Transkription ebenfalls mit der T3-RNA-Polymerase durchgeführt.
- Die hGBP-3-Sonde wurde aus dem ursprünglichen 2107-Klon (pBS 2107) hergestellt. Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym ScaI (Position 1855) geschnitten, das entstehende 1,6 kb-Fragment isoliert und die *in vitro* Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase durchgeführt.

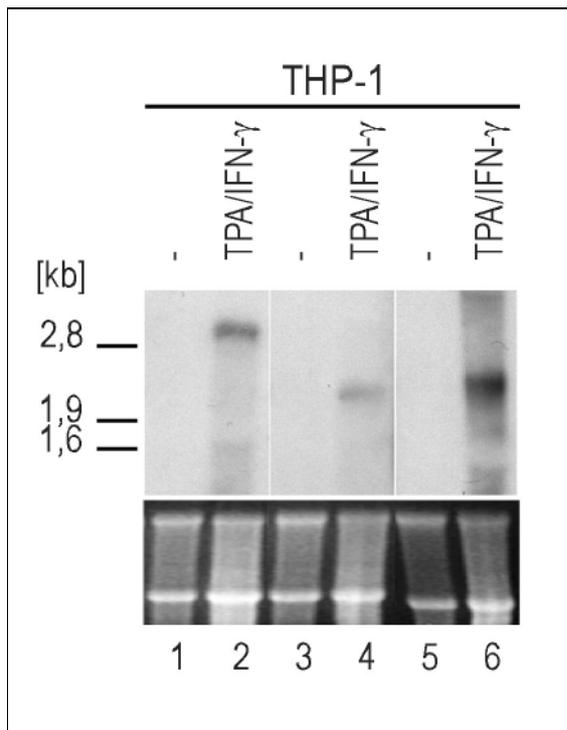


Abb. 30: Nachweis der Spezifität der hGBP-3-cRNA-Sonde

Dargestellt ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 µg/Spur) von unbehandelten (Spur 1, 3 und 5) bzw. TPA/IFN- γ -behandelten (Spur 2, 4 und 6) THP-1-Zellen, der zerschnitten wurde; einzelne Streifen wurden mit einer hGBP-1- (Spur 1 und 2), hGBP-2- (Spur 2 und 3) bzw. hGBP-3- (Spur 5 und 6) spezifischen cRNA-Sonde hybridisiert: Zur Kontrolle des RNA-Auftrages ist unterhalb des Blots das Ethidiumbromid-gefärbte denaturierende Agarosegel abgebildet.

Die Untersuchung der Spezifität der hGBP-3 Sonde ergab, daß die drei Sonden unterschiedliche große mRNAs erkennen. Die hGBP-1-Sonde erkennt eine mRNA bei ca. 3,0 kb, die hGBP-2-Sonde eine bei ca. 2,2 kb und die hGBP-3 Sonde eine bei ca. 2,4 kb. Eine Kreuzreaktion der Sonden war nicht zu beobachten (Abb. 30). Die mRNA-Größen von hGBP-1 und hGBP-2 entsprachen den bereits publizierten [64].

Nachdem die Spezifität der hGBP-3-Sonde sichergestellt worden war, wurde ein Northern Blot mit THP-1- und U937-Zellen und den bereits in Kapitel 4.2.1.2 näher beschriebenen Induktionen durchgeführt. Dies diente der Ermittlung, ob die mRNA durch IFN- γ oder eines der anderen bei Gewinnung der RNA für die Erstellung der Genbank verwendeten Agentien induziert wird.

Es zeigte sich, daß die hGBP-3-mRNA in U937-Zellen durch IFN- γ induziert und daß die Induktion durch Vorbehandlung der Zellen mit TPA verstärkt wird. In THP-1-Zellen ist die IFN- γ -Induktion wesentlich stärker als in U937-Zellen; eine Vorbehandlung der THP-1-Zellen mit TPA hat keinen Einfluß auf die Expression der mRNA. Die mRNA-Expression wird nicht durch CHX reguliert (Abb. 31). Die Ergebnisse konnten durch eine Northern-Hybridisierung mit dem Digoxigenin-markierten Oligonukleotid #848 reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

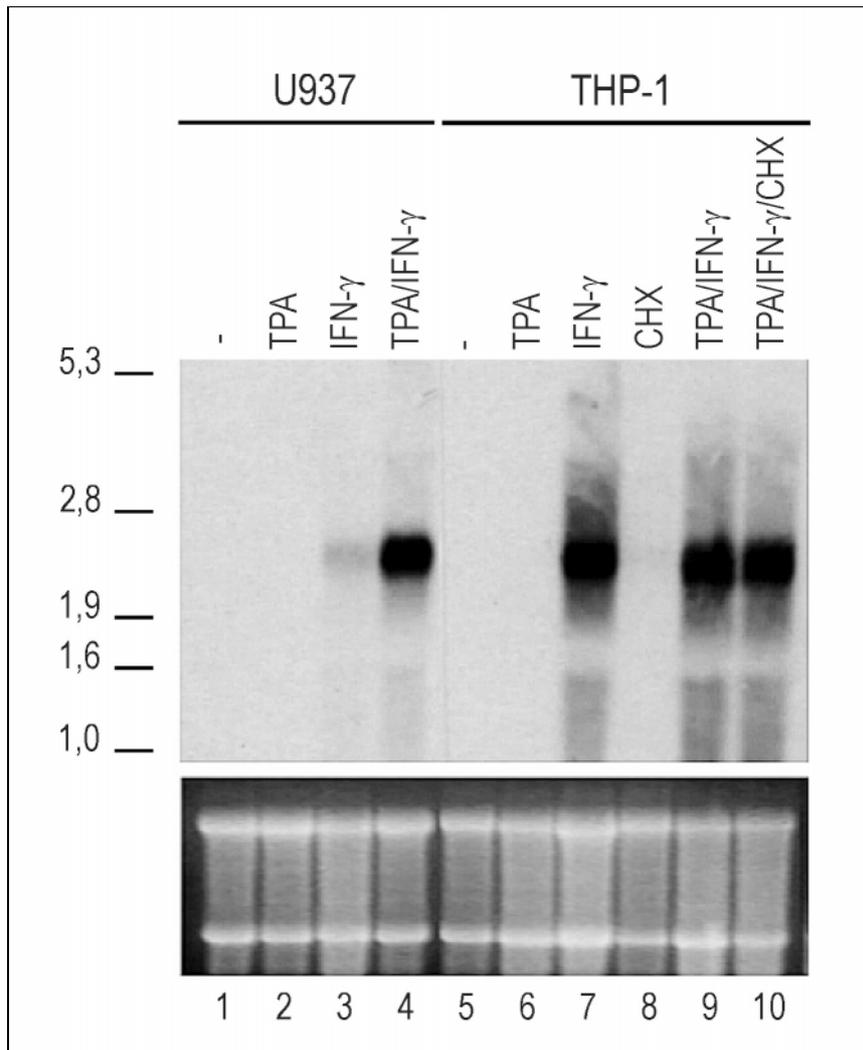


Abb. 31: Expression der hGBP-3-mRNA in U937- und THP-1-Zellen

Abgebildet ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 µg/Spur) unterschiedlich behandelter Zellen. U937-Zellen: unbehandelt (Spur 1), TPA- (Spur 2), IFN- γ - (Spur 3) und TPA/IFN- γ -behandelt (Spur 4); THP-1-Zellen: unbehandelt (Spur 5), TPA- (Spur 6), IFN- γ - (Spur 7), CHX- (Spur 8), TPA/IFN- γ - (Spur 9) und TPA/IFN- γ /CHX-behandelt (Spur 10). Die Hybridisierung (oben) erfolgte mit einer für hGBP-3-mRNA spezifischen cRNA-Sonde. Zur Darstellung von Qualität und Menge der im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA ist das Ethidiumbromidgel vor dem Transfer abgebildet (unten).

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die hGBP-3-mRNA auch in IFN- α induzierten Zellen exprimiert wird und ob die IFN- γ -Induktion sowie die Superinduktion der mRNA-Expression nach vorheriger TPA-Behandlung der Zellen, in einer anderen Makrophagen-Vorläuferzelllinie ebenfalls nachgewiesen werden kann.

In HL-60-Zellen – wie in U937-Zellen – ist die hGBP-3-mRNA-Expression nach IFN- γ -Induktion relativ gering. Die Expression steigt stark an, wenn die Zellen mit TPA vorbehandelt wurden. Da dieser Effekt nur in U937- und HL-60-Zellen auftritt und nicht bei den bereits etwas stärker zum makrophagenähnlichen Typ ausdifferenzierten THP-1-Zellen, kann vermu-

tet werden, daß die Expression der hGBP-3-mRNA erst in relativ ausdifferenzierten Zellen durch IFN- γ induziert werden kann. Die mRNA-Expression von hGBP-3 wird nicht durch IFN- α induziert; auch nach Vorbehandlung der Zellen mit TPA wurde keine Induktion der mRNA-Expression von hGBP-3 durch IFN- α beobachtet (Abb. 32).

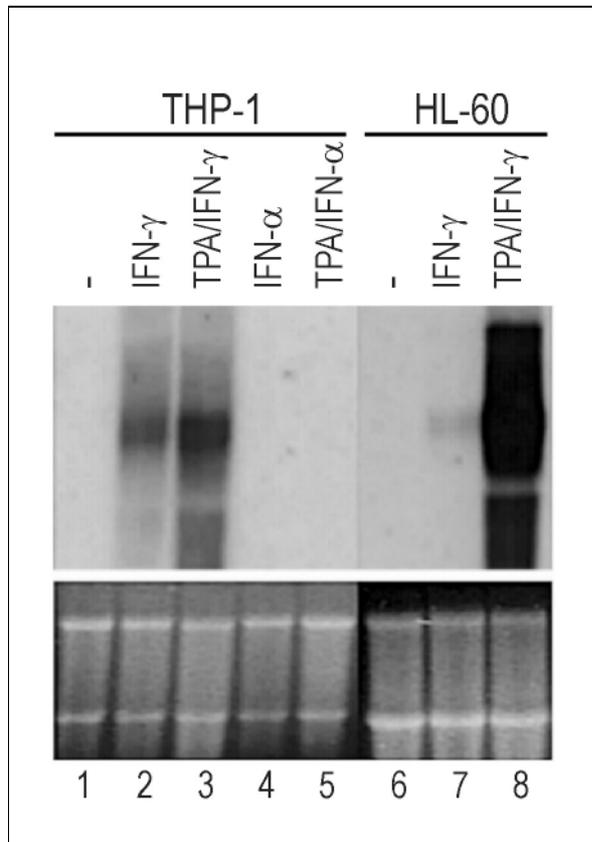


Abb. 32: Untersuchung des Einflusses von IFN- γ und IFN- α auf die hGBP-3-mRNA-Expression in THP-1- und HL-60-Zellen

Dargestellt ist ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 μ g/Spur) von THP-1- (Spur 1-5) und HL-60-Zellen (Spur 6-8): nicht behandelt (Spur 1 und 6), mit 1000 U/ml IFN- γ (Spur 2 und 7) bzw. 250 U/ml IFN- α (Spur 4) induziert, mit TPA/IFN- γ (Spur 3 und 8) bzw. TPA/IFN- α (Spur 5; ebenfalls 250 U/ml IFN- α) behandelt; die Hybridisierung erfolgte unter Einsatz einer für hGBP-3-mRNA spezifischen cRNA-Sonde. Das mit Ethidiumbromid gefärbte denaturierende Agarosegel vor dem RNA-Transfer ist im unteren Bereich der Abbildung zu sehen.

Im folgenden wurde untersucht, inwiefern eine IFN- γ -Induktion der mRNA-Expression auch in anderen Zelllinien zu verzeichnen ist. Hierbei wurden verschiedene Zelllinien unterschiedlichen nicht monozytären Ursprungs auf IFN- γ -Induzierbarkeit der hGBP-3-mRNA-Expression überprüft: Adenokarzinomzellen (HeLa), Keratinozyten (HaCaT), T-Zell Lymphomzellen (Jurkat) und Burkitt Lymphomzellen (Raji).

In keiner Zelllinie war eine konstitutive Expression der hGBP-3-mRNA zu beobachten. In fast allen Zelllinien wird die Expression der mRNA durch IFN- γ induziert: Die Expression der hGBP-3-mRNA wird in der Keratinozytenzelllinie HaCaT besonders stark durch IFN- γ induziert. In den beiden Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs (Jurkat, Raji) war eine IFN- γ -induzierte hGBP-3-mRNA-Expression kaum nachweisbar (Abb. 33). In der embryonalen WISH Zelllinie konnte keine Expression der mRNA nach IFN- γ -Induktion verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

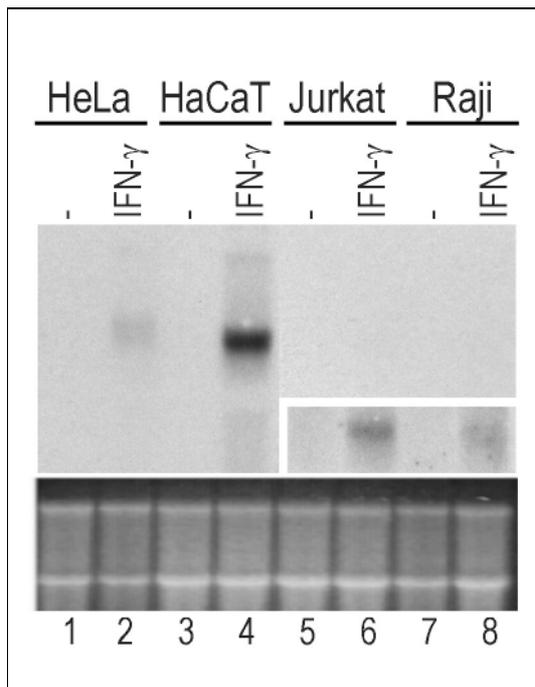


Abb. 33: Nachweis der IFN- γ -induzierten hGBP-3-mRNA-Expression in Zelllinien hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Ursprungs

Zur Überprüfung der IFN- γ -Induzierbarkeit der hGBP-3-mRNA-Expression wurde ein Northern Blot mit Gesamt-RNA (15 μ g/Spur) von unbehandelten (Spur 1, 3, 5 und 7) oder IFN- γ -induzierten (Spur 2, 4, 6 und 8) HeLa S3- (Spur 1 und 2), HaCaT- (Spur 3 und 4), Jurkat- (Spur 5 und 6) und Raji-Zellen (Spur 7 und 8) mit einer hGBP-3-spezifischen cRNA-Sonde hybridisiert. Zur Darstellung der schwachen Expression von hGBP-3 in IFN- γ -induzierten Raji- und Jurkat-Zellen (Spur 6 und 8) ist zusätzlich eine längere Exposition zu sehen (kleines Bild). Zur Darstellung von Qualität und Menge der im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA ist das Ethidiumbromidgel vor dem Transfer abgebildet (unten).

4.2.2.4 Nachweis der hGBP-3-mRNA in unterschiedlich induzierten Leukozyten des peripheren Blutes und verschiedenen Geweben

Zur Untersuchung der hGBP-3-mRNA-Expression in verschiedenen menschlichen Geweben wurde ein käuflich erwerblicher Northern Blot mit mRNAs diverser humaner Gewebe mit der hGBP-3-Sonde hybridisiert.

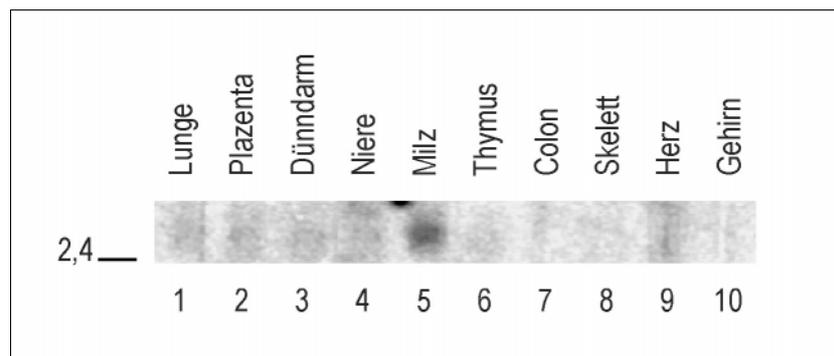


Abb. 34: Expression der hGBP-3-mRNA in humanem Gewebe

Ein kommerziell erhältlicher Northern Blot mit RNA verschiedener humaner Gewebe wurde mit einer hGBP-3-spezifischen Sonde hybridisiert.

Im Gewebelot wurde die hGBP-3-mRNA vorrangig in der Milz nachgewiesen. In Lunge, Plazenta, Dünndarm und Thymus konnte selbst nach langer Exposition nur ein sehr schwaches Signal vorgefunden werden (Abb. 34), während die hGBP-3-mRNA in Leber (Daten nicht gezeigt), Niere, Colon, Skelett, Herz und Gehirn nicht exprimiert wird (Abb. 34).

Im Anschluß an den Nachweis der hGBP-3-mRNA in Milzgewebe wurde untersucht, ob die mRNA in Monozyten oder anderen peripheren Blutzellen exprimiert wird und ob die Expression der mRNA durch IFN- γ oder andere Substanzen reguliert wird.

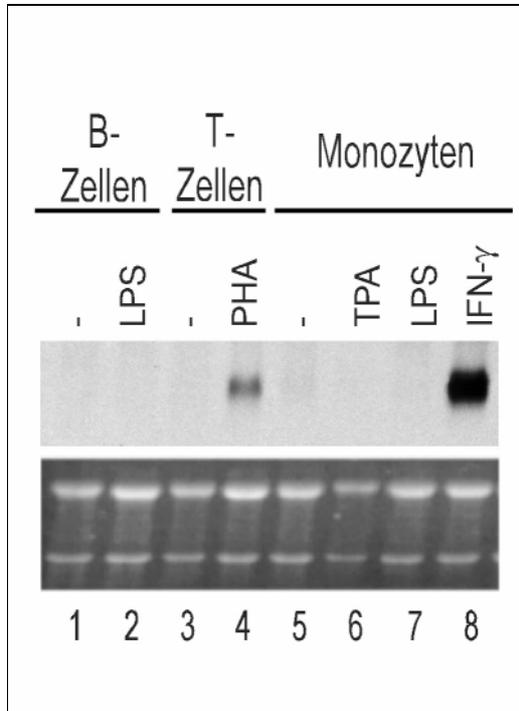


Abb. 35: Expression der hGBP-3-mRNA in Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes

Zur Untersuchung der hGBP-3-mRNA-Expression in peripheren Blutzellen wurde ein Northern Blot mit Gesamt-RNA von immunmagnetisch aufgereinigten B-Lymphozyten (Spur 1 und 2) und T-Lymphozyten (Spur 3 und 4) bzw. über Adhärenz isolierten Monozyten (Spur 5-8) hergestellt; die Zellen waren entweder 24 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS (B-Zellen; Spur 2) oder 8 $\mu\text{g/ml}$ PHA (Spur 4) behandelt oder 20 h mit 33 ng/ml LPS (Monozyten; Spur 7), 25 mM TPA (Spur 6) bzw. 1000 U/ml IFN- γ (Spur 8) behandelt worden. Die Hybridisierung erfolgte mit einer für hGBP-3-mRNA spezifischen cRNA-Sonde. Im unteren Bereich der Abbildung ist zur Abschätzung von Menge und Qualität der elektrophoretisch aufgetrennten RNA das mit Ethidiumbromid gefärbte denaturierende Agarosegel vor dem Northern-Transfer zu sehen.

Es wurde beobachtet, daß die hGBP-3-mRNA nicht nur in IFN- γ induzierten Makrophagen exprimiert wird; sie wird auch stark in PHA-stimulierten T-Zellen exprimiert (Abb. 35).

Der Nachweis der hGBP-3-mRNA in IFN- γ -induzierten Makrophagen und PHA-stimulierten T-Lymphozyten steht im Einklang mit dem Nachweis der mRNA in der Milz.

4.2.2.5 Nachweis der IFN- γ -Induzierbarkeit der hGBP-3 Proteinexpression

Für den Nachweis der Expression des hGBP-3-Proteins wurde ein polyklonales Antiserum hergestellt. Die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen das hGBP-3-Protein brachte das gleiche Problem mit sich wie die Analyse der mRNA-Expression: die Homologie zu den bereits bekannten GBP-Proteinen, hGBP-1 und hGBP-2. Für die Immunisierung eines Kaninchens wurde deshalb ein Peptid synthetisiert, welches einem Bereich im hGBP-3-Protein entspricht, der keine Homologie zu den beiden anderen Proteinen aufweist. Die Peptid-Sequenz lautet: RLHQEQVRQMEIAKQC. Hierbei entsprechen die ersten 15 Aminosäuren der Sequenz des hGBP-3-Proteins von As 520-534 (Abb. 29; Kap. 6.4). Über ein C-terminal an die Sequenz angefügtes Cystein wurde das Peptid mittels Glutaraldehyd an KLH gekoppelt und in der Kaninchen-Immunisierung eingesetzt; beides wurde von der Firma Eurogentec durchgeführt.

Das erhaltene Antiserum wurde zunächst im „Spottest“ analysiert. Hierfür wurden das Peptid, das an KLH gekoppelte Peptid sowie das Trägermaterial KLH auf Nitrocellulose aufgetragen, getrocknet und eine Entwicklung mit dem Präimmunserum, dem anti-hGBP-3-Antiserum und dem mit 100 µg/ml Peptid präabsorbierten anti-hGBP-3 Antiserum vorgenommen. Die Untersuchung ergab, daß das Präimmunserum sowohl das KLH-gekoppelte Peptid, als auch KLH erkennt, aber keine Reaktion mit dem Peptid allein zeigt (Daten nicht gezeigt). Das Antiserum erkennt dagegen, neben dem KLH-gekoppelten Peptid und dem Trägermaterial, auch das Peptid allein. Dabei wurden 100 ng Peptid gut und 10 ng nur noch sehr schwach bei einer Antikörperverdünnung von 1/1000 nachgewiesen. Eine Präabsorption des Antiserums mit 100 µg/ml Peptid unterband die Detektion des Peptides, während KLH und KLH-gekoppeltes Peptid noch erkannt wurden (Abb. 36).

Darüber hinaus wurde für den Spezifitätstest ein MBP-hGBP-3 Fusionsprotein hergestellt. Für die Herstellung des MBP-Fusionsproteins wurde eine PCR mit den Primern #863 und #864 und dem pBS 2107 V-Konstrukt als Matrize durchgeführt und das PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. Das Produkt wurde in den mit BamHI geschnittenen pEVRF0-HA-Vektor kloniert. Es entstand das Konstrukt pEVRF0-HA 2107#13 welches einen Basenaustausch von G nach T an Position 2102 und die Insertion eines Cytosins an Position 2268 aufweist. Das hGBP-3-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease BamHI aus dem pEVRF0-HA 2107#13-Konstrukt herausgeschnitten und in die BamHI-Schnittstelle des pMAL-c-Vektors eingefügt. Das entstandene pMAL-c 2107V#1-Konstrukt umfaßt C-terminal vom male-Gen die klonierte cDNA von hGBP-3 von Base 526 bis 2280, d.h. ohne Start- und Stopkodon, mit einem Aminosäureaustausch an Position 527 (Arginin gegen Isoleucin) und einem veränderten C-Terminus (CVLL anstelle von MCFT). Es werden Start- und Stopkodon vom Vektor genutzt. In der Region der für die Immunisierung verwendeten Peptidsequenz (As 520-534) weist das MBP-hGBP-3-Fusionsprotein dementsprechend einen Aminosäureaustausch (As 527) auf.

In einem Western Blot mit MBP-Protein und MBP-hGBP-3-Fusionsprotein wurde eine spezifische Interaktion mit dem MBP-hGBP-3-Fusionsprotein beobachtet, die bei Präabsorption mit 100 µg/ml hGBP-3-Peptid nicht zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt).

Da die zur Immunisierung verwendete Sequenz keine Homologie zu den Aminosäuresequenzen von hGBP-1 und hGBP-2 aufweist, kann davon ausgegangen werden, daß das Antiserum für das hGBP-3-Protein spezifisch ist.

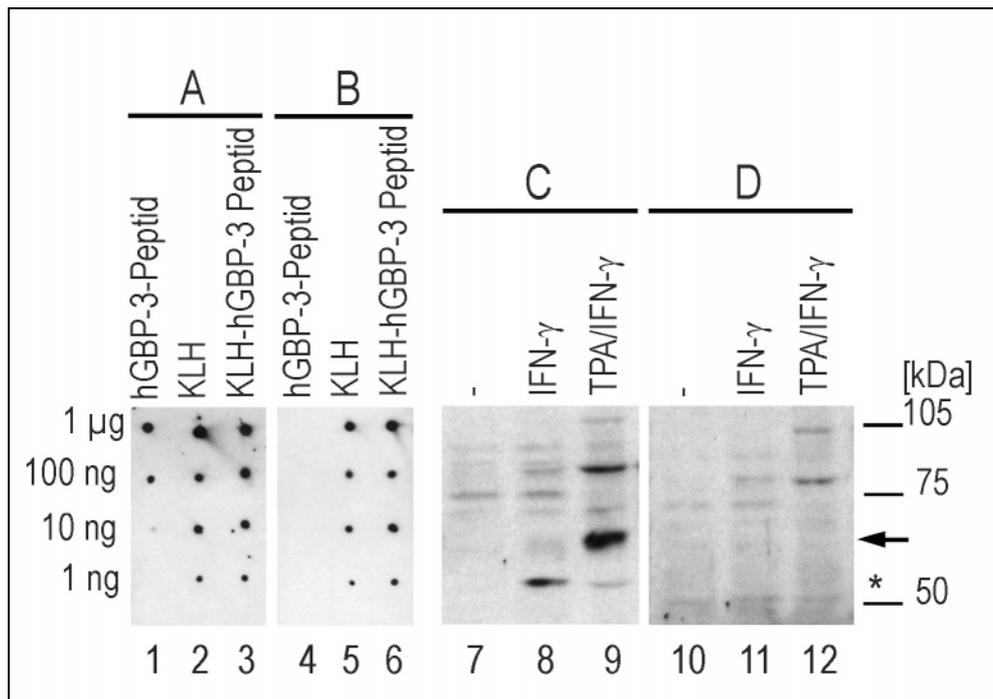


Abb. 36: Nachweis der Spezifität des Antiserums gegen hGBP-3

In A und B ist das Ergebnis eines Spotttests mit hGBP-3-Peptid, KLH bzw. KLH-gekoppeltem hGBP-3-Peptid als Antigen dargestellt; in C und D ist das Ergebnis eines Immunblots mit U937-Zell-extrakten zu sehen. Der Pfeil in C und D zeigt die spezifische hGBP-3-Bande bei ca. 66 kDa; der Stern markiert vermutlich alternativ prozessiertes hGBP-3. Für den Spotttest (A und B) wurden jeweils 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng bzw. 100 pg hGBP-3-Peptid (Spur 1 und 4), KLH (Spur 2 und 5) oder KLH-gekoppeltes Peptid (3 und 6) auf Nitrozellulosemembran aufgetragen; für den Western Blot (C und D) wurde Gesamtextrakt (1×10^8 Zellen/ml in SDS-PAGE-Ladelösung) unbehandelter (Spur 7 und 10), IFN- γ - (Spur 8 und 11) bzw. TPA/IFN- γ -behandelter (Spur 9 und 12) U937-Zellen elektrophoretisch im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Bei A und C wurde mit nicht präabsorbiertem hGBP-3-Antiserum (1/1000 verdünnt) entwickelt und bei B und D mit präabsorbiertem; für die Präabsorption des Antiserums wurde 1/1000 verdünntes anti-hGBP-3-Antiserum mit 100 µg/ml hGBP-3-Peptid über Nacht bei 4°C (B) oder 1 h bei RT (D) inkubiert.

Anschließend wurde untersucht, ob die in den Northern Blots beobachtete Induktion der hGBP-3-Expression nach IFN- γ - bzw. TPA/IFN- γ -Behandlung von THP-1- und U937-Zellen auch auf Proteinebene zu beobachten ist. Es wurde Gesamtextrakt von unterschiedlich induzierten THP-1- und U937-Zellen hergestellt, die Extrakte im SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot mit dem Antiserum gegen hGBP-3 durchgeführt.

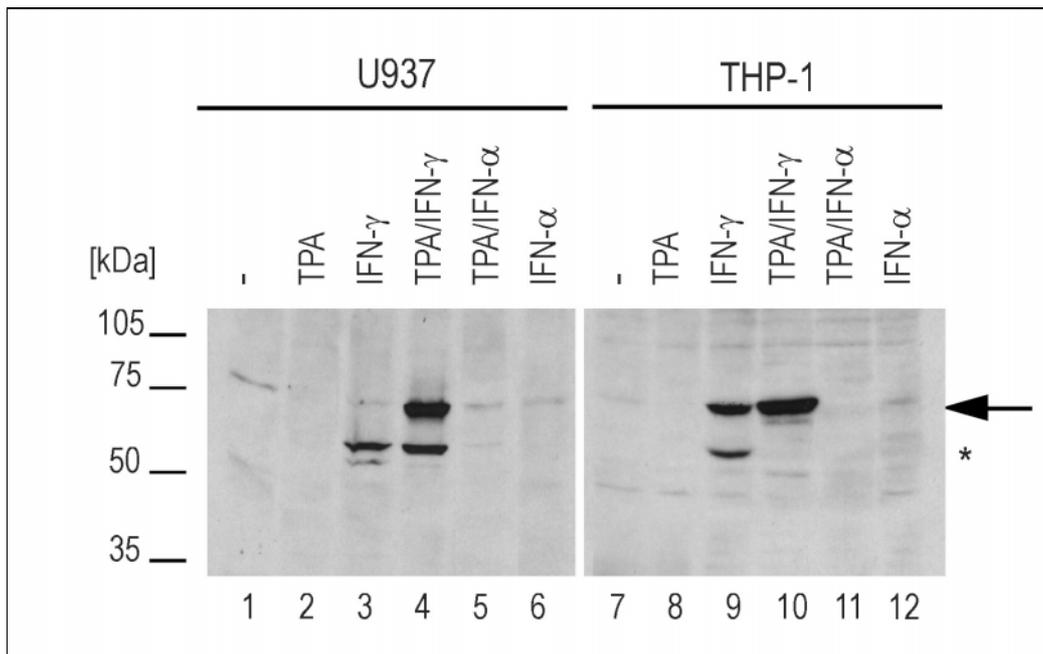


Abb. 37: Expression des hGBP-3-Proteins in unterschiedlich induzierten U937- und THP-1-Zellen

U937- und THP-1-Zellen wurden nicht behandelt (Spur 1 und 7), mit TPA behandelt (Spur 2 und 8), 24 h lang mit 1000 U/ml IFN- γ (Spur 3 und 9) bzw. 500 U/ml IFN- α (Spur 6 und 12) induziert oder mit TPA und IFN- γ - (Spur 4 und 10) bzw. TPA und IFN- α - (Spur 5 und 11; ebenfalls 500U/ml IFN- α) behandelt; die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen und gleiche Mengen im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferriert. Der Western Blot wurde mit anti-hGBP-3-Antiserum entwickelt. Der Pfeil markiert die spezifische hGBP-3-Bande bei ca. 66 kDa; der Stern kennzeichnet vermutlich alternativ prozessiertes hGBP-3.

Während nicht behandelte THP-1-Zellen nahezu keine Expression des hGBP-3-Proteins zeigen, wurde in IFN- γ -induzierten THP-1-Zellen und etwas stärker bei TPA- und IFN- γ -behandelten THP-1-Zellen eine Bande bei ca. 66 kDa beobachtet. Bei U937-Zellen wurde in nicht behandelten Zellen keine und in IFN- γ -induzierten Zellen nur eine sehr schwache Bande nachgewiesen; eine wesentlich stärkere Bande wurde bei TPA- und IFN- γ -behandelten Zellen beobachtet. Die Ergebnisse des Western Blots entsprechen somit genau den bereits auf mRNA-Ebene für THP-1- und U937-Zellen ermittelten Ergebnissen (vergl. Abb. 31 und Abb. 37). Wie bereits aufgrund der Untersuchung der mRNA-Expression in IFN- α -behandelten THP-1-Zellen erwartet, wurde bei beiden Zelllinien keine Induktion der Expression des hGBP-3-Proteins durch IFN- α beobachtet. Auch eine Vorbehandlung der Zellen mit TPA änderte daran nichts (Abb. 37). Wurde das Antiserum mit 100 μ g/ml hGBP-3-Peptid präabsorbiert, so wurde die Bande bei 66 kDa nicht beobachtet. Welche Bedeutung die etwas tiefer gelegene Bande bei etwas mehr als 50 kDa hat, die ebenfalls nach Präabsorption des Antiserums nicht mehr nachgewiesen wird, ist nicht geklärt; es könnte sich dabei um alternativ prozessiertes hGBP-3 handeln (Abb. 36).

Darüber hinausgehend wurde untersucht ob sich die Ergebnisse der mRNA-Expressionsstudien in peripheren Blutzellen auch auf Proteinebene nachvollziehen lassen.

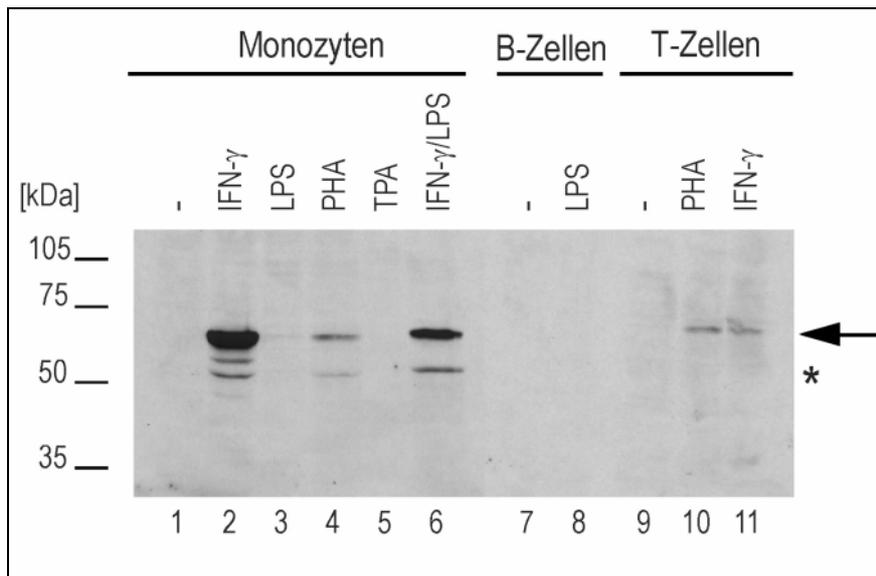


Abb. 38: Expression des hGBP-3-Proteins in Zellen des peripheren Blutes

Für den Western Blot wurden Monozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten immunmagnetisch aufgereinigt und anschließend unbehandelt in Kultur gehalten (Spur 1, 7 und 9) oder für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ (Spur 2 und 11), 33 ng/ml LPS (Monozyten; Spur 3), 10 μ g/ml LPS (B-Zellen; Spur 8), 8 μ g/ml PHA (Spur 3+10), 25 nM TPA (Spur 5) oder gleichzeitig mit 1000 U/ml IFN- γ und 33 ng/ml LPS (Spur 6) behandelt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen, gleiche Mengen im SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot mit Antiserum gegen hGBP-3 durchgeführt. Der Pfeil markiert die spezifische hGBP-3-Bande bei ca. 66 kDa; der Stern kennzeichnet vermutlich alternativ prozessiertes hGBP-3.

Die Expression des hGBP-3-Proteins wurde in IFN- γ -induzierten Monozyten und in PHA-behandelten T-Lymphozyten nachgewiesen; keine Expression fand sich in LPS- oder TPA-stimulierten Monozyten oder LPS-behandelten B-Lymphozyten. Zusätzlich wurde nachgewiesen, daß die hGBP-3-Proteinexpression in Monozyten auch durch PHA und in T-Lymphozyten auch durch IFN- γ induziert wird.

4.2.2.6 Nachweis der GTP-Bindung von hGBP-3

Für den Nachweis der GTP-Bindung wurden ein eukaryontisches Expressionsplasmid, kodierend für HA-markiertes rekombinantes hGBP-3, und ein Expressionskonstrukt mit mutierter hGBP-3-Sequenz hergestellt. Für die Konstruktion des hGBP-3-Expressionskonstrukts mit C-terminal lokalisierter HA-Markierung wurde eine PCR mit den Primern #863 und #864 durchgeführt, das PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten und in den ebenfalls BamHI-geschnittenen pEVRF0-HA-Vektor eingefügt. Dabei entstanden ausschließlich Konstrukte, die an unterschiedlichen Stellen Mutationen aufwiesen. Aus dem pEVRF0-HA 2107#13-Konstrukt mit den bereits in Kapitel 4.2.2.5 beschriebenen Mutationen im 3'-Bereich und dem pEVRF0-HA 2107#29-Konstrukt, mit einer Mutation an Position 664 (Cytosin gegen Thymin, resultierend in einem Aminosäureaustausch von Arginin gegen

Cystein), wurde ein Konstrukt mit fehlerfreier hGBP-3-Sequenz hergestellt: Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease XbaI wurde der mutierte Bereich aus dem Konstrukt pEVRF0-HA 2107#13 deletiert und durch das nicht mutierte XbaI-Fragment des pEVRF0-HA 2107#29 Konstrukts ersetzt. Es entstand das Konstrukt pEVRF0-HA 2107V#4, das für die hGBP-3 Aminosäuresequenz von 2 bis 586 kodiert.

Des Weiteren wurde ein Konstrukt mit mutierter GTP-Bindungssequenz kloniert. Es wurde an Aminosäureposition 52 ein Austausch von Serin gegen Asparagin vorgenommen. Durch diese Mutation konnte in anderen Guanylat-bindenden Proteinen ein Verlust der GTP-Bindung erreicht werden [103;236]. Es wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt: Mit den Primern #863 und #866 und StuI-geschnittenem pBS 2107V#4-Konstrukt bzw. den Primern #865 und #864 und AflIII-geschnittenem pBS 2107V#4-Konstrukt wurde zunächst die Mutagenese durchgeführt und anschließend in einer Fusions-PCR ein hGBP-3-PCR-Produkt von Base 526 bis 2280 mit Mutationen an Position 676 und 677 (TC gegen AA ausgetauscht) generiert. Das Fragment wurde mit BamHI nachgeschnitten und in den mit BamHI linearisierten pEVRF0-HA-Vektor 5' von der HA-Markierungssequenz kloniert. Das entstandene Konstrukt wurde pEVRF0-HA 2107 Asn52#17 genannt.

Zur Analyse der GTP-Bindung wurden HeLa S3-Zellen mit dem Wildtypkonstrukt (pEVRF0-HA 2107V#4) bzw. dem mutierten hGBP-3-Konstrukt (pEVRF0-HA 2107 Asn52#17) transfiziert, die Zellen geerntet, in CSK-Puffer lysiert und der zytoplasmatische Überstand zusammen mit GTP-Agarose inkubiert. Die Agarose wurde gewaschen und anschließend in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen. Die Proben wurden im Western Blot mit anti-HA-Antikörper analysiert.

Es wurde beobachtet, daß das Wildtypkonstrukt GTP-Agarose bindet, während die Mutante nur eine sehr geringe Bindung an die GTP-Agarose zeigt (Abb. 39). Das hGBP-3-Protein bindet dementsprechend GTP und die Aminosäure Serin an Position 52 spielt bei der Bindung eine entscheidende Rolle; die Mutation des Serin 52 führt allerdings nicht zu einer vollständigen Inhibition der Bindung.

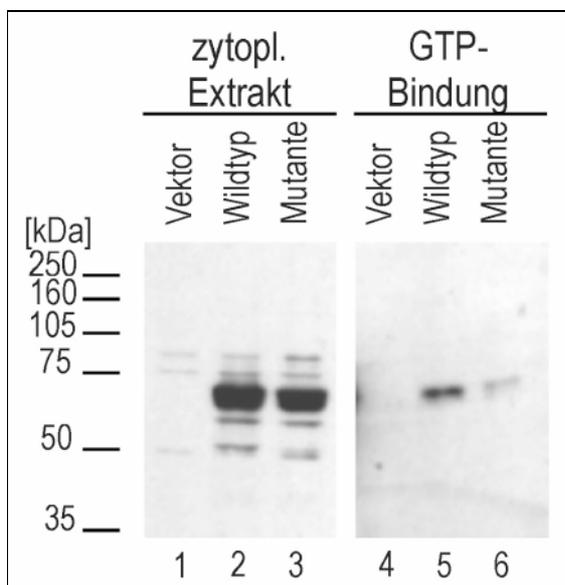


Abb. 39: Bindung von hGBP-3 an Agarose-gekoppeltes GTP

HeLa S3-Zellen wurden mit dem Vektor (Spur 1 und 4; pEVRF0-HA), dem Wildtypkonstrukt, kodierend für rekombinantes HA-markiertes hGBP-3 (Spur 2 und 5; pEVRF0-HA 2107V#4), oder der Mutante, kodierend für mutiertes HA-markiertes hGBP-3 (Spur 3 und 6; pEVRF0-HA 2107 Asn52#17) transfiziert, 12 h nach der Transfektion für 24 h mit 1000 U/ml IFN- γ induziert und in CSK-Puffer lysiert. Der zytoplasmatische Überstand (Spur 1-3) wurde mit an Agarose gebundenem GTP inkubiert. Die gewaschene Agarose wurde in SDS-PAGE-Ladelösung aufgenommen und ein Immunblot mit anti-HA-Antikörper durchgeführt. Spur 4-6 zeigen das Ergebnis der GTP-Bindung.

5 Diskussion

Die Gesundheit und Lebensfähigkeit des Organismus wird ständig durch potentielle Pathogene, wie Bakterien, Viren, Protozoen und Helminthen wie auch durch entartete körpereigene Zellen bedroht. Dem Schutz des Organismus vor derartigen Krankheitserregern dient das Immunsystem. Man unterscheidet dabei zwei Formen der Immunantwort: die unspezifische Immunantwort, wird u.a. von Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und dem Komplement vermittelt; die erworbene spezifische Immunantwort wird vorrangig von Lymphozyten und Antikörpern vermittelt [1]. Reguliert wird die Immunantwort durch ein Netzwerk kleiner interzellulär wirkender Proteine, den Zytokinen. Zu dieser Gruppe gehören auch die Interferone [79].

Die Interferone bilden eine Familie von Proteinen, die verschiedene biologische Funktionen ausüben. IFN- γ ist ein wichtiger Faktor im Rahmen der zellvermittelten Immunität. Die vielfältigen Effekte von IFN- γ schließen u.a. die Fähigkeit zur Inhibition viraler Replikation, die Stimulation antimikrobieller Aktivität sowie die Kontrolle des Zellwachstums und der Differenzierung ein. IFN- γ beeinflusst die für die Immunantwort wichtige Interaktion von Leukozyten und Endothel und ist einer der wirksamsten Aktivatoren von Makrophagen [1;82;244]. Interferone beeinflussen darüber hinaus die Phagolysosomenfusion und die Azidifikation von Vakuolen, die zelluläre Kompartimentierung, [156;282;283] und den Aufbau des Zytoskeletts [32;109;304;312;313].

Vermittelt werden die Effektorfunktionen von IFN- γ durch die Regulation der Expression verschiedener Gene, wie z.B. der von Proteinen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind. IFN- γ bindet an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und aktiviert den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg. Es kommt zur Bildung von spezifischen Transkriptionskomplexen wie GAF und ISGF3, die durch Bindung an Konsensussequenzen in Promotoren und Enhancern die Transkription von Genen beeinflussen [31;129;240;323].

Bis heute sind mehr als 200 Gene beschrieben worden, deren Expression durch IFN- γ induziert wird (<http://198.94.213.64/ari/sup/im/im15/im15a.htm>). Von vielen ist die Funktion noch nicht bekannt [31].

In dieser Arbeit wurden drei Gene untersucht, deren mRNA nach Stimulation mit Interferon vermehrt exprimiert wird. Hierbei handelt es sich um zwei intrazellulär lokalisierte Proteine und ein sezerniertes Protein.

5.1 IFP 35 und zytoplasmatische Multiproteinkomplexe

5.1.1 IFP 35, ein Leuzin-Zipper-Protein

IFP35 ist ein Protein, welches in vielen Zelllinien und Geweben exprimiert wird und dessen Expression sowohl durch IFN- α als auch IFN- γ induziert wird [16;319]. Das IFP35-Protein weist N-terminal ein sogenanntes Leuzin-Zipper-Motiv auf. Dieses Motiv besteht aus einer periodischen Wiederholung der Aminosäure Leuzin oder anderer hydrophober Aminosäuren

an jeder siebten Aminosäureposition und umfaßt mindestens acht Umdrehungen der α -Helix. Es kommt zur Ausbildung einer parallelen doppelsträngigen, α -helikalen sogenannten „coiled coil“-Struktur, die es Proteinen erlaubt Dimere auszubilden [229]. Das Leuzin-Zipper-Motiv wurde zuerst für Proteine der AP-1-Familie von Transkriptionsfaktoren beschrieben, die zusätzlich zum Leuzin-Zipper eine basische, für die DNA-Bindung notwendige, Domäne besitzen [153;180]. Später wurde festgestellt, daß Leuzin-Zipper-Motive nicht auf DNA-bindende Proteine beschränkt sind, sondern Domänen darstellen, die allgemein Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln [8;45;46;111;141;260;315].

IFP35 gehört zu den Leuzin-Zipper-Proteinen ohne DNA-bindende basische Domäne, verfügt aber wie viele andere Leuzin-Zipper-Proteine über die Fähigkeit zur Homodimerisierung. IFP35 ist in nicht induzierten Zellen bei der Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten, unter Verwendung von NP-40 als Detergens, sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion nachzuweisen; nach IFN-Induktion ist IFP35 vermehrt in der nukleären Fraktion lokalisiert. Der Umstand, daß IFP35 einen Leuzin-Zipper aufweist und nach IFN-Induktion vorwiegend in der nukleären Fraktion zellulärer Extrakte anzutreffen ist, führte zu der Annahme, daß IFP35 im Nukleus lokalisiert ist [16;319].

5.1.2 Lokalisierung von IFP 35 im Zytoplasma IFN- γ -induzierter Zellen

Immunfluoreszenzstudien, bei denen sowohl ein polyklonales Antiserum gegen IFP35 als auch ein monoklonaler Antikörper gegen IFP35 verwendet wurde, zeigten, daß IFP35 nach IFN- γ - und IFN- α -Induktion im Zytoplasma punktartige Strukturen ausbildet. Diese zytoplasmatische Verteilung wurde in Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs beobachtet. Größe, Anzahl und Anordnung des Punktmusters variierten in Abhängigkeit von der Zelllinie. So war nach IFN- γ -Induktion von HeLaS3-Zellen die Entstehung von 10-20 größeren, wahllos im Zytoplasma verteilten Strukturen zu beobachten, während in einer anderen Zelllinie, wie z.B. der Fibroblastenzelllinie GM 637, eine größere Anzahl kleinerer Strukturen beobachtet wurde. In anderen Zelllinien, z.B. den Lungenkarzinomzelllinien SW 1573 und A 549, waren die Punkte teilweise „perlschnurartig“ angeordnet. In nicht induzierten Zellen waren diese Strukturen nicht oder nur vereinzelt vorzufinden. Eine Lokalisierung von IFP35 im Nukleus wurde nicht beobachtet. Die Spezifität des entstehenden Punktmusters wurde dadurch bestätigt, daß 1.) dieses Muster nach Präabsorption des Antiserums nicht mehr beobachtet werden konnte und 2.) zwei verschiedene Antikörper gegen IFP35 dasselbe Ergebnis zeigten.

Das IFN-induzierte Verteilungsmuster konnte erstmals 6-12 h nach IFN-Induktion beobachtet werden, wobei die Anzahl der punktförmigen Strukturen mit der Zeit kaum anstieg, die Größe allerdings zunahm. Ein Hinweis darauf, daß IFP35 an definierten Ankerpunkten in der Zelle akkumuliert. Ein Abbau der Aggregate konnte selbst 96 h nach Entfernung des Induktionsreizes kaum beobachtet werden, was dafür spricht, daß diese Komplexe sehr stabil sind und nur langsam abgebaut werden.

Die spezifische Struktur erinnerte an die Verteilung von bekannten zellulären Organellen oder Kompartimenten. In Doppelimmunfluoreszenzstudien mit Antikörpern gegen verschie-

dene Organellen und subzelluläre Kompartimente konnte jedoch eine Kolo­kalisierung mit beschriebenen Strukturen wie Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, Golgi Apparat, Endosomen und der Plasmamembran nicht nachgewiesen werden. Subzelluläre Fraktionierungen unter Verwendung von Percoll-Gradienten führten zu dem Ergebnis, daß IFP35 zusammen mit einem Marker für das Zytoplasma in der Fraktion geringster Dichte kolo­kalisiert; ein Hinweis auf die zytoplasmatische Lokalisierung des Proteins. Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt werden; es wurde fast ausschließlich zytoplasmatisch ver­teiltes IFP35 nachgewiesen, welches nicht in Zellorganellen oder Kompartimenten lokalisiert war und keine Assoziation mit Membranen zeigte.

Unter Anwendung von Immunfluoreszenz, subzellulärer Fraktionierung und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß IFP35 punk­artige Strukturen im Zytoplasma ausbil­det, die nicht in Kompartimenten oder Organellen lokalisiert sind. Die Größe dieser Strukturen in der Immunfluoreszenz, wie auch die Anzahl der Goldpartikel in der Elektronenmikroskopie, läßt auf die Bildung von Proteinaggregaten schließen.

Aggregatbildung wurde bereits für andere Proteine beschrieben. Ein zytoplasmatisch ver­teiltes punktförmiges Muster in der Immunfluoreszenz wurde von Moll et al. bei Verwendung von Antikörpern gegen das Tumorsuppressorprotein p53 beobachtet [215]. Für Ubiquitin und Proteasomen-Antigene wurden perinukleäre Aggregate beschrieben [325]. Die Ausbildung zytoplasmatischer Ribonukleoproteinkomplexe wurde für das Leuzin-Zipper Protein LINE-1 nachgewiesen [141]. Auch für IFN-induzierte Proteine sind Aggregatbildungen beschrieben worden: So finden sich IFN-induzierbare Proteine in PML NBs („human promyelocyte leu­kemia nuclear bodies“); hierbei handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die mit der nukleären Matrix assoziiert sind [107;120;170].

Über die Funktion dieser Proteinaggregate und die strukturellen Hintergründe wird in der Regel nur spekuliert. So wird vermutet, daß die Ubiquitin-Proteasomen-Komplexe, die u.a. nach Behandlung von Zellen mit Proteasomen-Inhibitoren auftreten, in Zentren entstehen, in denen die durch Ubiquitin und Proteasomen vermittelte Proteolyse stattfindet. In diesen „Proteolyse-Zentren“ sammeln sich die Ubiquitin-Proteasomen-Komplexe, wenn die Proteo­lyse gehemmt und die Freisetzung der Komplexkomponenten Ubiquitin, Peptid und Proteasom verhindert wird. Es wird vermutet, daß die Aggregate, wenn sie einmal entstanden sind, nicht oder nur sehr langsam abgebaut werden [325]. Im Fall der von Moll et al. beschriebenen Lokalisierung des p53-Tumorsuppressorproteins im Zytoplasma wird durch diese Sequestrie­rung vermutlich eine Translokierung von p53 in den Zellkern verhindert; p53 steht dann nicht mehr als Suppressor im Zellkern zur Verfügung [214;215;234]. Bei den PML NBs wird ver­mutet, daß sie eine Rolle in der Vermittlung antiviraler Effekte von Interferonen spielen, da sie mit viralen Proteinen interagieren und die Expression einiger PML NB-assoziiierter Proteine IFN-induzierbar ist [120].

5.1.3 IFP 35 ist in Proteinkomplexen organisiert

Aufgrund der Ergebnisse aus Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie, wurde das native Molekulargewicht von IFP35 bestimmt. IFP35 eluierte bei der Auftrennung von postnukleärem Überstand auf einer Gelfiltrationssäule bei einem Molekulargewicht von 150-440 kDa. Dies legt die Vermutung nahe, daß IFP35 Homo- oder Heteromultimere ausbildet und in großen Multiproteinkomplexen lokalisiert ist.

Die Beobachtung, daß endogenes und rekombinantes IFP35 in Immunpräzipitationsstudien dimerisieren, läßt vermuten, daß mehrere IFP35-Moleküle in einem derartigen Proteinaggregat vorhanden sind. Eine Inhibition der Translation mit Cycloheximid [100] zeigte, daß die Bildung der Aggregate von einer weiteren Komponente abhängig ist. Die spezifische, in der Immunfluoreszenz sichtbare, IFP35-Struktur löste sich nach 3stündiger Behandlung der Zellen mit CHX auf, während im Western Blot kein Abbau des IFP35-Proteins zu verzeichnen war. Es wird dementsprechend vermutet, daß an der Ausbildung des punktförmigen IFP35-Verteilungsmusters eine CHX-sensible Komponente beteiligt ist. Es muß sich bei der CHX-sensiblen Komponente nicht zwangsläufig um ein Protein des Komplexes handeln. Es kann auch ein Enzym sein, welches notwendige Bestandteile des Komplexes vor ihrer Bindung modifiziert und somit für die Interaktion mit dem Komplex aktiviert.

5.1.4 Identifizierung der Interaktionspartner von IFP 35 und potentieller Komponenten des postulierten Multiproteinkomplexes

Ein Interaktionspartner von IFP35 konnte in Nmi gefunden werden. Nmi ist wie IFP35 ein IFN-induziertes Protein mit bisher unbekannter Funktion und weist im C-Terminus eine Homologie zu IFP35 auf [18]. Wie IFP35 zeigt Nmi ein nach IFN-Induktion auftretendes zytoplasmatisch verteiltes punktförmiges Verteilungsmuster [181]. In der Doppelimmunfluoreszenz wurde eine Kolo-kalisierung und in der Immunpräzipitation von rekombinantem Nmi und endogenem IFP35 eine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen.

Die von Wang et al. veröffentlichte Interaktion von IFP35 und B-ATF [319], einem Leuzin-Zipper-Protein mit basischer Region, konnte weder mittels Immunfluoreszenz noch mit Hilfe der Immunpräzipitation bestätigt werden.

Die Tatsache, daß IFP35 im Zytoplasma lokalisiert ist, aber nach Lyse der Zellen mit NP-40 in der nukleären Fraktion anzutreffen ist, führte zu der Vermutung, daß IFP35 mit Komponenten des Zytoskeletts, wie z.B. Zytokeratinen, assoziiert sein könnte [67;68;187]. Das Zytoskelett setzt sich vornehmlich aus drei Komponenten zusammen: dem Aktinskelett, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Die Bildung des IFN-induzierten IFP35-Verteilungsmusters wurde durch Cytochalasin D, ein Agens, welches das Aktinskelett zerstört, nicht verhindert [250]. Auch durch Nocodazol, ein die Mikrotubuli depolymerisierendes Agens [335], wurde die punktförmige Verteilung von IFP35 nicht aufgelöst. Das Aktinskelett und die Mikrotubuli sind dementsprechend nicht die Strukturen, die für die Organisation der Struktur verantwortlich sind. Darüber hinaus kann ausgeschlossen werden, daß IFP35 mit dem Aktinskelett interagiert, da in der Immunfluoreszenz keine Kolo-kalisierung mit dem Aktin-

skelett beobachtet wurde. Ein wichtiges Ergebnis war die Beobachtung, daß IFP35 mit einem Bestandteil der Intermediärfilamente, dem Zytokeratin 19 (CK 19) interagiert. In den Lungenkarzinom-Zelllinien A 549 und SW1573 wurde in den Bereichen, in denen eine perlschnurartige Anordnung der IFP35 enthaltenden Komplexe vorlag, eine Kolokalisierung mit CK 19 beobachtet. Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen IFP35 und die in HeLa S3-Zellen exprimierten Zytokeratine 7, 8, 17 und 18 zeigten keine in der konventionellen Mikroskopie erkennbare Kolokalisierung. In dieser Zelllinie war, anders als in den genannten Lungenkarzinom-Zelllinien, keine in irgendeiner Form geordnete regelmäßige Anordnung der IFP35 enthaltenden Aggregate beobachtet worden. Vermutlich gibt es über das CK 19 hinausgehend weitere Strukturproteine, die IFP35 beinhaltende Multiproteinkomplexe binden.

Moll et al. beschrieben kürzlich eine zytoplasmatische Struktur, die der in HeLa S3-Zellen beobachteten IFP35-Struktur sehr ähnelt. Es handelt sich dabei um im Zytoplasma sequestriertes p53. Diese Komplexe wurden vorrangig bei Verwendung des gegen p53 gerichteten monoklonalen Antikörpers pAb1801 beobachtet [214;215;234]. In der konfokalen Laser Scan Mikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit eine vollständige Kolokalisierung des IFP35-Punktmusters und der vom Antikörper pAb1801 erkannten Struktur in HeLa S3-Zellen beobachtet. In Zelllinien, in denen eine teilweise Kolokalisierung von IFP35 und CK 19 beobachtet werden kann, ist diese Kolokalisierung nur partiell (ca. 10-20%). Durch Untersuchungen zur Spezifität des pAb1801-Antikörpers wurde nachgewiesen, daß es sich bei dem Protein, welches die von dem Antikörper erkannten Strukturen bildet, nicht um p53, sondern um eine Kreuzreaktion mit einem bisher unbekanntem Protein handelt. Eine Kreuzreaktion des pAb1801-Antikörpers war bereits in älteren Publikationen vermutet worden; mit dem Antikörper pAb1801 waren in der Immunfluoreszenz punktartige Strukturen in Zellen beobachtet worden, in denen mit anderen Methoden kein p53 nachgewiesen werden konnte [20].

Im Western Blot konnte in HeLa S3-Zellextrakten mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen p53 und einem polyklonalen, gegen p53 gerichteten Antiserum, p53 nur sehr schwach bzw. gar nicht nachgewiesen werden. Dies entspricht Veröffentlichungen, wonach p53 in HeLa-Zellen kaum nachweisbar ist [186;200;271]. In der Lungenkarzinomzelllinie SW1573 wurde p53 von allen im Western Blot einsetzbaren Antikörpern nachgewiesen. Ein weiteres Indiz für die Kreuzreaktion von Antikörper pAb1801 sind von Wang et al. im Rahmen der Untersuchungen zur Interaktion von IFP35 und B-ATF durchgeführte Studien zur Interaktion von p53 und IFP35; hier wurde keine eindeutige Interaktion der beiden Proteine beobachtet [318].

Bei dem Protein, mit dem der Antikörper pAb1801 kreuzreagiert, handelt es sich nicht um IFP35 oder Nmi, weil die vom pAb1801-Antikörper erkannte punktartige Struktur nicht in allen untersuchten Zelllinien vollständig mit IFP35 oder Nmi kolokalisiert und bereits in nicht induzierten Zellen vorhanden ist. Es könnte sich bei dem in der Kreuzreaktion erkannten Protein um das gesuchte Strukturprotein handeln, an das die IFP35 enthaltenden Komplexe zumindest teilweise binden und durch das sie evtl. am Zytoskelett verankert werden. Die Vermutung wird dadurch gestützt, daß das Punktmuster in allen untersuchten Zelllinien (sowohl in

unbehandelten als auch in IFN- γ -induzierten Zellen) zu beobachten und nach Behandlung der Zellen mit CHX nicht mehr nachweisbar ist. Die Bindung von IFP35 an die von Antikörper pAb1801 erkannten Strukturen und die Bildung der Proteinaggregate ist nicht IFN- γ -abhängig, da 1.) IFP35 in nicht induzierten, rekombinantes IFP35 exprimierenden Zellen ebenfalls mit den vom pAb1801-Antikörper detektierten Strukturen kolokalisiert und 2.) in nicht induzierten Zellen mit dem Antiserum gegen IFP35 teilweise kleinere, punktförmige Strukturen nachgewiesen werden können, die mit den von Antikörper pAb1801 erkannten Strukturen kolokalisieren. Ein weiteres Indiz für die IFN-unabhängige Bildung dieser Proteinaggregate ist die Beobachtung, daß große IFP35 enthaltende Komplexe in der Gelfiltration auch in nicht induzierten Zellen nachweisbar sind (nicht gezeigte Daten). Infolge IFN-Induktion nehmen sie allerdings in ihrer Anzahl und Größe zu und die IFN-induzierten Proteine wie IFP35 und Nmi sind erst dann in der Immunfluoreszenz nachweisbar.

Es gibt aufgrund der vorliegenden Daten drei potentielle Interaktionspartner von IFP35, die an der Bildung zytoplasmatischer Aggregate beteiligt sein könnten. Das IFN-induzierbare Nmi-Protein ist nach den vorliegenden Ergebnissen immer in den postulierten Aggregaten vorhanden, da eine Kolokalisierung von Nmi und IFP35 in allen untersuchten Zelllinien beobachtet wurde. Die Anordnung der Proteinaggregate deutet darauf hin, daß sie an einer Komponente des Zytoskeletts verankert sind, die auch als Initiationspunkt für die Komplexbildung fungieren könnte. Eine partielle Interaktion von IFP35 und CK19 wurde beobachtet. In Zusammenarbeit mit B. Omary wurde nachgewiesen, daß die Interaktion der Proteine von der Phosphorylierung von IFP35 abhängt (Omary, nicht veröffentlichte Daten). Mit dem Protein, mit dem der Antikörper pAb1801 kreuzreagiert, liegt ein weiterer Bindungspartner vor.

5.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

IFP35 ist ein Protein, welches nach IFN-Induktion ein bisher für IFN-induzierte Zellen noch nicht beschriebenes Punktmuster im Zytoplasma ausbildet. IFP35 interagiert mit Nmi, das wiederum mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie N-Myc, C-Myc, Max, Mxi1 und Fos interagieren kann [18]. Außerdem interagiert IFP35 phosphorylierungsabhängig mit CK19, einem Mitglied der Familie der Intermediärfilamente, für die eine Beteiligung an der intrazellulären Signalleitung [19;50;232] und der Genregulation [301] diskutiert wird. Wie diese Interaktion aussieht ist noch nicht geklärt, aber die Interaktion von Komplexkomponenten mit Transkriptionsfaktoren und deren Verankerung am Zytoskelett, wie z.B. an CK19, könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Für Nmi ist bereits eine Funktion als Adaptermolekül in der Protein-Protein-Interaktion diskutiert worden. Eine derartige Funktion ist für das HTLV-1 Tax-Protein oder das HMG-1-Protein beschrieben worden; beide interagieren mit der basischen Region von bZip-Transkriptionsfaktoren [18]. IFP35 könnte in diesen Komplexen eine Verbindung zwischen Nmi und anderen Komponenten des Komplexes herstellen und somit der Oligomerisierung der Proteine dienen.

Die Komplexe assoziieren vermutlich mit Zellstrukturen, die bereits vor der IFN-Induktion vorhanden sind. Neben CK19 spielt hierbei das vom Antikörper pAb1801 erkannte Protein

eine Rolle. Es wird zum einen in nicht induzierten Zellen exprimiert und scheint dort mit IFP35 zu interagieren, wo IFP35 nicht mit CK19 interagiert. Da in sämtlichen bisher untersuchten Zelllinien mindestens eine partielle Kolo-kalisierung von IFP35 und dem vom pAb1801-Antikörper erkannten Protein beobachtet werden konnte, wird vermutet, daß dieses Protein, wie auch Nmi eine Rolle in der Aggregatbildung oder Aggregaterhaltung spielt. Möglicherweise handelt es sich bei dem Protein sogar um die Zytoskelettkomponente, die dafür verantwortlich ist, daß die zytoplasmatisch lokalisierten Komplexe in der Zellfraktionierung in der nukleären, auch Zytoskelettkomponenten enthaltenden, Fraktion lokalisieren. Dementsprechend kann eine Identifizierung dieses Proteins zur Aufklärung der Funktion bzw. Struktur von IFP35 und der Multiproteinkomplexe beitragen. Zur Zeit wird versucht dieses Protein durch Untersuchung einer Expressionsgenbank mit Hilfe des pAb1801-Antikörpers zu identifizieren.

5.2 Nociceptin/OFQ, ein Neuropeptid mit immunologischer Funktion?

5.2.1 Nociceptin/OFQ und sein Rezeptor ORL 1

Die Erforschung von Nociceptin/OFQ begann mit der Entdeckung seines Rezeptors. Er wurde 1994, aufgrund seiner Homologie zu bereits bekannten Opioid-Rezeptoren, von mehreren Gruppen als cDNA-Klon bzw. genomischer DNA-Klon aus verschiedenen Spezies isoliert und zunächst unterschiedlich benannt [47;61;112;176;216;227;318;322]; Mollereau et al. isolierten den Rezeptor aus humaner genomischer DNA und nannten ihn ORL 1 („opioid receptor-like receptor 1“) [216]. Bei dem ORL 1-Rezeptor handelt es sich um einen sieben Transmembrandomänen umfassenden, G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der strukturell und funktionell den Opioid-Rezeptoren ähnlich ist [216]. Der ORL 1-Rezeptor sprach auf Aktivierung mit bekannten Opioiden oder Opioid-Rezeptor-Agonisten sehr schlecht oder gar nicht an. Dementsprechend wurde vermutet, daß er nicht zu den klassischen Opioid-Rezeptoren gehört und einen noch unbekanntem Liganden bindet [47;216;318;322].

Der endogene Ligand des ORL 1-Rezeptors wurde parallel von zwei Arbeitsgruppen beschrieben und unterschiedlich benannt: von Meunier et al. wurde der Ligand aus dem Gehirn von Ratten isoliert und Nociceptin genannt, da er die Nociception, d.h. die Wahrnehmung von Schmerz vermittelt [206]; Reinscheid et al. isolierten den Liganden aus dem Gehirn von Schweinen und nannten ihn Orphanin FQ (OFQ), da er endogener Ligand eines Orphan-Rezeptors ist und die letzten beiden Aminosäuren F und Q sind [258]. Es handelt sich bei dem Liganden um ein Heptadecapeptid mit großer Homologie zu Dynorphin A. Das Peptid bindet hochaffin an den ORL 1-Rezeptor und ist in der Lage die Forskolin-vermittelte Stimulation der Adenylat-Zyklase zu inhibieren [206;258]; Nociceptin/OFQ ist nicht in der Lage Opioid-Rezeptoren zu aktivieren [258]. Die cDNA-Sequenz von Nociceptin/OFQ wurde 1996 veröffentlicht und weist eine große Homologie zu Preproenkephalin und Preprodynorphin auf [217;228].

Die Expression und Funktion von Nociceptin/OFQ im zentralen Nervensystem (ZNS) ist vielfach untersucht worden [7;47;89;110;112;176;216;217;228;241;258;261;330]. Intracerebroventricular injiziert beeinflusst Nociceptin/OFQ in Mäusen die Bewegungsaktivität und steigert die Schmerzempfindung. Es wird eine von den Funktionen der Opiode abweichende bzw. anti-Opioid-Rolle von Nociceptin/OFQ im ZNS vermutet [123;206;212;258].

Auf molekularer Ebene inhibiert Nociceptin/OFQ die Adenylat-Zyklase [206;258], beeinflusst spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle [76;168] und die Aktivität von K^{+} -Kanälen [201;309;334]. Vermutlich übt der ORL1-Rezeptor die Effekte über Go- oder Gi-Untereinheiten von G-Proteinen aus [76].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein, aus einer für cDNAs IFN- γ - und TPA-induzierter mRNAs angereicherter Genbank isolierter, cDNA-Klon von Nociceptin/OFQ charakterisiert. Die Aminosäuresequenz des isolierten Nociceptin/OFQ Klons weist an Position 89 einen Aminosäureaustausch auf und stellt somit eine Variante der von Nothacker et al. und Mollereau et al. publizierten Sequenzen dar [217;228].

5.2.2 Expression von Nociceptin/OFQ und vom ORL1-Rezeptor in Zellen hämatopoetischen Ursprungs

Während über die Expression des ORL1-Rezeptors in Zellen hämatopoetischen Ursprungs bereits vereinzelt Daten vorlagen, war in Bezug auf die Expression des Liganden in derartigen Zellen nur wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Northern-Analysen nachgewiesen, daß die mRNA-Expression von Nociceptin/OFQ durch IFN- γ reguliert wird. Die Expression der mRNA wurde nach IFN- γ -Induktion in mit TPA zur Differenzierung angeregten THP-1-Zellen, einer Makrophagen-Vorläuferzelllinie, induziert. In nicht behandelten, TPA-behandelten oder nur IFN- γ -induzierten Zellen war keine signifikante Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA nachzuweisen. In einer anderen Makrophagen-Vorläuferzelllinie, U937, wie auch in Monozyten des peripheren Blutes wurde nach TPA- und IFN- γ -Behandlung keine nennenswerte Steigerung der Expression des Liganden beobachtet; es lag eine geringe basale Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA in Monozyten des peripheren Blutes vor. Es wird dementsprechend vermutet, daß eine Induktion der Nociceptin/OFQ-mRNA-Expression durch IFN- γ nicht generell in allen Zellen monozytären Ursprungs erfolgt, sondern zelllinienspezifisch ist.

Eine Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA in peripheren Geweben und Zellen wurde bisher nur in humanem Milzgewebe und in nicht weiter differenzierten humanen Leukozyten des peripheren Blutes nachgewiesen [228]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommene Identifizierung einer die Nociceptin/OFQ-mRNA stark exprimierenden Blutzellpopulation stellt einen entscheidenden Schritt in der Charakterisierung von Nociceptin/OFQ dar. Im Gegensatz zur geringfügigen Expression in Monozyten, wurde die Nociceptin/OFQ-mRNA in unbehandelten B-Lymphozyten des peripheren Blutes in großen Mengen exprimiert. B-Lymphozyten sind somit vermutlich die primär Nociceptin/OFQ sezernierenden Immunzellen.

Darüber hinaus wurden erfolgreich Blutzellsubpopulationen identifiziert, welche die mRNA des Rezeptors exprimieren. Es wurden sowohl in Monozyten des peripheren Blutes als auch in Granulozyten große Mengen der ORL1-Rezeptor-mRNA im Northern Blot nachgewiesen; eine geringe Expression war in B- und T-Lymphozyten zu beobachten. Die Ergebnisse werden durch dieses Jahr von Peluso et al. veröffentlichte Daten bestätigt: Bei der Untersuchung von Leukozyten des peripheren Blutes wurde hier eine Expression der Rezeptor-mRNA in Monozyten wie auch in nicht weiter differenzierten Lymphozyten beobachtet [241]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA in Leukozyten des peripheren Blutes nicht durch PHA oder LPS beeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu den von Wick et al. ermittelten Ergebnissen; dort wurde die Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA in humanen Lymphozyten durch PHA induziert [322].

Bei der Untersuchung einer Reihe von Zelllinien hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Ursprungs wurde nachgewiesen, daß der ORL1-Rezeptor in einer Vielzahl von Zellen mehr oder weniger stark konstitutiv exprimiert wird; eine Beobachtung, die für Zellen hämatopoetischen Ursprungs durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt wird [241;322].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expression der ORL1-Rezeptor-mRNA in unbehandelten Zellen der Makrophagen-Vorläuferzelllinien U937, HL-60 und THP-1 nachgewiesen. Während die Expression des Rezeptors in U937-Zellen nicht durch TPA beeinflusst wird, wird die Expression in THP-1-Zellen durch TPA allein sowie durch TPA in Kombination mit IFN- γ vollständig reprimiert. Auch HL-60-Zellen zeigen eine Reprimierung der Rezeptorexpression nach TPA/IFN- γ -Behandlung. Interessanterweise wird die mRNA des Rezeptors nur dann exprimiert, wenn die mRNA des Liganden nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird. Die mRNA des Rezeptors wird z.B. in Monozyten stark exprimiert, während nur eine geringe Expression der Nociceptin/OFQ-mRNA in dieser Zellpopulation nachweisbar war. Der umgekehrte Fall liegt bei B-Lymphozyten vor. Diese gegenläufige Expression wurde bei sämtlichen untersuchten Zellen sowie bei Verwendung verschiedener Induktoren beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die mRNA des ORL1-Rezeptors in nahezu allen untersuchten Zellen hämatopoetischen wie auch nicht hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird; eine Ausnahme stellen u.a. TPA-behandelte THP-1- und HL-60-Zellen dar. Einen wesentlichen Schritt in der Charakterisierung von Nociceptin/OFQ und seinem Rezeptor stellt die Identifizierung der Zellpopulationen des peripheren Blutes dar, welche die mRNA des Rezeptors bzw. des Liganden exprimieren. Im peripheren Blut wird der Rezeptor hauptsächlich in Monozyten und Granulozyten exprimiert; eine Expression des Liganden ist überwiegend in B-Lymphozyten zu beobachten. Ligand und Rezeptor unterliegen einer gegenläufigen Expression; bei starker Expression der mRNA des Liganden ist die Expression der mRNA des ORL1-Rezeptors kaum nachweisbar. Es kann aufgrund dessen ausgeschlossen werden, daß eine autokrine Stimulation der Zellen durch Nociceptin/OFQ erfolgt.

5.2.3 Immunologische Funktion von Neuropeptiden

Auch wenn eine Funktion von Nociceptin/OFQ im Immunsystem noch nicht beschrieben ist, so ist doch einiges über die Wirkung anderer Neuropeptide auf das Immunsystem bekannt.

Bereits im vorigen Jahrhundert wurde von Elie Metchnikoff festgestellt, daß Substanzen, für die primär eine Wirkung auf das Nervensystem beschrieben worden war, auch auf das Immunsystem Einfluß nehmen: Opium, ein Opiat-Alkaloid, zeigte suppressierende Wirkung auf die zelluläre Immunität und setzte die Abwehrkraft von Meerschweinchen gegenüber einer Infektion mit Bakterien herab [52]; später wurde festgestellt, daß T-Lymphozyten [328] und Monozyten [191] über Opiat-Rezeptoren verfügen. Die Expression von Opioid-Rezeptoren, d.h. den Rezeptoren einer Klasse von Neuropeptiden, den Opioid-Peptiden, wurde für verschiedene Immunzellen beschrieben.

Für endogene Opioid-Peptide und exogene Opiat-Alkaloide wurde eine Vielzahl möglicher Effekte beschrieben: Förderung der Aktivität von NK-Zellen [160;199], Supprimierung der Antikörperproduktion [137;150;297], Beeinflussung der Proliferation von Lymphozyten, Ausbildung des Tc-Lymphozyten-Subtyps [56], Förderung der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten [197], Regulation von Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen mononukleärer Zellen [99;195;278;292], Beeinflussung der Chemotaxis von Monozyten und Granulozyten [308].

Neben den bereits bekannten Wirkungen von Opioiden, die einen Ansatzpunkt für die Untersuchung möglicher Effekte von Nociceptin/OFQ im Immunsystem bieten, kann auch die Untersuchung einer Beteiligung von Nociceptin/OFQ an der neurogenen Entzündung, die mit der Wirkung von Neuropeptiden in Verbindung gebracht wird, einen Hinweis auf die Rolle von Nociceptin/OFQ in der Peripherie geben. Hierbei führen für den Körper schädliche mechanische, elektrische, thermische oder auch chemische Reize zu einer Aktivierung peripherer Nervenendigungen primärer sensorischer Neurone und zu einer Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide. Diese bewirken eine Reihe von Veränderungen, die unter dem Begriff „neurogene Entzündung“ zusammengefaßt werden; diese Effekte sind u.a. präkapilläre Vasodilatation, postkapilläre Plasmaextravasation und Aktivierung von Mastzellen. Die neurogene Entzündung wird von einer Reihe von Neuropeptiden („calcitonin-gene related peptide“= CGRP, Neurokinin A, Somatostatin und Substanz P) vermittelt [142;205;262]; Rezeptoren für CGRP, Somatostatin und Substanz P wurden auf Monozyten, T- und B-Lymphozyten nachgewiesen [184].

Von den an der neurogenen Entzündung beteiligten Neuropeptiden wurde Substanz P am besten untersucht. Substanz P wurde ursprünglich als ein Mediator der Nociception beschrieben. Wie bei den Opioiden wurde später eine Wirkung des Neuropeptids auf Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen. Der Rezeptor für Substanz P wird auf T- und B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen, Endothelzellen und Eosinophilen exprimiert [140]. In Makrophagen fördert Substanz P die Produktion von Superoxidanionen, steigert Phagozytose und Zytotoxizität, beeinflußt die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α und stimuliert die Chemotaxis von Monozyten und polymorph-

kernigen Leukozyten [92;140]. In Bezug auf die Wirkungsweise von Substanz P in der neurogenen Entzündung war die Untersuchung von Knockout-Mäusen von großer Bedeutung. Mit Hilfe von Knockout-Mäusen, denen das Preprotachykinin A Gen fehlt, welches für Substanz P und Neurokinin A kodiert, wurde nachgewiesen, daß Tachykinine die Plasmaextravasation im Rahmen der neurogenen Entzündung beeinflussen [53]. Knockout-Mäuse, denen der Substanz P-Rezeptor (Neurokinin-1-Rezeptor) fehlt und bei denen die Bildung intrapulmonaler Immunkomplexe induziert wurde, zeigten im Gegensatz zu Wildtypstämmen nahezu keine Entzündungsreaktion; Substanz P ist somit ein wichtiger Faktor in der Entstehung bzw. im Verlauf von Entzündungsreaktionen [40]. In Monozyten wird sowohl der Rezeptor exprimiert als auch das Peptid sezerniert, so daß eine autokrine Stimulation stattfinden kann.

Über die Funktion von Nociceptin/OFQ im Immunsystem kann zur Zeit nur spekuliert werden. Obwohl Nociceptin/OFQ strukturell mit den Opioiden verwandt ist, weist es funktionell eher anti-Opioid-Effekte auf [123;206;212;258]. Aufgrund seiner Nociception vermittelnden Wirkung ähnelt es funktionell eher Neuropeptiden wie Substanz P, deren Wirkung in der neurogenen Entzündung durch Opioide reprimiert werden kann [142]. Eine Beteiligung von Nociceptin/OFQ an der neurogenen Entzündung ist dementsprechend wahrscheinlich. Bei der Untersuchung möglicher Effekte von Nociceptin/OFQ ist die Analyse der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche von Bedeutung, da die Expression der mRNA noch keine Aussage über die Expression des Rezeptorproteins erlaubt. Zu diesem Zweck wurde versucht die peripheren Blutzellsubpopulationen, die den Rezeptor exprimieren, mit Hilfe von Biotin- und Fluorochrom-markiertem Nociceptin/OFQ in der FACS-Analyse zu identifizieren. Dieser Versuch war vermutlich aufgrund mangelnder Sensitivität des Nachweissystems nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Zur näheren Untersuchung der Expression des Rezeptorproteins werden zur Zeit anti-Peptid-Antiseren gegen das ORL 1-Protein hergestellt.

Parallel zur Herstellung der Antiseren werden Vorversuche zur Wirkung von Nociceptin/OFQ auf Monozyten und Granulozyten durchgeführt. Untersuchungen zur chemotaktischen Wirkung von Nociceptin/OFQ bzw. zur inhibitorischen Wirkung von Nociceptin/OFQ auf f-MLP-vermittelte Chemotaxis von Granulozyten und Monozyten zeigten bisher keine erkennbaren Effekte. Es wurde ebenfalls kein Einfluß auf die Produktion der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), deren Expression z.B. von Substanz P beeinflusst wird (s.o.).

Nachdem in einer Reihe von Untersuchungen zur Funktion von Nociceptin/OFQ keine Nociceptin/OFQ-vermittelten Effekte beobachtet werden konnten, wird in Zukunft der Beweis erbracht werden müssen, daß der ORL 1-Rezeptor in Zellen, in denen eine Expression der Rezeptor-mRNA nachgewiesen wurde, exprimiert und funktionell aktiv ist. Darüber hinaus muß der Nachweis erbracht werden, daß nicht nur die mRNA des Liganden in B-Lymphozyten exprimiert wird, sondern auch das Nociceptin/OFQ-Peptid sezerniert wird. Bereits von Nothacker et al. war vermutet worden, daß durch unterschiedliche Prozessierung des Prepro-nociceptins neben Nociceptin/OFQ auch andere Peptide freigesetzt und sezerniert werden könnten [228]. Diese Theorie bewahrheitete sich dieses Jahr mit der Entdeckung von Nocista-

tin. Nocistatin bindet nicht an den ORL 1-Rezeptor und scheint eine dem Nociceptin entgegengesetzte Rolle in der Nociception zu spielen [121;211;231]. Auch diese, durch unterschiedliche Prozessierung generierten Peptide könnten von B-Zellen sezerniert werden und Effekte auf das Immunsystem ausüben.

5.3 Humanes GBP-3: Klonierung, Expression und Charakterisierung eines IFN- γ -induzierbaren Guanylat-bindenden Proteins

5.3.1 Guanylat-bindende Proteine: eine Gruppe IFN-induzierbarer Proteine unbekannter Funktion

Die GBPs wurden ursprünglich als IFN-induzierbare Guanylat-bindenden Proteine (GBP) in Fibroblasten und Makrophagen beschrieben [63;291]. Sie gehören zur Familie der G-Protein-Superfamilie der GTPasen. GTPasen spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion, dem Vesikeltransport und der Translation [35-37].

Innerhalb dieser Familie stellen die GBPs eine Subgruppe dar, die durch mehrere Charakteristika von anderen GTP-bindenden Proteinen unterschieden werden kann. Ihr Molekulargewicht umfaßt ca. 65 kDa. Sie binden spezifisch an Guanin-Nukleotide (GTP, GDP und GMP), die an Agarose immobilisiert wurden [62-64]; GBPs binden Guaninnukleotide nur schwach in Lösung, zeigen einen hohen K_M -Wert für die GTP-Hydrolyse, können multiple Zyklen der Hydrolyse in Abwesenheit von Nukleotid-Austausch-Faktoren ausüben und setzen GDP und GMP als Reaktionsprodukte der Hydrolyse frei [224;275]. Im Gegensatz zu anderen GTP-bindenden Proteinen weisen GBPs nur die ersten zwei der drei für GTP-bindende Proteine typischen Konsensusmotive auf [9;64;83;88;127;154;203;236;274]. GBPs zeigen nahezu keine Bindung an andere Nukleotide [64].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der vollständige cDNA-Klon von „Klon 2107“ aus einer cDNA-Genbank, hergestellt aus mRNAs TPA- und IFN- γ -induzierter Makrophagen-Vorläuferzellen, isoliert. Klon 2107 weist eine große Homologie zu bereits bekannten IFN-induzierten GBP-Proteinen auf und wird als hGBP-3 (humanes Guanylat-bindendes Protein 3) bezeichnet.

5.3.2 Humanes GBP-3 trägt alle wichtigen Sequenzmerkmale von GBP-Proteinen

Die isolierte vollständige hGBP-3-cDNA umfaßt 2419 Basenpaare und kodiert für ein 586 As umfassendes 66,6 kDa großes Protein (Tab. 7). Ein Vergleich von hGBP-3 mit den beiden beschriebenen humanen GBP-Proteinen, hGBP-1 und hGBP-2, ergab 57% homologe und 30% ähnliche Aminosäuren.

Die Homologie ist im N-terminalen Bereich besonders stark ausgeprägt, in dem auch zwei für Guanylat-bindende Proteine typische Konsensussequenzen identifiziert werden konnten. Auch die Sequenz eines potentiellen dritten Konsensusmotivs wurde nachgewiesen. GTP-bindende Proteine weisen im allgemeinen drei Konsensusmotive auf. Das erste lautet GXXXXGKS(T), das zweite DXXG und das dritte N/TKXD. Hierbei interagieren die ersten

beiden Domänen mit den Phosphatgruppen der Nukleotide bzw. auch mit einem Mg^{2+} -Kofaktor. Das dritte Motiv ist für die Nukleotidspezifität verantwortlich. Der Abstand zwischen den Konsensusmotiven beträgt mindestens 40 Aminosäuren [83;88;236]. Das Fehlen der dritten Domäne ist typisch für GBPs; sie fehlt den GBPs aus Mensch [64], Maus [64;127], Ratte [9] und Huhn [274]. Obwohl die Nukleotid-spezifisierende dritte Domäne fehlt, zeigen die beschriebenen GBPs nahezu keine Bindung an andere Nukleotide [64]. Andere Proteine, denen die dritte Konsensussequenz fehlt, weisen abweichende Nukleotid-Bindungseigenschaften auf: Kinesin [230] zeigt eine höhere Affinität für ATP anstelle von GTP [71;173]; die PEP-Carboxykinase bindet vorrangig ITP anstelle von GTP. Es wird vermutet, daß es über die ersten beiden Domänen hinausgehend in GBP-Proteinen eine weitere Domäne gibt, die sich von der von Dever et al. [88] für GTP-bindende Proteine beschriebenen dritten Domäne unterscheidet und für die Nukleotidspezifität verantwortlich ist. Diskutiert wird hierbei die Sequenz „TLRD“ der humanen GBPs, die auch im hGBP-3-Protein vorhanden ist. Die Sequenz ähnelt dem TVRD-Motiv des Hühner-GBP; der Austausch der N/TKXD-Konsensussequenz gegen das TVRD-Motiv soll für die veränderte Guanylat-Bindung der GBP-Proteine verantwortlich sein [127;274]; für die ähnliche Sequenz TQXD wurde bereits eine Beteiligung an der GTP-Bindung für ein nicht zu den GBP-Proteinen gehörendes GTP-bindendes Protein beschrieben [280]. Beim mGBP3 ist an entsprechender Stelle, anstelle des TVRD Motivs, die Sequenz AVR D zu finden [127].

<i>Protein</i>	„Accession“- Nummer	<i>cDNA</i> [kb]	<i>Protein</i> [As]	<i>Konsensusmotive für die Guanylat-Bindung [Pos.]</i>			<i>Iso- prenylierungs- signal CAAX</i>
				I	II	(III)	
hGBP-1	M55542	2881	592	As 45-52	As 97-100	As 181-184	Ja
hGBP-2	M55543	2107	591	As 45-52	As 97-100	As 179-182	Ja
hGBP-3		2419	586	As 45-52	As 97-100	As 179-182	Ja
mGBP-1/mag1	M55544	2807	589	As 45-52	As 97-100	As 179-182	Ja
mGBPma/mag2	M81128	3295	623	As 43-50	As 95- 98	As 177-180	Nein
mGBP-3	U44731	2486	620	As 39-46	As 91- 94	As 173-176	Nein
p67	M80367	2396	591	As 47-54	As 99-102	As 181-184	Ja
Chicken GBP	X92112	1877	573	As 46-53	As 98-107	As 175-178	Ja

Tab. 7: Vergleich charakteristischer Daten der beschriebenen GBP-Proteine

Aufgeführt ist die Größe der Nuklein- und Aminosäuresequenz und die Lage der für GBP-Proteine postulierten typischen Konsensusmotive; I und II sind die beiden für GTP-bindende Proteine typischen Konsensussequenzen, die sich in der Sequenz aller GBP-Proteine finden lassen; III ist das für GBP-Proteine postulierte alternative dritte Konsensusmotiv (TLRD-Motiv), welches die Guanylat-Bindung spezifizieren soll. Darüber hinaus ist aufgeführt, ob die Proteine über ein Isoprenylierungssignal verfügen.

Es konnte mit hGBP-3 eine cDNA identifiziert werden, die eine große Homologie zu bereits beschriebenen Guanylat-bindenden Proteinen aufweist und über alle für GBP-Proteine charakteristischen Konsensusmotive verfügt. Es sind sowohl die beiden ersten, für die Bindung der Phosphatgruppen notwendigen, Motive vorhanden als auch das TLRD-Motiv als Alternative zum dritten Konsensusmotiv GTP-bindender Proteine. Darüber hinaus weist hGBP-3 an Position 132 bis 135 die Sequenz NKID auf. Diese Sequenz entspricht dem, normalerweise nicht in Guanylat-bindenden Proteinen vorhandenen, dritten Motiv, das für GTP-bindende Proteine von Dever et al. beschrieben wurde; es ist allerdings nur 32 Aminosäuren, anstelle der von Dever et al. beschriebenen mindestens 40 Aminosäuren [88], vom zweiten Konsensusmotiv entfernt. Ob dieses Motiv eine Nukleotid-spezififizierende Funktion hat, bleibt noch zu untersuchen.

5.3.3 Humanes GBP-3: ein membrangebundenes Protein?

Über die für die Guanylat-Bindung charakteristischen Konsensusmotive hinausgehend weist hGBP-3 ein CAAX-Motiv am C-Terminus auf, über das nur ein Teil der GBP-Proteine verfügt (Tab. 7). Das Motiv ist Erkennungssequenz für die Prenyltransferase und somit für die Isoprenylierung von Proteinen verantwortlich [57;69].

Die Isoprenylierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der eine C15- oder C20-Kohlenwasserstoffkette über eine Thiofunktion an das Protein angelagert wird [57]. Am besten untersucht wurde die Wirkung der Isoprenylierung bei p21ras [87;158;159]; dort spielt sie eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Proteins in der Membran [87;158;159]. Eine Beteiligung dieser Proteinmodifikation an einer Protein-Protein-Interaktion wird für nicht in der Membran verankerte Proteine mit Isoprenylierungssignal diskutiert [60;198;245]. Mit Ausnahme der Mitglieder der Ras-Superfamilie, gibt es nur noch wenige isoprenylierte GTP-bindende Proteine [225], zu denen auch die GBP-Proteine gehören. Humanes GBP-1 und das p67-Protein aus der Ratte weisen nicht nur das Konsensusmotiv auf, sondern konnten erfolgreich *in vitro* isoprenyliert werden [9;222;275;310]. Bei den humanen GBP-Proteinen, hGBP-1 und hGBP-2, scheint die Isoprenylierung nicht zu einer Lokalisierung der Proteine an der Membran zu führen, da diese GBPs in der Immunfluoreszenz homogen in der Zelle verteilt sind [62] und in der Zellfraktionierung vorrangig (85%) im zytoplasmatischen 100000xg-Überstand zu finden sind [222].

Zur subzellulären Lokalisierung von hGBP-3 wurde ein polyklonales Antiserum gegen eine Peptidsequenz von hGBP-3 hergestellt, welche nur eine sehr geringe Homologie zu den anderen humanen GBP-Proteinen zeigt. Während in der Immunfluoreszenz bisher keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden konnte, ob hGBP-3 membrangebunden ist, deuten die Ergebnisse der Fraktionierung von Zellen in Membranfraktion und 100000xg-Überstand darauf hin, daß auch hGBP-3 vorrangig zytoplasmatisch lokalisiert ist (nicht gezeigte Daten). Es scheint sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse abzuzeichnen, daß hGBP-3 wie auch hGBP-1 und hGBP-2 [62] frei im Zytoplasma verteilt ist und die Isoprenylierung auch hier nicht zu einer Verankerung des Proteins an der Membran führt.

5.3.4 Humanes GBP-3: ein Protein, dessen Expression nicht nur durch IFN- γ reguliert wird

In Makrophagen-Vorläuferzelllinien (THP-1, U937 und HL-60) wird die mRNA von hGBP-3 nach IFN- γ -Induktion exprimiert. Gleiche Ergebnisse ließen sich bei der Untersuchung der Proteinexpression von hGBP-3 mit Hilfe von Western Blot-Analysen verzeichnen; die Proteinexpression wurde dabei mit Hilfe des im vorangegangenen Kapitel erwähnten Antikörpers gegen eine Peptidsequenz von hGBP-3 untersucht. Während in IFN- γ -induzierten Adenokarzinomzellen (HeLaS3), Keratinozyten (HaCaT), T-Zell- (Jurkat) und B-Zell- (Raji)-Lymphomzellen eine Induktion der hGBP-3-mRNA-Expression zu beobachten war, wurde eine IFN- γ -induzierte Steigerung der Proteinexpression nur in HaCaT-Zellen, aber nicht in HeLaS3-, Jurkat- und Raji-Zellen, beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Humanes GBP-3 wird nicht nur in Zelllinien, sondern auch in Zellen des peripheren Blutes exprimiert. Die Expression von hGBP-3 wird in Monozyten und T-Lymphozyten des peripheren Blutes durch IFN- γ bzw. durch PHA induziert. LPS zeigt weder in B-Lymphozyten noch in Monozyten einen Einfluß auf die Expression. Es wurde keine signifikante Expression von mRNA und Protein in IFN- α -induzierten Zellen beobachtet.

Der hGBP-3 Klon weist nicht nur eine Homologie zu den Sequenzen bereits bekannter humaner GBPs auf. Auch die mRNA- und Protein-Expression weist Ähnlichkeiten auf. Vorrangig ist dabei die Induktion der hGBP-Expression durch IFN- γ zu nennen. Die GBPs wurden ursprünglich als IFN-induzierbare Proteine beschrieben. Die mRNA von hGBP-1 gehört zu den am stärksten durch IFN induzierten mRNAs [63] und weist in der Promotorregion eine GAS-Konsensussequenz auf [42;146;185]. Die Regulation der Expression von hGBP-3 in Makrophagen-Vorläuferzellen deutet darauf hin, daß die Expression von hGBP-3 vom Differenzierungsgrad der Monozyten abhängig ist: Von den verwendeten Zelllinien ist THP-1 die in der Monozyten-Makrophagen-Entwicklung am weitesten entwickelte Zelllinie, während die U937- und HL-60-Zellen frühere Stadien der Entwicklung darstellen. Während die mRNA in den weniger differenzierten Zellen erst nach Einleitung der Differenzierung durch TPA exprimiert wird, ist sie in den differenzierteren THP-1-Zellen bereits nach IFN- γ -Induktion nachzuweisen. Die Ergebnisse decken sich mit Daten aus der Untersuchung der Proteinexpression.

Bereits von Nantais et al. wurde eine Induktion der Proteinexpression von hGBPs in THP-1- und HL-60-Zellen nach IFN- γ - und LPS-Induktion beobachtet, die durch Vorbehandlung der Zellen mit Agentien, welche die Differenzierung auslösen, verstärkt wurde [222]; dabei ist zu beachten, daß die Versuche mit Antiseren durchgeführt wurden, die aus Immunisierungen mit vollständigem hGBP-Protein hervorgingen und dementsprechend vermutlich mit allen humanen GBP-Proteinen reagieren [62;222]. Es kann aufgrund der vorliegenden Daten vermutet werden, daß die GBP-Expression bei allen humanen GBP-Proteinen vom Differenzierungsgrad der induzierten Monozyten abhängig ist. Wie bei hGBP-1 [84], wird auch die Induktion der hGBP-3-mRNA nicht durch CHX beeinflusst. Somit gehört hGBP-3 zu den Genen der Primärantwort auf einen IFN- γ -Stimulus.

Ein entscheidender Unterschied zwischen der Expression von hGBP-3 und der Expression anderer humaner GBPs besteht darin, daß die hGBP-3-Expression nicht durch IFN- α induziert wird. IFN- γ ist zwar der potenteste Induktor der hGBP-1-Expression, die Expression wird aber auch durch IFN- α und - β induziert [62;63;84;291]. Die Beobachtung, daß die hGBP-3-Expression nicht durch IFN- α induziert wird, legt die Vermutung nahe, daß die einzelnen GBPs in der Zelle unterschiedliche Funktionen ausüben.

Ein interessantes Ergebnis war, daß in Zelllinien nicht monozytären Ursprungs, mit Ausnahme von Keratinozyten, die mRNA von hGBP-3 nach IFN- γ -Induktion verstärkt exprimiert wird, aber keine Expression des hGBP-3-Proteins nachgewiesen werden konnte. Ein Phänomen, das bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde: während von Decker et al. eine verstärkte mRNA-Expression von humanen GBP-1 nach IFN-Induktion von HeLa-Zellen beschrieben wurde [84], konnte von Cheng et al. keine Induktion der Expression von hGBP-Proteinen nachgewiesen werden [62]. Es besteht die Möglichkeit, daß die GBP-mRNA in diesen Zellen instabil ist, nicht translatiert oder das Protein sehr schnell intrazellulär abgebaut wird [271].

Das humane GBP-3 weist eine interessante, bisher für andere humane GBPs nicht in diesem Umfang charakterisierte, Expression in Geweben und peripheren Blutzellen auf. Von Staeheli et al. wurde die Expression von GBP-mRNA in der Milz von poly (I) poly (C)-behandelten Mäusen nachgewiesen [291]; die mRNA von hGBP-1 wurde in Lymphozyten IFN-behandelter Mäuse, in *in vitro* IFN-stimulierten Lymphozyten sowie in den Lymphozyten IFN-behandelter Patienten nachgewiesen [62]; eine weitere Differenzierung der exprimierenden Blutzellpopulationen fand jedoch noch nicht statt. Für hGBP-3 wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß die mRNA in humanem Milzgewebe exprimiert wird. Ein wichtiger Befund war auch hier die Identifikation der peripheren Blutzellen, die hGBP-3 exprimieren. Das hGBP-3-Protein wurde in aktivierten T-Lymphozyten und Monozyten aber nicht in aktivierten B-Lymphozyten nachgewiesen. Neu war die Beobachtung, daß die Expression eines GBPs nicht nur durch IFN- γ sondern auch durch PHA induziert werden kann.

5.3.5 Humanes GBP-3: ein Guanylat-bindendes Protein

Neben gemeinsamen Sequenzmerkmalen weisen die GBPs ein charakteristisches Nukleotid-Bindungsverhalten auf.

Zur Untersuchung des Nukleotidbindungsverhaltens von hGBP-3 wurde ein eukaryontisches Expressionskonstrukt von hGBP-3 und eine Mutante hergestellt. Die Mutante weist in der letzten Position des ersten für Guanylat-bindende Proteine typischen Konsensusmotivs eine Mutation von Serin zu Asparagin auf; dieses Serin ist an der Bindung der Phosphatgruppen der Nukleotide bzw. an der Bindung des Mg²⁺-Kofaktors beteiligt [88;236]. Eine Mutation zu Asparagin führt zu einer stark reduzierten Affinität für GTP [103]. Zur Überprüfung der Guanylat-Bindung wurden HeLa S3-Zellen transfiziert, zytoplasmatische Zellextrakte gewonnen und rekombinantes hGBP-3-Protein mit GTP-gebundener Agarose präzipitiert. Dabei

wurde eine Bindung von hGBP-3 an GTP-Agarose nachgewiesen; die Mutante band GTP wesentlich schwächer.

Die GBPs weisen charakteristischerweise eine Bindung von GTP, GDP und GMP auf, wobei die Hauptreaktionsprodukte der GTP-Hydrolyse unterschiedlich sind. Das hGBP-1-Protein hydrolysiert GTP zu GMP (85%). Bei niedrigen Temperaturen wird auch GDP (56%) gebildet. Dieses kann aber weder als Substrat noch als Inhibitor fungieren. Andere Nukleotide werden nicht in größerem Maße gebunden bzw. hydrolysiert. Die Entfernung der Phosphatreste erfolgt vermutlich sequentiell und nicht unter Freisetzung von Pyrophosphat. Das hGBP-1-Protein zeigt keine Guanylat-Zyklase- und Geranyltransferase-Aktivität. Es finden multiple Hydrolysezyklen in Abwesenheit von Austausch-Faktoren statt. Mit seiner starken intrinsischen GTPase-Aktivität und seinem hohen K_m -Wert ähnelt hGBP-1 anderen hochmolekularen GTPasen. Humanes GBP-2-Protein setzt GTP vorrangig zu GDP und weniger zu GMP um. Die humanen GBP-Proteine, hGBP-1 und hGBP-2, haben dementsprechend die gleiche Substrat-, aber unterschiedliche Produktspezifitäten. Beide hydrolysieren kein GDP; bei hGBP-2 ist GDP ein Inhibitor der GTP-Hydrolyse, während dies bei hGBP-1 nicht der Fall ist [224;275].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die spezifische Bindung von hGBP-3 an GTP-gekoppelte Agarose nachgewiesen, womit ein weiteres Kriterium der GBPs erfüllt ist. Die Untersuchung der Bindung an GDP und GMP sowie an andere Nukleotide steht noch aus.

5.3.6 Ausblick

Mit hGBP-3 konnte ein Klon isoliert werden, der in Bezug auf alle bisher untersuchten Eigenschaften für GBP-Proteine charakteristische Merkmale aufweist. Das Protein ist ca. 66 kDa groß und weist für Guanylat-bindende Proteine charakteristische Sequenzmotive auf. Die Expression wird durch IFN- γ induziert. Humanes GBP-3 weist ein für einige GBPs charakteristisches Isoprenylierungssignal auf und bindet GTP.

Darüber hinausgehend sind noch Fragen offen, wie zum Beispiel die Nukleotidspezifität von hGBP-3. Es bleibt zu untersuchen, ob neben GTP auch andere Nukleotide von hGBP-3 gebunden werden. Des Weiteren stehen noch Untersuchungen zur GTP-Spaltung aus.

Wichtig ist die eindeutige Beantwortung der Frage, ob hGBP-3 membranassoziiert ist. Nantais et al. hatten bei ihren Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von GBPs beobachtet, daß ca. 85% zytoplasmatisch verteilt sind [222]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Antiserum gegen eine Peptidsequenz von hGBP-3 hergestellt und eine eukaryontisches Expressionsplasmid, das für HA-markiertes rekombinantes hGBP-3 kodiert, generiert; da die Methoden zur subzellulären Lokalisierung von Proteinen im Labor etabliert sind, ist mit einer über die erwähnten Vorversuche hinausgehenden zuverlässigen Beantwortung der Frage in Kürze zu rechnen.

Neben dem Bindungsverhalten und der Lokalisierung kann die postulierte, die Guanylat-Spezifität bestimmende Sequenz charakterisiert werden. Mit Hilfe von mutagenisierten hGBP-3-Konstrukten kann überprüft werden, ob die Sequenz TLRD, die bei allen drei huma-

nen GBPs identisch ist, eine Rolle bei der GTP-Bindung spielt [127;274;280]. In diesem Zusammenhang kann auch untersucht werden, welche Bedeutung die im hGBP-3-Protein zu findende NKID-Sequenz, die dem dritten Konsensusmotiv Guanylat-bindender Proteine entspricht, für die Guanylat-Bindung hat.

Man kann viel in Bezug auf die GBP-Proteine untersuchen; einiges scheint für eine umfassende Charakterisierung notwendig zu sein, anderes scheint eher auf eine Liebe zum Detail zurückzugehen. Egal vor welchem Hintergrund diese Analysen durchgeführt werden, hofft man, daß sie irgendwann einmal dazu führen eine seit Entdeckung der GBP-Proteine vor mehr als 15 Jahren offene Frage zu klären:

5.3.7 Welche Funktion haben GBP-Proteine?

Es gibt bis heute acht klonierte GBPs: drei humane GBPs (hGBP-1, hGBP-2 und hGBP-3), drei murine GBPs (mGBP-1/mag-1, mGBP-2/mag2, mGBP3), ein GBP aus der Ratte (p67) sowie ein aus dem Huhn isoliertes GBP. Die GBPs sind in weiten Bereichen der Sequenz und in wesentlichen Charakteristika, wie den Konsensusmotiven für die GTP-Bindung, dem Nukleotid-Bindungsverhalten und dem Nukleotid-Hydrolyseverhalten ähnlich. Sie sind in unterschiedlichen Spezies weit verbreitet und ihre Expression ist durch IFN- γ induzierbar. Und auch in einem letzten Punkt gleichen sie einander: ihre Funktion ist nicht bekannt. Ein Problem, daß nicht nur in Bezug auf GBPs existiert. Auch von anderen IFN-induzierten GTP-bindenden Proteinen, wie dem IGTP [298;299], IRG-47 [118], TGTP [55]/ Mg21 [178] und LRG-47 [289] ist die Funktion bislang unbekannt. Eine weitere GTP-bindende, IFN-induzierbare Proteinfamilie, die Mx-Proteine, vermitteln teilweise antivirale Effekte; hier ist die GTP-Bindung notwendig für die antivirale Wirkung [220;221;249].

5.4 *Schlußwort*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei sehr unterschiedliche Gene untersucht, deren Expression durch IFN- γ reguliert wird.

Mit IFP35 wurde die Assoziation eines IFN-induzierten Proteins mit großen zytoplasmatischen Multiproteinkomplexen beschrieben. Die Untersuchung von Klon 2107 führte zur Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Guanylat-bindenden Proteins, hGBP-3, dessen Expression durch IFN- γ und PHA induziert werden kann. Mit der Isolierung von Nociceptin/OFQ aus IFN- γ induzierten Makrophagen-Vorläuferzellen und der Identifizierung der peripheren Blutzellen, die den Liganden bzw. den Rezeptor exprimieren, konnte ein potentiell immunologisch wirksames Neuropeptid näher charakterisiert werden.

In Anlehnung an ein Puzzle, dessen Einzelteile mit der Bildseite nach unten auf dem Tisch liegen und bei dem die Teile zunächst umgedreht, betrachtet und dann zu einem großen Ganzen zusammengefügt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit isolierte Bereiche der Immunantwort untersucht, die irgendwann in das große Ganze eingefügt werden können. Die Teile sind klein, aber ohne sie wird das Puzzle immer unvollständig und vielleicht auch unverständlich bleiben.

6 Anhang

6.1 Vergleich unterschiedlicher IFP35-Nukleinsäuresequenzen

Verglichen werden die veröffentlichte IFP35-cDNA-Sequenz von Wang et al. (IFP35 Wang et al.; [319]), der partielle publizierte genomische Klon (IFP35 genom.Klon; „Accession“-Nummer L78833; [43;286]), die der Proteinsequenz von Bange et al. [16] zugrunde liegende Nukleinsäuresequenz (IFP35 alt) und die Sequenz des aus der HeLa-Genbank isolierten cDNA-Klons von IFP35 (pGEM 135 komplett). Die korrigierte Sequenz ist in der ersten Zeile aufgeführt (IFP35 korrigiert).

```

IFP35 KORRIGIERT - AGACCACAGCCCTTTGGGGGGTACAAACAAGAGTTCAGTTGCTGTGAATT - 50
IFP35 ALT - AGACCACAGCCCTTTGGGGGGTACAAACAAGAGTTCAGTTGCTGTGAATT - 50
pGem 135 komplett- AGACCACAGCCCTTTGGGGGGTACAAACAAGAGTTCAGTTGCTGTGAATT - 50
IFP35 WANG ET AL.-
IFP35 GENOM.KLON - A----- - 1

IFP35 KORRIGIERT - CTGCCACTGTGCCAGCTCTGAAGCCTCAGCTCTTGCCAAACAGACCCGA - 100
IFP35 ALT - CTGCCACTGTGCCAGCTCTGAAGCCTCAGCTCTTGCCAAACAGACCCGA - 100
PGEM 135 KOMPLETT- CTGCCACTGTGCCAGCTCTGAAGCCTCAGCTCTTGCCAAACAGACCCGA - 100
IFP35 WANG ET AL.-
IFP35 GENOM.KLON - ----- - 1

IFP35 KORRIGIERT - GACCCATGTCAGCCCCACTGGATGCCGCCCTCCACGCCCTTCAGGAGGAG - 150
IFP35 ALT - GACCCATGTCAGCCCCACTGGATGCCGCCCTCCACGCCCTTCAGGAGGAG - 150
PGEM 135 KOMPLETT- GACCCATGTCAGCCCCACTGGATGCCGCCCTCCACGCCCTTCAGGAGGAG - 150
IFP35 WANG ET AL.- CCGCCCTCCACGCCCTTCAGGAGGAG - 26
IFP35 GENOM.KLON - -----CTTCC----- - 6
                ... ..*****.....

IFP35 KORRIGIERT - CAGCCAGACTCAAGATGAGGCTGTGGGACCTGCAGCAGCTGAGAAAGGA - 200
IFP35 ALT - CAGCCAGACTCAAGATGAGGCTGTGGGACCTGCAGCAGCTGAGAAAGGA - 200
PGEM 135 KOMPLETT- CAGCCAGACTCAAGATGAGGCTGTGGGACCTGCAGCAGCTGAGAAAGGA - 200
IFP35 WANG ET AL.- CAGCCAGACTCAAGATGAGGCTGTGGGACCTGCAGCAGCTGAGAAAGGA - 76
IFP35 GENOM.KLON - ----- - 6
                .....

IFP35 KORRIGIERT - GCTCGGGGACTCCCCAAAGACAAGGTCCCATTTTCAGTGCCCAAGATCC - 250
IFP35 ALT - GCTCGGGGACTCCCCAAAGACAAGGTCCCATTTTCAGTGCCCAAGATCC - 250
PGEM 135 KOMPLETT- GCTCGGGGACTCCCCAAAGACAAGGTCCCATTTTCAGTGCCCAAGATCC - 250
IFP35 WANG ET AL.- GCTCGGGGACTCCCCAAAGACAAGGTCCCATTTTCAGTGCCCAAGATCC - 126
IFP35 GENOM.KLON - -----AGGTCCCATTTTCAGTGCCCAAGATCC - 33
                .....*****.....

IFP35 KORRIGIERT - CCCTGGTATTCCGAGGACACACCCAGCAGGACCCGGAAGTGCCTAAGTCT - 300
IFP35 ALT - CCCTGGTATTCCGAGGACACACCCAGCAGGACCCGGAAGTGCCTAAGTCT - 300
PGEM 135 KOMPLETT- CCCTGGTATTCCGAGGACACACCCAGCAGGACCCGGAAGTGCCTAAGTCT - 300
IFP35 WANG ET AL.- CCCTGGTATTCCGAGGACACACCCAGCAGGACCCGGAAGTGCCTAAGTCT - 176
IFP35 GENOM.KLON - CCCTGGTATTCCGAGGACACACCCAGCAGGACCCGGAAGTGCCTAAGTCT - 83
                *****

IFP35 KORRIGIERT - TTAGTTTCCAATTTGCGGATCCACTGCCCTCTGCTTGCGGGCTCTGCTCT - 350
IFP35 ALT - TTAGTTTCCAATTTGCGGATCCACTGCCCTCTGCTTGCGGGCTCTGCTCT - 350
PGEM 135 KOMPLETT- TTAGTTTCCAATTTGCGGATCCACTGCCCTCTGCTTGCGGGCTCTGCTCT - 350
IFP35 WANG ET AL.- TTAGTTTCCAATTTGCGGATCCACTGCCCTCTGCTTGCGGGCTATGCTCT - 226
IFP35 GENOM.KLON - TTAGTTTCCAATTTGCGGATCCACTGCCCTCTGCTTGCGGGCTCTGCTCT - 133
                *****;*****

```

IFP35 KORRIGIERT	- GATCACCTTTGATGACCCCAAAG-----	- 373
IFP35 ALT	- GATCACCTTTGATGACCCCAAAG-----	- 373
PGEM 135 KOMPLETT-	GATCACCTTTGATGACCCCAAAG-----	- 378
IFP35 WANG ET AL.-	GATCACCTTTGATGACCCCAAAG-----	- 249
IFP35 GENOM.KLON	- GATCACCTTTGATGACCCCAAAGGTAAGCTCATGGGGAGCCTCAGGAGGG - 183	

IFP35 KORRIGIERT	-----TGGCT	- 378
IFP35 ALT	-----TGGCT	- 378
PGEM 135 KOMPLETT-	-----TGGCT	- 378
IFP35 WANG ET AL.-	-----TGGCT	- 254
IFP35 GENOM.KLON	- AGGTGGGGAGGGTTCCAGTACTGACCCTGTTTCCACCACCCAGTGGCT - 233	

IFP35 KORRIGIERT	- GAGCAGGTGCTGCAACAAAAGGAGCACACGATCAACATGGAGGAGTGCCG - 428	
IFP35 ALT	- GAGCAGGTGCTGCAACAAAAGGAGCACACGATCAACATGGAGGAGTGCCG - 428	
PGEM 135 KOMPLETT-	GAGCAGGTGCTGCAACAAAAGGAGCACACGATCAACATGGAGGAGTGCCG - 428	
IFP35 WANG ET AL.-	GAGCAGGTGCTGCAACAAAAGGAGCACACGATCAACATGGAGGAGTGCCG - 304	
IFP35 GENOM.KLON	- GAGCAGGTGCTGCAACAAAAGGAGCACACGATCAACATGGAGGAGTGCCG - 283	

IFP35 KORRIGIERT	- GCTGCGGGTGCAGGTCCAGCCCTTGGAGCTGCCCATGGTACCACCATCC - 478	
IFP35 ALT	- GCTGCGGGTGCAGGTCCAGCCCTTGGAGCTGCCCATGGTACCACCATCC - 478	
PGEM 135 KOMPLETT-	GCTGCGGGTGCAGGTCCAGCCCTTGGAGCTGCCCATGGTACCACCATCC - 478	
IFP35 WANG ET AL.-	GCTGCGGGTGCAGGTCCAGCCCTTGGAGCTGCCCATGGTACCACCATCC - 354	
IFP35 GENOM.KLON	- GCTGCGGGTGCAGGTCCAGCCCTTGGAGCTGCCCATGGTACCACCATCC - 333	

IFP35 KORRIGIERT	- AGGTGATG-----	- 486
IFP35 ALT	- AGGTG-----	- 483
PGEM 135 KOMPLETT-	AGGTG-----	- 483
IFP35 WANG ET AL.-	AGGTGATG-----	- 362
IFP35 GENOM.KLON	- AGGTGATGGTATGACAGAATCCTGGGGCATGCAAAGCATGCCATGCACCT - 383	
	****###	
IFP35 KORRIGIERT	-----	- 486
IFP35 ALT	-----	- 483
PGEM 135 KOMPLETT-	-----	- 483
IFP35 WANG ET AL.-	-----	- 362
IFP35 GENOM.KLON	- GGGCATGGGGAAGTGGAGCTGTGTCTGGGACCACCCCTTGCTGTCTCCCC - 433	
IFP35 KORRIGIERT	----GTGTCCAGCCAGTTGAGTGGCCGGAGGGTGTGGTCACTGGATTTTC - 532	
IFP35 ALT	----TCCAGCCAGTTGAGTGGCCGGAGGGTGTGGTCACTGGATTTTC - 526	
PGEM 135 KOMPLETT-	----TCCAGCCAGTTGAGTGGCCGGAGGGTGTGGTCACTGGATTTTC - 526	
IFP35 WANG ET AL.-	----GTGTCCAGCCAGTTGAGTGGCCGGAGGGTGTGGTCACTGGATTTTC - 408	
IFP35 GENOM.KLON	- CTAGGTGTCCAGCCAGTTGAGTGGCCGGAGGGTGTGGTCACTGGATTTTC - 483	
	###*****	
IFP35 KORRIGIERT	- CTGCCAGCCTCAGGCTGAGTGAGGAGGAGCTGCTGGACAAGCTAGAGATC - 582	
IFP35 ALT	- CTGCCAGCCTCAGGCTGAGTGAGGAGGAGCTGCTGGACAAGCTAGAGATC - 576	
PGEM 135 KOMPLETT-	CTGCCAGCCTCAGGCTGAGTGAGGAGGAGCTGCTGGACAAGCTAGAGATC - 576	
IFP35 WANG ET AL.-	CTGCCAGCCTCAGGCTGAGTGAGGAGGAGCTGCTGGACAAGCTAGAGATC - 458	
IFP35 GENOM.KLON	- CTGCCAGCCTCAGGCTGAGTGAGGAGGAGCTGCTGGACAAGCTAGAGATC - 533	

IFP35 KORRIGIERT	- TTCTTTGGCAAGACTAGGAACGGAGGTGGCGATGTGGACGTTCCGGGAGCT - 632	
IFP35 ALT	- TTCTTTGGCAAGACTAGGAACGGAGGTGGCGATGTGGACGTTCCGGGAGCT - 626	
PGEM 135 KOMPLETT-	TTCTTTGGCAAGACTAGGAACGGAGGTGGCGATGTGGACGTTCCGGGAGCT - 626	
IFP35 WANG ET AL.-	TTCTTTGGCAAGACTAGGAACGGAGGTGGCGATGTGGACGTTCCGGGAGCT - 508	
IFP35 GENOM.KLON	- TTCTTTGGCAAGACTAGGAACGGAGGTGGCGATGTGGACGTTCCGGGAGCT - 583	

IFP35 KORRIGIERT	- ACTGCCAGGGAGTGTTCATGCTGGGGTTTGCTAGGGATGGAG-----	- 673
IFP35 ALT	- ACTGCCAGGGAGTGTTCATGCTGGGGTTTGCTAGGGATGGAG-----	- 667
PGEM 135 KOMPLETT-	ACTGCCAGGGAGTGTTCATGCTGGGGTTTGCTAGGGATGGAG-----	- 667
IFP35 WANG ET AL.-	ACTGCCAGGGAGTGTTCATGCTGGGGTTTGCTAGGGATGGAG-----	- 549
IFP35 GENOM.KLON -	ACTGCCAGGGAGTGTTCATGCTGGGGTTTGCTAGGGATGGAGGTGAGGGCT	- 633

IFP35 KORRIGIERT	- -----	- 673
IFP35 ALT	- -----	- 667
PGEM 135 KOMPLETT-	-----	- 667
IFP35 WANG ET AL.-	-----	- 549
IFP35 GENOM.KLON -	ATGCAGGCCTCCTGCAGGGGAGAGGGTATAGGGTGTGCAAGATTATGGTG	- 683
IFP35 KORRIGIERT	- -----	- 673
IFP35 ALT	- -----	- 667
PGEM 135 KOMPLETT-	-----	- 667
IFP35 WANG ET AL.-	-----	- 549
IFP35 GENOM.KLON -	CAGGGAGAGGAGAGGGCTTGATGCTAAAGGCCACCCCTCCTTGCTCCCC	- 733
IFP35 KORRIGIERT	- ----TGGCTCAGCGTCTGTGCCAAATCGGCCAGTTCACAGTGCCACTGGG	- 719
IFP35 ALT	- ----TGGCTCAGCGTCTGTGCCAAATCGGCCAGTTCACAGTGCCACTGGG	- 713
PGEM 135 KOMPLETT-	----TGGCTCAGCGTCTGTGCCAAATCGGCCAGTTCACAGTGCCACTGGG	- 713
IFP35 WANG ET AL.-	----TGGCTCAGCGTCTGTGCCAAATCGGCCAGTTCACAGTGCCACTGGG	- 595
IFP35 GENOM.KLON -	ACAGTGGCTCAGCGTCTGTGCCAAATCGGCCAGTTCACAGTGCCACTGGG	- 783

IFP35 KORRIGIERT	- TGGGCAGCAAGTCCCTCTGAGAGTCTCTCCGTATGTGAATGGGGAGATCC	- 769
IFP35 ALT	- TGGGCAGCAAGTCCCTCTGAGAGTCTCTCCGTATGTGAATGGGGAGATCC	- 763
PGEM 135 KOMPLETT-	TGGGCAGCAAGTCCCTCTGAGAGTCTCTCCGTATGTGAATGGGGAGATCC	- 763
IFP35 WANG ET AL.-	TGGGCAGCAAGTCCCTCTGAGAGTCTCTCCGTATGTGAATGGGGAGATCC	- 645
IFP35 GENOM.KLON -	TGGGCAGCAAGTCCCTCTGAGAGTCTCTCCGTATGTGAATGGGGAGATCC	- 833

IFP35 KORRIGIERT	- AGAAGGCTGAG-----	- 780
IFP35 ALT	- AGAAGGCTGAG-----	- 774
PGEM 135 KOMPLETT-	AGAAGGCTGAG-----	- 774
IFP35 WANG ET AL.-	AGAAGGCTGAG-----	- 656
IFP35 GENOM.KLON -	AGAAGGCTGAGGTAAGCAGGAGGGGTGAAGAACAGGGGCTGGGCTGGGTA	- 883

IFP35 KORRIGIERT	- -----	- 780
IFP35 ALT	- -----	- 774
PGEM 135 KOMPLETT-	-----	- 774
IFP35 WANG ET AL.-	-----	- 656
IFP35 GENOM.KLON -	ACCTGTCTGCCTGCCAGGAAC TTGCCCAATGAAGGATCAGAGGCCCCAAA	- 933
IFP35 KORRIGIERT	- -----	- 780
IFP35 ALT	- -----	- 774
PGEM 135 KOMPLETT-	-----	- 774
IFP35 WANG ET AL.-	-----	- 656
IFP35 GENOM.KLON -	CCCCACTGACCTACCTACCCACCATCAGCCTCTCCAGGCCTCCCGACCTC	- 983
IFP35 KORRIGIERT	- -----	- 780
IFP35 ALT	- -----	- 774
PGEM 135 KOMPLETT-	-----	- 774
IFP35 WANG ET AL.-	-----	- 656
IFP35 GENOM.KLON -	ATACCCCATGGGGCACTGCCTGCCCTACCCCAAGCCCCAGCCCTTCTC	- 1033
IFP35 KORRIGIERT	- -----ATCAGGTCGCAGCC	- 794
IFP35 ALT	- -----ATCAGGTCGCAGCC	- 788
PGEM 135 KOMPLETT-	-----ATCAGGTCGCAGCC	- 788
IFP35 WANG ET AL.-	-----ATCAGGTCGCAGCC	- 670
IFP35 GENOM.KLON -	CCATGAGCCTTTGCCATCTCCTGGCTCCTTTTCCAGATCAGGTCGCAGCC	- 1083

IFP35 KORRIGIERT	- AGTTCCCCGCTCGGTACTGGTGCTCAACATTCCTGATATCTTGGATGGCC	- 844
IFP35 ALT	- AGTTCCCCGCTCGGTACTGGTGCTCAACATTCCTGATATCTTGGATGGCC	- 838
PGEM 135 KOMPLETT-	AGTTCCCCGCTCGGTACTGGTGCTCAACATTCCTGATATCTTGGATGGCC	- 838
IFP35 WANG ET AL.-	AGTTCCCCGCTCGGTACTGGTGCTCAACATTCCTGATATCTTGGATGGCC	- 720
IFP35 GENOM.KLON	- AGTTCCCCGCTCGGTACTGGTGCTCAACATTCCTGATATCTTGGATGGCC	-1133

IFP35 KORRIGIERT	- CGGAGCTGCATGACGTCCTGGAGATCCACTTCCAGAAGCCCACCCGCGGG	- 894
IFP35 ALT	- CGGAGCTGCATGACGTCCTGGAGATCCACTTCCAGAAGCCCACCCGCGGG	- 888
PGEM 135 KOMPLETT-	CGGAGCTGCATGACGTCCTGGAGATCCACTTCCAGAAGCCCACCCGCGGG	- 888
IFP35 WANG ET AL.-	CGGAGCTGCATGACGTCCTGGAGATCCACTTCCAGAAGCCCACCCGCGGG	- 770
IFP35 GENOM.KLON	- CGGAGCTGCATGACGTCCTGGAGATCCACTTCCAGAAGCCCACCCGCGGG	-1183

IFP35 KORRIGIERT	- GGCGGGGAGGTAGAGGCCCTGACAGTCGTACCCCAAGGACAGCAGGGCCT	- 944
IFP35 ALT	- GGCGG--AGGTAGAGGCCCTGACAGTCGTACCCCAAGGACAGCAGGGCCT	- 936
PGEM 135 KOMPLETT-	GGCGG--AGGTAGAGGCCCTGACAGTCGTACCCCAAGGACAGCAGGGCCT	- 936
IFP35 WANG ET AL.-	GGCGGGGAGGTAGAGGCCCTGACAGTCGTACCCCAAGGACAGCAGGGCCT	- 820
IFP35 GENOM.KLON	- GGCGGGGAGGTAGAGGCCCTGACAGTCGTACCCCAAGGACAGCAGGGCCT	-1233
	****#	
IFP35 KORRIGIERT	- AGCAGTCTTCACCTCTGAGTCAGGCTAGGGGCCTCCCCTTCTCATCTCC	- 994
IFP35 ALT	- AGCAGTCTTCACCTCTGAGTCAGGCTAGGGGCCTCCCCTTCTCATCTCC	- 986
PGEM 135 KOMPLETT-	AGCAGTCTTCACCTCTGAGTCAGGCTAGGGGCCTCCCCTTCTCATCTCC	- 986
IFP35 WANG ET AL.-	AGCAGTCTTCACCTCTGAGTCAGGCTAGGGGCCTCCCCTTCTCATCTCC	- 870
IFP35 GENOM.KLON	- AGCAGTCTTCACCTCTGAGTCAGGCTAGGGGCCTCCCCTTCTCATCTCC	-1283

IFP35 KORRIGIERT	- CCACCCCCCAGCCAAGTTCTCACACTGGCCTGGGCTTGGGTGCCATA	-1044
IFP35 ALT	- CCACCCCCCAGCCAAGTTCTCACACTGGCCTGGGCTTGGGTGCCATA	-1036
PGEM 135 KOMPLETT-	CCACCCCCCAGCCAAGTTCTCACACTGGCCTGGGCTTGGGTGCCATA	-1035
IFP35 WANG ET AL.-	CCACCCCCCAGCCAAGTTCTCACACTGGCCTGGGCTTGGGTGCCATA	- 919
IFP35 GENOM.KLON	- CCACCCCCCAGCCAAGTTCTCACACTGGCCTGGGCTTGGGTGCCATA	-1332
	*****x*****	
IFP35 KORRIGIERT	- TAGGAGGTCTGTATGTTACCAACAGTGCGGAGGGGTACACATTGCAA	-1094
IFP35 ALT	- TAGGAGGTCTGTATGTTACCAACAGTGCGGAGGGGTACACATTGCAA	-1086
PGEM 135 KOMPLETT-	TAGGAGGTCTGTATGTTACCAACAGTGCGGAGGGGTACACATTGCAA	-1085
IFP35 WANG ET AL.-	TAGGAGGTCTGTATGTTACCAACAGTGCGGAGGGGTACACATTGCAA	- 969
IFP35 GENOM.KLON	- TAGGAGGTCTGTATGTTACCAACAGTGCGGAGGGGTACACATTGCAA	-1382

IFP35 KORRIGIERT	- ACACTGCCCAGAACAGTAAAAAGAGCCTGCATGCCAAAAAAAAA	-1139
IFP35 ALT	- ACACTGCCCAGAACAGTAAAAAGAGCCTGCATGCCAAAAAAAAA	-1131
PGEM 135 KOMPLETT-	ACACTGCCCAGAACAGTAAAAAGAGCCTGCATGCCAAAAAAAAA	-1130
IFP35 WANG ET AL.-	ACACTGCCCAGAACAGTAAAAAGAGCCTGCATGCCAAAAAAAAA	-1014
IFP35 GENOM.KLON	- ACACTGCCCAGAACAGTAAAAAGAGCCTGCATGCCATGAT	-1422

6.2 Vergleich unterschiedlicher IFP35-Aminosäuresequenzen

Verglichen werden die veröffentlichte IFP35-Proteinsequenz von Wang et al. (IFP35 Wang et al.; [319]), die sich aufgrund der Translation der in Wang et al. publizierten cDNA-Sequenz von IFP35 ergebende Proteinsequenz (IFP35 Wang Transl.), die translatierte Sequenz des partiellen, publizierten genomischen Klons (IFP35 genom.Klon; „Accession“-Nummer L78833; [43;286]), die Proteinsequenz für die der aus der HeLa-Genbank isolierte IFP35-cDNA-Klon kodiert (pGEM135 komplett) und die von Bange et al. veröffentlichte IFP35-Sequenz (IFP35 Bange et al.; [16]). Die korrigierte Sequenz ist in der ersten Zeile aufgeführt (IFP35 korrigiert).

IFP35 KORRIGIERT	MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPKDKVPFVSVPKIPL	50
IFP35 Wang Transl.	MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPKDKVPFVSVPKIPL	50
IFP35 WANG ET AL.	MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPKDKVPFVSVPKIPL	50
IFP35 Bange et al.	MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPKDKVPFVSVPKIPL	50
PGEM135 komplett	MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPKDKVPFVSVPKIPL	50
IFP35 genom.Klon	-----VVFVSVPKIPL	10

IFP35 KORRIGIERT	VFRGHTQQDPEVPKSLVSNLRIHCPFLAGALITFDDPKVAEQVLQOKEH	100
IFP35 WANG TRANSL.	VFRGHTQQDPEVPKSLVSNLRIHCPFLAGALITFDDPKVAEQVLQOKEH	100
IFP35 WANG ET AL.	VFRGHTQQDPEVPKSLVSNLRIHCPFLAGALITFDDPKVAEQVLQOKEH	100
IFP35 BANGE ET AL.	VFRGHTQQDPEVPKSLVSNLRIHCPFLAGALITFDDPKVAEQVLQOKEH	100
PGEM135 komplett	VFRGHTQQDPEVPKSLVSNLRIHCPFLAGALITFDDPKVAEQVLQOKEH	100
IFP35 GENOM.KLON	VFRGHTQQDPEVPKSLVSNLRIHCPFLAGALITFDDPKVAEQVLQOKEH	60

IFP35 KORRIGIERT	TINMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQVMVSSQLSGRRVLTGFAPASRLRSE	150
IFP35 WANG TRANSL.	TINMEECRLRLQVQPLELPMVTTIQVMVSSQLSGRRVLTGFAPASRLRSE	150
IFP35 WANG ET AL.	TIDMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQVMVSSQLSGRRVLTGFAPASRLRSE	150
IFP35 BANGE ET AL.	TINMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQV--SSQLSGRRVLTGFAPASRLRSE	148
PGEM135 KOMPLETT	TINMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQV--SSQLSGRRVLTGFAPASRLRSE	148
IFP35 GENOM.KLON	TINMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQV--SSQLSGRRVLTGFAPASRLRSE	108
	** .***** .*****	
IFP35 KORRIGIERT	EELLDKLEIFFGKTRNGGDVDVRELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQF	200
IFP35 WANG TRANSL.	EELLDKLEIFFGKTRNGGDVDVRELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQF	200
IFP35 WANG ET AL.	EELLDKLEIFFGKTRDGGGDVDVRELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQF	200
IFP35 BANGE ET AL.	EELLDKLEIFFGKTRNGGDVDVRELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQF	198
PGEM135 KOMPLETT	EELLDKLEIFFGKTRNGGDVDVRELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQF	198
IFP35 GENOM.KLON	EELLDKLEIFFGKTRNGGDVDVRELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQF	158

IFP35 KORRIGIERT	TVPLGGQQVPLRVSPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDILDGPELH	250
IFP35 WANG TRANSL.	TVPLGGQQVPLRVSPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDILDGPELH	250
IFP35 WANG ET AL.	RVPLGGQQVPLRVSPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDILDGPELH	250
IFP35 BANGE ET AL.	TVPLGGQQVPLRVSPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDILDGPELH	248
PGEM135 KOMPLETT	TVPLGGQQVPLRVSPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDILDGPELH	248
IFP35 GENOM.KLON	TVPLGGQQVPLRVSPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDILDGPELH	208

IFP35 KORRIGIERT	DVLEIHFQKPTRGGGEVEALTVVPQ--GQQGLAVFTSESG	288
IFP35 WANG TRANSL.	DVLEIHFQKPTRGGGEVEALTVVPQ--GQQGLAVFTSESG	288
IFP35 WANG ET AL.	DVLEIHFQKPTRGGGEVEALTVVPQ--GQQGLAVFTSESG	288
IFP35 BANGE ET AL.	DVLEIHFQKPTRGGGGRGPDSRTPRTAGPSSLHL-----	282
PGEM135 KOMPLETT	DVLEIHFQKPTRGGGEVEALTVVPQ--GQQGLAVFTSESG	286
IFP35 GENOM.KLON	DVLEIHFQKPTRGGGEVEALTVVPQ--GQQGLAVFTS---	243
	******	
	* . . *	

6.3 Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von hGBP-1, hGBP-2 und hGBP-3

Dargestellt ist ein Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von hGBP-1 („Accession“-Nummer: M55542), hGBP-2 („Accession“-Nummer: M55543) und dem im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten hGBP-3.

hGBP-3	CCAGGCTGTGGAACCTTTGTTCTTTCACCTTTTGCAATAAATCTTGCTGC	50
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	TGCTCACTCTTTGGGTCCACACTGCCTTTATGAGCTGTAACACTCACTGG	100
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	GAATGCTGCAGCTTCACTCCTGAAGCCGGCGAGACCACGAACCCACCAG	150
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	GAGGAACAAACAACCTCCAGACGCGCAGCCTTAAGAGCTGTAACACTCACC	200
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	GCGAAGGTCTGCAGCTTCACTCCTGAGCCAGCCAGACCACGAACCCACCA	250
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	GAAGGAAGAACTCCAAACACATCCGAACATCAGAAGGAGCAAATCCTG	300
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	ACACGCCACCTTTAAGAACCCTGACACTCAACGCTAGGGTCCGCGGCTTC	350
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----	
hGBP-3	ATTCTTGAAGTCAGTGAGACCAAGAACCACCAATTCGGACACGCTAAT	400
hGBP-1	-----	
hGBP-2	-----AGTAAAAGTCCACAGTTACCGTGAGAGAAAAA	32
hGBP-3	TGTTGTAGATCATCACTTCAAGGTGCCATATCTTTCTAGTGAAAAATT	450
hGBP-1	-----	
hGBP-2	AAGAGGAGAAAAGCAGTGCAGCCAAACTCGGAAGAAAAGAGAGGAGGAAAA	82
hGBP-3	ATTCTGGCCTCCGCTGCATACAAATCAGGCAACCAGAATTCTACATATAT	500
hGBP-1	----ACAGAAGTGCTAGAAGCCAGTGTCTCGTGAACCTAAGGAGAAAAAGAA	46
hGBP-2	GGACTCGACTTTCACATTGGAACAACCTTCTTTCCAGTGCTAAGGCTCTC	132
	... *	
hGBP-3	AAGGCAAAGTAACATC--CTAGACATGGCTTTAGAGATCCACATGTCAGA	548
hGBP-1	CAGACAAGGGAACAGC--CTGGACATGGCATCAGAGATCCACATGACAGG	94
hGBP-2	TGATCTGGGGAACAACACCTGGACATGGCTCCAGAGATCAACTTGCCGGG	182
	... * . . . * * * * *	
hGBP-3	CCCCATGTGCCTCATCGAGAAC'TTTAATGAGCAGCTGAAGGTTAATCAGG	598
hGBP-1	CCCAATGTGCCTCATTGAGAACACTAATGGGCGACTGATGGCGAATCCAG	144
hGBP-2	CCCAATGAGCCTCATTGATAACACTAAAGGGCAGCTGGTGGTGAATCCAG	232
	*** ** * * * * *	
hGBP-3	AAGCTTTGGAGATCCTGCTGCCATTATGCAACCTGTAGTTGTGGTAGCG	648
hGBP-1	AAGCTCTGAAGATCCTTTCTGCCATTACACAGCCTATGGTGGTGGTGGCA	194
hGBP-2	AAGCTCTGAAGATCCTATCTGCAATTACGCAGCCTGTGGTGGTGGTGGCG	282
	***** * * * * * *	

hGBP-3	ATTGTGGGCCTCTATCGCACTGGCAAATCCTACCTGATGAACAAGCTGGC	698
hGBP-1	ATTGTGGGCCTCTACCGCACAGGCAAATCCTACCTGATGAACAAGCTGGC	244
hGBP-2	ATTGTGGGCCTCTATCGCACAGGCAAATCCTACCTGATGAACAAGCTGGC *****	332
hGBP-3	TGGGAAGAACAAGGGCTTCTCTGTGTCATCTACGGTGCAGTCTCACACCA	748
hGBP-1	TGGAAAGAAAAAGGGCTTCTCTCTGGGCTCCACGGTGCAGTCTCACACTA	294
hGBP-2	TGGGAAGAAAAACGGCTTCTCTCTAGGCTCCACAGTGAAGTCTCACACCA **.* ** ** ** **	382
hGBP-3	AGGGAATTTGGATATGGTGTGTGCCCTCATCCCAACTGGCCAAATCACACA	798
hGBP-1	AAGGAATCTGGATGTGGTGTGTGCCCCACCCCAAGAAGCCAGGCCACATC	344
hGBP-2	AGGGAATCTGGATGTGGTGTGTGCCCTCATCCCAAGAAGCCAGAACACACC *.* ** ** ** **	432
hGBP-3	TTAGTTCCTGCTTGACACCGAGGGCTGGGAGATGTAGAGAAGGCTGACAA	848
hGBP-1	CTAGTTCCTGCTGGACACCGAGGGCTGGGAGATGTAGAGAAGGCTGACAA	394
hGBP-2	CTAGTTCCTGCTCGACACTGAGGGCTGGGAGATATAGAGAAGGCTGACAA *****	482
hGBP-3	CAAGAATGATATCCAGATCTTGCACCTGGCACTCTTACTGAGCAGCACCT	898
hGBP-1	CCAGAATGACTCCTGGATCTTCGCCCTGGCCGTCTCTCTGAGCAGCACCT	444
hGBP-2	TGAGAATGACTCCTGGATCTTGCCTGGCCATCCTCTCTGAGCAGCACCT *****	532
hGBP-3	TTGTGTACAATA-C-TGTGAACAAATTTGATCAGGGTGCTATCGACCTAC	946
hGBP-1	TCGTGTACAATAGCATAGGAACC--ATCAACCAGCAGGCTATGGACCAAC	492
hGBP-2	TCGTGTACAATAGCATGGGAACC--ATCAACCAGCAGGCCATGGACCAAC * ** ** ** **	580
hGBP-3	TGCACAATGTGACAGAAGTACAGATCTGCTCAAGGCAAGAACTCACCC	996
hGBP-1	TGTACTATGTGACAGAGCTGACACATAGAATCCGATCAAATCCTCACCT	542
hGBP-2	TTCACTATGTGACAGAGCTGACAGATCGAATCAAGGCAAACTCCTCACCT *.* ** ** ** *	630
hGBP-3	GACCTTGACAGG-----GTTGAAGATCCTGCTGACTCTGCGAGCTTCTT	1040
hGBP-1	GATGAGAATGAGAATGAGGTTGAGGATTCAGCTGACTTTGTGAGCTTCTT	592
hGBP-2	GGT-----ACAATTCGTAGACGACTCAGCTGACTTTGTGAGCTTTTT *.* ** ** *	674
hGBP-3	CCCAGACTTAGTGTGGACTCTGAGAGATTTCTGCTTAGGCCTGGAATAG	1090
hGBP-1	CCCAGACTTTGTGTGGACTCTGAGAGATTTCTCCCTGGACTTGGGAAGCAG	642
hGBP-2	TCCAGCATTGTGTGGACTCTCAGAGATTTACCCTGGAAGTGAAGTAG **** ** ** ** *	724
hGBP-3	ATGGGCAACTTGTTCACACCAGATGAATACCTGGAGAATCCCTAAGGCCA	1140
hGBP-1	ATGGACAACCCCTCACACCAGATGAGTACCTGACATACTCCCTGAAGCTG	692
hGBP-2	ATGGAGAACCCATCACTGCTGATGACTACTTGGAGCTTTCGCTAAAGCTA ****.* ** ** ** *	774
hGBP-3	AAGCAAGGTAGTGATCAAAGAGTTCAAATTTCAATTTGCCTCGTCTGTG	1190
hGBP-1	AAGAAAGGTACCAGTCAAAAAGATGAAACTTTTAACCTGCCAGACTCTG	742
hGBP-2	AGAAAAGGTACTGATAAGAAAAGTAAAGCTTTAATGATCCTCGTTGTG *.. ***** ** ** ** *	824
hGBP-3	TATACAGAAGTTCTTTCCAAAAAGAAATGCTTTATCTTTGACTTACCTG	1240
hGBP-1	TATCCGGAAATTTCTTTCCAAAAGAAAAATGCTTTGTCTTTGATCGGCCCG	792
hGBP-2	CATCCGAAAGTTCTTTCCCAAGAGGAAGTCTTCTGCTTTCGATTGGCCCG ** *.* ** ** ** *	874
hGBP-3	CTCACCAAAAAAG--CTTGCCCAACTTGAACACTGCCTGATGATGAGC	1288
hGBP-1	TTCACCGCAGGAAG--CTTGCCCAAGCTCGAGAACTACAAGATGAAGAGC	840
hGBP-2	--CTCCTAAGAAGTACCTTGCTCACCTAGAGCAGCTAAAGGAGGAAGAGC *.* *.* ** ** ** *	922

hGBP-3	TAGAGCCTGAATTTGTGCAACAAGTGACAGAATTCTGTTTCCTACATCTTT	1338
hGBP-1	TGGACCCCGAATTTGTGCAACAAGTAGCAGACTTCTGTTTCCTACATCTTT	890
hGBP-2	TGAACCCCTGATTTTCATAGAACAAGTTGCAGAATTTTGTTCCTACATCCTC *..* ** ** *..* *..* ***** *..* ** ***** *..* *	972
hGBP-3	AGCCATTCTATGACCAAGACTCTTCCAGGTGGCATCATGGTCAATGGATC	1388
hGBP-1	AGTAATTCCAAAACCTAAAACCTTTTCAGGAGGCATCCAGGTCAACGGGCC	940
hGBP-2	AGCCATTCCAATGTCAAGACTCTTTTCAGGTGGCATTGCAGTCAATGGGCC ** **** *..* ** ***** ***** ***** ***** ** *	1022
hGBP-3	TCGTCTAAAGAACCCTGGTGC'TGACC'TATGTCAATGCCATCAGCAGTGGGG	1438
hGBP-1	TCGTCTAGAGAGCCTGGTGC'TGACC'TACGTCAATGCCATCAGCAGTGGGG	990
hGBP-2	TCGTCTAGAGAGCCTGGTGC'TGACC'TACGTCAATGCCATCAGCAGTGGGG ***** *..* ***** ***** ***** ***** ***** *****	1072
hGBP-3	ATCTGCC'TTGCATAGAGAATGCAGTCC'TGGCCT'TGGCTCAGAGAGAGAAC	1488
hGBP-1	ATCTGCC'TTGCATAGAGAATGCAGTCC'TGGCCT'TGGCCTCAGAGAGAGAAC	1040
hGBP-2	ATCTACCC'TGCATAGAGAATGCAGTCC'TGGCCT'TGGCCTCAGAGAGAGAAC **** *..* ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1122
hGBP-3	TCAGCTGCAGTGCAAAGGCCAT'TGCCACTATGACCAGCAAATGGGCCA	1538
hGBP-1	TCAGCTGCAGTGCAAAGGCCAT'TGCCACTATGACCAGCAAATGGGCCA	1090
hGBP-2	TCAGCCGCAGTGCAAAGGCCAT'TGCCACTATGACCAGCAAATGGGCCA ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1172
hGBP-3	GAAAGTGCAGTGCCCATGGAAACCCTCCAGGAGCTGCTGGACCTGCACA	1588
hGBP-1	GAAGGTGCAGTGCCCACAGAAAGCCTCCAGGAGCTGCTGGACCTGCACA	1140
hGBP-2	GAAGGTGCAGTGCCCACGGAAACCCTCCAGGAGCTGCTGGACCTGCACA *** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1222
hGBP-3	GGACCAGTGAGAGGGAGGCCATTGAAGTCTTCATGAAAACTCTTTCAAG	1638
hGBP-1	GGGACAGTGAGAGAGAGGCCATTGAAGTCTTCATCAGGAGTTCCTTCAAA	1190
hGBP-2	GGGACAGTGAGAGAGAGGCCATTGAAGTCTTCATGAAAGACTCTTTCAAG ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1272
hGBP-3	GATGTAGACCAAAGTTTCCAGAAAGAATTGGAGACTCTACTAGATGCAA	1688
hGBP-1	GATGTGGACCATCTATTTCAAAGGAGTTAGCGGCCCAGCTAGAAAAAAA	1240
hGBP-2	GATGTGGACCAAATGTTCCAGAGGAAATTAGGGGCCCAGTTGGAAGCAAG ***** ***** *..* ** *..* *..* *..* *..* *..* *..* *..* *..*	1322
hGBP-3	ACAGAATGACATTTGTAAACGGAACCTGGAAGCATCCTCGGATTATTGCT	1738
hGBP-1	GCGGGATGACTTTTGTAAACAGAATCAGGAAGCATCATCAGATCGTTGCT	1290
hGBP-2	GCGAGATGACTTTTGTAAACAGAATTCCAAAGCATCATCAGATTGTTGCA *..* ***** ***** *..* ** ***** ***** ***** *****	1372
hGBP-3	CGGCTTTACTTTAAGGATATTTTTGGTCCCTCTAGAAGAAGCAGTGAAGCAG	1788
hGBP-1	CAGTTTACTTTCAGGTCATTTTCAGTCCCTCTAGAAGAAGAAGTGAAGGCG	1340
hGBP-2	TGGCTTTACTTTCAGGATATTTTTGGCCCTTTAGAAGAAGATGTCAAGCAG * ***** ** *..* ** *..* ***** ***** ***** ***** *	1422
hGBP-3	GGAATTTATTCCTAAGCCAGGAGGCCATAATCTCTTCATTTCAGAAAACAGA	1838
hGBP-1	GGAATTTATTCGAAACCAGGGGGCTATCGTCTCTTTGTTTCAGAAGCTACA	1390
hGBP-2	GGAACATTTTCTAAACCAGGAGGTTACCGTCTCTTTACTCAGAAGCTGCA ***** *..* ** *..* ***** ** *..* ***** ***** ***** *	1472
hGBP-3	AGAACTGAAGCAAAGTACTATCGGGAGCCTCGGAAAGGAATACAGGCTG	1888
hGBP-1	AGACCTGAAGAAAAAGTACTATGAGGAACCGAGGAAGGGGATACAGGCTG	1440
hGBP-2	GGAGCTGAAGAATAAGTACTACCAGGTGCCAAGGAAGGGGATACAGGCCA *..* ***** ***** ***** *..* ** ***** ***** ***** *****	1522
hGBP-3	AAGAAGTTCTGCAGAAATATTTAAAGTCCAAGGAGTCTGTGAGTCATGCA	1938
hGBP-1	AAGAGATTTCTGCAGACATACTTGAATCCAAGGAGTCTATGACTGATGCA	1490
hGBP-2	AAGAGGTGCTGAAAAAATATTTGGAGTCCAAGGAGGATGTGGCTGATGCA ***** *..* ** *..* ** *..* ***** ***** ***** ***** *****	1572

hGBP-3	-----	
hGBP-1	CTGGCCAAGTCTACAATGTCCCAATATCAAGGACAACCACCCTAGCTTCT	2237
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	TAGTGAAGACAATGTACAGTTATCCATTAGATCAAGACTACACGGTCTAT	2287
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	GAGCAATAATGTGATTTCTGGACATTGCCCATGTATAATCCTCACTGATG	2337
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	ATTTCAAGCTAAAGCAAACCACCTTATACAGAGATCTAGAATCTCTTTAT	2387
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	GTTCTCCAGAGGAAGGTGGAAGAAACCATGGGCAGGAGTAGGAATTGAGT	2437
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	GATAACAATTTGGGCTAATGAAGAAAACCTCTCTTATTGTTTCAGTTCATC	2487
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	CAGATTATAACTTCAATGGGACACTTTAGACCATTAGACAATTGACACTG	2537
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	GATTAACAAAATTCACATAATGCCAAATACACAATGTATTTATAGCAACG	2587
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	TATAATTTGCAAAGATGGACTTTAAAAGATGCTGTGTAACATAACTGAAA	2637
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	TAATTCATTACTTATTATTTAGAATGTAAAGCTTATGATAGTCTTTTC	2687
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	TAATTCCTAACACTCATACTTGAAATCTTTCCGAGTTTCCCAGAAGAGA	2737
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	ATATGGGATTTTTTTTGACATTTTTGACCCATTTAATAATGCTCTTGTGT	2787
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	TTACCTAGTATATGTAGACTTTGTCTTATGTGTCAAAAGTCCTAGGAAAG	2837
hGBP-2	-----	
hGBP-3	-----	
hGBP-1	TGGTTGATGTTTCTTATAGCAATTAATAAATTATTTTTGAACTGA	2881
hGBP-2	-----	

6.5 Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von Klon 2107 und 2107/18-1

Dargestellt ist ein Sequenzvergleich zwischen dem Ursprungsklon 2107 (pBS 2107) mit fehlendem 5'-Terminus und dem Vollängenklon mit fehlerhafter Sequenz im 3'-Bereich (pBS 2107-18/1).

```

2107-18/1 - CCAGGCTGTGGAACCTTTGTTCTTTCCTCTTTGCAATAAATCTTGCTGC - 50
2107-18/1 - TGCTCACTCTTTGGGTCCACACTGCCTTTATGAGCTGTAACACTCACTGG - 100
2107-18/1 - GAATGTCTGCAGCTTCACTCCTGAAGCCGGCGAGACCACGAACCCACCAG - 150
2107-18/1 - GAGGAACAAACAACCTCCAGACGCGCAGCCTTAAGAGCTGTAACACTCACC - 200
2107-18/1 - GCGAAGGTCTGCAGCTTCACTCCTGAGCCAGCCAGACCACGAACCCACCA - 250
2107-18/1 - GAAGGAAGAAACTCCAAACACATCCGAACATCAGAAGGAGCAAATCCTG - 300
2107-18/1 - ACACGCCACCTTTAAGAACCCTGACACTCAACGCTAGGGTCCGCGGCTTC - 350
2107-18/1 - ATTCTTGAAGTCAGTGAGACCAAGAACCCACCAATCCGGACACGCTAAT - 400
2107-18/1 - TGTTGTAGATCATCACTTCAAGGTGCCCATATCTTTCTAGTGAAAAAATT - 450
2107-18/1 - ATTCTGGCCTCCGCTGCATACAAATCAGGCAACCAGAATTCTACATATAT - 500
2107-18/1 - AAGGCAAAGTAACATCCTAGACATGGCTTTAGAGATCCACATGTCAGACC - 550
2107-18/1 - CCATGTGCCTCATCGAGAACTTTAATGAGCAGCTGAAGGTTAATCAGGAA - 600
2107-18/1 - GCTTTGGAGATCCTGTCTGCCATTATGCAACCTGTAGTTGTGGTAGCGAT - 650
2107-18/1 - TGTGGGCCTCTATCGCACTGGCAAATCCTACCTGATGAACAAGCTGGCTG - 700
2107 - G - 1
2107-18/1 - GGAAGAACAAGGGCTTCTCTGTTGCATCTACGGTGCAGTCTCACACCAAG - 750
2107 - GGAATTTGGATATGGTGTGTGCCTCATCCCAACTGGCCAAATCACACATT - 51
2107-18/1 - GGAATTTGGATATGGTGTGTGCCTCATCCCAACTGGCCAAATCACACATT - 800
2107 - AGTTCCTGCTTGACACCGAGGGCCTGGGAGATGTAGAGAAGGCTGACAACA - 101
2107-18/1 - AGTTCCTGCTTGACACCGAGGGCCTGGGAGATGTAGAGAAGGCTGACAACA - 850
2107 - AGAATGATATCCAGATCTTTGCACTGGCACTCTTACTGAGCAGCACCTTT - 151
2107-18/1 - AGAATGATATCCAGATCTTTGCACTGGCACTCTTACTGAGCAGCACCTTT - 900
2107 - GTGTACAATACTGTGAACAAAATTGATCAGGGTGCTATCGACCTACTGCA - 201
2107-18/1 - GTGTACAATACTGTGAACAAAATTGATCAGGGTGCTATCGACCTACTGCA - 950
2107 - CAATGTGACAGAAGTACAGATCTGCTCAAGGCAAGAACTCACCCGACC - 251
2107-18/1 - CAATGTGACAGAAGTACAGATCTGCTCAAGGCAAGAACTCACCCGACC -1000
2107 - TTGACAGGGTTGAAGATCCTGCTGACTCTGCGAGCTTCTTCCAGACTTA - 301
2107-18/1 - TTGACAGGGTTGAAGATCCTGCTGACTCTGCGAGCTTCTTCCAGACTTA -1050

```



```

2107      - AAGCCAGGAGGCCATAATCTCTTCATTTCAGAAAACAGAAGAACTGAAGGC -1101
          |||
2107-18/1 - AAGCCAGGAGGCCATAATCTCTTCATTTCAGAAAACAGAAGAACTGAAGGC -1850

2107      - AAAGTACTATCGGGAGCCTCGGAAAGGAATACAGGCTGAAGAAGTTCTGC -1151
          |||
2107-18/1 - AAAGTACTATCGGGAGCCTCGGAAAGGAATACAGGCTGAAGAAGTTCTGC -1900

2107      - AGAAATATTTAAAGTCCAAGGAGTCTGTGAGTCATGCAATATTACAGACT -1201
          |||
2107-18/1 - AGAAATATTTAAAGTCCAAGGAGTCTGTGAGTCATGCAATATTACAGACT -1950

2107      - GACCAGGCTCTCACAGAGACGGAAAAAAGAAGAAAGAGGCACAAGTGAA -1251
          |||
2107-18/1 - GACCAGGCTCTCACAGAGACGGAAAAAAGAAGAAAGAGGCACAAGTGAA -2000

2107      - AGCAGAAGCTGAAAAGGCTGAAGCGCAAAGGTTGGCGGCGATTCAAAGGC -1301
          |||
2107-18/1 - AGCAGAAGCTGAAAAGGCTGAAGCGCAAAGGTTGGCGGCGATTCAAAGGC -2050

2107      - AGAACGAGCAAATGATGCAGGAGAGGGAGAGACTCCATCAGGAACAAGTG -1351
          |||
2107-18/1 - AGAACGAGCAAATGATGCAGGAGAGGGAGAGACTCCATCAGGAACAATAA -2100

2107      - AGACAAATGGAGATAGCCAAACAAAATTGGCTGGCAGAGCAACAGAAAAT -1401
          |||
2107-18/1 - CGATGAGAGTATGTAGCAGTGGCAAAGAGGGAGAGGCAGCAAGATCTTGT -2150

2107      - GCAGGA-----AC -1409
          |
2107-18/1 - GGCTCTCAGCAGGGAGTCTGGAGCCAGAAAGTCTGGGTATGAATCCAAGC -2200

2107      - AACAGATGCAGGAACAGGCTGCACAGCTCAGCACAACATTCCAAGCTCAA -1459
          |||
2107-18/1 - TCCACCTCTTAGAACAGGCTGCACAGCTCAGCACAACATTCCAAGCTCAA -2250

2107      - AATAGAAGCCTTCTCAGTGAGCTCCAGCACGCCAGAGGACTGTTAATAA -1509
          |||
2107-18/1 - AATAGAAGCCTTCTCAGTGAGCTCCAGCACGCCAGAGGACTGTTAATAA -2300

2107      - CGATGATCCATGTGTTTTACTCTAAAGTGCTAAATATGGGAGTTTCCTTT -1559
          |||
2107-18/1 - CGATGATCCATGTGTTTTACTCTAAAGTGCTAAATATGGGAGTTTCCTTT -2350

2107      - TTTTACTCTTTGTCACTGATGACACAACAGAAAAGAACTGTAGACCTTG -1609
          |||
2107-18/1 - TTTTACTCTTTGTCACTGATGACACAACAGAAAAGAACTGTAGACCTTG -2400

2107      - GGACAATCAACATTTAAATAAACTTTATAATTATTTTTTCAAAAAAAAAA -1659
          |||
2107-18/1 - GGACAATCAACATTTAAATAAACTTTATAATTATTTTTTCAAACTTTAAA -2450

2107      - AAAAAAAAAA -1669
          |||
2107-18/1 - AAAA -2454

```

7 Literaturverzeichnis

1. **Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober.** 1997. Cellular and Molecular Immunology. W.B.Saunders Company, Philadelphia, USA
2. **Adams, D.O. and T.A. Hamilton.** 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu.Rev.Immunol.* **2**:283-318.
3. **Allan, V.J. and T.E. Kreis.** 1986. A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* **103**:2229-2239.
4. **Alwine, J.C., D.J. Kemp, and G.R. Stark.** 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**:5350-5354.
5. **Amann, E. and J. Brosius.** 1985. "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **40**:183-190.
6. **Andrews and P.** 1970. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *In Methods of Biochemical Analysis* (D.Glick, ed.).Vol.18, pp.1-53 Interscience, New York, USA
7. **Anton, B., J. Fein, T. To, X. Li, L. Silberstein, and C.J. Evans.** 1996. Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *J.Comp.Neurol.* **368**:229-251.
8. **Asano, T., K. Takata, H. Katagiri, K. Tsukuda, J.L. Lin, H. Ishihara, K. Inukai, H. Hirano, Y. Yazaki, and Y. Oka.** 1992. Domains responsible for the differential targeting of glucose transporter isoforms. *J.Biol.Chem.* **267**:19636-19641.
9. **Asundi, V.K., R.C. Stahl, L. Showalter, K.J. Conner, and D.J. Carey.** 1994. Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim.Biophys.Acta* **1217**:257-265.
10. **Aulitzky, W.E., C. Huber, and C. Peschel.** 1993. Cytokine therapy of neoplastic and inflammatory disease. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **101**:221-226.
11. **Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl.** 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. New York, USA
12. **Auwerx, J.** 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**:22-31.
13. **Baek, K.J., B.A. Thiel, S. Lucas, and D.J. Stuehr.** 1993. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J.Biol.Chem.* **268**:21120-21129.
14. **Baldwin, A.S.J.** 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* **14**:649-683.
15. **Bange, F.C., T. Flohr, U. Buwitt, and E.C. Böttger.** 1992. An interferon-induced protein with release factor activity is a tryptophanyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett.* **300**:162-166.
16. **Bange, F.C., U. Vogel, T. Flohr, M. Kiekenbeck, B. Denecke, and E.C. Böttger.** 1994. IFP 35 is an interferon-induced leucine zipper protein that undergoes interferon-regulated cellular redistribution. *J.Biol.Chem.* **269**:1091-1098.
17. **Banks, L., G. Matlashewski, and L. Crawford.** 1986. Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur.J.Biochem.* **159**:529-534.
18. **Bao, J. and A.S. Zervos.** 1996. Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene* **12**:2171-2176.
19. **Baribault, H., R. Blouin, L. Bourgon, and N. Marceau.** 1989. Epidermal growth factor-induced selective phosphorylation of cultured rat hepatocyte 55-kD cytokeratin before filament reorganization and DNA synthesis. *J.Cell Biol.* **109**:1665-1676.
20. **Bartek, J., J. Bartkova, J. Lukas, Z. Staskova, B. Vojtesek, and D.P. Lane.** 1993. Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies. *J.Pathol.* **169**:27-34.

21. **Bass, B.L., H. Weintraub, R. Cattaneo, and M.A. Billeter.** 1989. Biased hypermutation of viral RNA genomes could be due to unwinding/modification of double-stranded RNA. *Cell* **56**:331.
22. **Bauer, K.D. and J.W. Jacobberger.** 1994. Analysis of intracellular proteins. *Methods Cell Biol.* **41**:351-376.
23. **Beck, S., A. Kelly, E. Radley, F. Khurshid, R.P. Alderton, and J. Trowsdale.** 1992. DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J.Mol.Biol.* **228**:433-441.
24. **Beck, S. and H. Koster.** 1990. Applications of dioxetane chemiluminescent probes to molecular biology. *Anal.Chem.* **62**:2258-2270.
25. **Berger, E.G., E. Aegerter, T. Mandel, and H.P. Hauri.** 1986. Monoclonal antibodies to soluble, human milk galactosyltransferase (lactose synthase A protein). *Carbohydr.Res.* **149**:23-33.
26. **Bergeron, J.J., J. Cruz, M.N. Khan, and B.I. Posner.** 1985. Uptake of insulin and other ligands into receptor-rich endocytic components of target cells: the endosomal apparatus. *Annu.Rev.Physiol.* **47**:383-403.
27. **Berton, M.T. and L.A. Linehan.** 1995. IL-4 activates a latent DNA-binding factor that binds a shared IFN-gamma and IL-4 response element present in the germ-line gamma 1 Ig promoter. *J.Immunol.* **154**:4513-4525.
28. **Birnboim, H.C.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**:243-255.
29. **Birnboim, H.C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* **7**:1513-1523.
30. **Blyussen, H.A., R. Muzaffar, R.J. Vlieststra, A.C. van der Made, S. Leung, G.R. Stark, I.M. Kerr, J. Trapman, and D.E. Levy.** 1995. Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:5645-5649.
31. **Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* **15**:749-795.
32. **Bonnekoh, B., C. Huerkamp, A. Wevers, J. Geisel, B. Sebok, F.C. Bange, D.A. Greenhalgh, E.C. Böttger, T. Krieg, and G. Mahrle.** 1995. Up-regulation of keratin 17 expression in human HaCaT keratinocytes by interferon-gamma. *J.Invest.Dermatol.* **104**:58-61.
33. **Böttger, E.C.** 1988. High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electrotransformation. *Biotechniques* **6**:878-880.
34. **Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* **106**:761-771.
35. **Bourne, H.R.** 1988. Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell* **53**:669-671.
36. **Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick.** 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**:125-132.
37. **Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick.** 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**:117-127.
38. **Boyer, H.W. and D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **41**:459-472.
39. **Boyum, A.** 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* **97**:77-89.
40. **Bozic, C.R., B. Lu, U.E. Hopken, C. Gerard, and N.P. Gerard.** 1996. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. *Science* **273**:1722-1725.
41. **Briken, V., H. Ruffner, U. Schultz, A. Schwarz, L.F. Reis, I. Strehlow, T. Decker, and P. Staeheli.** 1995a. Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol.Cell Biol.* **15**:975-982.

42. **Briken, V., H. Ruffner, U. Schultz, A. Schwarz, L.F. Reis, I. Strehlow, T. Decker, and P. Staeheli.** 1995b. Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol.Cell Biol.* **15**:975-982.
43. **Brown, M.A., K.A. Jones, H. Nicolai, M. Bonjardim, D. Black, R. McFarlane, P. de Jong, J.P. Quirk, H. Lehrach, and E. Solomon.** 1995. Physical mapping, cloning, and identification of genes within a 500-kb region containing BRCA1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:4362-4366.
44. **Brunda, M.J., L. Luistro, J.A. Hendrzak, M. Fountoulakis, G. Garotta, and M.K. Gately.** 1995. Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J.Immunother.Emphasis.Tumor Immunol.* **17**:71-77.
45. **Buckland, R., E. Malvoisin, P. Beauverger, and F. Wild.** 1992. A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion. *J.Gen.Virol.* **73**:1703-1707.
46. **Buckland, R. and F. Wild.** 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature* **338**:547
47. **Bunzow, J.R., C. Saez, M. Mortrud, C. Bouvier, J.T. Williams, M. Low, and D.K. Grandy.** 1994. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* **347**:284-288.
48. **Burg, M., U. Martin, C. Rheinheimer, J. Kohl, W. Bautsch, E.C. Böttger, and A. Klos.** 1995. IFN-gamma up-regulates the human C5a receptor (CD88) in myeloblastic U937 cells and related cell lines. *J.Immunol.* **155**:4419-4426.
49. **Burnette, W.N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.* **112**:195-203.
50. **Busso, N., S.K. Masur, D. Lazega, S. Waxman, and L. Ossowski.** 1994. Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J.Cell Biol.* **126**:259-270.
51. **Calvin, N.M. and P.C. Hanawalt.** 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J.Bacteriol.* **170**:2796-2801.
52. **Cantacuzene, J.** 1898. Nouvelles recherches sur lei mode die destruction des vibrions dans l'organisme. *Ann.Inst.Pasteur* **12**:273-300.
53. **Cao, Y.Q., P.W. Mantyh, E.J. Carlson, A.M. Gillespie, C.J. Epstein, and A.I. Basbaum.** 1998. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* **392**:390-394.
54. **Carlin, J.M., E.C. Borden, P.M. Sondel, and G.I. Byrne.** 1987. Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J.Immunol.* **139**:2414-2418.
55. **Carlow, D.A., J. Marth, I. Clark-Lewis, and H.S. Teh.** 1995. Isolation of a gene encoding a developmentally regulated T cell-specific protein with a guanine nucleotide triphosphate-binding motif. *J.Immunol.* **154**:1724-1734.
56. **Carr, D.J. and G.R. Klimpel.** 1986. Enhancement of the generation of cytotoxic T cells by endogenous opiates. *J.Neuroimmunol.* **12**:75-87.
57. **Casey, P.J.** 1992. Biochemistry of protein prenylation. *J.Lipid Res.* **33**:1731-1740.
58. **Cassatella, M.A., L. Hartman, B. Perussia, and G. Trinchieri.** 1989. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J.Clin.Invest.* **83**:1570-1579.
59. **Chaconas, G. and J.H. van de Sande.** 1980. 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* **65**:75-85.
60. **Chanock, S.J., J. el Benna, R.M. Smith, and B.M. Babior.** 1994. The respiratory burst oxidase. *J.Biol.Chem.* **269**:24519-24522.
61. **Chen, Y., Y. Fan, J. Liu, A. Mestek, M. Tian, C.A. Kozak, and L. Yu.** 1994. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* **347**:279-283.

62. **Cheng, Y.S., M.F. Becker-Manley, T.P. Chow, and D.C. Horan.** 1985. Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J.Biol. Chem.* **260**:15834-15839.
63. **Cheng, Y.S., R.J. Colonno, and F.H. Yin.** 1983. Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J.Biol.Chem.* **258**:7746-7750.
64. **Cheng, Y.S., C.E. Patterson, and P. Staeheli.** 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.
65. **Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, and W.J. Rutter.** 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**:5294-5299.
66. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.
67. **Chou, C.F., C.L. Riopel, and M.B. Omary.** 1994. Identification of a keratin-associated protein that localizes to a membrane compartment. *Biochem.J.* **298**:457-463.
68. **Chou, C.F., C.L. Riopel, L.S. Rott, and M.B. Omary.** 1993. A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J.Cell Sci.* **105**:433-444.
69. **Clarke, S.** 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu.Rev.Biochem.* **61**:355-386.
70. **Clevenger, C.V., K.D. Bauer, and A.L. Epstein.** 1985. A method for simultaneous nuclear immunofluorescence and DNA content quantitation using monoclonal antibodies and flow cytometry. *Cytometry* **6**:208-214.
71. **Cohn, S.A., A.L. Ingold, and J.M. Scholey.** 1989. Quantitative analysis of sea urchin egg kinesin-driven microtubule motility. *J.Biol.Chem.* **264**:4290-4297.
72. **Coligan, J.E., A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober.** 1998. *Current Protocols in Immunology.* John Wiley & Sons, New York, USA.
73. **Collins, J.T. and W.A. Dunnick.** 1993. Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. *Int.Immunol.* **5**:885-891.
74. **Collins, S.J.** 1987. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**:1233-1244.
75. **Collins, S.J., R.C. Gallo, and R.E. Gallagher.** 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**:347-349.
76. **Connor, M., A. Yeo, and G. Henderson.** 1996. The effect of nociceptin on Ca²⁺ channel current and intracellular Ca²⁺ in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br.J.Pharmacol.* **118**:205-207.
77. **Cox, P.M. and C.R. Goding.** 1992. An ATF/CREB binding motif is required for aberrant constitutive expression of the MHC class II DR alpha promoter and activation by SV40 T-antigen. *Nucleic.Acids.Res.* **20**:4881-4887.
78. **Cox, R.** 1968. The Use of Guanidinium Chloride in the Isolation of Nucleic Acids. *Methods Enzymol.* **12**, 120-125.
79. **Curfs, J.H., J.F. Meis, and J.A. Hoogkamp-Korstanje.** 1997. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**:742-780.
80. **Dalton, W.T.J., M.J. Ahearn, K.B. McCredie, E.J. Freireich, S.A. Stass, and J.M. Trujillo.** 1988. HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* **71**:242-247.
81. **de Duve and Berthet.** 1954. The use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes. *Int.Rev.Cytol.* **3**:225-275.
82. **de Mayer, E. and J. de Mayer-Guignard.** 1988. *Interferons and other regulatory cytokines.* John Wiley & Sons; New York; USA pp 91-113.

83. **de Vos, A.M., L. Tong, M.V. Milburn, P.M. Matias, J. Jancarik, S. Noguchi, S. Nishimura, K. Miura, E. Ohtsuka, and S.H. Kim.** 1988. Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* **239**:888-893.
84. **Decker, T., D.J. Lew, Y.S. Cheng, D.E. Levy, and J.E.J. Darnell.** 1989. Interactions of alpha- and gamma-interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein. *EMBO J.* **8**:2009-2014.
85. **Deguchi, M., H. Sakuta, K. Uno, K. Inaba, and S. Muramatsu.** 1995. Exogenous and endogenous type I interferons inhibit interferon-gamma-induced nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in murine peritoneal macrophages. *J.Interferon.Cytokine.Res.* **15**:977-984.
86. **Deng, G. and R. Wu.** 1983. Terminal transferase: use of the tailing of DNA and for *in vitro* mutagenesis. *Methods Enzymol.* **100**:96-116.
87. **Der, C.J. and A.D. Cox.** 1991. Isoprenoid modification and plasma membrane association: critical factors for ras oncogenicity. *Cancer Cells* **3**:331-340.
88. **Dever, T.E., M.J. Glynias, and W.C. Merrick.** 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**:1814-1818.
89. **Devine, D.P., L. Taylor, R.K. Reinscheid, F.J.J. Monsma, O. Civelli, and H. Akil.** 1996. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem.Res.* **21**:1387-1396.
90. **di Guan, C., P. Li, P.D. Riggs, and H. Inouye.** 1988. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**:21-30.
91. **Di Silvio, M., D.A. Geller, S.S. Gross, A. Nussler, P. Freeswick, R.L. Simmons, and T.R. Billiar.** 1993. Inducible nitric oxide synthase activity in hepatocytes is dependent on the co-induction of tetrahydrobiopterin synthesis. *Adv.Exp.Med.Biol.* **338**:305-308.
92. **Dickerson, C., B. Udem, B. Bullock, and R.A. Winchurch.** 1998. Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J.Leukoc.Biol.* **63**:602-605.
93. **Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder.** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic.Acids.Res.* **11**:1475-1489.
94. **Dorsey, M.J., H.J. Tae, K.G. Sollenberger, N.T. Mascarenhas, L.M. Johansen, and E.J. Taparowsky.** 1995. B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* **11**:2255-2265.
95. **Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic.Acids.Res.* **16**:6127-6145.
96. **Drew, P.D., M. Lonergan, M.E. Goldstein, L.A. Lampson, K. Ozato, and D.E. McFarlin.** 1993. Regulation of MHC class I and beta 2-microglobulin gene expression in human neuronal cells. Factor binding to conserved cis-acting regulatory sequences correlates with expression of the genes. *J.Immunol.* **150**:3300-3310.
97. **Duplay, P., H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin, and M. Hofnung.** 1984. Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J.Biol.Chem.* **259**:10606-10613.
98. **Eickbush, T.H. and E.N. Moudrianakis.** 1978. The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. *Cell* **13**:295-306.
99. **Eisenstein, T.K. and M.E. Hilburger.** 1998. Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations. *J.Neuroimmunol.* **83**:36-44.
100. **Ennis, H. L. and Lubin, M.** 1964. Cycloheximide: Aspects of Inhibition of Protein Synthesis in Mammalian Cells. *Science* **146**: 1474-1476.
101. **Epperson, D.E., D. Arnold, T. Spies, P. Cresswell, J.S. Pober, and D.R. Johnson.** 1992. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J.Immunol.* **149**:3297-3301.

102. **Epstein, M.A., B.G. Achong, Y.M. Barr, B. Zajac, G. Henle, and W. Henle.** 1966. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J.Natl.Cancer Inst.* **37**:547-559.
103. **Feig, L.A., B.T. Pan, T.M. Roberts, and G.M. Cooper.** 1986. Isolation of ras GTP-binding mutants using an in situ colony-binding assay. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83**:4607-4611.
104. **Fischer, L.** 1980. Gel-filtration Chromatography. Elsevier, Amsterdam. Elsevier, Amsterdam
105. **Flaman, J.M., T. Frebourg, V. Moreau, F. Charbonnier, C. Martin, C. Ishioka, S.H. Friend, and R. Iggo.** 1994. A rapid PCR fidelity assay. *Nucleic.Acids.Res.* **22**:3259-3260.
106. **Fleckner, J., P.M. Martensen, A.B. Tolstrup, N.O. Kjeldgaard, and J. Justesen.** 1995. Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine.* **7**:70-77.
107. **Flenghi, L., M. Fagioli, L. Tomassoni, S. Pileri, M. Gambacorta, R. Pacini, F. Grignani, T. Casini, P.F. Ferrucci, M.F. Martelli, and a. et.** 1995. Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood* **85**:1871-1880.
108. **Flohr, T., F.C. Bange, A. von Euch, M. Kiekenbeck, and E.C. Böttger.** 1992. Depletion of tryptophan is not involved in expression of tryptophanyl-tRNA synthetase mediated by interferon. *Infect.Immun.* **60**:4418-4421.
109. **Flohr, T., U. Buwitt, B. Bonnekoh, T. Decker, and E.C. Böttger.** 1992. Interferon-gamma regulates expression of a novel keratin class I gene. *Eur.J.Immunol.* **22**:975-979.
110. **Florin, S., C. Suaudeau, J.C. Meunier, and J. Costentin.** 1996. Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur.J.Pharmacol.* **317**:9-13.
111. **Fritzler, M.J., J.C. Hamel, R.L. Ochs, and E.K. Chan.** 1993. Molecular characterization of two human autoantigens: unique cDNAs encoding 95- and 160-kD proteins of a putative family in the Golgi complex. *J.Exp.Med.* **178**:49-62.
112. **Fukuda, K., S. Kato, K. Mori, M. Nishi, H. Takeshima, N. Iwabe, T. Miyata, T. Houtani, and T. Sugimoto.** 1994. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* **343**:42-46.
113. **Gannon, J.V., R. Greaves, R. Iggo, and D.P. Lane.** 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* **9**:1595-1602.
114. **Gassen, H.G., G.E. Sachse, and A. Schulte.** 1994. PCR; Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
115. **Gey, G.O., W.D. Coffman, and M.T. Kubicek.** 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**:264-2655.
116. **Giard, D.J., S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, and W.P. Parks.** 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* **51**:1417-1423.
117. **Gillis, S. and J. Watson.** 1980. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J.Exp.Med.* **152**:1709-1719.
118. **Gilly, M. and R. Wall.** 1992. The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *J.Immunol.* **148**:3275-3281.
119. **Glisin, V., R. Crkvenjakov, and C. Byus.** 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* **13**:2633-2637.
120. **Gongora, C., G. David, L. Pintard, C. Tissot, T.D. Hua, A. Dejean, and N. Mechti.** 1997. Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *J.Biol.Chem.* **272**:19457-19463.
121. **Gordon, D.** 1998. Nocistatin: new type of opioid?. *Gastroenterology* **114**:1122.
122. **Gowans, J.L. and J. Knight.** 1964. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc.R.Soc.LondonSer.B* **159**:257-269.

123. **Grisel, J.E., J.S. Mogil, J.K. Belknap, and D.K. Grandy.** 1996. Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not a spinal, anti-opioid peptide. *Neuroreport.* **7**:2125-2129.
124. **Groettrup, M., R. Kraft, S. Kostka, S. Standera, R. Stohwasser, and P.M. Kloetzel.** 1996. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur.J.Immunol.* **26**:863-869.
125. **Gubler, U. and B.J. Hoffman.** 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**:263-269.
126. **Gupta, J.W., M. Kubin, L. Hartman, M. Cassatella, and G. Trinchieri.** 1992. Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and gamma-interferon. *Cancer Res.* **52**:2530-2537.
127. **Han, B.H., D.J. Park, R.W. Lim, J.H. Im, and H.D. Kim.** 1998. Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1384**:373-386.
128. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.
129. **Haque, S.J. and B.R. Williams.** 1998. Signal transduction in the interferon system. *Semin. Oncol.* **25**:14-22.
130. **Harding, C.V.** 1996. Class II antigen processing: analysis of compartments and functions. *Crit.Rev.Immunol.* **16**:13-29.
131. **Harlow, E., L.V. Crawford, D.C. Pim, and N.M. Williamson.** 1981. Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J.Virol.* **39**:861-869.
132. **Harlow, E. and D. Lane.** 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
133. **Harris, P. and P. Ralph.** 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J.Leukoc.Biol.* **37**:407-422.
134. **Hasilik, A. and E.F. Neufeld.** 1980. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J.Biol.Chem.* **255**:4937-4945.
135. **Hassanain, H.H., S.Y. Chon, and S.L. Gupta.** 1993. Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J.Biol.Chem.* **268**:5077-5084.
136. **Hayflick, L.** 1961. The Establishment of a Line (WISH) of human Amnion Cells in continuous Cultivation. *Exp.Cell Res.* **23**:14-20.
137. **Heijnen, C.J., C. Bevers, A. Kavelaars, and R.E. Ballieux.** 1986. Effect of alpha-endorphin on the antigen-induced primary antibody response of human blood B cells in vitro. *J.Immunol.* **136**:213-216.
138. **Heikoop, J.C., B.M. Van-den, A. Strijland, P.J. Weijers, R.B. Schutgens, W.W. Just, R.J. Wanders, and J.M. Tager.** 1991. Peroxisomes of normal morphology but deficient in 3-oxoacyl-CoA thiolase in rhizomelic chondrodysplasia punctata fibroblasts. *Biochim.Biophys. Acta* **1097**:62-70.
139. **Herzberg, N.H., E. Middelkoop, M. Adorf, H.L. Dekker, G.M. Van, B.M. Van-den, P.A. Bolhuis, and B.C. Van-den.** 1993. Mitochondria in cultured human muscle cells depleted of mitochondrial DNA. *Eur.J.Cell Biol.* **61**:400-408.
140. **Ho, W.Z., J.P. Lai, X.H. Zhu, M. Uvaydova, and S.D. Douglas.** 1997. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J.Immunol.* **159**:5654-5660.
141. **Hohjoh, H. and M.F. Singer.** 1996. Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J.* **15**:630-639.
142. **Holzer, P.** 1998. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen.Pharmacol.* **30**:5-11.
143. **Hovanessian, A.G.** 1991. Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2',5'-oligoadenylate synthetases. *J.Interferon.Res.* **11**:199-205.

144. **Hovanessian, A.G.** 1993. Interferon-induced dsRNA-activated protein kinase (PKR): antiproliferative, antiviral and antitumoral functions. *Semin.Virol* **4**:237-245.
145. **Ibelgaufts, H.** 1993. *Gentechnologie von A bis Z*. VCH-Verlag, Weinheim.
146. **Ihle, J.N., B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, K. Yamamoto, W.E. Thierfelder, B. Kreider, and O. Silvennoinen.** 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends.Biochem.Sci.* **19**:222-227.
147. **Isaacs, A. and J. Lindenmann.** 1957. Viral interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc.Lond.* **147**:258-267.
148. **Johnson, D.R. and J.S. Pober.** 1990. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**:5183-5187.
149. **Johnson, D.R. and J.S. Pober.** 1994. HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Mol.Cell Biol.* **14**:1322-1332.
150. **Johnson, H.M., E.M. Smith, B.A. Torres, and J.E. Blalock.** 1982. Regulation of the *in vitro* antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79**:4171-4174.
151. **Johnston, T.C., R.B. Thompson, and T.O. Baldwin.** 1986. Nucleotide sequence of the luxB gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the beta subunit of bacterial luciferase. *J.Biol.Chem.* **261**:4805-4811.
152. **Jones, H.W.J., V.A. McKusick, P.S. Harper, and K.D. Wu.** 1971. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet.Gynecol.* **38**:945-949.
153. **Jones, N.** 1990. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* **61**:9-11.
154. **Jurnak, F.** 1985. Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science* **230**:32-36.
155. **Kafatos, F.C., C.W. Jones, and A. Efstratiadis.** 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic.Acids.Res.* **7**:1541-1552.
156. **Kagaya, K., K. Watanabe, and Y. Fukazawa.** 1989. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for Salmonella-killing activity. *Infect.Immun.* **57** :609-615.
157. **Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S.I. Koh, T. Kimura, and S.J. Green.** 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* **263**:1612-1615.
158. **Kato, K., A.D. Cox, M.M. Hisaka, S.M. Graham, J.E. Buss, and C.J. Der.** 1992. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**:6403-6407.
159. **Kato, K., C.J. Der, and J.E. Buss.** 1992. Prenoids and palmitate: lipids that control the biological activity of Ras proteins. *Semin.Cancer Biol.* **3**:179-188.
160. **Kay, N., J. Allen, and J.E. Morley.** 1984. Endorphins stimulate normal human peripheral blood lymphocyte natural killer activity. *Life Sci.* **35**:53-59.
161. **Kellermann, O.K. and T. Ferenci.** 1982. Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **90**:459-463.
162. **Kim, T.K. and T. Maniatis.** 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **273**:1717-1719.
163. **Kim, T.S., W.S. Xu, T. Sun, and E.P. Cohen.** 1995. Immunization with interleukin-2/interferon-gamma double cytokine-secreting allogeneic fibroblasts prolongs the survival of mice with melanoma. *Melanoma.Res.* **5**:217-227.
164. **Kimura, A., A. Israel, O. Le Bail, and P. Kourilsky.** 1986. Detailed analysis of the mouse H-2Kb promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* **44**:261-272.
165. **King, D.P. and P.P. Jones.** 1983. Induction of Ia and H-2 antigens on a macrophage cell line by immune interferon. *J.Immunol.* **131**:315-318.

166. **Kisselev, L., L. Frolova, and A.L. Haenni.** 1993. Interferon inducibility of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetase: new perspectives. *Trends.Biochem.Sci.* **18**:263-267.
167. **Klein, J.** 1991. Immunologie. VCH-Verlag, Weinheim.
168. **Knoflach, F., R.K. Reinscheid, O. Civelli, and J.A. Kemp.** 1996. Modulation of voltage-gated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons. *J.Neurosci.* **16**:6657-6664.
169. **Kohler, G. and C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
170. **Koken, M.H., D.F. Puvion, M.C. Guillemin, A. Viron, C.G. Linares, N. Stuurman, J.L. de, C. Szosteki, F. Calvo, C. Chomienne, and a. et.** 1994. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J.* **13**:1073-1083.
171. **Kucherlapati, R., S.P. Hwang, N. Shimizu, J.K. McDougall, and M.R. Botchan.** 1978. Another chromosomal assignment for a simian virus 40 integration site in human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **75**:4460-4464.
172. **Kurzrock, R., M. Talpaz, H. Kantarjian, R. Walters, S. Saks, J.M. Trujillo, and J.U. Gutterman.** 1987. Therapy of chronic myelogenous leukemia with recombinant interferon-gamma. *Blood* **70**:943-947.
173. **Kuznetsov, S.A. and V.I. Gelfand.** 1986. Bovine brain kinesin is a microtubule-activated ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83**:8530-8534.
174. **Kwon, N.S., C.F. Nathan, and D.J. Stuehr.** 1989. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J.Biol.Chem.* **264**:20496-20501.
175. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys. Methods* **10**:203-209.
176. **Lachowicz, J.E., Y. Shen, F.J.J. Monsma, and D.R. Sibley.** 1995. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J.Neurochem.* **64**:34-40.
177. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
178. **Lafuse, W.P., D. Brown, L. Castle, and B.S. Zwilling.** 1995. Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein. *J.Leukoc.Biol.* **57**:477-483.
179. **Lah, T.T., M. Hawley, K.L. Rock, and A.L. Goldberg.** 1995. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett.* **363**:85-89.
180. **Landschulz, W.H., P.F. Johnson, and S.L. McKnight.** 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**:1759-1764.
181. **Lebrun, S.J., R.L. Shpall, and L. Naumovski.** 1998. Interferon-induced upregulation and cytoplasmic localization of Myc-interacting protein Nmi. *J.Interferon.Cytokine.Res.* **18**:767-771.
182. **Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney, and H. Boedtke.** 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**:4743-4751.
183. **Lemmel, E.M., D. Brackertz, M. Franke, W. Gaus, P.W. Hartl, K. Machalke, H. Mielke, H.J. Obert, H.H. Peter, and J. Sieper.** 1988. Results of a multicenter placebo-controlled double-blind randomized phase III clinical study of treatment of rheumatoid arthritis with recombinant interferon-gamma. *Rheumatol.Int.* **8**:87-93.
184. **Levite, M., L. Cahalon, R. Hershkoviz, L. Steinman, and O. Lider.** 1998. Neuropeptides, via specific receptors, regulate T cell adhesion to fibronectin. *J.Immunol.* **160**:993-1000.
185. **Lew, D.J., T. Decker, I. Strehlow, and J.E. Darnell.** 1991. Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol.Cell Biol.* **11**:182-191.
186. **Liang, P. and T.H. MacRae.** 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **110**:1431-1440.

187. **Liao, J. and M.B. Omary.** 1996. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J.Cell Biol.* **133**:345-357.
188. **Lichter, T., R.P. Glick, T.S. Kim, R. Hand, and E.P. Cohen.** 1995. Prolonged survival of mice with glioma injected intracerebrally with double cytokine-secreting cells. *J.Neurosurg.* **83**:1038-1044.
189. **Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro.** 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int.J.Cancer* **17**:62-70.
190. **Liu, Y. and C.E. Samuel.** 1996. Mechanism of interferon action: functionally distinct RNA-binding and catalytic domains in the interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J.Virol.* **70**:1961-1968.
191. **Lopker, A., L.G. Aboud, W. Hoss, and F.J. Lionetti.** 1980. Stereoselective muscarinic acetylcholine and opiate receptors in human phagocytic leukocytes. *Biochem.Pharmacol.* **29**:1361-1365.
192. **Lundberg, K.S., D.D. Shoemaker, M.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge, and E.J. Mathur.** 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**:1-6.
193. **Lutsch, G., J. Stahl, H.J. Kargel, F. Noll, and H. Bielka.** 1990. Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver. *Eur.J.Cell Biol.* **51**:140-150.
194. **Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith.** 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu.Rev.Immunol.* **14**:301-331.
195. **Madden, J.J., W.L. Whaley, and D. Ketelsen.** 1998. Opiate binding sites in the cellular immune system: expression and regulation. *J.Neuroimmunol.* **83**:57-62.
196. **Maina, C.V., P.D. Riggs, A.G. Grandea, B.E. Slatko, L.S. Moran, J.A. Tagliamonte, L.A. McReynolds, and C.D. Guan.** 1988. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**:365-373.
197. **Mandler, R.N., W.E. Biddison, R. Mandler, and S.A. Serrate.** 1986. beta-Endorphin augments the cytolytic activity and interferon production of natural killer cells. *J.Immunol.* **136**:934-939.
198. **Marshall, C.J.** 1993. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* **259**:1865-1866.
199. **Mathews, P.M., C.J. Froelich, W.L.J. Sibbitt, and A.D. Bankhurst.** 1983. Enhancement of natural cytotoxicity by beta-endorphin. *J.Immunol.* **130**:1658-1662.
200. **Matlashewski, G., L. Banks, D. Pim, and L. Crawford.** 1986. Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells. *Eur.J.Biochem.* **154**:665-672.
201. **Matthes, H., E.P. Seward, B. Kieffer, and R.A. North.** 1996. Functional selectivity of orphanin FQ for its receptor coexpressed with potassium channel subunits in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol.Pharmacol.* **50**:447-450.
202. **Matthias, P., M.M. Muller, E. Schreiber, S. Rusconi, and W. Schaffner.** 1989. Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. *Nucleic.Acids.Res.* **17**:6418
203. **McCormick, F., B.F. Clark, T.F. la Cour, M. Kjeldgaard, L. Norskov-Lauritsen, and J. Nyborg.** 1985. A model for the tertiary structure of p21, the product of the ras oncogene. *Science* **230**:78-82.
204. **McDonell, M.W., M.N. Simon, and F.W. Studier.** 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J.Mol.Biol.* **110**:119-146.
205. **Messlinger, K.** 1997. [What is a nociceptor?]. *Anaesthesist.* **46**:142-153.
206. **Meunier, J.C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J.L. Butour, J.C. Guillemot, P. Ferrara, B. Monsarrat, and a. et.** 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**:532-535.

207. **Midgley, C.A., C.J. Fisher, J. Bartek, B. Vojtesek, D. Lane, and D.M. Barnes.** 1992. Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in *Escherichia coli*. *J.Cell Sci.* **101**:183-189.
208. **Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**:231-238.
209. **Miltenyi, S. and E. Pflüger.** 1991. High Gradient Magnetic Cell Sorting. *In* Radbruch Flow Cytometry and Cell Sorting. Springer Verlag; Berlin; pp.141-152.
210. **Min, W., J.S. Pober, and D.R. Johnson.** 1996. Kinetically coordinated induction of TAP1 and HLA class I by IFN-gamma: the rapid induction of TAP1 by IFN-gamma is mediated by Stat1 alpha. *J.Immunol.* **156**:3174-3183.
211. **Minami, T., E. Okuda-Ashitaka, Y. Nishiuchi, T. Kimura, S. Tachibana, H. Mori, and S. Ito.** 1998. Anti-nociceptive responses produced by human putative counterpart of nocistatin. *Br.J.Pharmacol.* **124**:1016-1018.
212. **Mogil, J.S., J.E. Grisel, R.K. Reinscheid, O. Civelli, J.K. Belknap, and D.K. Grandy.** 1996. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience* **75**:333-337.
213. **Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler.** 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**:11-24.
214. **Moll, U.M., M. LaQuaglia, J. Benard, and G. Riou.** 1995. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:4407-4411.
215. **Moll, U.M., A.G. Ostermeyer, R. Haladay, B. Winkfield, M. Frazier, and G. Zambetti.** 1996. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol.Cell Biol.* **16**:1126-1137.
216. **Mollereau, C., M. Parmentier, P. Mailleux, J.L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart, and J.C. Meunier.** 1994. ORL 1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* **341**:33-38.
217. **Mollereau, C., M.J. Simons, P. Soularue, F. Liners, G. Vassart, J.C. Meunier, and M. Parmentier.** 1996. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:8666-8670.
218. **Morris, S.M.J. and T.R. Billiar.** 1994. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am.J.Physiol.* **266**:E829-E839
219. **Nagano, Y. and Y. Kojima.** 1958. Inhibition de l'infection vaccinale par le virus homologue. *C.R.Soc.Biol.* **152**:1627-1629.
220. **Nakayama, M., K. Nagata, and A. Ishihama.** 1992. Enzymatic properties of the mouse Mx1 protein-associated GTPase. *Virus Res.* **22**:227-234.
221. **Nakayama, M., K. Nagata, A. Kato, and A. Ishihama.** 1991. Interferon-inducible mouse Mx1 protein that confers resistance to influenza virus is GTPase. *J.Biol.Chem.* **266**:21404-21408.
222. **Nantais, D.E., M. Schwemmle, J.T. Stickney, D.J. Vestal, and J.E. Buss.** 1996. Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J.Leukoc.Biol.* **60**:423-431.
223. **Nathan, C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**:3051-3064.
224. **Neun, R., M.F. Richter, P. Staeheli, and M. Schwemmle.** 1996. GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* **390**:69-72.
225. **Newman, C.M. and A.I. Magee.** 1993. Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1155**:79-96.
226. **Niman, H.L., R.A. Houghten, L.E. Walker, R.A. Reisfeld, I.A. Wilson, J.M. Hogle, and R.A. Lerner.** 1983. Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* **80**:4949-4953.

227. **Nishi, M., H. Takeshima, M. Mori, K. Nakagawara, and T. Takeuchi.** 1994. Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse kappa-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **205**:1353-1357.
228. **Nothacker, H.P., R.K. Reinscheid, A. Mansour, R.A. Henningsen, A. Ardati, J. Monsma-FJ, S.J. Watson, and O. Civelli.** 1996. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:8677-8682.
229. **O'Shea, E.K., J.D. Klemm, P.S. Kim, and T. Alber.** 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**:539-544.
230. **Obar, R.A., C.A. Collins, J.A. Hammarback, H.S. Shpetner, and R.B. Vallee.** 1990. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* **347**:256-261.
231. **Okuda-Ashitaka, E., T. Minami, S. Tachibana, Y. Yoshihara, Y. Nishiuchi, T. Kimura, and S. Ito.** 1998. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature* **392**:286-289.
232. **Omary, M.B., G.T. Baxter, C.F. Chou, C.L. Riopel, W.Y. Lin, and B. Strulovici.** 1992. PKC epsilon-related kinase associates with and phosphorylates cytokeratin 8 and 18. *J.Cell Biol.* **117**:583-593.
233. **Orkin, S.H.** 1989. Molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Annu.Rev.Immunol.* **7**: 277-307.
234. **Ostermeyer, A.G., E. Runko, B. Winkfield, B. Ahn, and U.M. Moll.** 1996. Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:15190-15194.
235. **Ozzello, L., C.M. de Rosa, K. Cantell, H.L. Kauppinen, and D.V.S. Habif.** 1995. Regression of human breast cancer xenografts in response to intralesional treatment with interferons alpha and gamma potentiated by tumor necrosis factor. *J.Interferon.Cytokine.Res.* **15**:839-848.
236. **Pai, E.F., W. Kabsch, U. Krengel, K.C. Holmes, J. John, and A. Wittinghofer.** 1989. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**:209-214.
237. **Paquette, R.L., M.R. Minosa, M.C. Verma, S.D. Nimer, and H.P. Koeffler.** 1995. An interferon-gamma activation sequence mediates the transcriptional regulation of the IgG Fc receptor type IC gene by interferon-gamma. *Mol.Immunol.* **32**:841-851.
238. **Paulnock, D.M.** 1992. Macrophage activation by T cells. *Curr.Opin.Immunol.* **4**:344-349.
239. **Pelham, H.R. and R.J. Jackson.** 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur.J.Biochem.* **67**:247-256.
240. **Pellegrini, S. and I. Dusanter-Fourt.** 1997. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur.J.Biochem.* **248**:615-633.
241. **Peluso, J., K.S. LaForge, H.W. Matthes, M.J. Kreek, B.L. Kieffer, and C. Gaveriaux-Ruff.** 1998. Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J.Neuroimmunol.* **81**:184-192.
242. **Pertoft, H., T.C. Laurent, T. Laas, and L. Kagedal.** 1978. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal.Biochem.* **88**:271-282.
243. **Pertoft, H., B. Warmegard, and M. Hook.** 1978. Heterogeneity of lysosomes originating from rat liver parenchymal cells. Metabolic relationship of subpopulations separated by density-gradient centrifugation. *Biochem.J.* **174**:309-317.
244. **Pestka, S., J.A. Langer, K.C. Zoon, and C.E. Samuel.** 1987. Interferons and their actions. *Annu.Rev.Biochem.* **56**:727-777.
245. **Pfeffer, S.R., A.B. Dirac-Svejstrup, and T. Soldati.** 1995. Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *J.Biol.Chem.* **270**:17057-17059.
246. **Pfefferkorn, E.R.** 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**:908-912.

247. **Pheiffer, B.H. and S.B. Zimmerman.** 1983. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic.Acids.Res.* **11**:7853-7871.
248. **Pine, R., T. Decker, D.S. Kessler, D.E. Levy, and J.E.J. Darnell.** 1990. Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol.Cell Biol.* **10**:2448-2457.
249. **Pitossi, F., A. Blank, A. Schroder, A. Schwarz, P. Hussi, M. Schwemmle, J. Pavlovic, and P. Staeheli.** 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J.Virol.* **67**:6726-6732.
250. **Pomidor, M.M., K.K. Ruhl, P. Zheng, Y. Song, O.A. Janne, R.S. Tuan, and N.J. Hickok.** 1995. Relationship between ornithine decarboxylase and cytoskeletal organization in cultured human keratinocytes: cellular responses to phorbol esters, cytochalasins, and alpha-difluoromethylornithine. *Exp.Cell Res.* **221**:426-437.
251. **Porath, J. and P. Flodin.** 1959. Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature* **183**:1657-1659.
252. **Promega.** 1996. Technical Manual: Rabbit Reticulocyte Lysate System
253. **Psyrembel, W.** 1990. Psyrembel Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter; Berlin.
254. **Puchtler, H. and S.N. Meloan.** 1985. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* **82**:201-204.
255. **Puck, T.T., P.I. Marcus, and S.J. Cieciura.** 1956. Clonal growth of mammalian cells in vitro. *J.Exp.Med.* **103**:273-2844.
256. **Pulvertaft, R.V.** 1966. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancett.* **1**:238-240.
257. **Radbruch, A.** 1992. Flow Cytometry and Cell Sorting. Springer Verlag; Berlin.
258. **Reinscheid, R.K., H.P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R.A. Henningsen, J.R. Bunzow, D.K. Grandy, H. Langen, J. Monsma-FJ, and O. Civelli.** 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270**:792-794.
259. **Rennison, M.E., S.E. Handel, C.J. Wilde, and R.D. Burgoyne.** 1992. Investigation of the role of microtubules in protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells. *J.Cell Sci.* **102**:239-247.
260. **Ridgway, N.D., P.A. Dawson, Y.K. Ho, M.S. Brown, and J.L. Goldstein.** 1992. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J.Cell Biol.* **116**:307-319.
261. **Rossi, G.C., L. Leventhal, and G.W. Pasternak.** 1996. Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice. *Eur.J.Pharmacol.* **311**:R7-R8
262. **Rossi, R. and O. Johansson.** 1998. Cutaneous innervation and the role of neuronal peptides in cutaneous inflammation: a minireview. *Eur.J.Dermatol.* **8**:299-306.
263. **Roth, J., M. Bendayan, E. Carlemalm, W. Villiger, and M. Garavito.** 1981. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J.Histochem.Cytochem.* **29**:663-671.
264. **Sahagian, G.G. and E.F. Neufeld.** 1983. Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* **258**:7121-7128.
265. **Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
266. **Salinovich, O. and R.C. Montelaro.** 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal.Biochem.* **156**:341-347.
267. **Sander, B., J. Andersson, and U. Andersson.** 1991. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol.Rev.* **119**:65-93.
268. **Sanger, F., A.R. Coulson, B.G. Barrell, A.J. Smith, and B.A. Roe.** 1980. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J.Mol.Biol.* **143**:161-178.

269. **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**:5463-5467.
270. **Schaap et al.** 1987. Chemical and enzymatic triggering of 1.2-dioxetanes. 1:Aryl esterase-catalyzed chemiluminescence from a naphthyl-acetate substituted dioxetane. *TetrahedronLett.* **28**:935-938.
271. **Scheffner, M., B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine, and P.M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-1136.
272. **Schulze, G.C., C. Boker, S.K. Nadimpalli, F.K. von, and R.A. Hille.** 1993. Tail-specific antibodies that block return of 46,000 M(r) mannose 6-phosphate receptor to the trans-Golgi network. *J.Cell Biol.* **122**:541-551.
273. **Schwarz, E., U.K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, and H.H. zur.** 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**:111-114.
274. **Schwemmle, M., B. Kaspers, A. Irion, P. Staeheli, and U. Schultz.** 1996. Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J.Biol.Chem.* **271**:10304-10308.
275. **Schwemmle, M. and P. Staeheli.** 1994. The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J.Biol.Chem.* **269**:11299-11305.
276. **Sears, L.E., L.S. Moran, C. Kissinger, T. Creasey, H. Perry-O'Keefe, M. Roskey, E. Sutherland, and B.E. Slatko.** 1992. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**:626-633.
277. **Sechler, J.M., H.L. Malech, C.J. White, and J.I. Gallin.** 1988. Recombinant human interferon-gamma reconstitutes defective phagocyte function in patients with chronic granulomatous disease of childhood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**:4874-4878.
278. **Sharp, B.M., S. Roy, and J.M. Bidlack.** 1998. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J.Neuroimmunol.* **83**:45-56.
279. **Shigekawa, K. and W.J. Dower.** 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**:742-751.
280. **Shinjo, K., J.G. Koland, M.J. Hart, V. Narasimhan, D.I. Johnson, T. Evans, and R.A. Cerione.** 1990. Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**:9853-9857.
281. **Short, J.M., J.M. Fernandez, J.A. Sorge, and W.D. Huse.** 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic.Acids.Res.* **16**:7583-7600.
282. **Sibley, L.D., S.G. Franzblau, and J.L. Krahenbuhl.** 1987. Intracellular fate of Mycobacterium leprae in normal and activated mouse macrophages. *Infect.Immun.* **55**:680-685.
283. **Sibley, L.D., E. Weidner, and J.L. Krahenbuhl.** 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii. *Nature* **315**:416-419.
284. **Singer, D.S. and J.E. Maguire.** 1990. Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit.Rev.Immunol.* **10**:235-257.
285. **Singh, H., N. Derwas, and A. Poulos.** 1987. Very long chain fatty acid beta-oxidation by subcellular fractions of normal and Zellweger syndrome skin fibroblasts. *Arch.Biochem. Biophys.* **257**:302-314.
286. **Smith, T.M., M.K. Lee, C.I. Szabo, N. Jerome, M. McEuen, M. Taylor, L. Hood, and M.C. King.** 1996. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res.* **6**:1029-1049.
287. **Snapper, C.M. and W.E. Paul.** 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**:944-947.

288. **Snapper, C.M., F. Rosas, M.A. Moorman, L. Jin, K. Shanebeck, D.M. Klinman, M.R. Kehry, J.J. Mond, and C.R. Maliszewski.** 1996. IFN-gamma is a potent inducer of Ig secretion by sort-purified murine B cells activated through the mIg, but not the CD40, signaling pathway. *Int.Immunol.* **8**:877-885.
289. **Sorace, J.M., R.J. Johnson, D.L. Howard, and B.E. Drysdale.** 1995. Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J.Leukoc.Biol.* **58**:477-484.
290. **Southern, E.** 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* **68**:152-176.
291. **Staeheli, P., M. Prochazka, P.A. Steigmeier, and O. Haller.** 1984. Genetic control of interferon action: mouse strain distribution and inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology* **137**:135-142.
292. **Stefano, G.B., B. Scharrer, E.M. Smith, T.K.J. Hughes, H.I. Magazine, T.V. Bilfinger, A.R. Hartman, G.L. Fricchione, Y. Liu, and M.H. Makman.** 1996. Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit.Rev.Immunol.* **16**:109-144.
293. **Strehlow, I., D. Seegert, C. Frick, F.C. Bange, C. Schindler, E.C. Böttger, and T. Decker.** 1993. The gene encoding IFP 53/tryptophanyl-tRNA synthetase is regulated by the gamma-interferon activation factor. *J.Biol.Chem.* **268**:16590-16595.
294. **Sundstrom, C. and K. Nilsson.** 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int.J.Cancer* **17**:565-577.
295. **Takano, E., M. Maki, H. Mori, M. Hatanaka, T. Marti, K. Titani, R. Kannagi, T. Ooi, and T. Murachi.** 1988. Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **27**:1964-1972.
296. **Tanaka, H. and C.E. Samuel.** 1994. Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:7995-7999.
297. **Taub, D.D., T.K. Eisenstein, E.B. Geller, M.W. Adler, and T.J. Rogers.** 1991. Immunomodulatory activity of mu- and kappa-selective opioid agonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:360-364.
298. **Taylor, G.A., M. Jeffers, D.A. Largaespada, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, and G.V. Woude.** 1996. Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J.Biol.Chem.* **271**:20399-20405.
299. **Taylor, G.A., R. Stauber, S. Rulong, E. Hudson, V. Pei, G.N. Pavlakis, J.H. Resau, and W.G. Vande.** 1997. The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J.Biol.Chem.* **272**:10639-10645.
300. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**:4350-4354.
301. **Traub, P. and R.L. Shoeman.** 1994. Intermediate filament and related proteins: potential activators of nucleosomes during transcription initiation and elongation? *Bioessays* **16**:349-355.
302. **Trowbridge, I.S. and M.B. Omary.** 1981. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **78**:3039-3043.
303. **Trowsdale, J., I. Hanson, I. Mockridge, S. Beck, A. Townsend, and A. Kelly.** 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* **348**:741-744.
304. **Troyanovsky, S.M., R.E. Leube, and W.W. Franke.** 1992. Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern. *Eur.J.Cell Biol.* **59**:127-137.
305. **Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada.** 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int.J.Cancer* **26**:171-176.
306. **Ullrich, A., J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W.J. Rutter, and H.M. Goodman.** 1977. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**:1313-1319.

307. **Unanue, E.R.** 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu.Rev.Immunol.* **2**:395-428.
308. **van Epps, D.E. and L. Saland.** 1984. Beta-endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis. *J.Immunol.* **132**:3046-3053.
309. **Vaughan, C.W. and M.J. Christie.** 1996. Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones. *Br.J.Pharmacol.* **117**:1609-1611.
- 309b. **Vaux, C. and S.D. Fuller.** 1991. The use of antiidiotype antibodies for the characterization of protein-protein interactions. *Methods Cell Biol.* **34**:1-38.
310. **Vestal, D.J., J.E. Buss, G.S. Kelner, D. Maciejewski, V.K. Asundi, and R.A. Maki.** 1996. Rat p67 GBP is induced by interferon-gamma and isoprenoid-modified in macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **224**:528-534.
311. **Vieira, J. and J. Messing.** 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**:3-11.
312. **Vogel, U. and E.C. Böttger.** 1995. Control of cytokeratin 17 expression by interferon gamma. *Immunobiology* **193**:322-327.
313. **Vogel, U., B. Denecke, S.M. Troyanovsky, R.E. Leube, and E.C. Böttger.** 1995. Transcriptional activation of psoriasis-associated cytokeratin K17 by interferon-gamma. Analysis of gamma-interferon activation sites. *Eur.J.Biochem.* **227**:143-149.
314. **Vojtesek, B., J. Bartek, C.A. Midgley, and D.P. Lane.** 1992. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J.Immunol.Methods* **151**:237-244.
315. **Vrana, K.E., S.J. Walker, P. Rucker, and X. Liu.** 1994. A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation. *J.Neurochem.* **63** :2014-2020.
316. **Wadzinski, B.E., B.J. Eisfelder, L.F.J. Peruski, M.C. Mumby, and G.L. Johnson.** 1992. NH2-terminal modification of the phosphatase 2A catalytic subunit allows functional expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **267**:16883-16888.
317. **Wanamarta, A.H., J. van Rijn, L.E. Blank, J. Haveman, N. van Zandwijk, and H. Joenje.** 1989. Effect of N-acetylcysteine on the antiproliferative action of X-rays or bleomycin in cultured human lung tumor cells. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **115**:340-344.
318. **Wang, J.B., P.S. Johnson, Y. Imai, A.M. Persico, B.A. Ozenberger, C.M. Eppler, and G.R. Uhl.** 1994. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* **348**:75-79.
319. **Wang, X., L.M. Johansen, H.J. Tae, and E.J. Taparowsky.** 1996. IFP 35 forms complexes with B-ATF, a member of the AP1 family of transcription factors. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **229**:316-322.
320. **Wenner, C.A., M.L. Guler, S.E. Macatonia, A. O'Garra, and K.M. Murphy.** 1996. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J.Immunol.* **156**:1442-1447.
321. **Whitehead, T.P., L.J. Kricka, T.J. Carter, and G.H. Thorpe.** 1979. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin.Chem.* **25**:1531-1546.
322. **Wick, M.J., S.R. Minnerath, S. Roy, S. Ramakrishnan, and H.H. Loh.** 1995. Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **32**:342-347.
323. **Williams, B.R. and S.J. Haque.** 1997. Interacting pathways of interferon signaling. *Semin.Oncol.* **24**:S9-S9
324. **Wilson, C.M.** 1983. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* **91**:236-247.
325. **Wojcik, C., D. Schroeter, S. Wilk, J. Lamprecht, and N. Paweletz.** 1996. Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Eur.J.Cell Biol.* **71**:311-318.

326. **Wright, K.L., L.C. White, A. Kelly, S. Beck, J. Trowsdale, and J.P. Ting.** 1995. Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J.Exp.Med.* **181**:1459-1471.
327. **Wulf, E., A. Deboen, F.A. Bautz, H. Faulstich, and T. Wieland.** 1979. Fluorescent phallo-toxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**:4498-4502.
328. **Wybran, J., T. Appelboom, J.P. Famaey, and A. Govaerts.** 1979. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J.Immunol.* **123**:1068-1070.
329. **Xie, Q.W., R. Whisnant, and C. Nathan.** 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* **177**:1779-1784.
330. **Xu, X.J., J.X. Hao, and Z. Wiesenfeld-Hallin.** 1996. Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport.* **7**:2092-2094.
331. **Xue, H. and J.T. Wong.** 1995. Interferon induction of human tryptophanyl-tRNA synthetase safeguards the synthesis of tryptophan-rich immune-system proteins: a hypothesis. *Gene* **165**:335-339.
332. **Yanish-Perron, C., Viera, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains; nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-199.
333. **York, I.A. and K.L. Rock.** 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* **14**:369-396.
334. **Zhang, S. and L. Yu.** 1995. Identification of dynorphins as endogenous ligands for an opioid receptor-like orphan receptor. *J.Biol.Chem.* **270**:22772-22776.
335. **Zieve, G.W., D. Turnbull, J.M. Mullins, and J.R. McIntosh.** 1980. Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp.Cell Res.* **126**:397-405.
336. **Zijlstra, J.G., E.G. de Vries, and N.H. Mulder.** 1987. Multifactorial drug resistance in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line. *Cancer Res.* **47**:1780-1784.
337. **Zimmerman, S.B. and B.H. Pfeiffer.** 1983. Macromolecular crowding allows blunt-end ligation by DNA ligases from rat liver or *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **80**:5852-5856.

Verzeichnis eigener Publikationen

Originalpublikationen

A. Meyerdierks, B. Denecke, M. Rohde, E.J. Taparowsky and E.C. Böttger. *A cytoplasmic structure resembling large protein aggregates induced by interferons*. J. Histochem. Cytochem.; im Druck.

B. Denecke, **A. Meyerdierks** and E.C. Böttger. *RGS1 is expressed in monocytes and acts as a GTPase activation protein for G-protein coupled chemoattractant receptors*. Zur Publikation eingereicht.

A. Meyerdierks, B. Denecke, K. Adermann, I. Zellmann and E.C. Böttger. *Human GBP-3: Cloning, expression, and characterization of a novel human guanylate-binding protein*. Manuskript in Vorbereitung.

X. Zhou, J. Liao, **A. Meyerdierks**, E. C. Böttger and M.B. Omary. *Interferon-regulated association of IFP35 with human Keratin 19*. Manuskript in Vorbereitung.

Poster:

- | | | |
|-----------|------|---|
| Oktober | 1995 | 47. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
B. Denecke, A. Meyerdierks and E.C. Böttger
„Generation of a subtracted library highly enriched for IFN-gamma induced cDNAs from human macrophage cell lines“
Immunität und Infektion 23 Suppl. 1 (1995) 45. |
| September | 1996 | 27th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Hamburg
A. Meyerdierks , B. Denecke, M. Rohde and E.C. Böttger
„An interferon-induced protein demonstrates an unusual pattern of cytoplasmic structure“
Immunobiology 196 (1996) 75 |
| September | 1996 | 27th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Hamburg
B. Denecke, A. Meyerdierks , P. Bank and E.C. Böttger
„Isolation of new IFN- γ -induced genes from human macrophage cell lines using a subtracted library highly enriched for IFN- γ -induced cDNAs“
Immunobiology 196 (1996) 59 |
| Mai | 1997 | 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, Miami, USA
A. Meyerdierks , B. Denecke, M. Rohde and E.C. Böttger
„A unique cytoplasmic structure induced by interferons“ |
| September | 1997 | 28th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Würzburg
B. Denecke, A. Meyerdierks , P. Bank, C. Schoemperlen, M. Berger, and E.C. Böttger
„Differentiation of macrophages: characterization of a novel protein expressed in macrophages after treatment with 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)“
Immunobiology 197 (1997) 185-186 |
| Dezember | 1998 | General Meeting of the American Society for Cell Biology, San Franzisko, USA
X. Zhou, J. Liao, A. Meyerdierks , E.C. Böttger and M.B. Omary
„Interferon-regulated association of IFP35 with human Keratin 19“ |

Lebenslauf

Name Anke Meyerdierks
Geburtsdatum 17. November 1968
Geburtsort Osterholz-Scharmbeck
Wohnort Steinbruchstraße 21A
30629 Hannover
Familienstand ledig

Schulische Ausbildung, Studium und Berufstätigkeit

1975-1979 Grundschule Lilienthal-Trupermoor
1979-1981 Orientierungsstufe Lilienthal
1981-1988 Gymnasium Lilienthal
Mai 1988 Abitur (Leistungsfächer: Mathematik und Biologie)
*Oktober 1988-
April 1994* Hochschulstudium der Biologie an der Technischen Hochschule Darmstadt: Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie. Note: sehr gut
Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. Dencher mit dem Thema: „Regulation der Transkription der E6- und E7-Gene des Humanen Papillomvirus Typ 16 durch Katecholamine“. Bewertung: sehr gut
seit Januar 1995 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Hochschule Hannover.
Anfertigung der Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Böttger mit dem Thema: „Charakterisierung Interferon-gamma-induzierter Gene: Interferon-induzierbares Protein 35, Nociceptin/Orphanin FQ und humanes Guanylat-bindendes Protein 3“

Danksagungen

Herrn **Prof. Dr. D. Bitter-Suermann** (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können.

Herrn **Prof. Dr. G.-F. Gerlach** (Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover) danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn **Prof. Dr. E.C. Böttger** (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die stets gesicherte Finanzierung und besonders für die engagierte wissenschaftliche Betreuung in den letzten Jahren. Ihm verdanke ich viele neue Kenntnisse und Fähigkeiten.

Den **Angehörigen der Arbeitsgruppe** danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau **I. Zellmann** und Frau **M. Berger**, deren technische Assistenz maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat; ohne sie wären viele Ergebnisse nicht zustande gekommen. Herrn **Dr. B. Denecke** danke ich für die Herstellung der subtrahierten Genbank und seine stete Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Am Institut für medizinische Mikrobiologie möchte ich mich besonders bei Frau **Dr. M. Mühlenhoff** für die Einführung in den Umgang mit dem FPLC-System bedanken. Frau **B. Brenneke** danke ich für die Bestimmung der Antikörpersubklasse des monoklonalen Antikörpers IEB5IIA12 und Frau **I. Hoppe** danke ich für die Unterstützung bei der Ascitesproduktion. Für die Durchführung der Arbeiten am konfokalen Laser Scan Mikroskop sowie am Elektronenmikroskop, die Bereitstellung von Antikörpern und fachliche Beratung gilt mein besonderer Dank Herrn **Dr. M. Rohde** (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig). Herrn **Dr. K. Adermann** (Institut für Peptidforschung, Hannover) danke ich für die Synthese der Peptide. Herrn **Dr. U. Vogel** danke ich für die Einführung in mein Arbeitsgebiet und die Unterstützung bei der Immunisierung. Frau **W. Baars** danke ich für die stets freundliche, ausgeglichene und hilfsbereite Art mit der sie alle meine Fragen beantwortete und die Messung meiner „FACS-Proben“ durchführte.

Für die Bereitstellung von Antikörpern, Plasmidkonstrukten und Zelllinien danke ich Herrn **Dr. E.G. Berger** (Universität Zürich, Schweiz), Herrn **Dr. K. v. Figura** (Universität Göttingen), Herrn **Dr. E. Fusenig** (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg), **Dr. Goppelt-Strübe** (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) Herrn **Dr. K. Grandy** (Vollum Institute Portland, Oregon, USA), Herrn **Dr. S. L. Gupta** (Hipple Cancer Research Center, Dayton, Ohio, USA), Herrn **Dr. L. Naumovski** (Stanford Medical Center, Stanford, Kalifornien, USA), Herrn **Dr. J. Scheper** (Universität Amsterdam, Niederlande), Herrn **Dr. R. Schwinzer** (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover), Herrn **Dr. J. Stahl** (Max-Delbrück-Centrum, Berlin), Herrn **Dr. I. Steinmetz** (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover), Frau **Dr. E.J. Taparowsky** (Purdue Universität, West Lafayette, Indiana, USA), Herrn **Dr. P. v. Wussow** (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover).

Frau **K. Ravenschlag** danke ich für die Isolierung des hGBP-3-Partialklons aus der subtrahierten Genbank, ihr Beharren darauf, daß der Klon eine weitere Bearbeitung verdient, und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für finanzielle Unterstützung und liebevollen Rückhalt in arbeitsreicher Zeit sowie dafür, daß sie mich in meinen beruflichen Entscheidungen immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel, sowie sie herangezogenen Hilfsleistungen Dritter vollständig angegeben habe. Weiterhin erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, den 11. Oktober 1998

(Anke Meyerdierks)