

Molekulare Charakterisierung und funktionelle Analyse der Interferon-induzierten 47 kDa GTPase IIGP

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Frank Kaiser

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
Institut für Biotechnologie
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Stahl
Berichter: Prof. Dr. R. Lauster
Berichter: Prof. Dr. S.H.E. Kaufmann (MPI-IB, Berlin)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 5. Oktober 2004

Berlin 2005
D 83

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2000 bis zum Oktober 2003 am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (MPI-IB) in der Abteilung Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan H.E. Kaufmann und der Betreuung von Dr. Jens Zerrahn durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster
Technische Universität Berlin
Fakultät III - Prozesswissenschaften
Institut für Biotechnologie (Medizinische Biotechnologie)
Straße des 17. Juni
D-10623 Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan H. E. Kaufmann
Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
Schumannstr. 21/22
Campus Charité Mitte
D-10117 Berlin

Danksagung

Ich danke von ganzem Herzen meinem Betreuer Dr. Jens Zerrahn, ohne dessen Unterstützung und Hilfe die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich bedanke mich für seine vielen Ideen, wertvollen Anregungen und konstruktiven Vorschläge, die mich fortwährend und insbesondere nach Rückschlägen im Labor motivierten. Ich danke ihm für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, für seine unendliche Geduld mit mir und seine (oft von „hanseatischem Charme“ geprägten) Bemühungen, aus mir einen eigenverantwortlichen Wissenschaftler zu machen. „*May the force be with you, too !*“. Danke für alles !

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan H.E. Kaufmann für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung für Immunologie am MPI für Infektionsbiologie anzufertigen. Ich danke ihm für seine unermüdlichen Anstrengungen, entgegen den zunehmend schwierigen wirtschaftlichen und politischen Umständen für seine MitarbeiterInnen optimale Arbeitsbedingungen zu schaffen und mir zu ermöglichen, mit außerordentlichen Freiheiten an einem faszinierenden Forschungsthema zu arbeiten. Ich schätze es sehr, dass er ein unvergleichlich anregendes und kompetentes wissenschaftliches Umfeld geschaffen hat, in dem ich meine Arbeit anfertigen konnte.

Bei beiden möchte ich mich ganz besonders für ihr Verständnis und ihre Toleranz bedanken, die sie mir während der schwierigen Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit entgegengebracht haben.

Ein riesengroßes Dankeschön möchte ich unseren herzensguten „Labor-Mädels“ Ute Gühlich, Jessica Bigott und Sandra Leitner aussprechen. Sie haben mit ihrer Kollegialität, Hilfsbereitschaft und tatkräftiger Unterstützung ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, und zudem mit ihrem (manchmal ungewolltem !) Humor eine wunderbar angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen, die ich sehr vermisse. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir sehr viel Spaß gemacht. Danke !

Ich danke allen MitarbeiterInnen der Abteilung Kaufmann für ihre Hilfsbereitschaft und für die exzellente, inspirierende und motivierende Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Helen Collins und Dr. Ulrich Schaible für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen bedanken, die diese Arbeit maßgeblich vorangetrieben haben. Ihr Enthusiasmus hat wesentlich dazu beigetragen, mich nachhaltig für die Forschung zu begeistern. Bedanken möchte ich mich auch für die Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft von Dr. Bärbel Raupach, Dr. Hans-Willi Mittrücker, Dr. Peter Seiler, Dr. Ulrich Steinhoff und Dr. Sabine Daugelat. Dr. Amanda Ozin danke ich für ihre Hilfe mit der englischen Korrespondenz. Für viele kleine und große Gefallen möchte ich mich ganz herzlich bei Isa, Manuela Stäber,

Marion Herma, Jana Enders, Christine Hagens, Nicole Kurth, Jane Kowall, Sabine Jörg, Mike Stein sowie unseren „zwei Besten“ Monika Krabowski und Christa Höhne bedanken.

Weiterhin danke ich den Leitern der Mikroskopie-, Proteinreinigung- und Microarray-Zentralabteilungen Dr. Volker Brinkmann, Dr. Robert Hurwitz und Dr. Hans Mollenkopf, sowie ihren MitarbeiterInnen Beatrix Fauler und Frank Siejak für ihre freundliche Hilfsbereitschaft. Vielen Dank an Ina Wagner und Dr. Martin Meixner (HU) für die vielen DNA-Sequenzierungen. Ein großes Dankeschön geht ebenso an die zahlreichen MitarbeiterInnen der Tierhaltung, EDV, Administration und Technik (insbesondere Uschi Herbst für die zahlreichen Crashkurse wie „Formulare für Anfänger“) sowie an Souraya Sibaei und Gabi Roetzer aus dem Sekretariat, die mir alle bei vielen (nicht wissenschaftlichen) Problemen immer lebenswürdig weiterhalfen.

Ich danke Prof. Dr. Oliver Liesenfeld (FU Berlin) und seinen ArbeitskollegInnen für die großzügige technische und fachliche Unterstützung. Prof. Dr. Roland Lauster (TU Berlin) danke ich für die freundliche Bereitschaft, als Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen vielen FreundInnen in Berlin, die oft recht ungewollt die Höhen und Tiefen meiner Forschungsarbeit miterleben mussten. Ich habe ihnen, insbesondere Linde und Hans, viele angenehme, aufmunternde und Trost spendende Stunden außerhalb des Instituts zu verdanken. Für viele schöne und zuweilen schillernde Kontraste zum Laborleben danke ich vor allem Schubber-Kerstin und dem Fräulein Steffi (die mit dem roten Farbband) sowie den vielen anderen bizarren Gestalten aus dem Kuriositäten-Kabinett der aha, des SchwuZ, von Ajpnia und den Teufelsbergern, die ich ins Herz geschlossen habe.

Meinen Eltern, deren Geduld ich so lange auf die Probe stellen musste, danke ich dafür, dass sie mir immer die Freiheit ließen, meinen Forschungsinteressen ungehemmt nachzugehen, und mich dabei stets auf vielfältige Weise unterstützten. Großes Dankeschön !

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Andi für seine Freundschaft und Fürsorge und dafür, dass er schon seit vielen Jahren mein Abenteuer Forschung so liebevoll unterstützt und tapfer erträgt. Merci !

*„Meine Lieben, es waren wunderschöne Jahre, ich kann es nicht anders sagen ...
und ich danke, danke ganz herzlich !“*

frei nach Georgette Dee, Schillertheater Berlin 1992

Euer Franky

Inhaltsverzeichnis

	Danksagung	I
	Inhaltsverzeichnis	III
	Abkürzungen	VIII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung und Überblick	1
1.2	Die Regulation der angeborenen Immunantwort durch Interferone	5
1.3	Zellautonome Resistenzprogramme innerhalb der IFN-Immunantwort	9
1.4	Die Interferon-induzierten 47 kDa GTPasen sind essentielle Komponenten der zellautonomen Resistenz	13
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit und methodische Herangehensweise	20
2	MATERIAL	21
2.1	Geräte	21
2.2	Chemikalien	21
2.3	Enzyme und Zytokine	23
2.4	Antikörper und polyklonale Seren	24
2.5	„Kits“	24
2.6	Größenstandards	25
2.7	Lösungen und Puffer	25
2.8	Sonstige Verbrauchsmaterialien	29

2.9	Nährmedien	30
2.9.1	Bakterienmedien	30
2.9.2	Hefemedien	31
2.9.3	Zellkulturmedien	32
2.10	Y2H cDNA-Genbibliotheken	32
2.11	Synthetische Oligonukleotide	32
2.11.1	Amplifikation / Klonierung	32
2.11.2	Vektormodifikation	34
2.11.3	Mutagenese	34
2.11.4	Sequenzierung	34
2.11.5	Plasmide / Vektoren	35
2.11.5.1	Subklonierung	35
2.11.5.2	Yeast-Two-Hybrid-Vektoren	35
2.11.5.3	Prokaryontische Expressionsvektoren	35
2.11.5.4	Eukaryontische Expressionsvektoren	35
2.12	Organismen	36
2.12.1	<i>E. coli</i> -Stämme	36
2.12.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	36
2.12.3	Zelllinien	36
2.12.4	Mäuse	36
2.12.5	Erreger	37
2.13	Elektronische Auswertung und verwendete Software	37
3	METHODEN	38
3.1	Mikrobiologische Methoden	38
3.1.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E.coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	38
3.1.2	Herstellung und Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten (RuCl ₂) <i>E. coli</i>	38
3.1.3	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i>	39
3.1.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	39
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab aus <i>E. coli</i>	40
3.2.2	Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab aus <i>E. coli</i>	40
3.2.3	Plasmid-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i>	41
3.2.4	DNA Konzentrationsbestimmung	41
3.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	41
3.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	42
3.2.7	Enzymatische Modifikation von DNA	42
3.2.7.1	DNA-Restriktionsverdau	42

3.2.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	42
3.2.7.3	Auffüllreaktion von 5'-überstehenden DNA-Enden	42
3.2.7.4	Entfernung von 3'-überstehenden DNA-Enden	43
3.2.7.5	Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.9	DNA-Sequenzierung	44
3.3	Biochemische Methoden	44
3.3.1	Präparation von Protein-Gesamtzelllysaten	44
3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	45
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.3.4	Coomassie-Färbung	45
3.3.5	Immunoblot (Western-Blot)	45
3.3.6	Ko-Immunpräzipitation	46
3.3.7	Zellfraktionierung	46
3.4	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	47
3.5	Methoden der Yeast-Two-Hybrid-Analyse	48
3.5.1	Grundkonzept der Y2H-Analysen	48
3.5.2	Amplifikation der cDNA-Bibliothek	51
3.5.3	Analysen zur <i>bait</i> -Eignung	52
3.5.4	Analyse der cDNA-Genbibliothek („Screen“)	53
3.5.5	Phänotyp-Validierung	54
3.5.6	Analyse der <i>prey</i> -kodierenden Plasmide	55
3.5.7	Rekonstitutionstransformation zur Phänotyp-Validierung	55
3.5.8	Quantitative Bestimmung der <i>lacZ</i> -Genreporteraktivität	55
3.6	Tierexperimente	56
3.6.1	Präparation primärer Knochenmarksmakrophagen	56
3.6.2	Präparation von <i>Toxoplasma gondii</i>	57
3.6.3	Protein-Immunisierung	57
3.7	Zellkultur	57
3.7.1	<i>In-vitro</i> -Infektionen	58
3.8	Mikroskopie	58
3.8.1	Fluoreszenz- und Konfokale Mikroskopie	58
3.8.2	Elektronenmikroskopie	59

4	ERGEBNISSE	60
4.1	Identifikation von Protein-Interaktionspartnern für 47 kDa GTPasen mit Yeast-Two-Hybrid-Analysen	60
4.1.1	Eignung der 47 kDa GTPasen	61
4.1.2	Eignung der cDNA-Genbibliotheken	65
4.1.3	Y2H-Vorversuche mit 47 kDa GTPasen	65
4.2	Identifikation und Charakterisierung von IIGP-Interaktionspartnern	67
4.2.1	Y2H-Analysen mit der GTPase IIGP	67
4.2.2	Die 47 kDa GTPase IIGP interagiert mit dem Maus-Homolog von hook3	71
4.2.3	Die GTPase-negative IIGP-Mutante S83N interagiert nicht mit mHk3	73
4.2.4	Innerhalb der 47 kDa GTPase-Familie interagiert ausschließlich IIGP mit mHk3	75
4.2.5	Bestimmung der für die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 relevanten Proteinbereiche	75
4.2.6	Bestätigung der Interaktion zwischen IIGP und mHk3 <i>in-vivo</i>	79
4.2.7	Subzelluläre Lokalisation von IIGP und mHk3	81
4.2.8	Für die Assoziation von IIGP mit dem Golgi-Apparat ist ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk erforderlich	86
4.3	Charakterisierung von IIGP in Überexpressionsstudien	89
4.3.1	Ektopisch exprimiertes IIGP bildet perinukleäre Aggregate	89
4.3.2	Charakterisierung der IIGP-Aggregate	91
4.3.3	Die Ausbildung der IIGP-assoziierten Strukturen repräsentiert keine klassische Aggresomenbildung	93
4.3.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der von ektopisch exprimiertem IIGP gebildeten Aggregate	99
4.3.5	Analyse der Membranassoziation von IIGP und IIGP[S83N]	102
4.3.6	Einfluss von IFN- γ auf die von ektopischem IIGP gebildeten Strukturen	103
4.3.7	Die ektopische Expression von IIGP führt zur Ausbildung von IGTP-Aggregaten	109
4.3.8	Die 47 kDa GTPasen interagieren im Y2H-System miteinander	111
4.4	Identifizierung von Interaktionspartnern für weitere Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen mit dem Y2H-System	113
4.5	Das Verhalten von IIGP in einem <i>in-vitro</i>-Modell für <i>Toxoplasma gondii</i>-Infektionen	116
4.5.1	Veränderung der subzellulären Lokalisation von IIGP in <i>T. gondii</i> infizierten Zellen	117
4.6	Ausblick: Expression und Reinigung rekombinanter 47 kDa GTPasen zur Immunisierung	120

5	DISKUSSION	122
5.1	Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnisse dieser Arbeit	122
5.2	Die Interaktionen der 47 kDa GTPasen im Y2H-System	124
5.3	Die 47 kDa GTPase IIGP interagiert mit dem CLIP-Molekül mHk3	132
5.3.1	Die hook Proteine als neue Mitglieder der CLIP-Molekülgruppe	132
5.3.2	Die humane hook Proteinfamilie	133
5.3.3	Das hook Protein in <i>Drosophila melanogaster</i>	134
5.3.4	Die Interaktion zwischen IIGP und dem mHk3 Protein der Maus	134
5.3.5	Mögliche Einflußnahme von membranassoziiertem IIGP auf die Infektionsstrategien intrazellulärer Erreger	138
5.4	Alternative Modelle für die molekularen Wirkungsweisen der 47 kDa GTPasen	141
5.4.1	Die Interaktion zwischen IIGP und p125	142
5.4.2	Die Interaktion zwischen GTPI und VAP33	143
5.4.3	Die Interaktion zwischen IIGP und arc20	145
5.4.4	Die Interaktion zwischen GTPI und PTP1B	148
5.5	Charakterisierung der von IIGP ausgebildeten intrazellulären Proteinaggregate	149
6	ZUSAMMENFASSUNG	157
7	LITERATURVERZEICHNIS	159
	Lebenslauf	181
	Eidesstattliche Erklärungen	184
	Reprint der Veröffentlichung	185
	Anhang	

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
Ak	Antikörper
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATG	Startcodon der Translation
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	Klonanzahl (engl.: colony forming unit)
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithioerytrol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-Zellsortierung (engl: fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (engl: fetal calf serum)
g	Erdbeschleunigung in m/s^2
g	Gramm
h	Stunde (engl: hour)
HRP	engl: horse-radish peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactoside
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl: multiple cloning site)
M-CSF	Makrophagen-Wachstumsfaktor (engl: macrophage-colony-stimulating factor)

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
m/v	Masse pro Volumen (Gewichtsprozent)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Verhältnis Erreger:Zielzelle (engl: multiplicity of infection)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger RNA)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (engl: open reading frame)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Hefe-Selektions- bzw. Mangelmedium (engl.:synthetic dropout)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
U	enzymatische Einheit (engl: unit)
Upm	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslationierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Y2H	Yeast-Two-Hybrid

Übernommene englische Terminologie

bait	„Köderprotein“
prey	„Beuteprotein“
Yeast-Two-Hybrid	“Protein-Hybrid-Interaktionsanalyse in Hefe”

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Gluthaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen der Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1 Einleitung

1.1 Einführung und Überblick

Im Laufe der Evolution hat sich die Immunabwehr zu einem komplexen System entwickelt, das mit unterschiedlichsten Mechanismen den mehrzelligen Organismus wirkungsvoll vor Infektionen schützt. Das hoch entwickelte Immunsystem der Wirbeltiere, das primär auf die Abwehr von Krankheitserregern ausgerichtet ist, lässt sich dabei prinzipiell in angeborene Komponenten, deren Effektormechanismen immer vorhanden sind, und die erworbene, adaptive Immunantwort unterteilen, die erst durch den Kontakt mit einem spezifischen Antigen generiert wird (Janeway, 2001).

Innerhalb der Immunologie fand die adaptive Immunantwort für lange Zeit besondere Beachtung, da diese von B- und T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort klonal und hochspezifisch erfolgt, durch eine „Gedächtnis“-Funktion für die Antigene von erfolgreich abgewehrten Erregern lang anhaltend wirkt, und deren umfassendes Verständnis die Grundlage für die Etablierung wirksamer Schutzimpfungen ist.

Forschungsarbeiten jüngerer Zeit belegen jedoch nachdrücklich, dass es im besonderen Maße die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems sind, die einen erfolgreichen Schutz des Wirtsorganismus vor Krankheitserregern sicherstellen. Die angeborene Immunantwort erfolgt unmittelbar nach dem Eindringen von Erregern in den Wirtsorganismus und dient vorrangig dazu, die Erreger bereits zu einem möglichst frühen Zeitpunkt an der Eintrittspforte einzugrenzen und dem Organismus die Infektion schnellstmöglich zu signalisieren. Ohne die Komponenten der angeborenen Immunantwort, also allein durch die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems im späteren Infektionsverlauf, schlägt eine sterile Eliminierung von Erregern meist fehl.

Zu den Haupteffektorzellen der angeborenen Immunantwort zählen vorrangig neutrophile Granulozyten in der frühen Infektionsphase und Makrophagen im fortschreitenden Infektionsverlauf (Kaufmann, 1999). Beide Zelltypen können eingedrungene Erreger phagozytieren und abtöten. Virusinfizierte Zellen werden direkt durch die von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte Zellyse eliminiert, wodurch die Vermehrung der Viren gehemmt wird. Die zellulär vermittelte Abwehr

wird in infizierten Geweben zusätzlich durch lösliche Komponenten wie Defensine und Collectine unterstützt. Gegen Mikroben, die den Abwehrmechanismen am primären Infektionsherd entgehen, wirken weiterhin Plasmaproteine wie natürliche Antikörper sowie das Komplementsystem, um eine systemische Ausbreitung der Erreger im Wirtsorganismus möglichst zu unterbinden.

Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems verfügen nicht über die Möglichkeit des adaptiven Immunsystems, die in den extrazellulären Raum des Wirtsorganismus eingedrungenen Erreger über Oberflächenrezeptoren antigenspezifisch zu erkennen. Die phylogenetisch am frühesten entstandene Immunabwehr verfügt jedoch über ein genetisch determiniertes Repertoire von Rezeptoren wie den „f-Met-Leu-Phe“-Rezeptor, den Mannose-Rezeptor, den „Scavenger Rezeptoren“ und die Familie der „Toll-Like-Rezeptoren“ (TLR), die unterschiedliche Erregerklassen anhand derer distinkten Komponenten spezifisch detektieren können (Girardin et al., 2002). Trotz der fehlenden Antigenspezifität ermöglichen diese Rezeptoren eine effektive Diskriminierung zwischen wirts-„eigenen“ Zellen und den in den Wirtsorganismus eingedrungenen, „fremden“ Mikroben.

Effektorzellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) haben nicht nur essentielle direkte Abwehrfunktionen, sondern repräsentieren als Antigen-präsentierende Zellen auch die Schnittstelle zum adaptiven Immunsystem, indem sie Antigene prozessieren und sie in Assoziation mit den Molekülen des „Major Histocompatibility Complexes“ (MHC) gegenüber T-Lymphozyten präsentieren. Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion werden von den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α), Interleukin-12 (IL-12) sowie die Interferone (IFN) des Typs I (hauptsächlich IFN- α und IFN- β) und Typs II (IFN- γ) sezerniert (siehe 1.2). Diese pleiotropen Zytokine wirken als Infektionssignal und aktivieren in Immunzellen des angeborenen Immunsystems neben der Phagozytose eine Vielzahl spezifischer und hocheffizienter Abwehrprogramme gegen Viren, Bakterien und Protozoen, aber auch gegen Tumore (siehe 1.3). Weiterhin initiieren sie die Rekrutierung von Leukozyten zum Infektionsherd, wodurch eine Entzündungsreaktion generiert wird. Ebenso kommen diesen früh produzierten Zytokinen essentielle immunregulatorische

Funktionen zu, indem sie entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der spezifischen humoralen (vornehmlich gegen extrazelluläre Erreger) und der zellulären Immunantwort (vorrangig gegen intrazelluläre Erreger) durch die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems nehmen.

Parallel zur Entwicklung einer effizienten Immunabwehr des Wirtsorganismus haben Erreger ihrerseits in einer Art Ko-Evolution effektive Mechanismen entwickelt, die die Immunabwehr des Wirtsorganismus unterlaufen. Als eine der effektivsten Strategie von Erregern, sich den zahlreichen Abwehrmechanismen im extrazellulären Milieu des Wirtsorganismus zu entziehen, lässt sich ihr fakultatives oder obligatorisches Eindringen in die Zellen des Wirtsorganismus ansehen (Kaufmann, 1993). Intrazellulär lebende Erreger verfügen über auch als Virulenzfaktoren bezeichnete Komponenten, die ihnen das Eindringen in nicht-phagozytierende Wirtszellen und den Verbleib in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten, beispielsweise dem endosomalen System oder dem Zytosol, ermöglichen. Dabei interferieren die Virulenzfaktoren auf molekularer Ebene mit den Signalwegen der Wirtszelle mit dem Ziel, die Infektion nicht nur gegenüber der infizierten Zelle selbst zu maskieren, sondern auch die Signalisierung der Infektion an extrazelluläre Immunabwehrkomponenten zu beeinträchtigen oder ganz auszuschalten (Hornet et al., 2002).

Zur Abwehr von Erregern, denen es gelingt, den zahlreichen Komponenten des angeborenen Immunsystems im extrazellulären Raum zu entgehen (Ismail et al., 2002) und in Wirtszellen einzudringen, verfügen somatische Zellen über ein individuelles und von extrazellulären Komponenten unabhängiges Repertoire an antiviralen, antimikrobiellen und antiparasitären Abwehrmechanismen (Kaufmann, 1999). Dieser zellautonome Infektionsschutz in nahezu jeder Körperzelle wird, ebenso wie die Effektormechanismen von Immunzellen, vorrangig durch Interferone induziert (Boehm et al., 1997). Damit kommt den Interferonen innerhalb der angeborenen Immunantwort eine essentielle Rolle zu.

Die Relevanz dieser zellautonomen Resistenzmechanismen für eine effektive und erfolgreiche Eliminierung einer Infektion wurde lange Zeit unterschätzt. Während viele Interferon-induzierte Effektormechanismen von phagozytierenden, „professionellen“ Immunzellen des angeborenen Immunsystems hinreichend charakterisiert sind, sind die

Interferon-regulierten Prozesse des zellautonomen Infektionsschutzes in somatischen Zellen nicht vollkommen verstanden. Es gibt verstärkt Hinweise darauf, dass fundamentale Funktionen dieser zellautonomen Resistenzprogramme gegen intrazelluläre Erreger von hochmolekularen Interferon-regulierten GTPasen vermittelt werden, zu denen die 65 kDa GTPasen (auch Guanin Binding Proteins, GBPs), die Mx-Proteine sowie die 47 kDa GTPasen gezählt werden (Taylor et al., 2004).

Besondere Aufmerksamkeit erlangte vor kurzem die Familie der 47 kDa GTPasen, deren Induktion zusammen mit der Familie der 65 kDa GTPasen innerhalb der zahlreichen Interferon-induzierten Gene sowohl in hämatopoetischen als auch in nicht-hämatopoetischen Zellen quantitativ dominiert (siehe 1.4). Mäuse mit gezielten Gen-Defekten für einzelne Mitglieder der 47 kDa GTPase Familie zeigen eine signifikant verringerte Resistenz gegenüber verschiedenen intrazellulären Krankheitserregern.

Die molekularen Funktionen der 47 kDa GTPasen und ihre Mechanismen, durch die sie Resistenzen gegenüber intrazellulären Erregern vermitteln, sind bisher ungeklärt. Im Rahmen ihrer katalytischen Aktivität unterliegen GTPasen generell einer signifikanten Konformationsveränderung, wodurch sie als molekulare Schalter und Regulatoren innerhalb unterschiedlichster fundamentaler zellulärer Prozesse wirken können (Vetter und Wittinghofer, 2001). Dementsprechend haben GTPasen entscheidenden Einfluss auf zahlreiche molekulare und zellphysiologische Aspekte der Immunantwort, wie z.B. der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Synthese und Translokation von Proteinen sowie der Signaltransduktion und des vesikulären Transports.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der molekularen Interaktionen der 47 kDa GTPasen, um Einblicke in ihre Wirkungsmechanismen und die beteiligten Prozesse zu erhalten, die ihrer fundamentalen Rolle innerhalb der angeborenen Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger zu Grunde liegen.

1.2 Die Regulation der angeborenen Immunantwort durch Interferone

Die Interferone gehören zu der Proteinklasse der Zytokine, unter denen man kleine, lösliche (Glyko-)Proteine versteht, die von verschiedenen Körperzellen sezerniert werden (Callard, 1994; Nathan und Sporn, 1991). Sie wirken nicht als direkte Effektormoleküle, sondern agieren als chemische Botenstoffe zwischen Zellen in autokriner oder parakriner Weise. Ihre antivirale Aktivität wurde ursprünglich vor mehr als 30 Jahren in den Medienüberständen von Virus-infizierten Fibroblastenkulturen (IFN- β : Isaacs und Lindenmann, 1957) bzw. von stimulierten Leukozytenkulturen (IFN- γ : Edelman und Wheelock, 1966) entdeckt. Zur Interferon-Familie werden inzwischen über 40 Mitglieder gezählt (Boehm et al., 1997; Bogdan, 2000), die man basierend auf ihrer Genstruktur, zellulären Produzenten, Rezeptorspezifität und ihrer biologischen Effektorfunktionen in zwei unterschiedliche Klassen unterteilt. Zu den Typ I Interferonen zählt man neben IFN- α (auch als „Leukozyten-Interferon“ bezeichnet) und IFN- β („Fibroblasten-Interferon“) eine Vielzahl weiterer strukturell untereinander verwandter Mitglieder wie IFN- δ , IFN- ω und IFN- τ (Hauptmann und Swetly, 1985; Lefevre et al., 1998; Martal et al., 1998). Dagegen wird die Klasse der Typ II Interferone lediglich von dem auch als „Immun-Interferon“ bezeichnete IFN- γ repräsentiert (Callard, 1994).

Typ I Interferone können von nahezu jeder viral infizierten Körperzelle produziert werden (Goodbourn et al., 2000), wobei die Synthese einem komplexem, oft zelltypspezifischem regulatorischem Transkriptionsnetzwerk unterliegt (Taniguchi et al., 2001). An die in das Zytoplasma eingedrungenen genomischen doppelsträngigen RNA-Strukturen des Virus bindet zunächst die konstitutiv exprimierte (und innerhalb eines autokrinen Mechanismus durch IFN Typ I induzierbare) Serin-Threonin-Kinase (PKR) (Jacobs und Langland, 1996). Über PKR wird der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, der nach seiner Rekrutierung in den Nukleus mit den Mitgliedern der IRF-Transkriptionsfaktorfamilie (Interferon Regulatory Factors; u.a. IRF-1, IRF-3, IRF-7, IRF-9) einen Multiproteinkomplex ausbildet, der an die IFN- β Promotoren bindet und die Transkription von IFN- β induziert (Chu et al., 1999; Israel, 2000; Lenardo et al., 1989). Die genaue Zusammensetzung dieser Transkriptionskomplexe

sowie ihre Regulierung wird noch kontrovers diskutiert (Reis et al., 1992; Sato et al., 1998; Wathélet et al., 1998). Innerhalb des komplexen transkriptionellen Netzwerks existieren positive Rückkopplungsmechanismen, die eine volle und anhaltende IFN- β Induktion bewirken und in Fibroblasten auch zur Transkription von IFN- α -Genen führen (Erlandsson et al., 1998; Harada et al., 1996), deren Promotor keine NF κ B-Bindungsstelle besitzen (MacDonald et al., 1990; Pitha et al., 1998).

Im Gegensatz zu den Typ I Interferonen wird IFN- γ ausschließlich von Immunzellen synthetisiert. Zu den Hauptproduzenten gehören Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), T-Helfer (T_H) Zellen des T_H1-Typs (inflammatorische CD4⁺ T-Zellen) und aktivierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Boehm et al., 1997). Auch Makrophagen (Munder et al., 1998), B-Zellen (Yoshimoto et al., 1997) und CD8 α ⁺ Dendritische Zellen (Ohteki et al., 1999) können IFN- γ produzieren. Während T-Zellen durch den antigenspezifischen Kontakt ihres T-Zell Rezeptorkomplexes mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aktiviert und zur IFN- γ -Produktion angeregt werden (Ullman et al., 1990; Young, 1996), wird die IFN- γ -Synthese in NK-Zellen, B-Zellen und Makrophagen antigen-unabhängig durch pro-inflammatorische Makrophagenzytokine wie IL-12, IL-18 und TNF- α induziert. Weitere wichtige Komponenten dieses Netzwerkes sind IL-1, IL-2 sowie IFN- α , die bei der Induktion von IFN- γ als Ko-Stimulatoren wirken können (Bancroft et al., 1987; Nakanishi et al., 2001). Makrophagen und NK-Zellen verfügen zudem über einen positiven autokrinen Rückkopplungsmechanismus für die IFN- γ Expression (Cockfield et al., 1993; Di Marzio et al., 1994; Hardy und Sawada, 1989).

Ihre biologische Aktivität in den Zielzellen vermitteln die Interferone nach Bindung an die Interferon-Rezeptoren, die zwar ubiquitär, jedoch unterschiedlich stark auf der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden (Farrar und Schreiber, 1993; Valente et al., 1992). Obwohl Typ I und Typ II Interferone strukturell nicht miteinander verwandt sind und auch ihre Oberflächenrezeptoren divergieren (Farrar und Schreiber, 1993), teilen sich die Signaltransduktionswege beider Interferonklassen gemeinsame Schlüsselkomponenten der „JAK-STAT“-Transduktionsmaschinerie, den die meisten Zytokin-Rezeptoren zur Signalweiterleitung nutzen (Darnell et al., 1994; Imada und Leonard, 2000; Schindler, 1999). Das Prinzip dieses Signalweges liegt in der kaskadischen Aktivierung von „Janus Kinasen“ (JAKs) und der „Signal Transducers

und „Activators of Transcription“ (STATs), die nach ihrer Aktivierung durch Phosphorylierung von den intrazellulären Domänen der Rezeptorkomplexe dissoziieren und nach ihrer Rekrutierung in den Nukleus durch Bindung an spezifische Promotoren die Transkription von Zielgenen initiieren. Innerhalb des Signaltransduktionswegs der Typ I Interferone assoziieren aktiviertes STAT1 und STAT2 mit IRF-9 und wandern als heterotrimerer Komplex (ISGF-3) in den Zellkern, wo er durch Bindung an ISRE-Sequenzmotive („Interferon Stimulated Response Elements“) im Promotorbereich die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen initiiert (Darnell et al., 1994). In der IFN- γ Signaltransduktionskaskade bilden die phosphorylierten STAT1 Proteine als GAF („Gamma Interferon Activation Factor“) bezeichnete Homodimere, die in den Nukleus transportiert werden, wo sie durch die Bindung an die GAS-Promotorelemente („Gamma Interferon Activation Sites“) die Transkription von IFN- γ regulierten Genen initiieren (Decker et al., 1997). Neben diesen ubiquitären zentralen IFN-Signaltransduktionswegen existieren weitere alternative Mechanismen der Signalweiterleitung, die oft zelltyp- und speziesspezifisch erfolgen und der zellulären IFN-Antwort eine bislang nicht vollständig verstandene Komplexität verleihen (Taniguchi et al., 2001). Die physiologische Relevanz dieser alternativen Signaltransduktionswege, die im Falle von IFN- γ weniger komplex als bei Interferonen des Typ I ausfallen, ist überwiegend ungeklärt. Es besteht die Annahme, dass sie vermutlich nicht direkt an der Induktion von spezifischen Abwehrmechanismen beteiligt sind (Shimoda et al., 1996; Teglund et al., 1998), sondern vielmehr die IFN-Antwort modulieren und durch die oft beobachtete Inhibition des Zellwachstums und der Zellproliferation die Anzahl infizierter Zellen verringern, wodurch sie indirekt zur Infektionsabwehr beitragen können (Micouin et al., 2000; Platanias und Fish, 1999).

Als zelluläre Antwort auf Interferone bezeichnet man sowohl die positive als auch negative Regulation der Genexpression der Wirtszelle. Interferone des Typ I und Typ II induzieren zwar eindeutig unterscheidbare Signaltransduktionskaskaden, durch die Beteiligung identischer Transkriptionsfaktorenkomplexe entstehen allerdings Schnittstellen zwischen beiden Signalwegen. Dementsprechend entsteht eine einerseits spezifische, andererseits z.T. überlappende zelluläre Interferonantwort (de Veer et al., 2001; Der et al., 1998). Als primäre Antwort bezeichnet man die direkte

transkriptionelle Aktivierung von Genen durch die Transkriptionsfaktoren der Interferon-Signaltransduktionskaskade, entsprechend für Interferone des Typ I die Aktivierung der Gene mit GAS-Promoterelementen durch GAF und im Falle von Interferonen des Typ II der ISRE-enthaltenden Gene durch ISGF3 (Boehm et al., 1997). Daneben wird durch Interferone die Expression von bis zu weiteren 40 Transkriptionsfaktoren initiiert, die ihrerseits eine Vielzahl von Genen induzieren. Diese indirekte, von der *de-novo* Proteinbiosynthese von Transkriptionsfaktoren abhängige Geninduktion wird deshalb als sekundäre Interferonantwort bezeichnet (Taniguchi et al., 2001). Die Komplexität der zellulären Antworten auf Interferone kann zu einem großen Teil auf die Vielzahl der von ihnen regulierten Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden. Da sich die primären und sekundären Transkriptionsfaktoren bei der Genregulation oft überschneiden, lassen sich viele IFN-regulierte Gene nicht eindeutig als primär- oder sekundär-responsiv klassifizieren. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer gemischten Interferonantwort.

Die Zahl der durch Interferon Typ I regulierten Gene wird auf mindestens 500 pro Einzelzelle geschätzt und wird von der Zahl der IFN- γ regulierten Gene sogar übertroffen (Der et al., 1998; Wan et al., 1996). Der weitaus größte Teil der Interferon-vermittelten Gen-Aktivierung und -Inhibition erfolgt auf der Ebene der transkriptionellen Regulation. Daneben existieren zahlreiche post-transkriptionelle Regulationsmechanismen, deren molekulare Funktionsweisen bislang nur unzureichend charakterisiert sind (Condino-Neto und Newburger, 2000; Curiel et al., 1999; Mitchell et al., 1996).

1.3 Zellautonome Resistenzprogramme innerhalb der IFN-Immunantwort

Das durch Interferone induzierte und regulierte komplexe Transkriptionsnetzwerk resultiert in einer entsprechend vielfältigen funktionellen zellulären Antwort. Die zahlreichen physiologischen Veränderungen scheinen jedoch in ihrer Gesamtheit auf die Regulation des Immunsystems und die Kontrolle der Abwehr infektiöser Erreger ausgerichtet zu sein. Diese Annahme basiert auf der Untersuchung von Mäusen, deren Interferonrezeptor (Huang et al., 1993) bzw. essentielle Komponenten innerhalb von Interferon-Signaltransduktionswegen (Durbin et al., 1996; Park et al., 2000; Rodig et al., 1998) oder deren Interferon-Gene selbst (Cooper et al., 1993) durch genetische Mutation oder Deletion funktionell inaktiviert wurden. Diese für IFN-Antworten defizienten Tiere zeigen nur innerhalb des lymphatischen Systems Abnormalitäten (Dalton et al., 1993) und pathologische Effekte beschränken sich auf eine stark verminderte Resistenz gegenüber verschiedenen Krankheitserregern (van den Broek et al., 1995a).

Die von Interferonen induzierten zellulären Antworten lassen sich vier genetischen Hauptprogrammen zuordnen, die durch zahlreiche diverse Mechanismen kooperativ die Eliminierung von infektiösen Erregern ermöglichen (Boehm et al., 1997; Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993). Zu diesen Programmen zählt die Erreger-spezifische Modifikation der Immunantwort über die Regulation des Zytokinnetzwerks, die Aktivierung der Phagozytose in Makrophagen und Neutrophilen, die Verstärkung der Antigenpräsentation sowie die Induktion zellautonomer direkter Abwehrmechanismen.

Interferone des Typs I und II koordinieren die angeborene Immunantwort, indem sie maßgeblichen Einfluss auf die Funktionalität der Immunzellen nehmen und ihr komplexes Interaktionsnetzwerk modulieren. Durch sie wird die Proliferation, Differenzierung, Wanderung sowie die Zytokinproduktion von T- und B-Zellen gesteuert (Szabo et al., 1995), und in B-Zellen die Produktion bestimmter Antikörperisotypen induziert (Stark et al., 1998). Damit haben die Interferone einen direkten Einfluss auf die Etablierung der zellulären und humoralen Effektormechanismen. Die Stimulation von Makrophagen durch IFN- γ verstärkt die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose und aktiviert intrazelluläre Prozesse, die zur

Ansäuerung und Fusion des Phagosoms mit den Lysosomen zum Phagolysosoms führen (Warren und Vogel, 1985). Die quantitative und qualitative Steigerung der Antigenprozessierung korreliert mit der erhöhten Expression von MHC II (de Veer et al., 2001), wodurch die Präsentation der prozessierten Antigene gegenüber T-Zellen intensiviert wird. In Nicht-Immunzellen verstärken Typ I Interferone die Expression von MHC I und Zelladhäsionsmolekülen wie das „Intercellular Adhesion Molecule-1“ (ICAM-1) und begünstigen so die Rekrutierung von Immunzellen zu Infektionsherden und die Ausbildung von spezifischen T-Zellantworten (Stark et al., 1998).

Neben der Steuerung der Effektorfunktionen und der Koordination des Interaktionsnetzwerkes von Immunzellen induzieren Interferone auch in Nicht-Immunzellen Abwehrprogramme, die von extrazellulären Komponenten des Immunsystems unabhängig sind und direkt gegen Erreger wirken, die in Wirtszellen eingedrungen sind. Jede kernhaltige Körperzelle, unabhängig vom Zelltyp und Zelldifferenzierungszustand, verfügt über ein solches Repertoire an IFN-induzierbaren intrazellulären Immunabwehrmechanismen (Kaufmann, 1993). Die Überführung der Zelle in diesen „Abwehrmodus“ gegen virale sowie intrazelluläre bakterielle und parasitäre Erreger ist durch eine drastische Veränderung der Zellphysiologie gekennzeichnet.

Zu den am besten charakterisierten Komponenten der zellautonomen antiviralen Resistenzprogramme, die durch Interferone Typ I und Typ II induziert werden, gehören die „Protein Kinase R“ (PKR), das „2'-5' Oligoadenylate Synthetase“-System (2'-5' OAS), die „double stranded RNA specific Adenosin Deaminase“ (dsRAD) sowie die Mx-GTPasen, auf die in Abschnitt 1.4 genauer eingegangen wird. Diese Programme stellen essentielle, nicht-redundante Komponenten innerhalb der antiviralen Verteidigung von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen dar. PKR besitzt neben der in Abschnitt 1.2 beschriebenen Funktion als Signalmolekül einer viralen Infektion weitere wichtige direkte Effektorfunktionen von immunologischer Relevanz. Die immunologischen Defekte von PKR-defizienten Mäusen sind weit reichender als die von IFN- γ -defizienten Mäusen (Abraham et al., 1999; Yang et al., 1995). Der direkte antivirale Effekt von PKR beruht auf der Phosphorylierung der Translationsinitiationsfaktoren, was deren Recycling verhindert und schließlich zur

Inhibierung der mRNA-Translation führt (Clemens und Elia, 1997; Meurs et al., 1990). PKR trägt auch indirekt zur Beseitigung einer viralen Infektion bei, indem PKR in infizierten Zellen die Apoptose induziert (Der et al., 1997; Tan und Katze, 1999). Als Signal-transduzierende Kinase beeinflusst PKR weiterhin die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF κ B, IRF-1 und STAT1, die für die Induktion verschiedener antiviraler Abwehrkomponenten von Bedeutung sind (Kumar et al., 1997; Williams, 1999). Das antivirale 2'-5' OAS System besteht aus mehreren IFN-induzierbaren Proteinen, die durch dsRNA aktiviert werden und die Synthese von 2',5' verbundenen Oligoadenylaten aus ATP katalysieren. Durch die Anbindung dieser Moleküle an die inaktive, als Monomer vorliegende Endoribonuklease L (RNaseL) entsteht ein aktives RNaseL-Homodimer, das einzelsträngige RNA sowie ribosomale 28S RNA degradiert (Jordanov et al., 2000) und damit die virale Translation unterbindet (Rebouillat und Hovanessian, 1999). Als viraler Inhibitor wirkt weiterhin die IFN-induzierbare dsRAD, die in einem als RNA-Editierung bezeichneten Prozeß den Austausch von Adenosin zu Inosin in doppelsträngiger RNA katalysiert (Patterson et al., 1995; Polson et al., 1996). Diese Mutationen induzieren den Abbau der RNA durch eine Inosin-spezifische Ribonuklease und verhindern so die Synthese funktioneller viraler Proteine (Scadden und Smith, 1997).

Während in der zellautonomen antiviralen Immunantwort beide Interferon-Typen essentielle Funktionen ausüben, werden antibakterielle und antiparasitäre Effektormechanismen hauptsächlich durch Interferon- γ induziert (Goodbourn et al., 2000; Shtrichman und Samuel, 2001; van den Broek et al., 1995a; van den Broek et al., 1995b). Der molekulare Mechanismus dieser unterschiedlichen Einflussnahme liegt in der IFN Typ I abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes ISGF3, der vorrangig Gene der antiviralen Immunantwort reguliert, während die primär durch IFN- γ aktivierten STAT1-Dimere hauptsächlich antimikrobielle Effekte induzieren (Dupuis et al., 2001). Zwar können auch für Interferon-Typ I indirekte antimikrobielle Effekte nachgewiesen werden, diese spielen jedoch im Vergleich zu IFN- γ nur eine untergeordnete Rolle (Bogdan, 2000).

Zu den wichtigsten IFN- γ induzierten zellautonomen antimikrobiellen Effektorsystemen zählt die Generierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite sowie die

Expression der "Natural Resistance-Associated Macrophage Protein" (NRAMP) Familie. Die Aktivierung dieser Mechanismen erfolgt nicht als generelle, zelltypübergreifende Antwort auf IFN- γ , sondern zelltypspezifisch in professionellen phagozytierenden Immunzellen, den Makrophagen. Diese Beschränkung gilt besonders für die Produktion von freien Sauerstoffmetaboliten („Reactive Oxygen Intermediates“, ROIs) in Phagolysosomen durch den Multi-Enzymkomplex "NADPH-oxidase", auch als "Phagocyte Oxidase"-System (Phox) bezeichnet. Der Zusammenschluss der zahlreichen Einzelkomponenten zu dem funktionsfähigen Multi-Enzymkomplex Phox ist IFN- γ abhängig (Bogdan et al., 2000). Aus den freien Sauerstoffradikalen werden hochreaktive oxidierende Radikale gebildet, die für die phagozytierten Mikroben toxisch sind. Im Gegensatz zu ROIs können das toxische Stickoxid (NO) sowie hochreaktive Stickstoffmetabolite von verschiedenen Zelltypen durch die IFN- γ induzierbare "inducible Nitric Oxide Synthase" (iNOS) im Cytosol gebildet werden. Stickstoffradikale vermitteln nicht nur antimikrobielle Effekte, sondern besitzen auch eine spezifische antivirale Aktivität (Nathan, 1997). Ebenfalls nur in phagozytierenden Zellen wird das IFN- γ induzierte NRAMP1 Protein als integrales Membranprotein von Lysosomen exprimiert (Hackam et al., 1998). Nach phagozytotischer Aufnahme von Mikroben wird NRAMP1 zur Phagosomenmembran rekrutiert, wo es die Konzentration divalenter Kationen innerhalb der Phagosomen kontrolliert und so die intraphagosomale Replikation des Erregers inhibiert. Desweiteren ist NRAMP2 an der Regulation des Eisengehalts der Zelle beteiligt (Bellamy, 1999; Jabado et al., 2000), der Einfluss auf die Resistenz der Wirtszelle gegenüber intrazellulären Erregern nimmt und Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten ist (Collins et al., 2002; Schaible et al., 2002).

Die Infektionsabwehr von Mäusen, die lediglich für distinkte IFN- γ -vermittelte Resistenzmechanismen defizient sind (Hackam et al., 1998; Khabar et al., 2000), ist im Vergleich zu IFN- γ -Rezeptor defizienten Tieren, die über keinerlei IFN- γ -vermittelte Effektorfunktionen verfügen (Durbin et al., 1996; Huang et al., 1993), nur geringfügig beeinträchtigt. Es ist daher anzunehmen, dass neben den zuvor beschriebenen, gut charakterisierten IFN- γ -vermittelten Effektorfunktionen weitere, noch unbekannte IFN- γ -induzierbare Mechanismen existieren, die eine antimikrobielle und antiparasitäre

zellautonome Resistenz vermitteln (Hanson, 1991; Way et al., 1998). Als immunologisch relevante Faktoren der intrazellulären Resistenz werden in jüngeren Forschungsarbeiten in besonderem Maße die hochmolekularen, durch IFN-induzierbaren GTPasen diskutiert (siehe 1.4).

1.4 Die Interferon-induzierten 47 kDa GTPasen sind essentielle Komponenten der zellautonomen Resistenz

Expressionsanalysen von Genen, die differentiell durch Interferone reguliert werden, haben gezeigt, dass sowohl in hämatopoetischen (z.B. Makrophagen) als auch nicht-hämatopoetischen Zellen (z.B. Fibroblasten) die Transkription einer Guanylat-bindenden Proteinfamilie (GBP), die 47 kDa GTPasen, durch IFN- γ -Stimulation signifikant induziert wird. Bezüglich ihrer differentiellen Expression dominiert diese Proteinfamilie die zelluläre Interferonantwort, zusammen mit der ebenfalls IFN-induzierbaren, jedoch nicht mit den 47 kDa GTPasen sequenzverwandten Familie der 65 kDa GTPasen (Boehm et al., 1998). Von der 47 kDa GTPase Familie wurden bisher sechs Mitglieder in der Maus identifiziert. Zu ihnen zählen IGTP, GTPI, LRG-47, IRG-47, TGTP/Mg21 (Carlow et al., 1995; Gilly und Wall, 1992; Lafuse et al., 1995; Sorace et al., 1995; Taylor et al., 1996) sowie IIGP, das in unserem Labor mit der Methode der differentiellen Subtraktions-Hybridisierung als stark induziertes Gen während einer *L. monocytogenes*-Infektion identifiziert und kloniert wurde (Zerrahn et al., 2002). Genomische Studien geben Anlass zur Annahme, dass noch weitere, bisher nicht charakterisierte Mitglieder in der Maus existieren. Während in Invertebraten bislang keine Vertreter dieser Proteinfamilie identifiziert werden konnten, gibt es Hinweise, dass sequenzverwandte Gene in der Ratte, im Zebrafisch und im Menschen existieren (J.C. Howard, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung). Homologe Gene zu den 65 kDa GTPasen der Maus (mGBP1/mag-1 und mGBP2/mag-2) (Vestal et al., 1998) sind bereits in der Ratte (Asundi et al., 1994), im Huhn (Schwemmle et al., 1996) und im Menschen (Cheng et al., 1983; Strehlow et al., 1994) identifiziert worden. Auch für die durch IFN Typ I induzierbaren und nicht mit den 47 kDa GTPasen verwandten Mx-GTPasen Mx1 und Mx2 der Maus (Haller et al., 1998; Horisberger et al., 1983) ist

die Existenz von Homologen in verschiedenen Säugetieren, Vögeln und Fischen nachgewiesen worden, und auch die humanen Homologe (MxA/hGBP1 und MxB/hGBP2) sind bereits identifiziert und charakterisiert (Horisberger et al., 1990).

Die Mitglieder der 47 kDa GTPasen, deren Molekulargewicht zwischen 45 und 48 kDa variiert, werden konstitutiv nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Ihre Induktion erfolgt durch beide Interferon-Typen sowohl in professionellen Zellen des Immunsystems (wie Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen) als auch in Nicht-Immunzellen (wie Fibroblasten), wobei IFN- γ einen wesentlich stärkeren induktiven Effekt als Interferon-Typ I aufweist (Boehm et al., 1998; Sorace et al., 1995). Die Klassifizierung der 47 kDa GTPasen innerhalb der IFN-Antwort ist nicht einheitlich, so wurden verschiedene Mitglieder entweder der primären oder sekundären Interferonantwort zugewiesen (Boehm et al., 1998; Gilly et al., 1996) und als gemischte Antwortgene charakterisiert (Taylor et al., 1996). Dagegen ist die Induktion der murinen 65 kDa GTPasen strikt IFN- γ vermittelt und erfolgt vollständig als sekundäre Interferonantwort (Briken et al., 1995).

Die 47 kDa GTPasen zählen zu der GTPase Superfamilie, deren charakteristische Eigenschaft die Bindung und Hydrolyse von GTP ist (Vetter und Wittinghofer, 2001). Außer der konservierten „G-Domänen-Topologie“ zeigen die 47 kDa GTPasen keine weiteren Sequenzhomologien zu anderen GTPasen oder Proteinen (Boehm et al., 1998). Die auch als „GTPase-Domäne“ bezeichnete GTP-Bindungsdomäne besteht aus den drei kanonischen Sequenzmotiven G1 (G(X₄)GKS) (P-loop), G3 (D(X₂)G) und G4 ((N/T)(K/Q)XD) (Dever et al., 1987). Röntgenstrukturanalysen der kleinen GTPase p21^{ras} zeigten, dass durch das G1- und G3-Motiv die Interaktion mit den Phosphatgruppen der gebundenen Guaninnukleotide vermittelt wird, während das G4-Motiv mit dem Purinring von GTP interagiert und für die Spezifität der Guaninerkennung verantwortlich ist (Bourne, 1995; Bourne et al., 1990). Die Anbindung von GTP an die GTPasen ersetzt das zunächst mit ihnen assoziierte GDP, und nach der katalytischen Hydrolyse von GTP liegen die GTPasen erneut in ihrer GDP-gebundenen Form vor. Somit entsteht ein unidirektionaler Hydrolysezyklus, in dem die GTPasen zwischen GTP- und GDP-gebundenen Formen alternieren (Vetter und Wittinghofer, 2001). Mit der GDP/GTP-Bindung ist ein signifikanter Konformationswechsel verbunden, der die

Affinität der GTPasen zu anderen Makromolekülen verändert. Durch diese Eigenschaft können GTPasen als molekulare Schalter in unterschiedlichsten biochemischen Prozessen wirken. Der Austausch von GDP zu GTP aktiviert dabei die GTPasen, während die Hydrolyse von GTP zu GDP inaktivierend wirkt. Reguliert wird dieser Zyklus in vielen Fällen von "GTPase Activating Proteins" (GAPs), die die Hydrolyse von GTP zu GDP und somit die Inaktivierung beschleunigen, und von "Guanine Nucleotide Exchange Factors" (GEFs), die die Austauschrate von GDP zu GTP erhöhen und als Aktivatoren fungieren. Bezüglich ihrer Funktion als biologische Schalter sind die Affinitäten zu GDP bzw. GTP, die benötigte Zeit für ihre Bindung, sowie die Hydrolyserate kritische Faktoren für eine präzise koordinierte Interaktion mit anderen Molekülen (Bourne, 1995).

Anhand ihrer Primärstruktur lassen sich die 47 kDa GTPasen in zwei Subfamilien unterteilen, wobei bei den Mitgliedern IGTP, GTPI und LRG-47 die GKS Sequenz innerhalb des G1-Motivs durch GMS ersetzt ist (Boehm et al., 1998). Innerhalb des phylogenetischen Stammbaums steht die Familie der 47 kDa GTPasen in Nachbarschaft zu den ebenfalls IFN-induzierbaren, jedoch nicht sequenzverwandten 65 kDa GTPasen und Mx Proteinen (Abb. 1).

Trotz der sehr geringen Sequenzähnlichkeit zwischen den einzelnen IFN-induzierbaren GTPase-Familien wird aufgrund der bisher bekannten biochemischen und biologischen Charakteristika angenommen, dass sie sich alle zur Superfamilie der Dynamine zählen lassen (Praefcke und McMahon, 2004; Uthaiyah et al., 2003). Für die Mitglieder der 47 kDa GTPasen existieren bisher keine Röntgenstrukturdaten, die Einblick in ihre molekulare Funktionsweise ermöglichen würden. Eine funktionelle Verwandtschaft der 47 kDa GTPasen zu den anderen hochmolekularen GTPasen der Dynamin-Superfamilie (hGBP1, MxA, Dynamin) erscheint unter Berücksichtigung der vor kurzem publizierten biochemischen Charakterisierung von IIGP plausibel (Uthaiyah et al., 2003).

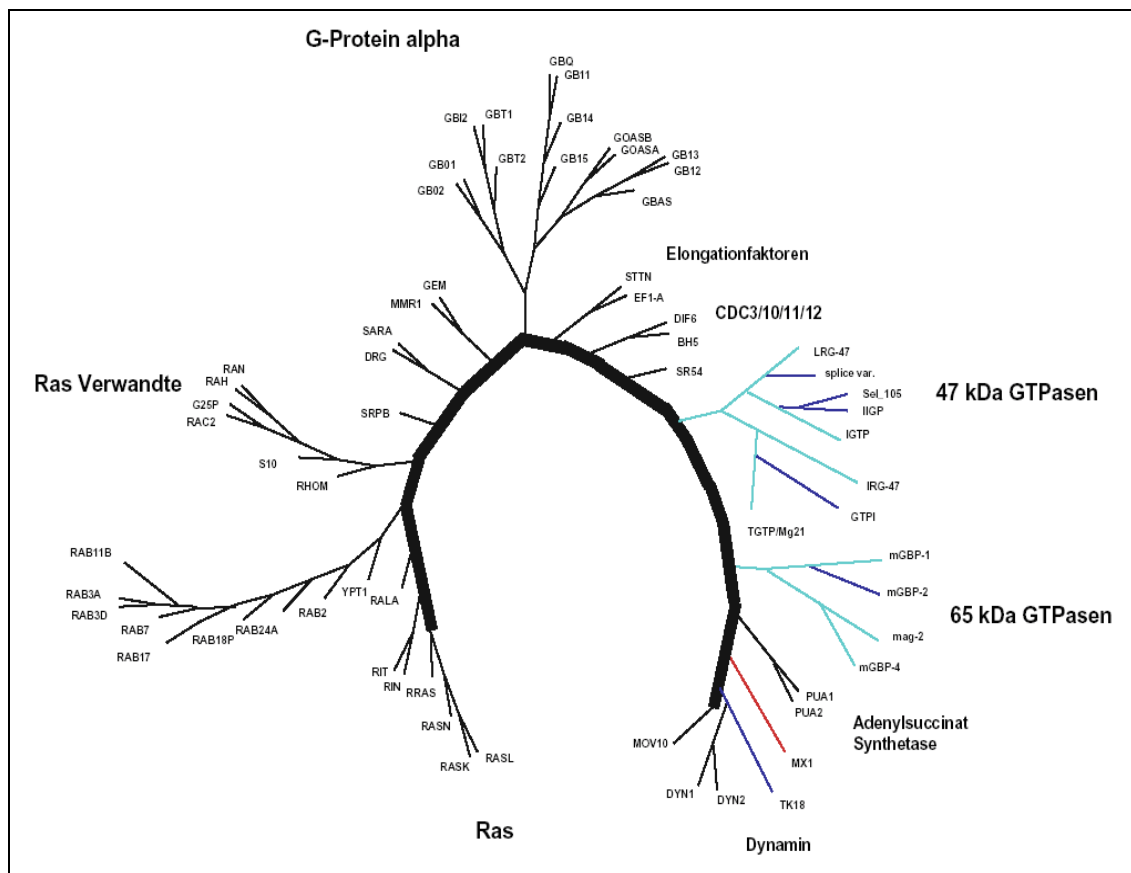


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von ausgewählten kleinen („klassischen“) und hochmolekularen, IFN-induzierbaren GTPasen (Boehm, Guethlein, Howard; Köln).

Die in intrazelluläre Resistenzmechanismen involvierten Familien der 47 kDa GTPasen, 65 kDa GTPasen und die Mx1-GTPase sind farblich hervorgehoben.

Die niedrige Bindungsaffinität von IIGP für Guanin-Nukleotide im mikromolaren K_D -Bereich ist eine charakteristische Eigenschaft dieser großen GTPasen (Binns et al., 2000; Schwemmle et al., 1995). Während kleine GTPasen wie $p21^{\text{Ras}}$ zur Steigerung ihrer Hydrolyseaktivität GAPs benötigen, besitzen die großen GTPasen MxA und Dynamin die Eigenschaft, nukleotidabhängig Homo-Oligomere oder Multimere zu bilden, womit eine als „kooperativ“ bezeichnete Hydrolyseaktivitätssteigerung verbunden ist (Eccleston et al., 2002; Kochs et al., 2002; Nakayama et al., 1993). Auch IIGP zeigt *in-vitro* mit steigender Proteinkonzentration diese erhöhte Aktivität, die mit der Ausbildung von IIGP-Homo-Oligomeren in Gegenwart von GTP korreliert (Uthaiyah et al., 2003). Im Gegensatz zu den anderen großen GTPasen, deren Affinität zu GTP

höher oder identisch mit der zu GDP ist, besitzt IIGP *in-vitro* jedoch eine höhere Affinität zu GDP.

Studien zur subzellulären Lokalisation geben Hinweise darauf, dass die 47 kDa GTPasen mit intrazellulären Membranen assoziiert sind, wobei bisher nur für IGTP und IIGP die Membranassoziation detailliert beschrieben wurde (Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002). Der überwiegende Anteil von exprimiertem IGTP ist mit der zytoplasmatischen Seite von ER-Membranen assoziiert, ein geringer Anteil befindet sich in globulären Strukturen in der Zellperipherie. Auch IIGP ist am ER lokalisiert, zeigt aber zusätzlich eine signifikante Assoziation mit dem Golgi-Apparat. Die Art und Weise der Bindung der 47 kDa GTPasen an die jeweiligen Organellenmembranen ist unbekannt. Keine der 47 kDa GTPasen besitzt ein Signalpeptid, eine hydrophobe potentielle Transmembrandomäne oder ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv (CaaX-Sequenz), das Proteine durch eine posttranslationale Bindung von Isoprenyl-Lipiden in Membranen verankern kann (Clarke, 1992). Dagegen ist die punktförmige zytoplasmatische Verteilung der 65 kDa GTPasen, die möglicherweise eine Vesikelassoziation reflektiert, in Maus- und Humanzellen auf die zelltypabhängige Isoprenylierung eines CaaX-Motivs zurückzuführen (Cheng et al., 1985; Schwemmle und Staeheli, 1994; Vestal et al., 2000). Es wurde postuliert, dass ein N-terminales Myristylierungsmotiv zumindest teilweise für die Assoziation mit Membranen erforderlich sein könnte, es existieren jedoch keine Daten, die diese Vermutung untermauern (R. Uthaiyah, Universität zu Köln, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird die Assoziation der 47 kDa GTPasen mit intrazellulären Membranen durch eine physikalische Interaktion mit membranständigen Proteinen vermittelt.

Bezüglich der Funktion der 47 kDa GTPase Familie in der angeborenen Immunantwort wurde gezeigt, dass ihre Mitglieder eine fundamentale Rolle in zelltypunabhängigen und zellautonomen Resistenzmechanismen gegenüber verschiedenen viralen und intrazellulären bakteriellen und protozoischen Erregern ausüben. Die Vermittlung einer spezifischen antiviralen Aktivität durch eine 47 kDa GTPase konnte *in-vitro* mittels einer TGTP überexprimierenden murinen Fibroblasten-Zelllinie gezeigt werden, in der die Vermehrung des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) effizient gehemmt wurde, die

jedoch keine erhöhte Resistenz gegenüber dem Herpes Simplex Virus (HSV-1) zeigte (Carlow et al., 1998).

Offensichtlich scheinen distinkte Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen eine unterschiedliche Relevanz für die Abwehr von unterschiedlichen intrazellulären Erregern zu haben. Untersuchungen von Mäusen mit einer gezielten Deletion für IGTP, LRG-47 oder IRG-47 weisen einen Verlust der Resistenz gegenüber dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* auf, wobei die Defizienz in IRG-47 defizienten Tieren nur in der chronischen Phase der Infektion offensichtlich wurde (Collazo et al., 2001; Halonen et al., 2001). LRG-47 defiziente Mäuse zeigten zudem eine hohe Anfälligkeit für Infektionen mit dem fakultativ intrazellulärem, gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes*. Gegenüber einer Infektion mit murinem Cytomegalo-Virus (MCMV) sind diese 47 kDa GTPase-defizienten Mäuse resistent. Mit der Generierung von Knochenmarks-Chimären zwischen genetisch unveränderten Mäusen und IGTP-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass für eine erfolgreiche Immunabwehr einer *T. gondii* -Infektion die Expression dieser 47 kDa GTPase sowohl in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Zellen erforderlich ist (Collazo et al., 2002).

Während die immunologische Relevanz der 47 kDa GTPasen für die zellautonome Resistenz durch die phänotypische Charakterisierung der entsprechenden defizienten Mäuse eindeutig belegt ist, ist der molekulare Wirkungsmechanismus dieser GTPase-Familie bisher unbekannt. Es besteht die generelle Annahme, dass die von den 47 kDa GTPasen vermittelten Effektormechanismen unabhängig von anderen Komponenten des angeborenen oder erworbenen Immunsystems und auf intrazellulärer Ebene wirksam sind, denn in den 47 kDa GTPase defizienten Mäusen sind wichtige immunologische Parameter der angeborenen Immunantwort wie die Produktion der Zytokine IL-12 und TNF- α , die NO-Produktion sowie NK- und T-Zellfunktionen unverändert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Resistenz von Astrozyten gegenüber *T. gondii* durch IGTP vermittelt wird und unabhängig von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffmetaboliten oder dem intrazellulären Eisen- und Tryptophanentzug erfolgt, der in anderen Zelltypen bei der Infektionsabwehr von *T. gondii* involviert ist (Halonen et al., 2001).

Anhand der bisherigen Daten lässt sich zwar eine Zugehörigkeit aller drei IFN-induzierbaren GTPasen (47 kDa GTPasen, 65 kDa GTPasen und Mx-Proteine) zu der Superfamilie der Dynamine postulieren, jedoch sind die wenigen bisher bekannten Eigenschaften dieser GTPase-Familien untereinander außerordentlich divers, so dass sich keine Rückschlüsse auf die molekulare Funktionsweise der 47 kDa GTPasen ableiten lassen. Die Rolle der 65 kDa GTPasen in der Interferon-Antwort ist noch ungeklärt. In natürlich vorkommenden Mausstämmen ohne funktionelles mGBP-1 Allel konnten ebenso wie in Mäusen mit gezielt generierter 65 kDa Defizienz keine phänotypischen Abweichungen oder erhöhte Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern festgestellt werden (Jin et al., 1998; Staeheli et al., 1984). Der einzige Hinweis, dass humane 65 kDa GTPasen immunologisch relevant sein könnten, liefert die erhöhte Resistenz einer hGBP-1 überexprimierenden Zelllinie gegenüber VSV und dem Encephalomyocarditis Virus (ECMV) (Anderson et al., 1999).

Die Mechanismen, durch die die IFN Typ I induzierbaren Mx-GTPasen zellautonome antivirale Resistenzmechanismen vermitteln, sind hingegen detailliert charakterisiert (Haller et al., 1998; Horisberger, 1995). Die Inhibition der viralen Replikation beruht auf der Interaktion der Mx-GTPasen mit Strukturkomponenten des Virus, wodurch dessen intrazellulärer Transport und Translationsmaschinerie gestört wird (Kochs und Haller, 1999a; Kochs und Haller, 1999b; Stranden et al., 1993). Es ist nicht eindeutig geklärt, inwiefern die Fähigkeit der Mx-Proteine, GTP-abhängig zu oligomerisieren und zu hochmolekularen Aggregaten zu assemblieren, zu dem von ihnen vermittelten antiviralen Effekt beiträgt (Kochs et al., 2002). Eine derartige Ausbildung von komplexen Aggregaten oder eine Interaktion mit Erregerkomponenten ist für 47 kDa GTPasen bisher nicht bekannt. Aufgrund der Assoziation der 47 kDa GTPasen mit den Membranen des ER und des Golgi-Apparates wurde spekuliert, dass diese GTPasen in Vorgänge der membranassoziierten Proteinprozessierung oder in membranabhängige Transportprozesse involviert sein könnten (MacMicking et al., 2003; Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit und methodische Herangehensweise

Die molekularen Mechanismen, durch die die IFN-induzierbaren 47 kDa GTPasen intrazelluläre zellautonome Resistenz gegen virale, bakterielle und protozoische Erreger vermitteln, sind bisher unbekannt. Die Primärstrukturen der 47 kDa GTPasen enthalten keinerlei funktionelle Motive, die einen direkten Rückschluss auf ihre Wirkungsweise zulassen. Ebenso fehlen Sequenzmotive, die die beobachtete Assoziation mit intrazellulären Membranen vermitteln könnten. Es besteht die Möglichkeit, dass 47 kDa GTPasen über Protein-Protein-Interaktionen mit den Membranen unterschiedlicher Zellkompartimente assoziieren. Zudem könnte ihre Hydrolyseaktivität in Analogie zu anderen GTPasen durch GEF/GAP-Proteine moduliert werden. Daher erscheint es plausibel, dass Proteine existieren, die mit den 47 kDa GTPasen physikalisch interagieren.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war deshalb die Identifikation von Protein-Interaktionspartnern für die Familie der 47 kDa GTPasen, um Einblicke in ihre molekulare Funktionsweise zu erhalten. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei das in unserem Labor neu identifizierte Familienmitglied IIGP (Zerrahn et al., 2002).

Als experimenteller Ansatz zur Identifikation von Interaktionspartnern für IIGP (und anderen Mitgliedern der 47 kDa GTPasen) diente das „Yeast-Two-Hybrid“-System (Y2H), ein *in-vivo*-Interaktionstest, der im Vergleich zu konventionellen biochemischen Methoden auch die Identifikation von schwachen und transienten Protein-Protein-Interaktionen in Hefezellen ermöglicht. Um Einblicke in die strukturelle Organisation von IIGP zu erhalten, wurden mit diesem System auch die für eine Interaktion relevanten Proteinbereiche der GTPase bestimmt. Mit mikroskopischen und biochemischen Techniken wurde die subzelluläre Lokalisation von IIGP bzw. der Interaktionspartner und die Art ihrer Assoziation mit den Membranen intrazellulärer Kompartimente analysiert. Zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise und Charakteristik von IIGP wurden die Eigenschaften von endogen und ektopisch exprimiertem IIGP und einer hydrolytisch inaktiven IIGP-Mutante untersucht. Schließlich wurde der Einfluss von IIGP auf eine Infektion mit intrazellulären Erregern in einem *in-vitro* Infektionsmodell analysiert.

2 Material

2.1 Geräte

Blotkammer	BioRad
Brutschränke	Heraeus
Cryo-Einfrierhilfe	Roth
Dounce-Homogenisator	Roth
Elektrophoresekammern	BioRad
Elektrophorese-Netzgeräte	BioRad
Elektroporationsgerät	BioRad
Feinwaage	Sartorius
Film-Entwicklungsgerät	Kodak
Filmkassetten	Amersham
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Geltrockner	BioRad
Glasmaterialien	Schott
Gradient-PCR Cyclers	Eppendorf
Heizblock	Kleinfeld
Konfokales Laserscan-Mikroskop	Leica
Lichtmikroskope	Zeiss
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA
PCR Thermo-Cycler	Perkin Elmer
pH-Meter	Knick
Photometer	BioRad
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	Integra Biosciences
Replika-Stempel für Microtiterplatten	Nunc
Standzentrifugen	Beckmann, Sorvall
Sterilwerkbank	Heraeus
Tischzentrifugen	Eppendorf
Ultraschallgerät „Sonifier“	Branson
Ultrazentrifuge	Beckmann
Vakuum-Trockner	BioRad
Vortex-Gerät	IKA-Labortechnik
Wipptisch	Biometra
Zellzählkammer (Neubauer improved)	Brand

2.2 Chemikalien

Aceton, p.a.	Merck
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (30%)	BioRad
Agarose (low melting point)	Biozym
Agarose	Biozym
Aminosäuren	ICN, Sigma
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ampizillin	Sigma
Bacto-Agar	Gibco

Bacto-Trypton	Gibco
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
CHAPS	ICN
Chloramphenicol	Sigma
“Complete” Protease-Inhibitor- Cocktail, EDTA-frei	Roche/Boehringer
2-Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma
Coomassie Brilliant Blau R-250	Sigma
DMEM (1x)	Biochrom
dNTPs	TaKaRa
EDTA	Merck
Essigsäure, 100% p.a.	Merck
Ethanol, 100% p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll Type 400	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Galaktose	Sigma
Glutaraldehyd 25%	Sigma
Glycerol	Sigma
GTP- γ -S, GTP- β -S	Sigma
Hämagglutinin	Aldrich
Harnstoff	Sigma
Hefestickstoffbasis	Difco
HEPES-Puffer	Biochrom
Heringssperma-DNA	Stratagene
Isopropanol, p.a.	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Kalziumchlorid	Sigma
L-Glutamin	Biochrom
Lithiumacetat Dihydrat	Sigma
Magermilchpulver	Fluka
Magnesiumchlorid	ICN
Methanol, 100% p.a.	Merck
Molwiol	Calbiochem
MOPS	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumphosphat (dibase)	ICN
Natriumphosphat (monobase)	Sigma
Natriumpyruvat	Biochrom
Natronlauge	Merck
Nocodazol	Sigma
ONPG	ICN
PBS-Dulbecco (1x)	Biochrom
Penicillin / Streptomycin	Merck

PMSF	Sigma
Polyethylen-Glycol (PEG) 3350	Sigma
Ponceau S	Sigma
Raffinose	Difco
Rinderserum-Albumin (BSA)	Sigma
RPMI (1x)	Biochrom
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure, rauchend	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS), p.a.	Merck
Sorbitol	Sigma
Sucrose	Sigma
TEMED	Sigma
Trichloressigsäure, 100% p.a.	Roth
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton-X 100	Sigma
Trypan-Blau 0,5% (w/v)	Biochrom
Trypsin/EDTA	Biochrom
Tween-20	Sigma
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside)	Gibco
Xylencyanol	Roth
Zymolyase	ICN

2.3 Enzyme und Zytokine

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs
Cloned Pfu Polymerase	Stratgene
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs
Immunisierungs-Adjuvanz "ABM-S"	Linaris
Interferon- γ	Strathmann Biotech / Roche
Lysozym	Sigma
Pfu-Turbo Polymerase	Stratogene
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Qiagen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Genecraft
Zymolyase	ICN

2.4 Antikörper und polyklonale Seren

primäre mAKs und polyklonale Seren

6xHistidin	α -6xHis mAk	Qiagen
Actin	Texas Red Phalloidin	Molecular Probes
cis-Golgi	α -GM130 mAk	BD Transduction
Endosomen	α -transferrin mAk	Becton Dickinson
ER	α -Calnexin Mausserum	Stressgene
Fc-Rezeptor-Block	α -CD16/32 mAK	Pharmingen
Glutathion-S-Transferase	α -GST mAk	Becton Dickinson
Golgi	α -58K-9 mAk	Sigma
HA-Epitop	α -HA mAk, Klon 12CA	Roche
hHk3, mHk3	α -hHk3 Hasenserum	Dr. H. Krämer, Texas
IGTP	α -IGTP mAk clone 7	Becton Dickinson
IIGP	α -IIGP mAk 5D9, 10D7	Zerrahn et al., 2002
Keratin	α -Keratin mAK	Dianova
LexA-Bindungs-Domäne	α -LexA mAk	Clontech
Lysosomen	α -LAMP1 mAk	Becton Dickinson
Mannosidase	α -Mannosidase Hasenserum	Dr. A. Haas, Bonn
Tubulin	α -DM1A mAk	Sigma
Ubiquitin	α -FK2 mAk	Affinity Reasearch
Vimentin	α -vimentin mAK	Dianova

Sekundärantikörper

Schaf- α -Maus, Schaf- α -Hase, Schaf- α -Ratte; FITC, PE, Cy2 oder C5 gekoppelt	Dianova
Schaf- α -Maus, Schaf- α -Hase; Peroxidase gekoppelt	Dianova

2.5 „Kits“

BCA Protein Assay	Pierce
Bradford Protein Assay	BioRad
DupLEX-A TM Yeast-Two-Hybrid-System	OriGene
ECL Western-Blotting Detection	Amersham Pharmacia
Gel-Extraction Kit JETSORB	Genomed
Matchmaker TM LexA Yeast-Two-Hybrid-System	Clontech
QiaExII	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi, Maxi und Mega Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAQuick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
T4 Cloning Ligation Kit	Stratagene

2.6 Größenstandards

1 kb DNA-Leiter	Gibco
vorgefärbte Proteinleiter „Benchmark“	Gibco

2.7 Lösungen und Puffer

TB 1

RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
KAc	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerol	15 % (v/v)
pH 5,8 (HAc)	

TB 2

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerol	15 % (v/v)
pH 6,8 (NaOH)	

TE (10x)

EDTA	10 mM
Tris-HCl, pH7,5	100 mM

50% PEG-3350

250 g PEG 3350 in 500 ml ddH₂O, autoklavieren

LiOAc (10x)

51 g Lithiumacetat in 500 ml ddH₂O, autoklavieren

TE/LiOAc (1x)

1 Vol 10x TE, 1 Vol 10x LiOAc

TE/LiOAc/PEG (1x)

1 Vol 10x TE, 1 Vol 10x LiOAc, 8 Vol 50 % PEG-3350

TRF 1

1 Vol 10x TE
1 Vol 10x LiOAc
8 Vol ddH₂O

TRF 2

1 Vol 10x TE
1 Vol 10x LiOAc
8 Vol 50% PEG-3350

Z-Puffer

Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
sterilfiltrieren	
<i>frische Zusätze:</i>	
β-ME	50 mM

ONPG-Stammlösung

4 mg/ml ONPG in Z-Puffer
frisch ansetzen, 1-2 Stunden mischen

X-Gal-Lösung

100 mg X-Gal in 1ml N,N-Dimethylformamid (-20°C)

Hefep lasmid-Präparationspuffer

Triton-X	2 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)
NaCl ₂	0,1 M
EDTA	0,001M
Tris, pH 8,0	0,01 M

Hefe-Aufschlußpuffer für Proteinlysate

Harnstoff	8 M
SDS	5% (w/v)
Tris-HCl pH 6,8	40 mM
EDTA	0,1 mM
Bromphenolblau	0,5 mg/ml

frische Zusätze vor dem Aufschluß der Hefezellen pro ml:

β-ME	10 µl
PMSF-Stammlösung	50 µl
Protease-Inhibitoren	(nach Angabe des Herstellers)

Zymolyase-Lösung

Zymolyase	2,5 mg/ml
Sorbitol	1,2 M
Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4	0,1 M

PMSF-Stammlösung (100x)

0,1742 g PMSF in 10 ml Isopropanol

TAE (1x)

Tris-HCl, pH 7,8	20 mM
Natriumacetat	10 mM
EDTA	1 mM

TENS

EDTA	1 mM
NaOH	0,1 M
SDS	0,5 % (w/v)
Tris-HCl pH8,0	10 mM

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Phosphatpuffer pH 7,4	10 mM

Protein-Probenpuffer (Laemmli) (5x)

Tris-HCl	250 mM
Glycerin	25 % (v/v)
SDS	7,5 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
β-ME	12,5 %

DNA-Probenpuffer

Glycerin	50 % (v/v)
TAE	1x
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)

SDS-PAGE Elektrophoresepuffer

Tris-HCl pH8,3	50 mM
Glycin	380 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Western-Blot Transferpuffer

Tris-HCl	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,00375 % (w/v)

10% APS-Stammlösung

1g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH₂O; Lagerung bei -20 °C

TBS

NaCl	150 mM
Tris-HCl, pH 8,0	25 mM

TBST Waschlösung

TBS + 0,1 % (v/v) Tween-20

Western-Blot Blockierlösung

5% (w/v) Magermilchpulver in TBST

Western-Blot Stripping-Lösung

β-ME	100 mM
SDS	2 % (w/v)
Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM

Ponceau-Lösung

2 g/l Ponceau-S in 5% (v/v) Essigsäure

Coomassie-Färbelösung

Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Blau	2,5 mg / ml

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol	0,25 % (w/v)
Ficoll Type 400	15 % (w/v)

Immunpräzipitations-Lysepuffer

NaCl	120 mM
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	1mM
Glycerol	10 %
CHAPS	10 mM
Proteaseinhibitor-Mix	(gemäß den Angaben des Herstellers)

Immunpräzipitations-Elutionspuffer

SDS	5% (w/v)
β-ME	100 mM
Tris-HCl, pH 6,8	6,25 mM

Fraktionierung: hypotonischer Puffer

MgCl ₂	1 mM
<i>zum Aufschluß der Zellen frische Zugabe von Proteaseinhibitoren:</i>	
Aprotinin	1 % (w/v)
Leupeptin	50 µg/ml
PMSF	1 mM
Hepes, pH 7,5	10 mM

Sucrose-Gradient

Sucrose	20% / 20% / 38% (w/v)
Hepes, pH 7,5	10 mM
MgCl ₂	1 mM

Antikörperfärbungen von fixierten Zellen:**Wasch- bzw. Blockpuffer**

BSA	1 % (w/v)
Tween20	0,05 % (v/v)
in PBS	
<i>zum Blockieren Zugabe von:</i>	
Ziegenerum	10 % (v/v)
<i>zusätzlich beim Anfärben von Makrophagen:</i>	
Fc-Rezeptor-Block	20 µg/ml

2.8 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier 3MM	Schleicher & Schuell
Einmalpipettenspitzen	Sarstedt
Hybond ECL Nitrozellulose Membran	Amersham
Hyperfilm ECL	Kodak
Kulturschalen 24x24 cm	Greiner
Petrischalen	Greiner
Polypropylen Röhrchen (15 / 50 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,0 / 2,0 ml)	Eppendorf
Säuregewaschene Glasperlen 425-600 µm	Sigma
Sterican Einmalkanülen	Braun
Steritop Membranfilter	Millipore
Zellkulturflaschen	Falcon
Zellkulturschalen (6 / 24 / 96 well)	Greiner
Zellkulturobjektträger („chamber slides“)	Nunc

2.9 Nährmedien

2.9.1 Bakterienmedien

Die Nährmedien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60 °C mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Ampicillin und Kanamycin wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml und Chloramphenicol von 34 µg/ml eingesetzt. Festmedien enthalten zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar.

LB

Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,5	

SOC

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	0,6 g/l
KCl	0,2 g/l
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

M9 Salze, 10x

Na ₂ HPO ₄	0,42 M
KH ₂ PO ₄	0,24 M
NaCl	0,09 M
NH ₄ Cl	0,19 M
pH 7,4 (NaOH); autoklavieren	

Minimalmedium M9 (– Tryptophan)

M9 Salze (10x)	1 x
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Glucose	0,4 % (w/v)
Kanamycin	0,05 mg/l
Ura, His, Leu	je 0,04 mg/l

2.9.2 Hefemedien

YPD-Vollmedium

Pepton	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Glucose	20 g/l

SD-Aminosäuregemisch –H,T,U,L (10x)

Isoleuzin	300 mg/l
Valin	1500 mg/l
Adenin Hemisulfat	200 mg/l
Arginin HCl	200 mg/l
Lysin HCl	300 mg/l
Methionin	200 mg/l
Phenylalanin	500 mg/l
Threonin	2000 mg/l
Tryptophan	200 mg/l
sterilfiltrieren; Aufbewahrung bei 4°C	

Selektionsmedien SD

Hefestickstoffbasis (ohne Aminosäuren)	6,7 g/l
SD-Aminosäuregemisch –H,T,U,L (10x)	1 x
pH 5,8; autoklavieren	

Zusätze (steril):

Kanamycin	25 µg/ml
-----------	----------

Aminosäuren entsprechend der Auxotrophien der Hefen:

Histidin HCl	200 mg/l
Tyrosin	300 mg/l
Uracil	200 mg/l
Leuzin HCl	1000 mg/l

für Glukosemedium (nicht-induktiv)

Glukose	2% (w/v)
---------	----------

für Galaktosemedium (induktiv)

Galaktose	2 % (w/v)
Raffinose	1 % (w/v)

für X-Gal-haltige Festmedien

X-Gal-Lösung	4 ml/l (=80 mg/l)
BU-Salze (10x)	100 ml/l

BU-Salze (10x)

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	70 g/l
NaH ₂ PO ₄	30 g/l
pH 7,0	

2.9.3 Zellkulturmedien**Standard-Zellkulturmedium**

L-Glutamin	2 mM
Na-Pyruvat	1 mM
HEPES	20 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 U/ml
β-ME	50 µM
FCS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)
in DMEM / RPMI (1x), sterilfiltrieren	

Differenzierungsmedium für Knochenmarksmakrophagen

20 % L-Zell-Kulturüberstand in Standardmedium

2.10 Y2H cDNA-Genbibliotheken

MatchmakerTM Clontech
"Mouse total spleen cDNA library"

pJG4-5 CD4⁺ T-cell-library Dr. V. R. Prasad, Albert Einstein College
of Medicine, New York

2.11 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide („Primer“) wurden von den Firmen metabion (Berlin) und TIB Molbiol (Berlin) lyophilisiert bezogen, standardmäßig in TE aufgelöst und bei -24 °C aufbewahrt. Alle Sequenzen sind in 5' → 3' Leserichtung angegeben.

2.11.1 Amplifikation / Klonierung**Amplifikation der 47 kDa GTPasen und der mit ihnen interagierenden Proteine**

Die Amplifikationsprimer wurde so entworfen, dass nach der Einklonierung in die *Sma*I-geschnittene MCS am 5'-Ende eine neue *Sma*I-Schnittstelle entsteht und am 3'-Ende eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle eingefügt wird.

IGTP_fwd	GGAATGGATTAGTCACAAAGTTGCCAC
IGTP_rev	CACCAGCTCGAGGTGAATTCGGGAGGGAG
GTPI_fwd	GGAATGGAAGAGGCAGTTGAGTCACCTG
GTPI_rev	CACCAGCTCGAGAGGATGAGGAATGGAGAG
LRG-47_fwd	GGAATGAAACCATCACACAGTTCCTGC
LRG-47_rev	CACCAGCTCGAGGATCTGCGGAGGGAAGATG
TGTP_fwd	GGAATGGCTTGGGCCTCCAGCTTTGATG
TGTP_rev	CACCAGCTCGAGAGCTTCCCAGTACTCGGG
IIGP_fwd	GGAATGGGTCAGCTGTTCTCTTCACCT
IIGP_rev	CACCAGCTCGAGGTTTCTTAAACATATCTC
IRG-47_fwd	GGAATGGATCAGTTCATCTCAGCCTTC
IRG-47_rev	CACCAGCTCGAGGGCAACATTTACTGTTTC
clGP9_fwd	GGAATGGGTCAGTCTTCTTCTAAACCCG
clGP9_rev	TTTAGAACCTTACTCAGAGTCCACACTGTC
m_hook3_fwd	GGAATGTTTAACGTGGAGTCTGTGGAG
m_hook3_rev	CACCAGCTCGAGCCTTGCTGTGGCTGGCTG
m_p125_fwd	GGAATGGCGGATAGGAAGGCTAACG
m_p125_rev	CACCAGCTCGAGATGCTGGGGCTGTTCTGG
m_arc20_fwd	GGAATGACTGCCACTCTCCGCCCCCTAC
m_arc20_rev	CACCAGCTCGAGAAAATTCTTGAGGAACTC

Verkürzungen von IIGP und mHk3

Die verkürzten Fragmente von IIGP und mHk3 wurden mit Primern amplifiziert, die am 5'-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle und am 3'-Ende ein Stop-Codon, gefolgt von einer *Xho*I-Schnittstelle einfügen.

IIGP_252_rev	CACCAGCTCGAGAGGGAGGTCACCTTATCAG
IIGP_331_rev	CACCAGCTCGAGAGCTAATCTCTGCAAAG
IIGP_391_rev	CACCAGCTCGAGTTTCAGGTAAAATATTTTC
hook3_166_fwd	GGAATTCGCTGGACATGATGCCTATGTTG
hook3_236_fwd	GGAATTCCTCAGCAGGAAGAAGACATTTGC
hook3_450_fwd	GGAATTCCTCAGCAGCCTTGCAGCAG
hook3_627_fwd	GGAATTCGGAGCAGCACCAGAAATTCAAGC
hook3_236_rev	CACCTCGAGTTATGGGCTATTGGGATCTTC
hook3_450_rev	CACCTCGAGTTAAGATTCTTGGCTTCCCAG
hook3_627_rev	CACCTCGAGTTATCCTTGATTCTGTTTAGG
hook3_673_rev	CACCTCGAGTTAATTGTACCAGGCACTAAC

2.11.2 Vektormodifikation

Um die Umklonierung der Gene zwischen den unterschiedlichen Vektoren zu erleichtern, wurden die MCS der Vektoren pGilda und pB42AD mit einer modifizierten Oligonukleotidsequenz erweitert („synthetic oligonucleotide approach“, siehe Anhang).

smartMCS_1	AATTGCATATGGCCATGGAGGCCGGGATCCCGGGTCGACACGAATTCCTCGAGTAGCGGCCGC
smartMCS_2	TCGAGCGGCCGCTACTCGAGGAATTCGTGTCGACCGGGATCCCGCCTCCATGGCCATATGC

2.11.3 Mutagenese

Der Austausch der Aminosäure Serin gegen Asparagin an AS-Position 83 im IIGP Protein erfolgte mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ nach den Angaben des Herstellers (durchgeführt von Dr. Jens Zerrahn).

Um das Einklonieren von mHk3 in die Hefe-Vektoren zu ermöglichen, wurde die interne *Xho*I-Restriktionsschnittstelle im mHk3-Gen (Position 1714) durch die Amplifikation mit einem Mutagenese-Primer deletiert. Der resultierende Basenaustausch innerhalb der *Xho*I-Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) veränderte die Aminosäuresequenz von mHk3 nicht. Der durch die Primer m_hook3_mut_fwd / m_hook3_rev amplifizierte Bereich wurde anschließend als *Bgl*II-*Xho*I-Fragment in das mHk3-Gen einkloniert.

IIGP[S83N]_1	TCAGGGAAGAACAGCTTCATCAATACCCTGAG
IIGP[S83N]_2	ATGAAGCTGTTCTTCCCTGATCCCGTCTCC
m_hook3_mut_fwd	TGAAGATCTCGA <u>ACCA</u> AGATTTAACAACAG

2.11.4 Sequenzierung

pB42AD_fwd	CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG
pB42AD_rev	GCCGACAACCTTGATTGGAGACTTG
pGilda_fwd	CGTCAGCAGAGCTTCACC

2.11.5 Plasmide / Vektoren

2.11.5.1 Subklonierung

pCR-Script Amp SK(+) Stratagene

2.11.5.2 Yeast-Two-Hybrid-Vektoren

bait-Vektoren

pLexA	BD-Klonierungsvektor	Clontech
pLexA-smart	pLexA mit modifizierter MCS	
pLexA-53	Kontrolle: Fusion LexA-murine p53	Clontech
pLexA-Lam	Kontrolle: Fusion LexA-human Lamin C	Clontech
pLexA-Pos	(identisch mit pSH17-4)	Clontech
pRHFM1	Kontrolle: Fusion LexA-homeodomain Drosophila bicoid	Origene
pSH17-4	Kontrolle: Fusion LexA-GAL4-AD	Origene
pEG202-MAX	Kontrolle: Fusion LexA-Max	Origene
pBait	Kontrolle: Fusion LexA-Bait	Origene

prey-Vektoren

pB42AD	AD-Klonierungsvektor	Clontech
pB42AD-smart	pB42AD mit modifizierter MCS	
pJG4-5	(identisch mit pB42AD)	Origene
pB42AD-T	Kontrolle: Fusion B42-SV40 large T antigen	Clontech
pTarget	Kontrolle: Fusion B42-Target	Origene

lacZ-Reporterplasmide

p8oplacZ	(identisch mit pSH18-34)	Clontech
pSH18-34	<i>URA3</i> , 2 um, Apr _R , 8 ops.-lacZ (hohe Sensitivität)	Origene
pJK103	<i>URA3</i> , 2 um, Apr _R , 2 ops.-lacZ (mittlere Sensitivität)	Origene
pRB1840	<i>URA3</i> , 2 um, Apr _R , 1 op.-lacZ (geringe Sensitivität)	Origene
pJK101	<i>URA3</i> , 2 um, Apr _R , GAL1-2 ops.-lacZ (Repression)	Origene

2.11.5.3 Prokaryontische Expressionsvektoren

pET22/26-b	Novagen
pET32-a	Novagen
pET42-a	Novagen

2.11.5.4 Eukaryontische Expressionsvektoren

pCMV-GFP Stratagene

2.12 Organismen

2.12.1 *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> XL1 Blue	allg. Subklonierung	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10 Gold	allg. Subklonierung	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 alpha	allg. Subklonierung	Promega
<i>E. coli</i> JM 109	Subklonierung von methylierungs-sensitiven DNA-Sequenzen	Promega
<i>E. coli</i> KC8	Selektion der Hefe-Prey-Plasmide	Clontech
<i>E. coli</i> K12 BL21 (DE3)	Proteinexpression	Novagen
<i>E. coli</i> K12 Rosetta (DE3)	Proteinexpression	Novagen
<i>E. coli</i> K12 Origami (DE3)	Proteinexpression	Novagen

2.12.2 *S. cerevisiae*-Stämme

		<i>Sensitivität des Leu-Reportergens</i>
EGY48	MAT α <i>trp1 his3 ura3 leu2::6 LexAop-LEU2</i>	hoch
EGY194	MAT α <i>trp1 his3 ura3 leu2::4 LexAop-LEU2</i>	mittel
EGY188	MAT α <i>trp1 his3 ura3 leu2::2 LexAop-LEU2</i>	niedrig
EGY40	MAT α <i>trp1 his3 ura3 leu2::0 LexAop-LEU2</i>	(Negativkontrolle)

2.12.3 Zelllinien

NIH/3T3	Maus-Fibroblastenzelllinie	ATCC CRL-1658
NIH/3T3 – IIGP	Klon A4	(J. Zerrahn)
NIH/3T3 - IIGP[S83N]	polyklonal FACS-sortiert auf GFP ⁺	(J. Zerrahn)
McCoy	Maus-Epithel-/Fibroblastenzelllinie	ATCC CRL-1696
RAW 264.7	Maus-Makrophagen ähnliche Zelllinie	ATCC CRL-2278
Send	Maus-Endothelzelllinie	
BAC 1.2F5	Maus-Makrophagen ähnliche Zelllinie	
J774 A.1	Maus-Monozyten-Makrophagenzelllinie	

2.12.4 Mäuse

C57BL/6 Mäuse wurden aus der institutseigenen Zucht der pathogenfreien Tiereinrichtungen des MPI für Infektionsbiologie bzw. vom Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) bezogen.

2.12.5 Erreger

<i>Toxoplasma gondii</i>	(bezogen von Prof. Dr. O. Liesenfeld, FU Berlin)
<i>Listeria monocytogenes</i>	(bezogen von Dr. U. Schaible, MPI-IB)
<i>Chlamydia</i>	(bezogen von Abt. für molekulare Biologie, MPI-IB)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	(bezogen von Dr. U. Schaible, MPI-IB)

2.13 Elektronische Auswertung und verwendete Software

Sequenzanalyse, Datenbankanalysen	NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Sequenzalignment	MULTALIGN www.toulouse.inra.fr/multalin.html
Coiled-Coil-Domänen-Analyse	COILS www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html
Chromatogrammanalyse	Chromas (Technelysium Pty Ltd)
Sequenzbearbeitung	Clone Manager 5.0 (Scientific & Educational Software)
Textverarbeitung	Word 2000 (Microsoft)
Bildbearbeitung	Photoshop 7 (Adobe Systems)
Zeichnungen	Illustrator 10 (Adobe Systems)

3 Methoden

Generelle mikrobiologische und molekularbiologische Methoden erfolgten gemäß den Vorschriften im Handbuch „*Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*“ (Sambrook, 1989). Die Kultivierung und Manipulation von Hefezellen erfolgte gemäß den Angaben im Handbuch „*Yeast Protocols Handbook*“ (Clontech, 2001).

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E.coli* und *S. cerevisiae*

Bakterien- und Hefezellen wurden mit sterilen Glaspipetten als Verdünnungsausstriche oder mit Hilfe von sterilen Glasperlen gleichmäßig auf Agar-Festmedien ausgebracht und bei 37 °C über Nacht (*E. coli*) bzw. bei 30 °C für 2-8 Tage (*S. cerevisiae*) bis zum Erscheinen von Einzelkolonien inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit Einzelklonen von Festmedien bzw. mit Flüssigkulturen in der stationären Wachstumsphase beimpft, unter Schütteln bei 150-200 rpm inkubiert und ihre OD₆₀₀ mit einem Spektralphotometer kontrolliert. Agarplatten mit Bakterien- bzw. Hefekolonien wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 4 °C bis zu maximal 4 Wochen aufbewahrt. Zur Langzeitlagerung wurden die Flüssigkulturen in der exponentiellen Phase mit 8 % (*E. coli*) bzw. 25 % (*S. cerevisiae*) Glycerin versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und bei -70 °C dauerhaft eingefroren.

3.1.2 Herstellung und Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten (RuCl₂) *E. coli*

Die Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien erfolgte gemäß einem modifizierten Protokoll nach Hanahan (Hanahan, 1983). Flüssigkulturen wurden mit Bakterien angeimpft, die unter optimalen Wachstumsbedingungen propagiert wurden (zweimaliges Ausstreichen auf Festmedien und anschließende Übernacht-Flüssigkultur), und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀= 0,3 - 0,4) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend für 15 min auf Eis gekühlt, bei 4 °C für 10 - 15 min bei 1000 g zentrifugiert, das Zellpellet in eiskaltem TB1-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter

Zentrifugation wurden die Bakterien in eiskaltem TB2-Puffer aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

Zur Transformation der chemisch kompetenten Bakterien mittels Hitze-Schock wurden die Bakteriensuspensionen auf Eis aufgetaut und mit 1 - 5 ng der Plasmid-DNA bzw. mit bis zu 3 µl Ligationsansatz versetzt. Nach Inkubation auf Eis für 30 - 45 min erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Wasserbad. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz zur phänotypischen Expression mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und für 30 min bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Abschließend wurde der Ansatz auf antibiotikahaltigen Festmedien ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Wie unter 3.1.2 beschrieben wurden Bakterienflüssigkulturen bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase angezogen, auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Durch sequentielles Resuspendieren des Bakterienpellets in eiskaltem 10 %igen Glycerol (in $\frac{1}{50}$ Vol, $\frac{1}{200}$ Vol, $\frac{1}{400}$ Vol des ursprünglichen Kulturvolumens) und Zentrifugation bei 4 °C und 1000 g für jeweils 15 min wurden die Bakterien sukzessive gewaschen und eingengt. Derart behandelte *E. coli* wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 50 µl der elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1-10 ng DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte in vorgekühlten Einweg-Küvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand und einem Spannungsimpuls von 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω. Der Ansatz wurde sofort mit 500 µl vorgewärmten SOC-Medium ohne Antibiotika vorsichtig gemischt und nach einstündiger Inkubation bei 37 °C auf Selektionsmedien ausplattiert und über Nacht inkubiert.

3.1.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Das folgende Protokoll erlaubt die Durchführung von 30 Einzeltransformationen; die Volumina wurden gemäß der Anzahl der Transformationen entsprechend angepasst.

300 ml Flüssigmedium wurden mit einer Hefe-Übernachtskultur zu einer $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bis zu einer $OD_{600}=0,5 - 0,7$ unter starkem Schütteln bei 30 °C inkubiert (Dauer 4 - 6 h). Die Zellen wurden pelletiert (1500 g, 5 min, RT), einmal mit sterilem

Wasser gewaschen und in 1,5 ml TRF1 resuspendiert. Zur Transformation wurden 5 µl Heringssperma-DNA (50 µg, zuvor für 5 min aufgekocht), 1 µl Plasmid-DNA (20 - 100 ng) und 50 µl kompetente Hefezellen mit 200 µl TRF2 versetzt, durch Invertieren vorsichtig gemischt und für 30 min ohne Schütteln bei 30 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 40 µl DMSO folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 min. Der Ansatz wurde mit 600 µl sterilem Wasser vermischt, als Verdünnungsreihe (bzw. komplett auf 24x24 cm Kulturschalen bei der Transformation von cDNA-Bibliotheken) auf Hefe-Selektionsmedien ausplattiert und bei 30 °C für 2 - 8 Tage bis zum Erscheinen von Einzelkolonien inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab aus *E. coli*

Die Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse (Zhou et al., 1990). 1,5 ml einer stationären Bakterienflüssigkultur wurden zentrifugiert (1000 g, 5 min, RT), der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet im verbleibenden Medium (ca. 50 µl) resuspendiert. Zur Lyse wurde die Bakteriensuspension bei RT mit 300 µl TENS gemischt (Vortex für 2 - 5 sec). Das Lysat wurde durch Zugabe von 150 µl 2M Natriumacetat (pH 5,2) neutralisiert und für 5 min zentrifugiert (20.000 g, 4 °C). Der klare Überstand wurde abgenommen, mit 900 µl eiskaltem Ethanol (100 %) gemischt und erneut zentrifugiert (20.000 g, 4 °C, 5 min). Das DNA/RNA Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol (75 %) gewaschen, luft- oder vakuumgetrocknet, in 50 µl RNaseA-haltigem (10 mg/ml) TE aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

Für hochreine Plasmidpräparationen wurden Silicagel-Säulen („QIAprep Spin Miniprep Kit“, Qiagen) verwendet, wobei mit den Reagenzien und Materialien des Herstellers und nach seinen Vorschriften gearbeitet wurde.

3.2.2 Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab aus *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus stationären Bakterienkulturen wurden Anionenaustauschersäulen („Plasmid Midi und Maxi Kit“, Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.3 Plasmid-Präparation aus *S. cerevisiae*

1,5 ml einer stationären Hefe-Flüssigkultur (in SD-Selektionsmedium) wurden kurz zentrifugiert (20.000 g, 1 min, RT) und das Zellpellet in 200 µl Hefe-Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g säurebehandelten Glasperlen wurde der Ansatz für 2 min stark gevortext. Der wäßrige Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (12.000 g, 5 min, RT) mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (100 %) gefällt (20.000 g, 20 min, RT). Nach einem Waschschriff mit eiskaltem Ethanol (70 %) wurde die Plasmid-DNA bei RT getrocknet und in 5 µl sterilem destillierten Wasser aufgenommen.

3.2.4 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Für die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNA gilt: $1 A_{260}/\text{ml} = 50 \mu\text{g DNA}/\text{ml}$. Für reine DNA gilt: $A_{260}/A_{280} = 1,8$.

3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Größenauftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden die DNA-Lösungen und Größenstandards mit $\frac{1}{5}$ Volumen DNA-Probenpuffer versetzt, in die Taschen des horizontalen Agarosegels (1- 1,5 % in TAE-Puffer) gefüllt und bei einer konstanten Spannung von 100 V (Feldstärke: 5 V/cm) aufgetrennt. Die Anfärbung der DNA erfolgte bereits während der Elektrophorese durch Ethidiumbromid, das dem Gel bzw. Puffer zugegeben wurde (0,5 µg EtBr / ml TAE). Alternativ wurden die Gele zur Kontraststeigerung nach der Elektrophorese in TAE-Bädern mit bzw. ohne Ethidiumbromid ge- bzw. entfärbt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter UV-Beleuchtung (266 nm) sichtbar gemacht und mit einem Bild-Dokumentationssystem photographiert.

3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach erfolgter Gelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment bei kurzer Exposition in schwachem UV-Licht (302 nm) aus dem EtBr-gefärbten Agarose-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit Hilfe des „QIAEX Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert und in TE Puffer aufgenommen.

3.2.7 Enzymatische Modifikation von DNA

3.2.7.1 DNA-Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte standardmäßig mit 1 U Restriktionsendonuklease pro μg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 - 50 μl für 60 - 120 min unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Bedingungen bezüglich Puffer und Temperatur. Bei Spaltung mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen erfolgte die Inkubation gleichzeitig in einem für beide Enzyme kompatiblen Puffer. Alternativ wurden nach der ersten Restriktion die Pufferbedingungen angepasst oder es erfolgte ein Pufferwechsel nach einer Filterdialyse bzw. DNA-Präzipitation.

3.2.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Dephosphorylierung von DNA-Enden wurde den Restriktionsansätzen abschließend 1 U alkalische Phosphatase zugegeben und für weitere 30 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (60 °C für 15 min) gestoppt. Die weitere Aufreinigung der dephosphorylierten Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel.

3.2.7.3 Auffüllreaktion von 5'-überstehenden DNA-Enden

Die Reaktion zum Auffüllen von 5'-überstehenden Fragment-Enden mit dNTPs erfolgte in Gegenwart von Klenow-Polymerase (1 U / μg DNA) und 25 μM dNTPs in PCR-Puffer für 30 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min gestoppt.

3.2.7.4 Entfernung von 3'-überstehenden DNA-Enden

3'-überstehende Enden wurden durch Zugabe von T4-DNA-Polymerase (2 - 5 U pro μg DNA) und 0,1 mM dNTPs in T4-Polymerase-Puffer entfernt. Der Ansatz wurde nach Inkubation für 20 min bei RT hitzeinaktiviert (10 min bei 65 °C).

3.2.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Ligase-Pufferbedingungen mit 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA, der fünffachen molaren Menge Insert-DNA und 1 U T4-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 - 15 μl . Die Reaktion erfolgte für 2 - 4 Stunden bei RT (für überhängende DNA-Enden) bzw. über Nacht bei 14 - 16 °C (für glatte DNA-Enden). Ligationsansätze ohne Insert-DNA dienten zur Kontrolle einer Religation des Vektors.

3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionsansätze enthielten standardmäßig 1 - 50 ng Matritzen-DNA, 250 μM dNTP-Mix, 0,5 μM Primer und 1 U DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 μl in den Pufferbedingungen des Polymerase-Herstellers. Vor der PCR-Reaktion wurde die DNA standardmäßig für 2 min bei 94 °C aufgeschmolzen, es folgten 25 Temperaturzyklen und eine abschließende Inkubation bei 72 °C für 10 min. Ein Standardtemperaturzyklus schmolz die DNA für 2 min bei 94 °C auf, die Anbindung der Oligonukleotide an die Einzelstrang-DNA („Annealing“) erfolgte bei 55 °C für 30 s, die Synthesereaktion („Elongation“) erfolgte für 1 min/kb des zu erwarteten Syntheseprodukts beim Temperaturoptimum der verwendeten Polymerasen (72 °C für Taq- bzw. 68 °C für Pfu-Polymerase).

Die Anzahl der Syntheseschritte, die Annealing-Temperatur sowie die Elongationszeit wurden jeweils an die spezifischen Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide bzw. an die Größe des erwarteten Produkts angepasst. Zur Optimierung dieser Reaktions-Parameter wurde eine Temperaturgradienten-PCR-Maschine verwendet.

Analytische PCR-Reaktionen wurden mit Taq-Polymerase durchgeführt, die quantitative Amplifikation von DNA-Fragmenten zur späteren Klonierung erfolgte mit Pfu- bzw. Pfx-Polymerasen, die eine höhere Polymerisationsgenauigkeit besitzen. Die

PCR-Produkte wurden vor ihrer weiteren Verwendung mittels Gelelektrophorese aufgereinigt.

Zum spezifischen Nachweis von transformierter Plasmid-DNA in *E. coli* wurde eine geringe Menge einer Bakterienkolonie direkt in den PCR-Ansatz gegeben („Kolonie-PCR“). Von transformierten *S. cerevisiae* wurde zuvor von einer Hefe-Kolonie eine Spheroblasten-Suspension durch Zugabe von 10 µl Zymolyase-Lösung und Inkubation bei 37 °C für 5 min präpariert, von der 2 µl zur PCR-Reaktion zugegeben wurden.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Grundsätzlich wurde die Integrität aller amplifizierten Sequenzen sowie der Einklonierungen von Genfragmenten in den korrekten Leseraster eines Vektors mittels DNA-Sequenzierung der relevanten Genbereiche verifiziert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde in der institutseigenen Sequenzierungseinrichtung von Ina Wagner bzw. von Dr. Martin Meixner, HU Berlin, und der Firma AGOWA (Berlin) nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten mit dem „*Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*“ (Applied Biosystems) und wurden auf dem Sequenzierautomaten „*373 DNA Sequencer Stretch*“ (Applied Biosystems) analysiert. Die Chromatogramme wurden mit der Software „*Chromas*“ ausgewertet, die Sequenzdaten wurden mit dem Programm „*Clone manager*“ und den Internet-basierten Werkzeugen „BLAST“ und „MULTALIGN“ weiterbearbeitet.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Präparation von Protein-Gesamtzelllysaten

Für die Präparation von Gesamtzelllysaten aus Hefezellen wurde das Zellpellet von 1 ml einer Hefekultur ($OD_{600}=0,5$) in 700 µl vorgewärmten (70°C) Hefe-Aufschlußpuffer resuspendiert, mit ca. 50 µl säurebehandelten Glasperlen versetzt und stark gevortext. Während der Inkubation bei 100 °C für 20 min wurden die Proben immer wieder stark gevortext und nach jeweils 5 min 50 µl frisches PMSF zugesetzt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Lysate durch Zentrifugation (13.000 g, 10 min, RT) geklärt,

die Überstände auf Eis gekühlt und sofort mittels SDS-PAGE aufgetrennt oder bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Präparation von Gesamtzelllysaten von eukaryontischen Zellen wurden die Zellpellets in Proteaseinhibitor-haltigem PBS resuspendiert und in Protein-Probenpuffer für 5 min aufgekocht.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die mit Wasser verdünnten Proteinlösungen gemäß den Angaben des Herstellers mit BCA bzw. Bradford-Reagenz (Bradford, 1976) versetzt und photometrisch gemessen. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden mit Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgekocht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) in horizontalen Laufkammern gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden 5 %ige Sammelgele und ein 10 %ige Trenngele verwendet.

3.3.4 Coomassie-Färbung

Die Protein-Gele wurden bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung bis zu einer intensiven gleichmäßigen Anfärbung inkubiert und anschließend solange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich von der Hintergrundfärbung abhoben. Die Gele wurden anschließend auf Filterpapieren vakuumgetrocknet und photographisch dokumentiert.

3.3.5 Immunoblot (Western-Blot)

Die Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper wurde gemäß den Standard-Protokollen durchgeführt (Harlow, 1988). Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte bei 4°C in Transferpuffer gemäß den Angaben des Herstellers der Blotkammer. Der vollständige Transfer wurde durch reversible Anfärbung der Proteine mit Ponceau-Lösung kontrolliert. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran in Blockpuffer für 1h bei RT oder 4°C über Nacht inkubiert. Die anschließenden Inkubationen mit den Primär- und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte für jeweils 1 h in der

vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in TBST mit 1% Magermilchpulver. Nach allen Inkubationsschritten wurden die Membranen ausgiebig mit TBST unter Schütteln gewaschen. Die Membranen wurden mit den Reagenzien des ECL-Detektionssystems gemäß den Angaben des Herstellers entwickelt und auf Autoradiographie-Filmen exponiert. Um bereits prozessierte Membranen erneut mit alternativen Antikörpern zu behandeln, wurden sie in Stripping-Puffer für 30 min bei 50 °C unter Schütteln inkubiert und ausgiebig in TBST gewaschen.

3.3.6 Ko-Immunpräzipitation

IFN- γ stimulierte bzw. unstimulierte Knochenmarksmakrophagen wurden von den Petrischalen durch Inkubation für 15 min in eiskaltem PBS mit 0,5 mM EDTA abgelöst. Nach zweimaligem Waschen in eiskaltem PBS wurden die Zellpellets in Lysis-Puffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Abtrennung des unlöslichen Materials zentrifugiert (16.000 g, 30 min, 4 °C). Die aufgereinigten Lysatüberstände wurden in Aliquots zu je 0,8 ml aufgeteilt und entweder durch Inkubation mit 10 μ g irrelevantem Maus IgG $_{1\kappa}$ Antikörper oder Serum von nicht-immunisierten Hasen bei 4 °C mit 100 μ l Protein-G Sepharose für 30 min vorgereinigt. Nach der Zentrifugation wurden die Lysate entweder auf Eis belassen oder mit 1 mM GTP- γ -S oder GDP- β -S bei 32 °C für 30 min inkubiert. Die Immunpräzipitation von mHk3 bzw. IIGP erfolgte durch Zugabe von 100 μ l Protein-G-Sepharose und 10 μ g α -IIGP (mAk 5D9) bzw. affinitätsgereinigtem α -hook3 Hasenserum. Nach einer Inkubation bei 4°C für 1 h wurde die Sepharose durch kurze Zentrifugation pelletiert, fünf mal mit Lysis-Puffer und abschließend mit PBS gewaschen. Die Immunkomplexe wurden durch Inkubation in 0,5 ml Eluations-Puffer für 45 min bei 37 °C von der Sepharose gelöst. Die Eluate wurden anschließend lyophilisiert, in Protein-Probenpuffer resuspendiert und kurz aufgekocht. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

3.3.7 Zellfraktionierung

Die Zellen wurden nach dem Ablösen von den Kulturschalen zwei mal mit eiskaltem PBS gewaschen, das Zellpellet in 30 ml hypotonischem Puffer für 5 min bei 4°C vorinkubiert und vorsichtig zentrifugiert (450 g, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die

Zellen in 2 ml hypotonischem Puffer unter Zugabe von Protease-Inhibitoren für 5 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis und wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, die Behandlung der Suspensionen wurde solange fortgeführt, bis 90% der Zellen aufgeschlossen waren. Zellorganellen wie Zellkerne und Mitochondrien wurden aus den Lysaten durch eine Zentrifugation bei 1.000 g für 5 min bei 4 °C entfernt. Die Überstände wurden mit Sukroslösung (Endkonzentration von 8,5 %) versetzt und nochmals zentrifugiert (10.000 g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde verworfen, die Überstände enthielten die löslichen bzw. an intrazelluläre Membranen gebundenen Proteine. Die Anreicherung der löslichen bzw. an zytosolische, Golgi- und ER-Membranen gebundenen Proteinen in distinkten Fraktionen erfolgte in einem Sukrose-Schrittgradienten (Vidugiriene und Menon, 1993). Die geklärten Lysate wurden vorsichtig auf den Sukrose-Gradienten geschichtet und bei 100.000 g für 2 h bei 4 °C ultrazentrifugiert. Die individuellen Fraktionen wurden vorsichtig abgenommen, auf eine Sukrosekonzentration von 8,5 % eingestellt und das darin enthaltene Membranmaterial durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 2 h bei 4°C pelletiert. Die Pellets wurden in 100 µl hypotonischem Puffer aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, wobei jeweils ein zu 10 µg Gesamtprotein äquivalentes Volumen pro Spur aufgetragen wurde, und mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

3.4 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur prokaryontischen rekombinanten Proteinexpression wurden die Vektoren und Bakterienstämme des „pET Expression“-Systems (Novagen) verwendet. Die Sequenzen der 47 kDa GTPasen wurden in ihrer gesamten Länge im passenden Leseraster in die MCS der Vektoren pET22b, pET26b, pET32a, und pET42a so einkloniert, dass die GTPasen mit den vektorkodierten N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen fusionierten (Signalsequenzen für den Proteinexport und Peptidsequenzen für die Affinitätsaufreinigung). Die Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte gemäß den Vorschriften des Handbuchs „*pET System Manual, 10th Ed.*“ (Novagen, 2001) und mit freundlicher Unterstützung von R. Hurwitz (Zentralabteilung für Proteinaufreinigung, MPI-IB Berlin).

3.5 Methoden der Yeast-Two-Hybrid-Analyse

Soweit nicht anders angegeben wurden für die Durchführung der Yeast-Two-Hybrid-Analysen (Y2H) die Protokolle der Handbücher „*MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System*“ (Clontech, 1996) und „*DupLEX-ATM Yeast-Two-Hybrid-System V2.7*“ (Origene, 1998) verwendet. Beide Systeme verwenden zueinander kompatible Komponenten.

3.5.1 Grundkonzept der Y2H-Analysen

Das Yeast-Two-Hybrid System (Y2H) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen (Bartel und Fields, 1995; Chien et al., 1991; Fields und Song, 1989). Es macht sich die Tatsache zu Nutze, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell eigenständigen Untereinheiten bestehen: zum einen aus der DNA-Bindungsdomäne (BD), durch die ein Transkriptionsfaktor an die DNA-Promotorregion bindet, zum anderen aus der Aktivierungsdomäne (AD), die den RNA-Polymerase II Komplex rekrutiert und die Transkription des Gens initiiert (Hope und Struhl, 1986; Keegan et al., 1986). Beide Untereinheiten sind für die Aktivierung der Transkription unerlässlich und normalerweise Domänen ein und desselben Proteins. Werden beide Domänen als separate Proteine in einer Zelle exprimiert, liegen sie physikalisch voneinander getrennt vor, können nicht miteinander assoziieren und die Gentranskription initiieren (Brent und Ptashne, 1985; Ma und Ptashne, 1988). Werden jedoch beide Domänen in unmittelbare räumliche Nähe zueinander gebracht, kann die Transkriptionsaktivität des Komplexes wiederhergestellt werden. Diese Re-Assoziation kann erreicht werden, indem man an beide Domänen Proteine fusioniert, die miteinander physikalisch interagieren und dementsprechend auch ihre Fusionspartner (BD und AD) räumlich zueinander bringt. Prinzipiell können BDs mit beliebigen ADs zur funktionellen Transkriptionskomplexen kombiniert werden (Abbildung 2).

beiden Fusionspartner der Hybride zur Assemblierung eines transkriptionell funktionellen Komplexes, dessen Aktivität durch die Verwendung von geeigneten Promotoren (hier: LexA-Operatoren) und Reportergenen (hier: *lacZ* und *LEU*) gemessen werden kann (Gyuris et al., 1993). Prinzipiell lassen sich in Y2H-Systemen die Interaktionen zwischen bekannten Proteinen untersuchen, oder es kann nach unbekannten Interaktionspartnern gesucht werden, indem man an die AD-Domäne die Sequenzen einer cDNA-Genbibliothek fusioniert, in der potenzielle Interaktionspartner für das *bait* kodiert sind (Abbildung 2).

Das hier verwendete Y2H-System ist eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Y2H-Systeme und arbeitet mit zwei Genreportern (Golemis und Khazak, 1997). Die β -Galaktosidase, die durch ein *LacZ*-Gen auf einem Plasmid kodiert wird, kann Substrate wie X-Gal in Gegenwart von Luftsauerstoff spalten, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Der zweite Reporter, die β -Isopropylmalat-Dehydrogenase wird von dem *LEU2*-Gen kodiert und ist in das Hefechromosom integriert. Dieses Enzym wird für die Synthese von α -Ketoisocaproat, einer unmittelbaren Vorstufe von Leuzin, benötigt. Die eingesetzten *S. cerevisiae*-Stämme sind für die Aminosäure Leuzin auxotroph (ebenso wie für Histidin, Tryptophan und Urazil als Selektionsdruck für die BD-, AD- und die X-Gal-Reporter kodierenden Plasmide, deren exprimierte Enzyme die Auxotrophien ausheben). Durch Zugabe von Galaktose zu den Medien wird die Expression von BD- und AD-Hybriden initiiert (beide stehen unter der Kontrolle eines minimalen GAL1-Promoters, der nicht durch Hefe-eigene Transkriptionsfaktoren induziert werden kann). Assoziieren AD und BD durch eine Interaktion ihrer Fusionspartner miteinander, wird die Leuzin-Auxotrophie aufgehoben und Hefezellen können auf Leuzin-defizienten Minimalmedien wachsen. Zusätzlich kann die Aktivierung des *lacZ*-Gens auf X-Gal-haltigen Festmedien qualitativ *in-vivo* bzw. durch den Umsatz von sensitiveren Substraten wie ONPG *ex-vivo* quantitativ gemessen werden. Mit diesen Eigenschaften verfügt dieses System gegenüber den klassischen Y2H-Analysen eine Vielzahl von Vorteilen:

- die Verwendung des in Hefezellen heterologen LexA-Promotors reduziert unspezifische Signale, wie sie in Systemen auftreten, die Hefe-eigene GAL4-Promotoren nutzen
- Es kann überprüft werden, ob die Fusionsproteine in den Nukleus gelangen und dort an LexA-Operatoren binden können (Grundvoraussetzung zur Durchführung einer Y2H-Analyse)
- durch die Induzierbarkeit der Fusionsprotein-Expression (durch Galaktose) werden mögliche toxische Effekte minimiert
- der Einsatz von zwei voneinander unabhängigen Genreportern erlaubt auch im Falle der Transaktivierung eines Reporters die Durchführung von Analysen
- das lacZ-Reportergen ermöglicht die Quantifizierung des Reportersignals, die die Stärke der Protein-Protein-Interaktion reflektieren kann

3.5.2 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Die in den *prey*-Vektor pJG4-5 einklonierte cDNA-Genbibliothek aus CD4⁺ T-Zellen der Maus (Dr. V. R. Prasad) wurde zunächst amplifiziert, um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA für Y2H-Analysen zu erhalten. Die Amplifikation erfolgte durch Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* und anschließender Präparation der Plasmid-DNA aus den Bakterienkolonien. Um die Komplexität der Bibliothek zu erhalten, wurden insgesamt 4×10^6 Einzelklone propagiert. Die Amplifikation der Bakterien erfolgte auf Selektions-Festmedien, um eine einheitliche Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Transformanden zu ermöglichen und zu gewährleisten, dass die gesamte Bibliothek gleichmäßig amplifiziert bzw. keine cDNAs über- bzw. unterrepräsentiert werden. Pro Transformationsansatz (100 µl kompetente *E. coli*) wurde soviel Ursprungs-DNA eingesetzt, dass 4×10^4 Einzelklone wuchsen. Insgesamt 100 Einzeltransformationen wurden auf antibiotikahaltige LB-Festmedien (Kulturschalen mit 150 mm Durchmesser) gleichmäßig mit sterilen Glasperlen ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert, bis ein gleichmäßiger Bakterienrasen aus distinkten Einzelklonen wuchs. Die Klone wurden mit LB Flüssigmedium abgespült, und aus dem Bakterienpellet mit Hilfe des „Qiagen Mega-Prep-Kits“

hochreine Plasmid-DNA präpariert. Der Titer der Bibliothek wurde in Hefetransformationen bestimmt und die DNA bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.5.3 Analysen zur *bait*-Eignung

S. cerevisiae EGY48 wurde mit den *bait*-Plasmiden transformiert und auf Selektionsmedien (SD Glu –H) kultiviert. Die Expression der *bait*-Proteine erfolgte in Induktions-Flüssigmedium (SD Gal/Raf –H) über Nacht bei 30 °C unter Schütteln. Die Hefezellen wurden anschließend pelletiert (1000 g, 10 min, RT), mit sterilem Wasser gewaschen und ein Gesamtzelllysats präpariert. Die Analyse der *bait*-Expression erfolgte in Western-Blot-Analysen mit einem gegen die LexA-Bindungsdomäne gerichteten Antikörper.

Zur Ermittlung von möglichen toxischen Effekten der *bait*-Proteine in *S. cerevisiae* EGY48 wurde das Wachstum der Hefezellen, die mit den *bait*-Plasmiden vortransformiert wurden, auf Nicht-Induktionsmedium (SD Glu –H) und Induktionsmedium (SD Gal/Raf –H) verglichen. Dazu wurden eine Suspension der Hefezellen als Verdünnungsreihe ausplattiert und nach 3-7 Tagen die Koloniezahl ermittelt.

Die Überprüfung einer Autoaktivierung der *LEU*- und *lacZ*-Genreporter durch die *bait*-Proteine erfolgte in unterschiedlichen *S. cerevisiae* Stämmen, deren *LEU*-Genreporter bzw. *lacZ*-Reporterplasmide eine unterschiedliche Anzahl von LexA-Bindungsstellen besitzen. Die *S. cerevisiae* Stämme (bereits vortransformiert mit den *lacZ*-Reporterplasmiden [poplacZ] und kultiviert auf SD Glu -U) wurden mit den *bait*-Plasmiden und dem leeren *prey*-Vektor pB42AD kotransformiert und auf Festmedien kultiviert (SD Glu –H,T,U). Anschließend wurden diese Zellen in Verdünnungsreihen auf Leuzin-defiziente Induktionsfestmedien (SD Gal/Raf –H,T,U,L) ausgebracht und gleichzeitig der Titer der Suspensionen auf Nicht-Induktionsmedien (SD Glu –H,T,U) bestimmt. Die Anzahl der nach 10 Tagen gewachsenen Klone auf den Leuzin-defizienten Medien reflektiert das Autoaktivierungspotential des *bait*-Proteins für den *LEU*-Genreporter. Zur qualitativen Ermittlung des *lacZ*-Autoaktivierungspotentials von *bait*-Proteinen wurden diese Transformanten auf

X-Gal-haltigen Induktions-Festmedien kultiviert (SD Gal/Raf/XGal –H,T,U) und nach 2-4 Tagen optisch auf eine Blaufärbung untersucht.

Um zu überprüfen, ob die *bait*-Plasmide in den Nukleus eindringen und dort an LexA-Operatoren binden können, wurden sog. „Repressionsanalysen“ durchgeführt. *S. cerevisiae* EGY48 wurde mit dem Reporterplasmid pJK101 und den bait-Plasmiden kotransformiert und auf Selektionsmedien (SD Glu –H,U) kultiviert. pJK101 enthält einen lacZ-Genreporter, der unter der Kontrolle von LexA-Operatoren steht und zusätzlich „Upstream Activating Sequences“ (AUS-Gal) in 5' Lage zu den LexA-Bindungsstellen besitzt. Diese AUS-Gal bewirken die Bindung des Hefe-eigenen Gal4-Transkriptionsaktivators, der vom endogenen Gal80-Repressor in Galaktose-freiem Medium in seiner Funktion gehemmt wird. In Anwesenheit von Galaktose dissoziiert der mit Galaktose beladene Gal80-Repressor vom Gal4-Regulatorprotein ab. Dies würde normalerweise die Transkription des lacZ-Reporters initiieren. Sollte jedoch das ko-exprimierte *bait*-Protein in den Zellkern eintreten und dort an die LexA-Operatoren binden, wird die Transkription des lacZ-Reportergens durch sterische Hemmung verhindert. Zur semiquantitativen Bestimmung der lacZ-Genreporteraktivität von pJK101 wurden die Kotransformanten (bzw. pJK101 alleine als Kontrolle) auf Induktionsfestmedien kultiviert (SD Gal/Raf/XGal –H,U bzw. SD Gal/Raf/XGal -U). Die Verringerung der Blaufärbung der Klone (im Vergleich zu pJK101 alleine) nach 4-6 Tagen korreliert mit der Bindungseffizienz der *bait*-Proteine und die LexA-Operatoren.

3.5.4 Analyse der cDNA-Genbibliothek („Screen“)

Um die Transformationseffizienz zu steigern wurden die cDNA-Genbibliothek kodierenden *prey*-Plasmide in *S. cerevisiae* EGY48[p8oplacZ] transformiert, die bereits die *bait*-Plasmide enthielten. Die Transformation eines repräsentativen Anteils der cDNA-Genbibliothek erfolgte dabei in mehreren separaten Transformationsansätzen, um den gleichzeitigen Transfer mehrerer *prey*-Plasmide in die Hefezellen möglichst gering zu halten (ca. 30-50 Einzeltransformationen mit 1 µg Genbibliotheks-DNA pro Transformationsansatz). Die Transformationsansätze wurden mit Glasperlen gleichmäßig auf Festmedien (SD Gal –H,T,U) in großen Kulturschalen (24x24 cm) ausgebracht und für 3-4 Tage kultiviert, bis ein gleichmäßiger Zellrasen wuchs. Die

Kolonien wurden mit sterilem Wasser abgespült, mehrfach mit Wasser gewaschen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Alternativ zu der Amplifikation der Transformanden auf Festmedien wurden die Transformanden sofort nach der Transformation in Glukose-haltigem Selektions-Flüssigmedium (SD Glu –H,T,U) für 2 Stunden bei 30°C geschüttelt, mehrfach mit Wasser gewaschen und sofort für die Interaktionsanalyse verwendet. Durch diese Methodik werden nicht die Transformanden selbst, sondern die eingebrachten Plasmide amplifiziert.

Die Interaktionsanalysen zwischen den *bait*-Proteinen und den in der cDNA-Genbibliothek kodierten *preys* erfolgte durch Ausplattieren der Kotransformanden auf Leuzin-defizienten Selektions-Induktionsmedium (SD Gal/Raf –H,T,U,L) und Inkubation bei 30 °C bis zu 10 Tagen. Die gewachsenen Leuzin-prototrophen Hefeklone (*LEU*⁺) wurden von den Platten mit sterilen Impfösen abgenommen, in 96well-Mikrotiterplatten unter nicht-induktiven Bedingungen in Flüssigmedium propagiert (200 µl SD Glu –H,T,U; 30 °C unter Schütteln für 24 h) und nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser bei -80°C eingefroren.

3.5.5 Phänotyp-Validierung

Um zu überprüfen, ob die in der Interaktionsanalyse identifizierten *LEU*⁺ Klone beide Genreporter reproduzierbar aktivieren, wurden die Klone aus den Mikrotiterplatten mit einem sterilen Replika-Stempel auf Festmedien ausgestempelt und bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde die Aktivierung des *LEU*-Genreporters (SD Gal/Raf –H,T,U,L) bzw. des *lacZ*-Genreporters (SD Gal/Raf/XGal –H,T,U) separat bzw. in Kombination (SD Gal/Raf/XGal –H,T,U,L) getestet. Durch Ausstempeln der Klone auf Glukose-haltige Medien (SD Glu –H,T,U,L bzw. SD Glu/XGal –H,T,U) wurde überprüft, ob die Aktivierung der Genreporter in Abhängigkeit der Galaktose-Induktion erfolgt. Klone mit positiven Genreportersignalen (*LEU*⁺ *lacZ*⁺) wurden durch Verdünnungsausstriche (auf SD Glu –H,T,U) vereinzelt und in weiteren Analysen jeweils fünf Einzelklone untersucht.

3.5.6 Analyse der *prey*-kodierenden Plasmide

Die Expression der *prey*-Proteine in *LEU⁺ lacZ⁺* Klonen wurde mittels Western-Blot-Analyse mit einem gegen die HA-Domäne gerichteten Antikörper untersucht. Zur weiteren Analyse der *prey*-kodierenden Plasmide wurden die Plasmide der *LEU⁺ lacZ⁺* Klone isoliert, in den *E. coli* Stamm KC8 mittels Elektroporation transformiert und auf Tryptophan-defizienten Medien diejenigen Klone, die *prey*-Plasmide enthielten, selektioniert. Die Plasmide der *Trp⁺* KC8-Klonen wurden erneut präpariert, in *E. coli* DH5 α retransformiert und im präparativen Maßstab isoliert. Das cDNA-Insert wurde aus dem *prey*-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* herausgeschnitten und seine Größe mittels Gelelektrophorese überprüft. Mittels PCR wurden die cDNA-Inserts der *prey*-Plasmide amplifiziert, die PCR-Produkte anschließend mit *HaeIII* restringiert und in einer Gelelektrophorese (2% Agarose) aufgetrennt. Anhand der spezifischen Restriktionsmuster („Fingerprints“) ließen sich identische Bibliotheks-Inserts identifizieren und vorsortieren. Die Identität der cDNAs wurde abschließend mittels DNA-Sequenzierung ermittelt.

3.5.7 Rekonstitutionstransformation zur Phänotyp-Validierung

Die in den Interaktionsanalysen identifizierten und isolierten *prey*-kodierenden Plasmide wurden zusammen mit den *bait*-kodierenden Plasmiden in *S. cerevisiae* EGY48[p8oplacZ] kotransformiert, auf Festmedien (SD Glu –H,T,U) selektioniert und wie unter 3.5.5 beschrieben die Aktivierung der *LEU*- bzw. *LacZ*- Genreporter einzeln oder in Kombination getestet.

3.5.8 Quantitative Bestimmung der *lacZ*-Genreporteraktivität

Im verwendeten Y2H-System kann die β -Galaktosidase-Aktivität die Stärke der Interaktion zwischen *bait* und *prey* reflektieren. Während die Kultivierung von *S. cerevisiae* EGY48[p8oplacZ] Kotransformanden auf X-Gal-haltigen Festmedien eine qualitative Bestimmung der *lacZ*-Genreporteraktivität ermöglicht, erlaubt der Umsatz des Substrats ONPG in Flüssigkeit die quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.

S. cerevisiae EGY48[p8oplacZ] Kotransformanten wurden in Induktions-Flüssigmedium (SD Gal/Raf –H,T,U) bei 30 °C unter Schütteln für 5 Stunden inkubiert und zu einer OD₆₀₀=0,5 normalisiert. Die Zellen aus 1 ml Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 1,5 ml Z-Puffer gewaschen und in 300 µl Z-Puffer resuspendiert. 100 µl dieser Suspensionen wurden durch fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und sofortigem Auftauen bei 37 °C (Wasserbad) aufgeschlossen und abschließend mit 700 µl β-ME-haltigen Z-Puffer versetzt und gevortext. Den Lysaten wurden 160 µl ONPG-Lösung zugegeben. Die Reaktionen erfolgten bei 30 °C bis zur Gelbfärbung und wurden durch Zugabe von 400 µl 1M Na₂CO₃ gleichzeitig abgestoppt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und die Überstände bei 420 nm spektralphotometrisch gemessen. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller Units ermittelt (β -Galaktosidase-Unit= $1000 \times OD_{420} / (\text{Inkubationszeit}[\text{min}] \times 0,5 \text{ ml} \times OD_{600})$), die den Umsatz von 1 µmol ONPG zu o-Nitrophenol und D-Galactose pro Minute pro Zelle angeben (Miller, 1972).

3.6 Tierexperimente

Die Tierhaltung sowie alle tierexperimentellen Eingriffe erfolgten gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes.

3.6.1 Präparation primärer Knochenmarksmakrophagen

Die Generierung von Knochenmarksmakrophagen erfolgte gemäß dem Protokoll von Falk und Vogel (1990). Tibiae und Femura aus C57BL/6 Mäusen wurden steril präpariert und das Knochenmark mit Zellkulturmedium ausgespült. Nach Zentrifugation der Zellen (1000 g, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in kaltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die Zellen zwei mal mit Medium gewaschen. 4×10^6 Knochenmarkszellen wurden auf Petrischalen ohne beschichtete Oberfläche in 10 ml Differenzierungsmedium angezüchtet. Nach 4 Tagen wurden der Kultur weitere 10 ml Differenzierungsmedium zugegeben. Nach 7-8 Tagen wurden die differenzierten Makrophagen mit eiskaltem PBS mit 0,5 mM EDTA von den Kulturschalen abgelöst, in PBS gewaschen und entweder sofort verwendet oder zur Langzeitlagerung cryokonserviert.

3.6.2 Präparation von *Toxoplasma gondii*

T. gondii Erreger wurden großzügig von der Arbeitsgruppe von Prof. O. Liesenfeld (Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Erreger, die im Rhythmus von 3-4 Tagen passagiert wurden, wurden frisch aus dem Intraperitoneum von infizierten Mäusen unter sterilen Bedingungen isoliert, in PBS (4°C) gewaschen und der Titer bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung in *in-vitro*-Infektionsexperimenten wurden die Erreger bis zu maximal 4 h in PBS (4 °C) lichtgeschützt aufbewahrt.

3.6.3 Protein-Immunisierung

Weibliche Balb/c Mäuse (6-8 Wochen alt) wurden mit den Affinitäts-aufgereinigten rekombinaten 47 kDa GTPasen immunisiert. Das Immunisierungsprotokoll folgte den Empfehlungen des Herstellers der Adjuvanzen (Linaris). Es wurden 50 µg rekombinantes Protein in Adjuvanz I subkutan am Schwanzansatz injiziert. Nach 7 Tagen wurde diese Injektion wiederholt. Nach weiteren 14 Tagen wurden 50 µg rekombinantes Protein in Adjuvanz II intraperitoneal injiziert. Nach weiteren 3 Tagen wurden durch vorsichtiges Einschneiden der Schwanzspitze ca. 20 µl Blut entnommen. Die zellulären Bestandteile wurden abzentrifugiert (5000 g, 15 min, 4°C) und die Seren in Western-Blot-Analysen getestet.

3.7 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C, 7 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Adhärenente Zellen wurden durch Inkubation in Trypsin/EDTA-Lösung von Kulturschalen abgelöst. Nach 3-5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt, die Zellen in PBS gewaschen und in einer Verdünnung von max. 1:10 passagiert. Zur Ermittlung der Zellzahl sowie der Zellvitalität wurden die Zellsuspensionen mit einem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung versetzt und lichtmikroskopisch untersucht. Alle Zelllinien wurden regelmäßig von M. Stäber (MPI-IB, Berlin) auf Mycoplasmen-Kontaminationen getestet und gegebenenfalls saniert.

3.7.1 *In-vitro*-Infektionen

Die für *in-vitro*-Infektionen verwendeten cryokonservierten Zelllinien Send, McCoy, RAW-B und BAC wurden von den Abteilungen für Molekulare Biologie und Zelluläre Mikrobiologie des MPI-IB zur Verfügung gestellt. Die *in-vitro*-Infektionen dieser Zelllinien mit Chlamydien und Listerien erfolgte gemäß den Infektionsschutzbestimmungen und wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. U. Schaible und J. Enders (MPI-IB, Berlin) durchgeführt. Die auf Glasobjektträgern kultivierten Zellen wurden mit den Erregern (in PBS) für unterschiedliche Dauer in einem Volumen von max. 150 µl inkubiert. Nach dem Infektionszyklus wurden die Erreger durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt, die Zellen wie unter 3.8.1 fixiert und permeabilisiert und bis zur weiteren Analyse bei 4°C in Blockpuffer aufbewahrt. Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden *T. gondii* Erreger mit Hämatoxylinlösung angefärbt und zur Kontraststeigerung kurz in Wasser entfärbt.

3.8 Mikroskopie

3.8.1 Fluoreszenz- und Konfokale Mikroskopie

Die auf Deckgläsern kultivierten Zellen wurden mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert, mit 0,1 % Triton-X in PBS für 5 min permeabilisiert und mit Blockpuffer für 30 min vorbehandelt. Alternativ wurden die Zellen für eine Anfärbung von Zytoskelettkomponenten zur besseren Strukturhaltung in eiskaltem Methanol für 10 min fixiert, 1 min in eiskaltem Azeton inkubiert und luftgetrocknet. Die Objektträger wurden für 60 min mit den entsprechenden Primärantikörpern in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen in Blockpuffer inkubiert. Um Artefaktfärbungen durch Antikörperpräzipitate zu vermeiden, wurden alle Antikörperlösungen vor ihrer Verwendung zentrifugiert (13.000 g, 15 min, 4 °C) und für Färbungen die geklärten Überstände verwendet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern in Blockpuffer für 60 min. Zwischen diesen Schritten wurden die Objektträger vorsichtig mit 0,05 % Tween-20 in PBS fünf mal gewaschen. Die Proben wurden mit Molviol eingebettet und mit einem Fluoreszenzmikroskop bzw. einem konfokalen Laserscan-Mikroskop analysiert.

3.8.2 Elektronenmikroskopie

Die Transmissions-Elektronenmikroskopischen Analysen von NIH/3T3 Fibroblasten, die ektopisch IIGP bzw. IIGP[S83N] exprimieren, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. V. Brinkmann und B. Fauler (Zentralabteilung für Mikroskopie des MPI-IB, Berlin) durchgeführt. Die Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde von Prof. Alice Warley (King's College, Department for Electron Microscopy, London) mit freundlicher Unterstützung von Dr. H. Collins (King's College London, Department for Life Sciences, Grossbritannien) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation von Protein-Interaktionspartnern für 47 kDa GTPasen mit Yeast-Two-Hybrid-Analysen

In Analogie zu den generellen Eigenschaften von GTPasen (Vetter und Wittinghofer, 2001) besteht die Annahme, dass die Interaktionen der 47 kDa GTPasen konformationsabhängig und transient erfolgen und als eher schwache Interaktionen entsprechend schwer mit konventionellen biochemischen *in-vitro* Methoden nachzuweisen sind. Eine Möglichkeit, solche Protein-Protein-Interaktionen trotzdem zu identifizieren, bietet das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H). Es erlaubt die Detektion von Interaktionen über einen längeren Zeitraum in einem *in-vivo* Milieu, das den Bedingungen, unter denen die Interaktion natürlicherweise stattfinden würde, recht nahe kommen kann (siehe detaillierte Beschreibung des verwendeten Y2H unter 3.5).

In Yeast-Two-Hybrid-Systemen kann die Fusionierung von größeren Proteinen oder Proteinanteilen an die DNA-Bindungs- (BD) bzw. Aktivierungsdomäne (AD) die Komplexierung zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor derart stören, dass die Identifikation von Interaktionen erheblich erschwert oder ganz unmöglich wird. Daher ist es oft vorteilhaft, lediglich kurze Proteinbereiche, die möglichst funktionelle Domänen repräsentieren, zu fusionieren. Dennoch wurden die 47 kDa GTPasen (IGTP, GTPI, LRG-47, TGTP, IIGP und IRG-47) in ihrer vollständigen Größe verwendet, denn distinkte funktionelle Domänen waren, mit Ausnahme der GTPase-Domäne, für die 47 kDa GTPasen nicht identifizierbar. Andererseits sollte die Ausbildung derjenigen Konformation, die für eine Interaktion erforderlich ist, bei Verwendung der vollständigen GTPase-Proteinsequenz am wahrscheinlichsten sein.

Die für die 47 kDa GTPasen kodierenden cDNAs wurden mit spezifischen Oligonukleotiden, deren Sequenzen von den verfügbaren Datenbank-Sequenzdaten abgeleitet wurden (www.ncbi.nlm.nih.gov), von Maus-cDNA amplifiziert und die Integrität der PCR-Produkte mittels DNA-Sequenzanalysen verifiziert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend so in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Hefe-Expressionsvektors pGilda einkloniert, dass der von der DNA-Bindungsdomäne LexA vorgegebene Leseraster erhalten blieb und ein LexA-GTPase-Hybrid („bait“) entsteht.

Die korrekte Größe der in Hefe exprimierten LexA-GTPase-Fusionsproteine wurde in einer Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 3).

4.1.1 Eignung der 47 kDa GTPasen

Die Durchführung eines Y2H zur Identifikation von bisher unbekannten Protein-Interaktionspartnern für die 47 kDa GTPasen ist nur dann möglich, wenn die Expression dieser GTPasen in Hefe bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllt. Die heterologen GTPasen sollten für die Hefezellen nicht toxisch sein, ihre Expression darf die verwendeten Reportergene (*LEU* zur Aufhebung der Leuzin-Auxotrophie und *lacZ* zur Expression von β -Galaktosidase) nicht alleine, d.h. ohne eine spezifische Interaktion mit Aktivierungsdomänen-Fusionen (*“preys”*), initiieren und die Fusion an die LexA-DNA-Bindungsdomäne darf weder deren Transport in den Nukleus, noch die Anbindung an LexA-Operatoren behindern.

Expression der LexA-GTPase-Fusionsproteine

Die Expression der *bait*-Proteine in *S. cerevisiae* EGY48 wurde in Western-Blot-Analysen überprüft (Abbildung 3). Alle klonierten 47 kDa GTPasen ließen sich in der zu erwarteten Größe als LexA-Fusionen detektieren, wobei sich das Expressionsniveau signifikant unterschied. Lediglich IRG-47 zeigte zusätzlich geringe Mengen eines verkürzten Produkts, das möglicherweise durch proteolytischen Abbau oder vorzeitigen Translationsabbruch entsteht.

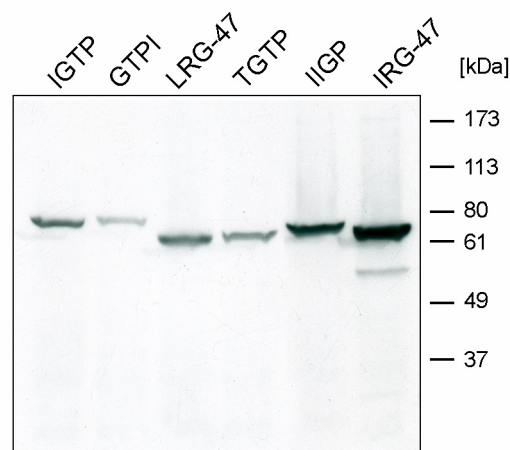


Abbildung 3: Qualitative und quantitative Western-Blot-Analyse der Expression von LexA-GTPase-Fusionsproteinen in *S. cerevisiae* EGY48

(Fortsetzung Abbildung 3)

EGY48 wurde mit den pGilda-GTPase-Vektoren transformiert, auf nicht-induktiven Festmedien (SD Glu –H) selektioniert und in Flüssigmedium angezogen. Die Induktion erfolgte in Flüssigmedium (SD Gal/Raf –H) für 12 h bei 30°C unter Schütteln. Es wurden jeweils äquivalente Mengen Gesamtzelllysate elektrophoretisch aufgetrennt und die LexA-GTPase-Fusionsproteine mit einem monoklonalen, gegen die LexA-DNA-Bindungsdomäne gerichteten Antikörper detektiert. Die molekulare Größe der Expressionsprodukte ergibt sich aus der Summe der GTPase-Größe (ca. 47 kDa) und der LexA-Bindungsdomäne (25 kDa).

Toxizität

Die Überexpression der heterologen 47 kDa GTPasen kann für die Hefezellen toxisch sein. Da im Interaction-Trap-System positive Interaktionspartner aus einer komplexen cDNA-Bibliothek durch eine Wachstumsselektion identifiziert werden, darf die Überexpression der GTPasen selbst das Wachstum von *S. cerevisiae* EGY48 nicht inhibieren (bzw. fördern, siehe Autoaktivierung). Um den Einfluss der GTPasen auf das Wachstum von *S. cerevisiae* EGY48 zu ermitteln, wurden eine identische Anzahl von LexA-GTPase-Transformanten auf Festmedien unter Induktionsbedingung bzw. ohne Induktion ausplattiert. Nach zwei Tagen wuchsen ebenso viele GTPase-exprimierende Klone wie unter nicht-induktiven Bedingungen, die sich auch in ihrer Größe nicht unterschieden (Tabelle 1). Die Expression der GTPasen hemmte demzufolge nicht das Wachstum von *S. cerevisiae* EGY48.

Autoaktivierung der LEU- und lacZ-Selektionsreporter

Zur Selektion von Interaktionspartnern aus einer komplexen cDNA-Bibliothek muss ausgeschlossen werden, dass die GTPase-Fusionsproteine per se die verwendeten Genreporter aktivieren. Um mögliche Autoaktivierungen der *LEU*- und *lacZ*-Selektionsreporter zu testen, wurden die GTPase-baits in Kombination mit der B42-Aktivierungsdomäne bzw. irrelevanten preys exprimiert und das prototrophe Wachstum auf Leuzin-defizienten Medien (*LEU*⁺) bzw. die Blaufärbung der Klone durch eine β -Galaktosidase-Aktivität (*lacZ*⁺) auf X-Gal-haltigen Medien getestet (Tabelle 1). Um zu überprüfen, welche maximale Sensitivität die Genreporter haben dürfen, ohne transaktiviert zu werden, wurde diese Analyse mit *S. cerevisiae* EGY-Stämmen bzw. *lacZ*-Reporterplasmiden durchgeführt, deren Reportergene eine unterschiedliche Anzahl von LexA-Operatoren besitzen (6/2/1x OpLexA für *LEU* bzw.

8/2/1x OpLexA für *lacZ*). Unter den gewählten Testbedingungen konnte auch bei maximaler Sensitivität keine relevante Reporter-Aktivierung festgestellt werden. Das schwache prototrophe Wachstum von GTPase-bait-Transformanten auf Leuzin-defizienten Medien ab Tag 6 erfolgte unabhängig von der Sensitivität der Reporter und reflektiert daher vermutlich nicht ein Aktivierungspotenzial von IIGP, sondern ist eine vom Reportersystem unabhängige physiologische Folge der Überexpression dieser GTPase in *S. cerevisiae* EGY48. Diese geringe Wachstumsautoaktivität an Tag 5/6 stellte nach Optimierung der experimentellen Parameter (siehe Kap. 3) kein Hindernis für die Durchführung einer komplexen Y2H-Analyse dar, denn relevante Interaktionen wurden nach einer Wachstumsselektion für 3-4 Tage erwartet. Eine GTPase-inaktive IIGP-Mutante (IIGP[S83N]), die analog zu publizierten GTPase-Mutanten (Dugan et al., 1995; Feig, 1999; Taylor et al., 1997) durch einen singulären Aminosäureaustausch in der GTPase-Bindungsdomäne vermutlich in einer GDP-gebundenen, inaktiven Konformation arretiert ist, besaß kein Autoaktivierungspotenzial.

Kerngängigkeit & LexA-Bindungstest

Zur Aktivierung der Genreporter des Y2H-Systems müssen die *baits* in den Nukleus transportiert werden und dort an LexA-Operatoren binden können. Beide Voraussetzungen wurden überprüft, indem zusätzlich zu den GTPase-*baits* das Reporterplasmid pJK101 in *S. cerevisiae* EGY48 kotransformiert wurde, das die Anbindung der *baits* an LexA-Operatoren durch eine Verringerung der β -Galaktosidase-Expression quantitativ reflektieren kann (Tabelle 1). In diesem Test zeigten die GTPase-*baits* gemäß der Verringerung der *lacZ*-Signalstärke ein unterschiedliches Potential, im Nukleus an LexA-Operatoren zu binden (mäßig: LRG-47, IGTP; gut: GTPI, IIGP, IIGP[S83N]; optimal: IRG-47, Kontrollen).

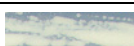
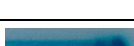
BD: LexA+	Expression	Toxizität	Auto-Aktivierung		Kernlokalisierung & LexA- Bindungsfähigkeit	
			<i>LEU</i>	<i>lacZ</i>		
IGTP	+	-	-	-		(+)
GTPI	+	-	-	-		++
LRG-47	+	-	-	-		(+)
TGTP	+	-	-	-		+
IRG-47	+	-	-	-		+++
IIGP	+	-	d 5/6 (schwach)	d 5 (sehr schwach)		++
IIGP [S83N]	+	-	-	-		++
Lam p53 Drosophila bicoid	+	-	-	-	  	+++
						(pJK101)

Tabelle 1: Charakterisierung der Eigenschaften der 47 kDa GTPasen im Y2H-System

Die Expression der LexA-GTPase-Fusionsproteine in *S. cerevisiae* EGY48 wurde durch Western-Blot-Analysen verifiziert (Abbildung 3). Mögliche toxische Effekte der GTPasen wurden ermittelt, indem gleiche Mengen von GTPase-*bait*-transformierten EGY48 auf induktive (SD Gal/Raf -H) bzw. nicht-indukiven Selektionsmedien (SD Glu -H) bei 30 °C über 10 d angezogen wurden. Das Autoaktivierungspotenzial der GTPasen wurde in Gegenwart von mehreren irrelevanten *preys* (AD alleine, AD-large T, AD-target) in EGY-Stämmen mit unterschiedlicher Leuzin-Sensitivität (EGY48, EGY194, EGY188, EGY40) und Reporterplasmiden mit unterschiedlicher *lacZ*-Sensitivität (p8oplacZ, pJK103, pRB1840) getestet. Die Aktivierung des *LEU*-Reporters wurde auf Induktionsmedien ohne Leuzin (SD Gal/Raf -H,T,L), die des *lacZ*-Reporters auf X-Gal-haltigen Induktionsmedien (SD Gal/Raf/XGal -H,T) innerhalb einer Inkubationsdauer von 12 d bei 30°C getestet. Die Abschwächung der Blaufärbung in pJK101-Kotransformatanten im Vergleich zur maximalen Färbung ohne Expression einer BD reflektiert der Grad der Kerngängigkeit der GTPase-*bait*s und ihre Bindungsfähigkeit an LexA-Operatoren (ermittelt auf X-Gal-haltigen Induktionsplatten (SD Gal/Raf/XGal -H,U) nach 48 h). Die qualitative Bewertung repräsentiert das Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Grundsätzlich wurden in allen Experimenten zahlreiche interne Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt (nicht gezeigt, siehe 2.11.5.2).

Die in Tabelle 1 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass alle 47 kDa GTPasen grundsätzlich die Mindestkriterien erfüllten, um mit den Methoden des Y2H innerhalb von cDNA-Bibliotheken nach unbekannten Protein-Interaktionspartnern zu suchen.

4.1.2 Eignung der cDNA-Genbibliotheken

Ebenso wie Fusionen an die BD können AD-Hybride („*preys*“) die Reportergene transaktivieren. Die Fusion der zahlreichen in einer cDNA-Bibliothek kodierten Proteine an die AD kann deshalb im Y2H-System zu einem erheblichen Hintergrundsignal führen und die Detektion von spezifischen Interaktionssignalen erheblich erschweren. Um das Autoaktivierungspotenzial der *preys* der beiden verwendeten cDNA-Genbibliotheken (aus CD4⁺ T-Zellen bzw. der kompletten Milzzellpopulation) zu überprüfen, wurde ein repräsentativer Anteil beider cDNA-Bibliotheken in *S. cerevisiae* EGY48 zusammen mit der unfusionierten LexA-BD kotransformiert. Von ca. 1×10^5 Kotransformanten (repräsentiert ca. 1/30 der gesamten Komplexität der cDNA-Bibliotheken) wuchsen lediglich 3 Klone unter Leuzin-defizienten selektiven Wachstumsbedingungen zu sehr späten Zeitpunkten (Tag 8), und nur 2 Klone zeigten an Tag 6 eine schwache Blaufärbung. Beide cDNA-Bibliotheken eignen sich mit ihrer geringen Autoaktivierungsfrequenz, die ebenso die spontane Mutationsrate von *S. cerevisiae* EGY48 unter diesen Selektionsbedingungen reflektieren könnte, sehr gut für die Durchführung einer umfangreichen Suche nach neuen, unbekannten Protein-Interaktionspartnern mit dem Y2H-System.

4.1.3 Y2H-Vorversuche mit 47 kDa GTPasen

Es wurden zunächst Y2H-Analysen im kleinen Maßstab mit einem kleinen Anteil der Genbibliothek durchgeführt, um das Verhalten der GTPase-*baits* in Kombination mit den cDNA-Bibliothek-*preys* vorab zu testen. Die in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass für alle GTPasen prinzipiell positive Signale erwartet werden konnten, wobei sich bei der Kultivierung der einzelnen GTPasen unter Selektionsbedingungen sowohl der Zeitpunkt, zu dem prototrophes Wachstum detektiert werden konnte, als auch die Anzahl und Signalqualität (Größe bzw. Blaufärbung) der Klone erheblich differierte. Eine Doppelsektion auf Festmedien (prototrophe Selektion auf Leuzin-defizienten Medien und gleichzeitige Farbreaktion durch

Umsetzung von X-Gal) führte zu einer erheblichen Verringerung der Klonanzahl. Dieser Effekt wurde bereits beschrieben (Golemis, 1997) und könnte auf toxische Effekte von umgesetztem X-Gal zurückzuführen sein.

Die Anzahl der erhaltenen Klone schien mit der Fähigkeit der GTPase-*bait*s, in den Nukleus transportiert zu werden und dort an LexA-Operatoren binden zu können, zu korrelieren (vgl. Tabelle 1). Die Signalstärke könnte jedoch auch das unterschiedliche Expressionsniveau der GTPasen reflektieren. Früh detektierbare Signale entsprechen erwartungsgemäß tatsächlichen Interaktionen, während die zu späteren Zeitpunkten auftretenden Signale häufig auf eine unspezifische Hintergrundaktivität zurückzuführen sind. Für jede GTPase ergab sich deshalb ein individuelles zeitliches Fenster, in dem die Detektion von spezifischen Interaktionen am wahrscheinlichsten war. Anhand dieser Ergebnisse wurden die experimentellen Bedingungen für die GTPasen individuell so optimiert, dass bei der Suche nach Interaktionspartnern die gesamte Komplexität der cDNA-Bibliotheken mehrfach abdeckt wurde.

Selektion	Leu							Leu + lacZ
	3	4	5	6	7	8	9	9
[d]								
GTPase								
IGTP	-	-	-	4	3	6	3	2 (weiß)
GTPI	-	15	23	80	100	20	>100	≈130 weiß ≈ 20 klein, tiefblau
LRG-47	-	-	-	-	2	3	34	3 (groß, tiefblau)
TGTP	-	-	-	1	4	7	16	-
IRG-47	-	9	17	≈300	n.b.	n.b.	n.b.	22 weiß, 2 blau
IIGP	-	4	8	≈100	≈300	n.b.	n.b.	>200 (klein, weiß)
IIGP[S83N]	-	-	-	-	-	1	3	-

Tabelle 2: Vortest einer Y2H-Analyse mit den 47 kDa GTPasen und einem Anteil der CD4⁺-cDNA-Bibliothek

(Fortsetzung Tabelle 2)

1 µg der *prey*-cDNA-Bibliothek-DNA (CD4⁺) wurde in EGY48[p8opLacZ], in die bereits GTPase-*bait*s enthält, transformiert. Die Effizienz dieser sequenziellen Transformation lag bei ca. 5x10⁴ Klonen / µg DNA (titriert auf SD Glu –H,T,U). Nach einer Plasmidamplifikation wurden die Zellen entweder unter *LEU*-Wachstumsselektion (SD Gal/Raf –H,T,U,L) oder *LEU*⁺*LacZ*⁺ Doppelselektion (SD Gal/Raf/XGal –H,T,U,L) für 9 d bei 30 °C inkubiert. Die Zahlen geben die Anzahl der an dem Tag nach der Transformation gewachsenen Klone an. Die mitgeführten Positivkontrollen waren an d 3-4 detektierbar, die Negativkontrollen zeigten entweder kein Signal oder waren sehr spät an d 8-9 schwach positiv. n.b.= nicht bestimmt: die Zahl der Einzelklone konnte nicht bestimmt werden, da die Platte vollständig mit einem dichten Zellrasen bewachsen war.

4.2 Identifikation und Charakterisierung von IIGP-Interaktionspartnern

4.2.1 Y2H-Analysen mit der GTPase IIGP

In einer Y2H-Analyse sollten gemäß den Empfehlungen ca. 2x10⁶ unabhängige Transformanden einer Säugetier-cDNA-Genbibliothek auf eine Interaktion mit einem *bait* untersucht werden, um die gesamte Komplexität der in der cDNA-Bibliothek kodierten Protein(-fragmente) abzudecken. Für eine optimale Transformationseffizienz wurde das IIGP-*bait* und die cDNA-Bibliothek-*preys* sequenziell in *S. cerevisiae* EGY48[p8oplacZ] transformiert. Aus dem Transfer von jeweils 30 µg DNA der CD4⁺- bzw. der Milzzell-cDNA-Bibliothek gingen jeweils ca. 1,8 x 10⁶ unabhängige Hefe-Transformanden hervor, deren *bait* und *prey*-kodierende Plasmide durch Wachstum auf Selektionsmedien (SD Glu –H,T,U) zunächst amplifiziert wurden. Die dreifache Anzahl dieser Ursprungstransformanden wurde unter Leuzin-defizienten Wachstumsbedingungen (SD Gal/Raf –H,T,U,L) für 12 Tage bei 30 °C auf Festmedien selektioniert. Da die Expression des IIGP-*bait*s in *S. cerevisiae* EGY48 in einem schwachen Wachstum auf Leuzin-defizienten Festmedien ab Tag 6 resultierte, wurden bevorzugt diejenigen prototrophen Klone weiter analysiert, die zu einem frühen Zeitpunkt der Wachstumsselektion zwischen Tag 3 und Tag 6 detektierbar waren. Jeweils ca. 400 prototrophe Klone wurden vereinzelt, ohne weitere Wachstumsselektion (SD Glu –H,T,U) passagiert und anschließend in mehreren unabhängigen Experimenten auf entsprechenden Festmedien ausplattiert, um den *LEU*⁺-Phänotyp zu verifizieren und die Aktivierung des zweiten unabhängigen *lacZ*-Genreporters (Blaufärbung) zu testen. Nur 2/3 aller ursprünglich prototrophen Klone zeigten einen stabilen *LEU*⁺ Phänotyp. Lediglich 5 dieser Klone zeigten zunächst eine deutliche Blaufärbung, die sich jedoch in weiteren Experimenten nicht reproduzieren ließ. Es ist daher anzunehmen, dass keiner

der ca. 800 untersuchten Klone einen spezifischen Interaktionspartner für IIGP repräsentierte, sondern die Genreporter unspezifisch und nicht reproduzierbar aktiviert wurden.

Eine konventionelle Wachstumsselektion mit anschließender Überprüfung des *lacZ*-Phänotyps schien zur Identifikation von IIGP-Interaktionspartnern ungeeignet zu sein. Deshalb wurden in einem weiteren Experiment die cDNA-Bibliothek-Transformanten (nach einer Plasmid-Amplifikation in Flüssigmedium) auf Festmedien (SD Gal/Raf/XGal –H,T,U,L) selektioniert, die simultan zur *LEU*-Wachstumsselektion eine Blaufärbung der Klone ermöglichten. Dabei bestätigte sich die Beobachtung, dass unter Doppelselektionsbedingungen signifikant weniger und kleinere Klone wachsen (vgl. Tabelle 2). Ca. 400 Klone, die bis zum 8. Tag der Selektion zu einer stabilen Hefekolonie von ca. 2-4 mm Größe wuchsen und eine Blaufärbung zeigten, wurden analog zum vorherigen Experiment auf eine reproduzierbare Genreporteraktivität getestet (Abbildung 4 A). Insgesamt zeigten 49 Klone einen stabilen *LEU*⁺ und *lacZ*⁺ Phänotyp. Von diesen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels PCR die Größe des Genbibliothek-cDNA-Inserts ermittelt und mit dem spezifischen Muster des *HaeIII*-Restriktionsverdaus der PCR-Produkte ("Fingerprint") getestet, ob sich unterschiedliche cDNAs innerhalb eines Klons befanden (Abbildung 4 B). Insgesamt 63 isolierte cDNA-Bibliothekplasmide wurden zur Überprüfung der ursprünglich detektierten Reportersignale in *S. cerevisiae* EGY48[p8oplacZ] mit dem IIGP-*bait* (bzw. irrelevanten *baits* zur Kontrolle der Interaktionsspezifität) zurücktransformiert (Tabelle 1, Anhang). In 18 Kotransformanten wurden ausschließlich in Kombination mit dem *bait* IIGP beide Genreporter aktiviert. Anschließend wurde von diesen Klonen der Fusionsbereich mit der AD-Domäne mittels DNA-Sequenzanalyse auf die Integrität überprüft. Plasmide, die nicht über einen offenen korrekt an die AD fusionierten Leserahmen verfügten, wurden verworfen. Von den verbliebenen Klonen wurde die Integrität der durch die cDNA-Bibliothekplasmide kodierten AD-Fusionsproteine in einer Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 4 °C).

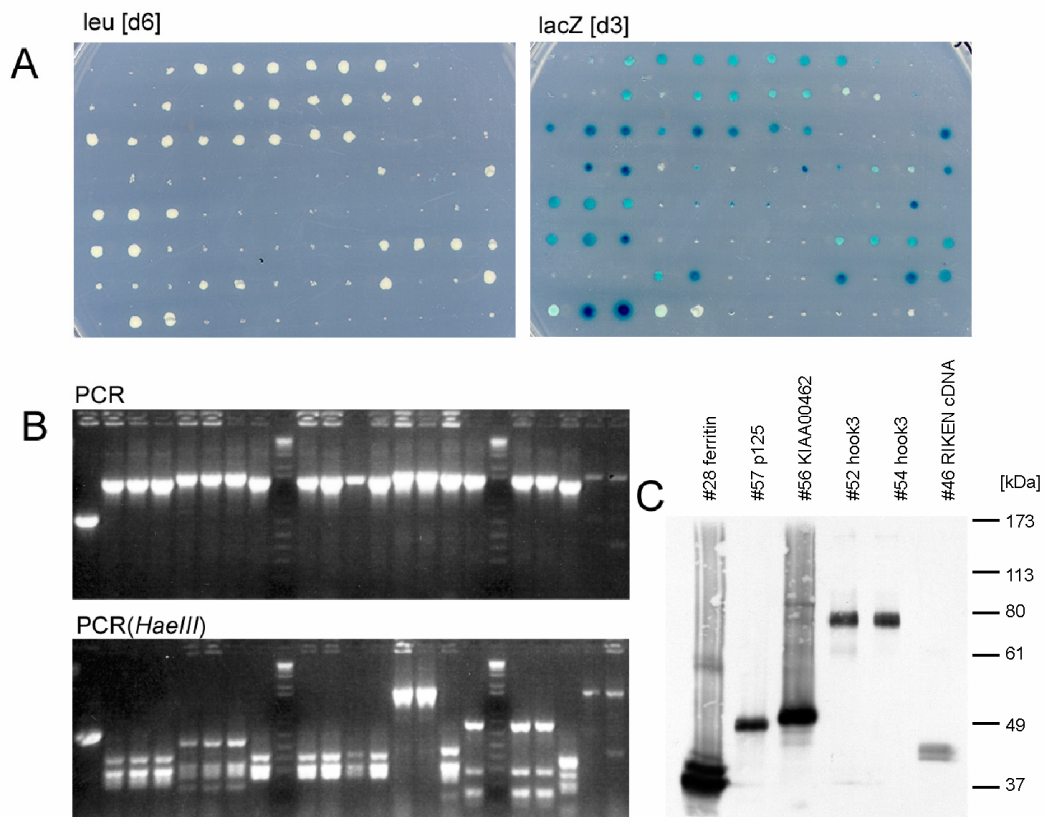


Abbildung 4: Yeast-Two-Hybrid-Analyse zur Identifikation von Protein-Interaktionspartnern für IIGP (exemplarisch)

A: Blaue (*lacZ*⁺), prototrophe (*LEU*⁺) Klone, die unter Doppelselektionsbedingungen an d8 detektierbar waren, wurden in 96well-Mikrotiterplatten kultiviert und zur Überprüfung der Stabilität ihres Phänotyps mehrfach mit einem Replika-Stempel auf Testmedien ausgestempelt (LEU: SD Gal/Raf –H,T,U,L; Detektion an d6 / lacZ: SD Gal/Raf/XGal –H,T,U; Detektion an d3). In der untersten Reihe ab Position 2 befinden sich die mitgeführten Positiv- (BD:p53, AD:largeT / BD:pbait, AD:pTarget) und Negativkontrollen (BD:LaminC, AD:large T / BD: unfusioniert, AD: unfusioniert).

B: PCR-Amplifikation der in den cDNA-Bibliotheks-prey-Plasmiden enthaltenen cDNA-Inserts (oben) bzw. *HaeIII*-Verdau dieser PCR-Produkte (unten). Um zu überprüfen, ob sich ursprünglich mehrere verschiedene cDNA-Bibliotheksplasmide in einem Hefeklon befanden, wurden jeweils drei aus dem Hefeklon isolierte cDNAs untersucht.

C: Die von den cDNA-Bibliotheksplasmiden kodierte Fusionsproteine in den Zelllysaten von induzierten Kotransformatanten wurden durch eine Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper, der gegen das im Vektor kodierte Hämagglutinin (HA)-Epitop gerichtet war, untersucht. # = Klonnummer.

Insgesamt 9 der analysierten cDNAs kodierten für Proteine bzw. Proteinbereiche, die in Y2H-Systemen häufig zu unspezifischen, falsch positiven Signalen führen (Ferritin und mitochondriale Proteine; aktualisierte zentral erfasste Liste unter www.fccc.edu/research/labs/golemis/Table1.html) und wurden nicht weiter berücksichtigt.

Aus den ca. 5×10^6 untersuchten Einzelklonen, die ursprünglich aus der Transformation beider cDNA-Bibliotheken hervorgingen, konnten im Y2H-System schließlich sechs Klone isoliert werden, die alle Kriterien einer spezifischen Protein-Interaktion erfüllten. Drei cDNA (# 46, 48, 56) waren in den verfügbaren Sequenzdatenbanken als nicht weiter kommentierte Einträge zu finden, die aus automatischen Sequenzierungsprojekten des Maus-Genoms hervorgingen (Okazaki et al., 2002; Strausberg et al., 2002). Die cDNA-Translationsprodukte der verbleibenden vier Klone waren homolog zu beschriebenen humanen Proteinen und repräsentieren mögliche Interaktionspartner der GTPase IIGP (Tabelle 3). Die beiden verwendeten cDNA-Bibliotheken scheinen sich qualitativ zu unterscheiden, denn die als relevante IIGP-Interaktionspartner eingestuft Proteine wurden ausschließlich mit der CD4⁺ cDNA-Bibliothek identifiziert.

Klon-nummer	Name	Datenbank-nummer	Beschreibung
52 54	hook3	NP 115786	golgi-associated microtubule-binding protein HOOK3 [Homo sapiens]
33	arc20	NP 005709	Arp2/3 protein complex subunit 4 (20 kDa); p20 [Homo sapiens]
57	p125	XP 133737	similar to Sec23-interacting protein p125 [Homo sapiens]; phospholipase
46	-	NM172678	Mus musculus RIKEN cDNA 2600017P15 gene
48	-	XM204098	Mus musculus RIKEN cDNA 5730434I03 gene
56	-	AB007931	Homo sapiens mRNA for KIAA0462 protein, partial cds

Tabelle 3: Übersicht der im Yeast-Two-Hybrid-System identifizierten cDNAs, die mögliche relevante Interaktionspartner von IIGP repräsentieren

Die sequenzierten *prey*-cDNAs von positiven Klone der Y2H-Analyse für IIGP wurden mit den verfügbaren Datenbanksequenzen verglichen (BlastN bzw. BlastP). Für die Translationsprodukte von drei cDNAs wurden sequenzverwandte humane Proteine gefunden. Angegeben ist die Datenbank-Identifikationsnummer, eine Kurzbeschreibung des Proteins bzw. der cDNA, der von den Plasmiden kodierte Bereich sowie der Grad der Sequenzhomologie der cDNA bzw. des Translationsprodukt in %. Tabelle 5 (siehe Anhang) gibt eine Gesamtübersicht der sequenzierten cDNAs.

4.2.2 Die 47 kDa GTPase IIGP interagiert mit dem Maus-Homolog von hook3

Von den drei Proteinen, die in der Y2H-Analyse als mögliche relevante Interaktionspartner von IIGP eingestuft wurden, wurde zunächst das Maus-Homolog von hook3 (Klon Nr. 52 und 54) genauer analysiert.

Obwohl die Größe der Genbibliotheks-cDNAs beider Klone (ca 2,1 kb) der Größe der vollständigen humanen hook3-cDNA (2157 bp) entsprach, waren die Translationsprodukte in der Western-Blot-Analyse signifikant kleiner (ca. 75 kDa) als eine LexA-Fusion mit dem gesamten hook3 Proteins (ca. 110 kDa). Daher wurde die Integrität des gesamten cDNA-Inserts durch eine DNA-Sequenzierung überprüft (Abbildung 5).

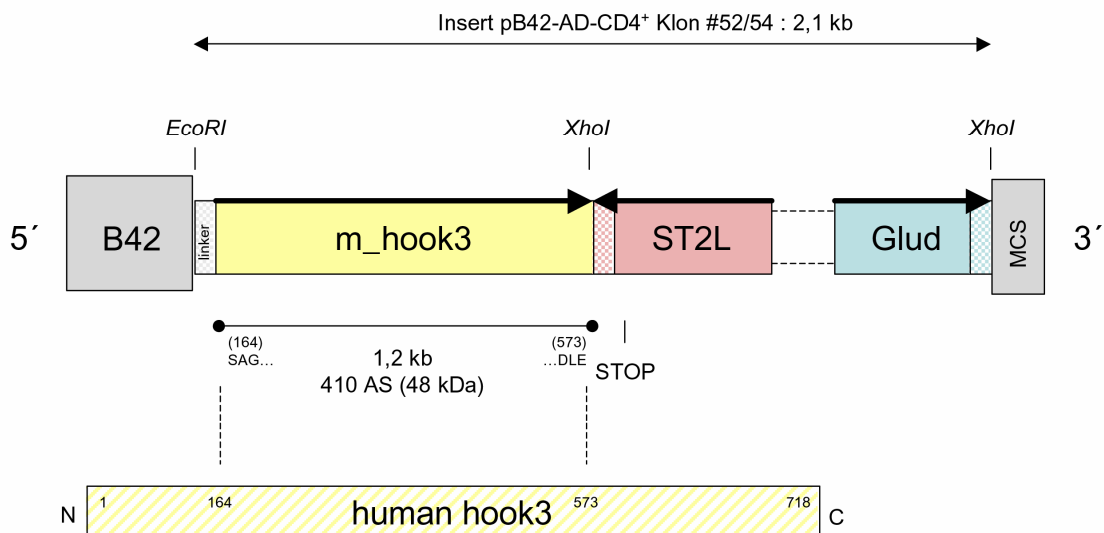


Abbildung 5: Schematische Übersicht der sequenzierten cDNA-Bibliotheks-Inserts der Klone Nr. 52 und 54 im Vektor pB42AD.

An die Aktivierungsdomäne B42 ist im vorgegebenen Leserahmen über eine kurze Linker-Sequenz eine 1,1 kb umfassende Teilsequenz des Maus-Homolgs von hook3 fusioniert (mHk3, gelb). Nach einer internen XhoI-Restriktionsschnittstelle von mHk3 folgt der Poly-A-Schwanz (schraffiert) eines in reverser (3' → 5')-Richtung klonierten Genfragments, das für ein Vorläuferprotein des Interleukin-1-Rezeptors (ST2L, rot) kodiert. An ST2L schließt sich ein kurzer Anteil der Glutamat-Dehydrogenase-cDNA incl. Poly-A-Schwanz (Glud, blau). Der weiße Bereich wurde nicht sequenziert. Die Pfeile entsprechen der 5' → 3'-Leserichtung.

Es zeigte sich, dass die isolierten cDNAs identisch sind und lediglich für einen Teil des Maus-Homologs von hook3 (mHk3) kodierten. Die Integration der mHk3-cDNA bis zur ihrer internen *XhoI*-Restriktionsschnittstelle war auf die Konstruktion der cDNA-Bibliothek aus *EcoRI*-*XhoI*-restringierten cDNA-Fragmenten zurückzuführen. Der mHk3 cDNA folgten weitere, teilweise in reverser Leserichtung klonierte Genfragmente. Schon kurz nach der *XhoI*-Restriktionsschnittstelle von mHk3 entstehen daher Stop-Codons, so dass ein ca. 75 kDa großes B42-Fusionsprotein entsteht, das 410 AS (164-573) (entspricht ca. 48 kDa) von mHk3 beinhaltet.

Die cDNA des vollständigen mHk3 Proteins wurde von Maus-cDNA amplifiziert. Die dazu erforderlichen spezifischen Sequenzen der Amplifikations-Oligonukleotide wurden aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu dem humanen Homolog von den zahlreichen Einträgen der verfügbaren EST- und Genomdatenbanken (NCBI, Celera) abgeleitet. Die Integrität des klonierten PCR-Produkts wurde per DNA-Sequenzanalyse verifiziert (Eintrag GenBank AY223806). Der Vergleich mit den verfügbaren Datenbanksequenzen ergab in drei unabhängig klonierten mHk3-cDNAs vier identische Nukleotidabweichungen (Position 96, 969, 1071, 1719), die vermutlich mausstammspezifische Sequenzunterschiede reflektieren und die publizierte Aminosäuresequenz von mHk3 nicht veränderten. Für weitere Klonierungen wurde die interne *XhoI*-Restriktionsschnittstelle in der mHk3 cDNA durch *BglII* ersetzt, ohne dass sich die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts veränderte (Klonierungsdetails siehe Kap. 3).

Die Interaktion zwischen IIGP und dem vollständigen mHk3-Protein wurde in einem Yeast-Two-Hybrid-Experiment überprüft. IIGP interagiert mit dem gesamten mHk3-Protein ebenso stark wie mit dem ursprünglich identifizierten Anteil, der von der durchsuchten cDNA-Genbibliothek kodiert wurde (Abbildung 6). Wurde IIGP bzw. mHk3 alleine oder in Gegenwart irrelevanter Proteine exprimiert, konnte weder ein prototrophes Wachstum, noch eine Blaufärbung der Hefekclone detektiert werden, was die Spezifität dieser Interaktion belegt.

BD	AD	leu	lacZ	
IIGP	Y2H#54			+
	m_hook3			+
	-			-
	large T			-
Laminin C	m_hook3			-
Dros. bicoid				-
p53				-
Slfn5				-
-				-
p53	large T			K+
p53	-			K-
-	large T			K-
-	-			K-

Abbildung 6: Spezifische Interaktion von IIGP mit mHk3 im Y2H-System

Zur Überprüfung des ursprünglichen Y2H-Resultats wurde das IIGP-*bait* in Kombination mit dem *prey* mHk3 bzw. Kontroll-*preys* (B42-largeT, LexA-Laminin C, LexA-Drosophila bicoid, LexA-p53, LexA-Slfn5) in *S. cerevisiae* EGY48[p8opLacZ] exprimiert und die Genreporteraktivität auf Festmedien (*LEU*: Wachstum auf SD Gal/Raf –H,T,U,L an d5 und *lacZ*: Blaufärbung auf SD Gal/Raf/XGal –H,T,U an d3) getestet. Die Ko-Expression von IIGP und mHk3 bzw. dem ursprünglich identifizierten Anteil von mHk3 (Klon #54) führt zu prototrophem Wachstum an d 4/5 und einer Blaufärbung der Hefen an d 3. In Kombination mit anderen Proteinen ist weder Wachstum noch eine Blaufärbung detektierbar.

BD: Bindungsdomänen-Fusionen (LexA); AD: Aktivierungsdomänen-Fusionen (B42); +: positiver *LEU*⁺ *lacZ*⁺ Phänotyp; -: keine detektierbare Reporteraktivität; K+/- : interne Positiv- bzw. Negativkontrollen

4.2.3 Die GTPase-negative IIGP-Mutante S83N interagiert nicht mit mHk3

Bei der Umsetzung von GTP zu GDP unterliegen GTPasen einem signifikanten Konformationswechsel, der ihre Interaktion mit anderen Proteinen maßgeblich beeinflussen kann (Vetter und Wittinghofer, 2001).

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von IIGP mit mHk3 konformationsspezifisch erfolgt, wurde die in 4.1.1 beschriebene GTPase-negative Mutante IIGP[S83N] im Y2H-System auf eine Interaktion mit mHk3 getestet (Abbildung 7).

BD	AD	leu	lacZ	
IIGP	Y2H #54			+
IIGP	m_hook3			+
IIGP [S83N]	Y2H #54			-
IIGP [S83N]	m_hook3			-

Abbildung 7: Die GTPase-negative IIGP-Mutante S83N interagiert nicht mit mHk3 im Y2H-System

Wie in 4.2.2 beschrieben wurden die Protein-Interaktionen anhand der Genreporteraktivität von kotransformierten *S. cerevisiae* EGY48[p8opLacZ] auf Festmedien getestet. Während die Expression von IIGP in Kombination mit mHk3 prototrophes Wachstum der Hefen an d 5 ermöglichte bzw. zur Blaufärbung an d 3 führte, war weder zum gleichen Zeitpunkt noch im späteren Verlauf des Experiments (d 9) keinerlei Wachstum oder Blaufärbung für die Mutante IIGP[S83N] zu detektieren. Zur Überprüfung wurden die in Abbildung 6 gezeigten internen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt (hier nicht gezeigt).

In der Y2H-Analyse konnten keinerlei Signale detektiert werden, die auf eine Interaktion der Mutante IIGP[S83N] mit mHk3 hinweisen. Das Expressionsniveau von mutiertem und nicht modifiziertem IIGP („Wildtyp“) war in quantitativen Western-Blot-Analysen nahezu identisch (nicht gezeigt), so dass die vollständige Unterbindung der Interaktion auf die eingeführte Punktmutation im GTPase-Bindungsmotiv zurückzuführen war. Es ist nahe liegend, dass in Analogie zu anderen GTPase-Mutanten eine solche Mutation die Konformation von IIGP signifikant veränderte. Daher war anzunehmen, dass die GTPase IIGP ausschließlich in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Konformation mit mHk3 interagiert.

4.2.4 Innerhalb der 47 kDa GTPase-Familie interagiert ausschließlich IIGP mit mHk3

Mit dem Y2H-System wurde weiterhin überprüft, ob neben IIGP auch andere Mitglieder der 47 kDa GTPase-Familie mit mHk3 interagieren (

Abbildung 8). Außer IIGP zeigte kein weiteres getestetes Familienmitglied eine Bindung an mHk3. Die spezifische Interaktion zwischen mHk3 und IIGP basiert demzufolge nicht auf Eigenschaften, die die einzelnen Mitglieder dieser GTPase-Familie möglicherweise gemeinsam haben (wie z.B. ihre GTPase-Aktivität), sondern wird durch individuelle Eigenschaften des Familienmitgliedes IIGP ermöglicht.

BD	AD	leu	lacZ	
IIGP	m_hk3			+
IGTP				-
GTPI				-
LRG-47				-
TGTP				-
IRG-47				-

Abbildung 8: Y2H-Analyse der Interaktion zwischen mHk3 47 kDa GTPasen

Analog zu und 4.2.2 und 4.2.3 wurde die Interaktion zwischen dem *prey* mHk3 und den Mitgliedern der 47 kDa-GTPase Familie als *baits* getestet. Die Expression der GTPase-*baits* wurde in Western-Blot-Analysen überprüft (nicht gezeigt).

4.2.5 Bestimmung der für die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 relevanten Proteinbereiche

Für eine Interaktion mit IIGP wird offensichtlich nicht das gesamte mHk3 Protein benötigt, denn die aus der cDNA-Bibliothek isolierte cDNA umfasste lediglich einen Anteil des gesamten Moleküls. Es wurde daher genauer untersucht, welche Proteinbereiche von mHk3 eine Bindung an IIGP vermitteln.

Für Interaktionen mit anderen Proteinen oder Strukturen werden oft Protein-Tertiärstrukturen benötigt, die nur von der gesamten Proteinsequenz ausgebildet werden können. Andererseits können Interaktionen auch von distinkten Proteindomänen vermittelt werden, die sich unabhängig von intramolekularen Wechselwirkungen mit weiteren Proteinbereichen ausbilden und funktionell autark sind. Für das humane Homolog von mHk3 (hHk3) wurden solche funktionellen Domänen bereits definiert (Walenta et al., 2001). Der N-Terminus von hHk3 kann an Mikrotubuli binden und wird als eine neue, noch nicht näher charakterisierte Mikrotubuli-Bindungsdomäne diskutiert. Der C-Terminus des Moleküls ermöglicht die Bindung des Moleküls an Strukturen des Golgi-Apparates, während der zentrale Teil eine Homodimerisierung des Moleküls vermittelt. Als vermutlich strukturelle Komponenten verfügt hHk3 über vier sog. coiled-coil-Regionen, die sich über weiten Bereich des Proteins erstrecken. Für mHk3 wurde eine computergestützte Vorhersage für die Ausbildung von Coiled-Coil-Domänen durchgeführt (www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie ist die vorhergesagte Ausbildung dieser Strukturen für mHk3 und das humane Homolog identisch. Die aus der cDNA-Genbibliothek isolierte mHk3-cDNA deckt den Bereich der Coiled-Coil-Domänen I und II sowie einen großen Teil der dritten Domäne ab (Abbildung 9A). Um die für die Interaktion mit IIGP benötigten Proteinregionen genauer zu definieren, wurden verschiedene Deletionsmutanten von mHk3, die jeweils individuelle oder mehrere aufeinanderfolgende Coiled-Coil-Regionen enthalten, kloniert und im Y2H-System auf eine Interaktion mit IIGP getestet (Abbildung 9B). Unter der Annahme, dass die β -Galaktosidaseaktivität des lacZ-Reportgens mit der Interaktionsstärke der Proteine korreliert, wurde die Umsetzung Substrats ONPG quantitativ bestimmt. IIGP interagiert weder mit der N-terminalen Mikrotubuli-Bindungsdomäne (AS 1-164), noch der C-terminalen Golgi-Bindungsdomäne (AS 589-718) von mHk3. Die Interaktion schien von dem zentralen Coiled-Coil-Bereich (AS 165-588) von mHk3 vermittelt zu werden. Lediglich die mHk3-Anteile, die die Coiled-Coil-Domäne III (AS 450-471) enthielten, konnten im Y2H-System mit IIGP signifikant interagieren. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Anteil des zentralen Bereichs von mHk3 eine essentielle Komponente für die Interaktion mit IIGP darstellt.

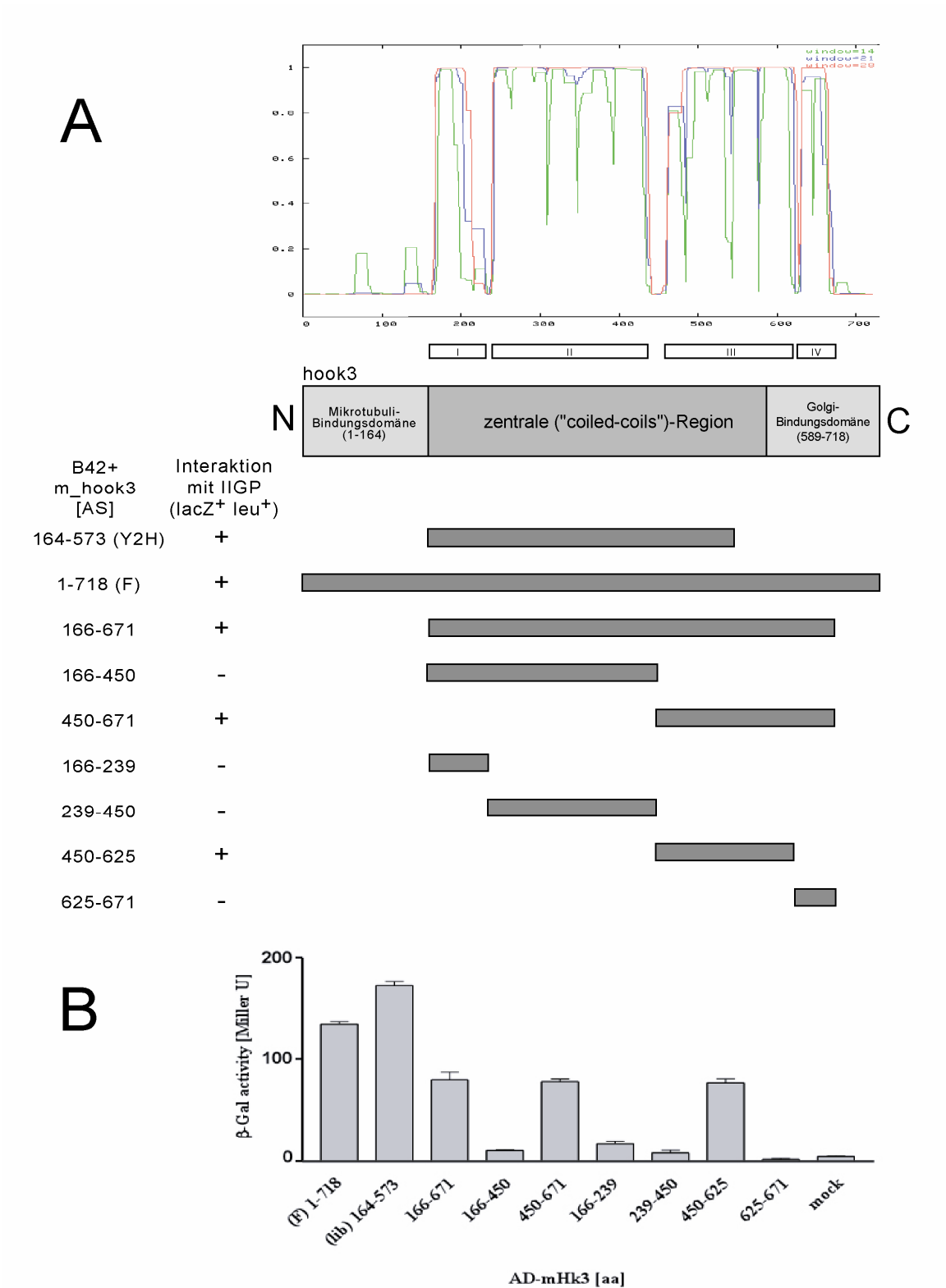


Abbildung 9: Computeranalyse der Coiled-Coil-Strukturen von mHk3 und Y2H-Analysen zur Bestimmung derjenigen Proteinbereiche, die für die Interaktion mit IIGP relevant sind

(Fortsetzung Abbildung 9)

A: Die Coiled-Coil-Strukturen von mHk3 wurden per Computeranalyse bestimmt. Die drei farbigen Graphen geben die von unterschiedlichen Algorithmen berechnete Wahrscheinlichkeit an, eine Coiled-Coil-Struktur auszubilden. Die aus dieser Vorhersage abgeleiteten vier Domänen (I-IV) sind zusammen mit den bereits definierten funktionellen Bereichen des humanen hook3-Homologs unter der Grafik schematisch dargestellt. Die zu den vier Coiled-Coil-Domänen korrespondierenden cDNA-Bereiche wurden per PCR amplifiziert und entweder einzeln oder in Kombination an den von B42 vorgegebenen Leserahmen fusioniert. Die Integrität der Produkte wurde durch DNA-Sequenzanalysen verifiziert und die korrekten Größen der Translationsprodukte in Western-Blot-Analysen überprüft (nicht gezeigt).

B: Um die Interaktionsstärken zwischen mHk3 Bereichen und IIGP zu quantifizieren, wurde neben konventionellen Y2H-Analysen auf Festmedien (nicht gezeigt) die Farbreaktion bei der Umsetzung von OPNG photometrisch gemessen und die β -Galaktosidaseaktivität berechnet (angegeben in Miller-Units, Doppelmessungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten). Nur diejenigen mHk3-Fusionsproteine zeigten eine Interaktion mit IIGP (+), die die Coiled-Coil-Domäne III umfassten. Für andere Anteile von mHk3 konnte keine Interaktion mit IIGP detektiert werden (-). F: gesamtes mHk3-Protein, lib: von der cDNA-Bibliothek kodierte mHk3-Anteil, Mock: unfusionierte B42-AD.

Analog zu mHk3 wurden auch für IIGP verschiedene Deletionsmutanten generiert, um die für eine Interaktion benötigten Proteinbereiche dieser GTPase weiter einzugrenzen. Neben der bereits definierten konservierten GTP-Bindungsdomäne ergab die Analyse der Primärsequenz von IIGP bzw. der anderen GTPase-Familienmitglieder keine Hinweise auf weitere funktionelle Regionen. Deshalb wurden verschiedene N- bzw. C-terminale Deletionsmutanten von IIGP generiert und in einer Y2H-Analyse auf eine Interaktion mit mHk3 getestet (Abbildung 10).

Es zeigte sich, dass die Deletion von 53 N-terminalen Aminosäuren vor der GTP-Bindungsdomäne von IIGP (IIGP 54-415) keinen Einfluß auf die Interaktion mit mHk3 hat, während schon geringfügige, nur 38 Aminosäuren umfassende Deletionen am C-Terminus der GTPase (IIGP 1-377) die Interaktion mit mHk3 vollständig unterbunden haben. Eine IIGP-Deletionsmutante, die zwar diese C-terminalen 38 Aminosäuren, aber keine GTPase-Bindungsdomäne enthielt (IIGP 178-415), konnte jedoch nicht mit mHk3 interagieren. Dies verdeutlichte, dass die Interaktion mit mHk3 nicht von den 38 C-terminalen Aminosäuren von IIGP vermittelt wurde, sondern vermutlich (mit Ausnahme von Anteilen des N-Terminus) die gesamte Proteinsequenz von IIGP zur Ausbildung einer spezifischen Konformation benötigt wird, die eine Interaktion mit einer coiled-coil-Struktur der zentralen Proteinregion von mHk3 ermöglicht.

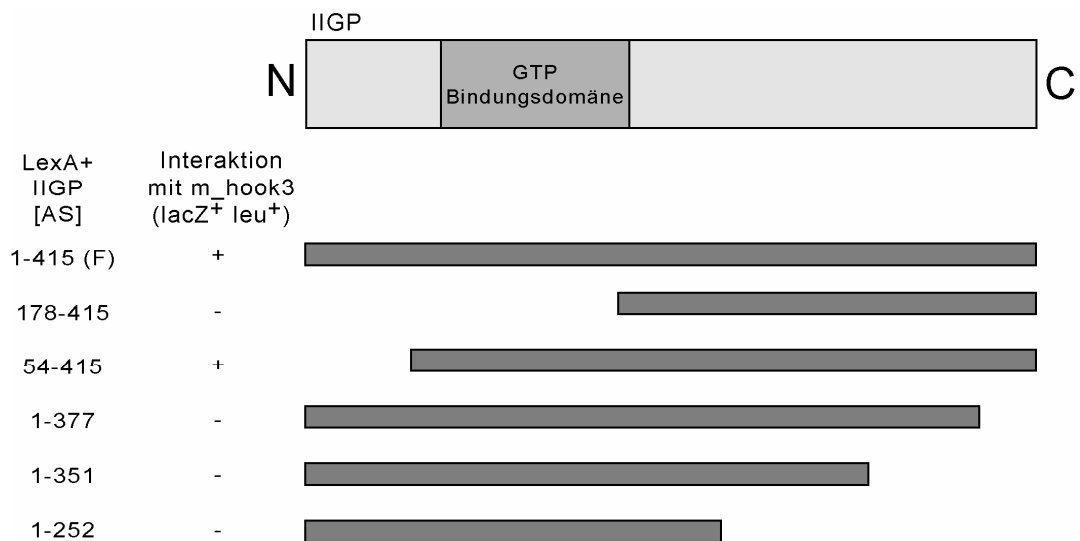


Abbildung 10: Y2H-Analyse der Interaktion zwischen mHk3 und verkürzten IIGP-Varianten

Analog zu Abbildung 9 wurden *baits* mit Sequenzbereichen von IIGP konstruiert und in einer Y2H-Analyse auf Interaktion mit dem *prey* mHk3 getestet. Eine am N-Terminus um 53 Aminosäuren verkürzte IIGP-Variante (AS 54-415) interagiert ebenso stark mit mHk3 wie das gesamte IIGP-Protein (F), während eine weitergehende N-terminale Verkürzung (AS 178-415) die Interaktion unterband. Für keine der C-terminalen Verkürzungen von IIGP konnte eine Interaktion mit mHk3 detektiert werden. Die Integrität aller Konstrukte sowie deren Translationsprodukte wurden überprüft. Die Qualitative Analyse der Interaktion (+/-) fasst die Resultate von drei unabhängigen Y2H-Analysen (konventionell auf Festmedien und Umsatz von ONPG) zusammen.

4.2.6 Bestätigung der Interaktion zwischen IIGP und mHk3 *in-vivo*

Um festzustellen, ob die im Y2H-System identifizierte Interaktion zwischen IIGP und mHk3 auch eine Assoziation beider Moleküle *in-vivo* reflektiert, wurde überprüft, ob sich zwischen beiden endogen exprimierten Proteinen Komplexe ausbilden, die immunpräzipitiert werden können. Dazu wurden Zellysate von Makrophagen hergestellt, die endogenes mHk3 konstitutiv exprimierten und durch IFN- γ -Stimulation zur Expression von endogenem IIGP induziert wurden. Beide Proteine wurden mit jeweils spezifischen Antikörpern aus den Lysaten präzipitiert und mittels Western-Blot getestet, ob in diesen Präzipitaten der jeweilige Interaktionspartner nachgewiesen werden konnte (Abbildung 11).

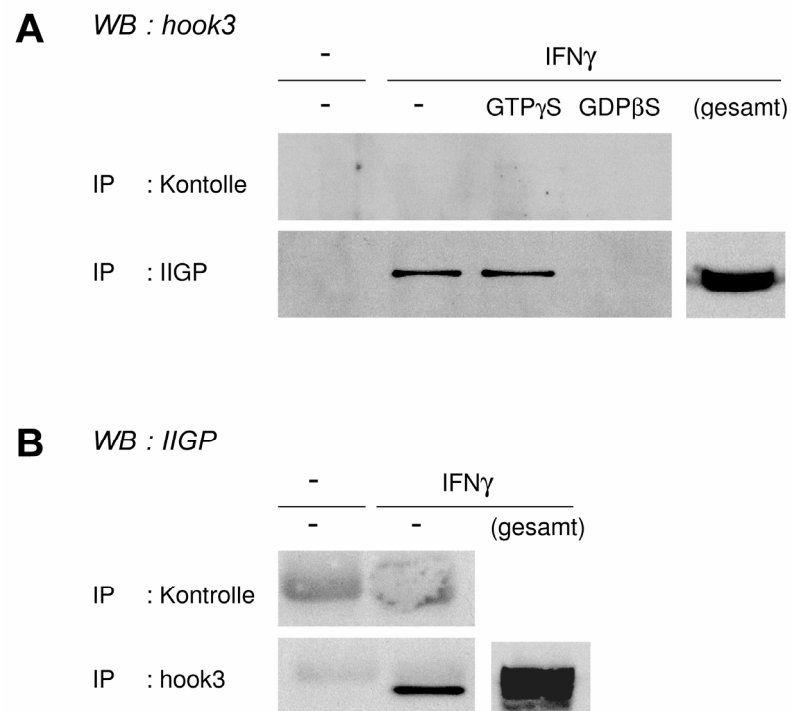


Abbildung 11: Nachweis der physikalischen Interaktion zwischen endogen exprimiertem IIGP und mHk3 durch Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) aus Makrophagen-Zellysaten

Nachweis der jeweils kopräzipitierten Interaktionspartner IIGP bzw. mHk3 in einer Western-Blot-Analyse (WB). Unstimulierte (-) bzw. IFN γ -stimulierte Makrophagen-Lysate wurden mit einem irrelevanten Isotyp-identischen Kontrollantikörpern (für IIGP) bzw. Serum (für mHk3) vorinkubiert (IP: Kontrolle), um zu kontrollieren, dass die detektierten Proteine nicht unspezifisch präzipitiert wurden. Anschließend wurde IIGP mit dem monoklonalen Antikörper 5D9 (A, untere Gelspur IP: IIGP) bzw. mHk3 mit einem affinitätsgerinigtem Hasenserum gegen hook3 (B, untere Gelspur IP: hook3) präzipitiert. Im Western-Blot wurden Antikörper gegen den jeweiligen Interaktionspartner verwendet (A: anti-hook3, B: anti-IIGP). Zur Ermittlung der Proteinmenge, die von den verwendeten Antikörpern direkt präzipitiert werden kann ("gesamt"), wurden IIGP bzw. mHk3 aus $\frac{1}{5}$ Volumen des in der Ko-IP verwendeten Zellysats präzipitiert und durch Verwendung der identischen Antikörper im Western-Blot detektiert. In zwei weiteren Ansätzen wurden die Lysate von IFN- γ stimulierten Makrophagen vor der Immunpräzipitation mit GTP γ S oder GDP β S für 30 Minuten bei 32°C inkubiert (A).

mHk3 konnte in IIGP-Immunkomplexen detektiert werden (Abbildung 11 A). In Lysaten von Makrophagen, die nicht mit IFN- γ stimuliert wurden und demzufolge kein endogenes IIGP enthielten, wurde hingegen mHk3 nicht kopräzipitiert. Dies verdeutlicht ebenso wie die Abwesenheit von mHk3 in den Präzipitaten eines irrelevanten, jedoch im Isotyp-übereinstimmenden Antikörpers, dass das konstitutiv exprimierte mHk3 Protein nicht unspezifisch, sondern in Assoziation mit IIGP kopräzipitiert wurde. Diese physikalische Interaktion zwischen endogenem IIGP und

mHk3 konnte in einem reziproken Experiment bestätigt werden (Abbildung 11 B): in den Präzipitaten von mHk3, die unter Verwendung eines polyklonalen Serums gegen hook3 aus den Zellysaten isoliert wurden, konnte IIGP nachgewiesen werden. Die quantitativen Unterschiede zwischen den kopräzipitierten Proteinen und der im Zellysate vorhandenen Gesamtproteinmenge zeigten deutlich, dass jeweils nur ein Teil des vorhandenen IIGP bzw. mHk3-Proteins kopräzipitiert wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch *in vivo* jeweils nur ein Teil des vorhandenen IIGP- und mHk3-Proteins in komplexierter Form vorliegt.

Die Yeast-Two-Hybrid-Analyse der GTPase-negativen IIGP-Mutante S83N ergab bereits Hinweise darauf, dass die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 konformationsabhängig erfolgt (4.2.3). Ebenso wie Einführung von Mutationen in die GTPase-Bindungsdomäne (S83N) kann die Bindung von nicht-hydrolysierbaren GTP bzw. GDP-Analoga (GTP γ S bzw. GDP β S) eine GTPase in ihrer Nukleosid-spezifischen Konformation arretieren und ihre funktionellen Eigenschaften signifikant verändern. Um den Einfluß dieser Analoga auf die physikalische Interaktion zwischen endogenem IIGP und mHk3 zu untersuchen, wurden die Zellysate vor der Immunpräzipitation im Überschuß mit GTP γ S bzw. GDP β S bei 32°C für 30 min inkubiert. Während in Gegenwart von GTP γ S eine vergleichbare Menge IIGP wie in unbehandelten Zellysaten mit mHk3 komplexierte, dissoziierte der IIGP-mHk3-Komplex durch Zugabe von GDP β S komplett (Abbildung 11 A). Dieses Resultat verdeutlicht, dass IIGP nur in der aktiven, GTP-gebundenen Konfiguration mit mHk3 interagiert und steht im Einklang mit den Befunden der Y2H-Analysen von IIGP bzw. der korrespondierenden GTPase-negativen Mutante IIGP[S83N].

4.2.7 Subzelluläre Lokalisation von IIGP und mHk3

Die im Y2H-System nachgewiesene Bindung von IIGP an mHk3 sowie die mittels Ko-Immunpräzipitation gezeigte Ausbildung von IIGP-mHk3-Komplexen *in-vivo* sind starke Indizien auf eine Interaktion dieser Proteine. Falls diese Interaktion eine funktionelle Relevanz *in vivo* hat, sollten sich diese Proteine in Zellen zumindest teilweise am gleichen Ort befinden, also kolokalisieren. Da sowohl gegen IIGP als auch gegen hook3 gerichtete monoklonale Antikörper bzw. polyklonale Seren vorhanden

waren, konnte die subzelluläre Verteilung beider Proteine in IFN- γ stimulierten Maus-Knochenmarksmakrophagen mittels konfokaler Lasermikroskopie ermittelt werden (Abbildung 12).

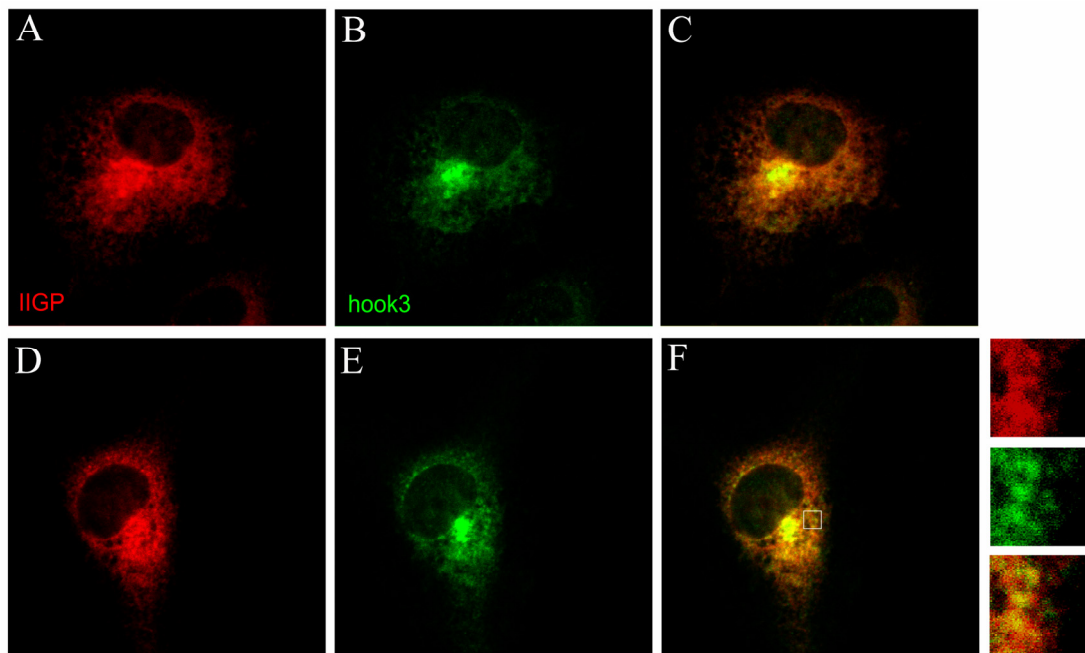


Abbildung 12: Konfokal-mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von IIGP und mHk3 in IFN γ -aktivierten Knochenmarksmakrophagen

Maus-Knochenmarksmakrophagen wurden auf Glasträgern kultiviert und mit IFN- γ über Nacht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und nach Färbung im konfokalen Lasermikroskop analysiert. Die Anfärbung der Zellen mit dem monoklonalen IIGP-Antikörper 5D9 und einem fluoreszenzgekoppelten (Cy3) Maus-Antikörper zeigte die typische Assoziation von IIGP mit dem ER und dem Golgi-Apparat (A,D: roter Farbkanal). mHk3 wurde mit einem polyklonalen Hasenserum und Cy2- Fluoreszenzantikörpern angefärbt (B,E: grüner Farbkanal). mHk3 akkumulierte in der Kernnähe am MTOC und dem Golgi-Apparat (Organellenfärbung nicht gezeigt), und konnte zudem in peripheren Zellbereichen als feines, retikuläres Netzwerk mit punktförmigen Akkumulationen detektiert werden. IIGP und mHk3 befinden sich in direkter räumlicher Nähe zueinander und Anteile kolokalisieren (C,F: die computerunterstützte Verrechnung des grünen und roten Farbkanals ergibt ein gelbes Signal, das einer Co-Lokalisation beider Proteine entspricht). Der mit einem Quadrat gekennzeichnete Bereich in F ist zur besseren Auflösung vergrößert dargestellt.

Die bereits beschriebene Assoziation von IIGP mit dem ER (Zerrahn et al., 2002) resultierte in einem typischen retikulären Verteilungsmuster, dessen Signal ausgehend vom Nukleus hin zur Zellperipherie kontinuierlich schwächer wurde (Abbildung 12 A,D). Die starke Akkumulation von IIGP in unmittelbarer Nähe zum Kern reflektierte die Assoziation mit dem Golgi-Apparat. Die Verteilung von mHk3 in Maus-

Makrophagen (Abbildung 12 B,E) entsprach der bereits bekannten Verteilung des humanen Homologs hHk3 in Vero-Zellen (Walenta et al., 2001). MHk3 zeigte eine starke Akkumulation im Bereich des “Microtubule Organising Centers” (MTOC) und des Golgi-Apparates (Abbildung 12 C,F). An diesen Strukturen ähnelte das mHk3 Signal zwar dem Verteilungsmuster von IIGP, jedoch schienen beide Signale hier nicht vollständig zu koloalisieren, sondern vielmehr in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander zu stehen (Abbildung 12, Ausschnittsvergrößerung). Im perinukleären Bereich hingegen überlagerte sich das retikuläre, teilweise vesikuläre Verteilungsmuster von IIGP und mHk3. In der konfokalen Analyse schien die Stimulation der Zellen durch IFN- γ weder einen Einfluss auf das Expressionsniveau, noch auf die subzelluläre Verteilung von mHk3 zu haben (nicht gezeigt).

Die signifikante Akkumulation von IIGP und mHk3 im Bereich des Golgi-Apparates ist ein weiteres starkes Indiz für eine *in-vivo* Interaktion beider Proteine an diesem Organell. Der Befund, dass beide Proteine in diesem Bereich nicht vollständig koloalisieren, sondern ein signifikanter Proteinanteil in unmittelbarer räumlichen Nähe zueinander steht, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Interaktion einen eher transienten oder kurzlebigen Charakter hat. Diese Annahme steht im Einklang mit dem Resultat der Ko-Immunpräzipitation, die zeigte, dass in Zellysaten nur ein Teil beider Proteine in komplexierter Form vorliegt. Relevante Interaktionen scheinen aber auch im zellperipheren Bereichen plausibel, in dem beide Proteine identisch lokalisiert waren. In Analogie zu der Lokalisation von hHk3 (Walenta et al., 2001) wurde mHk3 in der Zellperipherie als ein feines retikuläres Netzwerk mit punktförmigen Akkumulationen detektiert, die möglicherweise auf eine Vesikelassoziation zurückzuführen sind.

Die postulierte Assoziation der 47 kDa GTPasen mit intrazellulären Membranen konnte bereits für die Mitglieder IGTP und IIGP in detaillierten Analysen bestätigt werden (Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002). Bisher konnten jedoch keine strukturellen Komponenten innerhalb dieser Proteine identifiziert werden, die eine solche Membrananbindung direkt vermitteln könnte. Hingegen konnte gezeigt werden, dass hook3 direkt über den C-terminalen Proteinbereich an Golgi-Membranen binden kann (Walenta et al., 2001), die Lokalisation an noch nicht weiter charakterisierte vesikelartige Strukturen ist hingegen ungeklärt. Um die Assoziation beider Proteine mit

intrazellulären Membranen genauer zu untersuchen, wurden die Zellysate von IFN- γ stimulierten Makrophagen über einen Sukrose-Schrittgradient derart aufgetrennt, dass sich die Membranen gemäß ihrer physikalischen Dichte in distinkten Fraktionen anreicherten. Anschließend wurde die Verteilung von mHk3, IIGP sowie IGTP in diesen Fraktionen in einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 13).

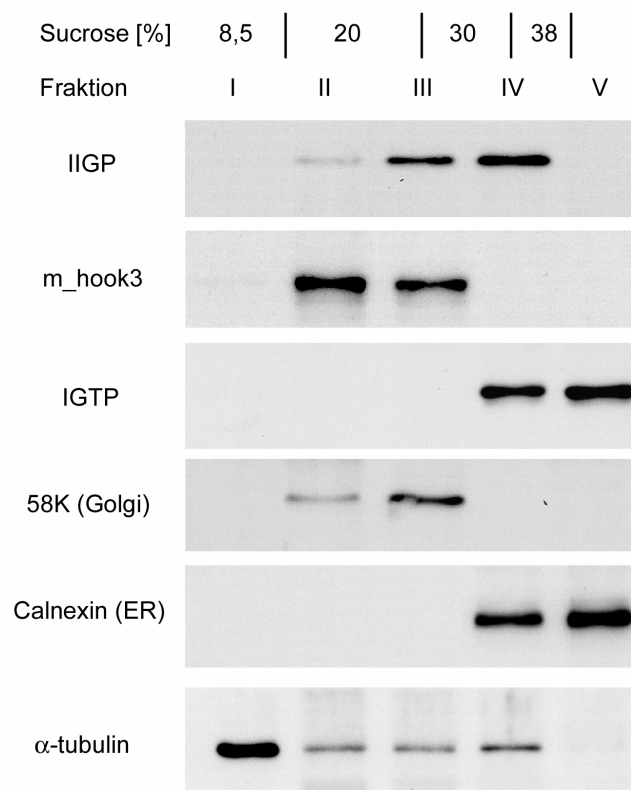


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse fraktionierter subzellulärer Membranen von IFN- γ stimulierten Maus-Knochenmarkmakrophagen

Die Zellysate von über Nacht mit IFN- γ stimulierten Maus-Knochenmarksmakrophagen wurden von ihren Zellkernen abgetrennt und die intrazellulären Membranen in einem diskontinuierlichen Sukrose-Gradient durch Zentrifugation angereichert. Einzelne Fraktionen dieses Gradienten wurden anschließend in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Fraktion I entspricht der 8,5 %igen, Fraktion II der 20 %igen Sukrosephase, während die Fraktionen III und IV jeweils den Interphasen zwischen 20 % und 30 % bzw. 30 % und 38 % Sukrose entsprechen. Das Pellet entspricht Fraktion V. Die Anreicherung der unterschiedlichen Organellmembranen wurde durch die Detektion ihrer spezifischen Membranproteine mit spezifischen Antikörpern ermittelt (ER: Calnexin, Golgi: Formiminotransferase Cyclodeaminase durch 58K mAb).

Die Anreicherung bzw. Auftrennung der Membranen wurde in der Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen organellspezifische Proteine überprüft. In den Fraktionen II und III waren die Membranen des Golgi-Apparates angereichert und in den Fraktionen IV und V akkumulierten ER-Membranen. In Übereinstimmung mit der ER- und Golgi-Assoziation in der konfokalen mikroskopischen Analyse konnte IIGP sowohl in der mit Golgi-Membranen angereicherten Fraktion III als auch in der ER-angereicherten Fraktion IV detektiert werden. MHk3 konnte in Fraktion III nachgewiesen werden, und ein ebenso signifikanter Anteil befand sich in der weniger dichten Fraktion II, in der sich IIGP kaum detektieren ließ. Im Gegensatz zu IIGP war mHk3 in den ER-angereicherten Fraktionen IV und V nicht nachweisbar.

Die Anreicherung von IIGP und mHk3 in den Golgi-Membran-haltigen Fraktionen ist konsistent mit den Ergebnissen der konfokalen mikroskopischen Analysen. Die in der konfokal-mikroskopischen Analyse belegte Assoziation von IIGP mit ER-Membranen ließ sich durch die Fraktionierung der subzellulären Membranen bestätigen, jedoch konnte mHk3 in der ER-haltigen Fraktion nicht nachgewiesen werden. Die in der mikroskopischen Analyse beobachtete ER-ähnliche Verteilung von mHk3 in Kernnähe scheint demzufolge nicht eine direkte Assoziation mit diesem Kompartiment zu reflektieren. Die Detektion beider Proteine in der Golgi-haltigen Fraktion könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Golgi-Apparat das Kompartiment darstellt, an dem relevante Interaktionen zwischen beiden Proteinen stattfinden. Die differentielle Verteilung beider Proteine in anderen Fraktionen ist konsistent mit dem Befund der Ko-Immunpräzipitation, in der offensichtlich nur ein Teil der beiden Proteine miteinander komplexiert.

Wie für IIGP wurde auch für das 47 kDa GTPase-Familienmitglied IGTP bereits eine ER-Assoziation beschrieben (Taylor et al., 1997). Die Verteilung von IGTP im Sukrosegradient unterschied sich signifikant von der von IIGP. Dies könnte eine unterschiedliche Art und Weise, wie beide GTPasen an das ER binden, reflektieren. Die unterschiedliche Verteilung im Sukrosegradient könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass beide GTPasen differentiell mit distinkten ER-Bereichen, die sich in ihrer Dichte und möglicherweise auch in ihrer Funktion unterscheiden, oder mit Membranen anderer Organellen assoziieren. α -Tubulin konnte nicht nur in der leichten, cytosolischen

Fraktion I nachgewiesen werden, sondern auch in geringen Mengen in den dichteren Fraktionen II-IV. Da α -Tubulin mit subzellulären Membranen assoziiert, ist diese Verteilung plausibel.

4.2.8 Für die Assoziation von IIGP mit dem Golgi-Apparat ist ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk erforderlich

In Experimenten mit den pharmakologischen Agenzien Brefeldin A und Nocodazol wurden die Mechanismen, die der Assoziation von hHk3 mit dem cis-Golgi zugrunde liegen, bereits detailliert untersucht (Walenta et al., 2001). Die Behandlung von Zellen mit Brefeldin A unterbindet die Transportprozesse innerhalb des cis-, medial- und Trans-Golgi und induziert innerhalb dieser Subkompartimente den Rücktransport der Golgi-assoziierten Proteine zum ER, wodurch sich die Golgi-Struktur schließlich auflöst (Dinter und Berger, 1998). In Brefeldin A behandelten Zellen verblieb (im Gegensatz zu vielen anderen cis-Golgi-Proteinen, die zum ER zurücktransportiert werden) ein Großteil des hHk3-Proteins in unmittelbarer Nähe zum Nukleus und akkumulierte in der Nähe des MTOC. Die Lokalisation von hHk3 am Golgi-Apparat scheint demzufolge abhängig von Golgi-spezifischen Transportmechanismen zu sein. Die Transportprozesse innerhalb des Golgi-Apparates bzw. zwischen Golgi und ER erfolgen entlang von Mikrotubuli, die zudem maßgeblich die Struktur dieses Kompartiments bestimmen. Die Depolymerisierung der Mikrotubuli durch Nocodazol führt demzufolge zunächst zum Auseinanderbrechen des Golgi-Apparates und schließlich zur Auflösung der Struktur. Gleichzeitig bilden sich verstreut im Cytoplasma durch de-novo-Synthese Golgi-artige, aberrante Strukturen an den sog. ER-“Exit-Sites” aus (Thyberg und Moskalewski, 1999). In Nocodazol-behandelten Zellen bleibt, im Gegensatz zur Behandlung mit Brefeldin A, ein Großteil von hHk3 mit den auseinander gerissenen Golgi-Fragmenten assoziiert (Walenta et al., 2001), wie viele andere cis-Golgi-gebundene Proteine auch. Für die Assoziation von hHk3 mit dem Golgi-Apparat scheint eine intakte Mikrotubuli-Struktur demnach nicht benötigt zu werden.

In Analogie zu diesen Experimenten wurde durch konfokale Lasermikroskopie untersucht, welche Auswirkungen Nocodazol auf die Lokalisation von IIGP und mHk3 hat. Abbildung 14 zeigt die typische Assoziation von IIGP (A-C) bzw. mHk3 (D-F) mit

dem Golgi-Apparat in unbehandelten, IFN- γ stimulierten Knochenmarksmakrophagen. Nach Zugabe von Nocodazol verteilte sich der zerstörte Golgi-Apparat in der Zelle (H). IIGP blieb weiterhin mit dem ER assoziiert, dessen normalerweise feine retikuläre Struktur durch die Depolymerisierung der Mikrotubuli kontrahiert wirkte, und zeigte keinerlei Assoziation mit den aufgelösten Golgi-Strukturen (G,I). In Übereinstimmung mit den bisherigen Beschreibungen blieb hingegen der überwiegende Teil von mHk3 weiterhin mit den zerstörten Strukturen des Golgi-Apparates assoziiert (K). Eine Kolokalisation, wie sie in IFN- γ behandelten Zellen im Bereich des Golgi-Apparates nachgewiesen wurde, konnte nach Nocodazolbehandlung nicht detektiert werden (J-L). IIGP und mHk3 scheinen demnach auf unterschiedliche Weise mit dem Golgi-Apparat zu assoziieren. Im Gegensatz zu mHk3 scheint die Assoziation von IIGP mit dem Golgi-Apparat von einem intakten Mikrotubuli-Netzwerk abhängig zu sein.

Abbildung 14 (nächste Seite)

Die subzelluläre Lokalisation von IIGP, mHk3 sowie des Golgi-Apparates wurde in unbehandelten bzw. mit Nocodazol-behandelten Maus-Knochenmarksmakrophagen gemäß Abbildung 12 im konfokalen Lasermikroskop untersucht.

A-F: unbehandelte Zellen; G-L: Inkubation mit Nocodazol. Der Golgi-Apparat wurde mit einem Antikörper gegen das Protein α -Mannosidase (B,H), das cis-Golgi-Subkompartiment mit einem Antikörper gegen das Matrixprotein GM130 (E,F) angefärbt. Die Verrechnung der Einzelsignale zeigt eine Kolokalisation beider Signale als gelbes Signal an (rechte Spalte).

Ein signifikanter Anteil von IIGP (A,C) assoziierte mit dem Golgi-Apparat (B,C). Die Assoziation von mHk3 (D,F) mit dem cis-Golgi (E,F) konnte mit abgeschwächter Laserintensität optisch aufgelöst werden (F). mHk3 war zudem im angrenzenden Bereichen des MTOC detektierbar. Die feine retikuläre Verteilung von IIGP in unbehandelten Zellen (A) erschien nach der Behandlung mit Nocodazol als kontrahierte, stellenweise kollabierte Netzstruktur (G,J). Während IIGP (G,I) nicht mit den verstreut aufgelösten Strukturen des Golgi-Apparates (H,I) kolokalisierte, blieb der überwiegende Teil von mHk3 mit diesen Strukturen assoziiert (K). Eine spezifische Kolokalisation von IIGP mit mHk3 war in Nocodazol-behandelten Zellen nicht mehr erkennbar (J-L).

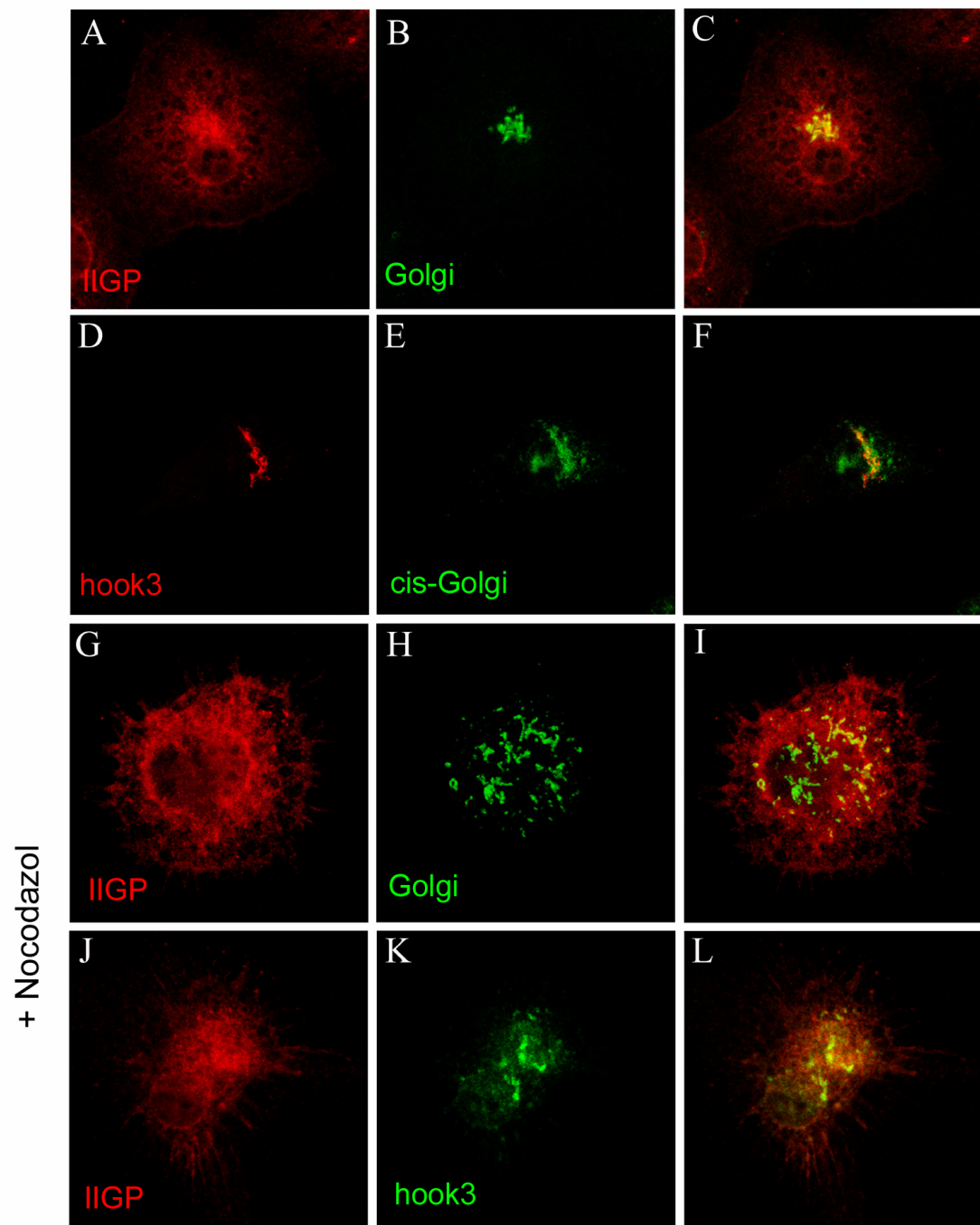


Abbildung 14: Konfokale mikroskopische Analyse der Assoziation von IIGP und mHk3 mit dem Golgi-Apparat in Maus-Knochenmarksmakrophagen nach Nocodazol-Behandlung

4.3 Charakterisierung von IIGP in Überexpressionsstudien

Eine Möglichkeit, die biochemischen und funktionellen Eigenschaften von Proteinen in ihrem *in-vivo* Kontext näher zu charakterisieren, bietet die Modulation ihres Expressionsniveaus in Zellen.

Die weitergehende Charakterisierung von IIGP erfolgte anhand von Fibroblastenzellen (NIH/3T3), die IIGP bzw. die korrespondierende GTPase-negative Mutante IIGP[S83N] überexprimieren (zur Verfügung gestellt von J. Zerrahn). In diesen Zellen wird von einem retroviral eingebrachten bicistronischen Konstrukt sowohl IIGP als auch das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) als Reportergen unter der Kontrolle des MCSV-Promoters (Murine Stem Cell Virus)konstitutiv exprimiert. Unterschiedlich stark IIGP-exprimierende stabile Transfektanten wurden anhand der Intensität ihres GFP-Fluoreszenzsignals selektioniert und klonal expandiert bzw. die polyklonalen IIGP[S83N]-Transfektanten mittels Zellsortierung auf ein starkes GFP-Signal selektioniert.

4.3.1 Ektopisch exprimiertes IIGP bildet perinukleäre Aggregate

Die Überexpression von IIGP und IIGP[S83N] wurde von den NIH-Fibroblasten toleriert und zeigte bei der Kultivierung der Zellen keinen Einfluß auf die Zellmorphologie oder das Zellwachstum (nicht gezeigt). Die konfokale mikroskopische Analyse der Transfektanten zeigte jedoch, dass sich die subzelluläre Verteilung des überexprimierten IIGP bzw. IIGP[S83N] deutlich von der typischen ER- und Golgi-Assoziation des endogen exprimierten IIGP unterscheidet (Abbildung 15).

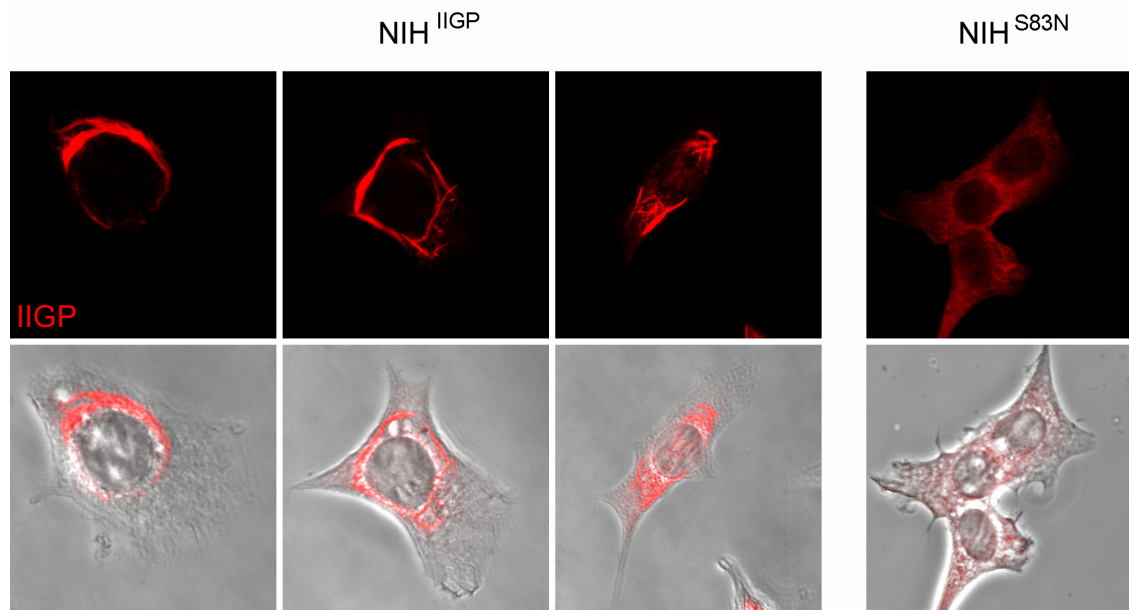


Abbildung 15: Konfokal-mikroskopische Analyse der Überexpression von IIGP bzw. IIGP[S83N] in Maus-Fibroblasten NIH/3T3

Konstitutiv IIGP bzw. IIGP[S83N] überexprimierende NIH-Mausfibroblasten wurden auf Objektträgern kultiviert und mit einem gegen IIGP gerichteten monoklonalen Antikörper und einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die oberen Bilder zeigen das Fluoreszenzsignal, das in den unteren Bildern mit dem Phasenkontrast in identischer Fokussierungsebene überlagert wurde. Die dargestellten IIGP-überexprimierenden Zellen zeigen repräsentativ drei unterschiedliche Ausprägungen des IIGP-Aggregats. Die subzelluläre Verteilung von IIGP[S83N] war in allen Zellen identisch.

IIGP bildete in den Zellen auffällige, lineare Strukturen überwiegend im perinukleären Bereich. Im Gegensatz wurde IIGP[S83N] als unregelmäßiges Verteilungsmuster, das sich über das gesamte Zytoplasma erstreckt, detektiert (im Gegensatz zum gleichmäßig verteilten GFP-Signal, nicht gezeigt).

Durch Überexpression von IIGP bildeten sich in den Zellen um den Nukleus herum auffällige, untypische, meist lineare IIGP-positive Strukturen aus, die keine Ähnlichkeit mit bekannten zellulären Strukturen hatten. Bei höherer Auflösung zeigte sich, dass diese Aggregate teilweise aus mehreren parallel zueinander angeordneten Schichten bestanden, und den Nukleus als eine kompakte, bänderähnliche Struktur umschlossen, die auf einer Seite des Kerns meist stärker ausgeprägt war (Abbildung 15, links). Oft krümmten sich diese verdichteten Strukturen nicht entlang des Nukleus, sondern blieben als lineare Strukturen in unmittelbarer Nähe zum Nukleus tangential angeordnet (Abbildung 15, Mitte). In einem Teil der Transfektanten waren im zellperipheren Bereich mehrere kleine lineare Aggregate detektierbar, die kristallinen und fädigen Strukturen ähnelten. Diese scheinbar locker miteinander assoziierten Einzelaggregate

waren in einer gewissen Polarität zum Zellkern hin ausgerichtet und verdichteten sich im perinukleären Bereich (Abbildung 15, rechts). Die Ausbildung dieser untypischen IIGP-positiven Aggregate erfolgte in den IIGP-überexprimierenden Transfektanten unabhängig von der Expressionsstärke (bezüglich des GFP-Signals) und war selbst bei transienter ektopischer Expression von IIGP detektierbar (nicht gezeigt). Möglicherweise reflektiert die unterschiedliche Anordnung der IIGP-positiven Aggregate unterschiedliche physiologische Zustände der individuellen Zelle bei der Ausbildung dieser ungewöhnlichen Struktur.

Eine derartiges Aggregat wurde bei der Überexpression von IIGP[S83N] nicht ausgebildet. Die GTPase-negative IIGP-Mutante war im gesamten Cytoplasma lokalisiert, das Fluoreszenzsignal wies im direkten Vergleich mit dem gleichmäßig verteilten GFP-Signal (nicht gezeigt) leichte Unregelmäßigkeiten auf, hatte jedoch keine Ähnlichkeit mit retikulären Strukturen. Innerhalb der polyklonalen IIGP[S83N]-Transfektantenpopulation zeigten alle Zellen, unabhängig von der Stärke ihres GFP-Signals (und der damit korrelierenden Expressionsstärke von IIGP[S83N]), dieses Verteilungsmuster. Der Befund, dass bei der ektopischen Expression IIGP[S83N] eine signifikant unterschiedliche Verteilung als unverändertes IIGP aufweist, deutet darauf hin, dass die in IIGP[S83N] eingebrachte Mutation maßgeblichen Einfluss auf die Lokalisation der GTPase nimmt.

4.3.2 Charakterisierung der IIGP-Aggregate

Da sich die Intensitäten der Fluoreszenzsignale von ektopisch exprimiertem IIGP und IIGP[S83N] in der konfokalen Analyse voneinander unterschieden, wurde zunächst untersucht, ob die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation beider Proteine auf ein unterschiedliches Expressionsniveau zurückzuführen war. Dazu wurden die Fluoreszenzsignale der ektopischen IIGP-Expression mit den Signalen des endogen exprimierten IIGP nach IFN- γ Stimulation bei einer identischen Detektionssensitivität verglichen. Parallel wurde die Expression von IIGP bzw. IIGP[S83N] in einer Western-Blot-Analyse quantifiziert (Abbildung 16).

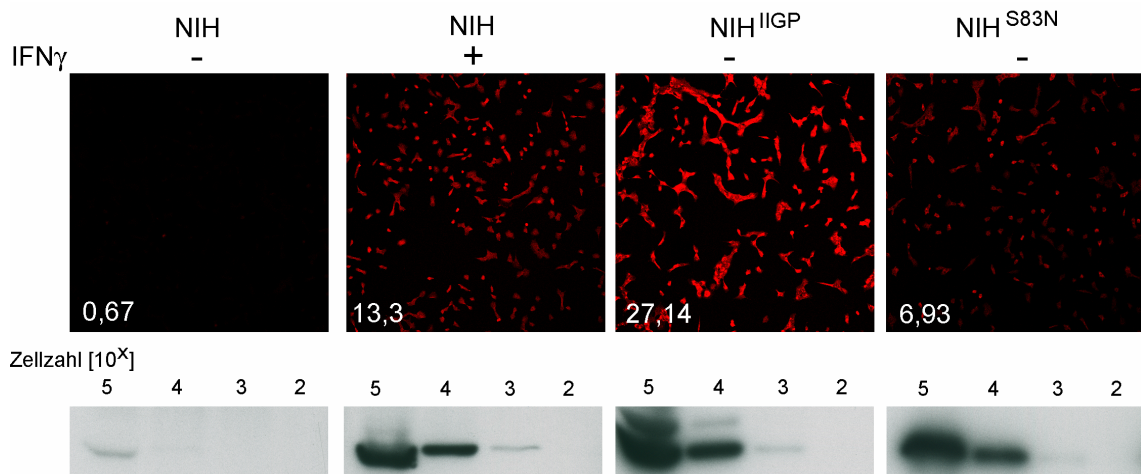


Abbildung 16: Quantitativer Vergleich der endogenen IIGP Expression nach IFN- γ Stimulation und ektopisch exprimiertem IIGP bzw. IIGP[S83N]

Die konfokal-mikroskopische Analyse erfolgte wie in Abbildung 15 beschrieben. Zur Induktion der Expression von endogenem IIGP wurden NIH/3T3-Mausfibroblasten für 10 h mit IFN- γ stimuliert (+). Das IIGP-Fluoreszenzsignal wurde unter identischen Bedingungen bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung aufgenommen. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch die Auswertung des Rot-Kanals (Histogrammauswertung in Photoshop). Zur semi-quantitativen Bestimmung der Expressionsstärke von IIGP wurden äquivalente Mengen Zellysat logarithmisch titriert und in einer Western-Blot-Analyse mit dem in der konfokalen Analyse verwendeten Antikörper gegen IIGP detektiert. Angegeben ist die korrespondierende aufgetragene Zellzahl pro Spur (10^5 - 10^2 Zellen/Gelspur). Die signifikanten Intensitätsunterschiede in der konfokalen Analyse korrelierten nicht mit den eher geringfügigen Mengenunterschieden in der Western-Blot-Analyse.

In der Western-Blot-Analyse von 10^5 nicht mit IFN- γ stimulierten Fibroblasten ließ sich ein sehr schwaches IIGP-Signal detektieren, das konfokal nicht detektierbar war. Dieses Signal entspricht der schwachen Basalexpression der 47 kDa GTPasen (Boehm et al., 1998). Nach einer Stimulation der Fibroblasten mit IFN- γ für 10 Stunden konnte die Expression von IIGP in der konfokal-mikroskopischen Analyse nachgewiesen werden, und bereits in einem Lysatäquivalent von 1000 Zellen konnte im Western-Blot ein IIGP-Signal detektiert werden. In der Western-Blot-Analyse schien die ektopische Expression von IIGP und IIGP[S83N] ungefähr auf gleichem Niveau zu liegen und nur geringfügig stärker zu sein, als die endogene Expression. Das Fluoreszenzsignal der IIGP-Transfektanden war hingegen deutlich intensiver, und das von IIGP[S83N]-Tranfektanden signifikant schwächer als das von endogen exprimiertem IIGP. Damit zeigte sich deutlich, dass die Fluoreszenzintensitäten nicht mit dem eigentlichen Expressionsniveau von IIGP bzw. IIGP[S83N] korrelierten. Möglicherweise ist die

stark unterschiedliche Verteilung von IIGP in diesen Zellen die Ursache für die starken Intensitätsunterschiede. Sollten diese jedoch eine unterschiedliche Antikörper-Affinität zu nativem IIGP und IIGP[S83N] reflektieren, so wäre dies ein Hinweis darauf, dass die GTPase-negative Mutante tatsächlich einem signifikanten Konfigurationswechsel unterliegt. Ebenso könnten funktionelle Unterschiede in einer unterschiedlichen Zugänglichkeit für den Antikörper resultieren. Im Einklang mit diesen Annahmen steht der Befund der Western-Blot-Analyse, dass derartige strukturelle oder funktionelle Unterschiede unter denaturierenden Bedingungen nicht detektierbar wären.

Eine Anreicherung von ektopisch exprimiertem IIGP über das physiologische Niveau hinaus lässt sich als Ursache für die Ausbildung der Aggregate in den IIGP-Transfektanten ausschließen, denn zwischen der endogen und der ektopisch exprimiertem IIGP Proteinmenge bestand quantitativ kein signifikanter Unterschied. Da sich diese Strukturen nur durch die ektopische Expression von IIGP, nicht jedoch durch die ebenso starke Expression von IIGP[S83N] ausbildeten, erscheint es plausibel, dass diese Strukturen biochemische oder funktionelle Eigenschaften der aktiven, GTP-gebundenen Form von IIGP reflektieren, die die GTPase-negative, GDP-gebundene Form nicht besitzt.

4.3.3 Die Ausbildung der IIGP-assoziierten Strukturen repräsentiert keine klassische Aggresomenbildung

Die ektopische von Proteinen kann darin resultieren, dass Proteine nicht korrekt gefaltet oder prozessiert werden können, in nicht-nativen Konformationen miteinander interagieren und Aggregate bilden. Dieses Phänomen wird bei der Überexpression von heterologen Proteinen in prokaryontischen Zellen beobachtet und resultiert in der Ausbildung von großen, unlöslichen Proteinaggregaten, den sog. „inclusion bodies“ (Einschlußkörper) (Fink, 1998). Auch in eukaryontischen Zellen können sich Strukturen aus falsch gefalteten, funktionell inaktiven Proteinen, die nicht zuvor durch das Proteasom abgebaut wurden, bilden (Kopito, 2000). Derartige Strukturen werden als Aggresomen bezeichnet. Es stellte sich daher die Frage, ob es sich bei den Aggregaten, die sich bei der ektopischen Expression von IIGP in Fibroblasten ausbildeten, um typische Aggresomen handelte.

Aggresomen setzen sich aus kleineren, zumeist uniformen Einzelaggregaten zusammen, die vorrangig in der Zellperipherie entstehen und Mikrotubuli-abhängig aktiv zum MTOC transportiert werden, wo sie ein großes, kompaktes, meist rundliches Aggregat bilden (Garcia-Mata et al., 2002). Die Form dieser Aggresomen kann auch unregelmäßig sein und sich aus scheinbar diffus verteilten, ohne ersichtliche Struktur miteinander assoziierten kleinen Einzelaggregaten zusammensetzen. Die Ausbildung eines Aggresoms resultiert in einer dramatischten Umorganisation der intermediären Filamentstrukturen des Cytoskeletts (Johnston et al., 1998). Eine charakteristische Strukturkomponente von Aggresomen ist der Einschluß in eine Struktur, die sich durch das Kollabieren der Vimentinstruktur bildet („Vimentin-Caging“).

In konfokal-mikroskopischen Analysen wurde deshalb genauer untersucht, ob die IIGP-Aggregate strukturelle Komponenten und Eigenschaften von Aggresomen aufweisen (Abbildung 17).

(nächste Seite)

Abbildung 17: Zweifarben-konfokal-mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von ektopisch exprimiertem IIGP und in die Aggresomenbildung involvierte Strukturkomponenten in Maus-Fibroblasten

In den ektopisch IIGP exprimierenden NIH/3T3 Fibroblasten wurden Zytoskelett-Strukturkomponenten (Tubulin, Vimentin, Filament, Keratin) bzw. Organellen (Golgi) mit spezifischen mAbs detektiert und mit Cy3-gekoppelten Sekundäntikörpern angefärbt (grüner Farbkanal, links). IIGP wurde parallel mit dem Cy5-Fluorochrom-gekoppelten mAk 10D7 detektiert (roter Farbkanal, 2. Spalte von links).

Um Interferenzen zwischen dem überlappenden Emissionsspektrum von Cy3 und Cy5 auszuschließen, wurden die Doppelfärbungen bei nur einer Wellenlänge angeregt und einzeln aufgenommen. Die Verrechnung beider Farbkanäle zeigt eine Kolokalisation als gelbes Signal an (dritte Spalte). Um die subzelluläre Lokalisationen zu verdeutlichen, ist rechts außen die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme gezeigt.

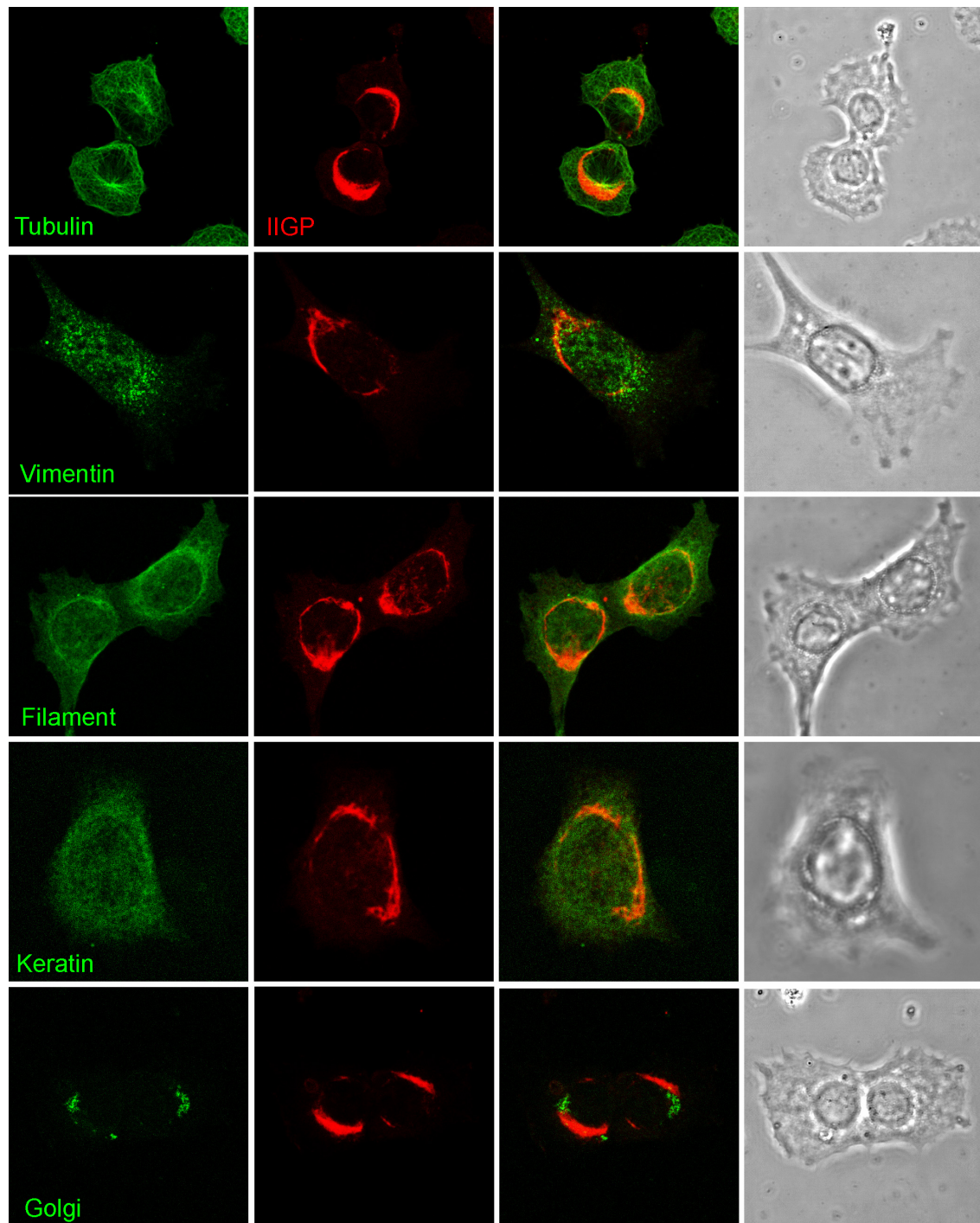


Abbildung 17: Zweifarben-konfokal-mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von ektopisch exprimiertem IIGP und in die Aggresomenbildung involvierte Strukturkomponenten in Maus-Fibroblasten

Die Gestalt der IIGP-Aggregate entsprach nicht den typischen Charakteristika von Aggresomen-Strukturen. Die IIGP-Aggregate dagegen zeigten sich als längliche Bänder, die sich zueinander parallel um den Nukleus anordneten und eine Assoziation mit den Strukturen des MTOC war nicht offensichtlich. Das IIGP-Aggregat zeigte nicht die für Aggresomen typische Assoziation mit Vimentin-Filamenten und zeigte generell keinen Einfluß auf das Filamentnetzwerk oder Keratinskelett in den Transfektanden. Eine Fragmentierung des Golgi-Apparates durch Aggresomen, die oft in der Interphase der Zellteilung beobachtet wird (Garcia-Mata et al., 1999), wurde in den Transfektanden nicht detektiert. Vielmehr schlossen sich beide Strukturen räumlich aus.

Im Gegensatz zu endogen exprimiertem IIGP assoziiert das aus ektopisch exprimiertem IIP hervorgehende IIGP-Aggregat nicht mit den Membranen des Golgi-Apparates, sondern es liegt in dessen unmittelbarer Nähe. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die funktionellen Eigenschaften von IIGP im Aggregat von denen von endogen exprimiertem IIGP unterscheiden.

Da die zu einem Aggresom akkumulierten Proteine in ihren nicht-nativen Konformationen vorliegen, kommt es zu starken intra- und intermolekularen physikalischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinbereichen, woraus eine geringe Löslichkeit der aggregierten Proteine auch in Gegenwart von Detergenzien resultiert. Deshalb wurde untersucht, ob die IIGP-Aggregate unlösliche Proteinpräzipitate darstellten (Abbildung 18). Dazu wurden endogen oder ektopisch exprimierende Fibroblasten durch ein mildes Detergenz lysiert und mittels Zentrifugation die löslichen Proteine von unlöslichen bzw. aggregierten Proteinen getrennt und IIGP in einer Western-Blot-Analyse detektiert.

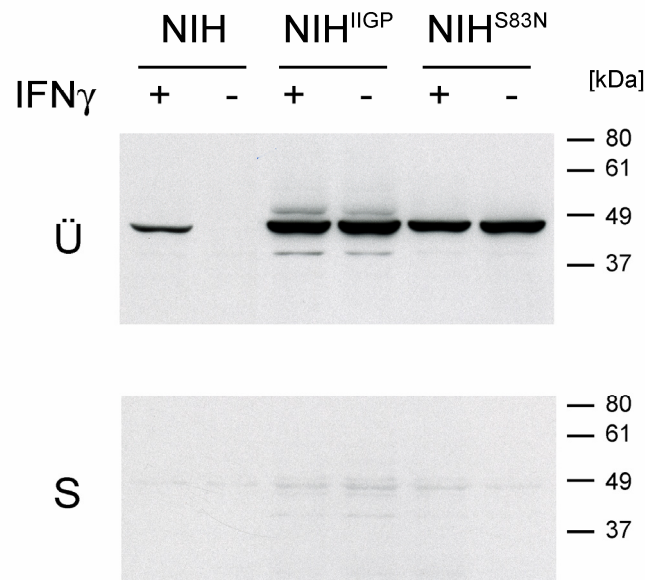


Abbildung 18: Qualitativer IIGP-Löslichkeitstest nach Zellyse von unbehandelten und IFN- γ stimulierten Maus-Fibroblasten und IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanden

NIH/3T3-Fibroblasten und IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanden wurden für 12 h mit IFN- γ stimuliert, gewaschen und in PBS mit 1% NP-40 auf Eis in Gegenwart von Protease-Inhibitoren lysiert. Nach einer Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 60 min. wurde der Überstand abgenommen, das Präzipitat in einem identischen Volumen Lysis-Puffer resuspendiert und IIGP in beiden Probenmittels Western-Blot mit dem Antikörper 5D9 detektiert. Unter diesen milden Lysebedingungen war IIGP und IIGP[S83N] in allen getesteten Situationen komplett löslich. Ü: Überstand; S: Sediment

Unter den gewählten milden Lysebedingungen zeigte sich, dass ektopisch exprimiertes IIGP bzw. IIGP[S83N] ebenso komplett löslich war wie das endogene IIGP. Die ausgebildeten Strukturen repräsentierten demzufolge keine unlöslichen, detergent-inerten Proteinaggregate, wie sie typisch für Aggresomen sind.

Eine hocheffiziente Möglichkeit, große partikuläre Strukturen wie Mitochondrien und Peroxisomen zu degradieren, bietet der Prozess der Autophagie. Darunter versteht man den noch nicht genau charakterisierten Einschluss dieser Partikel in sogenannten Autophagosomen, die anschließend mit Lysosomen fusionieren und von den lysosomalen Hydrolasen degradiert werden (Mortimore et al., 1996). Auch für die Degradation von Proteinkomplexen in Aggresomen wird dieser Stoffwechselweg diskutiert (Lee et al., 2002).

Um zu überprüfen, ob die von IIGP ausgebildeten Strukturen ein Aggregat von aberrant gefaltetem oder prozessiertem IIGP darstellt und demzufolge mit degenerativen Prozesswegen in Verbindung steht, wurde aggregiertes IIGP auf eine Assoziation mit den Kompartimenten des endosomalen-lysosomalen Stoffwechselwegs untersucht (Abbildung 19).

Es konnte keine Kolo-kalisation von IIGP mit Endosomen oder Lysosomen detektiert werden, was eine Degradierung der von IIGP gebildeten Strukturen durch einen lysosomalen Abbau unwahrscheinlich macht.

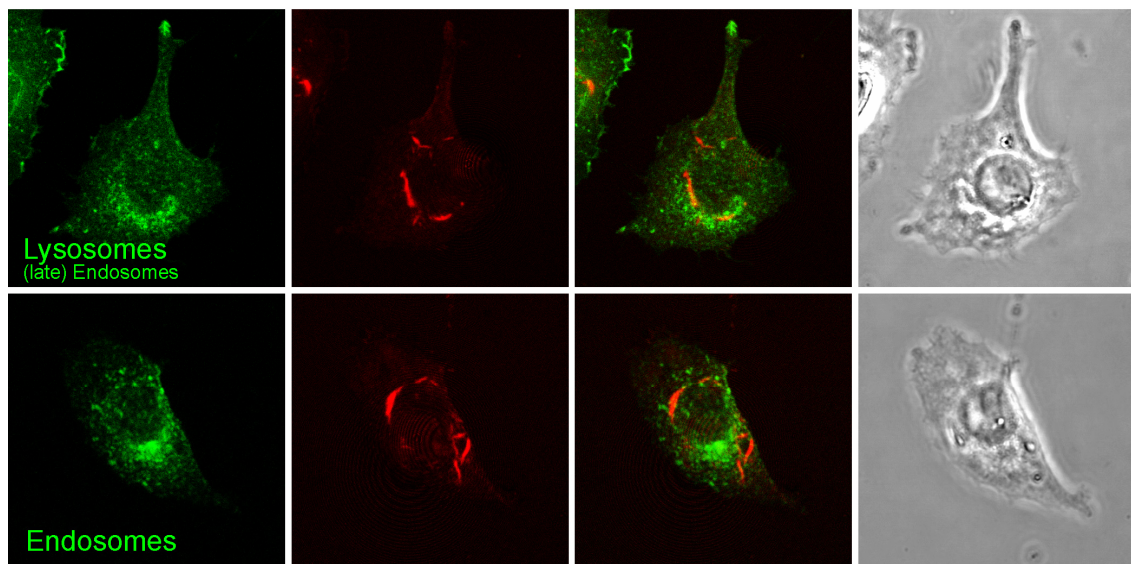


Abbildung 19: Zweifarbenaufgenommene Konfokalmikroskopie-Analyse der subzellulären Lokalisation von ektopisch exprimiertem IIGP und Kompartimenten des endosomalen-lysosomalen Systems in Maus-Fibroblasten

IIGP sowie Lysosomen bzw. Endosomen wurden in NIH/3T3 Fibroblasten mit spezifischen Antikörpern wie in Abbildung 17 angefärbt und konfokal-mikroskopisch analysiert.

4.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der von ektopisch exprimiertem IIGP gebildeten Aggregate

Da es sich bei den von IIGP-Aggregaten offensichtlich nicht um eine klassische Aggresomenausbildung aus falsch gefaltetem oder falsch prozessiertem IIGP handelt, beruht die Ausbildung dieser Aggregate möglicherweise auf charakteristischen Eigenschaften von IIGP. Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, dass die ebenso stark exprimierte Mutante IIGP[S83N] nicht zur Ausbildung von Aggregaten befähigt ist. Die Assoziation von endogenem IIGP mit intrazellulären Membranen lässt vermuten, dass auch ektopisch exprimiertes IIGP die Fähigkeit besitzt, mit Membranen assoziieren zu können. Auch der lineare Charakter der IIGP- Aggregate könnte ein Indiz für eine strukturassoziierte Verteilung von IIGP sein. Um zu klären, ob ektopisches IIGP mit intrazellulären Membranen assoziiert, wurde die Feinstruktur der IIGP-Aggregate mit elektronenmikroskopischen Techniken untersucht (Abbildung 20,21).

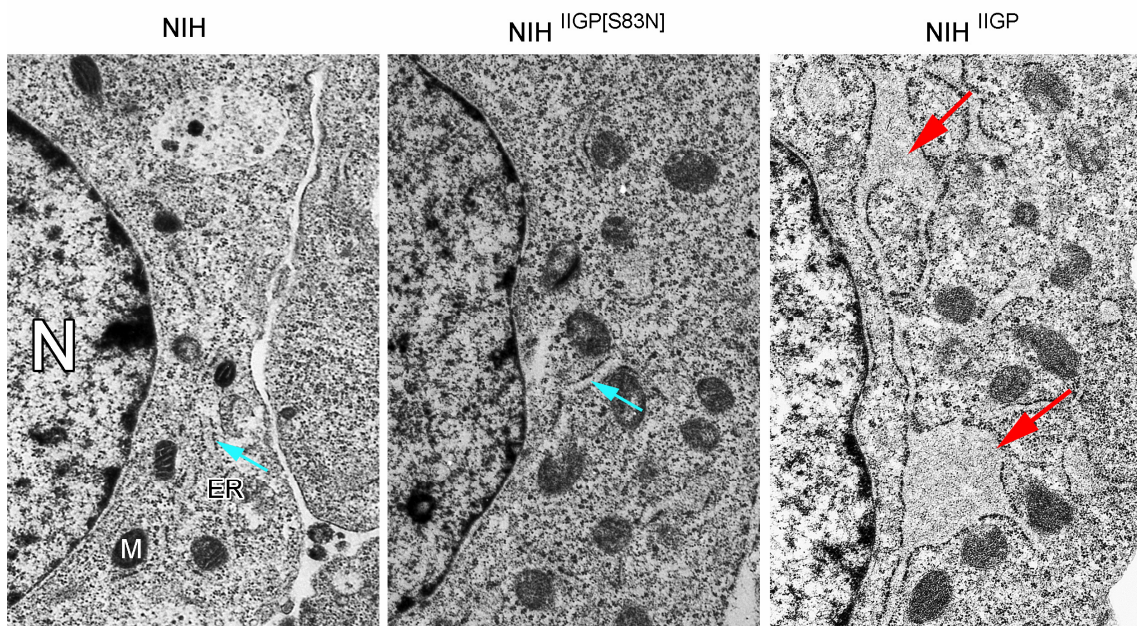


Abbildung 20 : Elektronenmikroskopische Untersuchung von NIH/3T3-Mausfibroblasten und IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanten

Die blauen Pfeile markieren das ER, das in IIGP[S83N] keine Veränderungen aufweist. Die roten Pfeile zeigen die großlumige Kompartimentalisierung des ER in IIGP-Transfektanten, die sich durch eine unterschiedliche Elektronendichte deutlich vom Zytoplasma abhebt. N Nukleus, M Mitochondrium, ER Endoplasmatisches Retikulum.

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung der IIGP-Transfektanden zeigte sich, dass sich das rauhe ER (erkennbar an den Ribosomen, die als kleine, linear angeordnete Punkte mit hoher Elektronendichte abgebildet werden) in unmittelbarer Nähe zum Nukleus auffällig ausdehnt und eine großlumige Struktur ausbildet, während der ER-Bereich in NIH-Fibroblasten und in IIGP[S83N]-Transfektanden unauffällig war. Mit der Ausdehnung des ER in diesen Zellen schien auch eine Kompartimentalisierung des ER-Netzwerkes verbunden zu sein. Im Lumen des ausgedehnten ER akkumulierte ein Material, das eine leicht unregelmäßige Elektronendichte aufwies und sich signifikant vom umgebenden Zytoplasma unterschied. Beim elektronenmikroskopischen Nachweis von IIGP mittels Antikörperfärbung (Immuno-EM) erwies es sich als äußerst schwierig, sowohl signifikante IIGP-Signale zu detektieren als auch die Assoziation von IIGP mit intrazellulären Strukturen gleichzeitig befriedigend aufzulösen (Abbildung 21).

Trotz der begrenzten Strukturerhaltung wurde deutlich, dass IIGP in der Nähe des Nukleus mit linearen Strukturen assoziiert vorliegt. Obwohl es nicht möglich war, diese Strukturen detaillierter aufzulösen, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass es sich in unmittelbarer Nähe zum Nukleus um die Membranen des ER handelt. Aus der Linearität der IIGP-Signale lässt sich ebenfalls folgern, dass es sich bei dem expandierten ER befindlichen Material, das sich auch in diesen Analysen durch eine unterschiedliche Elektronendichte vom Zytoplasma abhebt, offensichtlich nicht um IIGP handelt. In zellperipheren Bereichen wurde IIGP zudem auf der Innenseite der Membranen von Vesikeln detektiert, deren Identität jedoch aufgrund der begrenzten Strukturauflösung ungeklärt ist.

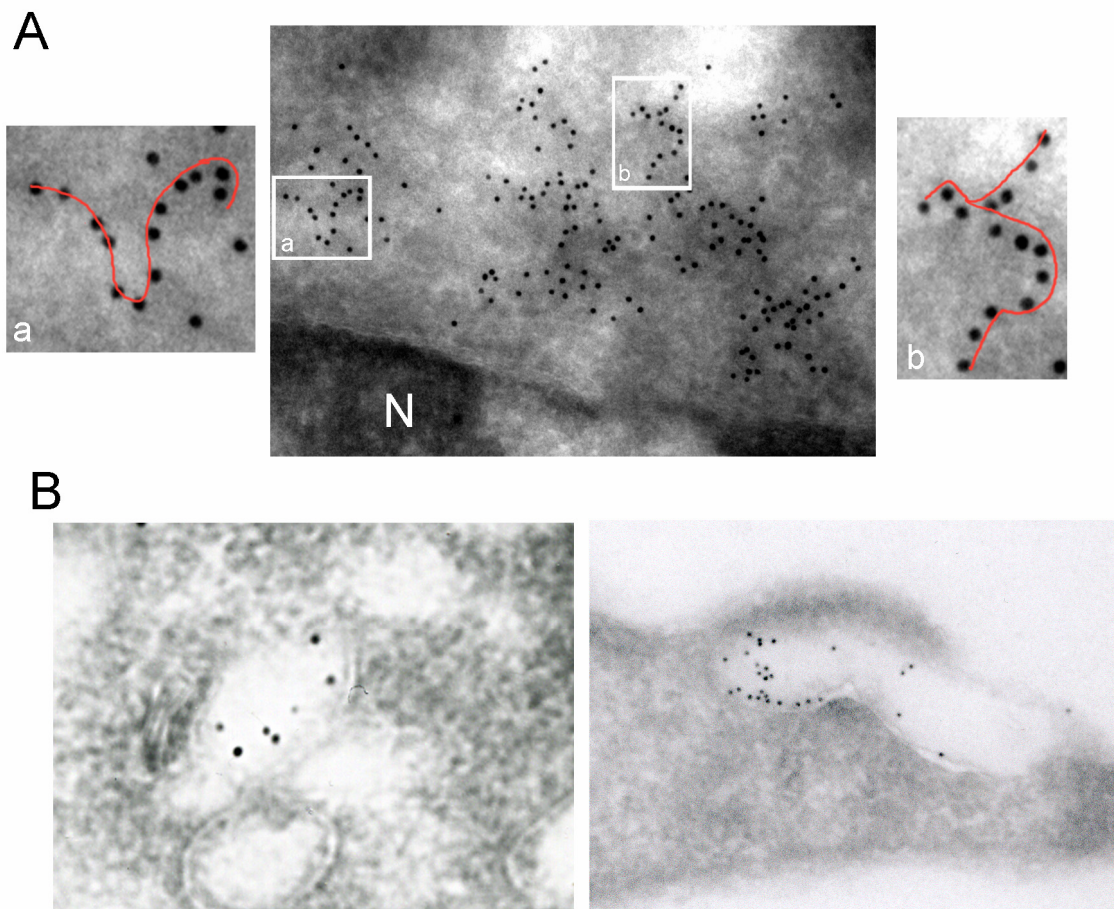


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Immundetektion (Immuno-EM) von ektopisch exprimiertem IIGP NIH/3T3 Fibroblasten

Die für die Immuno-EM präparierten IIGP-Transfektanten wurden mit einer Mischung der α -IIGP mAbs 5D9 und 10D7 (50:50) bzw. polyklonalem α -IIGP Hasenserum und mit einem an Goldpartikel gebundenen Zweitantikörper inkubiert und elektronenmikroskopisch aufgenommen (Alice Warley, King's College, Department for Electron Microscopy, London) N: Nukleus

A: Detektion von strukturassoziierten IIGP-Einzelsignalen in einem elektronendichten Bereich nahe des Nukleus. Die Ausschnittsvergrößerungen a,b verdeutlichen die lineare Anordnung der Signale (gedanklich durch rote Linien hervorgehoben).

B: Detektion von IIGP an der Innenseite der Membran von vesikelartigen Strukturen mit geringer Elektronendichte in peripheren Zellbereichen.

4.3.5 Analyse der Membranassoziation von IIGP und IIGP[S83N]

Um eine mögliche Assoziation des ektopischen IIGP mit intrazellulären Membranen zu verifizieren, wurden die Membranen der IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanten durch differentielle Zentrifugation angereichert und in einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 22 A). Weiterhin wurde ermittelt, ob eine gleichzeitige Expression von endogenem IIGP (durch IFN- γ -Stimulation) in diesen Zellen einen Einfluss auf eine mögliche Membranassoziation hatte (Abbildung 22 B).

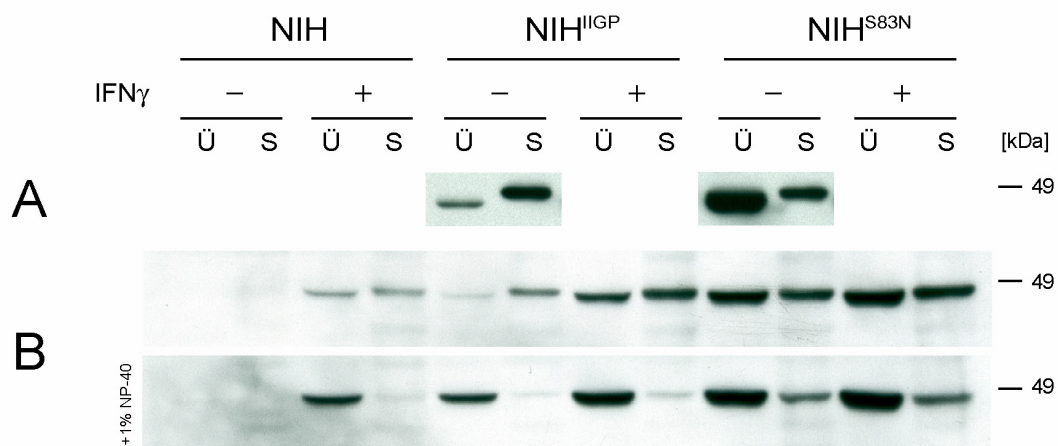


Abbildung 22: Quantitative Untersuchung der Membran-Assoziation von endogenem und ektopisch exprimiertem IIGP bzw. IIGP[S83N] in einer Western-Blot-Analyse

A: IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanten wurden mechanisch ohne Detergenz aufgeschlossen. Mit einer differentiellen Zentrifugation wurden zunächst die Kerne abgetrennt und lösliche Proteine im Überstand (Ü) von membrangebundenen Proteinen im Sediment (S) getrennt. Zur Vergleichbarkeit der Signale wurde das Sediment in einem gleichen Volumen Lysis-Puffer aufgenommen. Mittels Western-Blot-Analyse wurde IIGP in beiden Fraktionen detektiert. Die geringen Größenunterschiede sind vermutlich auf das unterschiedliche Laufverhalten der unterschiedlichen Proteinmengen zurückzuführen.

B: Unbehandelte oder für 10 h mit IFN- γ stimulierte Transfektanten bzw. NIH/3T3-Fibroblasten wurden wie in (A) analysiert (obere Reihe) oder vor der Membranfraktionierung für 30 min. mit 1% NP-40 versetzt (untere Reihe).

Der überwiegende Anteil von ektopischem IIGP wurde in der membranangereicherten Fraktion detektiert, während deutlich mehr IIGP[S83N] löslich als membranassoziiert vorzuliegen scheint (Abbildung 22 A). Die Membranassoziation von IIGP scheint demzufolge abhängig von dem GTP/GDP Bindungsstatus zu erfolgen. Endogenes IIGP (Abbildung 22 B) zeigt eine identische quantitative Anreicherung in der membranhaltigen Fraktion und hat in den ektopischen IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanden keinen Einfluß auf das Verhältnis zwischen löslichem und membranassoziierten IIGP. Wurden die Membranen in den Zellysaten durch die Zugabe eines Detergenz aufgelöst, lag IIGP fast vollständig löslich vor. Dieser Befund belegt die Membranassoziation von IIGP, denn die Detergenzbehandlung hatte auf die IIGP-Aggregate selbst keinen Einfluss (vgl. Abbildung 18).

4.3.6 Einfluss von IFN- γ auf die von ektopischem IIGP gebildeten Strukturen

IIGP als IFN- γ -induzierbare GTPase ist lediglich eine Komponente der komplexen zellulären Antwort auf Interferone. Möglicherweise ist die aberrante Lokalisation von ektopischem IIGP zu Aggregaten in den Fibroblasten darauf zurückzuführen, dass andere durch IFN- γ -abhängige Faktoren fehlen, die einen Einfluss auf den Transport, die Lokalisation und die Funktionalität von IIGP haben könnten. Es wurde daher untersucht, welchen Einfluss die Stimulation der IIGP-Tranfektanden mit IFN- γ auf die IIGP-Aggregate ausübt (Abbildung 23).

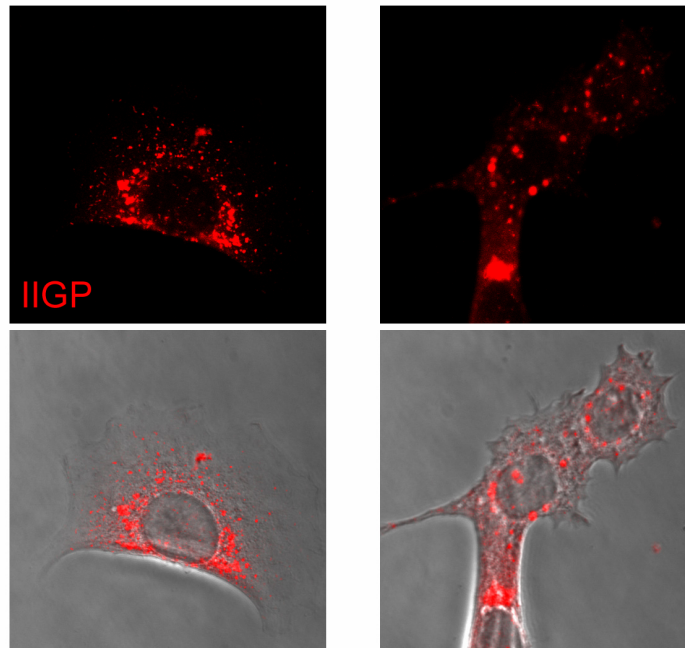


Abbildung 23: Konfokal-mikroskopische Analyse der IIGP-Transfektanden nach IFN- γ Stimulation

Nach der Stimulation der IIGP-Transfektanden mit IFN- γ für 20 h löst sich das IIGP-Aggregat (vgl. Abbildung 15) in zahlreiche kleine vesikelartige Strukturen unterschiedlicher Größe auf. Das IIGP-Fluoreszenzsignal (oben) ist mit dem Phasenkontrast überlagert (unten). Durchführung wie in Abbildung 15.

Die konfokale mikroskopische Analyse zeigte, dass sich nach IFN- γ Stimulation die ausgeprägten IIGP-Aggregate in zahlreiche runde, vesikelartige Einzelstrukturen auflösen, die sich über das gesamte Zytoplasma bis in die äußere Zellperipherie verteilen. Größere rundliche Strukturen verblieben in der Nähe des Nukleus, während die Aggregate zur Zellperipherie hin tendenziell kleiner erschienen. Innerhalb der analysierten Zellpopulation schien dieser Auflösungsprozess unterschiedlich weit fortgeschritten zu sein. Mit der Abrundung der linearen Aggregate, der vollständigen Auflösung zu unterschiedlich großen Vesikeln bis hin zu einer Verteilung, die der Lokalisation von endogenem IIGP sehr ähnelte, wirkten diese Einzelbeobachtungen wie zeitliche Stadien eines dynamischen Auslösungsprozesses des IIGP-Aggregats. Auch nach weitgehender Auflösung des Aggregats konnte jedoch keine Verteilung detektiert

werden, die der für endogens IIGP typischen Assoziation mit dem ER oder Golgi-Apparat entsprach.

Zur genaueren Charakterisierung der aus dem IIGP-Aggregat gebildeten Vesikel wurde in konfokal-mikroskopischen Analysen überprüft, ob diese Vesikel mit bekannten Strukturkomponenten oder Zellorganellen assoziiert sind (Abbildung 24).

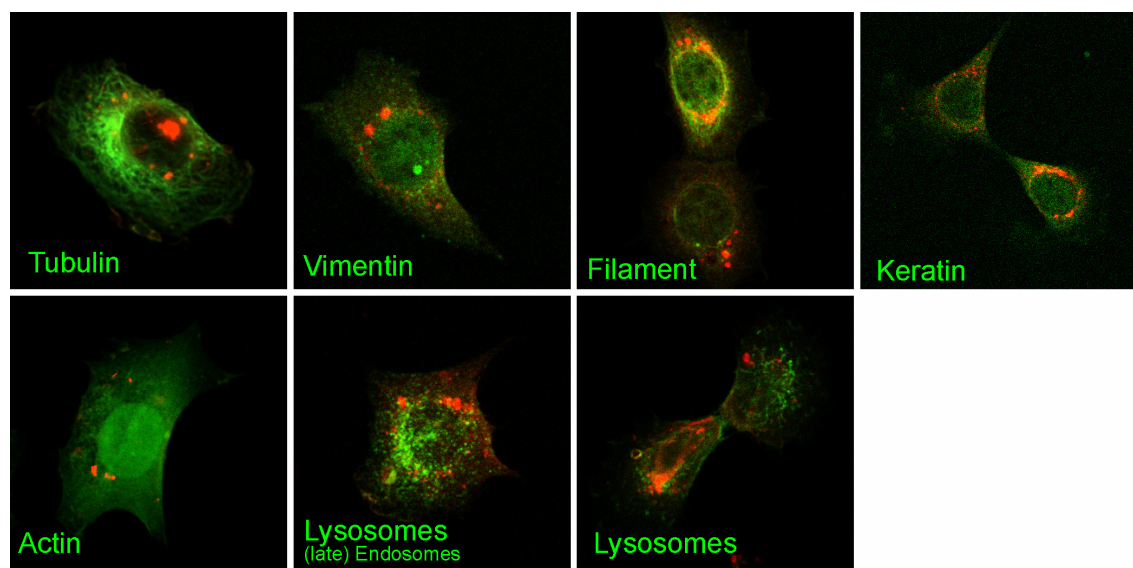


Abbildung 24: Zweifarben-konfokale Analyse des aufgelösten IIGP-Aggregats sowie Zellstrukturen bzw. Zellorganellen in IIGP-Transfektanten nach IFN- γ Stimulation

Durchführung wie in Abbildung 17. Gezeigt ist lediglich die Überlagerung der angefärbten Zellstrukturen (grüner Farbkanal) mit dem IIGP-Signal (roter Farbkanal). Es waren keine Kolokalisationen detektierbar.

Für die aufgelösten IIGP-Aggregate konnte ebenso wie für die intakte IIGP-Struktur keine signifikante Assoziation mit bekannten zellulären Strukturkomponenten oder Zellorganellen detektiert werden. Ein Eingang der IIGP-Aggregate in den lysosomalen Abbau war nicht offensichtlich, da keine Kolokalisation mit den Organellen des endosomalen-lysosomalen Systems detektiert wurde.

Die Stimulation von Zellen mit IFN- γ führt induziert eine erhöhte Stoffwechselaktivität, die sowohl in der Neusynthese als auch im erhöhten Abbau von Proteinen resultiert. Um zu überprüfen, ob die Auflösung des IIGP-Aggregats mit einer Verringerung der

IIGP-Proteinmenge korreliert, wurde die IIGP- bzw. IIGP[S83N]- Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach der IFN- γ Stimulation in einer Western-Blot-Analyse semiquantitativ bestimmt (Abbildung 25).

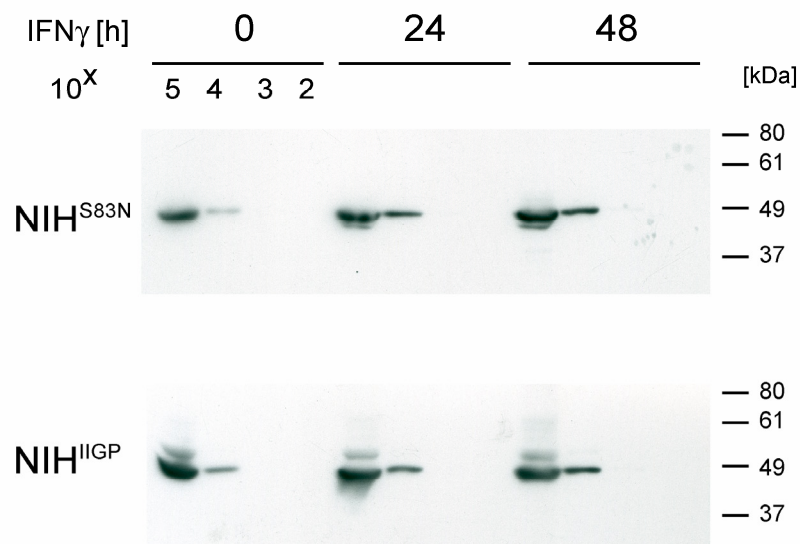


Abbildung 25: Qualitative und semiquantitative Western-Blot-Analyse von IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanten nach IFN- γ Stimulation für 24 und 48 h.

Die NIH/3T3-Transfektanten wurden für bis zu 48 h mit IFN- γ stimuliert und äquivalente Zellysatmenge im Western-Blot logarithmisch titriert (10^5 - 10^2 Zellen/Spur). Die mit dem mAk 5D9 detektierte IIGP-Proteinmenge nahm nach der IFN- γ Stimulation leicht zu und blieb nach 24 h konstant.

Die Stimulation der Transfektanten mit IFN- γ führte innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht zu einer Abnahme der IIGP-Proteinmenge, sondern führte im Gegenteil zu einer Zunahme der Gesamtproteinmenge an IIGP bzw. IIGP[S83N]. Ebenso wenig waren IIGP-Abbauprodukte mit geringerem Molekulargewicht detektierbar, jedoch konnte ein höhermolekulares Produkt bei der ektopischen Expression von IIGP nachgewiesen werden, das auch bereits in früheren Experimenten bereits detektierbar (vgl. Abbildung 16). Demzufolge beruhte die Auflösung der IIGP-Aggregate offensichtlich nicht auf einem proteolytischen Abbau von IIGP.

Der proteolytische Abbau von aberrant prozessierten oder gefalteten Proteinen erfolgt üblicherweise durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Hershko und Ciechanover,

1998). Der Befund der Western-Blot-Analysen, dass ein Teil des ektopisch exprimiertem IIGP ein höheres Molekulargewicht besaß, könnte eine Ubiquitinylierung des Proteins reflektieren. Es wurde deshalb mikroskopisch überprüft, ob sich eine Ubiquitinylierung am IIGP-Aggregat nachweisen ließ bzw. die Auflösung des Aggregats das Ergebnis einer Ubiquitin-abhängigen Prozessierung war (Abbildung 26).

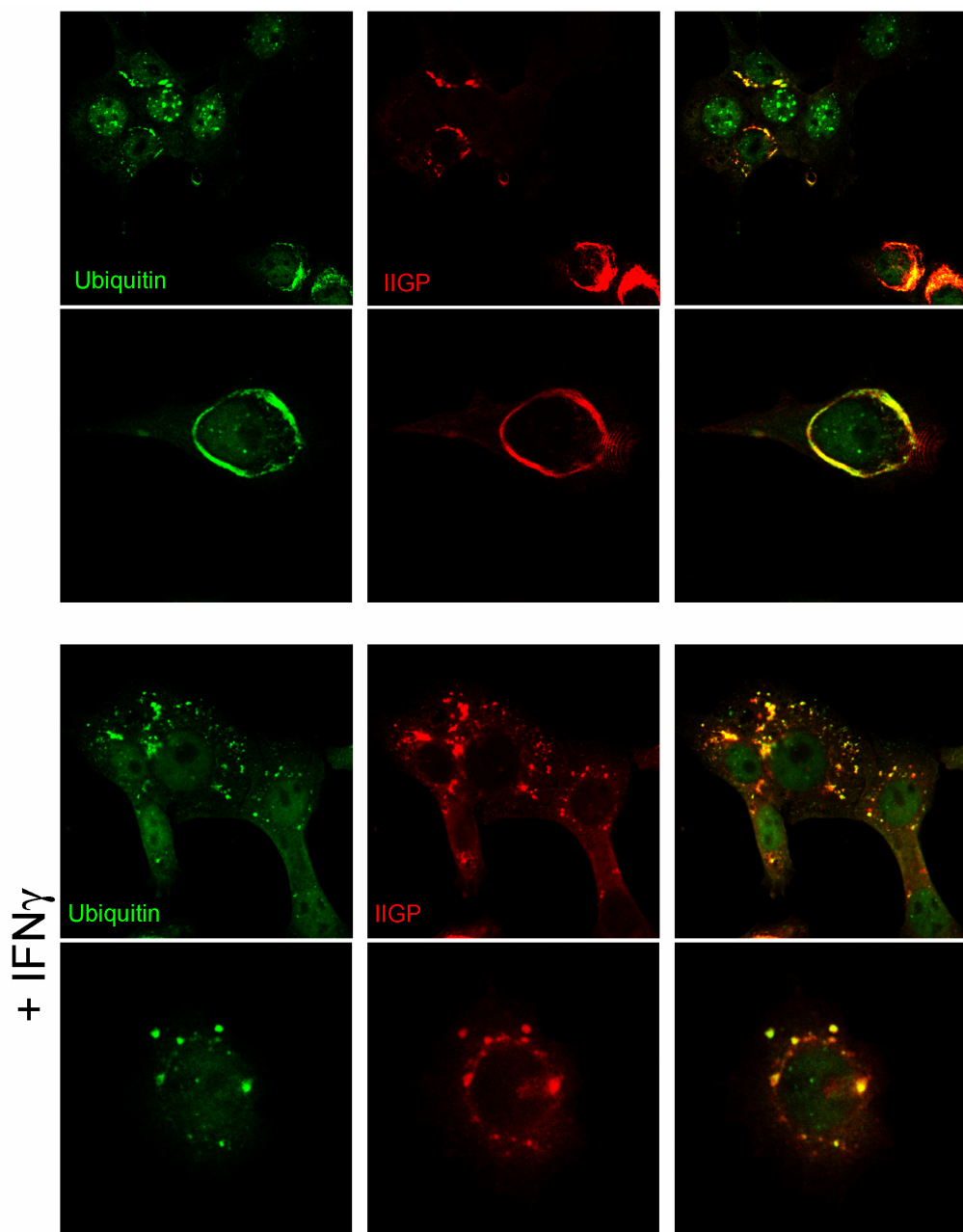


Abbildung 26: Zweifarbenaufgenommene mikroskopische Analyse der Ubiquitinylierung der IIGP-Aggregate in unstimulierten und IFN γ -stimulierten IIGP-Transfektanten

(Fortsetzung Abbildung 26)

Unbehandelte oder mit IFN- γ stimulierte IIGP-Transfektanden wurden wie in Abbildung 15 onfokal-mikroskopisch analysiert. Die Detektion von ubiquitinylierten Proteinen erfolgte mit dem mAk FK2 (grüner Farbkanal). Die Überlagerung beider Farbkanäle zeigte, dass ein überwiegender Teil der IIGP-positiven Aggregate sowohl in unbehandelten als auch in IFN- γ -stimulierten Transfektanden mit einem Ubiquitin-Signal kolokalisierte oder assoziiert war.

Die konfokal-mikroskopische Analyse zeigte eindeutig, dass die IIGP-Aggregate fast vollständig mit Ubiquitin kolokalisierten. Diese Kolokalisation blieb nach der IFN- γ Stimulation an den größeren Aggregaten bestehen, während einige kleinere IIGP-positive Vesikel nicht ubiquitinyliert erschienen. Um zu überprüfen, ob die Ko-Lokalisation beider Signale einer Ubiquitinylierung von IIGP selbst oder die eines anderen, identisch lokalisierten Proteins entsprach, wurde die Ubiquitinylierung von IIGP in einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 27).

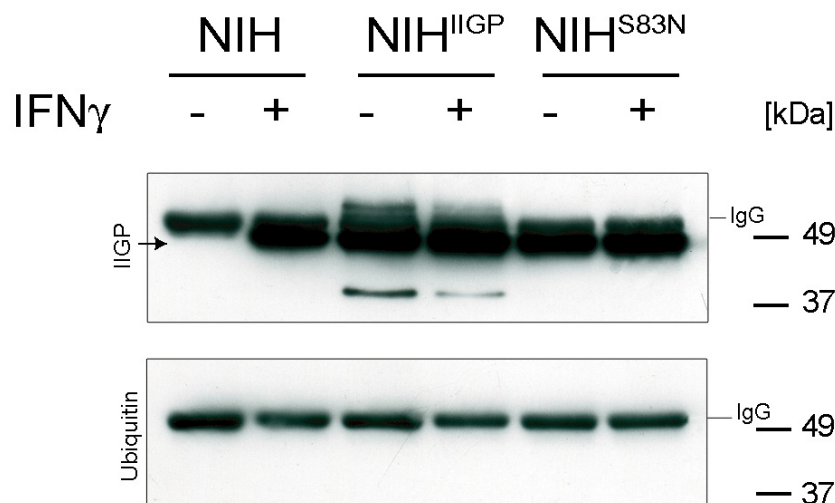


Abbildung 27: Western-Blot-Analyse der Ubiquitinylierung von ekto- und endogen exprimiertem IIGP bzw. IIGP[S83N] nach Immunpräzipitation

Western-Blot-Analyse nach einer Immunpräzipitation von endogenem bzw. ekto-exprimiertem IIGP aus Zellsätzen mit dem mAk 5D9 gegen IIGP (oben) und dem mAk FK2 gegen Ubiquitin (unten). Die schwere Kette des in der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers gegen IIGP ist rechts markiert.

Aus den Zellysaten der Transfektanden immunpräzipitiertes IIGP war nicht ubiquitinyliert, und auch IIGP[S83N] und endogen exprimiertes IIGP war Ubiquitin-negativ. Daraus läßt sich folgern, dass das signifikante Ubiquitin-Signal der IIGP-Aggregate in der konfokalen mikroskopischen Analyse (vgl. Abbildung 25) nicht ubiquitinyliertes IIGP-Protein reflektierte, sondern auf der Ubiquitinylierung anderer Proteine innerhalb dieses Aggregats beruhen musste. Eine stabile physikalische Interaktion solcher ubiquitinylierten Proteine mit IIGP erscheint unwahrscheinlich, denn in der Western-Blot-Analyse von immunpräzipitiertem IIGP wurden keine ubiquitinylierten Proteine mit abweichender Molekulargröße kopräzipitiert.

4.3.7 Die ektopische Expression von IIGP führt zur Ausbildung von IIGP-Aggregaten

Die Ausbildung von Aggregaten nach der Überexpression von IIGP könnte darauf zurückzuführen sein, dass in einer nicht IFN- γ stimulierten Zelle essentielle Komponenten fehlen, die für eine korrekte subzelluläre Lokalisation von IIGP benötigt werden. Eine solche Komponente könnte z.B. ein ebenfalls IFN- γ stimuliertes Protein, und demzufolge auch eine 47 kDa GTPase sein. Da gegen IGTP ein monoklonaler Antikörper verfügbar war, konnte die subzelluläre Lokalisation von endogenem IGTP in IFN- γ stimulierten NIH Maus-Fibroblasten und IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanden untersucht werden (Abbildung 28).

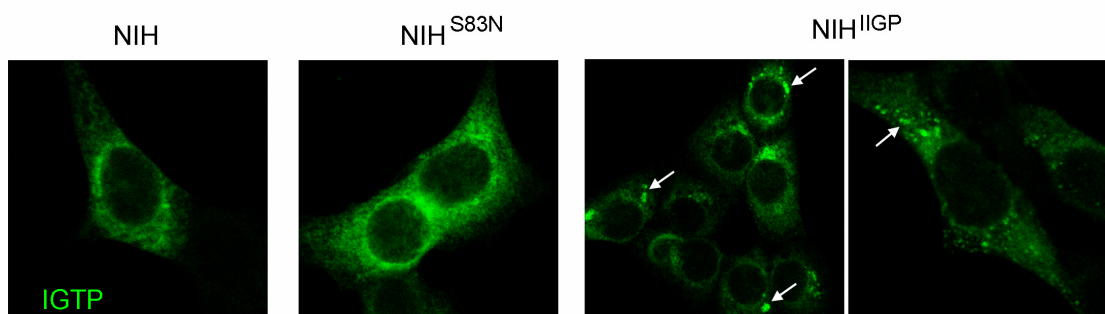


Abbildung 28: Konfokale mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von IGTP in IFN- γ stimulierten NIH-Mausfibroblasten und IIGP- bzw. IIGP[S83N]-Transfektanden

Die Zellen wurden für über Nacht mit IFN- γ stimuliert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen IGTP gefärbt. In IIGP überexprimierenden Transfektanden bildeten sich untypische IGTP-positive Aggregate (Pfeile).

Die retikuläre subzelluläre Verteilung von IGTP in Fibroblasten und IIGP[S83N]-Transfektanten ist indikativ für eine ER-Assoziation dieser GTPase. Auch in IIGP überexprimierenden Zellen lokalisierte ein signifikanter Anteil von IGTP an ER-Strukturen, jedoch bildeten sich untypische IGTP-positive Aggregate, die den aufgelösten IIGP-Aggregaten in ihrer Form und Größe teilweise ähnelten. In einer weiteren Analyse wurde überprüft, ob es sich bei diesen IGTP-positiven Aggregaten um die von IIGP gebildeten Aggregate handelte (Abbildung 29).

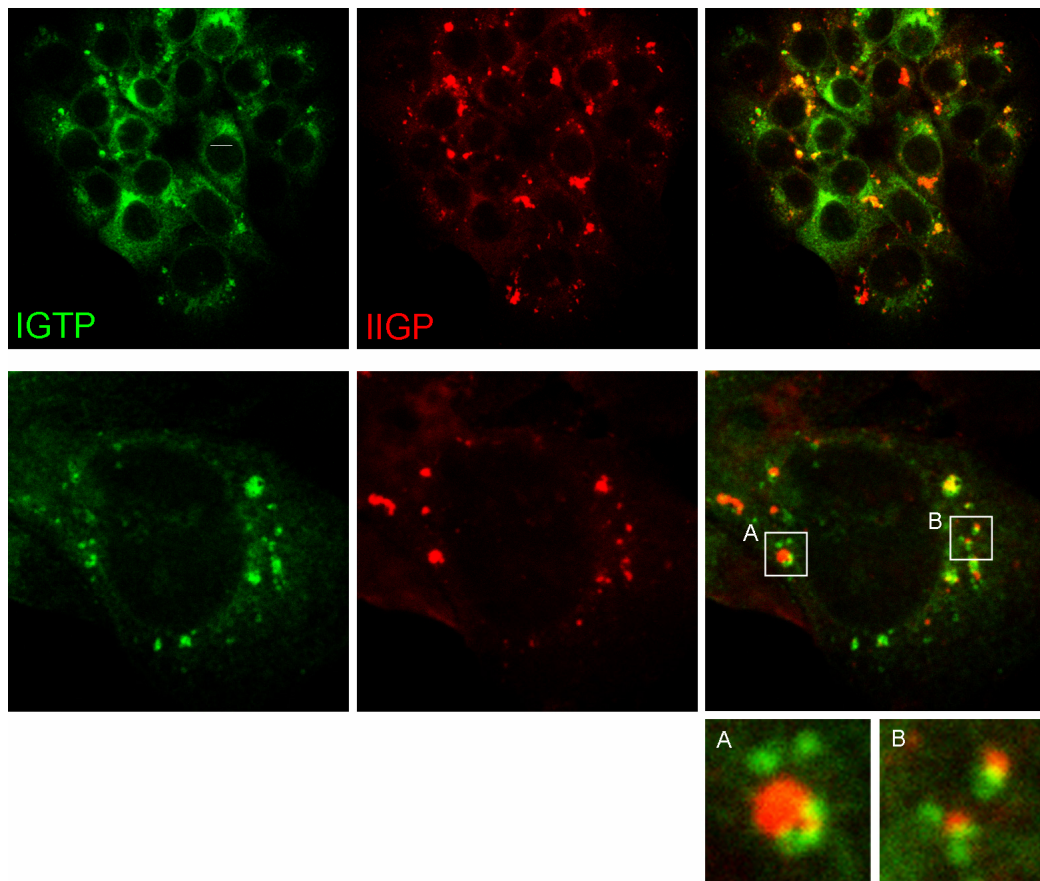


Abbildung 29: Zweifarben-konfokale mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von IGTP und IIGP in IFN- γ stimulierten IIGP-Transfektanten

Die obere Reihe zeigt eine Übersicht mit schwacher Vergrößerung, die untere Reihe eine Einzelzellaufnahme mit Ausschnittvergrößerung. Die Zellen wurden für 20h mit IFN- γ stimuliert und sowohl mit einem Cy5-gekoppelten IIGP-Antikörper (roter Farbkanal) als auch einem monoklonalen Antikörper gegen IGTP und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (grüner Farbkanal) gefärbt. Die Überlagerung beider Farbkanäle (rechts) zeigte, dass die Signale beider GTPasen teilweise kolokalisierten.

Die IIGP/IGTP-Doppelfärbung von IFN- γ stimulierten IIGP-Transfektanden zeigte, dass die von beiden GTPasen gebildeten untypischen vesikelähnlichen Aggregate nicht identische Strukturen waren, sondern nur teilweise kolokalisierten oder sich in unmittelbarer Nähe zueinander befanden. Ein signifikanter Anteil von IGTP blieb weiterhin retikulär verteilt. In unstimulierten Transfektanden konnte IGTP nicht detektiert werden (nicht gezeigt), was die Induzierbarkeit dieser GTPase durch IFN- γ bestätigte.

4.3.8 Die 47 kDa GTPasen interagieren im Y2H-System miteinander

Die Kolokalisation bzw. Assoziation von IIGP und IGTP in den konfokalen mikroskopischen Analysen gab Anlass zur Annahme, dass beide GTPasen möglicherweise miteinander interagieren. Um zu überprüfen, ob zwischen den Familienmitgliedern der 47 kDa GTPasen physikalische Interaktionen existieren, wurden mittels einer Y2H-Analyse das Interaktionspotential aller Mitglieder untereinander analysiert (Tabelle 4).

<i>prey</i> <i>bait</i>	IGTP	GTPi	LRG-47	TGTP	IIGP	IRG-47	-
IGTP	++	++	-	-	-	-	-
GTPi	++	+++ 3	+/-	++ 3	-	-	-
LRG-47	+	+	-	-	-	-	-
TGTP	++	+++ 2	+/-	+	-	+/-	-
IIGP	++ 5*	+++ 2	+ 5*	+ 5*	+/- 5*	- 5*	- 6*
IRG-47	-	++ 4	-	+/-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4: Zusammenfassung der Y2H-Analysen zur Ermittlung mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen 47 kDa GTPase-Familienmitgliedern

(Fortsetzung Tabelle 4)

Die GTPasen wurden als Vollängenproteine an LexA (*bait*) bzw. B42 (*prey*) fusioniert, die Integrität aller Konstrukte durch Sequenzierung verifiziert und die Größe der Translationsprodukte mittels Western-Blot-Analysen überprüft (nicht gezeigt). Die GTPase-*baits* bzw. -*preys* wurden in allen kombinatorischen Möglichkeiten in *S. cerevisiae* EGY48[p8oplcaZ] kotransformiert. Nach einer Plasmidamplifikation wurde das prototrophe Wachstum der Kotransformanten auf Leuzin-defizienten Medien (SD Gal/Ralf - H,T,U,L) und die Blaufärbung (SD Gal/Ralf/XGal -H,T,U) getestet. Angegeben ist die Intensität der Blaufärbung an d 3 (keine Färbung: - , stärkste Färbung: +++) sowie der Tag, an dem prototrophes Wachstum eindeutig detektierbar war (ermittelt bis d 12). Der Stern verweist auf das unspezifische prototrophe Wachstum von LexA-IIGP-Transformanten ab d 5/6.

Die in der Y2H-Analyse detektierten Genreportersignale (schematisch zusammengefasst unter 5.2) geben Anlass zur Annahme, dass die 47 kDa GTPasen ein unterschiedlich starkes Potential besitzen, mit anderen Familienmitgliedern zu interagieren. Das größte und flexibelste Interaktionspotential scheint GTPI zu besitzen, jede getestete Kombination mit einem anderen Familienmitglied führte zu einer deutlichen Aktivierung beider Genreporter. Zudem scheint dieses Familienmitglied auch mit sich selbst interagieren zu können. Eine Oligomerisierung von IIGP, wie sie bei der biochemischen Charakterisierung dieses Familienmitglieds postuliert wurde (Uthaiyah et al., 2003), scheint sich in dieser Analyse jedoch nicht eindeutig reproduzieren zu lassen.

Keine der GTPasen transaktivierte die Genreporter (mit Ausnahme der bereits in 4.1.1 beschriebenen geringen *LEU*-Autoaktivität von IIGP), demzufolge scheinen die detektierten Signale real existierende Interaktionen in den Hefezellen zu reflektieren. Dennoch ist schwer einzuschätzen, ob die Aktivierung von nur einem der beiden Genreporter von vielen der getesteten *bait*-/ *prey*-Kombinationen auf systembedingte Limitierungen des Y2H-Systems zurückführen sind, die Stärke der Interaktion reflektieren oder möglicherweise ein Artefakt darstellen. Eine sichere Interpretation wird auch durch den Befund erschwert, dass der reziproke Austausch der GTPasen zwischen *bait* und *prey* nur in wenigen Fällen (z.B. zwischen GTPI und TGTP) zu einem identischen Ergebnis führte.

4.4 Identifizierung von Interaktionspartnern für weitere Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen mit dem Y2H-System

Analog zu den in 4.2.1 beschriebenen Analysen für IIGP wurden auch für die 47 kDa GTPasen IGTP, GTPI und IRG-47 Y2H-Analysen mit der aus CD4⁺ T-Zellen hergestellten cDNA-Genbibliothek durchgeführt. Tabelle 5 (siehe Anhang) gibt eine detaillierte Übersicht der Analyseschritte und der identifizierten cDNAs dieser Interaktionsanalysen.

Für IGTP konnte kein Interaktionspartner in der cDNA-Genbibliothek identifiziert werden. Als mögliche Interaktionspartner von GTPI wurde u.a. ein Klon identifiziert, der für einen Anteil von IRG-47 (AS 23-420) kodierte, und zwei voneinander unabhängige Klone, die Anteile von TGTP (AS 45-415 bzw. AS 40-415) exprimierten.

IRG-47 interagiert u.a. mit einem Protein, das eine hohe Sequenzähnlichkeit (55 % auf Aminosäure-Ebene) zu TGTP zeigte (Sequenzvergleich s. Anhang). Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Protein um ein neues Mitglied der 47 kDa GTPase-Familie handelte, wurde mit den verfügbaren Sequenzdaten der Genomdatenbank (Celera) ein Dendrogramm erstellt, das die Sequenzverwandschaft der Familienmitglieder der 47 kDa GTPase als Stammbaum darstellt (Abbildung 30).

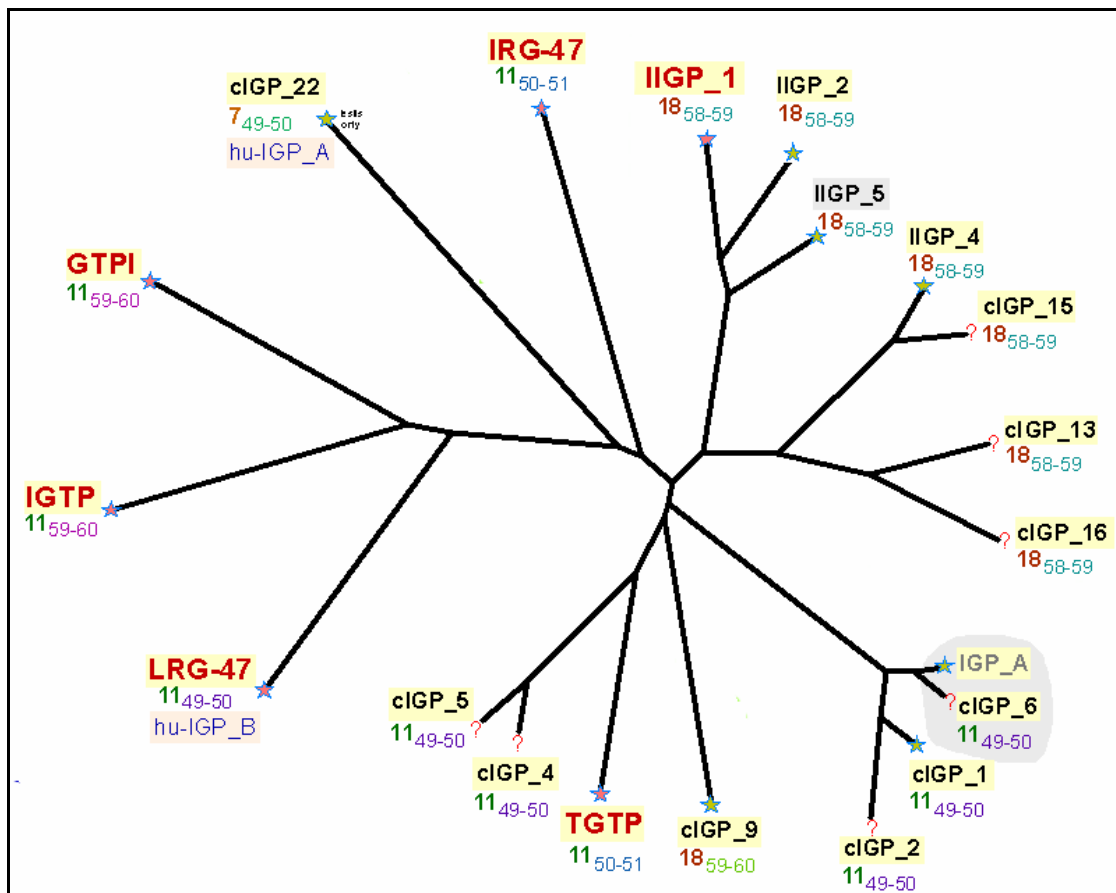


Abbildung 30: Sequenzverwandtschaft der identifizierten und hypothetischen Mitglieder der 47 kDa GTPase Familie auf Basis der Celera-Genomdatenbank (J. Zerrahn)

Im Dendrogramm reflektiert der Grad der Verästelung den Verwandtschaftsgrad, die Länge der Äste die Sequenzunterschiede zwischen den GTPase-Familienmitgliedern. Unter dem Namen der GTPasen (cIGP=„*Celera identified GTPase*“) ist die Chromosomennummer (große Ziffern) und die Position auf dem Chromosom (kleine Ziffern, Angabe in cM) angegeben. Die bisher klonierten (roter Stern) GTPasen sind rot dargestellt, grüne Sterne verweisen auf die Bestätigung der Expression anhand der verfügbaren EST-Sequenzdaten. Hypothetische Mitglieder, zu denen bisher keine entsprechenden EST-Sequenzen gefunden wurden, sind mit einem Fragezeichen markiert.

Zunächst zeigte sich, dass die Familie der 47 kDa GTPasen weitaus mehr Mitglieder umfasst (nach dieser Analyse 20) als die bisher veröffentlichten sechs Mitglieder (Abbildung 30, in rot). Das in der Y2H-Analyse identifizierte IRG-47-interagierende Protein entsprach nach diesem Sequenzvergleich dem Familienmitglied cIGP_9 („*Celera identified GTPase 9*“), das im Dendrogramm in unmittelbarer Nähe zu TGTP steht. Die Ergebnisse der Interaktionsanalysen der cDNA-Genbibliothek stehen damit im Einklang mit den in 4.3.8 durchgeführten Analysen des interfamiliären Interaktionspotentials von 47 kDa GTPasen und geben Anlass zur Annahme, dass

einzelne Familienmitglieder dieser GTPase-Familie miteinander physikalisch im Y2H-System interagieren können.

Neben der Interaktion mit anderen Mitgliedern der 47 kDa GTPase Familie wurden für GTPI und IRG-47 weitere Interaktionspartner identifiziert, die jedoch solange als putativ einzustufen sind, bis sie mit methodisch unabhängigen Analysen, wie sie z.B. für IIGP und mHk3 durchgeführt wurden, bestätigt werden können. GTPI interagiert u.a. mit dem Protein VAP33, das offensichtlich SNARE-gesteuerte Vesikelfusionen reguliert (Nishimura et al., 1999; Weir et al., 2001), und mit dem Protein PTP1B, einer ER-ständigen Protein Tyrosin Phosphatase, die in Prozesse der Signaltransduktion involviert ist (Haj et al., 2003; Haj et al., 2002). Für IRG-47 konnte eine Interaktion mit dem Anteilen des Proteins SOJO (p170) nachgewiesen werden, das zu Cytoskelett-assoziierten Proteinen verwandt ist (Steppan, 2000).

Die durchgeführten Interaktionsanalysen zeigen deutlich, dass einzelne Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen offensichtlich ein sehr unterschiedliches, individuelles Spektrum an Interaktionspartnern besitzen, und steht damit im Einklang mit der Annahme, dass die Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen distinkte molekulare Funktionen ausüben (siehe auch Abschnitt 5.2, 5.4).

4.5 Das Verhalten von IIGP in einem *in-vitro*-Modell für *Toxoplasma gondii*-Infektionen

Alle bisher generierten 47 kDa GTPase-defizienten Mäuse (IGTP^{-/-}, LRG-47^{-/-}, IRG-47^{-/-}) weisen eine verminderte Resistenz gegenüber dem intrazellulären Parasiten *T. gondii* auf. Es ist bisher unbekannt, inwiefern IIGP an der Vermittlung von zellautonomen Resistenzmechanismen beteiligt ist und gegen welche Pathogene diese Mechanismen gerichtet sein könnten. Es erschien deshalb plausibel, zunächst das Verhalten von IIGP in Infektionsmodellen mit *T. gondii* zu untersuchen.

Zunächst wurde untersucht, welche Zellen effizient mit *T. gondii*-Tachyzoiten *in-vitro* infiziert werden können. Es zeigte sich, dass Zelllinien unterschiedlichen histologischen Ursprungs infizierbar waren (Abbildung 31).

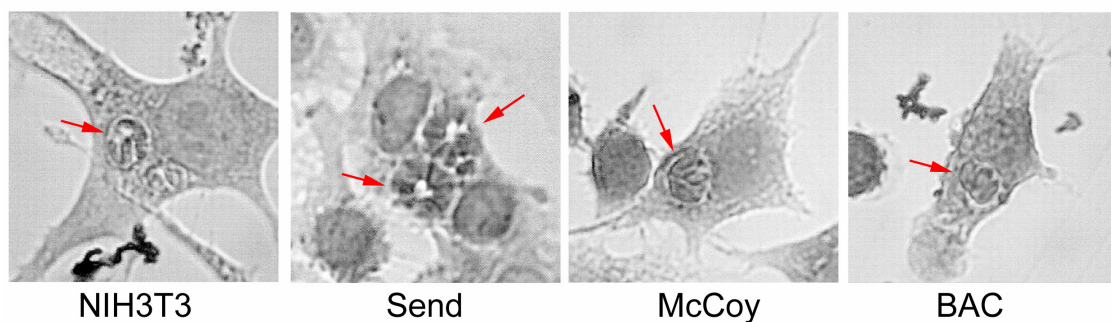


Abbildung 31: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten Zelllinien unterschiedlichen histologischen Ursprungs

Fibroblasten: NIH/3T3, Endothelzellen: Send, Epithelzellen: McCoy, Makrophagen: BAC 1.2F5.

Die Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, für 4 h mit frisch präparierten *T. gondii* infiziert (MOI 10:1) und bis zu 24 h weiterkultiviert. Für die Phasenkontrastaufnahmen wurden die Zellen mit Hämatoxylin angefärbt. Die Pfeile zeigen die parasitophore Vakuole, in der sich die *T. gondii*-Trachyzoiten rosettenartig anordneten.

Konfluent gewachsene Zellrasen wurden am effizientesten infiziert, während *T. gondii* offensichtlich schwer in einzeln stehende Zellen eindringen konnte, wofür möglicherweise eine verminderte Beweglichkeit der Erreger auf den Glasflächen verantwortlich war. Für eine effektive Infektion mussten die Wirtszellen für mehrere Stunden mit den Tachyzoiten inkubiert werden, so dass sich der genaue Infektionszeitpunkt nicht ermitteln ließ, sondern nur ein Zeitfenster für die Invasion der Zelle und den anschließenden Infektionsverlauf definieren ließ. Lichtmikroskopisch konnte die *T. gondii*-Infektion in einer Wirtszelle nur in fortgeschrittenen Infektionsstadien detektiert werden, nachdem sich die Tachyzoiten innerhalb der parasitophoren Vakuole bereits mehrfach geteilt hatten.

Unbehandelte oder mit IFN- γ stimulierte Maus-Fibroblasten wurden mit *T. gondii* für 4 Stunden *in-vitro* infiziert (MOI 10:1) und für 20 Stunden weiterkultiviert. Es zeigte sich, dass weder eine Vorstimulation der Zellen mit IFN- γ , noch eine Stimulation während der Infektion mit *T. gondii* die Infektionsrate verringerte. Ebenso wenig hatte IFN- γ einen Einfluss auf die Teilungsrate von *T. gondii* innerhalb der parasitophoren Vakuole. Demzufolge zeigte unter diesen Bedingungen die Stimulation der Zellen mit IFN- γ keinerlei detektierbare protektiven Effekt. Auch die Überexpression von IIGP in den NIH-Transfektanden hatte keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf (nicht gezeigt).

4.5.1 Veränderung der subzellulären Lokalisation von IIGP in *T. gondii* infizierten Zellen

In konfokalen mikroskopischen Analysen wurde untersucht, ob die Infektion von IFN- γ stimulierten Fibroblasten mit *T. gondii* einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von endogenem IIGP hatte.

In IFN- γ stimulierten und mit *T. gondii* infizierten Fibroblasten veränderte sich die typisch retikuläre IIGP-Verteilung signifikant (Abbildung 32). 6-12 Stunden nach der Infektion (A) war an der zum Nukleus zugewandten Seite der parasitophoren Vakuole ein starkes IIGP-Signal zu detektieren. Dieses Signal schien nicht gleichmäßig an der Vakuole lokalisiert zu sein, sondern sich aus vielen kleinen Einzelaggregaten zusammensetzen. Die typische retikuläre Verteilung von IIGP war vollständig aufgehoben. Eine ähnliche Akkumulation von feinen IIGP-Aggregaten in unmittelbarer

Nähe zur Vakuole und an der Vakuolenmembran konnte zu späteren Zeitpunkten (8-20 Stunden nach Infektion) detektiert werden, zu denen sich *T. gondii* bereits zweifach geteilt hatte (B). Konnten bei einer höheren MOI mehrere Tachyzoiten gleichzeitig in die Wirtszelle eindringen, bildeten sich mehrere Vakuolen aus, um die IIGP akkumulierte (C). In nicht-infizierten Zellen konnte eine hohe IIGP-Expression mit typischer Verteilung nachgewiesen werden, während die in den infizierten Zellen ausgebildeten IIGP-Aggregate im späteren Infektionsverlauf tendenziell schwächer wurden. Wurden die Fibroblasten nur kurz (1 Stunde) mit einer sehr hohen MOI infiziert und für 12 Stunden weiterkultiviert (D), konnte in den nicht infizierten Zellen ein starkes, normal verteiltes IIGP-Signal nachgewiesen werden (Zelle I+II), während in infizierten Zellen entweder IIGP-Aggregate an der Vakuole detektierbar waren (Zelle III) oder kein IIGP-Signal mehr detektierbar war (Zelle IV). Der Eindruck, dass IIGP in infizierten Zellen zu späteren Zeitpunkten der Infektion nicht mehr detektierbar war, wurde bei der Weiterkultivierung der Zellen bestätigt (D): nach 24 Stunden waren alle nicht infizierten Zellen IIGP-positiv, in den infizierten Zellen konnte hingegen kein IIGP nachgewiesen werden.

(Abbildung 32 nächste Seite)

Die Maus-Fibroblasten wurden über Nacht mit IFN- γ stimuliert, für unterschiedlich lange und mit unterschiedlicher MOI mit *T. gondii* infiziert und weiterkultiviert. Um sicherzustellen, dass es sich bei den detektierten IIGP-Signalen tatsächlich um feine IIGP-Aggregate und nicht um eine Artefaktfärbung eines präzipitierten IIGP-Antikörpers handelte, wurde in A-B mit einem monoklonalen Antikörper, in C-E mit Hybridom-Überständen angefärbt. Zur besseren Darstellung der parasitophoren Vakuole erfolgten die Phasenkontrastaufnahmen in einer eigenen Fokussierungsebene.

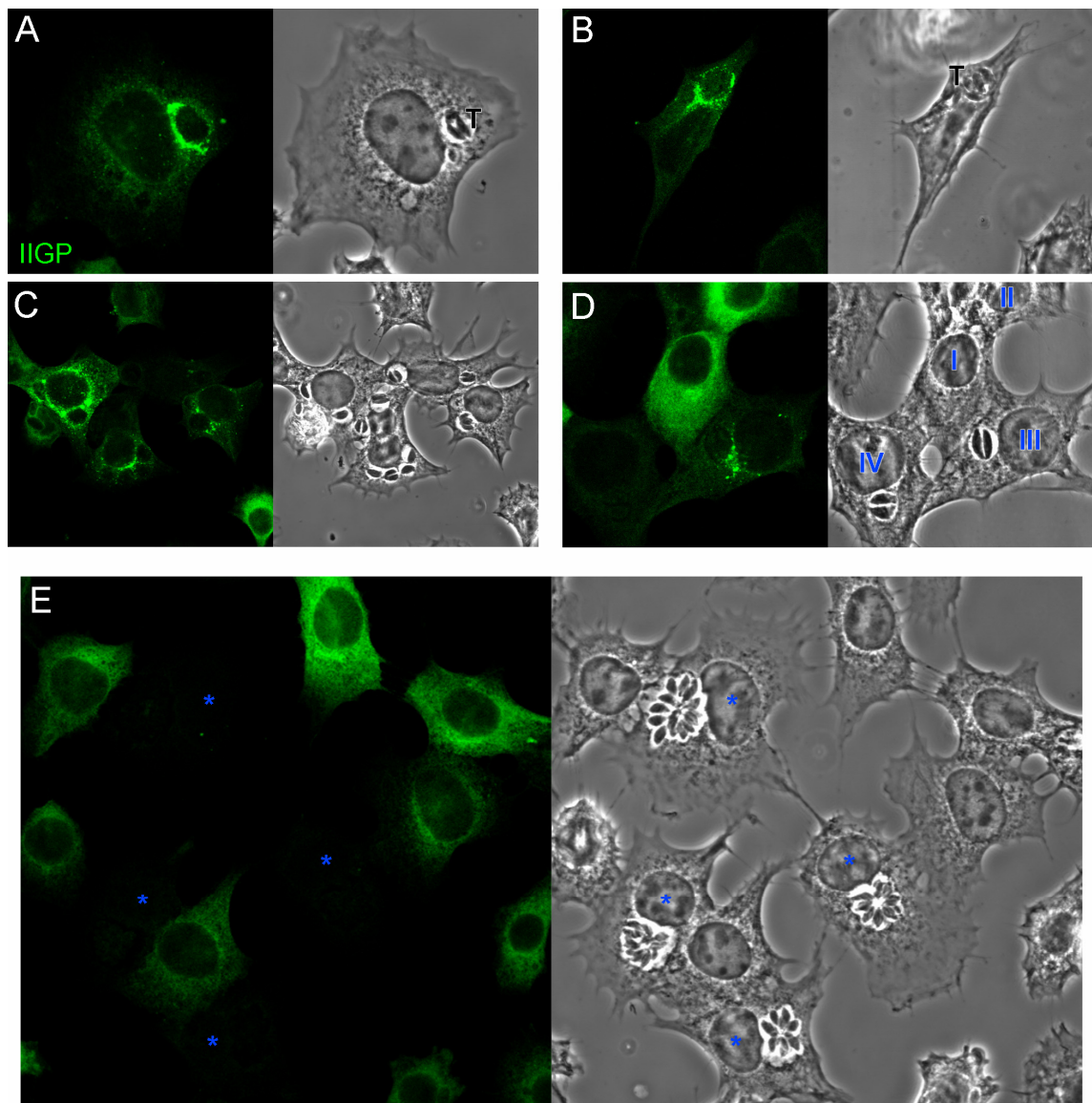


Abbildung 32: Konfokal-mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von IIGP in IFN- γ stimulierten Fibroblasten nach einer *T.gondii*-Infektion

A: Infektion für 6 h (MOI 10:1), Weiterkultivierung 6 h. *T.gondii* (T) hatte sich bereits geteilt. An der Vakuole akkumulierte IIGP als unregelmäßiges Aggregat.

B: Infektion für 8 h (MOI 10:1), Weiterkultivierung 12 h. In der Vakuole befanden sich bereits 4 Tachyzoiten. Auch in den angrenzenden Bereichen der Vakuole schien IIGP zu akkumulieren und Aggregate auszubilden.

C: Infektion für 6 h (MOI 100:1), Weiterkultivierung 6h. Mit dem Eindringen mehrerer Tachyzoiten haben sich mehrere unabhängige Vakuolen ausgebildet, in deren Umgebung IIGP vesikulär akkumulierte. In den infizierten Zellen schien das IIGP-Gesamtsignal abzunehmen, während nicht infizierte Zellen weiterhin stark IIGP-positiv waren.

D: Infektion für 1 h (MOI 10^5 :1), Weiterkultivierung 12h. IIGP positive Zellen waren nicht infiziert (I+II), in den infizierten Zellen bildeten sich an der Vakuole IIGP-Aggregate (III) oder IIGP war nicht detektierbar (IV).

E: Infektion für 6 h (10:1), Weiterkultivierung 24 h.. In den infizierten Zellen bildeten sich die typischen Tachyzoiten-Rosetten aus und IIGP konnte nicht detektiert werden (Zellposition markiert mit Stern), Alle nicht infizierten Zellen zeigten ein deutliches, typisch verteiltes IIGP-Signal.

4.6 Ausblick: Expression und Reinigung rekombinanter 47 kDa GTPasen zur Immunisierung

Die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern gegen die 47 kDa GTPasen ist für weitergehende Untersuchungen dieser Proteinfamilie unverzichtbar. Bisher existieren nur gegen IGTP und IIGP monoklonale Antikörper, die kommerziell erhältlichen Schafseren gegen andere Familienmitglieder erwiesen sich in den Immunfluoreszenz-Untersuchungen und in den Western-Blot-Analysen als unzureichend.

Zur Generierung von monoklonalen Antikörpern wurden die GTPasen in verschiedenen prokaryontischen Expressionssystemen exprimiert (siehe 3.4). Die Expression und Aufreinigung erwies sich dabei als unerwartet schwierig, denn die Expressionseffizienz, Stabilität und Löslichkeit der GTPasen konnte weder durch eine Fusion an andere Proteinfragmente (Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin), noch durch zahlreiche Optimierungen der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen befriedigend optimiert werden. Um zu überprüfen, ob sich generell eine Immunantwort gegen die GTPasen in der Maus erzeugen lässt, wurden Mäuse mit den aufgereinigten rekombinanten GTPasen immunisiert (nach einem für die Generierung von monoklonalen Antikörpern optimierten Protokoll, siehe 3.6.3), und anschließend die Seren in einer Western-Blot-Analyse auf eine Antigenspezifität gegen die 47 kDa GTPasen getestet (Abbildung 33).

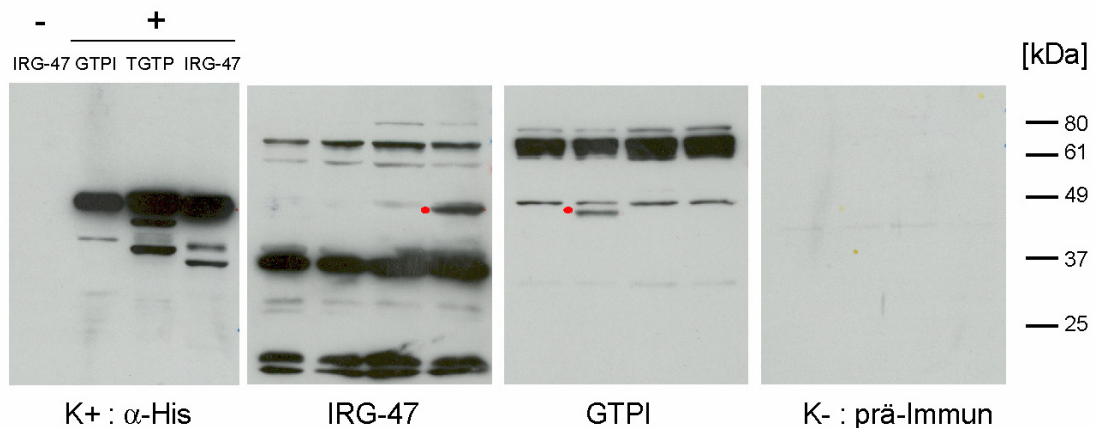


Abbildung 33: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Immunogenität rekombinanter 47 kDa GTPasen in der Maus

Stellvertretend sind die Ergebnisse der Immunisierung mit IRG-47 und GTPI gezeigt. Die rekombinanten 6x-His-GTPasen wurden in *E.coli* BL21[DE3LysS] exprimiert (+), die aufgetrennten Gesamtzelllysate von nicht-induzierten (-) bzw. induzierten (+) Kulturen dienten als Substrat für den Nachweis einer Antikörperreaktivität der Maus-Seren. Es konnte zwar eine spezifische Antikörperantwort gegen die GTPasen generiert werden (IRG-47,GTPI: rote Markierung), der überwiegende Anteil der Immunantwort war jedoch gegen prokaryontische Zellbestandteile gerichtet. K+: Expressionskontrolle, Detektion der rekombinanten GTPasen mit einem Antikörper gegen 6xHis. K-: nicht immunisierte Mäuse zeigten keine Reaktivität.

Grundsätzlich schien es möglich zu sein, in der Maus eine Antikörperantwort gegen die rekombinanten 47 kDa GTPasen zu generieren. Allerdings konnte eine sehr starke Immunantwort gegen zahlreiche prokaryontische Produkte nachgewiesen werden, mit denen GTPasen zum Zeitpunkt der Immunisierung offensichtlich kontaminiert waren.

Durch die Kombination verschiedener Aufreinigungsmethoden (Affinitäts-Chromatographie über die C-terminal angefügten Histidine, Gel-Chromatographie, Reverse-Phase-Chromatographie) konnte der Reinheitsgrad der rekombinanten GTPasen bereits signifikant erhöht werden, und weitere Optimierungen sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten, an die sich die Generierung von monoklonalen Antikörpern anschließen kann.

5 Diskussion

5.1 Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnisse dieser Arbeit

Nahezu jede Körperzelle in Vertebraten verfügt über ein autonomes, d.h. von anderen extrazellulären Komponenten unabhängig wirkendes Resistenzprogramm gegen Erreger (Boehm et al., 1997; Stark et al., 1998). Dieser Infektionsschutz auf Einzelzellebene ist nicht per se aktiv, sondern wird vorrangig durch Interferone des Typ I und Typ II induziert und stellt einen fundamentalen Teil der angeborenen Immunantwort des Wirtsorganismus gegen virale sowie intrazelluläre bakterielle und parasitäre Erreger dar (Kaufmann, 1999). Die zelluläre Antwort auf Interferone umfasst die Regulation einer Vielzahl unterschiedlichster Gene, ist damit außerordentlich komplex und zum heutigen Zeitpunkt nur unvollständig verstanden (de Veer et al., 2001; Der et al., 1998). Die nähere Charakterisierung einiger IFN-induzierter Genprodukte wie NOS2 (Bogdan et al., 2000; MacMicking et al., 1997; Scharton-Kersten et al., 1997), NRAMP (Hackam et al., 1998; Vidal et al., 1993), Phox (Vazquez-Torres und Fang, 2001) und IDO (Murray et al., 1989; Taylor und Feng, 1991) verdeutlicht, dass diese Einzelkomponenten durch unterschiedlichste, nicht-redundante Effektormechanismen die intrazelluläre Replikation von Erregern verhindern und so wesentlich zur Etablierung einer effektiven Immunabwehr des gesamten Wirtsorganismus über unterschiedliche Infektionsphasen hinweg beitragen. Den vielfältigen Infektions-, Replikations- und Überlebensstrategien von intrazellulären Erregern steht dementsprechend ein nicht weniger komplexes Repertoire an antimikrobiellen Schutzmechanismen des Wirtsorganismus gegenüber.

Es gibt zunehmend Belege dafür, dass die Mitglieder mehrerer IFN-regulierter GTPase Familien fundamentale Bestandteile dieser zellautonomen Resistenzprogramme darstellen (Eine Übersicht gibt Taylor et al., 2004). Erst kürzlich wurden die Mitglieder der 47 kDa GTPase Familie als neue und von den bisher identifizierten antimikrobiellen Effektormolekülen offensichtlich unabhängig agierende Komponenten des IFN-induzierten Abwehrprogramms identifiziert. Die Untersuchungen von Mäusen mit gezielten Deletionen für die einzelnen Mitglieder dieser Proteinfamilie demonstrieren eindrucksvoll die fundamentale Rolle der 47 kDa GTPasen bei der Abwehr von intrazellulären Bakterien wie *Listeria monocytogenes* sowie intrazellulären Parasiten

wie *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma cruzi* (Collazo et al., 2001; Taylor et al., 2000). Aktuelle Forschungsarbeiten, die während der Anfertigung dieser Arbeit publiziert wurden, konnten dieses Pathogenspektrum um *Mycobacterium tuberculosis* (MacMicking et al., 2003) und *Mycobacterium avium* (Feng et al., 2004) erweitern, was eine Schlüsselrolle dieser GTPasen in der angeborenen Immunabwehr gegen intrazelluläre Erreger betont.

Die molekularen Mechanismen, die der antimikrobiellen Wirkung der 47 kDa GTPasen sowohl auf der Ebene einer einzelnen Zelle als auch des Gesamtorganismus zugrunde liegen, sind bislang unbekannt. Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand deshalb darin, durch eine molekulare Charakterisierung der 47 kDa GTPasen neue Einblicke darin zu erlangen, durch welche Wirkungsmechanismen diese Proteine eine Immunabwehr gegen intrazelluläre Erreger vermitteln und innerhalb welcher molekularen Prozesse sie ihre Funktionen ausüben. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand hierbei das in unserem Labor identifizierte und klonierte Familienmitglied IIGP (Zerrahn et al., 2002).

In dieser Arbeit konnten erstmals Moleküle identifiziert werden, die mit einzelnen Mitgliedern der 47 kDa GTPase Familie physikalisch interagieren (siehe 4.2, 4.4). Die detaillierte Charakterisierung der Interaktion zwischen IIGP und mHk3 liefert erste konkrete Anhaltspunkte für die molekulare Wirkungsweise dieser GTPase (siehe 4.2). Die Ergebnisse dieser Interaktionsstudien stehen ebenso wie die durchgeführten Überexpressionsstudien (siehe 4.3) nicht nur im Einklang mit einer biochemischen Charakterisierung von IIGP, die während der Anfertigung dieser Arbeit von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert wurde (Uthaiyah et al., 2003), sondern erweitert sie um neue funktionelle Aspekte. Obwohl bisher kein IIGP-defizientes Mausmodell zur Verfügung steht, das eine detaillierte Funktionsanalyse dieser GTPase in *in-vivo* Infektionen erlauben würde, zeigen die durchgeführten Analysen von IIGP in einem *in-vitro* Infektionsmodell mit *Toxoplasma gondii*, dass die in dieser Arbeit charakterisierten Eigenschaften von ektopisch exprimiertem IIGP auch *in-vivo* eine Relevanz für die Immunabwehr von intrazellulären Erregern haben könnten (siehe 4.5).

5.2 Die Interaktionen der 47 kDa GTPasen im Y2H-System

Erste Hinweise auf die mechanistischen und funktionellen Eigenschaften von Molekülen ergeben sich oft aus strukturellen Analogien zu anderen, bereits detaillierter charakterisierten Molekülen. Die IFN-induzierbaren 47 kDa GTPasen verfügen jedoch außer ihrer GDP/GTP Bindungsdomäne, über die ihre Zugehörigkeit zur GTPase-Superfamilie definiert wird, über keinerlei weitere strukturelle Komponenten, die ihre protektive Aktivität erklären könnten. Die von GTPasen regulierten zellulären Prozesse (Bourne, 1995; Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991; Vetter und Wittinghofer, 2001) sind derart divers, dass die alleinige Zugehörigkeit zur GTPase-Superfamilie ebenfalls keine indirekten Rückschlüsse auf die Funktion der 47 kDa GTPasen erlaubt. Die phylogenetische Stammbaumanalyse (Abb. 1) zeigt jedoch, dass die von den 47 kDa GTPasen gebildete Untergruppe sich weniger zu den kleinen GTPasen wie Ras und G_{alpha}, die in zahlreiche Signalprozesse involviert sind, zählen lassen, sondern vielmehr eine Strukturverwandschaft zu den großen 65 kDa und MX GTPasen aufweisen. Diese beiden Untergruppen, deren Vermittlung von zellautonomen Resistenzprogrammen als gesichert gilt (Anderson et al., 1999; Haller et al., 1998; Haller und Kochs, 2002), lassen sich wiederum aufgrund ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften plausibel zu der Superfamilie der Dynamine zuordnen (Haller und Kochs, 2002; Praefcke und McMahon, 2004).

Die Funktion vieler GTPasen wird wesentlich von der Eigenschaft bestimmt, bei der alternierenden Bindung von GTP und GDP einem signifikanten Konformationswechsel zu unterliegen. Dadurch können sie bei einer Interaktion mit anderen Proteinen als molekulare Schalter wirken (Vetter und Wittinghofer, 2001). Ausgehend von der Annahme, dass auch die 47 kDa GTPasen molekulare Interaktionspartner besitzen, erlaubt die Identifikation solcher interagierenden Moleküle nicht nur einen direkten Rückschluss auf die molekularen Funktionsweisen der 47 kDa GTPase-Familie, sondern liefert auch konkrete Ausgangspunkte zu ihrer weiteren funktionellen Charakterisierung.

Zur Identifikation von Proteinen, die mit den 47 kDa GTPasen physikalisch interagieren, wurde in dieser Arbeit das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) als

experimenteller Ansatz gewählt. Das Y2H ist ein *in-vivo* Reportersystem, in dem die Interaktion von überexprimierten heterologen Fusionsproteine in Hefezellen überprüft werden kann (Fields und Song, 1989; Toby und Golemis, 2001). Eine der signifikantesten Einschränkungen bei der Verwendung von sehr sensitiven Y2H Systemen liegt oft in der Entstehung von unspezifischen, sog. „falsch positiven“ Reportersignalen, die quantitativ dominieren können und eine erfolgreiche Suche nach spezifischen, tatsächlichen Interaktionspartnern erheblich erschweren oder gar unmöglich machen. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein weiterentwickeltes Y2H-System (Golemis und Khazak, 1997; Toby und Golemis, 2001) verwendet, das durch den Einsatz eines heterologen Promoters unspezifische Hintergrundsignale unterdrückt sowie die Spezifität von Interaktionen durch zwei unabhängige Genreporter mit unterschiedlicher Sensitivität verifiziert. Um das Problem zu umgehen, bei einer möglichen Toxizität der exprimierten Fusionsproteine deren Interaktionspotential nicht detektieren zu können, verfügen in diesem System die Gene beider Fusionsproteine zudem über induzierbare Promotoren.

Für die 47 kDa GTPasen konnte gezeigt werden, dass sie grundsätzlich die zahlreichen Eignungs-Kriterien erfüllen, um im verwendeten Y2H-System auf Proteininteraktionen hin analysiert zu werden. Beim Einsatz von cDNA-Bibliotheken zur Suche nach bisher unbekannten Interaktionen ist sowohl die Qualität als auch der Ursprung dieser Bibliotheken für den Erfolg der Y2H-Analyse von essentieller Bedeutung. Bei der Verwendung einer kommerziell erhältlichen cDNA-Bibliothek (Clontech), die aus einer gesamten, nicht weiter aufgereinigten Milzzellpopulation hervorging, konnten keinerlei Interaktionen mit den 47 kDa GTPasen detektiert werden. Erst die Verwendung einer aus CD4⁺ T-Zellen hergestellten Bibliothek (zur Verfügung gestellt von V.R. Prasad) führte zu positiven Interaktionssignalen mit den 47 kDa GTPasen. Grundsätzlich wurden zur Qualitätskontrolle der Reportersignale konsequent in allen Y2H-Experimenten definierte interagierende Proteinpaare mit unterschiedlicher Interaktionsstärke als interne Positivkontrollen, sowie nicht miteinander interagierende Proteinpaare als interne Negativkontrollen mitgeführt.

Durch Analyse der T-Zell-cDNA-Genbibliothek konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die im Y2H-System mit unterschiedlichen Mitgliedern der 47 kDa GTPasen

Familie in den Hefezellen physikalisch interagieren. Es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner für die 47 kDa GTPasen molekulare Komponenten derjenigen Prozessen repräsentieren, in denen die GTPasen ihre Effektorfunktion ausüben. Diese Interaktionspartner müssen jedoch solange als spekulativ betrachtet werden, bis die Ergebnisse der Y2H-Analysen mit methodisch unabhängigen Experimenten als eine tatsächliche, in den relevanten Zellen detektierbare Interaktion bestätigt werden können und somit eine Signifikanz *in-vivo* plausibel erscheint. Eine der identifizierten Interaktionen (zwischen IIGP und mHk3) wurde in dieser Arbeit detailliert verifiziert und charakterisiert.

Zu den am besten charakterisierten GTPase-Interaktionspartnern gehören die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) sowie die Guanylat-Austausch-Faktoren (GEFs), die die unterschiedlichen Hydrolyseaktivitäten der GTPasen modulieren und dadurch ihre funktionelle Aktivität bestimmen können (Schweins und Wittinghofer, 1994; Vetter und Wittinghofer, 2001). GAPs und GEFs wurden bisher ausschließlich für konstitutiv exprimierte, kleine GTPasen wie Ras oder dem Elongationsfaktor EF-Tu beschrieben (Downward, 1996; Kraal et al., 1999). Bei keinem der in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner scheint es sich um klassische GAPs/GEFs zu handeln. Weil in Y2H Analysen nur ein gewisses Spektrum von Interaktionen detektiert werden kann, lässt sich aber nicht ausschließen, dass derartige aktivitäts-modulierende Proteine für 47 kDa GTPasen existieren. Ebenso wurde nicht untersucht, ob die hier identifizierten Interaktionspartner die Hydrolyseaktivität der GTPasen beeinflussen können. Der Befund, dass in den Y2H-Analysen keine klassischen GAPs/GEFs identifiziert wurden, steht allerdings im Einklang mit der generellen Annahme, dass die Funktionen von 47 kDa GTPasen nur in dem durch IFN induzierten „Abwehrmodus“ von Zellen relevant sind, und dementsprechend neben der transkriptionellen Regulation durch IFN keine post-transkriptionelle Regulation ihrer Aktivität erforderlich scheint. Die Hypothese, dass IFN allein die Expression, nicht jedoch die biochemische Aktivität der 47 kDa GTPasen reguliert, wird auch durch den Befund gestützt, dass *ex-vivo* aufgereinigtes IGTP überwiegend in der GTP-gebundenen, also aktiven Form vorliegt, und sich das Verhältnis zwischen GTP- und GDP gebundener Form bei der Stimulation der Zellen mit IFN- γ nicht verändert (Taylor et al., 1997).

Bei der Gegenüberstellung der identifizierten Interaktionspartner mit vorhandenen IFN-Genexpressionsprofilen (Der et al., 1998; Klamp, 2002) lässt sich feststellen, dass sie selbst offensichtlich nicht durch IFN reguliert sind, sondern konstitutiv exprimierte Komponenten unterschiedlichster zellulärer Prozesse darstellen. Dieser Befund könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass die untersuchte cDNA-Bibliothek aus nicht mit IFN- γ stimulierten CD4⁺ T-Zellen hervorging, und es ist anzunehmen, dass IFN- γ -regulierte Gene in dieser Bibliothek stark unterrepräsentiert oder gar nicht vorhanden sind und sich dementsprechend nicht detektieren lassen. IFN-regulierte Proteine, die mit GTPasen interagieren und ihre Aktivität modulieren, scheinen jedoch grundsätzlich zu existieren: Rho-GTPasen, die Prozesse wie Zellzykluskontrolle und vesikulären Transport regulieren, werden durch das als GAP wirkende Protein des „Breakpoint Cluster Region“ Gens (BCR) reguliert, dessen Expression wiederum durch IFN inhibiert wird (Ahmed et al., 1994).

Die biochemischen *in-vitro* Untersuchungen von rekombinantem IIGP (Uthaiyah et al., 2003) und von *ex-vivo* isoliertem IGTP (Taylor et al., 1997) legen nahe, dass analog zu anderen GTPasen die GTP-gebundene Form der 47 kDa GTPasen ihre funktionell aktive Form repräsentiert. Die Y2H-Analysen bestätigen die Gültigkeit dieses Postulats für IIGP *in-vivo*. IIGP interagiert nur in der GTP-gebundenen Form mit den identifizierten Zielmolekülen. Nach der Einführung einer Punktmutation in die Guanylat-Bindungsdomäne, die eine Bindung von GTP verhindert und damit die GTPase in ihrer GDP-gebundenen Form arretiert, verliert IIGP die Fähigkeit, mit den identifizierten Interaktionspartnern in Wechselwirkung zu treten. Offensichtlich verändert sich die Konformation von IIGP beim Wechsel zwischen GTP- und GDP-Bindung derart signifikant, dass die Interaktion mit den Proteinpartnern sterisch nicht möglich ist. Da das verwendete Y2H System offensichtlich geeignet ist, diese Konformationsveränderungen zu reflektieren, sollten zukünftige Analysen überprüfen, ob auch die Interaktionen der anderen Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen konformationsspezifisch erfolgen. Da alle Y2H-Genbankanalysen mit den 47 kDa GTPasen in ihrer wahrscheinlich aktiven, GTP-gebundenen Konformation durchgeführt wurden, lässt sich nicht generell ausschließen, dass möglicherweise auch für die GDP-gebundene Konformation distinkte Interaktionspartner existieren.

Aufgrund des differentiellen Resistenzverlusts von 47 kDa GTPase-defizienten Mäusen gegenüber verschiedenen intrazellulären Erregern wurde postuliert, dass die einzelnen Familienmitglieder distinkte, nicht-redundante Funktionen innerhalb des IFN-Immunabwehrprogramms ausüben. Am deutlichsten ist der unterschiedliche Einfluss einzelner Mitglieder der 47 kDa GTPasen bei der Abwehr intrazellulärer Bakterien: für eine erfolgreiche Abwehr von *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *M. tuberculosis* und *M. avium* scheint in den bisher generierten 47 kDa GTPase defizienten Mäusen nur LRG-47 von essentieller Bedeutung zu sein, während IGTP und IRG-47 keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf nehmen. Auch bei der Abwehr von intrazellulären Parasiten unterschiedlichen sich die einzelnen Familienmitglieder signifikant: IGTP und LRG-47 scheinen eine Resistenz gegen *T. gondii* während der akuten Infektionsphase zu vermitteln, während IRG-47 in der chronischen Infektionsphase für eine erfolgreiche Abwehr von Mikroben benötigt wird. Die Annahme, dass die einzelnen Familienmitglieder unterschiedliche Wirkungsmechanismen ausweisen, wird letztlich durch die zueinander sehr heterogenen Sequenzen der 47 kDa GTPasen unterstützt und könnte auch mit ihrer unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation in Zusammenhang stehen.

Die Y2H-Analysen dieser Arbeit können diese funktionelle Diversität der einzelnen Familienmitglieder erstmals auf molekularer Ebene belegen. Wie die detaillierte Untersuchung von mHk3 zeigt, erfolgt die Interaktion mit IIGP hochspezifisch und kein anderes Familienmitglied ist fähig, mit diesem Molekül zu interagieren. Auch der Befund, dass in den Y2H-Analysen für andere 47 kDa GTPasen distinkte mögliche Interaktionspartner identifiziert wurden (mit Ausnahme der später diskutierten interfamiliären Interaktionen), steht im Einklang mit dem Modell, dass jedes einzelne Familienmitglied über individuelle Eigenschaften verfügt und seine Funktion innerhalb von unterschiedlichen molekularen Prozessen ausübt, die sich spezifisch gegen verschiedene Überlebensstrategien intrazellulärer Erreger richten.

Rekombinantes IIGP kann *in-vitro* nukleotidabhängig Oligomere ausbilden, wobei bisher nicht geklärt ist, ob diese Eigenschaft für die Funktion der GTPase *in-vivo* von Relevanz ist (Uthaiyah et al., 2003). Das in dieser Arbeit verwendete Y2H-System kann eine physikalische Interaktion zwischen IIGP Molekülen nur eingeschränkt

wiedergeben, was wahrscheinlich auf die generellen systembedingten Detektions-Limitierungen bei Y2H-Analysen zurückzuführen ist. Die generelle Einschränkung, nur ein gewisses Spektrum von Interaktionen detektieren zu können, beruht im Wesentlichen auf der nicht physiologischen Überexpression der GTPasen als Hybride sowie der heterologen Expressionssituation in Hefezellen, die das natürliche zelluläre Milieu der GTPasen nur bedingt nachahmen können.

Obwohl davon auszugehen ist, dass die Frequenz von IFN-induzierten Genen in der verwendeten cDNA-Genbibliothek aus nicht IFN-stimulierten T-Zellen eher niedrig ist, wurden TGTP und IRG-47 als Interaktionspartner von GTPI identifiziert. Dies ist der erste Hinweis darauf, dass distinkte Mitglieder der 47 kDa GTPasen offensichtlich miteinander physikalisch interagieren können. Für IRG-47 wurde ein Interaktionspartner aus der cDNA-Genbank isoliert (cIGP 9), der eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den 47 kDa GTPasen aufweist. Offensichtlich handelt es sich hierbei um ein neues, bisher nicht kloniertes Familienmitglied der 47 kDa GTPasen, wobei noch nicht gezeigt ist, dass seine Expression wie die der anderen Familienmitglieder durch IFN reguliert wird. Die Analyse des interfamiliären Interaktionspotentials der 47 kDa GTPasen durch Analyse aller möglichen GTPase-*bait/prey*-Kombinationen im Y2H-System wurde durch die bereits erläuterten systembedingten Limitierungen erschwert. Beispielsweise aktivieren viele *bait-prey*-Kombinationen nur einen der Genreporter oder der reziproke Austausch der GTPasen zwischen *bait* und *prey* veränderte die Interaktionsstärken. Ebenso zeigten die aus der cDNA-Genbibliothek als GTPI-Interaktionspartner identifizierten verkürzten IRG-47 bzw. TGTP Varianten ein anderes Verhalten als ihre entsprechenden Vollängenproteine. Obwohl das Y2H-System als experimenteller Ansatz das Interaktionspotential der getesteten 47 kDa GTPasen nicht quantitativ wiedergeben kann, besteht Anlass zur Annahme, dass neben IIGP auch andere Familienmitglieder offensichtlich mit sich selbst interagieren können und darüber hinaus ein unterschiedlich starkes Potenzial besitzen, mit anderen Familienmitgliedern in Wechselwirkung zu treten. Die detektierten Genreportersignale der Interaktionen zwischen den 47 kDa GTPasen, die in Abbildung 34 schematisch zusammengefasst sind, könnten ein Hinweis darauf sein,

dass innerhalb der 47 kDa GTPase Familie ein möglicherweise komplexes Interaktionsnetzwerk existiert.

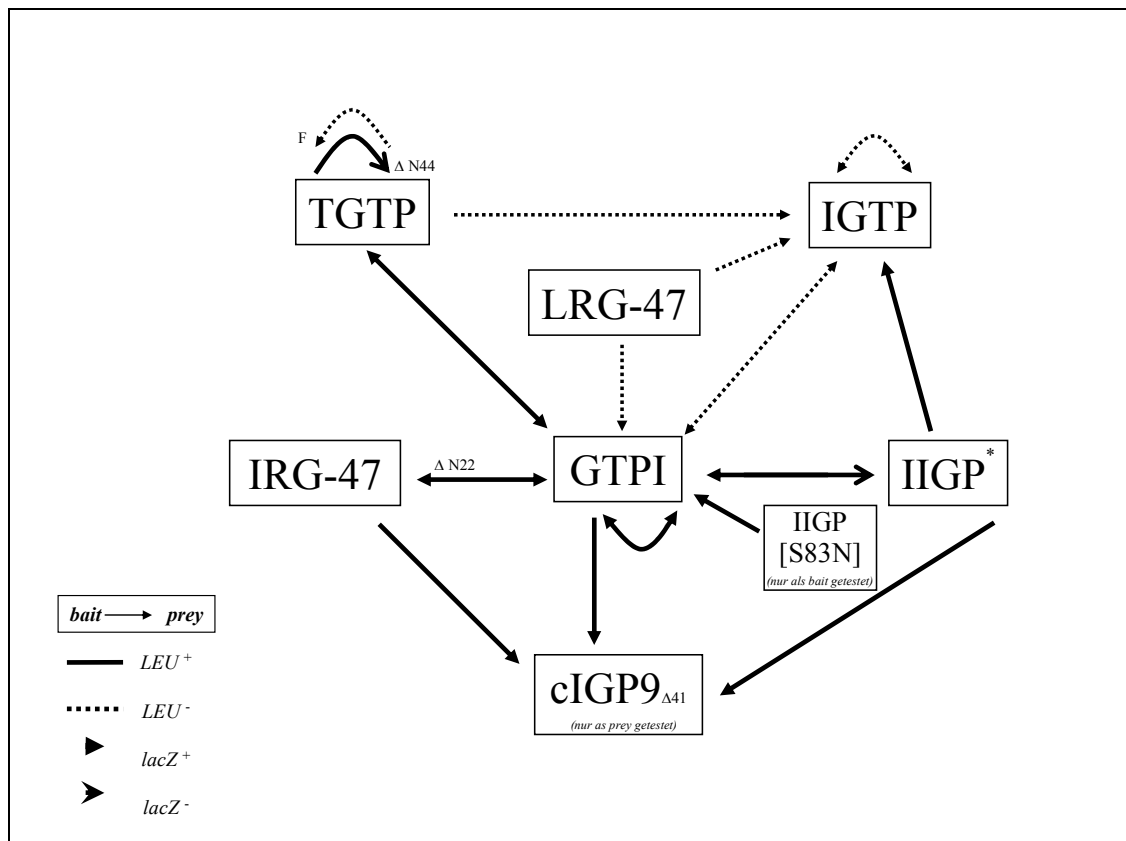


Abbildung 34: Schematische Darstellung der in den Y2H-Analysen detektierten Genreporteraktivitäten, die möglicherweise das interfamiliäre Interaktionspotential der 47 kDa GTPasen reflektieren

Die Pfeile symbolisieren die detektierten Genreporteraktivitäten der Y2H-Analyse und zeigen vom *bait*-Protein zum *prey*-Protein. Durchgehende Linien symbolisieren die Aktivität des *LEU*-Genreporters (*LEU*⁺, Wachstum der Hefen auf Leuzin-defizientem Mangelmedium), unterbrochene Linien verbinden *bait-prey* Kombinationen, die die Leuzin-Auxotrophie der Hefen nicht aufheben konnten (*LEU*⁻). Geschlossene Pfeilspitzen geben die Aktivierung des *lacZ*-Genreporters an (*lacZ*⁺, Blaufärbung der Hefen), offene Pfeilspitzen verweisen auf *lacZ*-negative Klone. N- oder C-terminale Verkürzungen (Δ) der GTPasen sind in AS angegeben. Der Stern verweist auf die schwache Transaktivierung des *LEU*-Genreporters durch IIGP. Es wird deutlich, dass viele GTPase-*bait-prey*-Kombinationen nur einen der beiden Genreporter aktivieren.

Diese möglichen interfamiliären Interaktionen geben Anlass zur Spekulation, dass die Mitglieder der 47 kDa GTPasen als ihre eigenen GAPs bzw. GEFs wirken könnten. Unter Berücksichtigung der molekularen Schalterfunktion von GTPasen ist auch denkbar, dass durch eine sequenzielle Interaktion mehrerer 47 kDa GTPasen intrazelluläre Signale amplifiziert oder weitergeleitet werden können, ähnlich wie in klassischen Signaltransduktionswegen durch Phosphorylierungsereignisse. Die Interaktionen zwischen den 47 kDa GTPasen könnten eine Voraussetzung für ihre Effektorfunktionen *in-vivo* darstellen. Bei genauerer Betrachtung des differentiellen Resistenzverlusts der 47 kDa GTPase defizienten Mäuse ergeben sich tatsächlich Hinweise darauf, dass einzelne Mitglieder nicht nur unabhängig voneinander, sondern ebenso gemeinsam agieren könnten. Beispielsweise werden für eine erfolgreiche Abwehr einer akuten *T. gondii* oder *L. major* Infektion sowohl IGTP als auch LRG-47 benötigt. Die unterschiedlich starken Interaktionen eines einzelnen Familienmitglieds mit einer unterschiedlichen Anzahl anderer Familienmitgliedern könnte dazu führen, dass innerhalb des Interaktionsnetzwerks distinkte Mitglieder eine zentrale Stellung für die Funktion anderer GTPasen einnehmen, oder anderen Mitgliedern hierarchisch über- bzw. untergeordnet sind, falls die GTPasen sequentiell innerhalb einer Kaskade agieren. In beiden Modellen würde ein einzelnes Familienmitglied durch die spezifische Kooperation mit anderen Familienmitgliedern seine Effektorfunktion ausüben, und das Spektrum des Resistenzverlusts gegenüber unterschiedlichen Erregern würde einen Rückschluss auf die Position der inaktivierten GTPase innerhalb der interfamiliären Beziehungen erlauben. Die bisher detektierten Interaktionen und das daraus abgeleitete Interaktionsnetzwerk kann jedoch nicht den differentiellen Resistenzverlust der bisher generierten 47 kDa defizienten Mäuse erklären. Beispielsweise zeigt LRG-47 in den Y2H-Analysen nur wenige Interaktionen mit anderen Familienmitgliedern, die Inaktivierung von LRG-47 in Mäusen führt jedoch im Vergleich zu einer IRG-47- bzw. GTPI-Defizienz zum umfassendsten Resistenzverlust gegenüber allen bislang getesteten intrazellulären Bakterien und Parasiten. Den Y2H-Analysen zufolge würde GTPI eine zentrale Stellung für die Funktion der anderen Familienmitglieder einnehmen, es steht jedoch kein GTPI defizientes Mausmodell zur Verfügung, um diese Hypothese *in-vivo* zu überprüfen. Es müssen sich weitere Analysen anschließen, um zu überprüfen, ob

interfamiliäre Interaktionen zwischen 47 kDa GTPasen tatsächlich existieren, und ob sie eine Relevanz für die Pathogenabwehr *in-vivo* haben.

5.3 Die 47 kDa GTPase IIGP interagiert mit dem CLIP-Molekül mHk3

Bei der Suche nach Proteinen, die mit IIGP interagieren, wurde mit dem Y2H-System das Maus-Homolog (mHk3) des humanen Proteins hook3 (hHk3) (Walenta et al., 2001) identifiziert. Innerhalb des Y2H-Systems erfüllte mHk3 reproduzierbar alle Kriterien eines spezifischen Interaktionspartners von IIGP. Mit zahlreichen, vom Y2H-System unabhängigen Methoden ist es gelungen, mHk3 als einen realen, d.h. in den relevanten Zellen existierenden, physikalischen Interaktionspartner von IIGP zu klassifizieren. Mittels Immunpräzipitation konnten Komplexe aus endogen exprimiertem IIGP und mHk3 in den Zellysaten aus IFN- γ stimulierten Makrophagen nachgewiesen werden. Dies gilt als starkes Indiz für eine tatsächliche Interaktion beider Proteine unter physiologischen Bedingungen *in-vivo*. Durch Zellfraktionierungen und konfokaler Mikroskopie wurde die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine bestimmt, wodurch sich diejenigen Bereiche detektieren ließen, in denen die Proteine gemeinsam lokalisiert sind und die Interaktion wahrscheinlich stattfindet.

5.3.1 Die hook Proteine als neue Mitglieder der CLIP-Molekülgruppe

Die hook Proteine werden zu einer erst vor kurzem definierten und wenige Vertreter umfassenden Gruppe von zytoplasmatischen Verbindungs-Molekülen gezählt, den sogenannten CLIP Proteinen („cytoplasmic linker molecules“) (Schroer, 2000). Dieser Name leitet sich aus ihrer Eigenschaft ab, gleichzeitig an Mikrotubuli und an die Membranen von intrazellulären Vesikeln bzw. Organellen binden zu können und diese beiden Strukturen miteinander dynamisch zu verknüpfen. Damit besitzen die CLIP-Proteine eine Schlüsselrolle bei der Positionierung und der Architektur von Membrankompartimenten (Rickard und Kreis, 1996). Den Prototyp der CLIP-Familie repräsentiert CLIP 170, das die Bindung von Endosomen an Mikrotubuli vermittelt (Pierre et al., 1992). Weitere bisher identifizierte Mitglieder sind u.a. das gehirnspezifische CLIP-115 (De Zeeuw et al., 1997), das den dendritischen Lamellarkörper an Mikrotubuli anbindet, und GMAP210, das die Membranen des Golgi-Apparates mit Mikrotubuli assoziiert (Infante et al., 1999). Eine rein statische und

strukturgebende Funktion der CLIPs erscheint bei der überaus dynamischen und komplexen Regulation von Organellstrukturen, -bewegungen und -modifikationen, wie sie z.B. für endozytotische und sekretorische Prozesswege typisch sind, eher unwahrscheinlich (Rickard und Kreis, 1996). CLIPs vermitteln die Rekrutierung von ebenfalls mikrotubuli-bindenden Motorproteinen der Kinesin- und Dynein-Familien, die die Bewegung der Organellen bzw. Vesikel entlang der Mikrotubuli katalysieren (Hirokawa, 1998). Es wurde postuliert, dass CLIPs an Vesikelfusionen aktiv beteiligt sind (Pfeffer, 1999) und es konnte gezeigt werden, dass sie durch die Modulation der Mikrotubuli-Polymerisation Einfluss auf die Gesamtdynamik des Mikrotubuli-Netzwerks nehmen können (Brunner, 2002; Komarova et al., 2002). Offensichtlich besitzen CLIPs ein komplexes Funktionsspektrum, das zum jetzigen Zeitpunkt nur in Ansätzen bekannt und verstanden ist.

5.3.2 Die humane hook Proteinfamilie

Die erst kürzlich identifizierte Familie der humanen hook Proteine (hHk) umfasst drei Mitglieder (Walenta et al., 2001), während in *Drosophila* nur ein Homolog (dHk) exprimiert wird (Kramer und Phistry, 1999). Die Bindung der hHks an Mikrotubuli wird von dem zwischen den Familienmitgliedern konservierten N-Terminus vermittelt, der eine neuartige Mikrotubuli-Bindungsdomäne repräsentiert, die keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Mikrotubuli-bindenden Strukturen aufweist (Walenta et al., 2001). Der basische C-Terminus, der sich strukturell zwischen den drei Proteinen am deutlichsten unterscheidet und vermutlich eine globuläre Domäne ausbildet, vermittelt für jedes Mitglied individuell die Anbindung an unterschiedliche intrazelluläre Membrankompartimente. Der überwiegende Teil von hHk3 ist mit den Membranen des cis-Golgi-Apparates assoziiert. Ein geringer Anteil von hHk3 lokalisiert zudem an distinkten punktuellen Strukturen, die möglicherweise mit Mikrotubuli assoziierte Vesikel darstellen, deren genaue Identität jedoch unbekannt ist. hHk1 und hHk2 zeigen keine Assoziation mit bekannten Zellorganellen und ihr ebenfalls punktueller Verteilungsmuster in der Zellperipherie hebt sich signifikant von der hHk3 Lokalisation ab (Walenta et al., 2001).

5.3.3 Das hook Protein in *Drosophila melanogaster*

Der Name der hook Proteinfamilie („hook“=Harken) leitet sich von der Form der Borsten (Makrochaeten) von dHk-defizienten *Drosophila melanogaster* Fliegen ab, die ungewöhnlich in Harkenform im Kopf- und Thoraxbereich abknicken (Kramer und Phistry, 1996). Die molekulare Funktion von dHk wurde in detaillierten Analysen der Komplexaugenentwicklung dieser Tiere aufgeklärt. Die Differenzierung und Entwicklung von neuronalen Zellen der Augen-Imaginalscheibe hin zu unterschiedlichen Photorezeptorzellen wird durch eine Signalübermittlung koordiniert, die auf dem Kontakt des neuronalen, in der Zellmembran verankerten Liganden „boss“ mit der ebenfalls auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptor-Tyrosinkinase „sev“ basiert (Hart et al., 1990; Kramer et al., 1991). Das aus dem direkten Zell-zu-Zell-Kontakt resultierende Signal wird abgebrochen, indem der gesamte Ligand-Rezeptorkomplex von der Signal-Zielzelle durch Endozytose internalisiert wird (Cagan et al., 1992; Klueg et al., 1998). Die endozytierten boss-sev-Ligandenkomplexe werden über sogenannte multivesikuläre Körper (multivesicular bodies, MVBs) zu späten Endosomen bzw. Lysosomen transportiert, wo sie degradiert werden (Futter et al., 1996; Stoorvogel et al., 1991). MVBs stellen auch in Humanzellen ein wichtiges endosomales Zwischenkompartiment beim Transport (Katzmann et al., 2002), Sortieren (Bishop, 2003) und Zwischenspeichern (Jiang et al., 2002) von sowohl endozytierten als auch *de-novo* synthetisierten Material dar. In dHk-defizienten Zellen ist die Anzahl der reifen MVBs signifikant vermindert (Sunio et al., 1999). Es wird angenommen, dass dHk nicht für die Internalisierung oder den Transport des endozytierten Materials zu den MVBs benötigt wird, sondern für die Ausbildung oder die strukturelle Stabilisierung von reifen MVBs innerhalb der endozytotischen Prozesswege verantwortlich ist (Kramer, 2002). Für hHk3 wird eine analoge strukturgebende bzw. -stabilisierende Funktion bezüglich des Golgi-Apparates diskutiert (Walenta et al., 2001).

5.3.4 Die Interaktion zwischen IIGP und dem mHk3 Protein der Maus

Anhand der bisherigen Analysen von dHk und hHk3 kann angenommen werden, dass die Mitglieder der hook Proteinfamilie generell einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung, Stabilisierung und Positionierung von dynamischen Membrankompartimenten leisten. Aufgrund der Assoziation von IIGP mit den

Membranen des ER und des Golgi-Apparates wurde bereits vermutet, dass der Wirkmechanismus dieser Moleküle auf der Modulation von membranabhängigen Prozesse basieren könnte (Zerrahn et al., 2002). Die Identifikation des CLIP Moleküls mHk3 als ein IIGP-Interaktionspartner belegt auf molekularer Ebene, dass eine 47 kDaGTPase in intrazelluläre membranabhängige Prozesse involviert ist, die die Basis für die Effektormechanismen gegen intrazelluläre Erreger bilden könnten.

In Analogie zu der beschriebenen Lokalisation von hHk3 (Walenta et al., 2001) wurde der überwiegende Anteil von mHk3 in Maus-Makrophagen und Fibroblasten in unmittelbarer Kernnähe detektiert. In diesem Bereich akkumuliert mHk3 an den Membranen des cis-Golgi und angrenzend zu den vom MTOC ausgebildeten Strukturen. mHk3 ist offensichtlich eine konstitutiv exprimierte Grundkomponente, denn die Stimulation der Zellen mit IFN- γ verändert das Expressionsniveau und die Lokalisation von mHk3 nicht. Die gemeinsame Lokalisation von IIGP und mHk3 am Golgi-Apparat lässt vermuten, dass an diesem Kompartiment die physiologisch relevante Interaktion zwischen IIGP und mHk3 stattfindet. Diese Annahme steht im Einklang mit den Ergebnissen der Zellfraktionierungen, in denen sich beide Proteine in den mit Golgi-Membranen angereicherten Fraktionen detektieren lassen. Die detaillierten mikroskopischen Analysen zeigen jedoch, dass die Lokalisation von IIGP und mHk3 in diesem Bereich nicht vollständig übereinstimmt, sondern sich ein signifikanter Anteil beider Proteine vielmehr in unmittelbarer Nähe zueinander befindet. Daraus lässt sich folgern, dass nur Anteile des dort lokalisierten IIGP und mHk3 physikalisch miteinander interagieren. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Immunpräzipitationen reflektiert, denn in den Zellysaten liegt lediglich ein Teil des vorhandenen IIGP und mHk3 Proteins als Komplex vor. Abgesehen von der Möglichkeit, dass aufgrund der verwendeten Präparations- und Aufreinigungsbedingungen nicht alle tatsächlich *in-vivo* ausgebildeten IIGP-mHk3-Komplexe detektiert wurden, könnte dieses Ergebnis die Gegenwart einer GTP gebundenen (und mit mHk3 interagierenden) IIGP-Fraktion und einer GDP gebundenem, funktionell inaktiven IIGP-Fraktion reflektieren. Tatsächlich wurde anhand der intrazellulären GDP bzw. GTP Konzentrationen (Kleineke et al., 1979) und der Nukleotidaffinitäten von IIGP das molare Verhältnis zwischen *in-vivo* vorhandenem

IIGP in der GDP- bzw. GTP-gebundenem Form auf 3:1 geschätzt (Uthaiyah et al., 2003). In Anbetracht der sehr hohen Nukleotid-Dissoziationsraten von IIGP, die auf kurze Halbwertszeiten von IIGP Komplexen hindeuten (Uthaiyah et al., 2003), könnten die Ergebnisse aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Interaktion zwischen IIGP und hook3 eher transient als statisch erfolgt. Angesichts der Interaktion von IIGP mit mHk3 an einer außerordentlich dynamischen Struktur wie dem Golgi-Apparat, der einem kontinuierlichen Materialaustausch unterliegt (Lippincott-Schwartz et al., 2000; Thyberg und Moskalewski, 1999; Ward et al., 2001), erscheint für die Regulation membranabhängiger Prozesse ein transients Interaktionscharakter zwischen IIGP und mHk3 plausibel.

Pharmakologische Agenzien wie Brefeldin A und Nocodazol stören distinkte Komponenten der Strukturhaltung und der Transportprozesse des Golgi-Apparates und erlauben damit detaillierte Analysen der Biologie dieses Organells (Dinter und Berger, 1998). Die Durchführung derartiger Analysen konnte nicht vollständig klären, welche Charakteristik und Funktion die Bindung von hHk3 an Golgi-Membranen hat und wie sie den gerichteten Vesikeltransport beeinflusst, der die Struktur des Golgi-Apparates bestimmt (Walenta et al., 2001). Bei einem Rücktransport von Golgi-gebundenen Proteinen zum ER, der aus der Behandlung der Zelle mit Brefeldin A resultiert, bleibt hHk3 größtenteils in unmittelbarer Nähe zum MTOC lokalisiert. Bei der Auflösung des Golgi-Apparates durch die Nocodazol-induzierte Depolymerisierung der Mikrotubuli bleibt hHk3 jedoch mit den Golgi-Fragmenten assoziiert. In den mikroskopischen Analysen dieser Arbeit verhielt sich mHk3 in IFN- γ stimulierten Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, identisch. Im Gegensatz zu mHk3 lokalisiert sein Interaktionspartner IIGP nicht an den aberrant lokalisierten Golgi-Strukturen, sondern bleibt mit dem ER assoziiert. Die Aufhebung der Kolo-kalisation von IIGP und mHk3 nach Nocodazolbehandlung zeigt, dass für die Assoziation von IIGP mit dem Golgi-Apparat, im Gegensatz zu mHk3, intakte Mikrotubuli-Strukturen benötigt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass IIGP nicht per se mit den Golgi-Membranen assoziiert, sondern durch einen mikrotubuli-abhängigen Prozess zum Golgi-Apparat rekrutiert wird, um dort mit mHk3 zu interagieren. Diese Interaktion könnte signifikant die Prozessierung der mHk3 assoziierten Membranen bestimmen.

mHk3 zeigt über die perinukleäre Lokalisation hinaus ähnlich wie sein humanes Homolog (Walenta et al., 2001) in der Zellperipherie ein retikuläres, teilweise punktuell verteiltes Verteilungsmuster, das in unmittelbarer Nähe zu den retikulären IIGP-Signalen steht. Es ist denkbar, dass die physiologisch relevante Interaktion zwischen IIGP und mHk3 nicht am Golgi-Apparat, sondern an diesen Strukturen in der Zellperipherie stattfindet. Diese Annahme schließt die zuvor postulierte Interaktion beider Proteine am Golgi-Apparat nicht grundsätzlich aus, sondern könnte eine alternative Erklärung für die nur anteilige Ausbildung von IIGP-mHk3-Komplexen darstellen. Neuere Forschungsberichte dokumentieren zahlreiche tief greifende Interaktionen zwischen dem ER und endozytotischen sowie phagosomalen Kompartimenten (Gagnon et al., 2002; Haj et al., 2002). Bei den punktuellen mHk3 Signalen könnte es sich um mHk3-positive Vesikel solcher Prozesswege handeln, die über mHk3 mit Mikrotubuli assoziieren und durch die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 mit dem ER in Kontakt stehen. Auch in diesem Szenario ist es denkbar, dass IIGP durch die Interaktion mit mHk3 einen wesentlichen Einfluss auf die Charakteristik oder den Transport derartiger Vesikel nimmt. Möglicherweise nimmt die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 in der Zellperipherie Einfluss auf die ER-Struktur und ER-Ausdehnung, die in der Zellperipherie in Abhängigkeit von Mikrotubuli erfolgt (Terasaki et al., 1986).

Die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 könnte nicht nur die räumliche Konfiguration von Membrankompartimenten bestimmen, sondern auch die Eigenschaften beider membranassoziierten Moleküle verändern und damit direkten Einfluss auf die Physiologie der Membran nehmen. Es wurde bereits vorgeschlagen, dass die Bindungseigenschaften von CLIP-Molekülen wahrscheinlich durch die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert werden (Rickard und Kreis, 1996). Die detaillierten Y2H-Interaktionsanalysen mit funktionell definierten Proteinbereichen von mHk3 zeigen, dass IIGP interessanterweise mit Anteilen der zentralen Coiled-Coil-Struktur interagiert, die wahrscheinlich eine Dimerisierung von mHk3 vermittelt (Walenta et al., 2001). Sollte die Ausbildung von Hk3-Dimeren eine physiologische Relevanz *in-vivo* haben, dann könnte IIGP durch die Interaktion mit diesem Proteinbereich die funktionellen Eigenschaften von mHk3 maßgeblich verändern. Für IIGP lassen sich die

Proteinbereiche, die eine Interaktion mit mHk3 vermitteln, nicht weiter eingrenzen. Offensichtlich wird für die Ausbildung einer Konformation, die mit mHk3 interagieren kann, mit Ausnahme eines 53 AS umfassenden kurzen N-Terminalen Bereichs die Integrität des gesamten IIGP Proteins benötigt. Jede weitere Verkürzung von IIGP führte zum Abbruch der Interaktion. Im Gegensatz zu den definierten membranbindenden Domänen von mHk3 ist nicht bekannt, wie die Membranassoziation von IIGP bzw. den anderen Mitgliedern der 47 kDa GTPasen vermittelt wird. Sie verfügen nicht über bekannte Sequenzmotive, die eine direkte Anbindung an Membranen ermöglichen würden, noch wurden kovalente Sekundärmodifikationen wie Myristoylierung (Farazi et al., 2001), die kleine GTPasen an Membranen rekrutiert (Wedegaertner, 1998) oder Isoprenylierung (O'Connor, 1987) nachgewiesen, durch die die differentielle Membranassoziation der 65 kDa GTPasen vermittelt wird (Nantais et al., 1996; Vestal et al., 1996). mHk3 scheint nicht der Faktor zu sein, der eine Assoziation von IIGP mit Membranen ermöglicht. mHk3 könnte zwar die Rekrutierung von IIGP zum bzw. die Lokalisation an den Golgi-Membranen beeinflussen, scheidet jedoch aufgrund seiner eigenen Lokalisierung als Verbindungsmolekül von IIGP zu den ER-Membranen aus. Auch die Aufhebung der Kolo-kalisation von IIGP und mHk3 in Nocodazol-behandelten Zellen verdeutlicht, dass beide Moleküle auf unterschiedliche Weise mit den Membranen assoziiert sind.

5.3.5 Mögliche Einflußnahme von membranassoziiertem IIGP auf die Infektionsstrategien intrazellulärer Erreger

Aufgrund der Assoziation von mHk3 mit den Membranen eines äußerst dynamischen Kompartiments wie die des Golgi-Apparates ist anzunehmen, dass die Funktionen von mHk3 über die postulierte Beteiligung am Aufbau und der Positionierung von Organellen hinausgehen. Die membranabhängigen intrazellulären Transportprozesse, in die mHk3 involviert ist, könnten im Rahmen der IFN-Antwort von IIGP moduliert werden. Ein wesentliches Merkmal des „Abwehrmodus“, den IFN in einer Wirtszelle gegen das Eindringen bzw. die Vermehrung intrazellulärer Erreger induziert, sind fundamentale Umstrukturierungen und Modifizierungen von Membrankompartimenten (Shurety et al., 2000; Sidhu et al., 1999), die zu einer drastischen Veränderung der Gesamt-Dynamik der intrazellulären membranabhängigen Prozesse führen (Tsang et al.,

2000). Von zentraler Bedeutung ist dabei die Kontrolle und Aufrechterhaltung der Degradationsmaschinerie von endosomalen und phagosomalen Membrankompartimenten, die Erreger nach dem Eindringen in die Wirtszelle passieren oder längerfristig als Nische zu ihrer Replikation nutzen (Meresse et al., 1999b). Die nach der Internalisation eines Pathogens gebildeten frühen Phagosomen bzw. Vakuolen unterliegen einem Reifungsprozess, der über eine Vielzahl sequenzieller Fusionsereignisse mit frühen Endosomen, späten Endosomen und schließlich Lysosomen zur Ansäuerung des Kompartiments und zur Freisetzung von hydrolytischen Proteasen führt, die die Pathogene abtöten. Die Beteiligung einer GTPase an diesen Reifungsprozessen konnte für Rab5a gezeigt werden. Diese GTPase katalysiert die Fusion von endosomalen Vesikeln mit Phagosomen und fördert die Zerstörung von darin enthaltenen Pathogenen wie *L. monocytogenes* oder *S. typhimurium* (Meresse et al., 1999a; Prada-Delgado et al., 2001). Offensichtlich steuern auch die 47 kDa GTPasen zur Degradation von intrazellulären Mikroben in infizierten Wirtszellen bei. IGTP ist in Astrozyten eine essentielle Komponente des IFN- γ -induzierten Infektionsschutzes gegen *T. gondii* (Halonen et al., 2001), während LRG-47 für die Degradation von *M. tuberculosis* in Makrophagen erforderlich ist (MacMicking et al., 2003). Die Befunde, dass in diesen Zellen LRG-47 mit den *M. tuberculosis*-haltigen Phagosomen assoziiert ist, und in LRG-47 defizienten Zellen die Ansäuerung der Phagosomen beeinträchtigt ist, sind starke Indizien dafür, dass diese 47 kDa GTPase die Phagosomen- bzw. Vakuolenfunktionen moduliert. Die in dieser Arbeit identifizierte Interaktion von IIGP mit mHk3, das als CLIP-Molekül membranabhängige Transportprozesse steuert, spricht stark für ein Modell, in dem die ER- bzw. Golgi-assoziierten 47 kDa GTPasen nach der Infektion der Wirtszelle zu den Pathogenhaltigen Phagosomen bzw. Vakuolen transportiert werden, wo sie entweder direkt oder durch die Rekrutierung weiterer Effektormoleküle die Degradation der Pathogene fördern. Diesem Modell zu Folge würde die Ausbildung der Phagosomen nicht nur von Komponenten des endosomalen Systems gesteuert werden, sondern auch von den 47 kDa GTPasen als ER- und Golgi-gebundene Faktoren. Tatsächlich wurde gezeigt, dass das ER wesentlich in frühen Entwicklungsstadien des Phagosoms an dessen Aufbau beteiligt ist (Gagnon et al., 2002).

Intrazelluläre Pathogene induzieren in den Kompartimenten, in denen sie sich zur Proliferation bzw. Replikation aufhalten, umfangreiche Modifikationen der umgebenden Membran, um die Fusion mit Lysosomen zeitlich zu verzögern oder ganz zu unterbinden (Dorn et al., 2002; Hackstadt, 2000; Kagan und Roy, 2002; Sinai und Joiner, 1997). Parallel zur Blockierung des degradativen Lysosomennetzwerks werden von den Erregern intrazelluläre Transportprozesse modifiziert und eine Umgestaltung des umgebenden Zytoskeletts induziert, die eine enge Assoziation der pathogenhaltigen Vakuole mit Wirtszell-Organellen ermöglicht, um die Versorgung der Erreger mit Nährstoffen zu gewährleisten (Sinai und Joiner, 1997). Die Wirkungsmechanismen der 47 kDa GTPasen könnten spezifisch gegen derartige Modifikationen der Wirtszelle gerichtet sein und beispielsweise durch eine Unterbindung der Nährstoffzufuhr die Pathogene abtöten.

Die bisher bekannten Komponenten der phagolysosomalen Degradationsmaschinerie agieren gegen ein breites Spektrum von Erregern, unabhängig von deren phylogenetischen Ursprung. Möglicherweise handelt es sich bei den 47 kDa GTPasen um neuartige Faktoren dieser Prozesswege, die distinkte, Spezies-spezifische Resistenzmechanismen vermitteln. Beispielsweise sind IRG-47, LRG-47 und IGTP essentielle Faktoren für eine Abwehr der intrazellulären Parasiten *T. gondii* und *L. major*, jedoch scheint IGTP keinen Einfluss auf eine *T. cruzi*-Infektion zu haben. Diese drei Parasiten unterscheiden sich nicht nur bezüglich der von ihnen induzierten Vakuolenmodifikationen, sondern auch in ihrer Replikationsstrategie: während sich *T. gondii* und *L. major* Erreger in der Vakuole vermehren, verlässt *T. cruzi* die Vakuole und repliziert im Zytoplasma. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Effektormechanismen dieser 47 kDa GTPasen nur relevant sind, wenn die Parasiten temporär in den Vakuolen verbleiben. Die unterschiedliche Einflussnahme der 47 kDa GTPasen auf die Abwehr verschiedener Pathogene könnte darauf beruhen, dass sie mit distinkten Komponenten interagieren, die für die unterschiedlichen Infektionsstrategien bzw. Infektionsphasen der Pathogene spezifisch sind.

Für IIGP lassen sich derartige Überlegungen nur begrenzt anstellen, denn es ist bisher nicht bekannt, ob und gegen welche Pathogene diese GTPase einen Resistenzfaktor darstellt. Gegen Ende der Anfertigung dieser Arbeit wurde veröffentlicht, dass das von

Salmonella ins Zytoplasma sekretierte Protein SpiC mit dem IIGP-Interaktionspartner mHk3 interagiert (Shotland et al., 2003). SpiC stellt einen essentiellen Virulenzfaktor für *Salmonella* dar, indem es in infizierten Makrophagen die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen verhindert. Es wird postuliert, dass die Blockierung der Phagosomenreifung *in-vivo*, ebenso wie die beobachtete Inhibition von Endosomen-Endosomen-Fusionen *in-vitro*, auf der Inaktivierung von mHk3 durch SpiC basiert. Sollte die Pathogenität von *Salmonella* tatsächlich auf einer Inhibition von mHk3 durch SpiC beruhen, dann würde IIGP durch seine Interaktion mit mHk3 das Potential besitzen, direkt gegen diesen Pathogenitätsmechanismus zu agieren. Die Interaktion von IIGP mit mHk3 könnte kompetitiv zu SpiC erfolgen, in der funktionellen Inaktivierung von SpiC bzw. der Reaktivierung von mHk3 resultieren und damit die Ausbildung eines Phagolysosoms ermöglichen, in dem *Salmonella* schließlich von der Wirtszelle abgetötet werden kann.

5.4 Alternative Modelle für die molekularen Wirkungsweisen der 47 kDa GTPasen

Bei der Analyse der cDNA-Genbibliotheken wurden neben mHk3 weitere Proteine identifiziert, die mit IIGP bzw. mit anderen Familienmitgliedern der 47 kDa GTPasen physikalisch im Y2H-System interagieren. Im Gegensatz zu der detailliert analysierten Interaktion zwischen IIGP und mHk3 wurden diese Interaktionspartner noch nicht durch unabhängige Methoden verifiziert bzw. charakterisiert und müssen deshalb zum jetzigen Zeitpunkt als putativ betrachtet werden. Trotz dieser Einschränkung stellen diese Interaktionen konkrete Anhaltspunkte für mögliche molekulare Funktionsweisen der 47 kDa GTPasen dar. Während eine Interaktion mit den Proteinen p125 und VAP33 konzeptionell im Einklang mit der bisher favorisierten Hypothese steht, dass der Wirkungsmechanismus der 47 kDa GTPasen auf der Modulation intrazellulärer membranabhängiger Transportprozesse basiert, deuten andere Interaktionspartner wie arc20 und PTP1B darauf hin, dass die GTPasen auf unterschiedliche Art und Weise zur Resistenz des Wirtsorganismus gegenüber Infektionen mit intrazellulären Pathogenen beitragen können.

5.4.1 Die Interaktion zwischen IIGP und p125

IIGP interagiert im Y2H-System mit p125, einem neu identifizierten Protein, das seinerseits mit der Komponente sec23p des COPII-Multiproteinkomplexes interagiert (Tani et al., 1999). COPII ist ein essentieller Hüllproteinkomplex von Vesikeln, die sekretorische und membranständige Proteine vom ER zum Golgi-Apparat transportieren (Antonny und Schekman, 2001; Gorelick und Shugrue, 2001). Abhängig von den im COPII-Komplex gebundenen Einzelkomponenten bzw. deren GDP/GTP-Bindung werden alle Phasen dieses Vesikeltransports von COPII gesteuert, ausgehend von der Abschnürung der Vesikel von den ER-Membranen über ihren Transport zwischen beiden Kompartimenten bis hin zur Fusion mit den Zielmembranen des Golgi-Apparates (Kirchhausen, 2000). Die genaue Funktion von p125 in diesen Prozessen ist noch unbekannt, es wird postuliert, dass dieses Protein durch die Interaktion mit sec23p die Funktionen von COPII modulieren und eine generelle Rolle in frühen sekretorischen Proteinprozesswegen spielen könnte (Mizoguchi et al., 2000). Die Schlüsselkomponenten zur Steuerung von COPII Komplexen repräsentieren GAPs und GEFs (Barlowe, 2000), die teilweise membranständig sind. Analog könnte ER-assoziiertes IIGP einen derartigen Regulationsfaktor von COPII darstellen. Möglicherweise steuert IIGP den Vesikelmetabolismus, indem es durch die Interaktion mit p125 den GTP/GDP Bindungszustand von sec23p moduliert, das wiederum als GAP-Protein gegenüber der COPII-Komponente Sar1p wirkt. P125 weist eine signifikante Sequenzähnlichkeit zu Phospholipasen auf, eine ebensolche enzymatische Aktivität wurde jedoch nicht nachgewiesen (Tani et al., 1999). Allerdings wurde erst kürzlich eine neue enzymatisch aktive Phospholipase des Typs A1 identifiziert (KIAA0725p), die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu p125 besitzt (Nakajima et al., 2002). Phospholipasen sind vorwiegend essentielle Regulatoren des Phospholipid-Metabolismus, daneben sind sie auch für Membranfusionen des Golgi-Apparates von Bedeutung (Weigert et al., 1999) und nehmen signifikanten Einfluß auf die Lipidkomposition von Phagosomen- und Vakuolenmembranen (Underhill und Ozinsky, 2002). Auf eine mögliche Beteiligung von p125 in diesen Prozessen wurde bereits hingewiesen (Huijbregts et al., 2000). Sollte der relevante *in-vivo* Interaktionspartner von IIGP nicht p125, sondern die sequenzverwandte und

enzymatisch aktive Phospholipase KIAA0725p sein, könnte IIGP direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der Vakuolenmembran nehmen und dementsprechend die Vakuolenreifung bis zur Abtötung der Pathogene fördern.

5.4.2 Die Interaktion zwischen GTPI und VAP33

Die im Y2H-System detektierte Interaktion von GTPI mit VAP33 (VAMP assoziiertes Protein, 33 kDa, auch als VAP-A bezeichnet) unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass 47 kDa GTPasen in die Regulation von membranabhängigen Transportprozessen involviert sind. VAP33 interagiert mit dem Protein VAMP (Vesikel-assoziiertes MembranProtein), einem sog. SNARE Protein (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors). Die SNARE Hypothese basiert auf den Analysen von Vesikel-Fusionsprozessen in Neuronen, in denen durch die Fusion der intrazellulären synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt exozytiert werden (Sollner et al., 1993; Sudhof, 1995). Nach der SNARE-Hypothese werden Vesikelfusionen generell durch die spezifische Interaktion von Proteinen von „Donor“-Vesikelmembranen (v-SNARES) mit komplementären Proteinen von „Akzeptor“-Zielfmembranen (t-SNARES; „target“) vermittelt (Bonifacino und Glick, 2004). Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass durch die Interaktion von SNARE-Proteinen eine Vielzahl intrazellulärer Membranfusions- und Transportprozesse gesteuert werden (Nichols und Pelham, 1998). Für die individuelle Regulation der Fusionsprozesse unterschiedlichster Membranen muss nach diesem Modell eine Vielzahl von distinkten SNARE-Proteinpaaren existieren, und es wird angenommen, dass dieses System durch weitere SNARE-interagierende Komponenten wie beispielsweise VAP33 reguliert wird. VAP33 wurde zunächst in Neuronen der Nacktschnecke *Aplysia Californica* entdeckt (Skehel et al., 1995), inzwischen sind Homologe in der Ratte (Skehel et al., 2000) und im Menschen (Nishimura et al., 1999; Weir et al., 1998) identifiziert, die auch in vielen nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert werden. Die Funktion von VAP33 bei der Regulation von Vesikeltransporten ist nicht klar definiert. In Neuronen von Ratten lokalisiert VAP33 am ER und an Mikrotubuli, und es wurde postuliert, dass es wahrscheinlich nicht direkt an der Exozytose, sondern generell am Transport der synaptischen Vesikel beteiligt ist (Skehel et al., 2000). In polarisierten Zellen wie Endothelzellen (Lapierre et al., 1999) und Muskel- bzw.

Fettzellen (Foster et al., 2000) scheint VAP33 den Transport von verschiedenen Plasmamembranproteinen an die Zelloberfläche zu vermitteln. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass VAP33 in nicht polarisierten Zellen am ER- und Golgi-Apparat lokalisiert und außer zu VAMP auch eine Affinität zu anderen SNARE-Proteinen besitzt (Weir et al., 2001). VAP33 interagiert zudem mit anderen Regulatoren von ER-Exportprozessen wie beispielsweise OSBP (Oxysterol-bindendes Protein) (Wyles et al., 2002). Aufgrund der Identifikation vieler VAMP-verwandter SNARE-Proteine in nicht neuronalen Zellen (Cain et al., 1992; Ralston et al., 1994) ist es wahrscheinlich, dass VAP33 einen generellen Regulator von SNARE-gesteuerten Vesikelfusionen repräsentiert. GTPI könnte in einer mit IFN stimulierten Wirtszelle signifikant zur Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene beitragen, indem durch die Interaktion der GTPase mit VAP33 beispielsweise die für die Vakuolenreifung typischen endosomalen und lysosomalen Vesikelfusionen gesteuert werden. Die Wirtszellproteine VAMP und VAP33 sind zudem Angriffsstrukturen unterschiedlicher Infektionsstrategien intrazellulärer Pathogene. Es wurde gezeigt, dass *in-vitro* VAMP durch das Tetanus-Neurotoxin proteolytisch gespalten wird (Montecucco und Schiavo, 1993) und VAMP *in-vivo* selektiv die IFN-induzierte, nicht jedoch die basale Lysozym-Sekretion von Makrophagen inhibieren kann (Pitzurra et al., 1993). Auch die starke Beeinträchtigung der Zytokin- und NO-Sekretion sowie die verminderte MHCII Expression ist vermutlich auf die Inhibition von VAMP-regulierten vesikulären Transportprozesse durch das Tetanus-Toxin zurückzuführen (Pitzurra et al., 1999). VAP33 wird offensichtlich von einem Phosphoprotein des Hepatitis C Virus als Ankerstruktur genutzt, um den viralen Replikationskomplex mit den ER- und Golgimembranen der Wirtszelle zu assoziieren (Tu et al., 1999). Möglicherweise wirkt die 47 kDa GTPase GTPI diesem Infektionsmechanismus entgegen, indem sie die Interaktion der Pathogene mit den VAMP/VAP33 regulierten Vesikelstrukturen und -prozessen stört oder unterbindet.

Obwohl noch nicht nachgewiesen wurde, zu welchem Zeitpunkt nach der Infektion einer Wirtszelle und an welchen intrazellulären Strukturen die 47 kDa GTPasen in Aktion treten, unterstützen die Interaktionen zwischen den GTPasen und p125 bzw. VAP33 das Konzept, dass die pathogenhaltigen Vakuolen bzw. Phagosomen die

relevante Schnittstelle zwischen Wirtszelle und Pathogen darstellen, an der die GTPasen antimikrobielle Effektormechanismen steuern. Bisher stützte sich diese Annahme auf den Nachweis von LRG-47 in *M. tuberculosis*-haltigen Phagosomen (MacMicking et al., 2003), und auf die Beobachtung, dass der Einfluss von IGTP und LRG-47 auf den Infektionsverlauf mit intrazellulären Parasiten offensichtlich damit korreliert, wie diese Pathogene nach ihrem Einschluß in Phagosomen bzw. Vakuolen der Wirtszelle diese Kompartimente modifizieren. Beide GTPasen sind zwar essentielle Faktoren für eine effiziente Infektionsabwehr gegen *L. major* und *T. gondii*, die nach der Infektion der Wirtszelle die Phagosomenreifung verhindern und bis zur Replikation in der Vakuole verbleiben, sie haben jedoch offensichtlich keinen Einfluss auf eine *T. cruzi*-Infektion, bei der die Pathogene nach einer unveränderten Ansäuerung der Endosomen ins Zytoplasma entkommen und dort replizieren. Bei den 47 kDa GTPase-Interaktionspartnern p125 und VAP33 könnte es sich ebenso wie mHk3 um entscheidende Faktoren von membranabhängigen Prozessen handeln, die gegen die Etablierung der Pathogene in den Phagosomen bzw. Vakuolen der Wirtszelle gerichtet sind und die durch IFN-induzierte 47 kDa GTPasen gesteuert werden.

5.4.3 Die Interaktion zwischen IIGP und arc20

Es gibt ebenso Hinweise, dass 47 kDa GTPasen antimikrobielle Effektormechanismen vermitteln, die nicht zwangsläufig mit einer Kontrolle der Vakuolenreifung assoziiert sind. Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen differentiellen Einfluss von LRG-47 auf intrazelluläre Parasiten scheint der Einfluss dieser GTPase auf bakterielle Infektionen nicht mit den intrazellulären Nischen zu korrelieren, in denen sich intrazelluläre Bakterien etablieren können. LRG-47 defiziente Mäuse zeigen einen Resistenzverlust gegenüber *S. typhimurium*, *M. tuberculosis* und *M. avium*, die durch die Inhibition der Vakuolenreifung in diesem Kompartiment verbleiben können, jedoch auch gegenüber *L. monocytogenes* Erregern, die der phagosomalen Degradation entkommen, indem sie dieses Kompartiment vor seiner Ansäuerung sehr frühzeitig verlassen und ins Zytoplasma entkommen (Cossart und Lecuit, 1998; Tilney et al., 1990). Daraus folgt, dass LRG-47 entweder zu einem sehr frühen Zeitpunkt, d.h. innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Infektion der Wirtszelle, an der Vakuole wirken müsste, oder aber ein essentieller Resistenzfaktor zu einem späteren Zeitpunkt

der Infektion darstellt, wenn sich die Erreger bereits im Zytoplasma befinden. In diesem Zusammenhang ist die Identifikation des IIGP-Interaktionspartners arc20 ein erster molekularer Hinweis darauf, dass die antimikrobielle Wirkung der 47 kDa GTPasen darauf beruhen könnte, dass sie den Zugang zu zytoplasmatischen Komponenten der Wirtszelle blockieren, die Pathogene für ihren Infektionszyklus nutzen. *L. monocytogenes* und andere intrazelluläre Erreger haben verschiedene Mechanismen entwickelt, einzelne Komponenten der Aktin-Polymerisations-Maschinerie von Wirtszellen auszunutzen, um sich in deren Zytosol zu bewegen und die noch intakte Wirtszellmembran aktiv durchdringen zu können, um angrenzende Nachbarzellen zu infizieren (Frischknecht und Way, 2001; Welch et al., 1998). Die treibende Kraft in Eukaryonten für Bewegungen peripherer Zellbereiche oder Veränderungen der Zellform ist der ausgesprochen dynamische Metabolismus von Aktin-Filamenten (Machesky et al., 1997). Die Generierung von physikalischen Kräften für derartige Bewegungen erfordert eine extrem präzise räumliche und zeitliche Koordination der Aktin-Polymerisierung. Eine Schlüsselstellung für die Kontrolle dieser Prozesse nimmt in Eukaryonten der hoch konservierte Arp2/3 Proteinkomplex ein, der die Aktin-Polymerisierung an den Enden der Filamente katalysiert und ihre Verzweigung steuert (Machesky und Gould, 1999; Welch et al., 1997). Die Struktur des Arp2/3 Komplexes wurde zunächst durch Bindungsanalysen seiner Einzelkomponenten (Gournier et al., 2001) und Y2H-Analysen (Zhao et al., 2001) untersucht und später durch die Kristallstruktur aufgeklärt (Robinson et al., 2001). Arc20 repräsentiert die zentrale Strukturkomponente des Komplexes und koordiniert die sequenzielle Assemblierung der anderen sechs Proteine zum Arp2/3 Gesamtkomplex. Der Arp2/3 Komplex selbst ist enzymatisch inaktiv und wird durch weitere Faktoren wie die Mitglieder der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteinfamilie (WASp) (Higgs und Pollard, 2001; Kreishman-Deitrick et al., 2002; Welch, 1999) oder der kleinen GTPase Cdc42 (Ma et al., 1998) aktiviert. Das Oberflächenprotein ActA von *L. monocytogenes* wirkt auf den Arp2/3 Komplex ebenfalls als Aktivator und rekrutiert zusätzlich weitere Faktoren, die die Aktin-Polymerisation an der Zelloberfläche des Bakteriums fördern (Welch et al., 1998). Durch die gerichtete Aktin-Polymerisation entstehen Aktin-„Schweife“, die das Bakterium ähnlich einem Rückschubprinzip durch das Zytoplasma bis zum Erreichen der Zellmembran vorantreiben. IIGP hat durch die Interaktion mit der zentralen arc20-

Komponente des Arp2/3 Komplexes möglicherweise das Potenzial, die Pathogen-induzierte Aktin-Polymerisation zu unterbinden und die Bewegung von *L. monocytogenes* im Zytoplasma der Wirtszelle zu stoppen. Dadurch würde IIGP die Ausbreitung der Erreger auf Nachbarzellen unmittelbar verhindern und die eingedrungenen Bakterien degenerativen Prozessen der Wirtszelle zugänglich machen.

L. monocytogenes verfügt weiterhin über einen speziellen Mechanismus, um Nachbarzellen, die direkt an die Membran der Wirtszelle angrenzen, zu infizieren und so Epithelien zu passieren (Greiffenberg et al., 1998). Beim Eindringen in die Nachbarzelle sind die Erreger noch von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle umgeben, wodurch offensichtlich Parazytophagie-ähnliche Prozesse in der Zielzelle aktiviert werden, die die Aufnahme des Erregers aktiv fördern (Robbins et al., 1999). Bei der Internalisierung ist das Bakterium transient von zwei Membranen unterschiedlicher Herkunft umschlossen und es entsteht eine Konstellation, die der zuvor beschriebenen Internalisierung von Transmembranliganden in *Drosophila* signifikant ähnelt (Robbins et al., 1999). Analog zum Einfluß von dHk3 auf diese multivesikulären Strukturen in *Drosophila* könnte mHk3 bzw. der mHk3-Interaktionspartner IIGP direkt in die Membran-Fusionsprozesse an der Zelloberfläche eingreifen, die *L. monocytogenes* zur Zell-zu-Zell-Infektion ausnutzt. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass ektopisch exprimiertes IIGP in den Immun-EM-Analysen nicht nur in Kernnähe, sondern auch in Vesikeln und an der Zellmembran detektierbar war. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch ungeklärt, ob die antimikrobielle Wirkung anderer 47 kDa GTPasen möglicherweise darauf beruhen könnte, das Eindringen von Pathogenen in die Wirtszellen zu verhindern. Der differentielle Einfluss von IRG-47 und LRG-47 auf Infektionen mit intrazellulären Parasiten scheint nicht damit zu korrelieren, ob die Pathogene aktiv in die Wirtszelle eindringen (wie z.B. *T. gondii*) oder die Rezeptor-vermittelte Phagozytose von Makrophagen für ihre Aufnahme nutzen (wie z.B. *L. major*). Experimentell wurde *in-vitro* nicht gezeigt, ob die protektive Wirkung von IGTP für Astrozyten gegenüber Infektionen mit *T. gondii* auf einer verstärkten Abtötung bzw. einer Unterbindung der Replikation der eingedrungenen Erreger beruht oder IGTP einen Schutz vor dem Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle vermittelt (Halonen et al., 2001).

5.4.4 Die Interaktion zwischen GTPI und PTP1B

Neben den Modellen, die die 47 kDa GTPasen als essentielle Faktoren mit möglichen Effektorfunktionen für die Abtötung von intrazellulären Pathogenen beschreiben, scheinen sie weiterhin zur Resistenz des Wirtsorganismus beizutragen, indem sie das Überleben von Wirtszellen fördern. Diese Hypothese stützt sich auf die Befunde der *in-vitro* Überexpressionen von TGTP und IGTP. Die Überexpression von TGTP in Fibroblasten führt zu einer verringerten Anfälligkeit gegenüber dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) (Carlow et al., 1998). Die erhöhte Resistenz von HeLa Zellen, die ektopisch IGTP exprimieren, gegenüber der Lyse durch den Cocksackie Virus basiert offensichtlich auf der Transkriptionshemmung der viralen mRNA und der Aktivierung des AKT-Kinase-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) Signaltransduktionswegs. Dieser inhibiert die virus-induzierte Zellapoptose und führt zu einer erhöhten „Vitalität“ der Wirtszelle (Zhang et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in dieser Arbeit die Protein Tyrosin Phosphatase PTP1B als ein möglicher Interaktionspartner von GTPI identifiziert wurde. PTP1B ist der Prototyp von über 40 verschiedenen PTPasen mit unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten (Tonks und Neel, 2001), die eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Signaltransduktionsprozessen einnehmen (Hunter, 2000). PTP1B wurde zunächst als negativer Regulator des Insulin-Rezeptors beschrieben (Elchebly et al., 1999). Inzwischen wurde gezeigt, dass PTP1B an der zytosolischen Seite des ER lokalisiert ist und die Signaltransduktion von verschiedenen membranständigen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) terminiert (Haj et al., 2002). Nach der Bindung eines Liganden an RTKs werden die Liganden-Rezeptorkomplexe endozytiert und zum ER transportiert, dort zum Abbruch der Signaltransduktion von PTP1B dephosphoryliert und anschließend wieder zur Zelloberfläche rekrutiert (Haj et al., 2003). Die Interaktion von GTPI mit PTP1B könnte darauf hindeuten, dass die 47 kDa GTPasen durch eine Interaktion mit PTPasen deren enzymatische Aktivität oder Spezifität modulieren und so Einfluss auf Signaltransduktionswege wie PI-3K nehmen, um die Überlebenschancen einer infizierten Zelle zu erhöhen. Die Beobachtung, dass die bisher generierten 47 kDa GTPase defizienten Mäuse keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Viren *in-vivo* aufweisen, belegt nicht, dass sie für eine erfolgreiche virale Infektionsabwehr

entbehrlich sind, sondern könnte auf redundante Wirkungsmechanismen der GTPasen bei viralen Infektionen hindeuten.

Aufgrund der signifikanten Reduktion der T-Zell Population in LRG-47 defizienten Mäusen nach einer *M. avium*-Infektion wurde bereits ein Modell vorgeschlagen (Feng et al., 2004), in dem die 47 kDa GTPasen nicht die Vitalität der infizierten Zellen, sondern die Proliferation und Expansion von T-Zell-Effektorpopulationen fördern, um die Infektion zu kontrollieren. Das hohe Expressionsniveau von IGTP und LRG-47 in CD4⁺ Effektor-/Gedächtnis-T-Zellpopulation (N.-P.-Wang, unveröffentlicht) könnte einen generellen Einfluss der 47 kDa GTPasen auf die Regulation der T-Zell-Dynamik reflektieren. Damit im Einklang stehen die Ergebnisse der Y2H-Analysen dieser Arbeit, denn die erfolgte Identifikation von 47 kDa GTPasen aus der verwendeten CD4⁺ T-Zell-cDNA-Bibliothek ist ein Indiz dafür, dass in diesen Zellen die 47 kDa GTPase-Transkripte in einer hohen Frequenz vorliegen müssen, wie sie für deren Detektion in Y2H-Analysen benötigt wird.

5.5 Charakterisierung der von IIGP ausgebildeten intrazellulären Proteinaggregate

Die Verteilung von IIGP in der mit IFN- γ stimulierten Maus-Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 entsprach der publizierten Assoziation von IIGP mit den Membranen des ER und des Golgi-Apparats in IFN- γ stimulierten primären Maus-Makrophagen (Zerrahn et al., 2002). Bei der ektopischen Expression von IIGP in NIH/3T3 wurde jedoch die Assoziation mit dem ER und dem Golgi-Apparat scheinbar aufgehoben, und die GTPase bildete überwiegend in unmittelbarer Nähe zum Nukleus große, bänderartige Strukturen aus, deren ungewöhnliche Form keinen erkennbaren Bezug zu anderen intrazellulären Organellen oder Strukturen hatte. Der überwiegend lineare Charakter dieser IIGP-Strukturen wurde offensichtlich nicht von intrazellulären Strukturkomponenten wie Aktin, Tubulin, Keratin oder Filamenten bestimmt, denn eine Assoziation von IIGP mit diesen Komponenten konnte in der konfokalen Mikroskopie nicht nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesen Strukturen um makromolekulare IIGP-Proteinaggregate handelt.

Generell können sich große Proteinaggregate ausbilden, wenn die bei der Proteinfaltung anfallenden Zwischenprodukte vor ihrer Assemblierung zum nativem Protein untereinander interagieren und oligomere Proteinkomplexe bilden (Wetzel, 1994). Zellen verfügen über effiziente Mechanismen, um die Entstehung dieser potentiell toxischen Proteinaggregate zu verhindern (Bonifacino und Weissman, 1998; Kopito, 1997; Wickner et al., 1999). Eine Hauptkomponente dieser Maschinerie sind die Chaperone, die die korrekte Faltung von Proteinen fördern, indem sie durch ihre Anbindung an neu synthetisierte, partiell gefaltete Polypeptide eventuelle intra- und intermolekulare Interaktionen der Zwischenprodukte verhindern und eine Rückfaltung von nicht-nativen Proteinen zu nativen Konformationen begünstigen (Hartl, 1996; Netzer und Hartl, 1998). Proteine, die trotz des Chaperon-Systems falsch gefaltet werden, werden durch das Ubiquitin-Proteasomensystem degradiert (Hershko und Ciechanover, 1998; Hirsch und Ploegh, 2000). Neueren Berichten zufolge sind diese Prozesse ein fundamentaler Teil der Basismaschinerie zur Proteinsynthese, denn der prozentuale Anteil von Proteinen, die zur korrekten Faltung Chaperone benötigen (Thulasiraman et al., 1999; Weissman et al., 1996) oder die durch das Proteasomen-System degradiert werden (Schubert et al., 2000), ist unter normalen physiologischen Bedingungen erstaunlich hoch (30-45 % der *de-novo* Proteinsynthese). Es ist zwar denkbar, dass die Synthese von nativem IIGP eine enge Assoziation mit Chaperonen erfordert, eine Überlastung des Chaperonen- bzw. Proteasomensystems durch die ektopische Expression von IIGP erscheint jedoch unwahrscheinlich, denn in NIH/3T3 Zellen wurde eine identische Proteinmenge an ektopischem und endogenem (nach IFN- γ Stimulation) IIGP nachgewiesen. Zudem tendieren Proteinaggregate aus nicht-nativen Konformeren dazu, metabolisch äußerst stabil zu sein und sich in wässriger Lösung selbst in Gegenwart von starken Detergenzien nur schlecht zu lösen (Fink, 1998). Ektopisch exprimiertes IIGP war jedoch bereits unter sehr milden Bedingungen komplett löslich und bei dem IIGP-Aggregat handelte es sich um eine reversible Struktur, die die Zellen durch eine Stimulation mit IFN- γ signifikant umstrukturieren bzw. komplett auflösen könnten. Zudem verfügt IIGP nicht über ausgedehnte hydrophobe oder stark polare Proteinbereiche, die Ausbildung eines klassischen inerten Protein-Aggregats begünstigen.

Es ist nicht vollständig verstanden, wie Zellen mit aggregierten Proteinen verfahren. In Prokaryonten akkumulieren Proteinaggregate diffusionsabhängig zu sogenannten "inclusion body"-Strukturen, die von der Zelle nicht weiter prozessiert werden können und selbst gegen eine Degradation durch Proteolyse inert sind (Speed et al., 1996). Für Eukaryontenzellen schlagen neuere Studien ein Modell vor, wonach in peripheren Zytoplasmabereichen gebildete kleinere Proteinaggregate entlang von Mikrotubuli zum MTOC unter Beteiligung des Motorproteins Dynein aktiv transportiert werden (Garcia-Mata et al., 2002; Kopito, 2000). Dort akkumulieren die Einzelaggregate in unmittelbarer Nähe zum Zellkern zu einem großen Aggregat, dem so genannten Aggresom (Johnston et al., 1998). In konfokalen mikroskopischen Analysen wurde untersucht, ob sich die ungewöhnliche Gestalt des IIGP-Aggregats auf die Ausbildung eines derartigen Aggresoms zurückführen lässt. Eine Assoziation der IIGP-Struktur mit dem MTOC war nicht offensichtlich. Die Ausbildung von Aggresomen ist häufig mit dramatischen Umstrukturierungen der Intermediärfilamente des Zytoskeletts assoziiert. Ein typisches Merkmal von Aggresomen ist eine äußere Begrenzung des Protein-Aggregats durch Vimentin (Lee et al., 2002), die für die IIGP-Struktur nicht nachgewiesen wurde. Auch das Auseinanderbrechen des Golgi-Apparats sowie eine partielle Desorganisation der Mikrotubuli-Strukturen als Folge einer Aggresomenausbildung (Garcia-Mata et al., 1999) war in den IIGP überexprimierenden Zellen nicht zu erkennen. Für die IIGP-Aggregate konnten keine charakteristischen Komponenten von Aggresomen nachgewiesen werden, ihre Gestalt ähnelte jedoch der Form von bänderartigen Aggresomen (Garcia-Mata et al., 2002). Da die IIGP-Aggregate von den Zellen toleriert wurden und keinerlei Einfluss auf Zellwachstum bzw. Zellmorphologie zeigten, wird angenommen, dass diese Aggregate keine Aggresomen im klassischen Sinn von akkumuliertem, inertem Protein, sondern möglicherweise Aggresomen-ähnliche Strukturen mit intakter Funktionalität darstellen. Die Ausbildung von Aggresomen als Resultat fehlerhafter Proteinprozessierungen gilt als Ursache zahlreicher degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen wie die Parkinson oder Huntington Krankheit (Sherman und Goldberg, 2001; Tran und Miller, 1999). Inzwischen gibt es jedoch auch Hinweise dafür, dass in einem normalen physiologischen Kontext Aggresomen-ähnliche Strukturen ausgebildet werden, die offensichtlich wichtige physiologische Prozesse steuern (Lelouard et al.,

2002). Auch für ein IFN-reguliertes Protein wurde die Ausbildung von großen Proteinaggregaten sowohl nach endogener als auch ektopischer Expression beschrieben (Meyerdierks et al., 1999).

Es wird kontrovers diskutiert, ob Aggresomen aktiv Komponenten des Chaperon-, Ubiquitinylierungs- und Proteasomensystems rekrutieren, um die aggregierten Proteine zu prozessieren (Fabunmi et al., 2000; Lee et al., 2002), oder in der Nähe des MTOC spezialisierte degradative Zentren existieren, die Proteine in Aggresomen abbauen (Wigley et al., 1999). Aggresomen scheinen sich unabhängig von der Ubiquitinylierung der aggregierenden Proteine auszubilden (Kopito, 2000). Die IIGP-Struktur zeigte in den konfokalen mikroskopischen Analysen ein deutliches Ubiquitin-Signal, das sich allerdings nicht auf ubiquitinyliertes IIGP zurückführen ließ, sondern offensichtlich die Ubiquitinylierung anderer, noch nicht identifizierter Komponenten in dieser Struktur reflektierte. Demzufolge scheint IIGP an dieser Struktur nicht selbst proteasomal degradiert zu werden, sondern könnte auf noch unbekannte Weise den Abbau anderer Komponenten steuern. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Aggresomen neben ihrer Funktion als zentrale „Sammelstelle“ für aggregierte Proteine scheinbar eine Schnittstelle zur Autophagie darstellen (Fortun et al., 2003; Lee et al., 2002). Autophagie bezeichnet die Degradation von großen partikulären Strukturen wie Zellorganellen (z.B. Mitochondrien und Peroxisomen) durch den molekular noch nicht verstandenen Einschluss dieser Partikel in Autophagosomen, der anschließenden Fusion mit Lysosomen und der Degradation durch lysosomale Hydrolasen (Mortimore et al., 1996). Ausgehend von der aufgestellten Hypothese, dass IIGP mit membranabhängigen Prozessen an pathogenhaltigen Vakuolen assoziiert ist und zudem in degradative Prozesse von Aggresomen-ähnlichen Strukturen involviert sein könnte, lässt sich spekulieren, dass diese GTPase der Wirtszelle ermöglicht, intrazelluläre Pathogene den Prozesswegen der Autophagie zuzuführen und sie innerhalb des lysosomalen Systems abzutöten und zu degradieren. Neuere Forschungsarbeiten zeigen, dass intrazelluläre Pathogene wie *L. monocytogenes* tatsächlich über Autophagie abgetötet werden können (Kirkegaard et al., 2004; Rich et al., 2003). Der Befund der konfokalen mikroskopischen Analysen, dass ektopisch exprimiertes IIGP in unstimulierten NIH/3T3 Zellen nicht mit den Strukturen des lysosomalen Prozessweges kolokalisierte,

spricht nicht notwendigerweise gegen diese Hypothese, sondern könnte darauf hinweisen, dass IIGP eine Degradation durch Autophagie im Zusammenspiel mit weiteren Komponenten vermittelt, die durch IFN- γ induziert werden.

Die ektopische Expression der in der GDP-Konformation arretierten Mutante IIGP[S83N] führte in den in NIH/3T3-Transfektanden zu keiner Ausbildung von Aggregaten, obwohl in den Zellen eine im Vergleich zu IIGP-Transfektanden ähnliche Proteinmenge vorlag. Daraus lässt sich schließen, dass die Assemblierung von IIGP zu großen Aggregaten *in-vivo* eine strukturelle Eigenschaft dieser GTPase darstellt und in Abhängigkeit vom ihrem GDP/GTP-Bindungszustand und der daraus resultierenden Konformation erfolgt. Diese Hypothese steht im Einklang mit der kürzlich publizierten biochemischen Charakterisierung von IIGP, in der die Ausbildung von IIGP-Oligomeren *in-vitro* nachgewiesen wurde (Uthaiyah et al., 2003).

Mit der Fähigkeit, strukturierte Proteinaggregate *in-vivo* ausbilden zu können, besitzt IIGP eine auffällige Parallele zu den Mx-GTPasen, die ebenfalls in Abhängigkeit ihres GDP/GTP-Bindungszustands aggregieren (Nakayama et al., 1993). Die Oligomerisierung von Mx1 wird dabei durch eine Selbstassemblierungsdomäne (SAS) vermittelt (Nakayama et al., 1993), für IIGP und die anderen 47 kDa GTPase Familienmitglieder konnten Domänen mit analoger Funktion bisher nicht identifiziert werden. Die Fähigkeit der Mx-GTPasen zur Oligomerisierung ist unmittelbar mit ihrer antiviralen Aktivität verbunden (Kochs et al., 2002). Ein Modell für die Wirkungsweise der GTPase MxA schlägt vor, dass in nicht-infizierten Wirtszellen die Aggregate aus MxA-Homo-Oligomeren einen Speicherort für die funktionell inaktive Mx-GTPase bilden. Aus diesen Aggregaten lösen sich in Virus-infizierten Zellen funktionell aktive Monomere, die an viralen Komponenten wie dem Nukleokapsid binden. Durch die Rekrutierung weiterer MxA-Monomere zu diesem GTPase-Virus-Komplex wird der intrazelluläre Transport des Virus und demzufolge seine Replikation unterbunden. Eine derartige direkte Interaktion mit Komponenten von Pathogenen wurde bisher für die 47 kDa GTPasen nicht gezeigt. Es ist wahrscheinlicher, dass der molekulare Wirkungsmechanismus dieser GTPase Familie in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrer Membranassoziation steht. Die durchgeführten Untersuchungen von

angereicherten intrazellulären Membranen zeigen, dass das ektopisch exprimierte IIGP in seiner GTP-gebundenen Form an die Membranen bindet. Die Immun-EM-Analysen der NIH/3T3-Transfektanten konnten eine Membranssoziation von IIGP aufgrund der schwachen Strukturhaltung zwar nicht eindeutig nachweisen, die streng lineare Anordnung der IIGP-Signale in Angrenzung zum Nukleus sind jedoch ein deutlicher Hinweis auf eine Assoziation mit den ER- bzw. Golgi-Membranen, wie sie in den konfokalen Analysen von endogenem IIGP detektiert wurde.

In den konventionellen EM-Analysen der IIGP-Transfektanten wurde eine signifikante großlumige Expansion des ER detektiert. Ektopisches IIGP scheint in diesen Zellen eine Subkompartimentalisierung des ER zu induzieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die mit Membranen assoziierten IIGP-Aggregate als „Mechano-Enzyme“ wirken könnten, ähnlich den für Dynamine vorgeschlagenen Wirkungsmechanismen (Praefcke und McMahon, 2004). Humanes Dynamin 1 (hDyn1) und das Dynamin verwandte Homolog Protein 1 (hDrp1) werden konstitutiv exprimiert und sind in Prozesse des intrazellulären Membrantransports und der Membranzusammenstrukturierung involviert (Danino und Hinshaw, 2001; Schmid et al., 1998). Obwohl der genaue molekulare Wirkungsmechanismus von Dynaminen noch ungeklärt ist, ist anhand der verfügbaren Daten anzunehmen, dass sie die treibende physikalische Kraft für die Ausbildung von Vesikeln erzeugen, indem sie nach ihrer Bindung an die Membranen in Abhängigkeit ihrer GTPase-Aktivität oligomerisieren und die Membranen zusammendrücken und durchtrennen (McNiven et al., 2000). Möglicherweise verfügt die membranassoziierte GTPase IIGP über eine ähnliche Funktionalität, sobald sie oligomerisiert und Aggregate ausbildet.

Der scheinbare Widerspruch, dass in NIH/3T3 Zellen nur das ektopische IIGP, nicht jedoch das nach IFN- γ Stimulation exprimierte endogene IIGP, eine Fähigkeit zur Oligomerisierung zeigte, könnte sich auf den unterschiedlichen Immunstatus dieser Zellen zurückführen lassen. Offensichtlich benötigt die normalerweise durch IFN- γ induzierte GTPase IIGP für die Rekrutierung an ER- und Golgi-Membranen weitere IFN- γ abhängige Faktoren, die in den nicht stimulierten IIGP-Transfektanten fehlen. In dieser Situation könnte dann die biochemische Eigenschaft von IIGP zur Oligomerisierung überwiegen und zur beobachteten Aggregatbildung führen. Diese

Hypothese wird durch den Befund gestützt, dass die Stimulation der IIGP-Transfektanden mit IFN- γ die IIGP-Aggregate in kleine, vesikuläre Strukturen auflöste und neu verteilte, ohne dass sich die in den Zellen vorhandene IIGP-Proteinmenge veränderte. Die in dieser Arbeit identifizierten IIGP-Interaktionspartner können diejenigen Faktoren, die für die Verteilung von IIGP in IFN-stimulierten Zellen erforderlich sind, nicht repräsentieren, denn ihre Expression wird zum jetzigen Kenntnisstand nicht durch Interferone reguliert. Demzufolge existieren möglicherweise weitere, noch nicht identifizierte IFN-regulierte IIGP-Interaktionspartner für IIGP.

Offensichtlich besitzen auch andere 47 kDa GTPase Familienmitglieder das Potenzial, Aggregate auszubilden. In konfokal-mikroskopischen Analysen von IFN- γ stimulierten IIGP-Transfektanden konnten IGTP-Aggregate detektiert werden, mit den vesikulären IIGP-Aggregaten partiell kolokalisierten. Diese Kolokalisation könnte auf eine physikalische Interaktion beider GTPasen zurückzuführen sein, die im Einklang mit dem postulierten interfamiliären Interaktionspotential der 47 kDa GTPasen stehen würde. Die kolokalisierenden IIGP und IGTP Aggregate könnten auch ein Hinweis darauf sein, dass beide GTPasen mit identischen intrazellulären Komponenten interagieren oder sich intrazelluläre Prozesswege teilen.

Die beobachtete Ausbildung von IIGP-Aggregaten in IFN- γ stimulierten und mit *T. gondii* infizierten NIH/3T3 Fibroblasten belegt, dass auch endogenes IIGP grundsätzlich oligomerisieren kann. In den mit *T. gondii* infizierten Fibroblasten akkumulierten IIGP-Aggregate in der Nähe der parasitophoren Vakuolen und schienen mit deren Membranen zu assoziieren. Die Größe und Form dieser Einzelaggregate ähnelte den aufgelösten IIGP-Aggregaten in den IFN- γ stimulierten IIGP-Transfektanden. Dieser Befund ist ein signifikanter Hinweis darauf, dass die Aggregatbildung nicht nur eine generelle strukturelle Charakteristik von IIGP ist, sondern in infizierten Wirtszellen eine Funktionalität *in-vivo* besitzen könnte. Möglicherweise reflektiert oligomerisiertes IIGP die funktionell aktive und für die Abwehr intrazellulärer Pathogene relevante Form von IIGP. IIGP als ER-assoziierte GTPase ist prädestiniert für die Ausübung von antiparasitären Effektormechanismen gegen den intrazellulären Parasiten *T. gondii*, denn die parasitophoren Vakuolen sind

von ER-Membranen umhüllt und stehen mit diesem Organell in direktem Kontakt (Sibley, 2003). Die Akkumulation von IIGP an diesen Vakuolen kann nicht auf eine Kontraktion des ER zurückgeführt werden, denn die Struktur des ER bleibt während der Infektion der Wirtszelle strukturell unverändert (L. Sibley, persönliche Mitteilung). Eine räumliche Verdrängung des ER durch die Vakuolen erscheint als Ursache für die Ausbildung der detektierten IIGP-Signale nicht plausibel. Möglicherweise beruht der Effektormechanismus von IIGP darauf, dass zu ER-assoziiertem IIGP-Protein an den Kontaktstellen zwischen ER und der parasitophoren Vakuole sukzessive weiteres IIGP-Protein aktiv rekrutiert wird, dort akkumuliert und funktionell aktive IIGP-Oligomere ausbildet, die schließlich mit den Vakuolenmembranen interferieren. Die Beobachtung, dass nach 24 Stunden einer *T. gondii* Infektion von Fibroblasten kein IIGP detektiert werden konnte, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Erreger mit den IFN- γ -Signalwegen interferiert und die Neusynthese von IIGP verhindert. Denkbar ist auch, dass *T. gondii* noch nicht bekannte Prozesse aktiviert, die eine spezifische Degradation des immunrelevanten IIGPs induzieren. Die IIGP-Transfektanden wurden ebenso effizient mit *T. gondii* infiziert wie normale NIH/3T3 Fibroblasten, woraus sich schließen lässt, dass IIGP selbst ohne weitere intrazelluläre Faktoren keinen Infektionsschutz gegen diesen Erreger etablieren kann. Die Etablierung eines zellulären Resistenzmodus scheint in Fibroblasten (im Gegensatz zu Makrophagen; persönliche Mitteilung von L. Sibley) neben IFN- γ weitere Faktoren wie z.B. TNF- α zu benötigen, denn die alleinige Stimulation der Fibroblasten mit IFN- γ zeigte weder einen Einfluss auf die Infektionsrate, noch auf die Replikationszeit von *T. gondii* in den infizierten Zellen.

6 Zusammenfassung

Innerhalb der angeborenen Immunabwehr gegen intrazellulär replizierende Erreger induzieren Interferone in nahezu jeder Körperzelle spezifische Resistenzprogramme, die unabhängig von extrazellulären Komponenten des Immunsystems agieren, sozusagen „zellautonom“ erfolgen. Es gibt inzwischen signifikante Belege dafür, dass die Mitglieder der vorrangig durch Interferon- γ induzierten 47 kDa GTPase Familie wesentliche Komponenten dieser zellautonomen Abwehrprogramme darstellen und essentiell zur Resistenz des Wirtsorganismus gegen intrazelluläre bakterielle und parasitäre Erreger beitragen.

Die molekularen Mechanismen, die der antimikrobiellen Wirkung der 47 kDa GTPasen zugrunde liegen, sind bislang unbekannt. Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand deshalb darin, mit einer molekularen Charakterisierung der 47 kDa GTPasen Einblicke in ihre Wirkungsweise und diejenigen Prozesse zu erlangen, innerhalb der sie ihre Funktion ausüben.

Ausgehend von der Annahme, dass 47 kDa GTPasen analog zu klassischen GTPasen mit anderen Proteinen interagieren, wurden in dieser Arbeit mit einem Hefe-Interaktionssystem erstmals Protein-Interaktionspartner für einzelne Mitglieder der 47 kDa GTPasen identifiziert. Exemplarisch wurde die Interaktion des in unserem Labor klonierten Familienmitglieds IIGP und dem erst vor kurzem identifizierten hook3 Protein (mHk3) detailliert untersucht. Mit unterschiedlichen biochemischen Methoden konnte die physikalische Interaktion zwischen IIGP und mHk3 bestätigt werden und die für die Interaktion relevanten Bereiche beider Proteine identifiziert werden. Es zeigte sich, dass mHk3 spezifisch mit IIGP und keinem anderen Mitglied der 47 kDa GTPase Familie interagiert und die Interaktion in Abhängigkeit des GTP-gebundenen, aktiven Zustands von IIGP erfolgt.

Hook3 vermittelt eine Assoziation von Organellmembranen mit Mikrotubuli und wird als ein Faktor diskutiert, der membranabhängige Transportprozesse steuert und offensichtlich in den gerichteten intrazellulären Vesikeltransport involviert ist. Die Befunde der konfokal-mikroskopischen Analysen deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen IIGP und mHk3 an den Strukturen des Golgi-Apparats bzw. an noch nicht näher charakterisierten vesikulären Strukturen in der Zellperipherie

stattfindet. Diese Befunde legen nahe, dass die 47 kDa GTPasen generell am Transport oder der Modifikation von Membranen beteiligt sein könnten. Damit hätten sie das Potential, gegen die Erreger gerichtete, immunrelevante Abwehrmechanismen an der Vakuolenmembran zu vermitteln, die die Schnittstelle zwischen dem internalisiertem Erreger und der Wirtszelle darstellt. Im Einklang mit diesem Konzept konnte nach einer *in-vitro* Infektion von Mausfibroblasten mit dem Erreger *Toxoplasma gondii* an den Pathogenvakuolen die GTPase IIGP detektiert werden.

In Mausfibroblasten, die IIGP ektopisch exprimieren, bildet IIGP in Abhängigkeit der GTPase-Aktivität große perinukleäre Proteinaggregate aus, bei denen es sich offensichtlich nicht um typische Aggresomen aus aberrant gefaltetem Protein handelt. Interessanterweise löst eine Stimulation dieser Zellen mit Interferon- γ die IIGP-Aggregate auf, was nahe legt, dass für die Rekrutierung oder Bindung von IIGP an die Membranen des ER und des Golgi-Apparats weitere IFN-abhängige Faktoren benötigt werden. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass die ektopische Expression von IIGP zu einer Deformation bzw. Kompartimentalisierung des ER führt. In IFN- γ stimulierten Fibroblasten, die mit *Toxoplasma gondii* Erregern infiziert wurden, konnte in der frühen Infektionsphase eine ähnliche Aggregatbildung von endogenem IIGP beobachtet werden. Die Ausbildung dieser makromolekularen Strukturen steht im Einklang mit dem Oligomerisierungspotential von IIGP. Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch ungeklärt, inwieweit die Fähigkeit von IIGP zur Oligomerisierung für eine Vermittlung von Resistenzmechanismen gegen intrazelluläre Erreger von Relevanz sein könnte.

Die Befunde der Hefe-Interaktionsanalysen deuten darauf hin, dass neben IIGP auch andere Familienmitglieder der 47 kDa GTPasen oligomerisieren können und offensichtlich auch zu interfamiliären Protein-Interaktionen befähigt sind. Möglicherweise existiert zwischen den 47 kDa GTPasen ein komplexes Interaktionsnetzwerk, das ihre immunrelevanten Funktionen bestimmt.

Neben der detailliert untersuchten Interaktion zwischen IIGP und mHk3 lassen sich von den weiterhin identifizierten Protein-Interaktionspartnern Funktionsmodelle für die 47 kDa GTPasen ableiten, die in dieser Arbeit eingehend diskutiert werden. Diese Moleküle könnten den Ausgangspunkt für zukünftige Forschungsarbeiten zum molekularen Wirkungsmechanismus der 47 kDa GTPasen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, N., Stojdl, D.F., Duncan, P.I., Methot, N., Ishii, T., Dube, M., Vanderhyden, B.C., Atkins, H.L., Gray, D.A., McBurney, M.W., Koromilas, A.E., Brown, E.G., Sonenberg, N. und Bell, J.C. (1999) Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, **274**, 5953-5962.
- Ahmed, S., Lee, J., Wen, L.P., Zhao, Z., Ho, J., Best, A., Kozma, R. und Lim, L. (1994) Breakpoint cluster region gene product-related domain of n-chimaerin. Discrimination between Rac-binding und GTPase-activating residues by mutational analysis. *J Biol Chem*, **269**, 17642-17648.
- Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L. und Rubin, B.Y. (1999) Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus und encephalomyocarditis virus. *Virology*, **256**, 8-14.
- Antonny, B. und Schekman, R. (2001) ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 438-443.
- Asundi, V.K., Stahl, R.C., Showalter, L., Conner, K.J. und Carey, D.J. (1994) Molecular cloning und characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim Biophys Acta*, **1217**, 257-265.
- Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., Bosma, G.C., Bosma, M.J. und Unanue, E.R. (1987) A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-gamma. *J Immunol*, **139**, 1104-1107.
- Barlowe, C. (2000) Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic*, **1**, 371-377.
- Bartel, P.L. und Fields, S. (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol*, **254**, 241-263.
- Bellamy, R. (1999) The natural resistance-associated macrophage protein und susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect*, **1**, 23-27.
- Binns, D.D., Helms, M.K., Barylko, B., Davis, C.T., Jameson, D.M., Albanesi, J.P. und Eccleston, J.F. (2000) The mechanism of GTP hydrolysis by dynamin II: a transient kinetic study. *Biochemistry*, **39**, 7188-7196.
- Bishop, N.E. (2003) Dynamics of endosomal sorting. *Int Rev Cytol*, **232**, 1-57.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K. und Howard, J.C. (1998) Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol*, **161**, 6715-6723.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. und Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **15**, 749-795.
- Bogdan, C. (2000) The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol*, **12**, 419-424.

- Bogdan, C., Rollinghoff, M. und Diefenbach, A. (2000) Reactive oxygen und reactive nitrogen intermediates in innate und specific immunity. *Curr Opin Immunol*, **12**, 64-76.
- Bonifacino, J.S. und Glick, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding und fusion. *Cell*, **116**, 153-166.
- Bonifacino, J.S. und Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin und the control of protein fate in the secretory und endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 19-57.
- Bourne, H.R. (1995) GTPases: a family of molecular switches und clocks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **349**, 283-289.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure und molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brent, R. und Ptashne, M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-736.
- Briken, V., Ruffner, H., Schultz, U., Schwarz, A., Reis, L.F., Strehlow, I., Decker, T. und Staeheli, P. (1995) Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol Cell Biol*, **15**, 975-982.
- Brunner, D. (2002) How to grab a microtubule on the move. *Dev Cell*, **3**, 2-4.
- Cagan, R.L., Kramer, H., Hart, A.C. und Zipursky, S.L. (1992) The bride of sevenless und sevenless interaction: internalization of a transmembrane ligand. *Cell*, **69**, 393-399.
- Cain, C.C., Trimble, W.S. und Lienhard, G.E. (1992) Members of the VAMP family of synaptic vesicle proteins are components of glucose transporter-containing vesicles from rat adipocytes. *J Biol Chem*, **267**, 11681-11684.
- Callard, R.u.A.G. (ed.). (1994) *The Cytokine FactsBook*.
- Carlow, D.A., Marth, J., Clark-Lewis, I. und Teh, H.S. (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.
- Carlow, D.A., Teh, S.J. und Teh, H.S. (1998) Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J Immunol*, **161**, 2348-2355.
- Cheng, Y.S., Becker-Manley, M.F., Chow, T.P. und Horan, D.C. (1985) Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein und its characterization. *J Biol Chem*, **260**, 15834-15839.
- Cheng, Y.S., Colonna, R.J. und Yin, F.H. (1983) Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem*, **258**, 7746-7750.

- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify und clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9578-9582.
- Chu, W.M., Ostertag, D., Li, Z.W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J. und Karin, M. (1999) JNK2 und IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, **11**, 721-731.
- Clarke, S. (1992) Protein isoprenylation und methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem*, **61**, 355-386.
- Clemens, M.J. und Elia, A. (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure und function. *J Interferon Cytokine Res*, **17**, 503-524.
- Cockfield, S.M., Ramassar, V., Noujaim, J., van der Meide, P.H. und Halloran, P.F. (1993) Regulation of IFN-gamma expression in vivo. IFN-gamma up-regulates expression of its mRNA in normal und lipopolysaccharide-stimulated mice. *J Immunol*, **150**, 717-725.
- Collazo, C.M., Yap, G.S., Hieny, S., Caspar, P., Feng, C.G., Taylor, G.A. und Sher, A. (2002) The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent und requires expression in both hematopoietic und nonhematopoietic cellular compartments. *Infect Immun*, **70**, 6933-6939.
- Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Woude, G.F., Sher, A. und Taylor, G.A. (2001) Inactivation of LRG-47 und IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J Exp Med*, **194**, 181-188.
- Collins, H.L., Kaufmann, S.H. und Schaible, U.E. (2002) Iron chelation via deferoxamine exacerbates experimental salmonellosis via inhibition of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent respiratory burst. *J Immunol*, **168**, 3458-3463.
- Condino-Neto, A. und Newburger, P.E. (2000) Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*, **95**, 3548-3554.
- Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G. und Orme, I.M. (1993) Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*, **178**, 2243-2247.
- Cossart, P. und Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry und actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands und signaling. *Embo J*, **17**, 3797-3806.
- Curiel, R.E., Garcia, C.S., Rottschaefer, S., Bosco, M.C. und Espinoza-Delgado, I. (1999) Enhanced B7-2 gene expression by interferon-gamma in human monocytic cells is controlled through transcriptional und posttranscriptional mechanisms. *Blood*, **94**, 1782-1789.

- Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A. und Stewart, T.A. (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, **259**, 1739-1742.
- Danino, D. und Hinshaw, J.E. (2001) Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 454-460.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. und Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways und transcriptional activation in response to IFNs und other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**, 1415-1421.
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H. und Williams, B.R. (2001) Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*, **69**, 912-920.
- De Zeeuw, C.I., Hoogenraad, C.C., Goedknegt, E., Hertzberg, E., Neubauer, A., Grosveld, F. und Galjart, N. (1997) CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron*, **19**, 1187-1199.
- Decker, T., Kovarik, P. und Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, **17**, 121-134.
- Der, S.D., Yang, Y.L., Weissmann, C. und Williams, B.R. (1997) A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3279-3283.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. und Silverman, R.H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15623-15628.
- Dever, T.E., Glynias, M.J. und Merrick, W.C. (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1814-1818.
- Di Marzio, P., Puddu, P., Conti, L., Belardelli, F. und Gessani, S. (1994) Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*, **179**, 1731-1736.
- Dinter, A. und Berger, E.G. (1998) Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol*, **109**, 571-590.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr. und Progulske-Fox, A. (2002) Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol*, **4**, 1-10.
- Downward, J. (1996) Control of ras activation. *Cancer Surv*, **27**, 87-100.
- Dugan, J.M., de Wit, C., McConlogue, L. und Maltese, W.A. (1995) The Ras-related GTP-binding protein, Rab1B, regulates early steps in exocytic transport und processing of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, **270**, 10982-10989.
- Dupuis, S., Dargemont, C., Fieschi, C., Thomassin, N., Rosenzweig, S., Harris, J., Holland, S.M., Schreiber, R.D. und Casanova, J.L. (2001) Impairment of

- mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science*, **293**, 300-303.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. und Levy, D.E. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, **84**, 443-450.
- Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A. und Brent, R. (1983) LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J Biol Chem*, **258**, 13258-13261.
- Eccleston, J.F., Binns, D.D., Davis, C.T., Albanesi, J.P. und Jameson, D.M. (2002) Oligomerization und kinetic mechanism of the dynamin GTPase. *Eur Biophys J*, **31**, 275-282.
- Edelman, R. und Wheelock, E.F. (1966) Vesicular stomatitis virus replication in human leukocyte cultures: enhancement by phytohemagglutinin. *Science*, **154**, 1053-1055.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. und Kennedy, B.P. (1999) Increased insulin sensitivity und obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, **283**, 1544-1548.
- Erlandsson, L., Blumenthal, R., Eloranta, M.L., Engel, H., Alm, G., Weiss, S. und Leanderson, T. (1998) Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol*, **8**, 223-226.
- Fabunmi, R.P., Wigley, W.C., Thomas, P.J. und DeMartino, G.N. (2000) Activity und regulation of the centrosome-associated proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 409-413.
- Falk, L.A. und Vogel, S.N. (1990) Differential production of IFN-alpha/beta by CSF-1- und GM-CSF-derived macrophages. *J Leukoc Biol*, **48**, 43-49.
- Farazi, T.A., Waksman, G. und Gordon, J.I. (2001) The biology und enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem*, **276**, 39501-39504.
- Farrar, M.A. und Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma und its receptor. *Annu Rev Immunol*, **11**, 571-611.
- Feig, L.A. (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol*, **1**, E25-27.
- Feng, C.G., Collazo-Custodio, C.M., Eckhaus, M., Hieny, S., Belkaid, Y., Elkins, K., Jankovic, D., Taylor, G.A. und Sher, A. (2004) Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *J Immunol*, **172**, 1163-1168.
- Fields, S. und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fink, A.L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies und amyloid. *Fold Des*, **3**, R9-23.

- Fortun, J., Dunn, W.A., Jr., Joy, S., Li, J. und Notterpek, L. (2003) Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci*, **23**, 10672-10680.
- Foster, L.J., Weir, M.L., Lim, D.Y., Liu, Z., Trimble, W.S. und Klip, A. (2000) A functional role for VAP-33 in insulin-stimulated GLUT4 traffic. *Traffic*, **1**, 512-521.
- Frischknecht, F. und Way, M. (2001) Surfing pathogens und the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*, **11**, 30-38.
- Futter, C.E., Pearse, A., Hewlett, L.J. und Hopkins, C.R. (1996) Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature und then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*, **132**, 1011-1023.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J. und Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119-131.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E.J. und Sztul, E.S. (1999) Characterization und dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*, **146**, 1239-1254.
- Garcia-Mata, R., Gao, Y.S. und Sztul, E. (2002) Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic*, **3**, 388-396.
- Gilly, M., Damore, M.A. und Wall, R. (1996) A promoter ISRE und dual 5' YY1 motifs control IFN-gamma induction of the IRG-47 G-protein gene. *Gene*, **179**, 237-244.
- Gilly, M. und Wall, R. (1992) The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells und encodes a protein with GTP-binding motifs. *J Immunol*, **148**, 3275-3281.
- Girardin, S.E., Sansonetti, P.J. und Philpott, D.J. (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals und flies. *Trends Microbiol*, **10**, 193-199.
- Golemis, E.A. und Khazak, V. (1997) Alternative yeast two-hybrid systems. The interaction trap und interaction mating. *Methods Mol Biol*, **63**, 197-218.
- Golemis, E.B., R. (1997) Searching for Interacting Proteins with the Two-Hybrid-System III. *The Yeast Two-Hybrid System* (Bartel, P. Fields, S.), Oxford University Press.
- Goodbourn, S., Didcock, L. und Randall, R.E. (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response und virus countermeasures. *J Gen Virol*, **81**, 2341-2364.
- Gorelick, F.S. und Shugrue, C. (2001) Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*, **177**, 13-18.
- Gournier, H., Goley, E.D., Niederstrasser, H., Trinh, T. und Welch, M.D. (2001) Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure und activity. *Mol Cell*, **8**, 1041-1052.

- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M. und Kuhn, M. (1998) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, und spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun*, **66**, 5260-5267.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. und Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 und S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791-803.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P. und Grinstein, S. (1998) Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nrampl) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med*, **188**, 351-364.
- Hackstadt, T. (2000) Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic*, **1**, 93-99.
- Haj, F.G., Markova, B., Klamann, L.D., Bohmer, F.D. und Neel, B.G. (2003) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem*, **278**, 739-744.
- Haj, F.G., Verveer, P.J., Squire, A., Neel, B.G. und Bastiaens, P.I. (2002) Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science*, **295**, 1708-1711.
- Haller, O., Frese, M. und Kochs, G. (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, **17**, 220-230.
- Haller, O. und Kochs, G. (2002) Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3**, 710-717.
- Halonen, S.K., Taylor, G.A. und Weiss, L.M. (2001) Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect Immun*, **69**, 5573-5576.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanson, B. (1991) Susceptibility of *Rickettsia tsutsugamushi* Gilliam to gamma interferon in cultured mouse cells. *Infect Immun*, **59**, 4125-4133.
- Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Kimura, T., Kitagawa, M., Yokochi, T., Tan, R.S., Takasugi, T., Kadokawa, Y., Schindler, C., Schreiber, R.D., Noguchi, S. und Taniguchi, T. (1996) Regulation of IFN-alpha/beta genes: evidence for a dual function of the transcription factor complex ISGF3 in the production und action of IFN-alpha/beta. *Genes Cells*, **1**, 995-1005.
- Hardy, K.J. und Sawada, T. (1989) Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, **170**, 1021-1026.
- Harlow, E.L., D. (1988) Antibodies - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York*, Chapter 6.

- Hart, A.C., Kramer, H., Van Vactor, D.L., Jr., Paidhungat, M. und Zipursky, S.L. (1990) Induction of cell fate in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless protein is predicted to contain a large extracellular domain und seven transmembrane segments. *Genes Dev*, **4**, 1835-1847.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- Hauptmann, R. und Swetly, P. (1985) A novel class of human type I interferons. *Nucleic Acids Res*, **13**, 4739-4749.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Higgs, H.N. und Pollard, T.D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*, **70**, 649-676.
- Hirokawa, N. (1998) Kinesin und dynein superfamily proteins und the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519-526.
- Hirsch, C. und Ploegh, H.L. (2000) Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol*, **10**, 268-272.
- Hope, I.A. und Struhl, K. (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-894.
- Horisberger, M.A. (1995) Interferons, Mx genes, und resistance to influenza virus. *Am J Respir Crit Care Med*, **152**, S67-71.
- Horisberger, M.A., McMaster, G.K., Zeller, H., Wathelet, M.G., Dellis, J. und Content, J. (1990) Cloning und sequence analyses of cDNAs for interferon- und virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: functional study of the corresponding gene promoter. *J Virol*, **64**, 1171-1181.
- Horisberger, M.A., Staeheli, P. und Haller, O. (1983) Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 1910-1914.
- Hornef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M. und Normark, S. (2002) Bacterial strategies for overcoming host innate und adaptive immune responses. *Nat Immunol*, **3**, 1033-1040.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M. und Aguet, M. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, **259**, 1742-1745.
- Huijbregts, R.P., Topalof, L. und Bankaitis, V.A. (2000) Lipid metabolism und regulation of membrane trafficking. *Traffic*, **1**, 195-202.
- Hunter, T. (2000) Signaling--2000 und beyond. *Cell*, **100**, 113-127.
- Imada, K. und Leonard, W.J. (2000) The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*, **37**, 1-11.

- Infante, C., Ramos-Morales, F., Fedriani, C., Bornens, M. und Rios, R.M. (1999) GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol*, **145**, 83-98.
- Iordanov, M.S., Paranjape, J.M., Zhou, A., Wong, J., Williams, B.R., Meurs, E.F., Silverman, R.H. und Magun, B.E. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase und c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA und encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, und alternative pathways. *Mol Cell Biol*, **20**, 617-627.
- Isaacs, A. und Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**, 258-267.
- Ismail, N., Olano, J.P., Feng, H.M. und Walker, D.H. (2002) Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, **207**, 111-120.
- Israel, A. (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol*, **10**, 129-133.
- Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S. und Gros, P. (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med*, **192**, 1237-1248.
- Jacobs, B.L. und Langland, J.O. (1996) When two strands are better than one: the mediators und modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, **219**, 339-349.
- Janeway, C.a.T., P. Walport, M. Shlomchik, M. (2001) In: Immunobiology. **Vol. 5**.
- Jiang, L., Erickson, A. und Rogers, J. (2002) Multivesicular bodies: a mechanism to package lytic und storage functions in one organelle? *Trends Cell Biol*, **12**, 362-367.
- Jin, H.K., Yamashita, T., Ochiai, K., Haller, O. und Watanabe, T. (1998) Characterization und expression of the Mx1 gene in wild mouse species. *Biochem Genet*, **36**, 311-322.
- Johnston, J.A., Ward, C.L. und Kopito, R.R. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, **143**, 1883-1898.
- Kagan, J.C. und Roy, C.R. (2002) Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol*, **4**, 945-954.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G. und Emr, S.D. (2002) Receptor downregulation und multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 893-905.
- Kaufmann, S.H. (1993) Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol*, **11**, 129-163.
- Kaufmann, S.H.E. (1999) Fundamental Immunology, 4th edit. *edited by William E. Paul*, Lippcott-Raven Publishers, 1335.

- Keegan, L., Gill, G. und Ptashne, M. (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, **231**, 699-704.
- Khabar, K.S., Dhalla, M., Siddiqui, Y., Zhou, A., Al-Ahdal, M.N., Der, S.D., Silverman, R.H. und Williams, B.R. (2000) Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes. *J Interferon Cytokine Res*, **20**, 653-659.
- Kirchhausen, T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 187-198.
- Kirkegaard, K., Taylor, M.P. und Jackson, W.T. (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance und subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 301-314.
- Klamp, T. (2002) Identifizierung und Charakterisierung von VLIg-1, einer neuen Interferon-induzierten GTPase. *Universität zu Köln*, Inaugural-Dissertation.
- Kleineke, J., Duls, C. und Soling, H.D. (1979) Subcellular compartmentation of guanine nucleotides und functional relationships between the adenine und guanine nucleotide systems in isolated hepatocytes. *FEBS Lett*, **107**, 198-202.
- Klueg, K.M., Parody, T.R. und Muskavitch, M.A. (1998) Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during Drosophila development. *Mol Biol Cell*, **9**, 1709-1723.
- Kochs, G., Haener, M., Aebi, U. und Haller, O. (2002) Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem*, **277**, 14172-14176.
- Kochs, G. und Haller, O. (1999a) GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, **274**, 4370-4376.
- Kochs, G. und Haller, O. (1999b) Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2082-2086.
- Komarova, Y.A., Akhmanova, A.S., Kojima, S., Galjart, N. und Borisy, G.G. (2002) Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol*, **159**, 589-599.
- Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-430.
- Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies und protein aggregation. *Trends Cell Biol*, **10**, 524-530.
- Kraal, B., Lippmann, C. und Kleanthous, C. (1999) Translational regulation by modifications of the elongation factor Tu. *Folia Microbiol (Praha)*, **44**, 131-141.
- Kramer, H. (2002) Sorting out signals in fly endosomes. *Traffic*, **3**, 87-91.

- Kramer, H., Cagan, R.L. und Zipursky, S.L. (1991) Interaction of bride of sevenless membrane-bound ligand und the sevenless tyrosine-kinase receptor. *Nature*, **352**, 207-212.
- Kramer, H. und Phistry, M. (1996) Mutations in the Drosophila hook gene inhibit endocytosis of the boss transmembrane ligand into multivesicular bodies. *J Cell Biol*, **133**, 1205-1215.
- Kramer, H. und Phistry, M. (1999) Genetic analysis of hook, a gene required for endocytic trafficking in drosophila. *Genetics*, **151**, 675-684.
- Kreishman-Deitrick, M., Rosen, M.K. und Kreishman-Deltrick, M. (2002) Ignition of a cellular machine. *Nat Cell Biol*, **4**, E31-33.
- Kumar, A., Yang, Y.L., Flati, V., Der, S., Kadereit, S., Deb, A., Haque, J., Reis, L., Weissmann, C. und Williams, B.R. (1997) Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 und NF-kappaB. *Embo J*, **16**, 406-416.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafuse, W.P., Brown, D., Castle, L. und Zwilling, B.S. (1995) Cloning und characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages und encodes a putative GTP-binding protein. *J Leukoc Biol*, **57**, 477-483.
- Lapierre, L.A., Tuma, P.L., Navarre, J., Goldenring, J.R. und Anderson, J.M. (1999) VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population und with occludin at the tight junction. *J Cell Sci*, **112 (Pt 21)**, 3723-3732.
- Lee, H.J., Shin, S.Y., Choi, C., Lee, Y.H. und Lee, S.J. (2002) Formation und removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem*, **277**, 5411-5417.
- Lefevre, F., Guillomot, M., D'Andrea, S., Battegay, S. und La Bonnardiere, C. (1998) Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family. *Biochimie*, **80**, 779-788.
- Lelouard, H., Gatti, E., Cappello, F., Gresser, O., Camosseto, V. und Pierre, P. (2002) Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature*, **417**, 177-182.
- Lenardo, M.J., Fan, C.M., Maniatis, T. und Baltimore, D. (1989) The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell*, **57**, 287-294.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H. und Hirschberg, K. (2000) Secretory protein trafficking und organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 557-589.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1988) Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell*, **55**, 443-446.

- Ma, L., Rohatgi, R. und Kirschner, M.W. (1998) The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15362-15367.
- MacDonald, N.J., Kuhl, D., Maguire, D., Naf, D., Gallant, P., Goswamy, A., Hug, H., Bueler, H., Chaturvedi, M., de la Fuente, J. und et al. (1990) Different pathways mediate virus inducibility of the human IFN-alpha 1 und IFN-beta genes. *Cell*, **60**, 767-779.
- Machesky, L.M. und Gould, K.L. (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 117-121.
- Machesky, L.M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F.J., Grogan, A., Totty, N.F., Burlingame, A.L., Hsuan, J.J. und Segal, A.W. (1997) Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion und is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J*, **328** (Pt 1), 105-112.
- MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K. und Nathan, C.F. (1997) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5243-5248.
- MacMicking, J.D., Taylor, G.A. und McKinney, J.D. (2003) Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*, **302**, 654-659.
- Martal, J.L., Chene, N.M., Huynh, L.P., L'Haridon, R.M., Reinaud, P.B., Guillomot, M.W., Charlier, M.A. und Charpigny, S.Y. (1998) IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal und cross-species therapeutic potentialities. *Biochimie*, **80**, 755-777.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. und Yoon, Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci*, **25**, 115-120.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B. und Gorvel, J.P. (1999a) The rab7 GTPase controls the maturation of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *Embo J*, **18**, 4394-4403.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B. und Gorvel, J.P. (1999b) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life und death. *Nat Cell Biol*, **1**, E183-188.
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R. und Hovanessian, A.G. (1990) Molecular cloning und characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*, **62**, 379-390.
- Meyerdierks, A., Denecke, B., Rohde, M., Taparowsky, E.J. und Bottger, E.C. (1999) A cytoplasmic structure resembling large protein aggregates induced by interferons. *J Histochem Cytochem*, **47**, 169-182.
- Micouin, A., Wietzerbin, J., Steunou, V. und Martyre, M.C. (2000) p95(vav) associates with the type I interferon (IFN) receptor und contributes to the antiproliferative effect of IFN-alpha in megakaryocytic cell lines. *Oncogene*, **19**, 387-394.

- Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor, New York*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitchell, T.J., Naughton, M., Norsworthy, P., Davies, K.A., Walport, M.J. und Morley, B.J. (1996) IFN-gamma up-regulates expression of the complement components C3 und C4 by stabilization of mRNA. *J Immunol*, **156**, 4429-4434.
- Mizoguchi, T., Nakajima, K., Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Hauri, H.P., Tagaya, M. und Tani, K. (2000) Determination of functional regions of p125, a novel mammalian Sec23p-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 144-149.
- Montecucco, C. und Schiavo, G. (1993) Tetanus und botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci*, **18**, 324-327.
- Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R. und Kadowaki, M. (1996) Autophagy. *Subcell Biochem*, **27**, 93-135.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K. und Modolell, M. (1998) Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 und IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*, **187**, 2103-2108.
- Murray, H.W., Szuro-Sudol, A., Wellner, D., Oca, M.J., Granger, A.M., Libby, D.M., Rothmel, C.D. und Rubin, B.Y. (1989) Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun*, **57**, 845-849.
- Nakajima, K., Sonoda, H., Mizoguchi, T., Aoki, J., Arai, H., Nagahama, M., Tagaya, M. und Tani, K. (2002) A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125. *J Biol Chem*, **277**, 11329-11335.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. und Okamura, H. (2001) Interleukin-18 regulates both Th1 und Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, **19**, 423-474.
- Nakayama, M., Yazaki, K., Kusano, A., Nagata, K., Hanai, N. und Ishihama, A. (1993) Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly und GTP-dependent conformational change. *J Biol Chem*, **268**, 15033-15038.
- Nantais, D.E., Schwemmler, M., Stickney, J.T., Vestal, D.J. und Buss, J.E. (1996) Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J Leukoc Biol*, **60**, 423-431.
- Nathan, C. (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*, **100**, 2417-2423.
- Nathan, C. und Sporn, M. (1991) Cytokines in context. *J Cell Biol*, **113**, 981-986.
- Netzer, W.J. und Hartl, F.U. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent und -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci*, **23**, 68-73.
- Nichols, B.J. und Pelham, H.R. (1998) SNAREs und membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*, **1404**, 9-31.
- Nishimura, Y., Hayashi, M., Inada, H. und Tanaka, T. (1999) Molecular cloning und characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane

- protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 21-26.
- O'Connor, C.M. (1987) Regulation und subcellular distribution of a protein methyltransferase und its damaged aspartyl substrate sites in developing *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, **262**, 10398-10403.
- Ohteki, T., Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M. und Koyasu, S. (1999) Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med*, **189**, 1981-1986.
- Okazaki, N., Kikuno, R., Ohara, R., Inamoto, S., Hara, Y., Nagase, T., Ohara, O. und Koga, H. (2002) Prediction of the coding sequences of mouse homologues of KIAA gene: I. The complete nucleotide sequences of 100 mouse KIAA-homologous cDNAs identified by screening of terminal sequences of cDNA clones randomly sampled from size-fractionated libraries. *DNA Res*, **9**, 179-188.
- Park, C., Li, S., Cha, E. und Schindler, C. (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*, **13**, 795-804.
- Patterson, J.B., Thomis, D.C., Hans, S.L. und Samuel, C.E. (1995) Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha und gamma interferons. *Virology*, **210**, 508-511.
- Pfeffer, S.R. (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol*, **1**, E17-22.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*, **70**, 887-900.
- Pitha, P.M., Au, W.C., Lowther, W., Juang, Y.T., Schafer, S.L., Burysek, L., Hiscott, J. und Moore, P.A. (1998) Role of the interferon regulatory factors (IRFs) in virus-mediated signaling und regulation of cell growth. *Biochimie*, **80**, 651-658.
- Pitzurra, L., Adami, C., Sevilla, M., Polonelli, L., Bistoni, F. und Blasi, E. (1999) Tetanus toxin impairs accessory und secretory functions in interferon-gamma-treated murine macrophages. *Cell Immunol*, **191**, 20-25.
- Pitzurra, L., Blasi, E., Puliti, M. und Bistoni, F. (1993) Toxic effects of tetanus toxin on GG2EE macrophages: prevention of gamma interferon-mediated upregulation of lysozyme-specific mRNA levels. *Infect Immun*, **61**, 3605-3610.
- Platanias, L.C. und Fish, E.N. (1999) Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol*, **27**, 1583-1592.
- Polson, A.G., Bass, B.L. und Casey, J.L. (1996) RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature*, **380**, 454-456.
- Prada-Delgado, A., Carrasco-Marin, E., Bokoch, G.M. und Alvarez-Dominguez, C. (2001) Interferon-gamma listericidal action is mediated by novel Rab5a functions at the phagosomal environment. *J Biol Chem*, **276**, 19059-19065.
- Praefcke, G.J. und McMahon, H.T. (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation und fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 133-147.

- Ralston, E., Beushausen, S. und Ploug, T. (1994) Expression of the synaptic vesicle proteins VAMPs/synaptobrevins 1 und 2 in non-neural tissues. *J Biol Chem*, **269**, 15403-15406.
- Rebouillat, D. und Hovanessian, A.G. (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 295-308.
- Reis, L.F., Harada, H., Wolchok, J.D., Taniguchi, T. und Vilcek, J. (1992) Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta und IFN-inducible genes. *Embo J*, **11**, 185-193.
- Rich, K.A., Burkett, C. und Webster, P. (2003) Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol*, **5**, 455-468.
- Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1996) CLIPs for organelle-microtubule interactions. *trends in Cell Biolog*, **6**, 178-183.
- Robbins, J.R., Barth, A.I., Marquis, H., de Hostos, E.L., Nelson, W.J. und Theriot, J.A. (1999) *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J Cell Biol*, **146**, 1333-1350.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S. und Pollard, T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, **294**, 1679-1684.
- Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E.M., Jr. und Schreiber, R.D. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory und nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, **93**, 373-383.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. und Taniguchi, T. (1998) Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett*, **425**, 112-116.
- Scadden, A.D. und Smith, C.W. (1997) A ribonuclease specific for inosine-containing RNA: a potential role in antiviral defence? *Embo J*, **16**, 2140-2149.
- Schaible, U.E., Collins, H.L., Priem, F. und Kaufmann, S.H. (2002) Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med*, **196**, 1507-1513.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J. und Sher, A. (1997) Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*, **185**, 1261-1273.
- Schindler, C. (1999) Cytokines und JAK-STAT signaling. *Exp Cell Res*, **253**, 7-14.

- Schmid, S.L., McNiven, M.A. und De Camilli, P. (1998) Dynamin und its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 504-512.
- Schroer, T.A. (2000) Motors, clutches und brakes for membrane traffic: a commemorative review in honor of Thomas Kreis. *Traffic*, **1**, 3-10.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. und Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-774.
- Schweins, T. und Wittinghofer, A. (1994) GTP-binding proteins. Structures, interactions und relationships. *Curr Biol*, **4**, 547-550.
- Schwemmle, M., Kaspers, B., Irion, A., Staeheli, P. und Schultz, U. (1996) Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity und induction by cytokines. *J Biol Chem*, **271**, 10304-10308.
- Schwemmle, M., Richter, M.F., Herrmann, C., Nassar, N. und Staeheli, P. (1995) Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J Biol Chem*, **270**, 13518-13523.
- Schwemmle, M. und Staeheli, P. (1994) The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem*, **269**, 11299-11305.
- Sherman, M.Y. und Goldberg, A.L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, **29**, 15-32.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E. und Ihle, J.N. (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response und IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, **380**, 630-633.
- Shotland, Y., Kramer, H. und Groisman, E.A. (2003) The Salmonella SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Mol Microbiol*, **49**, 1565-1576.
- Shtrichman, R. und Samuel, C.E. (2001) The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 251-259.
- Shurety, W., Merino-Trigo, A., Brown, D., Hume, D.A. und Stow, J.L. (2000) Localization und post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *J Interferon Cytokine Res*, **20**, 427-438.
- Sibley, L.D. (2003) Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. *Traffic*, **4**, 581-586.
- Sidhu, G.S., Singh, A.K., Sundarajan, R.N., Sundar, S.V. und Maheshwari, R.K. (1999) Role of vacuolar H(+)-ATPase in interferon-induced inhibition of viral glycoprotein transport. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 1297-1303.
- Sinai, A.P. und Joiner, K.A. (1997) Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol*, **51**, 415-462.

- Skehel, P.A., Fabian-Fine, R. und Kandel, E.R. (2000) Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum und microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1101-1106.
- Skehel, P.A., Martin, K.C., Kandel, E.R. und Bartsch, D. (1995) A VAMP-binding protein from Aplysia required for neurotransmitter release. *Science*, **269**, 1580-1583.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting und fusion. *Nature*, **362**, 318-324.
- Sorace, J.M., Johnson, R.J., Howard, D.L. und Drysdale, B.E. (1995) Identification of an endotoxin und IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J Leukoc Biol*, **58**, 477-484.
- Speed, M.A., Wang, D.I. und King, J. (1996) Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat Biotechnol*, **14**, 1283-1287.
- Staeheli, P., Prochazka, M., Steigmeier, P.A. und Haller, O. (1984) Genetic control of interferon action: mouse strain distribution und inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology*, **137**, 135-142.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. und Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Steppan, S. (2000) Molecular studies of a novel cytoskeleton protein in *Xenopus laevis*. *Thesis (2000)*.
- Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorschot, V. und Schwartz, A.L. (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*, **65**, 417-427.
- Stranden, A.M., Staeheli, P. und Pavlovic, J. (1993) Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology*, **197**, 642-651.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J. und Marra, M.A. (2002)

- Generation und initial analysis of more than 15,000 full-length human und mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16899-16903.
- Strehlow, I., Lohmann-Matthes, M.L. und Decker, T. (1994) The interferon-inducible GBP1 gene: structure und mapping to human chromosome 1. *Gene*, **144**, 295-299.
- Sudhof, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-653.
- Sunio, A., Metcalf, A.B. und Kramer, H. (1999) Genetic dissection of endocytic trafficking in *Drosophila* using a horseradish peroxidase-bridge of sevenless chimera: hook is required for normal maturation of multivesicular endosomes. *Mol Biol Cell*, **10**, 847-859.
- Szabo, S.J., Jacobson, N.G., Dighe, A.S., Gubler, U. und Murphy, K.M. (1995) Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity*, **2**, 665-675.
- Tan, S.L. und Katze, M.G. (1999) The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 543-554.
- Tani, K., Mizoguchi, T., Iwamatsu, A., Hatsuzawa, K. und Tagaya, M. (1999) p125 is a novel mammalian Sec23p-interacting protein with structural similarity to phospholipid-modifying proteins. *J Biol Chem*, **274**, 20505-20512.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. und Tanaka, N. (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, **19**, 623-655.
- Taylor, G.A., Collazo, C.M., Yap, G.S., Nguyen, K., Gregorio, T.A., Taylor, L.S., Eagleson, B., Secrest, L., Southon, E.A., Reid, S.W., Tessarollo, L., Bray, M., McVicar, D.W., Komschlies, K.L., Young, H.A., Biron, C.A., Sher, A. und Vande Woude, G.F. (2000) Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 751-755.
- Taylor, G.A., Feng, C.G. und Sher, A. (2004) p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*, **4**, 100-109.
- Taylor, G.A., Jeffers, M., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. und Woude, G.F. (1996) Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J Biol Chem*, **271**, 20399-20405.
- Taylor, G.A., Stauber, R., Rulong, S., Hudson, E., Pei, V., Pavlakis, G.N., Resau, J.H. und Vande Woude, G.F. (1997) The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J Biol Chem*, **272**, 10639-10645.
- Taylor, M.W. und Feng, G.S. (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, und tryptophan catabolism. *Faseb J*, **5**, 2516-2522.

- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G. und Ihle, J.N. (1998) Stat5a und Stat5b proteins have essential und nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, **93**, 841-850.
- Terasaki, M., Chen, L.B. und Fujiwara, K. (1986) Microtubules und the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol*, **103**, 1557-1568.
- Thulasiraman, V., Yang, C.F. und Frydman, J. (1999) In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *Embo J*, **18**, 85-95.
- Thyberg, J. und Moskalewski, S. (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res*, **246**, 263-279.
- Tilney, L.G., Connelly, P.S. und Portnoy, D.A. (1990) Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **111**, 2979-2988.
- Toby, G.G. und Golemis, E.A. (2001) Using the yeast interaction trap und other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods*, **24**, 201-217.
- Tonks, N.K. und Neel, B.G. (2001) Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 182-195.
- Tran, P.B. und Miller, R.J. (1999) Aggregates in neurodegenerative disease: crowds und power? *Trends Neurosci*, **22**, 194-197.
- Tsang, A.W., Oestergaard, K., Myers, J.T. und Swanson, J.A. (2000) Altered membrane trafficking in activated bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol*, **68**, 487-494.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S.T., Taylor, D.R., Yang, T., Mircheff, A.K., Wen, Y., Gorbalenya, A.E., Hwang, S.B. und Lai, M.M. (1999) Hepatitis C virus RNA polymerase und NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology*, **263**, 30-41.
- Ullman, K.S., Northrop, J.P., Verweij, C.L. und Crabtree, G.R. (1990) Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation und immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol*, **8**, 421-452.
- Underhill, D.M. und Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, **20**, 825-852.
- Uthaiyah, R.C., Praefcke, G.J., Howard, J.C. und Herrmann, C. (2003) IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity und GTP-dependent multimerization. *J Biol Chem*, **278**, 29336-29343.
- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G. und Garotta, G. (1992) Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol*, **22**, 2403-2412.

- van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Aguet, M. und Zinkernagel, R.M. (1995a) Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta und gamma interferon receptors. *J Virol*, **69**, 4792-4796.
- van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Zinkernagel, R.M. und Aguet, M. (1995b) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev*, **148**, 5-18.
- Vazquez-Torres, A. und Fang, F.C. (2001) Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages. *Trends Microbiol*, **9**, 29-33.
- Vestal, D.J., Buss, J.E., Kelner, G.S., Maciejewski, D., Asundi, V.K. und Maki, R.A. (1996) Rat p67 GBP is induced by interferon-gamma und isoprenoid-modified in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 528-534.
- Vestal, D.J., Buss, J.E., McKercher, S.R., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kelner, G.S., Asundi, V.K. und Maki, R.A. (1998) Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J Interferon Cytokine Res*, **18**, 977-985.
- Vestal, D.J., Gorbacheva, V.Y. und Sen, G.C. (2000) Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 und MuGBP-2: implications for different functions? *J Interferon Cytokine Res*, **20**, 991-1000.
- Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299-1304.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. und Gros, P. (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, **73**, 469-485.
- Vidugiriene, J. und Menon, A.K. (1993) Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER und located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J Cell Biol*, **121**, 987-996.
- Walenta, J.H., Didier, A.J., Liu, X. und Kramer, H. (2001) The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol*, **152**, 923-934.
- Wan, J.S., Sharp, S.J., Poirier, G.M., Wagaman, P.C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.L., Galindo, J.E., Huvar, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R. und Erlander, M.G. (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol*, **14**, 1685-1691.
- Ward, T.H., Polishchuk, R.S., Caplan, S., Hirschberg, K. und Lippincott-Schwartz, J. (2001) Maintenance of Golgi structure und function depends on the integrity of ER export. *J Cell Biol*, **155**, 557-570.
- Warren, M.K. und Vogel, S.N. (1985) Opposing effects of glucocorticoids on interferon-gamma-induced murine macrophage Fc receptor und Ia antigen expression. *J Immunol*, **134**, 2462-2469.
- Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M. und Maniatis, T. (1998) Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell*, **1**, 507-518.

- Way, S.S., Borczuk, A.C., Dominitz, R. und Goldberg, M.B. (1998) An essential role for gamma interferon in innate resistance to *Shigella flexneri* infection. *Infect Immun*, **66**, 1342-1348.
- Wedegaertner, P.B. (1998) Lipid modifications und membrane targeting of G alpha. *Biol Signals Recept*, **7**, 125-135.
- Weigert, R., Silletta, M.G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E.V., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K.N., Mironov, A., Luini, A. und Corda, D. (1999) CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature*, **402**, 429-433.
- Weir, M.L., Klip, A. und Trimble, W.S. (1998) Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem J*, **333** (Pt 2), 247-251.
- Weir, M.L., Xie, H., Klip, A. und Trimble, W.S. (2001) VAP-A binds promiscuously to both v- und tSNAREs. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 616-621.
- Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J.M. und Horwich, A.L. (1996) Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell*, **84**, 481-490.
- Welch, M.D. (1999) The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol*, **9**, 423-427.
- Welch, M.D., DePace, A.H., Verma, S., Iwamatsu, A. und Mitchison, T.J. (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits und is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*, **138**, 375-384.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A. und Mitchison, T.J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex und the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, **281**, 105-108.
- Wetzel, R. (1994) Mutations und off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol*, **12**, 193-198.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. und Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, und degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893.
- Wigley, W.C., Fabunmi, R.P., Lee, M.G., Marino, C.R., Muallem, S., DeMartino, G.N. und Thomas, P.J. (1999) Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol*, **145**, 481-490.
- Williams, B.R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, **18**, 6112-6120.
- Wyles, J.P., McMaster, C.R. und Ridgway, N.D. (2002) Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **277**, 29908-29918.

- Yang, Y.L., Reis, L.F., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schafer, R., Kumar, A., Williams, B.R., Aguet, M. und Weissmann, C. (1995) Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Embo J*, **14**, 6095-6106.
- Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y.I., Iwakura, Y. und Nakanishi, K. (1997) Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3948-3953.
- Young, H.A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, **16**, 563-568.
- Zerrahn, J., Schaible, U.E., Brinkmann, V., Gühlich, U. und Kaufmann, S.H. (2002) The IFN-inducible Golgi- und endoplasmic reticulum- associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J Immunol*, **168**, 3428-3436.
- Zhang, H.M., Yuan, J., Cheung, P., Luo, H., Yanagawa, B., Chau, D., Stephan-Tozy, N., Wong, B.W., Zhang, J., Wilson, J.E., McManus, B.M. und Yang, D. (2003) Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway und inhibition of viral replication. *J Biol Chem*, **278**, 33011-33019.
- Zhao, X., Yang, Z., Qian, M. und Zhu, X. (2001) Interactions among subunits of human Arp2/3 complex: p20-Arc as the hub. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 513-517.
- Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*, **8**, 172-173.

Lebenslauf

Name: Frank Kaiser
Geburtsdatum: 17.3.1971
Geburtsort: Mannheim
Nationalität: Deutsch

Ausbildung

1977 – 1981	Besuch der Friedrich-Ebert-Grundschule Ilvesheim
1981 - 1990	Besuch des Feudenheim-Gymnasiums Mannheim
1990	Abschluss der Gymnasialen Oberstufe und Ablegen der Allgemeinen Hochschulreife
1990	Aufnahme des Biologiestudiums (Diplom) an der FU Berlin
(1991 - 1992)	Zivildienst im Zentrallabor (Serologie & Hämatologie) des Elisabeth-Krankenhaus Berlin
1994	Abschluss des Grundstudiums mit Prüfungen in den Fächern Anorganische Chemie, Organische Chemie, Allg. Biologie (Genetik), Spez. Biologie (Botanik)
1996	Ablegen der mündlichen Diplom-Prüfung in den Fächern Molekularbiologie und Biochemie, Pflanzenphysiologie und Immunologie Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin in der Abteilung von Prof. Trautner zum Thema „Austausch von isospezifischen Target Recognizing Domains (TRDs) zwischen den mono- und multispezifischen Cytosin-C5-Methyltransferasen <i>M.Bsp6I</i> und <i>M.ϕ3TI</i> “
1997	Studienabschluss als Diplom-Biologe Anstellung am Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojekts
1998	Forschungsarbeiten am Max-Delbrück-Zentrum Berlin (Prof. Pezzutto) zu dem Thema „Induktion einer T-zellspezifischen Immunantwort gegen das tumorassoziierte Antigen EpCAM als Grundlage für eine therapeutische Vakzinierung“
2000	Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin in der Abteilung für Immunologie (Prof. Kaufmann) zum Thema: “Charakterisierung von hochregulierten Genen in der angeborenen Immunantwort auf <i>Listeria monocytogenes</i> “

Wissenschaftliche Anstellungen

- 1993 Charakterisierung des Wirkungsmechanismus von Cytostatika.
Max-Delbrück-Centrum Berlin, Abteilung für Cytologie
(Prof. Schütt).
- 1995 Klonierung und Expression des HPV 16/18 Onkogens E6
und Generierung von Antikörpern.
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ),
Abteilung für angewandte Tumorstudiologie (Prof. zur Hausen)
- 1997 Konstruktion von cDNA Bibliotheken und Herstellung
von Hochdichtefiltern.
Ressourcenzentrum des Deutschen Humanen Genomprojekts
(Prof. Lehrach)

Konferenzen und Präsentationen

- Mai 1999 Kurs "Zellphysiologie dendritischer Zellen", Positano, Italien
Vortrag "*EpCAM as a target antigen for therapeutic vaccination*"
- November 2001 Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Immunologie,
Düsseldorf
Posterpräsentation: "*Functional analysis of the 47 kDa GTPase IIGP*"
- Oktober 2002 Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Immunologie,
Marburg
Vortrag: "*The 47KDa GTPase IIGP interacts with
a microtubulebinding linker protein*"
- Dezember 2002 Annual meeting of the British Society for Immunology,
Harrogate, Grossbritannien
Posterpräsentation: "*The 47 kDa GTPase IIGP interacts
with a microtubule binding linker protein*"

Jetzige Anstellung

- Seit
November 2003 Wissenschaftlicher Angestellter in der Arbeitsgruppe für
Immunregulation (Dr. Anne O'Garra) am National Institute
for Medical Research (NIMR), Mill Hill, London, Großbritannien

zum Thema: "Characterization of specific signalling pathways
controlling the induction of Interleukin-10 in macrophages and
dendritic cells"

Publikationen

Kaiser, F., Kaufmann, S.H.E., Zerrahn, J. (2003)

IIGP, a member of the IFN inducible und microbial defense mediating 47 kDa GTPase family, interacts with the microtubule binding protein hook3.

Journal of Cell Science 117: 1747-1756

Kaiser, F., Kaufmann, S.H.E., Zerrahn, J. (2004)

Schlafen 8 (Slfn8) implicated in control of lymphoid differentiation und growth interacts with a new transcription elongation factor II-S like (TCEAL) - related protein.

Eingereicht zur Publikation

Geserick, P., **Kaiser, F.**, Klemm, U., Kaufmann, S.H.E., Zerrahn, J. (2004)

Modulation of T cell development und activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif.

International Immunology 16(10):1535-48

Berlin, den 5.10.2004

Frank Kaiser

Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Berlin, den 5.10.2004

Frank Kaiser

Reprint der Publikation

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgender Fachzeitschrift publiziert:

Kaiser, F., Kaufmann, S.H.E., Zerrahn, J. (2003)

IIGP, a member of the IFN inducible und microbial defense mediating 47 kDa GTPase family, interacts with the microtubule binding protein hook3.

Journal of Cell Science 117, 1747-1756

IIGP, a member of the IFN inducible and microbial defense mediating 47 kDa GTPase family, interacts with the microtubule binding protein hook3

Frank Kaiser, Stefan H. E. Kaufmann and Jens Zerrahn*

Department of Immunology, Max-Planck-Institute for Infection Biology, Schumannstrasse 21-22, 10117 Berlin, Germany

*Author for correspondence (e-mail: zerrahn@mpiib-berlin.mpg.de)

Accepted 4 December 2003

Journal of Cell Science 117, 1747-1756 Published by The Company of Biologists 2004
doi:10.1242/jcs.01039

Summary

Innate immunity against intracellular pathogens is critically determined by an as yet unknown interferon (IFN)-inducible mechanism exerted by members of the 47 kDa GTPase family. The association of IGTP and IIGP with membranous compartments, the endoplasmic reticulum and, in addition in case of IIGP, the Golgi, implicate these GTPases in intracellular membrane trafficking or processing. We identified the cytoplasmic linker molecule hook3 as an interactor for IIGP by yeast two-hybrid screening. The physical complex between these molecules was present in lysates of IFN γ -stimulated macrophages as demonstrated by co-immunoprecipitation. Only a minor subfraction of total cellular IIGP or hook3 was co-purified, indicating that this interaction is either transient and/or involves distinct subpopulations of the

total cellular pools of these molecules. Binding of IIGP to hook3 depends on a GTP-bound conformation. Hook3 is a microtubule-binding protein which participates in the organization of the cis-Golgi compartment. Both proteins were detected in the Golgi-membrane-enriched fraction upon subcellular fractionation. Apart from the Golgi localization of both proteins, hook3 was detected in perinuclear regions in close spatial proximity to IIGP, associated with the endoplasmic reticulum. Our experiments identify hook3 as the first cooperation partner of a member of the 47 kDa GTPase protein family and indicate that hook3 links in an IFN γ -inducible fashion to cytoskeleton-based membrane trafficking.

Key words: GTPase, Innate immunity, Golgi, Microtubule

Introduction

Multiple effector mechanisms of the innate immune system are directed against pathogens present in the extracellular space. Neutralization by antibodies, complement mediated lysis, or opsonization, restrict pathogen number and spread (Janeway et al., 2001). However, successful cellular invasion and subsequent productive replication are inherent to intracellular pathogens as are multiple intracellular defense mechanisms on the side of the host cells. In this regard, the profound role of nitric oxide (Bogdan, 1997; Nathan and Shiloh, 2000), and reactive oxygen intermediates (Kaufmann, 1999; Nathan and Shiloh, 2000), iron availability (Lieu et al., 2001), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mediated tryptophan starvation (Taylor and Feng, 1991), activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) (Stark et al., 1998; Samuel, 2001) or of the 2,5-oligoadenylate synthetase/RNaseL-system (Stark et al., 1998; Samuel, 2001) in antimicrobial or antiviral defense at the cellular level are well acknowledged. These intracellular effector mechanisms are not constitutively active but rather are induced upon recognition of pathogen-specific structures or stimulation by interferons (IFN) (Boehm et al., 1997).

Among the numerous genes that are induced by IFNs are members of three protein families with GTPase activity, which participate in distinct intracellular defense mechanisms: the Mx proteins, the 65kDa guanylate-binding proteins (GBP), and the 47kDa GTPase protein family. The Mx proteins confer

resistance to a variety of RNA viruses, influenza being one of the most prominent examples (Samuel, 2001; Haller and Kochs, 2002). Antiviral activity has recently been attributed to human GBP1, a member of the 65 kDa GBP family (Anderson et al., 1999). The 47 kDa GTPase family comprises, to date, six genes, namely IGTP, TGTP, LRG-47, IRG-47, GTPI and IIGP, which are strongly induced by IFNs in hematopoietic as well as non-hematopoietic cells (Gilly and Wall, 1992; Carlow et al., 1995; Lafuse et al., 1995; Sorace et al., 1995; Taylor et al., 1996; Boehm et al., 1998; Zerrahn et al., 2002). The significance of some members of this GTPase protein family in immunity against intracellular pathogens has been revealed by analysis of knockout (KO) mouse strains. Deficiency of IGTP or LRG-47 renders mice highly susceptible to infection with *Toxoplasma gondii* during the acute phase, while IRG-47 contributes to defense during the chronic phase (Taylor et al., 2000; Collazo et al., 2001). Interestingly, LRG-47-deficient KO mice succumb to sublethal infection with *Listeria monocytogenes*, while IGTP or IRG-47 are apparently not essential to resolve this infection. In contrast, all 47 kDa GTPase-deficient KO mice display normal resistance to murine CMV (Taylor et al., 2000; Collazo et al., 2001). This differential contribution to defense against different intracellular pathogens suggests that the 47 kDa GTPases (i) perform distinct functions, (ii) exert them in a cell type-specific fashion or (iii) underlie differential regulation. So far, type I and type II IFNs seem to be the prime inducers of expression

(Gilly and Wall, 1992; Carlow et al., 1995; Lafuse et al., 1995; Sorace et al., 1995; Taylor et al., 1996; Boehm et al., 1998; Zerrahn et al., 2002). Consistent with this IIGP is only transiently expressed in the spleen during the early phase of infection with *L. monocytogenes* (Zerrahn et al., 2002). Marginal metallophilic macrophages and endothelial cells throughout the spleen strongly express IIGP. A cell type-specific aspect of the effector mechanism mediated by IGTP was recently revealed by analysis of IGTP-deficient astrocytes infected with *T. gondii* (Halonen et al., 2001). While growth of *T. gondii* is significantly inhibited in wild-type cells upon IFN γ stimulation, the pathogen multiplies almost unrestrictedly in IGTP-deficient astrocytes (Halonen et al., 2001). This is consistent with previous results, that cellular resistance of murine astrocytes is independent from nitric oxide, reactive oxygen and tryptophan metabolism, which contribute efficiently to inhibition of *T. gondii* in other cell types (Halonen and Weiss, 2000). Furthermore, IGTP function in non-hematopoietic cells is essential for immunity against *T. gondii* (Collazo et al., 2002). Conceptually, these findings suggest a cell type-specific role of IGTP or its cognates in defense against intracellular pathogens. The effector mechanism(s) mediated by these 47 kDa GTPases are apparently operative at the intracellular level. This is in line with uncompromised overt immune parameters (IL-12, NO, TNF- α , T and NK cell function) in 47 kDa GTPase-deficient KO mice upon infection (Taylor et al., 2000; Collazo et al., 2001).

However, the actual nature of the effector mechanism(s) and the molecular function(s) of these GTPases remain unknown. *T. gondii* resides permanently in and *L. monocytogenes* very rapidly transits, membranous compartments within the host cell. The 47 kDa GTPases seem to localize to intracellular membranes: IGTP is associated with the endoplasmic reticulum (ER) (Taylor et al., 1997) and for IIGP, a significant subcellular fraction localizes to the Golgi apparatus in addition (Zerrahn et al., 2002). Hence it is tempting to speculate that these GTPases participate in the modulation of intracellular membrane-dependent processes, like vesicular trafficking, vesicular cargo specification, or interactions with components of the pathogen-containing vacuolar membrane. In general, GTPases act as molecular switches that adopt either a GTP- or GDP-bound conformational state, thereby modulating downstream events by differential interactions with other effector proteins (Vetter and Wittinghofer, 2001). Elucidation of the actual molecular processes will provide deeper insights into the role of the 47 kDa GTPases in the innate immune defense against intracellular pathogens on the subcellular level.

We report here, that IIGP physically interacts with the partially Golgi-associated murine hook3 protein, a member of the recently identified family of microtubule-binding proteins (Walenta et al., 2001). The interaction of IIGP with a potential cytoplasmic linker protein, which dynamically connects defined membrane compartments to microtubules, is not only consistent with previous notions about a role of the 47 kDa GTPases in membrane-associated processes (Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002) but it also represents the first evidence that GTPase family members participate in processes underlying differential membrane trafficking. This mechanism could form the basis for the functions exerted by IIGP, which lead to defense against intracellular pathogens.

Materials and Methods

Cells, reagents and antibodies

Bone marrow-derived macrophages (BMM) from C57BL/6 mice were prepared as described elsewhere (Falk and Vogel, 1990) and used for all experiments at days 6-9. The BMM were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 20% L cell-conditioned medium, 5×10^{-5} M 2-ME, 20 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and antibiotics. BMM were stimulated overnight with 1000 U/ml recombinant murine IFN γ (Strathmann Biotech, Hannover, Germany). For microtubule depolymerization, cells were treated with 5 μ g/ml nocodazole (NZ) for 1 hour. Antibodies used were: anti-IIGP mAb 5D9 (Zerrahn et al., 2002), ER-specific anti-calnexin rabbit serum (Stressgene, Victoria, Canada), anti-Golgi 58K mAb 58K-9 (Sigma, Missouri, USA), anti- α -tubulin mAb DM1A (Sigma, Missouri, USA), anti-IGTP mAb clone 7 (Becton Dickinson, #610880), cis-Golgi-specific anti-GM130 (BD Transduction Lab., Heidelberg, Germany), rabbit anti- α -mannosidase (kindly provided by Dr A. Haas, University of Bonn, Germany) and affinity-purified rabbit anti-hook3 serum (kindly provided by Dr H. Krämer, University of Texas, USA).

Constructs

The full-length, and the deletion variants, encoding cDNAs of the 47 kDa GTPases IIGP, IGTP, GTPI, LRG-47, IRG-47 or of murine hook3 were generated by PCR using cDNA derived from IFN γ -stimulated C57BL/6 BMM and gene-specific primers including restriction sites suited for subcloning into the yeast binding domain vector pGILDA (Clontech) or activation domain vector pB42AD (Clontech), respectively. A GTPase-negative IIGP mutant was generated that was similar to a variety of described and well-characterized GTPase mutants. A serine/threonine to asparagine exchange in the last position of the P-loop sequence leads to the generation of variants that are assumed to be locked in a GDP-bound conformation (Dugan et al., 1995; Taylor et al., 1997; Feig, 1999). Accordingly, the mutant IIGP_S83N, was generated by site-specific mutation introduced by overlap extension PCR using wild-type IIGP cDNA as substrate. The overlap extension primers were 5'-TCAGGGAAGAAGACAGCTT-CATCAATACCCTGAG and 5'-ATGAAGCTGTTCTTCCCTGAT-CCCGTCTCC with the altered sequences underlined. In *E. coli* expressed recombinant IIGP_S83N protein proved to be GTPase negative in contrast to wild-type IIGP protein (data not shown). The integrity of all constructs was verified by sequencing. The following commercial control plasmids were used: pRHF1, encoding a LexA-homeodomain of bicoid fusion (OriGene, Rockville, USA), pEG202-Max, encoding a LexA-Max fusion (Origene, Rockville, USA), pLexA-Lam, encoding a LexA-lamin fusion (Clontech), pLexA-53, encoding a LexA-p53 fusion (Clontech), p42AD-T, encoding a acidic activator B42-SV40 large T antigen fusion (Clontech).

Yeast-two hybrid screen

For the yeast-two hybrid screening the Matchmaker LexA-system (Clontech, Palo Alto, USA) was used. In principle, technical procedures were performed as recommended by the manufacturer. The yeast reporter strain EGY48(p8op-lacZ), which contains the independent reporter genes *lacZ* and *LEU2* downstream of a binding sequence for LexA, was transformed with the pGilda-IIGP construct. The level of fusion protein expression, autonomous reporter gene activation, and *lexA* operator binding indicative for nuclear transport of the fusion protein were validated prior library screening as described by the manufacturer. A murine CD4⁺ T cell cDNA library constructed in the vector pJG4-5 (kindly provided by Dr V. R. Prasad, Albert Einstein College of Medicine, New York) was transformed by standard lithium acetate technique into pGILDA_IIGP harboring EGY48(p8op-lacZ) yeast. Plasmid amplification was achieved by incubation of the

cotransformants in glucose containing synthetic medium lacking histidine, uracil and tryptophan for 2 hours at 30°C. To get rid of trace amounts of glucose the double transformants were extensively washed and afterwards plated on galactose/raffinose-containing synthetic induction medium lacking histidine, leucine, tryptophan and uracil. *Leu*⁺ colonies were propagated on glucose-containing selective medium and tested for *Leu* prototrophy and *lacZ* activity by replica-plating on galactose/raffinose-containing selective medium with X-gal and BU salts (25 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaH₂PO₄, pH 7.0) for β -galactosidase activity detection. Plasmids from *Leu*⁺ β -gal⁺ colonies were isolated and transformed into *E. coli* strain KC8 to rescue the pJG4-5-derived library plasmids. The recovered plasmids were used to retransform EGY48(p8op-*lacZ*)-containing pGILDA_IIGP and the transformants were validated for interaction by plating on selective medium, monitoring growth on leucine-deficient medium and β -galactosidase activity. The cDNA inserts from specific clones confirming the *Leu*⁺ β -gal⁺ phenotype upon re-analysis, were sequenced. Subsequent control experiments, for analysis of the specificity of interaction in yeast, as well as further analytical experiments were performed accordingly. All pGILDA-, pJG4-5- or pB42AD-based constructs were controlled to drive expression of the respective fusion proteins in yeast EGY48 by western blot analysis using either an anti-LexA or an anti-HA mAb (Clontech, Palo Alto, USA). β -Galactosidase activities, reflecting strength of the interactions, were determined by a liquid culture assays using ONPG (ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) as substrate as recommended by the manufacturer (Clontech yeast protocol handbook). Briefly, 5 ml galactose/raffinose-containing induction medium lacking histidine, tryptophan and uracil were inoculated to an OD₆₀₀=0.3-0.5 with individual cotransformants which were grown on plates with glucose-containing selective medium lacking histidine, tryptophan and uracil. After incubation for 5 hours at 30°C with shaking, suspensions in mid-log phase were normalized to OD₆₀₀=0.5 and 1 ml aliquots were assayed at 30°C in triplicate. β -galactosidase activity was expressed in Miller Units (Miller, 1972) and assays were repeated twice.

Immunoprecipitation

IFN γ -stimulated and non-stimulated BMM were dislodged from Petri dishes by incubation in cold PBS with 0.5 mM EDTA. The cells were washed twice with ice-cold PBS and after centrifugation the cell pellets were resuspended in lysis buffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 10 mM CHAPS and protease inhibitors). After incubation on ice for 30 minutes the insoluble material was pelleted by centrifugation at 16,000 *g* for 30 minutes at 4°C. The purified lysates were divided into the number of aliquots (0.8 ml/aliquot) needed. The lysates were pre-cleared by incubation with either 10 μ g irrelevant murine IgG1 κ antibody or rabbit pre-immune serum and 100 μ l protein-G Sepharose (Pharmacia, Uppsalla, Sweden) for 30 minutes at 4°C. After centrifugation, individual lysates were left on ice or incubated for 30 minutes at 32°C with 1 mM (f.c.) GTP- γ -S or GDP- β -S (Sigma, Missouri, USA) prior to specific immunoprecipitation. Subsequently, murine hook3 or IIGP proteins were immunoprecipitated from the pre-cleared lysates by addition of 10 μ g anti-IIGP mAb 5D9 or affinity purified rabbit anti-hook3 serum, respectively, and 100 μ l protein-G Sepharose slurry. After incubation for 1 hour at 4°C the beads were pelleted and washed five times with lysis buffer and once with PBS. Immune complexes were eluted with 0.5 ml 6.25 mM Tris-HCl, pH 6.8, SDS, 5% 2-ME at 37°C for 45 minutes. Subsequently, the eluates were lyophilized, resuspended in H₂O containing 10% glycerol, 5% 2-ME, and boiled. SDS-PAGE and western blot analysis were performed according to standard protocols (Harlow and Lane, 1988) and the blots were developed with ECL-western blot detection reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Microscopy

IFN γ -activated BMM were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in

PBS for 15 minutes, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes, and blocked with 10% goat serum, 20 μ g/ml anti-Fc receptor mAb 2.4G2, 1% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS for 30 minutes. The cells were then incubated for 30 minutes with anti-IIGP mAb 5D9 and rabbit anti-hook3 serum in blocking solution. Subsequently, the cells were incubated with Cy2-conjugated goat anti-rabbit IgG/IgM or Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG/IgM (Dianova, Hamburg, Germany). Between these individual steps the cell were extensively washed with 0.05% Tween 20 in PBS. After mounting in mowiol, the cells were analyzed with a Leica TCS-SP confocal laser scanner (Leica, Deerfield, USA) equipped with a DMIRB microscope (Leica). Individual scans were analyzed using the TCS-NT software and Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, USA).

Subcellular fractionation

A post-nuclear supernatant was prepared from BMM stimulated overnight with 1000 U IFN γ /ml. The harvested cells were washed twice with ice-cold PBS. Upon centrifugation the cell pellet was gently resuspended in 30 ml hypotonic buffer (10 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM MgCl₂), centrifuged (450 *g*, 4°C, 5 minutes), and the cells were gently resuspended in 2 ml ice-cold hypotonic buffer with 1:100 aprotinin (Sigma, #A-6279, Missouri, USA), 50 μ g/ml leupeptin, and 1 mM PMSF and incubated for 5 minutes on ice. Cells were lysed by 15-20 strokes with a tight-fitting Dounce homogenizer until approximately 90% of the cells were broken. A previously described modified fractionation protocol was applied, suited for enrichment of soluble cytosolic, plasma, Golgi and ER membrane protein fractions (Vidugiriene and Menon, 1993). The lysate was cleared by centrifugation at 1000 *g* for 5 minutes at 4°C and the post-nuclear supernatant was adjusted to 8.5% sucrose followed by centrifugation at 10,000 *g* for 15 minutes at 4°C. The resulting supernatant was layered on a sucrose step gradient of 20%, 30% and 38% sucrose solution layers. The sucrose solutions contained 10 mM Hepes, pH 7.5, and 1 mM MgCl₂. Subcellular fractionation was achieved by ultracentrifugation at 100,000 *g* for 2 hours at 4°C. Five fractions were taken: fraction I, the 8.5% sucrose layer, fraction II, the 20% sucrose layer, fraction III, the interphase between the 20% and 30% sucrose layers, fraction IV, the interphase between the 30% and 38% sucrose layers and the pellet was designated fraction V. The individual fractions were subsequently diluted with 8.5% sucrose solution and the cellular material was recovered by ultracentrifugation at 100,000 *g* for 2 hours at 4°C. The pellets were resuspended in 100 μ l hypotonic buffer and the protein content was determined with the BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Bonn; Germany). For subsequent SDS-PAGE and western blot analysis, 10 μ g total protein of each fraction were loaded per lane. The blots were probed with primary antibodies specific against IIGP, IGTP, α -tubulin, mHk3, Golgi-58K or calnexin. Secondary reagents used were either peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Germany).

Results

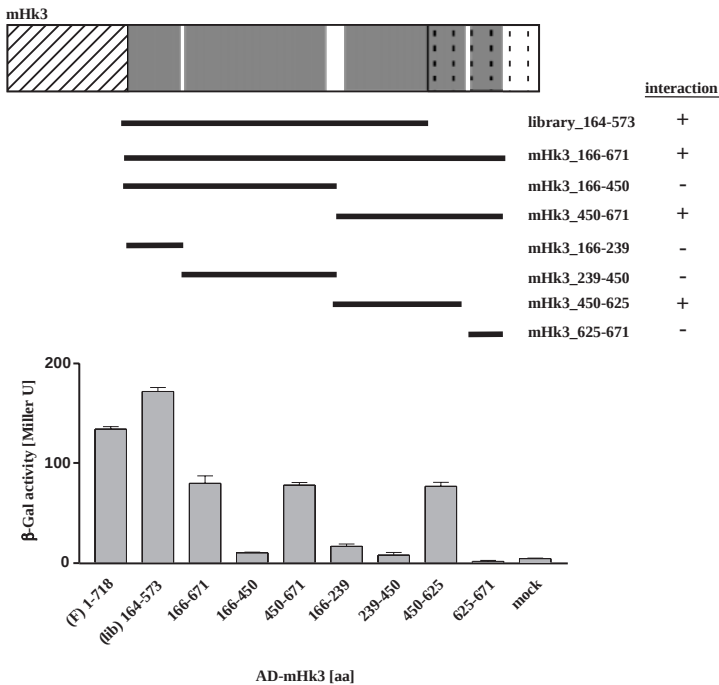
Identification of hook3 as IIGP interacting protein

In order to identify cellular proteins that interact with the 47 kDa GTPase IIGP we employed a yeast two-hybrid screen with the complete protein sequence of IIGP fused to the *lexA*-binding domain as bait and a CD4⁺ T cell-derived cDNA library as prey. After re-transformation into the yeast reporter strain and positive indication of interaction (*Leu*⁺ β -gal⁺), the screening led to the identification of a cDNA encoding a portion of the murine hook3 protein. The human homologue of hook3 (hHk3) was recently described as a constitutively expressed, microtubule-binding protein (Walenta et al., 2001). The conserved N-terminal domain is involved in binding to

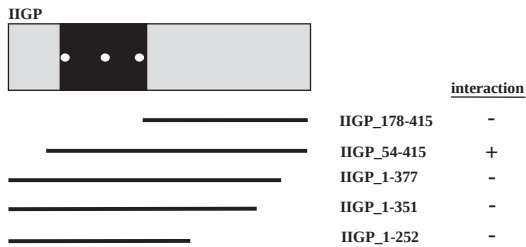
A.

BD	AD	-Leu/lacZ	BD	AD	-Leu/lacZ
IIGP	mHk3	+	LRG-47	mHk3	-
IIGP_S83N	mHk3	-	IRG-47	mHk3	-
IIGP	-	-	TGTP	mHk3	-
-	mHk3	-	IGTP	mHk3	-
lamin	mHk3	-	GTPI	mHk3	-
dros.bicoid	mHk3	-			

B.



C.



microtubules. An extended coiled-coil motif characterizes the central domain of this molecule, which mediates homodimerization, while the C-terminal part of this molecule contributes to the subcellular localization. The cDNA sequence of murine hook3 (mHk3) was inferred by analysis of available EST and genomic sequence databases (NCBI; Celera) and a full-length mHk3 cDNA was cloned based on the database sequence information for further analysis (accession number AY223806). The complete hook3 protein and IIGP strongly interacted with each other (Fig. 1A,B). In contrast, prototrophic growth on induction medium lacking leucine and β -gal activity was not observed when mHk3 or IIGP were expressed alone, or mHk3 in combination with unrelated control bait proteins, such as lamin C, *Drosophila* Bicoid, p53 or Max (Fig. 1A). In analogy to other well-characterized point mutations, locking small GTPases such as p21 ras, rab proteins or IGTP into an

Fig. 1. Yeast two-hybrid interaction between IIGP and mHk3. A, The interaction between IIGP, the GTPase negative mutant IIGP_S83N, controls (lamin, *Drosophila* Bicoid) or the other members of the 47 kDa GTPase protein family and full-length mHk3 were analyzed by growth on selective medium lacking leucine or for *lacZ* reporter activity. A $\text{Leu}^+\beta\text{-gal}^+$ ($\text{Leu}^+\text{lacZ}^+$) phenotype is indicated by +, while – indicates no detectable reporter activity. (B) Schematic depiction of the domains in mHk3. The N-terminal region (hatched) harbors a microtubule binding domain. The four putative central coiled-coil regions are indicated (dark gray) and the C terminus (dotted) depicts the region involved in Golgi membrane association (Walenta et al., 2001). Truncated mutants of mHk3 were generated and analyzed for interaction with IIGP. β -Galactosidase activities, reflecting strength of the interactions, were determined by a liquid culture assay and values are given in Miller Units. (C) Schematic depiction of IIGP with the localization of the guanylate-binding domain (black) indicated. Deletion variants of IIGP were tested for interaction with full-length mHk3 by growth on selective medium lacking leucine or for *lacZ* reporter activity. All analytical experiments were repeated twice with almost identical results.

inactive GDP-bound conformation (Dugan et al., 1995; Taylor et al., 1997; Feig, 1999), a serine₈₃ to asparagine exchange was introduced into the (phosphate-binding) P-loop of IIGP. Analysis of the LexA-IIGP_S83N fusion revealed that this subtle point mutation in the first of the three characteristic elements of GTP-binding proteins abrogated detectable interactions between IIGP and mHk3 (Fig. 1A). Thus, IIGP interacted in a conformation-dependent fashion with mHk3, most likely when present in a GTP-bound conformation. Furthermore, analysis of the other 47 kDa GTPase family members for interaction with the hook3 protein revealed their inability to bind to mHk3 (Fig. 1A) demonstrating the specificity of the interaction between mHk3 and IIGP.

Next, we tried to define more precisely the regions of mHk3 and IIGP involved in binding. The library-derived cDNA of mHk3 encodes most of the central part of the molecule including the first three out of four putative coiled-coil domains. Therefore, various deletion variants of mHk3, representing the individual or consecutive putative coiled-coil domains were tested for interaction with IIGP. Fusions harboring the third putative coiled-coil domain revealed significant interactions (aa 450-625), while all other variants remained negative (Fig. 1B). This result points to the third putative coiled-coil domain of mHk3 as an integral part of the interface that mediates binding to IIGP. Conversely, we analyzed terminal deletion variants of IIGP, because the presence of functional modules distinct from the conserved

guanylate-binding region within IIGP have not been revealed so far. Deletion of the first 53 aa of IIGP had no effect. This indicates that the N-terminal portion of the protein preceding the actual GTPase domain is irrelevant for mHk3 binding (Fig. 1C). In contrast, increasing deletions of the C-terminal regions of IIGP, including one comprising as few as the last 38 aa, completely abrogated the interaction with mHk3. However, the complete region distal to the guanylate-binding domain failed to associate with mHk3, demonstrating that the last 38 aa of IIGP are not involved in mHk3 binding. Based on these results we assume that conformation-dependent binding of IIGP to mHk3 requires integrity of the complete GTPase protein, with the exception of its N-terminal 53 aa. Taken together, yeast-two hybrid analysis provides strong evidence that the 47 kDa GTPase IIGP interacts in a specific and conformation-dependent fashion with the central region of mHk3.

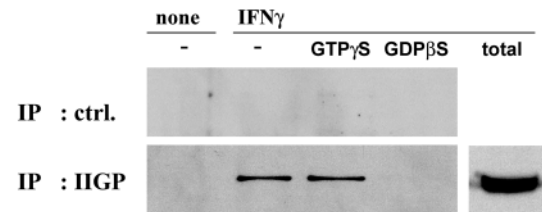
Interaction between mHk3 and IIGP in vivo

To verify that the interaction identified in yeast reflects association between IIGP and mHk3 in vivo, we performed co-immunoprecipitations to determine whether a physical complex of endogenous IIGP and mHk3 is detectable in lysates of IFN γ activated BMM. Western blot analysis revealed the presence of mHk3 in immunoprecipitates from IFN γ -activated BMM using the anti-IIGP mAb 5D9 (Fig. 2). In contrast, the constitutively expressed mHk3 was not detectable in immunoprecipitates from unstimulated BMM indicating that the protein was not unspecifically pulled down in lysates from IFN γ -stimulated cells. Likewise, neither IIGP nor mHk3 were detected upon pre-clearing of the lysates with irrelevant, but isotype matched antibodies prior to specific immunoprecipitation (Fig. 2A,B). Reciprocal analysis confirmed the physical in vivo interaction between IIGP and mHk3 in IFN γ -activated BMM (Fig. 2B). The GTPase was co-purified employing a polyclonal rabbit antiserum against mHk3. In comparison to the total amount of IIGP or mHk3 present in the lysates, in both cases only a minor fraction was recovered in complexed form.

Our interaction analysis in yeast provided evidence that IIGP binds to mHk3 in a conformation-dependent fashion. Binding of the non-hydrolysable analogs GTP- γ -S or GDP- β -S locks GTPases in distinct conformational states. Frequently, adopting either a GTP-bound or GDP-bound conformation correlates with different functional properties. Therefore, we assessed the influence of either GTP- γ -S or GDP- β -S on the interaction between IIGP and mHk3. Prior to specific immunoprecipitation, an excess of either non-hydrolysable analog was added to the lysates followed by incubation at 32°C. Addition of GDP- β -S induced complete dissociation of the complex composed of mHk3 and IIGP (Fig. 2A). In contrast, a comparable amount of mHk3 complexed to IIGP, as revealed in untreated lysates, was detected upon addition of GTP- γ -S (Fig. 2A). Hence a fraction of IIGP associated with mHk3 in IFN γ -stimulated cells. The dissociation of the complex induced in the presence of GDP- β -S suggests, that the interaction of IIGP with mHk3 is conformation dependent. This finding is consistent with our initial observation that the GTPase negative IIGP_S83N mutant did not interact with mHk3 in the yeast-two hybrid analysis.

A.

WB: Hk3



B.

WB: IIGP

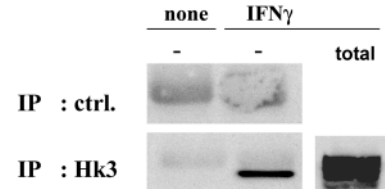


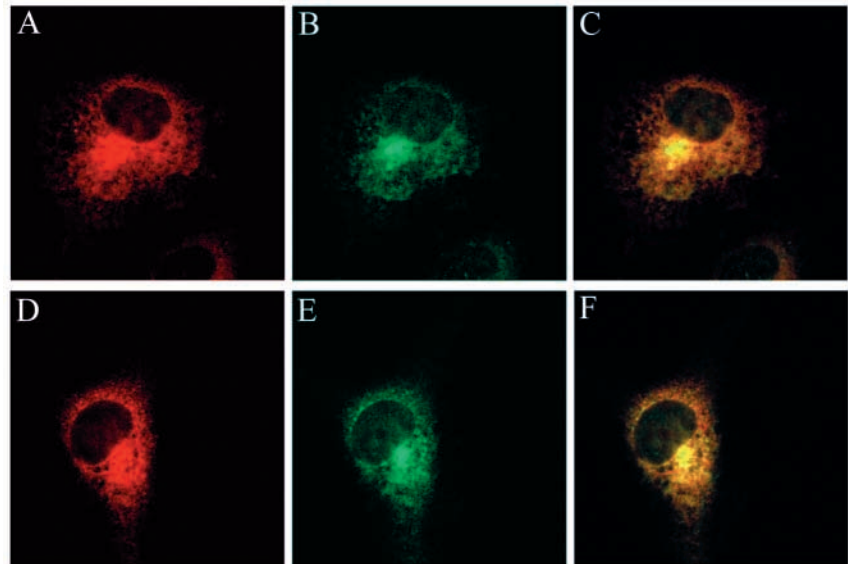
Fig. 2. Physical interaction of endogenous IIGP and mHk3.

Immunoprecipitation of endogenous IIGP or mHk3 from lysates of IFN γ -stimulated or non-stimulated BMM. (A) The lysates were pre-cleared by immunoprecipitation with isotype matched control mAbs. Subsequently, IIGP was immunoprecipitated with the anti-IIGP mAb 5D9 either prior or after incubation for 30 min at 32°C with addition of GTP γ -S or GDP β -S. Purified proteins were subjected to SDS-PAGE and western blotting. Co-immunoprecipitated mHk3 was revealed with an affinity-purified rabbit anti-hook3 serum. (B) The lysates were pre-cleared by use of a non-immune rabbit serum and mHk3 was subsequently purified from lysates of BMM stimulated with IFN γ or not. IIGP was revealed on western blots using the anti-IIGP mAb 5D9. To determine the total amount of IIGP (B) or mHk3 (A) recovered by specific immunoprecipitation, 1/5 of the samples that were probed for co-purification were analyzed in parallel by western blotting with the respective antibodies.

Subcellular localization

We have previously shown that IIGP localizes to the ER of IFN γ -stimulated cells (Zerrahn et al., 2002). In addition, a significant subcellular fraction is associated with the Golgi. The typical subcellular distribution of IIGP in IFN γ -activated BMM analyzed by two-color confocal microscopy is shown in Fig. 3A,D, revealing the reticulate distribution of IIGP throughout the cell reflecting its association with the ER. Colocalization of IIGP with the Golgi resident protein α -mannosidase is evident in the perinuclear region (Fig. 4A-C). A markedly defined accumulation of mHk3 in the same area is apparent (Fig. 3B,C,E,F), which is reminiscent of the position of the microtubule organizing center (MTOC) and the Golgi (Fig. 4D-F). Furthermore, mHk3 was detected proximal to this accumulation and in perinuclear regions in a fine reticulate to vesicular pattern. Identical distribution and staining intensity of mHk3 was observed in BMM not stimulated with IFN γ (data not shown), indicating that neither the expression level nor its subcellular distribution overtly change upon stimulation with IFN γ . A fraction of hHk3 was found to be associated with the cis-Golgi compartment, and accumulated in a microtubule-dependent way around the MTOC after disruption of the Golgi compartment by brefeldin A (Walenta et al., 2001).

Fig. 3. Subcellular localization of IIGP and mHk3 in IFN γ -stimulated BMM. The cells were stained with the anti-IIGP mAb 5D9 revealing the typical distribution of IIGP, which associates with the ER and the Golgi (A,D). The localization of mHk3 was revealed by employing an affinity-purified rabbit anti-hook3 serum (B,E). Cy2- (mHk3) and Cy3- (IIGP) labeled secondary reagents were used. In murine BMM mHk3 strongly accumulated in a juxtanuclear region reminiscent of the position of the MTOC and Golgi. In addition, a reticulate staining for mHk3 was observed in the perinuclear region. Close spatial proximity of IIGP and mHk3, which partially colocalized, was evident in the merged images (C,F).



Furthermore, cytoplasmic vesicles of unknown identity were labeled with hHk3-specific antibodies (Walenta et al., 2001). The strong juxtanuclear accumulation of mHk3 (Fig. 3B,C,E,F) does not completely colocalize with IIGP. Rather, it seems to be distinct from the defined localization of IIGP in this confined subcellular region. However, the alignment of the reticulate and vesicular pattern of mHk3 in the perinuclear region resembles the subcellular distribution of IIGP, suggesting close spatial proximity of both proteins (Fig. 3). Upon depolymerization of microtubules by nocodazole much of the hHk3 distributes throughout the cytoplasm (Fig. 4K,L) and, as has been reported previously, is associated with the dispersed Golgi compartment (Walenta et al., 2001). In contrast, association of IIGP with the Golgi seems to depend on an intact microtubule architecture, because colocalization of IIGP with the Golgi marker α -mannosidase was abrogated by nocodazole (Fig. 4G-I). These findings suggest that the mode of Golgi association of IIGP and mHk3, is distinct and, furthermore, that IIGP recruitment to the Golgi requires integrity of the microtubule network. Alternatively, but not mutually exclusively, IIGP and mHk3 interact in the more distal perinuclear regions where the staining pattern of both proteins significantly alignment to one another. While these observations provide further evidence for an interaction between IIGP and mHk3, they are also consistent with our finding that only a minor fraction of mHk3 co-purifies in complex with IIGP.

Subcellular fractionation

IIGP, IGTP and most likely the other 47 kDa GTPase cognates associate with intracellular membranes, such as the ER and Golgi in case of IIGP (Zerrahn et al., 2002). Likewise, a fraction of hHk3 interacts with Golgi membranes and is present in association with, as yet unidentified, vesicles (Walenta et al., 2001). To gain further insights into the membrane-dependent subcellular localization of both proteins we analyzed their distribution in enriched fractions of plasma, Golgi and ER membranes prepared from IFN γ -stimulated BMM. A post-

nuclear lysate was fractionated on a 8.5, 20, 30, and 38% sucrose step gradient and individual fractions were analyzed by western blot analysis (Fig. 5). IIGP was detected in fractions II-IV, being most prominent in the fractions III and IV. The Golgi enriched fractions, namely fraction II and III, were identified with the anti-Golgi 58K mAb, detecting the Golgi-associated protein formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) (Bashour and Bloom, 1998; Gao et al., 1998). The ER-enriched fractions IV and V were revealed by detection of the ER-resident membrane protein calnexin. Enrichment of IIGP in fraction III and IV is in line with our previous finding that IIGP not only associates with ER membranes but also with the Golgi (Zerrahn et al., 2002). The mHk3 overlapped with IIGP in the dense Golgi-enriched fraction III but was also present in significant amounts in the light Golgi-enriched fraction II where only minute amounts of IIGP were found. In contrast to IIGP, the 47 kDa GTPase cognate IGTP was identified only in the ER-enriched fractions, which is consistent with a previous report (Taylor et al., 1997). Although both, IIGP and IGTP, associated with the ER, IIGP was not detected in fraction V. The reason for this differential distribution has not been further addressed, but it could reflect differential association of the respective GTPases with ER membranes, the association with ER membranes with differing properties, or the association with other non-ER dense membranes. The α -tubulin was detected in almost all fractions, being most prominent in the cytosolic/plasma membrane fraction I. While the latter most likely includes soluble cytoplasmic and/or plasma membrane associated α -tubulin, the presence in the other fractions except fraction V, indicates association with membranous compartments enriched in these fractions. Taken together, analysis of the membrane-dependent subcellular distribution of IIGP and mHk3 reveals a subpopulation of both proteins in Golgi membrane-enriched subcellular fractions.

Discussion

Our data demonstrate that IIGP, a member of the 47 kDa GTPase family, which participates in defense against

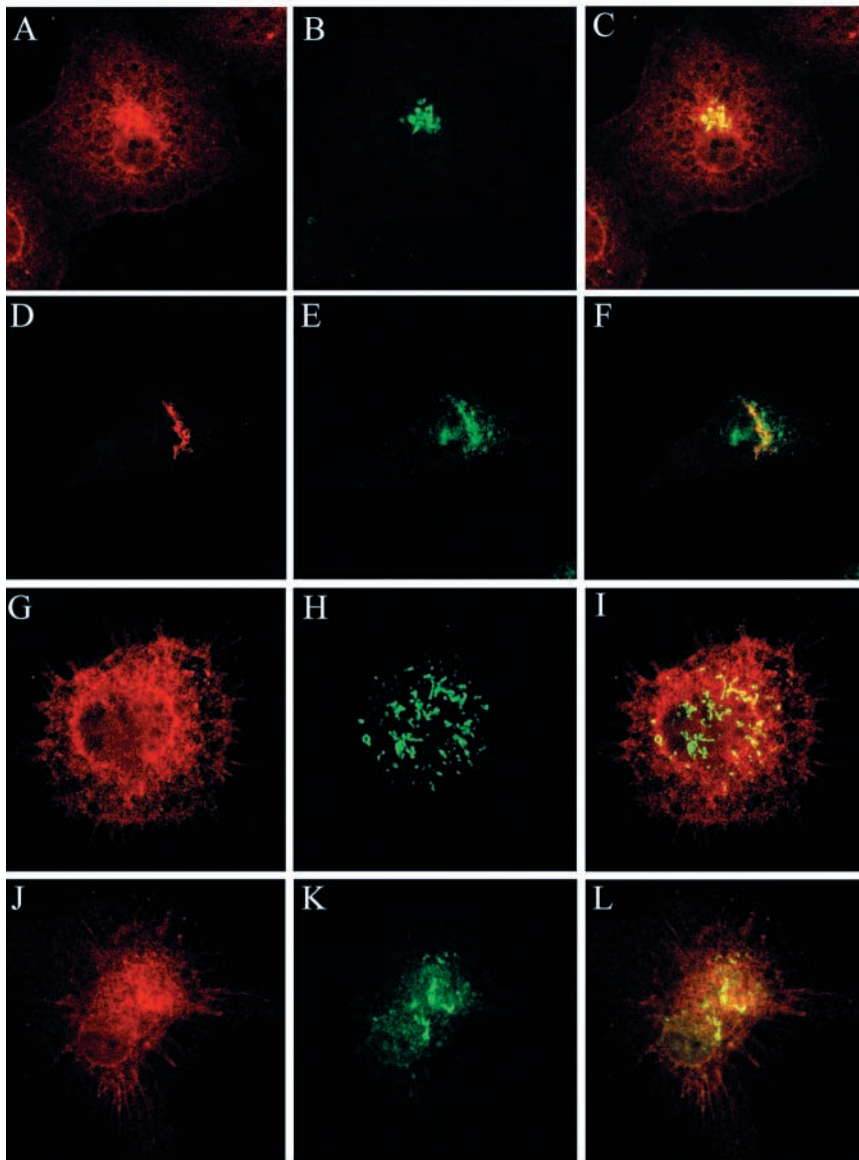


Fig. 4. Microtubule-dependent localization of IIGP to the Golgi. (A) subfraction of IIGP (A,C) localizes to the Golgi in IFN γ -stimulated murine BMM revealed by co-localization with the Golgi-resident protein α -mannosidase (B,C). Imaging specifically the juxtannuclear accumulation of mHk3 (E,F) reveals co-localization with the cis-Golgi matrix protein GM130 (D,F) as well as nearby accumulation which is reminiscent to the position of the MTOC (data not shown). The IFN γ -stimulated BMM were treated for 1 hour with nocodazole to disrupt microtubules (G-L). The fine reticulate localization of IIGP in untreated cells (A and Fig. 3), appears contracted upon nocodazole treatment, most probably reflecting the loss of the microtubule-dependent extension of the ER into the cellular periphery (G,I,J,L) (Terasaki et al., 1986). Dispersion of the α -mannosidase staining reflects the formation of Golgi-like structures at transitional ER exit sites (H,I) and colocalization with IIGP is not evident (G,I). Likewise, nocodazole treatment induces a scattered distribution of mHk3 staining (K,L).

intracellular pathogens, interacts with the microtubule-binding linker protein mHk3. The association of these GTPases with intracellular membranes suggests that these molecules modulate membrane-dependent processes (Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002). The herein identified interaction between IIGP and mHk3 provides the first evidence for a participation of IIGP in intracellular trafficking which could form the molecular basis for effector mechanisms directed against intracellular pathogens.

The recently described human hook protein family comprises three members that associate differentially with compartments of the secretory and endocytic pathways. A single hook protein (dHK) is expressed in *Drosophila*. Localized to endosomes, dHK participates in the formation or maturation of multivesicular bodies (MVB) (Kramer and Phistry, 1996), and loss of function results in a marked reduction in the number of these intermediate compartments within the endosomal pathway (Sunio et al., 1999). It has been proposed that hook proteins in general participate in proper assembly and/or positioning of membranous compartments,

the cis-Golgi in the case of hHk3, and consequently contribute to the ordered dynamic formation, maturation and trafficking of these entities (Walenta et al., 2001). A common feature of all human hook proteins is the presence of an amino-terminal microtubule binding domain. The carboxy-terminal region of hHk3 confers association with Golgi membranes (Walenta et al., 2001), suggesting that hHk3 tethers endomembranes to microtubules. In accordance with these analyses, we observed a strong juxtannuclear accumulation of mHk3 and partial localization with the Golgi. In close proximity to the Golgi, the distinct accumulation of mHk3 reflects an association around the MTOC (data not shown). A subfraction of IIGP is also associated with the Golgi (Zerrahn et al., 2002). Therefore, it is conceivable that the physiologically relevant interaction between IIGP and mHk3 takes place at the Golgi. This notion is consistent with the distribution of both IIGP and mHk3 in the Golgi enriched fractions upon fractionation of subcellular membranes. In terms of the dynamics underlying the continuous formation and organization of the Golgi (Allan, 1996; Thyberg and Moskalewski, 1999), we assume that binding of IIGP to mHk3 is transient rather than permanent. An alternative, not mutually exclusive, hypothesis is based on our observation that mHk3 also localizes in the perinuclear region in a fine reticulate and/or punctuate pattern. Recent reports indicate profound interactions between the ER and endocytic or phagosomal compartments (Haj et al., 2002; Gagnon et al., 2002). Furthermore, the ER resides in close contact with the microtubule cytoskeleton and its extension into the cellular periphery is microtubule dependent (Terasaki et al., 1986; Allan, 1996). Since small vesicles of unknown identity have been stained with antibodies against hHk3 (Walenta et al.,

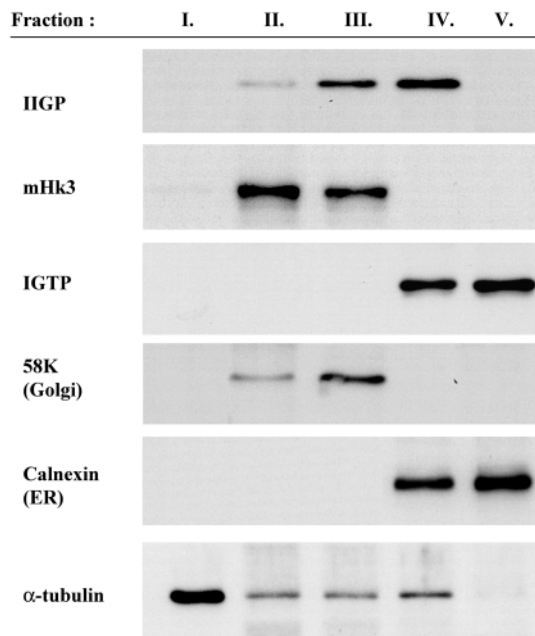


Fig. 5. Subcellular fractionation of IFN γ -stimulated BMM. Membrane enriched fractions from post-nuclear supernatants of IFN γ -stimulated BMM were prepared by separation on a sucrose-step gradient. Fraction I is the 8.5% and fraction II the 20% sucrose layer. The 20-30% and the 30-38% sucrose layer interphases constitute fraction III and IV, respectively. The pellet was designated as fraction V. Golgi and ER membrane-enriched fractions were identified upon SDS-PAGE and western blotting with mAbs against Golgi-associated FTCD and the ER resident protein calnexin. The differential distributions of IIGP, IGTP, mHk3, and α -tubulin were analyzed with specific antibodies as described in Materials and Methods.

2001), the question arises whether these mHk3-associated vesicles, potentially tethered to microtubules, contact the ER-associated IIGP. This would be consistent with the close spatial proximity of these proteins in perinuclear, cytoplasmic regions as revealed by microscopic analysis. Future studies are being directed to unraveling this issue in more detail.

Analysis of the primary amino acid sequence of IIGP and also of the other cognates does not provide valid information about the presence of distinct functional domains besides the guanylate binding domain. Our attempts to define more precisely the region of IIGP that is involved in binding to mHk3 revealed that the amino-terminal region preceding the guanylate binding domain is dispensable. Any other deletion abrogated interaction with mHk3 in yeast. Apparently, binding of IIGP to mHk3 depends on a specific conformation which seems to require integrity of the protein. Commonly, relaying of an effector function by GTPases goes along with conformational changes mediated by binding of GTP and subsequent hydrolysis (Vetter and Wittinghofer, 2001). The introduction of a subtle point mutation (S83N) in the guanylate binding domain of IIGP rendered the GTPase inactive and most likely induced conformational alterations. Consequently, the binding potential of the IIGP S83N mutant to mHk3 was abrogated in yeast, which is in accordance with the common scheme of GTPase functionality (Vetter and Wittinghofer,

2001). Likewise, mHk3 did not co-immunoprecipitate with IIGP if non-hydrolysable GDP- β -S was added. We assume that the interaction of IIGP with mHk3 requires a specific conformational state of the GTPase. Interestingly, the other members of the 47 kDa GTPase protein family failed to interact with mHk3. This not only emphasizes specificity of the interaction between IIGP and mHk3, but also provides further evidence that these GTPases mediate distinct effector functions.

The mHk3 protein is constitutively expressed and neither its expression level nor its subcellular location are significantly altered upon IFN γ stimulation. We conclude that mHk3 constitutes a basic element of the endomembrane trafficking pathways and/or the organization of the Golgi complex. However, a mere architectural function of mHk3 is unlikely, because the Golgi is a dynamic, steady-state system (Lippincott-Schwartz et al., 2000; Ward et al., 2001). One consequence of IFN γ encounter for the cell is to establish a common intracellular defense mode by inducing effector mechanisms that restrict intracellular pathogen replication. These IFN-induced mechanisms are in part reflected by profound changes in the dynamics and functional properties of distinct intracellular vesicles (Sidhu et al., 1999; Alvarez-Dominguez and Stahl, 1998; Tsang et al., 2000; Shurety et al., 2000). For example, the IFN γ -regulated GTPase Rab5a causes remodeling of the phagosomal environment, resulting in listericidal activity (Prada-Delgado et al., 2001). In analogy, IIGP could modulate processes of vesicular trafficking in which mHk3 is involved. IIGP need not regulate mHk3 function itself, but alternatively could be recruited by mHk3 to initiate antimicrobial effector mechanism at specific sites. The function of constitutively expressed small GTPases is often tightly regulated by an interplay between GTPase-activating proteins (GAPs) and GTP-exchange factors (GEFs) (Vetter and Wittinghofer, 2001). In contrast, functions of IIGP and its cognates could be primarily regulated at the transcriptional level by mere IFN stimulation. Subsequent interactions with cellular target molecules, such as mHk3, could promote expression of effector functions by IIGP. However, the exact functional significance of hHk3 for ordered vesicular trafficking or Golgi organization is not fully understood yet. Treatment of cells with brefeldin A induces disruption of the Golgi complex and redistribution of Golgi resident membrane proteins back to the ER (Dinter and Berger, 1998). Under these conditions hHk3 remains mainly localized in a juxtanuclear accumulation close to the MTOC (Walenta et al., 2001). In contrast, disruption of microtubules by nocodazole induces Golgi fragmentation and formation of scattered Golgi-like structures in close proximity to transitional ER exit sites (Dinter and Berger, 1998). In nocodazole-treated cells most of hHk3 is recruited to these Golgi fragments (Walenta et al., 2001). We observed an analogous dispersion of mHk3 staining in IFN γ -stimulated and nocodazole-treated BMM. In contrast to mHk3, we found that the association of IIGP to the Golgi depends on microtubule integrity. Apparently, IIGP association with mHk3 at the Golgi requires an intact microtubule network. The reason for this is unknown, but interactions between these proteins may depend on microtubule-dependent recruitment of IIGP to the Golgi. Our analysis provides no evidence for colocalization of IIGP with markers of the ER-to-Golgi intermediate compartment (data not shown). Hence, a conventional ER-Golgi transport of IIGP

along the secretory pathway seems unlikely. The way IIGP is being recruited to the Golgi as well as the nature of its association with the ER remains to be addressed.

Identification of mHk3 as the first interaction partner for a 47 kDa GTPase strongly emphasizes involvement in IFN-stimulated modulation of intracellular trafficking processes. Intracellular pathogens either pass through phagosomal/endosomal compartments for cytoplasmic replication or reside in specifically modified vacuoles. Whilst providing protection against lysosomal degradation, provision of nutrients for the pathogen in these vacuoles need to be ensured (Sinai and Joiner, 1997). Close association of cellular organelles with the membrane of the pathogen-containing vacuoles or intersection of cellular transport pathways are likely mechanisms employed by intracellular pathogens (Hackstadt, 2000; Dorn et al., 2002; Kagan and Roy, 2002). Interfaces between the host cell and the intracellular pathogen are well suited targets for host protection induced by IFNs. The association of IIGP with mHk3 suggests that the antimicrobial effector mechanisms are exerted in the context of modulation of intracellular trafficking by IFN. It is tempting to speculate that these alterations interfere with nutrient provision for intracellular pathogens or undermine the protective pathogen-containing niche for access of degradative pathways.

We thank Drs Helen Collins and Ulrich Schaible for helpful discussions and Sandra Leitner and Jessica Bigott for technical assistance.

References

- Allan, V. (1996). Role of motor proteins in organizing the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Cell. Dev. Biol.* **7**, 335-342.
- Alvarez-Dominguez, C. and Stahl, P. D. (1998). Interferon-gamma selectively induces Rab5a synthesis and processing in mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 33901-33904.
- Anderson, S. L., Carton, J. M., Lou, J., Xing, L. and Rubin, B. Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* **256**, 8-14.
- Bashour, A.-M. and Bloom, G. S. (1998). 58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. *J. Biol. Chem.* **273**, 19612-19617.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Fuetterer, A., Pfeffer, K. and Howard, J. C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J. Immunol.* **161**, 6715-6723.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749-795.
- Bogdan, C. (1997). Of microbes, macrophages and nitric oxide. *Behring Inst. Mitt.* **99**, 58-72.
- Carlow, D. A., Marth, J., Clark-Lewis, I. and Teh, H.-S. (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.
- Collazo, C. M., Yap, G. S., Hieny, S., Caspar, P., Feng, C. G., Taylor, G. A. and Sher, A. (2002). The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent and requires expression in both hematopoietic and nonhematopoietic cellular compartments. *Infect. Immun.* **70**, 6933-6939.
- Collazo, C. M., Yap, G. S., Sempowski, G. D., Lusby, K. C., Tessarollo, L., Vande Woude, G. F., Sher, A. and Taylor, G. A. (2001). Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* **194**, 181-188.
- Dinter, A. and Berger, E. G. (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell. Biol.* **109**, 571-590.
- Dorn, B. R., Dunn, W. A., Jr and Progulske-Fox, A. (2002). Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell. Microbiol.* **4**, 1-10.
- Dugan, J. M., deWit, C., McConlogue, L. and Maltese, W. A. (1995). The Ras-related GTP-binding protein, Rab1B, regulates early steps in exocytic transport and processing of beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 10982-10989.
- Falk, L. A. and Vogel, S. N. (1990). Differential production of IFN-alpha/beta by CSF-1- and GM-CSF-derived macrophages. *J. Leuk. Biol.* **48**, 43-49.
- Feig, L. A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* **1**, E25-E27.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. and Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119-131.
- Gao, Y.-S., Alvarez, C., Nelson, D. S. and Sztul, E. (1998). Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 33825-33834.
- Gilly, M. and Wall, R. (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.
- Hackstadt, T. (2000). Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* **1**, 93-99.
- Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G. and Bastiaens, P. I. H. (2002). Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* **295**, 1708-1711.
- Haller, O. and Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**, 710-717.
- Halonen, S. K. and Weiss, L. M. (2000). Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect. Immun.* **68**, 3426-3430.
- Halonen, S. K., Taylor, G. A. and Weiss, L. M. (2001). Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect. Immun.* **69**, 5573-5576.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies – A Laboratory Manual*. Chapter 6. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001). In *Immunobiology* Vol. 5. New York: Garland Publishing.
- Kagan, J. C. and Roy, C. R. (2002). Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 945-954.
- Kaufmann, S. H. E. (1999). In *Fundamental Immunology*, 4th edn. (ed. W. E. Paul), p.1335. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Kramer, H. and Pistray, M. (1996). Mutations in the *Drosophila* hook gene inhibit endocytosis of the boss transmembrane ligand into multivesicular bodies. *J. Cell Biol.* **133**, 1205-1215.
- Lafuse, W. P., Brown, D., Castle, L. and Zwilling, B. S. (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. Leukocyte Biol.* **57**, 477-483.
- Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. and Yang, Y. (2001). The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **22**, 1-87.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H. and Hirschberg, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**, 557-589.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nathan, C. and Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8841-8848.
- Prada-Delgado, A., Carrasco-Marin, E., Bokoch, G. M. and Alvarez-Dominguez, C. (2001). Interferon-gamma listericidal action is mediated by novel Rab5a functions at the phagosomal environment. *J. Biol. Chem.* **276**, 19059-19065.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778-809.
- Shurety, W., Merino-Trigo, A., Brown, D., Hume, D. A. and Stow, J. L. (2000). Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 427-438.
- Sidhu, G. S., Singh, A. K., Sundarajan, R. N., Sundar, S. V. and Maheshwari, R. K. (1999). Role of vacuolar H(+)-ATPase in interferon-induced inhibition of viral glycoprotein transport. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 1297-1303.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A. (1997). Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 415-462.
- Sorace, J. M., Johnson, R. J., Howard, D. L. and Drysdale, B. E. (1995). Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J. Leukocyte Biol.* **58**, 477-484.

- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R. G., Silverman, R. H. and Schreiber, R. D.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227-264.
- Sunio, A., Metcalf, A. B. and Kramer, H.** (1999). Genetic dissection of endocytic trafficking in *Drosophila* using a horseradish peroxidase-bridge of sevenless chimera: hook is required for normal maturation of multivesicular endosomes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 847-859.
- Taylor, M. W. and Feng, G. S.** (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* **5**, 2516-2522.
- Taylor, G. A., Collazo, C. M., Yap, G. S., Nguyen, K., Gregorio, T. A., Taylor, L. S., Eagleson, B., Secrest, L., Southon, E. A., Reid, S. W., Tessarollo, L., Bray, M., McVicar, D. W., Komschlies, K. L., Young, H. A., Biron, C. A., Sher, A. and Vande Woude, G. F.** (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 751-755.
- Taylor, G. A., Jeffers, M., Largaspadat, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Woude, G. F.** (1996). Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* **271**, 20399-20405.
- Taylor, G. A., Stauber, R., Rulong, S., Hudson, E., Pei, V., Pavlakis, G. N., Resau, J. H. and Vande Woude, G. F.** (1997). The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J. Biol. Chem.* **272**, 10639-10445.
- Terasaki, M., Chen, L. B. and Fujiwara, K.** (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* **103**, 1557-1568.
- Thyberg, J. and Moskalewski, S.** (1999). Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp. Cell Res.* **246**, 263-279.
- Tsang, A. W., Oestergaard, K., Myers, J. T. and Swanson, J. A.** (2000). Altered membrane trafficking in activated bone marrow-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 487-494.
- Vetter, I. R. and Wittinghofer, A.** (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304.
- Vidugiriene, J. and Menon, A. K.** (1993). Early lipid intermediates in glycosyl-phosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J. Cell Biol.* **121**, 987-996.
- Walenta, J. H., Didier, A. J., Liu, X. and Kramer, H.** (2001). The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J. Cell Biol.* **152**, 923-934.
- Ward, T. H., Polishchuk, R. S., Caplan, S., Hirschberg, K. and Lippincott-Schwartz, J.** (2001). Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* **155**, 557-570.
- Zerrahn, J., Schaible, U. E., Brinkmann, V., Gühlich, U. and Kaufmann, S. H.** (2002). The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J. Immunol.* **168**, 3428-3436.

Modifikation des MCS von pGilda und pB42AD zu „smartMCS“

		<u>EcoRI</u> (del)		<u>SfiI</u>				<u>BamHI</u>				<u>Sali</u>								<u>Sali</u> (del)					
		G	*	<u>NdeI</u>		<u>NcoI</u>		<u>XmaI/SmaI</u>						<u>EcoRI</u>		<u>XhoI</u>		<u>NotI</u>		*TC	GAC				
smartMCS_1	5′	AA	TTG	CAT	ATG	GCC	ATG	GAG	GCC	GGG	ATC	CCG	GGT	CGA	CAC	GAA	TTC	CTC	GAG	TAG	CGG	CCG	C	3′	
smartMCS_2	3′		C	GTA	TAC	CGG	TAC	CTC	CGG	CCC	TAG	GGC	CCA	GCT	GTG	CTT	AAG	GAG	CTC	ATC	GCC	GGC	GAG	CT	5′
		E	F	H	M	A	M	E	A	G	I	P	G	R	H	E	F	L	E	Stop					

- Einklonierung des DNA-Linkers in den *EcoRI* / *Sali* restringierten Vektor pGilda, bzw. in den *EcoRI* / *XhoI* restringierten Vektor pB42AD
- Allg. Klonierungsstrategie für 47 kDa GTPasen bzw. interagierender Proteine :
Ligation der mit *XhoI* restringierten PCR (Pfu-Pol)-Produkte in die *SmaI* / *XhoI* restringierte smartMCS
- nach der Einklonierung sind folgende Restriktionsschnittstellen mit anderen Expressionsvektoren kompatibel:

EcoRI: pGilda (BD), pB42AD (AD)
NdeI: pET(a)
NcoI: pET(a)
SfiI: pCMV

XhoI: ohne Stop; in pET mit C-terminalen 6xHis-tag
NotI: mit Stop

Tabelle 1: Übersicht des Y2H-Screens für IIGP

Angegeben ist jeweils die Nummer des isolierten cDNA-Inserts der Genbibliotheken aus Milzzellen (Klon # 1-34) bzw. aus CD4⁺ T-Zellen (Klon # 35-63) sowie die Genreporteraktivität nach der Kotransformation mit dem IIGP-Vollängenprotein (F), einer C-terminal verkürzten IIGP-Deletionsmutante (dC) sowie der Fusion LexA-Lam als Negativkontrolle (Lam). Als reale, spezifische Interaktionen gelten *LEU*⁺ und *lacZ*⁺ Interaktionen mit IIGP-F und gleichzeitiger Absenz von Interaktionen mit Lam. Sequenzierte Genbibliothek-Inserts sind grau unterlegt.

Die Zahlen geben denjenigen Tag nach dem Ausplattieren der Transformanden auf Festmedien an, an dem eindeutige Genreportersignale detektiert wurden. Geklammerte Zahlen verweisen auf schwer detektierbare Signale.

a (auto) = Signal entspricht einem unspezifischen Autoaktivierungspotential an Tag 4/5, das der Signalstärke der *bait/prey*-Kombination LexA-IIGP/AD42-MOCK entspricht.

Tabelle 2: Übersicht der Y2H-Screens für GTPI und IRG-47

Insgesamt 29 *LEU*⁺ Klone wurden aufgrund ihres starken *lacZ*-Signals (*lacZ*⁺ an d2) weiter analysiert. Nach Auswertung der *Hae*III-Restriktionsmuster wurden die cDNA-Inserts von 17 Klonen ansequenziert. Als Toxizitätskontrolle wurde die Interaktionsanalyse für GTPI parallel auf Festmedien mit bzw. ohne X-Gal durchgeführt. Weiter analysierte cDNA-*preys* sind grau hervorgehoben.

	<i>LEU</i>			<i>lacZ</i>			Sequenzierergebnis
Klon #	F	dC	Lam	F	dC	Lam	
1	a	-	-	a	-	-	
2	3	-	-	2	-	-	ferritin
3	a	-	-	a	3	-	
4	a	-	-	a	-	-	
5	a	-	-	a (3)	-	-	
6	a	-	-	a	-	-	
7	a	-	-	a	-	-	
8	3	-	(5)	1	3	2	false positive
9	3	-	(5)	2	-	(5)	false positive
10	a	-	-	2	-	2	
11	a	-	-	1	1	1	
12	a	-	2	3	3	3	false positive
13	a	-	3	2	2	2	false positive
14	a	-	-	3	3	-	5-aminovulnic acid synthase ALAS-E(mitoch.)
15	a	-	(5)	2	-	2	
16	a	-	-	a	-	-	
17	a	-	-	2	-	(5)	
18	a	-	(5)	3	5	5	
19	a	5	3	3	3	3	
20	a	-	-	a	-	-	
21	n.d.	-	-	n.d.	3	(5)	COP 9 subunit 4
22	n.d.	-	-	n.d.	(5)	-	
23	a	-	-	a	-	-	
24	a	-	-	2	-	-	ferritin
25	a	-	-	a	-	-	
26	a	-	-	a	-	-	
27	a	-	-	a	-	-	
28	3	-	-	3	-	-	ferritin (Frame 2)
29	3	-	-	2	-	-	ferritin (Frame 2)
30	a	-	-	3	-	3	
31	a	-	-	a	-	-	
32	2	-	2	2	-	3	
33	2	4	-	2	2	-	arc-20
34	3	n.d.	-	2	n.d.	-	ferritin
35	a	n.d.	2	a	n.d.	2	
36	3	-	-	2	-	-	L34 Galectin
37	3	-	-	2	-	-	ferritin
38	3	-	5	2	(5)	2	
39	a	-	-	3	-	5	
40	2	-	3	2	(5)	2	
41	a	-	-	3	(5)	(5)	
42	a	-	-	a	-	-	
43	n.d.	-	-	n.d.	-	-	
44	n.d.	-	-	n.d.	-	3	
45	n.d.	-	-	n.d.	-	-	
46	2	-	-	2	3	-	RIKEN cDNA
47	3	-	2	a	-	2	
48	3	-	-	3	(5)	-	Riken cDNA
49	a	-	-	3	-	5	
50	a	-	-	3	-	-	ferritin
51	3	-	3	a	(3)	3	
52	2	3	-	1	2	-	hook3
53	3	-	-	3	3	-	(junk)
54	2	3	-	1	2	-	hook3
55	<a	-	-	3	-	-	
56	3	3	-	2	2	-	KIAA 00462
57	a	3	-	5	5	-	p125
58	3	3	5	1	1	-	mitoch. Translocase
59	3	3	2	2	2	3	
60	a	-	-	a	-	-	
61	3	3	5	3	2	3	
62	a	-	-	a	-	-	
63	<a	-	-	a	3	-	??? Slow grower ???

bait	XGal plate#	repräsentiert durch Klonanzahl	Klon-Nr. (Position in Mikrotiterplatte)	Insertgröße (EcoRI / XhoI) [kb]	Identität (Blast-N / P)	kodierter Bereich (AS)
GTPI	+ 9	1	C 1.1	1,6	mouse IRG-47	23 - 420 vollständig (+UTR) EFL ... NVA - Stop
	-	1	G 2.61			
	+ 10	9	C 5.4	1,5	mouse TGTP	45 - 415 vollständig (+UTR) IEK... WEA - Stop
	-	1	G 4.64			
	- 8 5 5	1	G 1.58 A 4.96 E 10.132	1,5	mouse TGTP	40 – 415 vollständig (+UTR) KAV ... WEA – Stop
	+ 11 9	1	D 4.31 C 2.114	1,6	mouse TGTP	1 – 415 vollständig (+UTR) MAW... WEA + Stop
	-	1	G 9.71			
		1	.69	1,7	(mouse Sialyltransferase SIAT8D) PLASMIDSEGREGATION	
	+ 14	4	D 5.34	0,6	mouse cytochrome-b5 (common false positive)	34-133 (96%)
	- 8	1	F 10.55 .57			
			E 1.126			
IRG-47			A 3.93		VAP33 / VAMP-A / VAP-A vesicle associated membrane protein A	
			B 2.102		similar to ER-resident ubiquitin-like domain member 1 protein	
	- 1	3	E 6.46	0,65	mouse protein tyrosine phosphatase (PTP-1B / PTPN1)	328-432, vollständig
IRG-47		1	G 2.72 B 3.105	1,5	similar (!) to mouse TGTP (=cIGP 9)	42-258 (55%)
		4	F 12.75	1,4	Envelope protein [Porcine endogenous type C retrovirus / human CSEI / MHCII reg / complement C4/ cytochrome P450 hydroxylase	24-57 (94%)
			.76 .77	1,5	mouse novel; similar to Xenopus laevis SOJO (p170)	278-457 (90%)
		1	F 9.82	0,85	Xenopus E3 ubiquitin ligase (Greul1), zinc-finger-containing <i>Rekonstitution: false positive !?</i>	305-428 (100%)

cIGP9

[XM_137576](#). *Mus musculus* simi...[gi:38091361]

LOCUS XM_137576 1484 bp mRNA linear ROD 30-OCT-2003
DEFINITION *Mus musculus* similar to Ac2-233 (LOC215405), mRNA.
ACCESSION XM_137576
VERSION XM_137576.2 GI:38091361
KEYWORDS .
SOURCE *Mus musculus* (house mouse)
ORGANISM [Mus musculus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
COMMENT MODEL [REFSEQ](#): This record is predicted by automated computational
analysis. This record is derived from an annotated genomic sequence
([NT_039515](#)) using gene prediction method: GNOMON, supported by EST
[evidence](#).

Also see:

[Documentation](#) of NCBI's Annotation Process

On Oct 30, 2003 this sequence version replaced gi:[20883251](#).

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1484
/organism="Mus musculus"
/mol_type="mRNA"
/strain="C57BL/6J"
/db_xref="taxon:10090"
/chromosome="11"
[gene](#) 1..1484
/gene="LOC215405"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: GNOMON."
/db_xref="GeneID:[215405](#)"
/db_xref="InterimID:[215405](#)"
[CDS](#) 231..1484
/gene="LOC215405"
/codon_start=1
/product="similar to Ac2-233"
/protein_id="[XP_137576.2](#)"
/db_xref="GI:38091362"
/db_xref="GeneID:[215405](#)"
/db_xref="InterimID:[215405](#)"
/translation="MGQSSSKPDAKAHNMASSLTEFFKNFKMESKIISKETIDTSIQSC
IQEGDIQKVISIINAALTDIEKAPLNIAVTGETGAGKSTFINALRGIGHEESES
AVETTKDRKKYTHPKFPNVTIWDLPVGTNFKPEEYLLKKMKFQEYDFFLISSARFR
DNEAQLAEAIKKMKKKFYFVRTKIDSDLWNEKKAKPSSYNREKILEVIRSDCVKNLQN
ANAASTRVFLVSSFEVAQFDFPSLESTLLEELPAHKRHIFVQCLPTITEPAIDRRRDV
LKQTIWLEALKAGASATIPMMSFFNDIEEFKILSHYRACFGLDDESLENMAKEWSM
SVEELESTIKSPHLLSSEPNEVADKLVKTMEKIFAVTGGFVATGLYFRKSYMQNYF
LDTVTEDAKVLLKKKVFLQDSVDSE"
[misc feature](#) 267..713
/gene="LOC215405"
/note="COG3596; Region: Predicted GTPase [General function
prediction only]"
/db_xref="CDD:[COG3596](#)"
[misc feature](#) 285..854
/gene="LOC215405"
/note="COG1161; Region: Predicted GTPases [General
function prediction only]"
/db_xref="CDD:[COG1161](#)"
[misc feature](#) 441..785
/gene="LOC215405"
/note="Era; Region: GTPase [General function prediction
only]"
/db_xref="CDD:[COG1159](#)"

ORIGIN

```

1  aggacagggc agcagctaga gataaacctc agagctcttt atacacagca cagtctcttc
61  tgtggtagtc acacagtgca gcacacttgg acttccaagt agcaaacgcc ggtctgtaca
121 ggtctgtgtg catTTtGctgt tcctgggtgca gacggaagct cttcactgga ctcaaggctt
181 ctgccagaaa cctctttctc aaaggagctg tgtcctgtgt gccacaacc atgggtcagt
241 cttcttctaa acccgatgca aaggctcaca atatggcctc cagccttact gaattcttca
301 agaatttcaa gatggaaagc aaaatcattt ctaaggagac catcgattca attcagtcac
361 gtatccaaga aggagacatc cagaagggtga tttctataat caatgctgcc ttgacagaca
421 ttgagaaagc cccctgaac atcgtctgtga caggggagac aggggcaggg aagtccacgt
481 tcattaatgc cttcgggga ataggacatg aggaaagtga gtcagctgag agtggagcgg
541 tggagacaac caaggacagg aagaaataca ccaccctaa gttccctaata gtgaccatct
601 gggatctccc tggggttggg acaactaact tcaaaccaga agaatatctg aagaaaatga
661 agttccagga gtatgatttt ttctgatca tctcatctgc tcgctttaga gataatgaag
721 ccagctggc tgaagcaatc aaaaaaatga aaaagaagtt ctactttgtt cggaccaaaa
781 ttgacagtga tttgtggaat gagaagaaag ctaaaccag ttcctacaat agggagaaaa
841 tcctggaggt gatccgaagt gactgtgtaa agaactctga gaatgctaac gcagcctcta
901 ctcgtgtctt cttagtctca agctttgagg tagcacagtt tgattttcct agcctggagt
961 ccaccctttt ggaagagctg ccagcacaca agcgccacat cttcgtgcag tgcctcccta
1021 ccattactga gcctgctatt gatcgcagga gagatgtcct gaaacagaca atctggctgg
1081 aggtcttgaa ggctggagcg tcggccacca tccccatgat gtcattcttc aatgacgaca
1141 ttgaggaatt tgagaagatc ctgagccact acagggttg ctttgggcta gatgatgagt
1201 cgctggaaaa catggccaag gagtgggtcca tgtctgtgga ggagctggag tccaccatta
1261 agtcacccca tttgctgtca agtgagccga atgaatctgt ggcggacaag ctggtgaaaa
1321 ccattggagaa aatTTTTtGcc gtcactggcg gattcgtagc cactggcctt tacttttagaa
1381 agagttacta tatgcaaaat tattttcttg acacagtgac agaggatgct aaagttctac
1441 ttaagaaaaa agtctttttg caggacagtg tggactctga gtaa

```

//