

Lehrstuhl für Genetik der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

**Generierung und Charakterisierung einer Kinase
aktivierungsdefizienten Janus Kinase 2 - Mauslinie und
phänotypische Analyse einer PUMA-G^{-/-} Mauslinie**

Christian Josef Wufka

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Kay Heinrich Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. Klaus Dieter Pfeffer,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die Dissertation wurde am 11.05.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 24.08.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-IV
Abbildungsverzeichnis	V-VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI-XII

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	PUMA-G Einleitung	1
1.1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren / Sieben Transmembrandomänenrezeptoren.....	1
1.1.1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren im Immunsystem.....	2
1.1.1.2	PUMA-G und Liganden	3
1.1.2	Die Funktion des cAMP Spiegels im Organismus	5
1.1.2.1	Das Enzym Adenylat Cyclase	6
1.1.2.2	Die Funktion des Enzyms Protein Kinase A	7
1.1.3	Heterotrimere G-Proteine	8
1.1.4	Fettstoffwechsel.....	10
1.2	Jak2 Einleitung	11
1.2.1	Zytokin Rezeptoren und deren Liganden.....	12
1.2.1.1	Zytokine Typ I	13
1.2.1.2	Zytokine Typ II	15
1.2.2	Jak-STAT Signalweg.....	17
1.2.2.1	Jak Familie	19
1.2.2.2	STAT Familie	21
1.2.3	Hämatopoese	22
1.2.4	Infektionsmodell Vaccinia.....	25
1.3	Zielsetzung	26
1.3.1	PUMA-G	26
1.3.2	Jak2Y1007/8F.....	27
2	<i>Material und Methoden</i>	29
2.1	Bezugsquellennachweis	29
2.1.1	Chemikalien.....	29
2.1.2	Radiochemikalien	30
2.1.3	Enzyme	31
2.1.4	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	31

2.2	Geräte	32
2.3	Medien und Puffer	33
2.3.1	Stammlösungen und Puffer.....	33
2.3.2	Medien für die Bakterienkultur.....	36
2.3.3	Medien für die Zellkultur.....	36
2.4	Antibiotika und Medienzusätze	37
2.4.1	Antibiotika	37
2.4.2	X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid)	37
2.4.3	IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid).....	38
2.5	Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere	38
2.5.1	Bakterienstämme	38
2.5.2	Zellen und Zelllinien.....	39
2.5.3	Versuchstiere	39
2.6	Primer, Realtime - PCR - Sonden und Antikörper	40
2.6.1	Verwendete Primer	40
2.6.2	Realtime - Sonden.....	43
2.6.3	Verwendete Antikörper.....	44
2.7	Plasmidvektoren	45
2.7.1	Ausgangsvektoren.....	45
2.7.2	Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide.....	45
2.8	Tierversuche	45
2.8.1	Superovulation.....	45
2.8.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten.....	46
2.8.3	Generierung chimärer Mäuse.....	46
2.8.4	Organentnahme.....	47
2.8.5	Blutzuckermessung.....	47
2.8.6	Körpergewichtsbestimmung der PUMA-G Mäuse	47
2.9	Zellbiologische Methoden	47
2.9.1	E. coli Transformation	47
2.9.2	Plasmidgewinnung.....	48
2.9.3	Zellkultur	48
2.9.4	Elektroporation	50
2.9.5	FACS-Färbung und Analyse.....	51
2.9.6	Anfertigung Immun-histologischer Schnitte.....	52
2.9.7	Phagozytose Assay	52
2.9.8	Infektion von Fibroblasten mit Vaccinia Viren	53
2.10	Molekularbiologische Methoden	54

2.10.1	Isolierung chromosomaler DNS aus ES-Zellen und Schwanzbiopsien	54
2.10.2	Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe	54
2.10.3	Agarosegelelektrophorese	54
2.10.4	cDNS Synthese	55
2.10.5	Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR	56
2.10.5.1	Realtime - PCR („quantitative Echtzeit - Polymerase - Kettenreaktion“).....	57
2.10.6	Sequenzanalyse	58
2.10.7	Restriktionsverdau	58
2.10.8	Southernblot Analyse	59
2.10.9	Ligation von DNS-Molekülen	61
2.10.10	ELISA	61
2.10.10.1	Protein Kinase A (PKA) Assay	61
2.10.10.2	Zyklisches Adenosin Monophosphat ELISA	62
2.10.11	Western Blot	62
3	<i>Ergebnisse</i>	65
3.1	PUMA-G Ergebnisse	65
3.1.1	Expression von PUMA-G	65
3.1.1.1	PUMA-G Expression nach verschiedenen Stimuli	65
3.1.2	Körpergewichtsbestimmung PUMA-G defizienter Tiere	67
3.1.3	Blutzuckerbestimmung	69
3.1.4	Histologie von zwei Jahre alten Mäusen	70
3.1.5	PUMA-G Knochenmarksmakrophagen	73
3.1.6	Veränderung des cAMP-Spiegels durch Nikotinsäure	76
3.1.6.1	Protein Kinase A Assay	77
3.1.7	Ana1 Makrophagen Phagozytose	78
3.2	Jak2 Ergebnisse	84
3.2.1	Generierung einer Jak2 aktivierungsdefizienten Mauslinie	84
3.2.1.1	Herstellung der aktivierungsdefizienten Jak2 Maus-Mutante durch Punktmutationen	84
3.2.1.2	Klonierungsstrategie des Rekombinationsvektors	85
3.2.1.3	Sequenzanalyse	87
3.2.1.4	Generierung von Jak2 mutierten embryonalen Stammzellen	92
3.2.2	Generierung der Jak2 mutanten Mauslinie	97
3.2.2.1	Chimärengenerierung	97
3.2.2.2	Genomische Analyse der Jak2 mutierten Mauslinie	97
3.2.3	Phänotypanalyse	100
3.2.3.1	Embryonen Analyse	100
3.2.3.2	Jak2 Proteinanalyse aus embryonalen Fibroblasten	102
3.2.3.3	Biochemische Analysen	103
3.2.3.4	Infektion mit Vaccinia Viren	106
3.2.3.5	IFN γ responsive Transkription	109

4	<i>Diskussion</i>	113
4.1	PUMA-G Diskussion	113
4.1.1	Regulation des Fettstoffwechsels	113
4.1.2	PUMA-G ^{-/-} und intrazelluläre cAMP-Spiegel	114
4.1.3	Erweiterte Expressionsanalyse von <i>puma-g</i>	115
4.1.4	Immunologische Relevanz von PUMA-G	117
4.2	Jak2 Diskussion	119
4.2.1	Jak2 Phosphorylierungen und deren Wirkung	119
4.2.2	Datenbankanalyse des genomischen <i>jak2</i> Locus	120
4.2.3	Generierung der Jak2 aktivierungsdefizienten Mauslinie	121
4.2.4	<i>jak2</i> Expressions-Analyse	123
4.2.5	Jak2Y1007/8F Mauslinie	124
4.2.6	Jak-STAT und die zentrale Rolle in der Blutbildung	125
4.2.7	Jak-STAT und die IFN γ R-Signaltransduktion	126
4.2.8	Virale Infektion	129
5	<i>Zusammenfassung</i>	131
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	133
7	<i>Danksagung</i>	149

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1: Schematische („Snake like“) Abbildung des PUMA-G Rezeptors.....</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 1.2: Schematische Abbildung der Regulation der Adenylat Cyclase.</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 1.3: Protein Kinase A vermittelte Signaltransduktion.....</i>	<i>8</i>
<i>Abb. 1.4: Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine.</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 1.5: Schematisches Diagramm der drei Subfamilien der Klasse I Zytokin Rezeptoren.</i>	<i>14</i>
<i>Abb. 1.6: Interaktion zwischen einer Zytokinspezifischen Kette und einer Signaltransduzierenden Kette von Zytokinrezeptoren.....</i>	<i>15</i>
<i>Abb. 1.7: Signaltransduktion des Interferon TypI Rezeptors.....</i>	<i>16</i>
<i>Abb. 1.8: Drei Beispiele für den Jak STAT Signalweg.</i>	<i>18</i>
<i>Abb. 1.9: Struktur der Janus Kinasen.....</i>	<i>19</i>
<i>Abb. 1.10: Struktur der STAT Moleküle.</i>	<i>22</i>
<i>Abb. 1.11: Regulation der Hämatopoese durch Zytokine, die die Proliferation und Differenzierung von verschiedenen hämatopoetischen Zellen stimulieren.</i>	<i>24</i>
<i>Abb. 3.1: Regulation von PUMA-G in Ana1 Zellen nach IFNγ Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten.</i>	<i>65</i>
<i>Abb. 3.2: Regulation von PUMA-G in Ana1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli für 16 Stunden.</i>	<i>66</i>
<i>Abb. 3.3: Gewicht von weiblichen Tieren der Linie PUMA-G über einen Zeitraum von 50 Wochen bei normaler Ernährung.</i>	<i>67</i>
<i>Abb. 3.4: Gewicht von männlichen Tieren der Linie PUMA-G über einen Zeitraum von 50 Wochen bei normaler Ernährung.</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 3.5: Blutzuckerbestimmung in Wildtyp und PUMA-G^{-/-} Tieren nach 12 stündiger Fastenzeit.....</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 3.6: Blutzuckerbestimmung in Wildtyp und PUMA-G^{-/-} Tieren nach 12-stündiger Fastenzeit.</i>	<i>70</i>
<i>Abb. 3.7: Fotos von Neoplasien von PUMA-G^{-/-} Mäusen.....</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 3.8: H/E Färbung von infiltriertem Gewebe.</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 3.9: Immunhistochemische Schnitte von Leber.</i>	<i>72</i>
<i>Abb. 3.10: Immunhistochemischer Schnitt von neoplastischem Gewebe mit einer Immunfluoreszenz Färbung gegen CD31-PE.....</i>	<i>73</i>
<i>Abb. 3.11: Analyse von ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen nach zwölf tägiger Kultivierung in Differenzierungsmedium mit und ohne IFNγ Stimulation über 18 Stunden.....</i>	<i>74</i>
<i>Abb. 3.12: FACS Färbung der Zell-Marker CD80, CD86 und CD71 auf Ana1 Zellen nach IFNγ und Nikotinsäure Stimulation über Nacht.</i>	<i>75</i>
<i>Abb. 3.13: cAMP Spiegel in Ana1 Zellen nach IFNγ Stimulation und verschiedenen Dosen an Nikotinsäure.</i>	<i>76</i>
<i>Abb. 3.14: cAMP Spiegel in BMDMC nach IFNγ Stimulation und 200μM Nikotinsäure.</i>	<i>77</i>
<i>Abb. 3.15: PKA Aktivitätsbestimmung aus BMDMC von PUMA-G^{+/-} und PUMA-G^{-/-} Mäusen.</i>	<i>78</i>
<i>Abb. 3.16: Ana1 Monozyten/Makrophagen inkubiert mit fluoreszierenden Microspheres.</i>	<i>79</i>
<i>Abb. 3.17: Durchflusszytometrische Auswertung von Ana1 Zellen nach Stimulation mit IFNγ und Inkubation mit fluoreszierenden Microspheres.</i>	<i>80</i>
<i>Abb. 3.18: Wirkung von IFNγ auf die Phagozytoseleistung von Ana1 Zellen.</i>	<i>81</i>
<i>Abb. 3.19: Phagozytose von fluoreszierenden Listerien in Ana1 Zellen.</i>	<i>82</i>

<i>Abb. 3.20: Phagozytose von fluoreszierenden Microspheres von Knochenmarksmakrophagen.....</i>	<i>83</i>
<i>Abb. 3.21: Mutationsstrategie, die zum Aminosäureaustausch von AS 1007/8 Tyrosin zu Phenylalanin (Y1007/8F) führt.....</i>	<i>85</i>
<i>Abb. 3.22: Schematischer Überblick der ersten targeting Strategie.....</i>	<i>85</i>
<i>Abb. 3.23: Schematische Übersicht des Targetvektors mit kurzem homologem Arm, langem homologem Arm, Neomycin-Kassette und Thymidinkinase Kassette.....</i>	<i>86</i>
<i>Abb. 3.24: Schematischer Vergleich der Jak2 cDNS aus den Datenbanken von Celera und Ensembl.....</i>	<i>88</i>
<i>Abb. 3.25: Sequenzalignment der cDNS von Jak2.....</i>	<i>89</i>
<i>Abb. 3.26: Schematischer Vergleich des genomischen jak2 Locus aus den Datenbanken von Celera und Ensembl.....</i>	<i>90</i>
<i>Abb. 3.27: Schematischer Überblick der zweiten targeting Strategie.....</i>	<i>91</i>
<i>Abb. 3.28: Schematische Übersicht des zweiten Targetvektors mit kurzem homologem Arm, langem homologem Arm, Neomycin-Kassette und Thymidinkinase Kassette.....</i>	<i>91</i>
<i>Abb. 3.29: Schematische Darstellung des getargeteten Locus für die Screening PCR.....</i>	<i>92</i>
<i>Abb. 3.30: Screening von 80 gepickten Klonen.....</i>	<i>93</i>
<i>Abb. 3.31: Agarosegelbild putativ positiver Klone nach Screening PCR mit anschließendem EcoRI Verdau.....</i>	<i>94</i>
<i>Abb. 3.32: Agarosegelbild mit Screening-PCR der vereinzelt und gepickten zwölf Klone.....</i>	<i>94</i>
<i>Abb. 3.33: Agarosegelbild der Screening-PCR mit anschließendem EcoRI Verdau von vereinzelt positiven Klonen.....</i>	<i>95</i>
<i>Abb. 3.34: Übersicht über den Ziellokus von jak2.....</i>	<i>95</i>
<i>Abb. 3.35: jak2 Southern Blot der mit NcoI verdauten genomischen DNS ausgewählter PCR-positiver Klone... </i>	<i>96</i>
<i>Abb. 3.36: Neo Southern Blot der mit NcoI verdauten genomischen DNS ausgewählter positiver Klone.....</i>	<i>96</i>
<i>Abb. 3.37: Junge Mäuse im Alter von 7 bzw. 12 Tagen.....</i>	<i>97</i>
<i>Abb. 3.38: jak2 Southern Blot aus Schwanzbiopsien von N1 Nachkommen der chimären Tiere.....</i>	<i>98</i>
<i>Abb. 3.39: Typisierungs-PCR Strategie über die Mutation im Exon 21; FF-Motiv: Y1007/8F Mutation.....</i>	<i>98</i>
<i>Abb. 3.40: Agarosegelbild einer beispielhaften Typisierungs PCR.....</i>	<i>99</i>
<i>Abb. 3.41: Nachweis des genomisch funktionellen jak2 Mut Y1007/8F Allels.....</i>	<i>99</i>
<i>Abb. 3.42: Typisierungs PCR mehrerer Embryonen aus Jak2^{+m} x Jak2^{+m} Kreuzungen.....</i>	<i>100</i>
<i>Abb. 3.43: Digitalfotos von Embryonen am Tag 12,5.....</i>	<i>101</i>
<i>Abb. 3.44: Digitalfotos embryonaler Lebern (Tag 12,5) im Vergleich.....</i>	<i>102</i>
<i>Abb. 3.45: Anti-phospho Tyrosin AS694 STAT5 Western Blot fötaler Leberzellen von 12,5 Tagen alten Embryonen.....</i>	<i>104</i>
<i>Abb. 3.46: Anti-phospho Tyrosin AS701 STAT1 Western Blot.....</i>	<i>105</i>
<i>Abb. 3.47: Anti phospho Serin AS727 STAT1 Western Blot.....</i>	<i>106</i>
<i>Abb. 3.48: Wachstumskurven von Vaccinia Virus in Wildtyp, STAT^{-/-} und Jak2^{-/-} mEF.....</i>	<i>107</i>
<i>Abb. 3.49: Wachstumskurven von Vaccinia Virus in Wildtyp, Jak2^{m/-}, Jak2^{m/m} und Jak2^{-/-} mEF.....</i>	<i>108</i>
<i>Abb. 3.50: Realtime-PCR von Genen, die in Jak2Y1007/8F mutierten embryonalen Fibroblasten nach Stimulation mit IFNγ positiv reguliert werden.....</i>	<i>110</i>
<i>Abb. 3.51: Realtime-PCR von Chemokinen die über IFNγ reguliert werden können und in Jak2Y1007/8F Fibroblasten noch reguliert werden.....</i>	<i>111</i>
<i>Abb. 3.52: Realtime - PCR von durch IFNγ unregulierten Genen.....</i>	<i>112</i>

<i>Abb. 4.1: Humane, gewebespezifische Expression von GPR109A.</i>	116
<i>Abb. 4.2: Phosphorylierungsstellen der Janus Kinasen.</i>	119
<i>Abb. 4.3: Jak2 Western Blot von mEF mit und ohne Mutation Y1007/8F.</i>	123
<i>Abb. 4.4: Interferon γ induzierter Jak-STAT Signalweg.</i>	127

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2-1: Bakterienkulturmedium</i>	36
<i>Tabelle 2-2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien</i>	36
<i>Tabelle 2-3: Verwendete Antibiotika</i>	37
<i>Tabelle 2-4: X-Gal Gebrauchslösung</i>	37
<i>Tabelle 2-5: IPTG Gebrauchslösung</i>	38
<i>Tabelle 2-6: Verwendete Bakterienstämme</i>	38
<i>Tabelle 2-7: Verwendete Zellen und Zelllinien</i>	39
<i>Tabelle 2-8: Realtime - PCR - Primer</i>	40
<i>Tabelle 2-9: Screening PCR - Primer</i>	41
<i>Tabelle 2-10: Klonierungsprimer zur Erstellung der Targetvektoren</i>	41
<i>Tabelle 2-11: Primer für Southern Sonden</i>	42
<i>Tabelle 2-12: Typisierungs PCR Primer für PUMA-G^{-/-} und Jak2^{m/m}</i>	42
<i>Tabelle 2-13: Sonden für Realtime - PCR</i>	43
<i>Tabelle 2-14: Verwendete Antikörper</i>	44
<i>Tabelle 2-15: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren</i>	45
<i>Tabelle 2-16: Hergestellte Plasmide und Sonden</i>	45
<i>Tabelle 2-17: Standard PCR - Reaktionsansatz</i>	56
<i>Tabelle 2-18: Standard PCR - Bedingungen</i>	56
<i>Tabelle 2-19: Realtime - PCR - Reaktionsansatz</i>	57
<i>Tabelle 2-20: Realtime - PCR - Bedingungen</i>	57
<i>Tabelle 2-21: Standard Restriktionsverdau</i>	58
<i>Tabelle 2-22: Zusammensetzung des Lysepuffers</i>	63
<i>Tabelle 2-23: Zusammensetzung des 5 x Auftragspuffers</i>	63
<i>Tabelle 3-1: Anzahl der gewogenen PUMA-G Tiere</i>	67
<i>Tabelle 3-2: Neoplasiehäufigkeit von Tieren der Linie PUMA-G mit einem Alter von mindestens 16 Monaten</i> ..	70

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylat Cyclase
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BAC	bacterial artificial chromosome
BMDMC	bone marrow derived Macrophage cells
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
cDNS	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
CSF	"colony stimulating factors"
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FFS	freie Fettsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(n)
hCG	human chorionic gonadotropin
H/E	Hämalaun/Eosin
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
HDL	high density lipoprotein
HSV-TK	Thymidinkinase aus Herpes Simplex Virus
IDL	intermediate density lipoprotein
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactosid
JHx	Janus Kinasen homologe Domänen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
loxP	locus of X-ing over P1 phage
M	Mol
mEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNS	Boten-RNS
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
neo	Neomycin Phosphotransferase
NS	Nikotinsäure
nM	Nanomolar
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PKC	Protein Kinase C
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SPF	spezifisch Pathogen frei

<i>STAT</i>	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
<i>SSC</i>	<i>Sodiumchlorid-Sodiumcitrat-Lösung</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor Nekrose Faktor</i>
<i>VV</i>	<i>Vaccinia Virus</i>
<i>VLDL</i>	<i>very low density lipoprotein</i>
<i>v/v</i>	<i>Volumen/Volumen</i>
<i>w/v</i>	<i>Gewicht/Volumen</i>
<i>w/w</i>	<i>Gewicht/Gewicht</i>
<i>WT</i>	<i>Wildtyp</i>
<i>ÜN</i>	<i>über Nacht</i>
<i>UpM</i>	<i>Umdrehungen pro Minute</i>

1 Einleitung

1.1 PUMA-G Einleitung

Zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) ist ein zellulärer häufig genutzter sekundärer Botenstoff, der von der Adenylat Cyclase aus ATP synthetisiert werden kann. Die Regulation von intrazellulärem cAMP erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die die Adenylat Cyclase aktivieren oder inhibieren können. Die Aktivierung oder Inhibierung erfolgt über die Bindung von stimulierenden oder inhibierenden G_{α} -Untereinheiten von G-Proteinen. PUMA-G (**p**rotein **u**pregulated in **m**acrophages by Interferon γ) ist als G-Protein gekoppelter Rezeptor in der Lage, inhibitorische $G_{\alpha i}$ -Proteine zu aktivieren und somit den cAMP Spiegel intrazellulär durch Inhibition der Adenylat Cyclase negativ zu beeinflussen (Tunaru *et al.*, 2003).

1.1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren / Sieben Transmembrandomänenrezeptoren

Agrund der großen Anzahl von Rezeptoren und der zentralen physiologischen Bedeutung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) weist diese Molekülgruppe auch in der pharmazeutischen Forschung eine hohe Bedeutung auf. Innerhalb der Arten sind viele GPCR hoch konserviert und zum Teil nur in höher entwickelten Lebensformen vorhanden. Zum Beispiel sind die für die Immunabwehr wichtigen Chemokinrezeptoren nicht in *Drosophila melanogaster* vorhanden (Metpally und Sowdhamini, 2005), während sie beim Menschen eine wichtige Rolle einnehmen. Die Einteilung der Rezeptoren erfolgt anhand von gleichen Sequenz-Motiven und Strukturen. Aktuell existieren sechs verschiedene Klassen an G-Protein gekoppelten Rezeptoren (<http://www.gpcr.org/7tm/>). Die verschiedenen Klassen sind in A (Rhodopsin like), B (Secretin like), C (Metabotropic glutamate/pheromone), D (Pilz Pheromone), E (cAMP Rezeptoren (*Dictyostelium*)) und F/S (Frizzled/Smoothened Familie). Die GPCR-Rezeptoren leiten ihr Signal über G-Proteine weiter. Sie besitzen charakteristische Merkmale und Strukturen. Eine dieser typischen Strukturen, die alle Klassen gemeinsam haben, ist eine siebenmalig die Zellmembran durchspannende Domäne aus Helices, daher auch der Name sieben Transmembrandomänen Rezeptoren (7TM Rezeptoren). Diese sieben Helices sind intra- und extrazellulär durch jeweils drei Schleifen verbunden. Diese Schleifen variieren, genauso wie die extrazelluläre N'-terminale Region, in ihrer Aminosäureanzahl verglichen zu anderen Mitgliedern der Familie (Baldwin, 1993). Lange Zeit vermutete man,

dass diese Rezeptoren als Monomer ihr Signal weiterleiten. In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Gruppen allerdings mit pharmakologischen und biochemischen Methoden zeigen, dass sowohl dimere als auch oligomere Rezeptoren vorkommen (Jordan *et al.*, 2000; Marshall, 2001; George *et al.*, 2002; Kroeger *et al.*, 2003; Milligan, 2004; Terrillon und Bouvier, 2004). Eine Dimerisierung kann sowohl über eine transmembrane Domäne (Monnot *et al.*, 1996) als auch über die extrazelluläre Domäne (Romano *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 1996) erfolgen. Die Weiterleitung des extrazellulären Signals erfolgt über eine Konformationsänderung des Rezeptors nach Ligandenbindung (Ji *et al.*, 1998). Das Expressionsmuster der GPCRen ist aufgrund ihrer großen Anzahl sehr unterschiedlich. So sind manche GPCR in bestimmten Zelltypen konstitutiv exprimiert und in anderen Zelltypen erst nach Stimulation (Schaub *et al.*, 2001; Tunaru *et al.*, 2003).

1.1.1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren im Immunsystem

Makrophagen haben eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort. Nach Aktivierung phagozytieren Makrophagen vorhandene Pathogene, sezernieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Zwischenprodukte und töten somit die Erreger ab. Zusätzlich schütten sie proinflammatorische Zytokine für andere Immunzellen aus, wie $\text{IFN}\alpha$, um Zellen in einen antiviralen Status zu versetzen. Darüber hinaus sezernieren sie IL-1 für die Aktivierung von T_H Zellen und IL-6, das eine starke Antikörperantwort auslöst. Alternativ wird IL-12 produziert, welches aktivierend auf T-Zellen wirkt (Laskin und Pendino, 1995). Damit dieser positive immunmodulatorische Status der Makrophagen nicht dauerhaft zu starken Gewebeschäden führt, muss die Immunantwort einer strengen Regulation unterzogen sein. In Makrophagen ist bei vielen immunologisch negativ regulierenden Signalwegen cAMP/PKA beteiligt (Tau und Rothman, 1999; Feng und Chang, 1998). So gibt es eine Reihe von Molekülen, so genannte Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-10, welches aktive Immunzellen hemmen kann (Moore *et al.*, 2001). Der Promoter von IL-10 besitzt eine Bindestelle für das „cAMP responsive element binding protein“ (CREB). Ein erhöhter cAMP Spiegel hat über eine gesteigerte PKA Aktivität eine größere Menge des durch Phosphorylierung aktivierten Transkriptionsfaktors CREB zur Folge. Somit wird die Transkription des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erhöht und die Immunantwort negativ reguliert (Zhong *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 2002). Positiv durch cAMP sind Prostaglandine reguliert, die durch Cyclooxygenasen (cox-1/2) synthetisiert werden. Auch im

Promoterbereich von COX-2 findet sich eine CREB Bindestelle (Wadleigh et al., 2000).

Im Immunsystem spielen Chemokine eine wichtige Rolle, wobei viele Chemokine ihr Signal über GPCR vermitteln. Chemokinrezeptoren sind, wie PUMA-G, in die Klasse A der Rhodopsin like GPCR einzuordnen. Sie haben jedoch einen etwas anderen strukturellen Aufbau und sind in der Untergruppe der Peptid GPCR zu finden (<http://www.gpcr.org/7tm>). Ihre Funktion liegt in der zielgerichteten Zellmigration zum Infektionsort oder zu anderen Organen (Janeway Jr. et al., 2001). So wird das pro-inflammatorische Interleukin 8 von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert und lockt neutrophile Granulozyten und naive T-Zellen aus dem Blut ins umgebende Gewebe (Camp et al., 1990; Bacon et al., 1993; Bacon et al., 1995). Eine ähnliche Wirkung wird durch RANTES auf T-Lymphozyten erzielt (Schall et al., 1990; Turner et al., 1996). Es gibt noch eine Reihe weiterer Chemokine, die von einem breiten Spektrum an Zellen produziert und sezerniert werden und spezifisch auf Subzellpopulationen wirken können wodurch sie die Immunabwehr auf diesem Wege feiner regulieren (Janeway Jr. et al., 2001).

Inwiefern der murine 7TM-Rezeptor PUMA-G, der ortholog zum humanen GPCR GPR109A (alternativer Name HM74A) der in Adipozyten konstitutiv und in Makrophagen nach Induktion exprimiert wird, immunologisch bedeutsam ist sollte in dieser Arbeit betrachtet werden. PUMA-G wurde erstmalig in Interferon γ stimulierten murinen Makrophagen beschrieben (Schaub *et al.*, 2001).

1.1.1.2 PUMA-G und Liganden

PUMA-G ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der zur Familie der „Rhodopsin like“ sieben Transmembrandomänen Rezeptoren gehört und in die Untergruppe Rhodopsin eingeordnet wird. PUMA-G wird im murinen Genom auf Chromosom 12 kodiert. Das Gen *puma-g* ist intronlos und besteht aus einem Exon mit 1083 Basen. Daraus resultiert ein Protein mit der Länge von 360 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von 41,4 kDa. Strukturell aufgebaut ist PUMA-G aus einer extrazellulären Domäne von 30 AS und einem intrazellulären Bereich bestehend aus 70 AS. Die restlichen 260 AS bilden die sieben Transmembrandomänen mit den verbindenden Schleifen (Abb. 1.1). Inwiefern dieser Rezeptor biologisch als Monomer oder Multimer vorliegt, ist bisher nicht weiter untersucht. Der murine Rezeptor ist mit dem humanen Rezeptor sowohl auf genomischer Basis als auch in der Aminosäuresequenz zu 83% identisch.

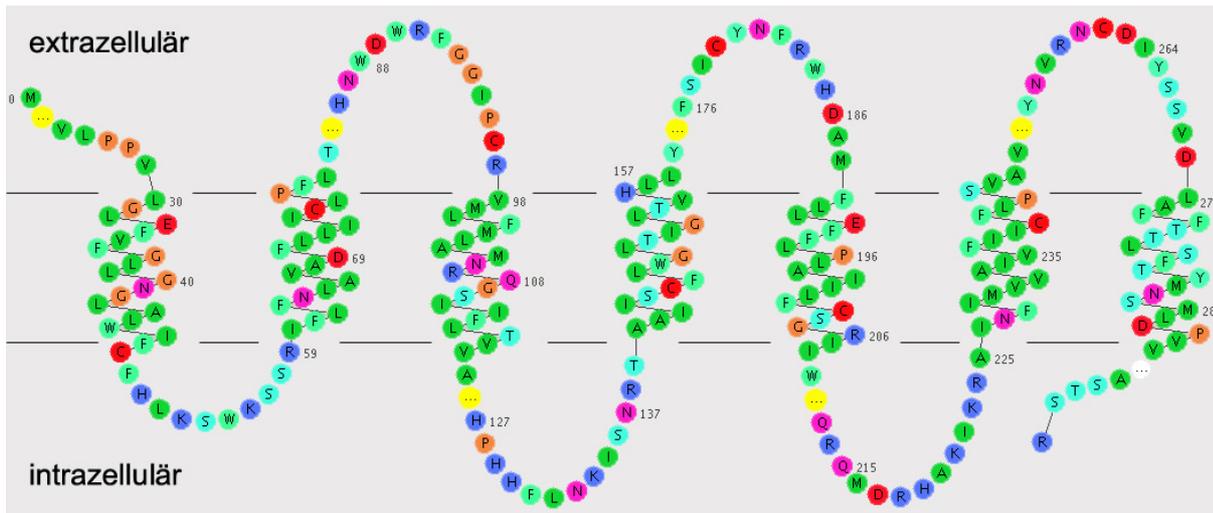


Abb. 1.1: Schematische („Snake like“) Abbildung des PUMA-G Rezeptors. Grüne, orange, rote und blaue Kreise zeigen biochemisch ähnliche AS, gelbe Kreise sind Aussparungen für eine bessere Übersicht (Skrabaneek et al., 2003), (http://www.gpcr.org/7tm/seq/diagrams_tGRAP/GP109_MOUSE-rbdg.html)

Liganden für diesen Rezeptor waren lange nicht bekannt bis Tunaru et al. (Tunaru *et al.*, 2003) Nikotinsäure als Ligand identifizieren konnten. Mit Isoprotenerol wurde in mit PUMA-G transfizierten Hamsterzellen *in vitro* das intrazelluläre cAMP Niveau über den β_2 -adrenergen Rezeptor erhöht. Nach einer darauf folgenden Bindung von Nikotinsäure an PUMA-G erfolgte über $G_{\alpha i}$ eine Inhibierung der Adenylat Cyclase und somit ein konzentrationsabhängiges Absinken des intrazellulären cAMP Spiegels. Diese Ergebnisse konnten durch Versuche mit einer PUMA-G defizienten Mauslinie untermauert werden (Tunaru *et al.*, 2003).

Nicotinsäure bildet zusammen mit Nikotinamid das Vitamin B3 (Niacin). Die von einem Menschen täglich benötigte Dosis beträgt 13 bis 20 mg und kann zum Teil im Körper aus Tryptophan synthetisiert werden. Aus einem Mangel an Niacin resultieren Symptome wie Durchfall, Dermatitis und geistige Minderentwicklung, in diesem Zusammenhang unter dem Krankheitsbild Pellagra bekannt (A.G.Olsson, 1994). Nikotinsäure wurde auch lange Zeit als Medikament gegen Hyperlipidämie verwendet und wurde in den 60er Jahren ausführlich an Tiermodellen und in der Anwendung am Mensch untersucht (A.G.Olsson, 1994). Aufgrund der unangenehmen Nebenwirkung des „flushing“, einer starken Rötung der Haut, wird Nikotinsäure heutzutage durch die Medikamentengruppe Statine ersetzt. Ihr genauer Wirkmechanismus wird im folgenden Kapitel 1.1.4 genauer erklärt. Die natürliche höchste Plasmakonzentration von Nikotinsäure im Mensch liegt im Bereich von 100 - 400 nM (Carlson et al., 1968). Konzentrationen von 0,5 μ M und darunter zeigen im Körper nur marginale Rezeptoraktivierung wodurch Nikotinsäure als endogener Ligand ausscheidet

(Tunaru *et al.*, 2003). Als erster endogener Ligand wurde (D)- β -Hydroxybutyrat gefunden (Taggart *et al.*, 2005). Bei diesem handelt es sich um einen von Fettsäuren stammenden Ketonkörper, der im Körper in Konzentrationen vorkommt, welche ausreichend sind, um ein starkes Signal über PUMA-G zu vermitteln. Nach längerer Fastenzeit erreicht (D)- β -Hydroxybutyrat im Blutplasma Konzentrationen von bis zu 8 mM (Fukao *et al.*, 2004). In der Wirkung auf den Fettsäurehaushalt hat (D)- β -Hydroxybutyrat eine vergleichbare Wirkung wie Nikotinsäure (Taggart *et al.*, 2005).

1.1.2 Die Funktion des cAMP Spiegels im Organismus

Der sekundäre Botenstoff „cyclic 3'-5'-Adenosin Monophosphat“ spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, bei der Proliferation und Zelldifferenzierung. Er hat innerhalb der Zelle eine sehr zentrale Funktion. Im Speziellen ist er bei der Mikrotubulus Organisation, Chromatin Kondensation/Dekondensation, Auflösung und Synthese der Zellkernmembran sowie der Regulation intrazellulärer Transportmechanismen beteiligt. Über diesen Signalweg wird die Exozytose kontrolliert. Ebenso reguliert der cAMP-Spiegel verschiedene immunologische Funktionen etwa die Signale von Hormonen und Neurotransmittern, bei der Immuntoleranz des Fötus und der Regulation des Fettsäurestoffwechsels in Adipozyten (<http://www.eurekah.com/> Bioscience Collection 2005; (Tasken und Aandahl, 2004). Treten im cAMP Signalweg Störungen auf, kann es zu verschiedenen Krankheiten wie Bluthochdruck, Magengeschwüre, Erkrankungen der Schilddrüse, *Diabetes mellitus* und Asthma kommen. Bei diesen verschiedenen Signalwegen wirkt cAMP entweder extrazellulär als Botenstoff über cAMP Rezeptoren (CAR) oder intrazellulär als second messenger. Extrazellulär fungiert cAMP als Chemoattraktant und veranlasst über den CAR1-Rezeptor die Bildung von multizellulären Strukturen aus Einzelzellen. Auch bei niederen Lebensformen, wie dem Schleimpilz *Dictyostelium* ist extrazelluläres cAMP wichtig. Die cAMP Rezeptoren CAR2, CAR3 und CAR4 übermitteln zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung ein Signal zur Musterbildung des Schleimpilzes (<http://www.eurekah.com/> Bioscience Collection 2005). Intrazellulär aktiviert cAMP die Protein Kinase A (PKA), die verschiedene Proteine phosphorylieren kann und somit eine Vielzahl von nachgeschalteten Proteinen beeinflusst (siehe Kapitel 1.1.2.2). Die Aktivität von PKA wird direkt über den cAMP Spiegel kontrolliert. Dieser wiederum ist sowohl von Phosphodiesterasen, die zyklische Nukleotide wie cAMP und cGMP

hydrolysieren, aber auch von der katalytischen Aktivität der Adenylat Cyclase, die cAMP synthetisiert, abhängig.

1.1.2.1 Das Enzym Adenylat Cyclase

Die Adenylat Cyclase ist ein Enzym, welches aus Adenosin Triphosphat (ATP) cAMP synthetisieren kann und dessen Aktivität durch Ca^{2+} und G-Proteine (siehe Kapitel 1.1.3) reguliert wird. Es ist membranständig in der Zelle lokalisiert und kommt in unterschiedlichen Typen (Typ I - IX) vor, die auch in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Bisher wurde nur Typ IV in allen untersuchten Geweben entdeckt (Gao und Gilman, 1991). Alle anderen sind in ihrer Expression auf spezifische Gewebe beschränkt. Die Einteilung der neun Typen erfolgt anhand ihrer regulatorischen Eigenschaften (Abb. 1.2)

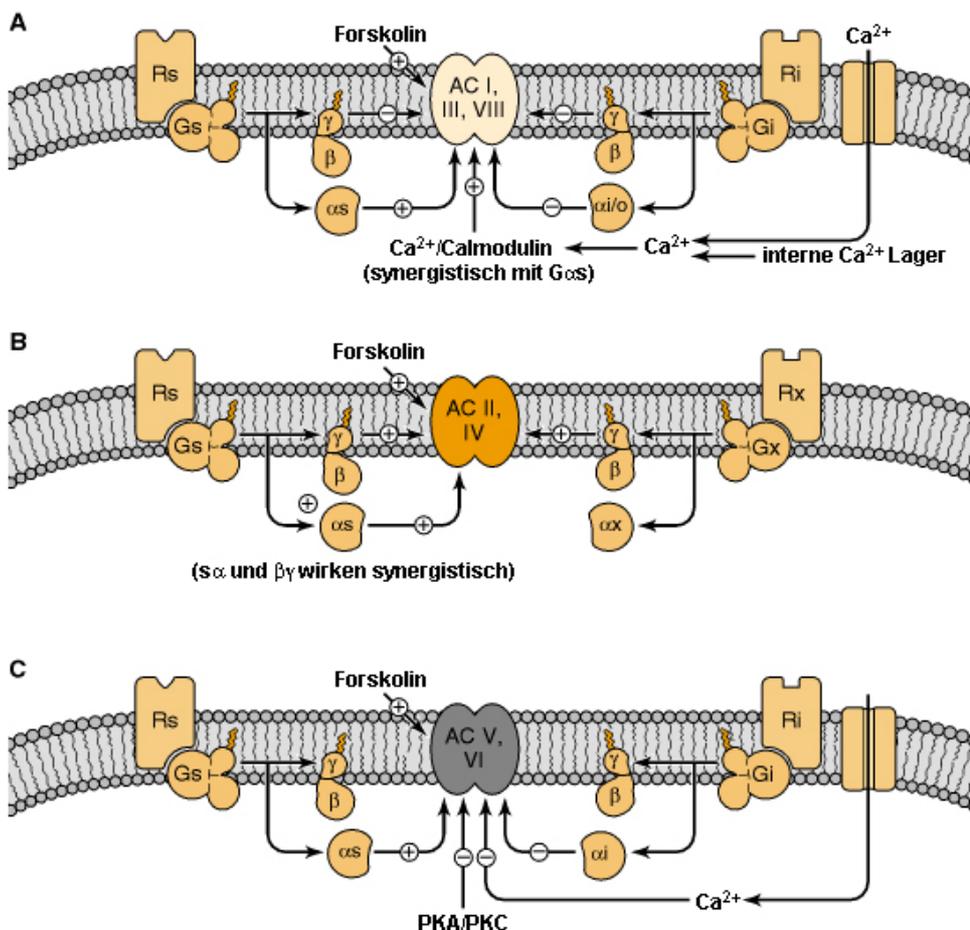


Abb. 1.2: Schematische Abbildung der Regulation der Adenylat Cyclase. Alle Typen werden über $\text{G}_{\alpha s}$ und Forskolin aktiviert. Negativregulation kann über Ca^{2+} , PKA/PKC, $\text{G}_{\alpha s}$, $\text{G}_{\alpha i}$ und die $\beta\gamma$ Untereinheit erfolgen. AC = Adenylat Cyclase, Rs/Ri = stimulierender oder inhibierender Rezeptor, G_s/G_i = stimulierendes oder inhibierendes G-Protein (Siegel *et al.*, 1998).

Adenylat Cyclase Typ I, III und VIII werden synergistisch durch die G-Protein Untereinheit $G_{\alpha s}$ und Ca^{2+} / Calmodulin aktiviert und teilweise durch $\beta\gamma$ Untereinheiten von G-Proteinen inhibiert (Abb. 1.2 oben). Adenylat Cyclase Typ II, IV und VII werden durch $G_{\alpha s}$ und die $\beta\gamma$ Untereinheiten von G-Proteinen aktiviert (Abb. 1.2, mitte). Die katalytische Funktion der Adenylat Cyclasen Typ V und VI werden durch $G_{\alpha i}$ und freies Ca^{2+} inhibiert (Abb. 1.2 unten) (Cooper et al., 1995; Guillou et al., 1999). Adenylat Cyclase Typ IX wird einer weiteren Gruppe zugerechnet. Sie wird durch $G_{\alpha s}$ stimuliert und mit $G_{\alpha i}$ und freiem Ca^{2+} inhibiert (Cumbay und Watts, 2004). Zusätzlich werden manche Adenylat Cyclasen durch Protein Kinasen reguliert. So stimuliert mit Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) aktivierte Protein Kinase C (PKC) die Adenylat Cyclasen II und VII, wohingegen Adenylat Cyclasen IV, VI und IX inhibiert werden (Yoshimura und Cooper, 1993; Cumbay und Watts, 2004).

1.1.2.2 Die Funktion des Enzyms Protein Kinase A

Protein Kinase A ist der Hauptmediator der über cAMP vermittelten Signale. Neben PKA gibt es noch zelltypspezifische Kationen Kanäle, so genannte „cyclic nucleotide gated“ (CNG) (Nakamura und Gold, 1987), und eine kleine Familie von „guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs) (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), welche durch cAMP beeinflusst werden. Das Enzym selbst ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei Dimeren. Eine Untereinheit jedes Dimers besitzt eine regulatorische Funktion, wohingegen die zweite Untereinheit zwei inaktive katalytische Domänen besitzt (Abb. 1.3) Im Genom codieren vier Gene ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$, $RII\beta$) die regulatorischen Untereinheiten und vier Gene ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$, $PRKX$) die katalytischen Untereinheiten (Foss et al., 1994; Zimmermann et al., 1999). Je nach Gewebetyp ist das Expressionsmuster der verschiedenen PKA Gene unterschiedlich und es werden verschiedene PKA Isotypen gebildet. Die Einteilung in die beiden Typen I und II erfolgt anhand der involvierten RI oder RII Untereinheiten. PKA Typ I besitzt eine hohe Löslichkeit und kommt daher hauptsächlich im Zytoplasma vor, wohingegen PKA Typ II an bestimmte zelluläre Strukturen gebunden vorliegt (Colledge und Scott, 1999; Diviani und Scott, 2001; Michel und Scott, 2002). Binden nun vier cAMP Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten werden die beiden katalytischen Untereinheiten freigesetzt und damit aktiviert. Die katalytischen Einheiten phosphorylieren anschließend eine Vielzahl von Zielproteinen an spezifischen Serin und Threonin Resten (Tasken et al., 1993; Kopperud et al., 2002).

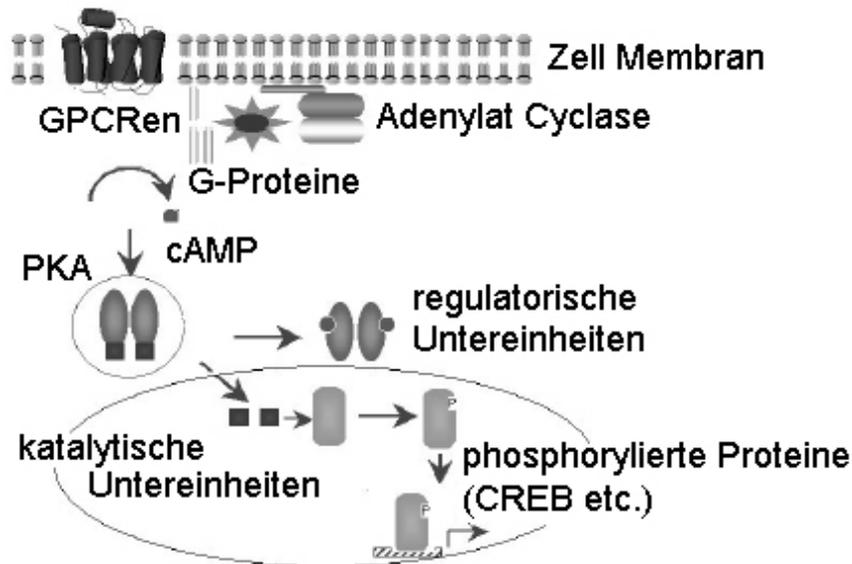


Abb. 1.3: Protein Kinase A vermittelte Signaltransduktion. Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird die Adenylat Cyclase aktiviert und synthetisiert cAMP. cAMP Bindung an die regulatorische Untereinheit von PKA aktiviert die katalytische Untereinheit. Diese phosphoryliert Zielproteine wie Transkriptionsfaktoren (CREB = cAMP response element binding protein); GPCR = G-Proteingekoppelter Rezeptor (Bossis *et al.*, 2004).

1.1.3 Heterotrimere G-Proteine

Der intrazelluläre cAMP Spiegel wird über heterotrimere G-Proteine reguliert. Sie bestehen aus drei Protein-Untereinheiten: einer α -Einheit (G_α), einer β -Einheit (G_β) und einer γ -Einheit (G_γ). Letztere ist für die Verankerung an der Zellmembran notwendig. Inaktives G-Protein Heterotrimer bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR), wird aktiviert und die α -Untereinheit dissoziiert ab. In der inaktiven Form bindet die G_α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP), welches bei Aktivierung durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Das verbleibende Heterodimer, bestehend aus der β - und γ -Untereinheit ($G_{\beta\gamma}$) und die aktivierte G_α Untereinheit modulieren verschiedene Effektorsysteme wie z.B. Ionenkanäle oder Enzyme (Abb. 1.4). Es leiten jedoch nicht alle GPCR ihr Signal über das selbe heterotrimere G-Protein weiter XXX (Berg *et al.*, 2002). Die einzelnen Untereinheiten sind im Genom in verschiedenen Genen codiert. Im humanen Genom gibt es für die G_α Untereinheit 17 verschiedene Gene, für G_β fünf und für G_γ zwölf unterschiedliche Gene. Die Expression und Zusammensetzung der einzelnen heterotrimeren G-Proteine ist zelltypspezifisch und noch nicht abschließend geklärt (Wettschreck und Offermanns, 2005). Aktives G_α und $G_{\beta\gamma}$ kann je nach G-Protein Subklasse eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die Adenylat Cyclase erzielen. Funktionell lassen sich die heterotrimeren G-

Proteine in vier Klassen einteilen, definiert durch die $G\alpha$ Untereinheit und zwar in G_{α_s} , $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$, $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}$, und $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ G-Proteine (Abb. 1.4). Jede Familie besteht aus mehreren Mitgliedern mit oftmals spezifischen Expressionsmustern. Am weitesten und stärksten exprimiert sind die $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$ Untereinheiten. Aus dieser hohen G-Proteinmenge resultiert auch eine rezeptorvermittelte Aktivierung in einer hohen $G_{\beta\gamma}$ Freisetzung. (Clapham und Neer, 1997; Robishaw und Berlot, 2004). Diese Klasse bewirkt in Bezug auf die Adenylat Cyclase eine Inhibition und somit die Bildung von weniger cAMP (Abb. 1.4 oben). Die Isoform $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}$ aktiviert Phospholipase C β -Isoformen (PLC- β) (Rhee, 2001) und die Isoform $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ erhöht die Aktivität der kleinen GTPase RhoA (Buhl et al., 1995) (Abb. 1.4 unten). $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ Untereinheiten werden ubiquitär exprimiert und binden häufig an dieselben Rezeptoren wie $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}$ (Dhanasekaran und Dermott, 1996). Das G_{α_s} wird ebenfalls ubiquitär exprimiert und koppelt viele GPCR an Adenylat Cyclase, die somit aktiviert wird. Daraus resultiert ein Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels (Abb. 1.4 rechts).

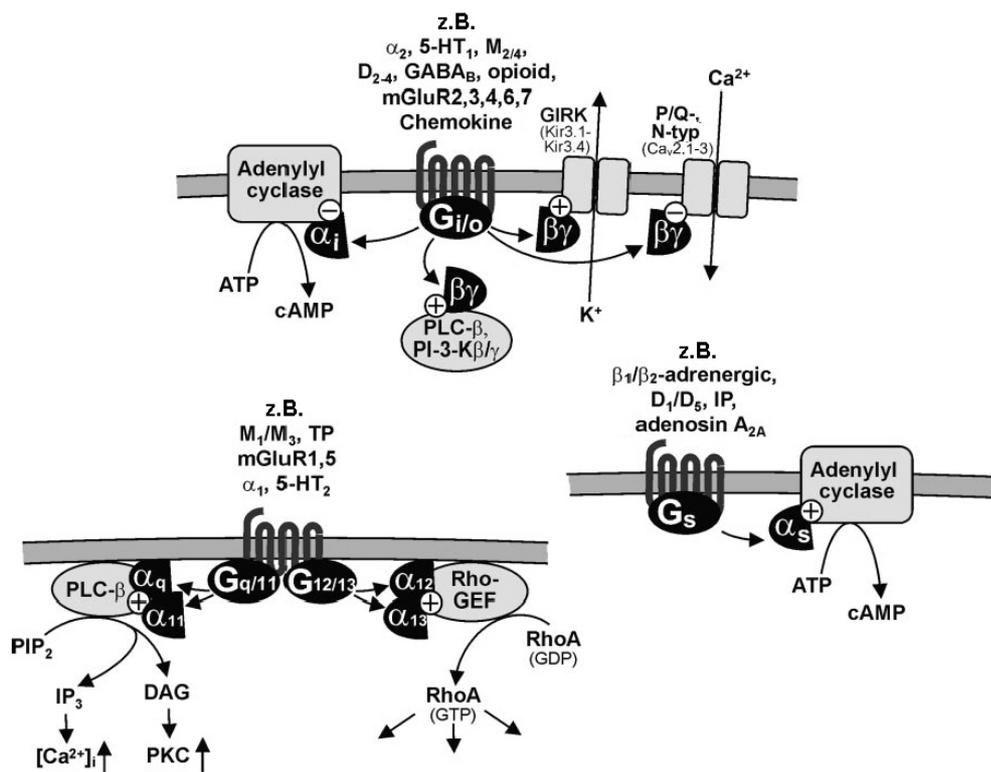


Abb. 1.4: Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine. Oben $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$ (AC inhibierend, PLC β aktivierend), in der Mitte rechts G_{α_s} (AC aktivierend) und unten links $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}$ (PLC β aktivierend) und $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ (Rho aktivierend) G-Protein Signalweg (Wettschureck und Offermanns, 2005).

Rezeptoren, die über heterotrimere G-Proteine die Aktivität der Adenylat Cyclase beeinflussen nehmen einen großen Teil der Rezeptoren in Mensch und Maus ein (Bockaert und Pin, 1999).

1.1.4 Fettstoffwechsel

In den vergangenen Jahren wurde immer ersichtlicher, dass Fettgewebe neben der Speicherfunktion auch als endokrines Organ verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sezerniert. Es gibt zwei verschiedene Arten von Fettgewebe, die zwar dieselbe Fettsäureregulation aufweisen jedoch unterschiedliche Funktionen übernehmen. Das sind braunes Adipozyten und weißes Adipozyten Gewebe. Braunes Adipozyten Gewebe reguliert den Temperaturhaushalt und weißes Adipozyten Gewebe speichert Energie wie Triacylglycerol (TAG) (Collins und Surwit, 2001). Der Hauptweg zur Freisetzung dieser gespeicherten Energie läuft über die „Hormon Sensitive Lipase“ (HSL), welche TAG zu freien Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert. Die Aktivität von HSL wird stark durch cAMP vermittelte Aktivierung von PKA reguliert und somit über die Adenylat Cyclase und GPCR. Aktive HSL hydrolysiert in Lipidtropfen TAG zu Glycerol und drei Fettsäureresten, welche ins Blutplasma abgegeben werden. Die freien Fettsäuren werden in der Leber zu TAG synthetisiert und als lösliche „very low density lipoprotein“ (VLDL) ins Blutplasma abgegeben. Dort können die Lipide zu Zielzellen gelangen oder durch zusätzliche Modifikationen wie Cholesterol- und Apolipoproteineinlagerung, zu „intermediate density lipoprotein“ (IDL) „low density lipoprotein“ (LDL) und „high density lipoprotein“ (HDL) verändert werden.

Nikotinsäure und (D)- β -Hydroxybutyrate bewirken nach Bindung an PUMA-G eine Konformationsänderung, die an PUMA-G gekoppeltes $G_{\alpha i}$ G-Protein aktiviert. Die darauf folgende Hemmung der Adenylat Cyclase verursacht ein Absinken des intrazellulären cAMP Spiegels, wodurch weniger PKA aktiviert wird. Die geringere HSL Aktivität, welche nun nicht mehr durch PKA aktiviert werden kann, hat zur Folge, dass weniger TAG abgebaut wird und die Zellen mehr freie Fettsäuren aufnehmen (Tunaru *et al.*, 2003; Taggart *et al.*, 2005). Hierdurch kommt es in der Leber zu einer geringeren Ausschüttung von VLDL und einer Erhöhung der LDL und HDL Spiegel im Blut, was positive Wirkungen auf den Körper hat. In Adipozyten aus PUMA-G defizienten Tieren erfolgt nach der Gabe von Nikotinsäure und (D)- β -Hydroxybutyrat kein Absinken des Spiegels freier Fettsäuren.

Inwiefern nun der in Makrophagen mit $IFN\gamma$ induzierbare G-Protein gekoppelte Rezeptor PUMA-G im Immunsystem eine Rolle spielt, war eine Fragestellung dieser Arbeit.

1.2 Jak2 Einleitung

Das Immunsystem wird gesteuert und kontrolliert durch das Zusammenarbeiten verschiedenster Zellen. Die Übertragung der für die Kommunikation von Zellen nötigen Signale erfolgt im Organismus über Blut und Lymphe. Die einzelnen Signale bestehen im Körper aus einzelnen Molekülen. Organe bzw. deren Zellen senden Botenstoffe aus, die von ihren Zielorganen bzw. Zielzellen erfasst und verarbeitet werden. Man unterscheidet drei Arten der Signalübertragung. Erstens endokrine Signale, welche über weite Strecken vermittelt werden und häufig organübergreifend sind. Diese Signale erreichen die Zielzellen im Körper über den Blutkreislauf und erreichen somit eine systemische Wirkung. Zweitens parakrine Signale, bei denen die Zellen Botenstoffe für in unmittelbarer Nähe liegende Zielzellen sekretieren und innerhalb von Organen wirken und drittens autokrine Signale. Hierbei sekretiert die Zelle Stoffe, die auf sie selbst eine spezifische Wirkung haben. Parakrine Signale werden über die Gewebsflüssigkeit weitergeleitet, während autokrine Signale nur die Zelle verlassen und sofort wirken können.

Eines der wichtigsten Säugersysteme, welches sehr stark von einer funktionierenden Kommunikation abhängig ist, ist das Immunsystem. Dessen Funktion im Organismus ist die Abwehr von Pathogenen und körperfremden Stoffen, die ungewollt eindringen konnten. Es besteht aus einer Vielzahl von Zelltypen, die alle untereinander mit Botenstoffen, so genannten Zytokinen, kommunizieren. Das Immunsystem ist wegen seiner wichtigen Abwehrfunktion über den ganzen Organismus verteilt. Somit ist auch die Kommunikation des Immunsystems auf verschiedene Arten der Signalübertragung angewiesen. Zytokine werden zum Beispiel endokrin am Ort einer Infektion ausgeschieden und locken Effektorzellen an den Infektionsherd, um dort gezielt die Erreger im Körper zu bekämpfen. Vor Ort schütten Immunzellen dann weitere Zytokine aus, die parakrin diese Effektoren zu erhöhter Zellteilung veranlassen und somit die Pathogenabwehr verbessern. Nötig für diese Art der Kommunikation sind neben den Signalmolekülen auch die dazu passenden Rezeptoren. Vergleichbar zu Antennen, die nur spezifische Signale empfangen können. Welche Rezeptoren eine Zelle exprimiert ist durch ihren Differenzierungsgrad bzw. durch ihre Art bestimmt. Alle Zellen eines Zelltypus im gleichen Aktivierungs- und Differenzierungsgrad tragen die selben Rezeptoren und reagieren somit auf die selben Botenstoffe. Für eine Zelle beginnt die Signalverarbeitung mit dem Erkennen des Botenstoffes. Neben sofortigen physiologischen Reaktionen, wie Öffnung der Ionenkanäle bei Nervenzellen, kann auch eine Veränderung der Genexpression durch extrazelluläre Signale erfolgen. Man kennt zwei Arten der Signalweiterleitung in der Zelle. Zum einen wird das Signal direkt, wie bei fettlöslichen

Steroidhormonen, bei denen das Hormon in die Zelle eindringt und dort mit dem Rezeptor einen Komplex bildet, der dann im Zellkern an DNS Motive binden kann, wirken (Wehner R und Gehring W, 1995). Alternativ über so genannte sekundäre Botenstoffe, wobei das extrazelluläre Signal über den Rezeptor an ein intrazelluläres Molekül weitergegeben dann in den Zellkern geleitet wird und dort die Transkription unterschiedlicher Gene reguliert. Der sehr schnelle second messenger Signalweg Jak-STAT spielt bei vielen verschiedenen Botenstoffen die Übermittlerrolle von äußerem Signal zur transkriptionellen Reaktion. So sind neben Hormonen, welche sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in der Organausbildung wichtig sind, auch Zytokine vom Typ I und II von diesem Signalweg abhängig.

1.2.1 Zytokin Rezeptoren und deren Liganden

Zytokine steuern die Kommunikation der verschiedenen Immunzellen im Körper. Jedes Zytokin wird von einem spezifischen Rezeptor erkannt und leitet das Signal in die Zelle weiter. Die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten wird beeinflusst, sowie die Immunreaktion auf Pathogene verstärkt oder beendet (Kirchner H et al., 1994). Hauptproduzenten von Zytokinen sind Zellen des Immunsystems. Die zugehörigen Rezeptoren finden sich dementsprechend ebenfalls meistens auf Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen. Für die vielen verschiedenen Zytokine gibt es ebenso unterschiedliche Rezeptoren, welche sich in fünf verschiedene Rezeptorfamilien einteilen lassen:

1. Immunglobulin Superfamilie Rezeptoren
2. Klasse I Zytokinrezeptoren (Hematopoietin Rezeptorfamilie)
3. Klasse II Zytokinrezeptoren (Interferon Rezeptorfamilie)
4. TNF Rezeptorfamilie
5. Chemokin Rezeptorfamilie

Immunglobulin Superfamilien Rezeptoren haben alle eine Immunglobulin ähnliche Struktur mit drei extrazellulären Immunglobulin Domänen. Beispiele für diese Klasse sind die Rezeptoren von IL-1 und M-CSF.

In die Gruppe der TNF Rezeptorfamilie fallen die Rezeptoren der Zytokine wie TNF α und β , LT- β und CD40L.

Unter die Chemokinrezeptoren fallen Rezeptoren wie z.B. für IL-8 und RANTES. Diese

Rezeptoren besitzen sieben membrandurchspannende Domänen.

Die meisten Zytokinrezeptoren lassen sich in die zweite Klasse, die Klasse I Zytokinrezeptoren eingliedern. Sie alle haben im extrazellulären Bereich zwei konservierte Motive. Das eine Motiv besteht aus vier Cysteinen (CCCC) und das andere aus der konservierten AS-Sequenz Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). Im Gegensatz dazu fehlt den Klasse II Zytokinrezeptoren das WSXWS Motiv und sie haben nur das CCCC Motiv (Kuby J, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit behandelten Rezeptoren fallen in diese beiden Kategorien und werden deshalb etwas genauer in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.2.1.1 Zytokine Typ I

Typ I Zytokine sind anhand ihrer Rezeptoren in einzelne Klassen einteilbar. So gehören z.B. die Zytokine GM-CSF, IL-3 und IL-5 zu den Zytokinen welche im zugehörigen Rezeptor die β_c Kette haben (Abb. 1.5 a.), die Rezeptoren für die Interleukine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 und IL-15 haben alle die γ_c Kette gemeinsam (Abb. 1.5 c.). Des weiteren gibt es Zytokinrezeptoren, die gemeinsam gp130 besitzen. Die hier zugehörigen Zytokine sind unter anderem IL-6, IL-11 und LIF (Abb. 1.5 b.). Da die konstanten Ketten der IL-12 und Leptin Rezeptoren in ihrer Sequenz der gp130 Kette sehr ähnlich sind, werden diese Rezeptoren auch in die Gruppe der IL-6 Rezeptor-Familie eingeordnet (Leonard und O'Shea, 1998). Zusätzlich zu den drei heterodimeren (trimeren) Rezeptorklassen der Typ I Zytokine gibt es noch homodimere Rezeptoren an die z.B. Wachstumshormone, Erythropoietin, Thrombopoietin und Prolactin bindet (Leonard und O'Shea, 1998).

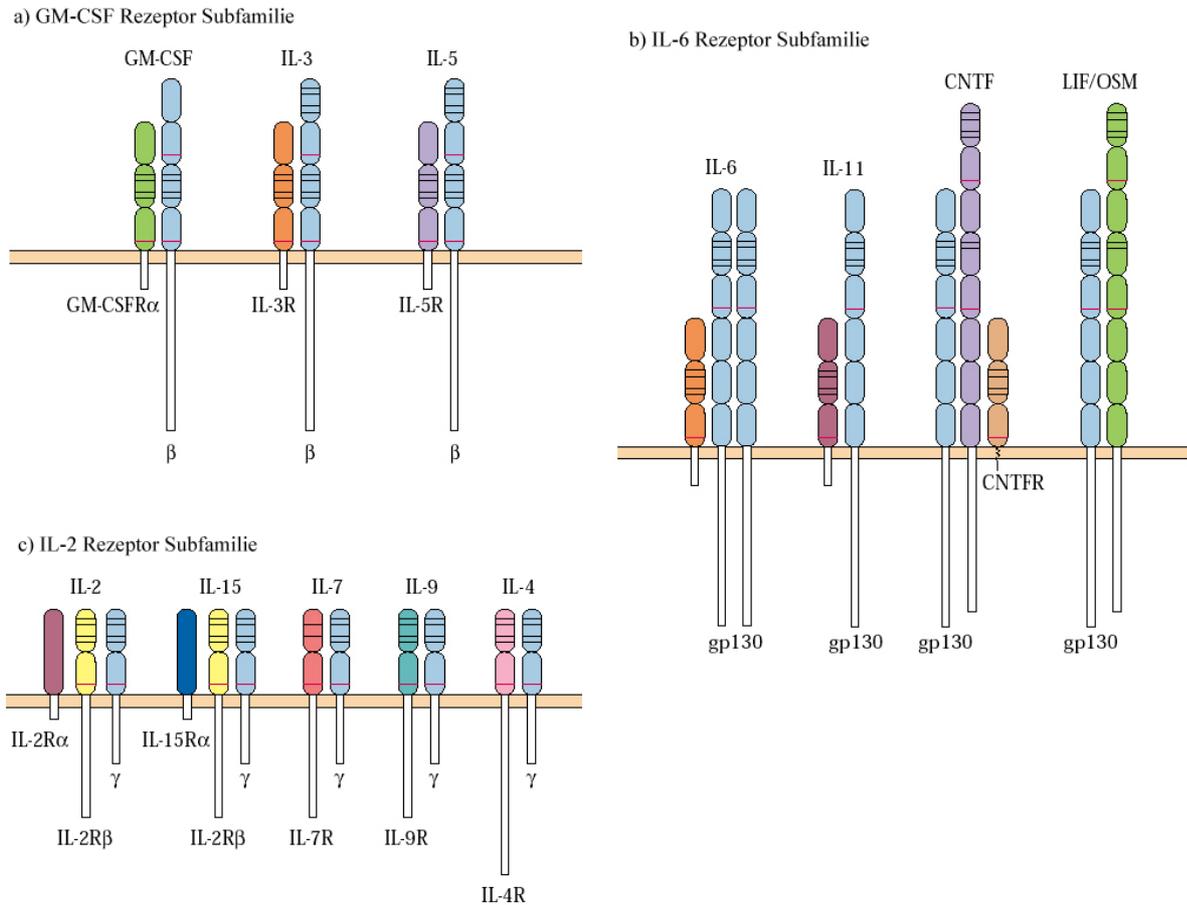


Abb. 1.5: Schematisches Diagramm der drei Subfamilien der Klasse I Zytokin Rezeptoren. Alle Mitglieder in a.) haben die gleiche intrazelluläre Rezeptorkette β_c und eine Zytokin-spezifische zweite Kette und in b.) findet man Rezeptoren mit der gp130 Kette. Sie bilden die IL6 Rezeptorenfamilie. In c.) sind die Rezeptoren der IL2 Familie mit der γ_c Kette gezeigt (Kuby J *et al.*, 2004).

Ihre Signalspezifität erhalten diese Zytokine alle über die zweite Kette am heterodimeren Rezeptor. Die spezifische α Kette des Rezeptors kann mit geringer Stärke das Zytokin binden. Binden jedoch zusätzlich noch die β Kette zusammen mit der α Kette an das Zytokin steigt die Affinität des heterodimeren Rezeptors zum Liganden extrem an (Abb. 1.6 a.). Alle zu der jeweiligen Gruppe der Typ I Rezeptoren gehörenden Zytokine verwenden ähnliche Janus Kinasen. So findet man bei allen Rezeptoren, die die β_c Kette haben Jak2, bei denen mit der γ_c Kette Jak1 und bei den aufgezählten homodimeren Rezeptoren wiederum immer Jak2 (Abb. 1.6 b.) (Kuby J, 1998). Die für die Transkription nötigen STAT-Dimere („signal transducers and activators of transcription“) können jedoch von unterschiedlicher Zusammensetzung sein (Leonard und O'Shea, 1998).

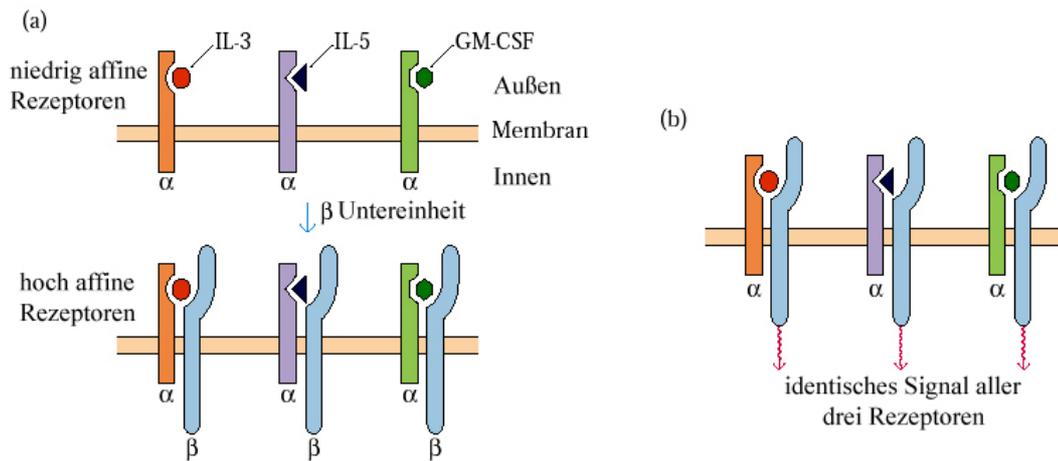


Abb. 1.6: Interaktion zwischen einer Zytokinspezifischen Kette und einer Signaltransduzierenden Kette von Zytokinrezeptoren. a: Schematische Darstellung der niedrig- und hochaffinen Kette des IL3, IL5 und GM-CSF Rezeptors. b: Spezifische Zytokinrezeptoren vermitteln über die selbe Signaltransduzierende Kette ihr Signal (Kuby J *et al.*, 2004).

1.2.1.2 Zytokine Typ II

Typ II Zytokine bestehen nur aus der Klasse der Interferone (IFN). Von diesen gibt es wiederum zwei Klassen. Typ I und Typ II Interferone. Die erste Unterscheidung in die Interferon-Typen erfolgte anhand rein biochemischer Einteilung. So verhielten sich die zuerst bekannten Interferone IFN α und IFN β serologisch identisch und waren gegenüber Säure stabil, IFN γ hingegen labil und somit Typ II IFN. Spätere Analysen belegten noch weitere Gemeinsamkeiten der Typ I Interferone. So sind IFN α und IFN β in ihrer Sequenz mehr als 50% identisch während die Ähnlichkeit von Typ I IFN zu Typ II IFN deutlich geringer ist.

Interferone sind in ihrer Wirkung relativ pleiotrop. Erstens induzieren verschiedene Viren und Pathogene dieselben Interferone und zweitens hemmen Interferone verschiedene Viren und Pathogene. Spezifisch sind sie jedoch in Bezug auf die Wirkung innerhalb der Arten. Das von Menschen oder Tieren produzierte Interferon kann seine antivirale Wirkung auch nur bei Zellen der selben oder in nah verwandten Arten erzielen. So kann humanes Interferon zwar noch in Affen, jedoch nicht in Vögeln antiviral wirken (Baron S *et al.*, 1996). Die Wirkung von Interferonen lässt sich jedoch nicht nur auf antivirale Aspekte reduzieren. Sie modulieren viele immunologisch relevante, zelluläre Vorgänge und beeinflussen das Wachstum von Immunzellen. Die Interferon Rezeptoren sind alle gleich aufgebaut und unterscheiden sich nur in ihrer extrazellulären Domäne. Allgemein kann man sagen, dass Interferone eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Pathogenen spielen (Charles A. Janeway *et al.*, 2007).

IFN Typ I

Zu den Typ I Interferonen von Menschen werden IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN ω und IFN κ gezählt. Hiervon sind nur IFN α und IFN β ubiquitär exprimiert. IFN ζ findet man nur in der Maus in den lymphatischen Organen Milz, Thymus und Lymphknoten (Takaoka und Yanai, 2006). Codiert sind sie im Mensch in benachbarten Loci auf Chromosom neun. Biochemisch haben alle Typ I Interferone weitere Gemeinsamkeiten (Kirchner H et al., 1994). IFN α und IFN β haben sowohl eine direkte Wirkung auf Viren, indem sie deren Replikation hemmen als auch eine indirekte, indem sie sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort stimulieren. Sie werden von mit Virus infizierten Zellen sezerniert und wirken somit parakrin auf die umliegenden Zellen antiviral. Auch eine bakterielle Infektion induziert Interferon Typ I und stimuliert das Immunsystem indem natürliche Killerzellen, Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert werden (Takaoka und Yanai, 2006). IFN α wird primär von Leukozyten und IFN β hauptsächlich von Fibroblasten und Epithelzellen produziert (Baron S et al., 1996). Die Zielzellen erkennen sowohl IFN α als auch IFN β mit dem selben Rezeptor. Die Signalweiterleitung bei den Typ I Interferonen erfolgt über Jak1 und Tyk2, die anschließend STAT1 und STAT2 aktivieren (Abb. 1.7).

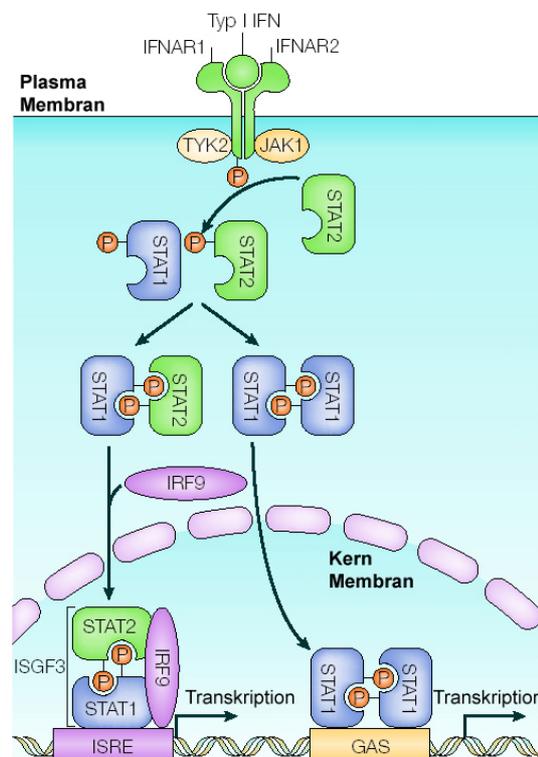


Abb. 1.7: Signaltransduktion des Interferon Typ I Rezeptors. Bindung von IFN an den IFN Typ I Rezeptor aktiviert Janus Kinasen (Jak). Die aktivierten Jaks phosphorylieren Tyrosine des Rezeptors. STAT Moleküle werden rekrutiert und ebenfalls von Jak phosphoryliert. Dimerisierte STATs translokieren in den Nukleus und binden an ISRE (IFN stimulated response element) bzw. GAS (IFN γ activated site) Motive der DNS und starten die Transkription Interferon regulierter Gene (Decker T et al., 2005).

IFN Typ II

Im Gegensatz zu den Typ I Interferonen ist bei Typ II Interferon nur IFN γ beschrieben. Erstmals wurde es von Wheelock 1965 als antivirale Substanz im Zellüberstand von Phytohämagglutinin stimulierten Leukozyten beschrieben (WHEELOCK und SIBLEY, 1965). IFN γ ist im humanen Genom nur in einem einzigen Gen auf Chromosom 12q24.1 codiert und umfasst einen 5kb großen Bereich mit 4 Exons. Bei Maus liegt es auf Chromosom 10 67.0 cM mit ebenfalls vier Exons. Biologisch aktiv kommt IFN γ als nicht kovalent verknüpftes Homodimer vor.

In seiner Wirkung hat IFN γ immunologische Funktionen. In IFN γ defizienten Mäusen oder Tieren, deren Signalweiterleitung entweder durch einen defekten Rezeptor oder STAT1 gestört war, konnte eine extreme Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern und Veränderungen im lymphatischen System nachgewiesen werden (Dalton *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993; Meraz *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 1996). Wurden die Tiere unter spezifisch Pathogen freien (SPF) Bedingungen gehalten, zeigten sich keinerlei Unterschiede zu Wildtyp Tieren. Die Produktion von IFN γ erfolgt hauptsächlich von aktivierten NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und T_H1-Zellen (Boehm *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Typ I Interferonen hat IFN γ im Immunsystem eine weitläufigere Wirkung. Eine Kernfunktion ist z.B. die Fähigkeit ruhende Makrophagen zu aktivieren, die daraufhin MHC II Moleküle auf der Zelloberfläche hochregulieren, vermehrt Zytokine produzieren und eine erhöhte antimikrobielle Aktivität entwickeln (Kuby J, 1998). Ebenfalls beeinflusst werden durch IFN γ CD4⁺ T_H2-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen. Der IFN γ Rezeptor hat einen vergleichbaren Aufbau wie der Typ I Interferonrezeptor. Die Signalweiterleitung intrazellulär erfolgt über den Jak-STAT Signalweg mit Jak1 und Jak2 und anschließender STAT1 Aktivierung und Homodimerisierung (Abb. 1.8 links).

1.2.2 Jak-STAT Signalweg

Als ein intrazellulärer sekundärer Botenstoff Signalweg ist der Jak-STAT Signalweg ein typisches Beispiel und wird in der vorliegenden Arbeit genauer behandelt. Bei ihm handelt es sich um eine sehr schnelle Weiterleitung des extrazellulären Signals in den Zellkern. Nach Bindung des Botenstoffes, in diesem Signalweg eines Zytokins an den Rezeptor, erfolgt die Weiterleitung nur über zwei Proteinklassen. Zum einen über Tyrosinkinasen, so genannte Janus Kinasen (Jak), und zum anderen über „signal transducers and activators of

transcription“ (STATs) Moleküle. Die STAT Moleküle wandern nach Aktivierung direkt in den Zellkern, binden an bestimmte DNS Sequenzen und starten die Transkription.

Nach der Bindung des Zytokins an den Rezeptor werden, abhängig vom Rezeptor, spezifische Janus Kinasen rekrutiert. Diese phosphorylieren und aktivieren sich gegenseitig. Anschließend wird der intrazelluläre Teil des Rezeptors phosphoryliert. An diesen gelangen dann zwei STAT Moleküle, welche wiederum durch die Kinasen phosphoryliert werden. Solchermaßen aktivierte STAT Moleküle dimerisieren und translozieren in den Zellkern, binden dort an spezifische DNS Sequenzen und initiieren dort die Transkription diverser Gene (Abb. 1.8). Es gibt eine Vielzahl von Molekülen, die über diesen Signalweg eine veränderte Genregulation initiieren.

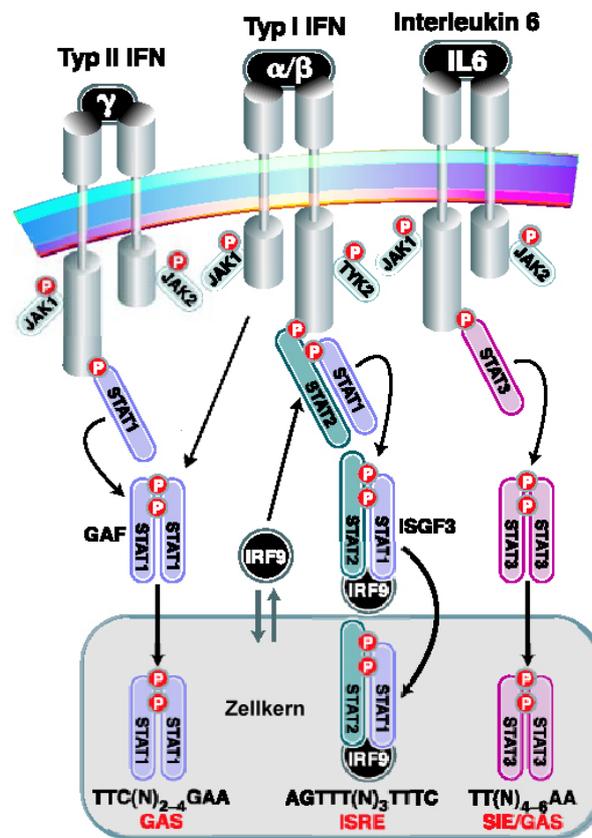


Abb. 1.8: Drei Beispiele für den Jak STAT Signalweg. *Links:* Typ II Interferonbindung führt zur Rezeptorphosphorylierung durch Jak1 und Jak2 was wiederum STAT1 Phosphorylierung induziert. STAT1 Dimere translozieren in den Nukleus und binden an GAS Sequenzen. *Mitte:* Typ I Interferon stimulieren Jak1 und Tyk2 Proteine. Der gebildete Transkriptionsfaktor besteht aus Phosphorylierten STATs, bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF9. Dieses Trimer bindet im Kern an ISRE Elemente. Zusätzlich bilden sich auch STAT1 Dimere. *Rechts:* Auf Interleukin 6 Bindung folgt Jak1 und Jak2 Aktivierung und anschließend eine Dimerisierung von STAT3 mit nachfolgender GAS Bindung (Aaronson und Horvath, 2002).

dem zweigesichtigen römischen Gott Janus benannten, Namen. Näher am Aminoende der Proteine gelegen (ca. AS300-580) befindet sich eine SH2 (Src homology) ähnliche Domäne (JH3-JH5). Sie ist wichtig für die Proteininteraktion für die jedoch bisher kein Bindepartner bekannt ist. Die JH6 und JH7 Domäne beinhaltet eine so genannte FERM Domäne (Band-4.1, ezrin, radixin, moesin). Diese Domäne ist ca. 300 AS groß und dient zur Interaktion mit Transmembranproteinen wie Rezeptoren. Die FERM Domäne kann auch an die Kinase Domäne binden und somit deren Aktivität positiv regulieren (Zhou et al., 2001).

Die JH1 Kinase aktive Domäne von Jak2

Jak2 spielt für das Wachstum des Organismus eine lebensnotwendige Rolle. Gezielte Geninaktivierung in Mäusen zeigte einen embryonal letalen Phänotyp am Tag e12,5 (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998). Inwieweit allerdings eine Kinase unabhängige Funktion von Jak2 entscheidend ist, konnte bisher nicht genauer untersucht werden. In *in vitro* Mutationsexperimenten wurde bisher nur die Kinaseaktivität genauer betrachtet (Chatti *et al.*, 2004). Die volle Kinaseaktivität ist neben dem aktiven Zentrum auch von der Aktivierung innerhalb der Kinasedomäne abhängig. Diese Domäne hat alle charakteristischen Eigenschaften einer typischen Tyrosinkinase. Veränderungen in der ATP bindenden Region unterbinden die Kinase Aktivität (Briscoe *et al.*, 1996). Innerhalb der JH1 Region ist der „activation loop“ von entscheidender Bedeutung. Bei Jak2 unterband eine Mutation in Insektenzellen von Tyrosin zu Phenylalanin in der Aminosäure 1007 und 1008 (Y1007/8F) *in vitro* die Kinase Aktivität vollständig (Feng *et al.*, 1997). Inwieweit diese Mutationen in der Maus Folgen hat, sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Durch die Y1007/8F Mutation wird das Protein weiterhin exprimiert und kann als Bindungspartner für andere Proteine dienen. Zusätzlich ist bekannt, dass eine Grundaktivität der Kinase *in vitro* nicht beeinflusst wird (Chatti *et al.*, 2004). Eine vergleichbare Mutation im „activation loop“ hat nur eine geringe Wirkung auf die Funktionalität von Tyk2. Hierbei wurde zwar durch die Tyrosin zu Phenylalanin Mutation in den AS Y1054F und Y1055F die ligandenabhängige Tyrosin Phosphorylierung von Tyk2, jedoch nicht die Kinase Aktivität verhindert (Gauzzi *et al.*, 1996). Wohingegen eine Mutation im Tyrosin Y981 in Jak3 zu einer erhöhten Aktivität führt und in Jak2 eine vergleichbare Mutation keinen Effekt hat (Zhou *et al.*, 1997). Die verschiedenen konservierten Tyrosine der Janus Kinasen haben somit Protein-spezifische Funktionen.

1.2.2.2 STAT Familie

Bei den Säugetieren existieren sieben verschiedene STAT Moleküle. STAT1 bis STAT6 inklusive STAT5a und STAT5b. In ihrer Größe liegen sie bei 750 bis 850 AS und 90 bis 115 kDa. Evolutionär sind sie vor den Janus Kinasen entstanden. Bisher wurden sie in Schnecken, Würmern, Insekten und Vertebraten nachgewiesen, jedoch nicht in Pilzen und Pflanzen (Darnell, Jr., 1997). Dementsprechend findet man sie auch außerhalb des Jak/STAT Signalweges. So gibt es Rezeptoren, die eine Tyrosinkinase im Rezeptor integriert haben und damit STATs phosphorylieren. Als Beispiele hierfür kann man bestimmte Wachstumsfaktoren wie den „epidermal growth factor“ oder „platelet-derived growth factor“ nennen. Das für die Transkription inaktive STAT liegt zytoplasmatisch vor und wird nur nach Rezeptor/Ligandenbindung an den intrazellulären Teil des Rezeptors rekrutiert. Dort bindet es über seine SH2 Domäne an phosphorylierte Tyrosine. Diese Bindung ist hoch spezifisch und führt zur gezielten STAT Aktivierung an bestimmten Rezeptoren. STAT eigene Tyrosine werden phosphoryliert und bilden eine neue Bindestelle für die SH2 Domäne von anderen STAT Molekülen. Die aktivierende Tyrosinphosphorylierung findet, z.B. bei STAT1, an der AS Y701 statt (Brierley und Fish, 2005). Neben der Tyrosin-Phosphorylierung können STATs zusätzlich noch an spezifischen Serinresten phosphoryliert werden (Frank *et al.*, 1997; Beuvink *et al.*, 2000; Lafont *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Belegt ist dies für STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a und STAT5b. Für die volle transkriptionelle Aktivität ist diese Phosphorylierung unumgänglich (Horvath, 2000). Bei STAT1 wird Serin 727 durch ein Mitglied der Protein Kinase C (PKC) Familie, PKC δ , phosphoryliert (Uddin *et al.*, 2002; Deb *et al.*, 2003). Nach Dimerisierung, welche sowohl aus Homo- als auch Heterodimeren bestehen kann, wird das Dimer durch die beiderseits vorhandene SH2 Domäne, die an das jeweils phosphorylierte Tyrosin des anderen STAT Moleküls bindet, stabilisiert (Abb. 1.10), und der STAT Komplex transloziert als aktivierter, dimerisierter STAT Transkriptionsfaktor in den Kern, bindet an Promoterelemente in der DNS und reguliert die Transkription.

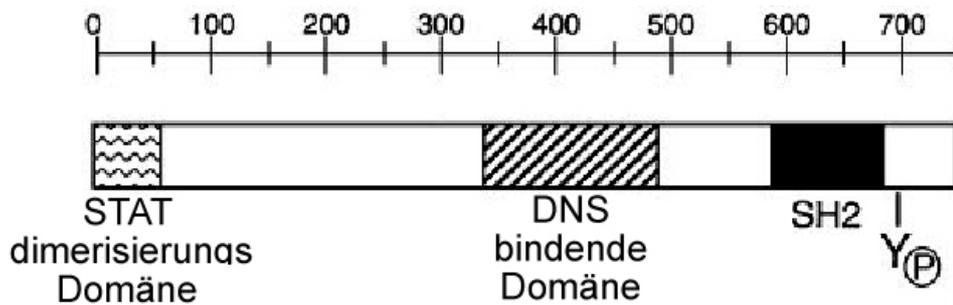


Abb. 1.10: Struktur der STAT Moleküle. Am Carboxyl-Ende die beiden phosphorylierten AS Tyrosin und Serin; sowohl C- als auch N-terminal liegt eine Domäne zur Dimerisierung zweier STAT Moleküle. C-terminal die SH2 Domäne. Zentral gelegen die DNS Binde Domäne (Leonard und O'Shea, 1998).

Der nukleäre Import erfolgt durch die Interaktion von Importin $\alpha 5$ mit einem Arginin/Lysin reichen Bereich in der DNS Bindedomäne (Fagerlund *et al.*, 2002; Melen *et al.*, 2001; McBride *et al.*, 2002). Importin $\alpha 5$ bindet wiederum an Importin $\beta 5$, welches den gesamten Komplex an die Kernporen verlagert und den Eintritt ermöglicht (Fagerlund *et al.*, 2002).

Nicht alle STAT Moleküle können untereinander dimerisieren. So sind Heterodimere bei STAT1 mit STAT2 bzw. STAT3 (Horvath und Darnell, 1997) und STAT5a mit STAT5b (Mui *et al.*, 1995) möglich. Ebenso ist von STAT2 kein Homodimer, sondern nur das Heterodimer mit STAT1 bekannt.

Von den STAT defizienten Maus Mutanten sind alle lebensfähig mit Ausnahme von STAT3. Hier tritt aufgrund früher embryonaler Störungen (Tag e6,5) ein Wachstumsstopp auf und somit sterben die Embryonen ab (Takeda *et al.*, 1997). STAT5 defiziente Tiere erreichen ein Alter von maximal sechs Wochen, sind signifikant leichter verglichen zu Wildtyp-Tieren und haben Defekte in der Bildung von Immunzellen. So sind $CD8^+$ T-Zellen gänzlich abwesend. Die B-Zellreifung arretierte im Stadium der pre-pro-B-Zelle (Hoelbl *et al.*, 2006).

1.2.3 Hämatopoese

Die Mehrzahl der ausdifferenzierten Blutzellen haben eine kurze Lebensdauer von teilweise nur wenigen Tagen oder Wochen, bevor sie abgebaut oder zerstört werden. Ein ständiger Nachschub mit neuen Zellen muss daher vom Organismus gewährleistet sein. Dieser Prozess der Blutzellneubildung wird als Hämatopoese bezeichnet. Diese muss in Zeiten von Infektionen oder anderen schwerwiegenden Veränderungen, die zu Blutverlust führen, schnell reagieren können, um einen übermäßigen Verlust von Blutzellen auszugleichen. Kommt es hierbei zu Fehlern, drohen Erkrankungen wie Anämien oder Leukämien. Für den geregelten

Ablauf ist daher ein kompliziertes System mit löslichen Botenstoffen, deren Rezeptoren und zellulären Interaktionen nötig.

Die einzelnen Zelltypen wie Erythrozyten und Leukozyten entstehen aus pluripotenten Stammzellen. Diese wandern während der Embryogenese in die blutbildenden Organe der fötalen Leber, der Milz und dem Knochenmark ein. Beim erwachsenen Mensch erfolgt die Blutbildung nur noch im Knochenmark. Von den Blutstammzellen lassen sich zwei Hauptlinien ableiten. Zum einen die lymphatische und zum anderen die myeloische Zelllinie (Abb. 1.11). Aus der lymphatischen Linie gehen die T-, B- und NK-Zellen hervor, aus der myeloischen Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Megakaryocyten, Mastzellen und Erythrozyten (Kuby J et al., 2004). In welche Richtung sich eine Zelle entwickelt bzw. differenziert, wird durch die vorhandenen Wachstumsfaktoren, in diesem Fall koloniestimulierende Faktoren („colony stimulating factors“ CSF), bestimmt (Abb. 1.11). Neben den CSF haben auch Interleukine und Erythropoietin eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Interleukine sind für die weitere Differenzierung in der lymphatischen Zelllinie und CSF für die Zellen der myeloischen Zelllinie verantwortlich. Für die Ausbildung von Erythrozyten ist zusätzlich Erythropoietin (Epo) unumgänglich. Die für die Differenzierung verantwortlichen Zytokine vermitteln ihr Differenzierungssignal über die Bindung an die spezifischen Zytokin-Rezeptoren. Bei den Klasse I und Klasse II Zytokinrezeptoren wird das Signal intrazellulär über den Jak/STAT Signalweg in den Zellkern weitergeleitet.

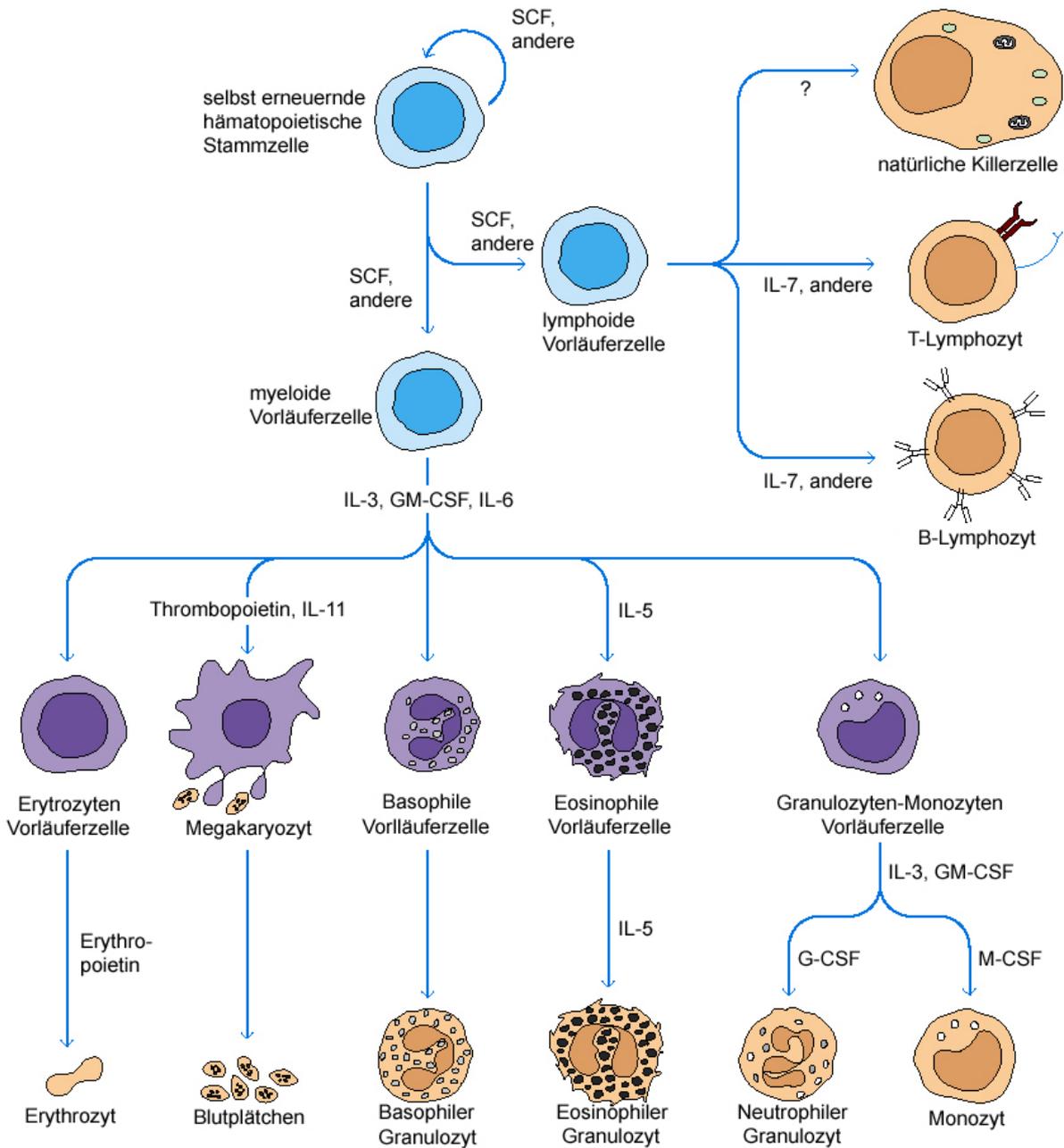


Abb. 1.11: Regulation der Hämatopoese durch Zytokine, die die Proliferation und Differenzierung von verschiedenen hämatopoetischen Zellen stimulieren. IL = Interleukin, CSF = Kolonie stimulierender Faktor, SCF = stem cell factor. Stammzellen in blau, Vorläuferzellen in violett und ausdifferenzierte Zellen in braun (Kuby J et al., 2004).

Kommt es im Blut zu einer niedrigeren Sauerstoffkonzentration wird Epo vermehrt gebildet und somit auch die Bildung von Erythrozyten gesteigert. Damit kann der niedrige Sauerstoffgehalt durch eine höhere Zahl an Erythrozyten mittelfristig aufgefangen werden. Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen brauchen für ihr Überleben ein Epo Signal. Ohne dieses gehen sie in Apoptose (S Gilbert, 2000). Es ist somit überlebensnotwendig im Organismus ein konstantes Niveau dieses Botenstoffes zu haben (Wu *et al.*, 1995). Die Signalweiterleitung von Epo in den Zellen erfolgt mittels des homodimeren Erythropoietin-

Rezeptors und dem Jak-STAT Signalweg (Wojchowski et al., 1999). Das Epo Signal führt intrazellulär zu einer Aktivierung von Jak2 und anschließender Phosphorylierung von STAT5a und STAT5b mit folgender Dimerisierung und Translokation in den Zellkern. Jak2 defiziente Tiere sind nicht mehr in der Lage die Bindung von Epo an den EpoR zu signalisieren und somit die Transkription Epo abhängiger Gene für die Blutbildung aufrecht zu halten (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998).

1.2.4 Infektionsmodell Vaccinia

Das Immunsystem muss Infektionen von Erregern wie Pilze, „Würmer“ und anderen Parasiten, Bakterien und Viren abwehren. Durch das humorale Immunsystem werden infizierte Zellen oder Erreger wie Viren direkt mit löslichen Proteinen des Komplementsystems oder spezifischen Antikörpern markiert. Dies kann zum einen zu einer Agglutination, Opsonierung und Phagozytose führen und zum anderen die Infektion neuer Zellen durch Viren verhindern, indem virale Rezeptoren oder eine Membranfusion blockiert wird (Kuby J, 1998). Neben der humoralen Immunabwehr gibt es auch zelluläre Abwehrmechanismen. So können zytotoxische T-Zellen (T_C) mit Virus infizierte Zellen gezielt abtöten und so die weitere Virenproduktion stören. Alternativ sind NK-Zellen und Makrophagen in der Lage infizierte Zellen zu töten und zu phagozytieren. Ein weiterer direkt antiviraler, jedoch nicht minder wichtiger, Effekt sind die von T_H - und T_C -Zellen ausgeschütteten Interferone (siehe Kapitel 1.2.1). Manche Viren sind jedoch in der Lage diese Abwehrmechanismen zu umgehen. Influenza hat eine hohe Mutationsrate und erzeugt ständig leicht abgewandelte Proteine, die vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden. Somit kann das Immunsystem nicht mehr gegen den Erreger vorgehen. Es muss sich ständig an die Veränderungen anpassen und verliert somit an Effektivität. Viren sind zusätzlich in der Lage direkt gegen zelluläre Abwehrmechanismen vorzugehen (Hengel et al., 1999). So erzeugen manche Viren Proteine, die an Komplementfaktoren binden und somit diesen Weg der Immunabwehr blockieren. Typische Beispiele hierfür sind das Vaccinia Virus und Herpes simplex Virus (Kuby J, 1998). Vaccinia Virus kann zusätzlich die antiviralen Effekte von Interferonen zwar nicht abwehren, aber dieses selbst von den Zellen fern halten. So exprimieren Vaccinia Virus infizierte Zellen einen im Virus Genom codierten löslichen $IFN\gamma$ Rezeptor, der extrazelluläres $IFN\gamma$ bindet und somit abfängt (Alcami und Smith, 1995). $IFN\gamma$ kann nur innerhalb der eigenen Art bzw. Familie wirken. Humanes Interferon γ wirkt also

noch auf Affenzellen, bindet jedoch nicht mehr an den IFN γ -Rezeptor von z.B. Mauszellen. Dies erklärt möglicherweise auch die Wirtsspezifität des Vaccinia Virus. Da IFN γ selbst sehr artspezifisch ist, kann dieser Anti-Virusmechanismus nur im tatsächlichen Wirt erfolgreich sein (Takaoka und Yanai, 2006). Gegen Typ I Interferone hat Vaccinia die selbe Strategie entwickelt. Ein Unterschied ist hierbei, dass die Speziespezifität nicht mehr gegeben ist, da Typ I Interferon nicht so restriktiv für die eigene Art ist (Symons *et al.*, 1995; Colamonici *et al.*, 1995). Vaccinia erreicht dies durch einen veränderten Rezeptor. Dieser bindet nicht, wie der zelluläre Rezeptor, nur den C-Terminus des Interferons, sondern kann auch den N-Terminus binden. Der C-Terminus von Typ I Interferon bestimmt die Speziespezifität (Liptakova *et al.*, 1997). Inwieweit die Y1007/8F Mutation in Jak2 eine immunologische Relevanz auf die Abwehr von Vaccinia Virus im Infektionsmodell hat sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

1.3 Zielsetzung

1.3.1 PUMA-G

Zyklisches Adenosin-Monophosphat ist einer der bedeutendsten sekundären Botenstoffe in Zellen. Dementsprechend ist der intrazelluläre cAMP Spiegel einer strengen und vielseitigen Regulation unterworfen. So wird über aktivierendes oder inhibierendes G-Protein das Enzym Adenylat Cyclase bei der cAMP Synthese beeinflusst. Extrazelluläre Signale, welche über G-Proteine signalisieren binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Einer dieser G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist der GPCR GPR109A (Human: HM74A, Maus: PUMA-G).

In diesem Teil der Arbeit war ein Ziel neue, bisher unbekannte Funktionen von PUMA-G im immunologischen Kontext zu entschlüsseln. Der bisherige Kenntnisstand aus der Literatur zeigt allgemein eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Zusammensetzung von Lipiden im Blut und den Fettsäurestoffwechsel. Inwiefern PUMA-G in Immunzellen, im Speziellen in Makrophagen, diese Funktion oder eventuelle weitere Funktionen ausübt ist bis dato unbekannt und war deshalb ein Thema dieser Arbeit. So sollte der Einfluss von PUMA-G auf eine Hauptfunktion der Makrophagen, die Phagozytose, untersucht werden. Des Weiteren sollte der PUMA-G defiziente Mausstamm auf morphologische Unterschiede, in Bezug auf den Fettstoffwechsel, genauer betrachtet werden.

1.3.2 Jak2Y1007/8F

Da die Jak2 defiziente Maus embryonal am Tag e12,5 aufgrund einer akuten Anämie verstirbt, kann die immunologische Funktion von Jak2 bisher nur in *in vitro* Experimenten untersucht werden (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998).

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Entwicklung und Charakterisierung einer aktivierungsdefizienten Mausmutante für Jak2 indem im „activation loop“ der Kinase die beiden Aminosäuren 1007 und 1008 von Tyrosin zu Phenylalanin mutiert wurden. *In situ* Daten belegen, dass es für eine Aktivierung von Jak2 zwingend erforderlich ist, diese beiden Tyrosine zu phosphorylieren.

Zum anderen sollte geklärt werden, ob die Mutation Y1007/8F *in vivo* essentiell für immunologisch relevante Signale ist.

Im konventionellen „Knock out“ wurde jegliche Funktionalität von Jak2 unterbunden. Inwiefern durch die Existenz von Y1007/8F mutiertem Jak2 Protein Kinase-unabhängige essentielle Funktionen identifiziert werden können, steht daher im Fokus dieser Arbeit. Hierzu sollte die Generierung einer Jak2Y1007/8F mutierten Mauslinie durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ampicillin Natriumsalz	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
(D)- β -Hydroxybutyrat	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
CpG1668	Tib Mol Biol, Berlin
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
N,N'-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DMEM Medium	GibcoBRL, Eggenstein
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL	Amersham, Braunschweig
EDTA	Riedel-de Haen, Seelze
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Eosin Y	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FKS (Fötale Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
FKS (Fötale Kälberserum) low Endotoxin	Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ, USA
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Hamburg
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex, Aachen
Geneticin (G418)	GibcoBRL, Eggenstein
IL1 β	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
Hämalaun	Merck, Darmstadt
hCG (humanes Choriongonadotropin)	Intervet, Unterschleißheim
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma, Taufkirchen
Kaisers Glycerin Gelatine	Merck, Darmstadt

Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
LPS	Sigma, Taufkirchen
LTA	Thomas Hartung, Lehrstuhl für Biochemische, Pharmakologie, Universität Konstanz
Marker 1kb DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
mIFN α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
mIFN β	PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA
mIFN γ	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
NP - 40	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nikotinsäure	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran [®]	Roth, Karlsruhe
pIC (Polyinosinic-Polycytidylsäure Natrium Salz	Sigma, Taufkirchen
PMSG („pregnant Mare Serum Gonadotropin“)	Intervet, Unterschleißheim
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
VLE RPMI-CLICKS 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Schuchart, Hohenbrunn
Tissue Tec	Vogel GmbH & Co KG, Gießen
TNF α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Tween 20	Merck, Darmstadt
X- Gal (X-Galaktopyranosid)	GibcoBRL, Eggenstein
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Radiochemikalien

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

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

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	BioLabs, New England
cDNS Synthese Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DNS T4 Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNS Taq-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
M-MLV	Invitrogen, Karlsruhe
Pronase E	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	BioLabs, New England
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	GibcoBRL, Eggenstein
	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
RNase out	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien	Bezugsquelle
Filme	Hyperfilm™-ECL, Amersham, Braunschweig
Filterpapier Whatman 3MM	VWR, Darmstadt
fluoresziernede Microspheres	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
NucTrap® Sonden-Aufreinigungssäulen	Stratagene, Heidelberg
Nylonmembran, Gene Screen Plus	NEN® Research Products, USA
Nylonmembran, Protran BA 85 Cellulosenitrate	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Parafilm M	American National Can™, Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	Falcon, New Jersey, USA
	Corning, New York, USA
QIAGEN Plasmid Isolierungskits	QIAGEN, Hilden
Rediprime DNA labelling system	Amersham, Braunschweig
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Cyclic AMP EIA Kit, Format A	Biomol, Hamburg
PKA Kinase Activity Assay Kit	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	BBD 6220, Heraeus, Hanau
Elektrophorese von DNS und RNS	Hoefer, Amstetten
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen
Kühlzentrifugen	Sorvall® RC 26 PLUS, Heraeus, Hanau Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau Rotor 2250 mit Mikrotiterschaukeln Omnifuge 2,0 RS, Heraeus, Hanau
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
PCR Maschinen	T3 Thermoblock, Biometra, Göttingen T1 Thermoblock, Biometra, Göttingen TGradient, Biometra, Göttingen
Phosphoimager	FLA 3000, FujiFilm, Düsseldorf
Photometer	Gene Quant, Pharmacia Biotech
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau
ELISA Reader	Sunrise, Tecan, Crailsheim
Zellkulturschüttler	3015, GFL, Burgwedel
Crosslinker	BIO-LINK BLX, Biometra, Göttingen
FACS	FACS Calibur, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	TE2000-S, Nikon, Düsseldorf
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa, Köln
Realtime - PCR Maschine	IQ5 I-Cycler, Biorad, München
Drehinkubatoren	OV3, Biometra, Göttingen
Binokular	Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Oberkochen MZ 16, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Thermoblöcke	Termomixer Compact, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Wasserbad	DRI Block, Techne, Jahnsdorf WNB22, Memert, Schwabach 1092, GFL, Burgwedel
Ultraschall Anlage	E100, Lauda, Lauda-Königshofen Branson-Sonifier 450, G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Blutzuckermessgerät	Accu Check Sensor Comfort, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Elektroporations Gerät	Gene Pulser II, Biorad, München

2.3 Medien und Puffer

2.3.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung
Auftragspuffer für DNS	0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylen Cyanol FF 15% Ficoll Typ 400
Laufpuffer (Western Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris Base 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7,7
Transferpuffer (20 x) (Western Blot)	25 mM Bicine 25 mM Bis Tris 1 mM EDTA bei 4°C aufbewahren
Schindler Puffer (Western Blot)	1 % NP-40 oder Triton X 100 100 mM Tris/HCl pH 8,0 20 % Glycerin 0,2 mM EDTA bei 4°C aufbewahren
TBS-T (20 x)	200 mM Tris/HCL pH 7,4 3 M NaCl 2 % Tween
Lysepuffer (PKA Assay)	20 mM MOPS 50 mM β -Glycerolphosphat 50 mM NaFl 1 mM Na_3VO_4 5mM EGTA 2 mM EDTA 1 % NP - 40 1 mM DTT 1 mM Benzamidin 1 mM PMSF 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin 10 mg/ml Aprotinin

PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM pH 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
Lösung I (Alkalische Lyse)	50 mM 25 mM 10 mM	Glukose Tris EDTA
Lösung II (Alkalische Lyse)	0,2 N 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung III (Alkalische Lyse)	60,0 % 11,5 % Eisessig 28,5 % H ₂ O _{bidest}	Kaliumacetat
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50 % 48 % 2 %	Phenol, pH = 8,0 Chloroform Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 EDTA, pH = 8,0
TNE	10 mM 100 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 NaCl EDTA, pH = 8,0
Proteinase K	10 mg/ml	Proteinase K in H ₂ O _{bidest} gelöst
Pronase E	10 mg/ml 10 mM 10 mM	Pronase E (10mg/ml) Tris, pH = 8,0 NaCl
		Selbstverdau 1h bei 37°C
Verdaulösung	500 µl 50 µl 7,5 µl 25 µl	TNE SDS 10 % Proteinase K Pronase E
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM 20 mM 2 mM	Tris, pH = 8,0 Eisessig EDTA
6 x DNS-Auftragspuffer	15 % 0,05 % 0,05 %	Ficoll Typ 400 Bromphenolblau Xylencyanol

2 x RNS Auftragspuffer	48,0 % (v/v)	Formamid
	10,0 % (v/v)	10 x MOPS
	17,3 % (v/v)	Formaldehyd
	14,0 % (v/v)	DEPC-H ₂ O
	5,3 % (v/v)	Glyzerin
	5,3 % (v/v)	Bromphenolblau
10 x MOPS-Puffer	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat·3H ₂ O
	10 mM	EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O
	pH = 7,2	
50 x Denhardt	1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	1 % (w/v)	Ficoll
	1 % (w/v)	BSA
20 x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
50 x TAE	2 M	Tris, pH = 8,0
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA
Hybridisierungslösung (Southern)	5 %	Dextransulfat
	0,5 %	SDS
	0,03 %	NaCl
Waschlösung I (Southern)	2 x	SSC
	0,1 %	SDS
Waschlösung II (Southern)	0,2 x	SSC
	0,1 %	SDS
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
10x PCR-Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Gelatine

2.3.2 Medien für die Bakterienkultur

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

Tabelle 2-1: Bakterienkulturmedium

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

Um Festmedium zu erhalten wurde Medium mit zusätzlich 15 g Agar pro Liter verwendet. Bakterien in Flüssigkulturen wurden bei 37°C im Schüttelkolben und Bakterien auf Agarplatten bei 37°C im Brutraum inkubiert.

Bakterien auf Agarplatten wurden im Kühlschrank bei 4°C mit Parafilm verschlossen und maximal 4 Wochen aufbewahrt. Für eine Langzeitlagerung wurden Bakterien Flüssigkulturen mit 50% sterilem Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2-2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

	Zelltypen				
	ES	EF	Makrophagen	BMDMC	Einfriermedium
Grundmedium	DMEM	DMEM	UPMI	UPMI	DMEM für ES UPMI für MΦ
Zusätze					
FKS*	15 %	5 %	10%	10%	25 %
LIF**	1 %				
DMSO					10%
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	
Streptomycin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	
β-Mercapto- ethanol	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	
M-CSF***				15%	
Behandlung					
Mitomycin C		10 µg/ml	2 h	30 min	

* Für ES und EF speziell getestetes ES-FKS, für Makrophagen und BMDMC getestetes Endotoxin freies FKS

** LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugegeben

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

2.4 Antibiotika und Medienzusätze

2.4.1 Antibiotika

Für eine positive Selektion Plasmid tragender Bakterien wurde den Kulturmedien Ampicillin, Kanamycin oder Erythromycin beigefügt.

Tabelle 2-3: Verwendete Antibiotika

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert	100 µg/ml
Erythromycin	5 mg/ml in H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert	5 µg/ml

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

Für eine Blau-Weiß Selektion von transformierten Bakterien wurde dieses Analogon des natürlichen Substrats der β-Galaktosidase 20 - 30 Minuten vor Verwendung auf die Agarplatten ausgestrichen.

Die Voraussetzung für eine Blau-Weiß Selektion sind Bakterienstämme, die einen Defekt im *lacZ* Gen besitzen. Bakterien, die mit einem funktionstüchtigen *lacZ* Gen transformiert wurden, können eine aktive β-Galaktosidase bilden und das Substrat X-Gal hydrolysieren. Dabei oxidiert 5-Brom-4-chlorindoxyl an Luft spontan zu dem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo, der Klone mit leerem Vektor blau färbt. Klone, die im eingebrachten *lacZ* Gen eine Insertion besitzen bleiben weiß.

Tabelle 2-4: X-Gal Gebrauchslösung

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

2.4.3 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid)

Bei der Verwendung von Bakterienstämmen, die den *lac*-Repressor überexprimieren, wurde den Festmedien IPTG zur Induktion der β-Galaktosidase zugegeben, um eine farbliche Insertionsselektion zu ermöglichen.

Tabelle 2-5: IPTG Gebrauchslösung

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

2.5 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.5.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2-6 sind die im Labor verwendeten Bakterienstämme für Klonierungszwecke oder Phagozytoseexperimente unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2-6: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
E. coli XL1-blue	endA1, hsdR17, thi-1, supE44, recA1, relA1, gyrA96, Δ(lac), (F'proAB), lacI ^q ZΔM15, Tn10 (Tet ^R)	Stratagene
E.coli DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	(Hanahan, 1983)
GFP - L. monocytogenes	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium stabil mit GFP transfiziert	Chakraborty, Gießen

2.5.2 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 2-7 aufgelistet.

Tabelle 2-7: Verwendete Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
Ana-1	Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen, immortalisiert mittels J2 Retrovirus	(Cox et al., 1989)
BMDMC	Kultivierung aus Knochenmarksvorläuferzellen mit M-CSF	
L-929	Fibroblasten	(Sanford KK und et al., 1948)
CD1 EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 postcoitum aus CD1 Embryonen	(Wurst und Joyner, 1993)
ES-Zellen E14.1	embryonale Stammzellen aus dem Mausstamm 129/SvJ Ola gewonnen	(Kuhn et al., 1991)
STAT1 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten	(Marie et al., 1998)
Jak2 ^{-/-} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 postcoitum aus Jak2 ^{-/-} Embryonen	(Neubauer et al., 1998)
Jak2 ^{m/m} EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 postcoitum aus Jak2 ^{m/m} Embryonen	In dieser Arbeit generiert

2.5.3 Versuchstiere

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tieren handelte es sich überwiegend um Wildtyp Tiere des Mausstammes C57BL/6 und C57BL/6 x 129/SvJ Ola. Einige Versuche wurden an PUMA-G defizienten Tieren (Huang et al., 1993; Schaub et al., 2001) und an in dieser Arbeit generierten Jak2^{+m} Tieren durchgeführt. Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet.

2.6 Primer, Realtime - PCR - Sonden und Antikörper

2.6.1 Verwendete Primer

Alle in diesem Kapitel aufgelisteten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) bezogen. Die in der Tabelle 2-8 angegebenen Primer wurden nur für Realtime - PCR Reaktionen nach Roche eingesetzt.

Tabelle 2-8: Realtime - PCR - Primer

Primername	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
PUMA-GExiqon 5'	ATC ACA CGG CAA GGG ATG	PUMA-G Realtime - PCR
PUMA-GExiqon 3'	CGT TCC TGA CGG ACA ACT ATG	PUMA-G Realtime - PCR
β-Aktin left	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	β-Aktin Realtime - PCR
β-Aktin right	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	β-Aktin Realtime - PCR
IRF1 Sense	GAG CTG GGC CAT TCA CAC	IRF1 Realtime - PCR
IRF1 Antisense	TCC ATG TCT TGG GAT CTG G	IRF1 Realtime - PCR
IRF2 Sense	GCA TGA GTG AGC TCT ACC CTCT	IRF2 Realtime - PCR
IRF2 Antisense	CTT CCT CCA GTG TGG TCT CC	IRF2 Realtime - PCR
IRF5 Sense	GAT GGG GAC AAC ACC ATC TT	IRF5 Realtime - PCR
IRF5 Antisense	GCT TTT GTT AAG GGC ACA GC	IRF5 Realtime - PCR
IRF8 Sense	GAG CCA GAT CCT CCC TGA CT	IRF8 Realtime - PCR
IRF8 Antisense	GGC ATA TCC GGT CAC CAG T	IRF8 Realtime - PCR
Stat1 Sense	TGA GAT GTC CCG GAT AGT GG	Stat1 Realtime - PCR
Stat1 Antisense	CGC CAG AGA GAA ATT CGT GT	Stat1 Realtime - PCR
Stat3 Sense	GCA GAG ATG TGG GAA TGG AG	Stat3 Realtime - PCR
Stat3 Antisense	TCA GTC TCG AAG GTG ATC AGG	Stat3 Realtime - PCR
Stat4 Sense	CGG CAT CTG CTA GCT CAG T	Stat4 Realtime - PCR
Stat4 Antisense	TGC CAT AGT TTC ATT GTT AGA AGC	Stat4 Realtime - PCR
CXCL9 Sense	CTT TTC CTC TTG GGC ATC AT	CXCL9 Realtime - PCR
CXCL9 Antisense	GCA TCG TGC ATT CCT TAT CA	CXCL9 Realtime - PCR
CXCL10 Sense	GCT GCC GTC ATT TTC TGC	CXCL10 Realtime - PCR
CXCL10 Antisense	TCT CAC TGG CCC GTC ATC	CXCL10 Realtime - PCR
CXCL11 Sense	CAA AGC CCA GGC AGA GAG	CXCL11 Realtime - PCR
CXCL11 Antisense	CCC TGT TTG AAC ATA AGG AAG C	CXCL11 Realtime - PCR
INDO Sense	GGG CTT TGC TCT ACC ACA TC	INDO Realtime - PCR
INDO Antisense	AAG GAC CCA GGG GCT GTA T	INDO Realtime - PCR
mGBP2 Sense	TGA GTA CCT GGA ACA TTC ACT GAC	mGBP2 Realtime - PCR
mGBP2 Antisense	AGT CGC GGC TCA TTA AAG C	mGBP2 Realtime - PCR
PKR Sense	GCG AGC AAG GCT TTA ACA TAA	PKR Realtime - PCR
PKR Antisense	AGA CAC TGA TAC TGT CCG TTG G	PKR Realtime - PCR

In folgender Tabelle 2-9 sind die Primer aufgelistet, die in der "Screening PCR" für den Nachweis der homologen Rekombination der Jak2 Rekombinationsvektoren in ES-Zellen eingesetzt wurden.

Tabelle 2-9: Screening PCR - Primer

Primername	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
HSV-TK Promoter	ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG	Screening PCR 1
Screen Pr3	TAG CTC AAT ACA AAG CAT AGG	Screening PCR 1+2
Screen Pr1	CTT TTA TCA TCA TGG ACC CAG	Screening PCR 1+2
Neo pEasyflox 5'	GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG	Screening PCR 2

In Tabelle 2-10 sind alle Primer aufgelistet, die für die Generierung der Targetvektoren für das mutierte *jak2* Allel verwendet wurden.

Tabelle 2-10: Klonierungsprimer zur Erstellung der Targetvektoren

Primername	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Primer k Arm 5'	ACT CCG GCC GCT TAA TCA GTA AAA TAC AGC ACA AG	Jak2 kurzer Arm 1
Primer k Arm 3'	TAA GCG GCC GGA GGG AAA AGT GCT AAA CTG AAC ATG	Jak2 kurzer Arm 1
Primer l. Arm 5'	TGG GGA TCC GAA TCC TAT GCT TTG TAT TGA GC	Jak2 langer Arm 1
Primer l. Arm 3'	TCC GAG CTC GGG AGA GCA ACC TAT AAC CCA AG	Jak2 langer Arm 1
Primer Mut YY-FF 5'	GCA GGA CAA AGA ATT CTT CAA AGT AAA GGA GCC AGG GGA AAG C	mutagenese Primer
Primer Mut YY-FF 3'	CTG GCT CCT TTA CTT TGA AGA ATT CTT TGT CCT GCG GCA AGA C	mutagenese Primer
EasyPrimer kA 5'	GGA TCC GGG AAA AGT GCT AAA CTG AAC	Jak2 kurzer Arm 2
EasyPrimer kA 3'	GGA TCC GTA ATC AGT AAA ATA CAG CAC	Jak2 kurzer Arm 2
EasyPrimer lA 5'	TCT AGA GCT ATA TGT AAC TGA TTT AAG	Jak2 langer Arm 2
EasyPrimer lA 3'	TCT AGA CCG ACC ACT GAC TTT CTA TC	Jak2 langer Arm 2

Tabelle 2-11 zeigt verschiedene Primer, die zur Erstellung der Southern Sonden verwendet wurden.

Tabelle 2-11: Primer für Southern Sonden

Primernamen	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Jak2Southern 5'	GAA GCT GGG AAT TCT TTC TAC	Jak2 Southern Sonde 1
Jak2Southern 3'	GTT AAC ACT TCT TCC TTA AGG G	Jak2 Southern Sonde 1
Jak2 Southern Fo	CCTTATTGCAACCCACAGAG	Jak2 Southern Sonde 2
Jak2 Southern Re	CCATGACACCTACTCTTATG	Jak2 Southern Sonde 2

Die verwendeten Primer zur Genotypisierung der PUMA-G^{-/-} Mäuse und der Jak2^{+^m} sind in Tabelle 2-12 aufgelistet.

Das Primerpaar PUMA-G-sense/333-WT ist spezifisch für das PUMA-G Wildtyp-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 450 bp; das Primerpaar PUMA-G-sense/333-KO ist spezifisch für das KO-Allel und ergibt ein PCR-Produkt von 530 bp.

Das Primerpaar Jak2WTTyp 5' / Jak2Typ 3' amplifiziert spezifisch das Wildtyp-Allel mit einem Produkt von 206 Bp und die Primer Jak2TypB 5' und Jak2MutTyp 3' ergeben spezifisch ein Produkt in der Größe von 218 Bp für das mutierte Allel

Tabelle 2-12. Typisierungs PCR Primer für PUMA-G^{-/-} und Jak2^{+^m}

Primernamen	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
PUMA-G-sense	TCA GAT CTG ACT CGT CCA CC	PUMA-G Typisierungs PCR
333-KO	CCT CTT CGC TAT TAC GCC AGC	PUMA-G Typisierungs PCR
333-WT	CCA TTG CCC AGG AGT CCG AAC	PUMA-G Typisierungs PCR
Jak2WTTyp 5'	GCA GGA CAA AGA ATA CTA	Jak2 Typisierungs PCR
Jak2Typ 3'	CTC AAT ACA AAG CAT AGG	Jak2 Typisierungs PCR
Jak2TypB 5'	GTA GGA ATT CAG CCA TAT	Jak2 Typisierungs PCR
Jak2MutTyp 3'	GCT CCT TTA CTT TGA AGA	Jak2 Typisierungs PCR

2.6.2 Realtime - Sonden

Die Sonden für die Realtime - PCR wurden sowohl von der Firma Exiqon als auch von Firma Roche bezogen und sind in Tabelle 2-13 aufgelistet.

Tabelle 2-13: Sonden für Realtime - PCR

	Roche	Exiqon
β-Aktin	#106	#82
PUMA-G	#95	#71
IRF1	#2	#3
IRF2	#2	#3
IRF5	#97	#73
IRF8	#26	#18
Stat1	#99	#75
Stat3	#17	#14
Stat4	#48	#36
CXCL9	#1	#1
CXCL10	#3	#2
CXCL11	#66	#50
INDO	#22	#19
PKR	#17	#14
mGBP2	#17	#14

2.6.3 Verwendete Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2-14 aufgeführt.

Tabelle 2-14: Verwendete Antikörper

Epitop	Bemerkung	gekoppelt	Firma
α -CD3	-	PE	Becton Dickinson (BD) GmbH, Heidelberg
α -CD4	-	PE	BD
α -B220	-	PE	BD
α -CD19	-	PE	BD
α -CD31	-	PE	BD
α -CD11b	-	FITC	BD
α -CD11c	-	PE	BD
α -CD71	-	PE	BD
α -CD80	-	PE	BD
α -CD86	-	FITC	BD
α -Jak2 (C-20)	Peptid am Carboxyl-Ende	-	Santa Cruz
α -Jak1 (HR-785)	interne Jak1 Region	-	Santa Cruz
α -phospho STAT5	phospho Tyr 694	-	Epitomics
α -STAT5 β	AS 771-787	-	Imgenex
α - β Aktin	-	-	Sigma
α -phospho STAT1 Tyr	AS 694-705 phospho Tyr 701	-	Upstate
α -STAT1	36 AS des Carboxyl-Endes	-	Upstate
α -phospho STAT1 Ser	phospho Ser 727	-	Cell Signaling
Kaninchen IgG (H+L)	Sekundär Antikörper	HRPO	Dianova
Maus IgG (H+L)	Sekundär Antikörper	HRPO	Dianova

2.7 Plasmidvektoren

2.7.1 Ausgangsvektoren

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

Tabelle 2-15: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pBluescript	Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promoter, <i>lacZ</i> α -Fragment, rop-	Stratagene, Kalifornien USA
pCR II-TOPO	Vektoren zur direkten Klonierung von PCR Produkten Amp ^R , Kan ^R , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promoter, <i>lacZ</i> α -Fragment	Invitrogen, Karlsruhe
T neo K44	pMC1Neo poly A mit flankierenden loxP Sequenzen in pCR 2.1 Vektor	Pfeffer, Düsseldorf
pEasyFloX	Neo poly A mit flankierenden loxP mit flankierenden loxP, drittes loxP Signal, Thymidin Kinase, Amp ^R ,	Förster, Düsseldorf

2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide

Tabelle 2-16: Hergestellte Plasmide und Sonden

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
T neo K44 Jak2	T neo K44	Jak2 kurzer Arm Jak2 langer Arm 1	Targetvektor 1
pEasyFloX Jak2	pEasyFloX	Jak2 kurzer Arm Jak2 langer Arm 2	Targetvektor 2
5' Sonde 1	pCR II-TOPO	494 bp großes Fragment	5'-flankierende Sonde für Targetvektor 1
5' Sonde 2	pCR II-TOPO	546 bp großes Fragment	5'-flankierende Sonde für Targetvektor 2

2.8 Tierversuche

2.8.1 Superovulation

Um eine größere Zahl an Blastozysten zu erhalten wurden weibliche Mäuse superovuliert. Dazu wurde den Mäusen 10 U Follikelreifungs-Hormon („pregnant Mare Serum Gonadotropin“, PMSG) und 44 - 48 Stunden später 10 U humanes Choriongonadotropin

(hCG) intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse mit männlichen Mäusen verpaart. Die Ovulation erfolgt etwa 12 Stunden nach hCG Gabe. Nach weiteren 12 Stunden erfolgte die Untersuchung auf einen Vaginalpfropf (plug), der auf eine erfolgte Begattung hinweist. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf entdeckt wird, wird als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung bezeichnet. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 p. c. entnommen.

2.8.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten für die Kultivierung von ES-Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen am Tag 14 *post coitem* gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend aus dem Uterus präpariert, in PBS gewaschen und der Kopf und die fötale Leber entfernt. Das restliche embryonale Gewebe wurde mit einer Schere zerteilt, dann durch ein Sieb (100 µm Porengröße, Falcon, New Jersey, USA) gedrückt und in EF Medium kultiviert. Die vereinzelt EF-Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Anschließend wurde alle zwei Tage frisches Medium auf die Zellen gegeben. Bei konfluentem Wachstum wurden die EF-Zellen expandiert und als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.8.3 Generierung chimärer Mäuse

Um chimäre Mäuse aus den homolog rekombinierten ES-Zellen zu erhalten wurden diese in Blastozysten (Tag 3,5) von superovulierten C57BL/6 Spendertieren injiziert. Jeweils 10 - 20 der manipulierten Blastozysten wurden anschließend in eine scheinchwangere CD1 Ammenmutter in den Uterus transferiert. Nach 19 Tagen Tragzeit wurden die Nachkommen geboren. Nach weiteren sieben Tagen konnte anhand der Fellfarbe eine chimäre Maus von einer nicht manipulierten C57BL/6 Maus unterschieden werden.

2.8.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70 % EtOH semisteril entnommen. Für histologische Schnitte wurden die entnommenen Organe in Paraffin (Tissue Tec, Vogel GmbH & Co KG) eingebettet, auf Trockeneis tief gefroren und bei -80°C gelagert.

2.8.5 Blutzuckermessung

Zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels der Mäuse wurden den Tieren abends das Futter entzogen um bei der Messung am nächsten Morgen innerhalb der Versuchsgruppe gleiche Bedingungen zu erhalten. Für die Messung wurden die Tiere minimal an der Schwanzvene geritzt um einen Tropfen Blut in die Kapillare des Messgerätes (Accu Check Sensor Comfort, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) fließen zu lassen.

2.8.6 Körpergewichtsbestimmung der PUMA-G Mäuse

Die Gewichtsbestimmung der Tiere der Mauslinie PUMA-G und entsprechender Kontrolltiere wurde im SPF-Bereich des Tierstalls unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in einem Becherglas gewogen.

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 E. coli Transformation

Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* Bakterienstämme DH5 α und XL1 Blue, verwendet. CaCl₂ behandelte Zellen können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden (Cohen et al., 1972)

Durchführung:

Zu 100 μ l kompetenten Zellen auf Eis wurde 1 μ l β -Mercaptoethanol gegeben. Nach einer

10 minütigen Inkubation mit gelegentlichem Mischen erfolgte die Zugabe des Plasmids (ca. 1 ng). Nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis folgte ein 60 Sekunden dauernder Hitzeschock im 42°C heißen Wasserbad. Die so behandelten Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium eine Stunde bei 37°C im Heizschüttler inkubiert und anschließend auf antibiotikumhaltigem Agar ausplattiert. Die gepickten Kolonien wurden in LB-Medium mit 50 µg/ml Antibiotikum bei 37°C und 260 Upm inkubiert und die Plasmide isoliert. Ein Teil der transformierten Zellen wurde als Glycerolstock bei -80° C aufbewahrt.

2.9.2 Plasmidgewinnung

Für die Gewinnung von ausreichend großen Mengen an Plasmid-DNS wurde ein Kit von Qiagen[®] verwendet der nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse arbeitet (Birnboim und Doly, 1979).

Für die benötigten Plasmidmengen wurden Kulturen mit 200 ml LB-Medium angesetzt und bei 37° C über Nacht inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 300 ml Zentrifugenröhren bei 5000 Upm für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml P1 Puffer von Qiagen[®] gut resuspendiert, in 50 ml Reaktionsgefäße (Falcon) überführt und nach Zugabe von 10 ml P2 Puffer 5 min lysiert. Anschließend wurden 10 ml P3 Puffer zur Neutralisation zugegeben und gevortext. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Reaktionsgefäße 20 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Spritze (Qiagen[®]) auf Ionentauschersäulen von Qiagen[®] gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT Puffer behandelt wurden. Nach dem Durchlauf wurde mit QC Puffer (30 ml) zweimal gewaschen und mit 15 ml QF Puffer die Plasmid-DNS in 50 ml Falcontubes eluiert. Die Fällung der DNS erfolgte mit 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 4500 Upm und 20° C (5 min). Das Pellet wurde mit 10 ml 80% EtOH gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft angetrocknet. Die DNS wurde in einer geeigneten Menge H₂O_{bidest} gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.9.3 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden in Laminar-Flo Sicherheitswerkbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 7% CO₂ und

wasserdampfgesättigter Atmosphäre. In regelmäßigen Abständen erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Medium und spätestens bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Semiadhärente Zellen (zum Beispiel Ana1) wurden mit Medium abgespült und dann verdünnt ausplattiert. Die Zellablösung adhärenter Zellen (zum Beispiel embryonale Fibroblasten) erfolgte durch Inkubation der mit PBS gewaschenen Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von FKS enthaltendem Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen neu ausgesät.

Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung von Zellen wurden diese in DMSO-haltigem Medium in flüssigem Stickstoff bei ca. -192°C aufbewahrt. Jedes Einfrierröhrchen enthielt 3×10^6 Zellen.

Durchführung:

ES-Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (später inaktiviert mit Medium) und Plasmazellen nur mit Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden in kaltem Einfriermedium aufgenommen und langsam abgekühlt. Dies erfolgte durch 30 minütiges Abkühlen auf -20°C , dann ÜN bei -80°C mit anschließender dauerhafter Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten

Embryonale Stammzellen wurden auf mit Mitomycin C ($10\ \mu\text{g/ml}$) vorbehandelten EF-Zellen ($2\frac{1}{2}\ \text{h}$, 37°C) kultiviert, die notwendige Wachstumsfaktoren zum Wachstum der ES-Zellen sezernieren. Zusätzlich wurde dem ES-Medium LIF-Überstand ($1000\ \text{U/ml}$ Endkonzentration) zugegeben, um das Ausdifferenzieren der ES-Zellen zu verhindern. Undifferenzierte ES-Zellen erscheinen im Phasenkontrast - Mikroskop als runde bis ovale Kolonien mit einem glatten, doppelbrechenden Rand. Die ausdifferenzierten Kolonien erscheinen grau, matt und bilden Pseudopodien aus.

Kultivieren von BMDMC

Knochenmarkszellen wurden aus dem Femur der Maus ausgespült und in Petrischalen mit BMDMC Medium (Tabelle 2-1) kultiviert. Das im Medium enthaltene M-CSF veranlasst die Zellen dazu aus den Vorläuferzellen im Knochenmark zu Makrophagen ausdifferenzieren. Für eine konstante Versorgung mit frischem M-CSF Medium wurde alle drei Tage ein

Mediumwechsel durchgeführt. Nach zwölf Tagen Kultur waren fast ausschließlich Makrophagen vorhanden. Ausdifferenzierte Makrophagen erscheinen im Phasenkontrastmikroskop grau und granulär.

Kultivieren der Ana1 Zelllinie

Die Zellen der Ana1 Monozyten/Makrophagenlinie wurden in Makrophagenmedium (Tabelle 2-2) gehalten. Die semiadhärenten Zellen wurden nach konfluentem Wachstum von der Zellkulturschale gespült und verdünnt in frischem Medium ausgesät.

2.9.4 Elektroporation

Elektroporation der ES-Zellen

Die embryonalen Stammzellen wurden durch Elektroporation mit den Targeting-Vektoren für das mutierte Exon 21 von *jak2* und gefloxter Neomycin - Kasette transfiziert.

Durchführung:

Die ES-Zellen wurden in ausreichend großen Mengen auf 15 cm Zellkulturschalen (ca. 5×10^7 Zellen pro Platte) expandiert. Um die ES-Zellen von der Schale zu lösen wurden diese mit Trypsin/EDTA bei 37° C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin mit Medium inhibiert und die Zellzahl bestimmt.

Je Elektroporationsansatz wurden 6×10^6 ES-Zellen in 750 µl ES-Medium aufgenommen und diese mit 50 µl Vektor (in PBS gelöst) zu gleichen Mengen verteilt. Diese 800 µl Vektor-ES-Zellsuspension wurde in Elektroporationsküvetten überführt und auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgte bei 340 V und 250 µF (Gene Pulser II, Biorad, München). Hierbei sollte die Zeitkonstante im Bereich zwischen 3,6 und 4,0 liegen. Im Anschluss wurden die elektroporierten Zellen 10 min auf Eis gestellt und jeder Ansatz auf eine 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml ES-Medium gegeben.

Selektion rekombinanter ES-Zellklone

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

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen zwei Tage ohne Selektionsfaktoren in ES-Zell Medium kultiviert. Am dritten Tag erfolgte eine Zugabe von Geneticin (G418, 200 µg/ml) und am 5ten Tag zusätzlich für die Negativselektion Gancyclovir (2 mg/ml). Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 12-14 Tagen wurden die Kolonien mit PBS gewaschen, überschichtet und einzelne Klone mit einer sterilen Pipette und 20µl PBS in 96-well-Platten überführt. Eine Trypsin/EDTA Behandlung der Kolonien löste den Zellverband auf. Zur Bereitstellung von Wachstumsfaktoren wurden den vereinzelt Kolonien noch EF-Zellen zugegeben. Nach zwei Tagen Kultivierung wurden drei Replikate der 96-well-Platten hergestellt. Eine dieser Platten wurde bei konfluentem Wachstum in zwei 48-well-Platten überführt und als diese gut bewachsen waren bei -80°C tief gefroren. Das zweite Replikat wurde für das Screening nach positiv rekombinierten Klonen verwendet. Das dritte Replikat wurde bei -20°C nach dichtem Bewuchs tief gefroren.

2.9.5 FACS-Färbung und Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse ermöglicht es, Oberflächenmoleküle auf einzelnen Zellen zu detektieren. Hierzu werden Antikörper, die mit einem Farbstoff gekoppelt sind, welcher durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge Licht einer anderen speziellen Wellenlänge emittiert, verwendet. Diese Antikörper binden spezifisch an Moleküle. Durch Laser werden die Farbstoffe angeregt und die Intensität des emittierten Lichts in einem Detektor gemessen. In dieser Arbeit wurden Antikörper, die mit PE und FITC konjugiert waren, verwendet. PE und FITC werden mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt wobei PE Licht der Wellenlänge 575 nm und FITC Licht der Wellenlänge 517 nm emittiert.

Durchführung:

Zuerst wurden die Zellen aus der Kulturschale gelöst, gezählt und in Wells einer 96 well-Platte mit 2×10^5 Zellen pro Färbung gegeben. Die Reste des Kulturmediums wurden mit zwei Waschsritten FACS-Puffer entfernt. Dazu wurden die Zellen mit 150 µl Puffer für 4 Minuten mit 700 Upm bei 4°C zentrifugiert. Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern wurden 10 µl FC-Block zugegeben und die Zellen 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der spezifische Antikörper in einem Volumen von 30 µl zupipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis und im Dunkeln erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 150 µl FACS-Puffer, 4 minütiger Zentrifugation mit 700 Upm bei 4° C um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für die Messung wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer

aufgenommen.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software CellQuest Version 3.1 (FACS Calibur, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

2.9.6 Anfertigung Immun-histologischer Schnitte

Die zuvor entnommenen tief gefrorenen Organe wurden für Kryo-Schnitte an einem Cryostat und für Paraffin-Schnitte an einem Mikrotom in wenige μm dünne Schichten geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden Paraffinschnitte bei Raumtemperatur und Kryo-Präparate bei -80°C gelagert oder zur sofortigen weiteren Verarbeitung mit Aceton fixiert.

Für eine immunhistologische, fluoreszierende Färbung wurden die Präparate vier mal mit PBS gewaschen und mit $150\ \mu\text{l}$ primärem Antikörper in einer feuchten Kammer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein viermaliger Waschschrift mit PBS. Für eine haltbare Färbung wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Präparate in Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation) eingebettet.

2.9.7 Phagozytose Assay

Für die Bestimmung der Phagozytoserate von Makrophagen wurden fluoreszierende Microspheres verwendet. Hierfür wurden Makrophagen (Ana1 oder BMDMC) mit fluoreszierenden Latexkügelchen inkubiert und anschließend mikroskopisch und durchflusszytometrisch analysiert.

Durchführung:

5×10^5 unstimulierte/vorstimulierte Zellen wurden mit Medium in 3 ml Gesamtvolumen in die Schalen von 6-well-Platten pipettiert und anschließend vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden in jedes Well $2,5 \times 10^7$ fluoreszierende, im Ultraschallbad vereinzelte Microspheres mit einer sterilen Pipette gegeben und für definierte Zeiten im Brutschrank kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 15 ml Reaktionsgefäße aufgenommen und mit einer Pasteurpipette mit 2 ml FKS vorsichtig unterschichtet. Bei der anschließenden Dichtezentrifugation ohne Bremse bei 700 Upm und 4°C für 5 Minuten, trennten sich die freien Microspheres in der oberen Phase von den Zellen

im Pellet ab. Die Zellen wurden mit 200 µl Volumen in Wells einer 48-well-Platte gegeben und mit 1% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen konnten nun im Durchflusszytometer oder im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.9.8 Infektion von Fibroblasten mit Vaccinia Viren

In dieser Arbeit wurde ein Wildtyp Vaccinia Virus (VV) verwendet. Um zu testen, wie effektiv Zellen in der Lage sind Viren abzuwehren, werden Zellen mit bekannten Virusmengen infiziert und mehrere Tage inkubiert. Im Anschluss wird der Virustiter im Überstand durch eine Verdünnungsreihe bestimmt.

Durchführung:

Die Zellen wurden in die Vertiefungen von mehreren 24-well-Platten gegeben und bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer bestimmten Anzahl von VV (etwa 200 - 500 pfu/ml und 1:20 Viren pro Zelle) infiziert. Eine erste Platte wurde bei -20°C sofort tief gefroren und diente als Null-Wert. Der Vermehrungszyklus von VV in Fibroblasten ist nach ca. 18 bis 20 Stunden beendet und neue Viren infizieren die nächsten Zellen. Die so durch die virale Zelllyse hervorgerufenen Plaques lassen sich im Lichtmikroskop deutlich erkennen. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden weitere 24-well-Platten tief gefroren.

Die Bestimmung des Virustiters im Überstand der infizierten Zellen wurde mit einer Verdünnungsreihe und einer Infektion von Fibroblasten bestimmt. Hierfür wurden Fibroblasten konfluent in 48-well-Platten kultiviert und die Verdünnungsreihen der Überstände der primär infizierten Zellen zugegeben. Nach 24 bis 48 Stunden wurden in den einzelnen Wells der Platten die viralen Plaques gezählt und anhand der Verdünnungsreihe der Ursprungstiter bestimmt.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Isolierung chromosomaler DNS aus ES-Zellen und Schwanzbiopsien

Die ES-Zellen wurden von der Zellkulturschale mit Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen und Schwanzbiopsien in 500 µl Verdauungslösung in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgenommen und ÜN bei 56°C im Schüttler inkubiert.

Um Zellreste zu entfernen wurde für 2 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine zuerst mit Phenol/Chloroform und in einem zweiten Schritt mit Chloroform abgetrennt, wieder für 2 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert, und die DNS aus der wässrigen Phase mit 100 % Ethanol bei -20° C gefällt. Der DNS-Faden wurde mit einer 200 µl Pipettenspitze ausgesponnen, in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer geeigneten Menge H₂O_{bidest} aufgenommen.

2.10.2 Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe

Zur Isolierung von RNS aus Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und dann direkt in 1 ml TRIzol (Invitrogen) pro 1-5 x 10⁶ Zellen resuspendiert. Für die Extraktion der RNS wurden die Zellen 5 Minuten bei RT, nach Zugabe von 200 µl Chloroform weitere 3 Minuten inkubiert und bei 4°C, 8000 Upm für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 500 µl Isopropanol versetzt, geschüttelt, weitere 10 Minuten inkubiert (RT) und anschließend wieder bei 8000 Upm, 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und Abnehmen des Überstands wurde das trockene Pellet in 100 µl DEPC-H₂O bei 56°C gelöst.

2.10.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNS-Fragmenten. In einem elektrischen Feld wandert negativ geladene Nukleinsäure zur Anode. Hierdurch erfolgt in einem Agarosegel eine Auftrennung von DNS-Fragmenten nach

ihrer Größe, wobei kleine Fragmente schneller zur Anode wandern als große. Durch Zugabe von Ethidiumbromid in das Agarosegel fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht und das Bandenmuster der DNS-Fragmente kann mit einer Digitalkamera aufgezeichnet werden.

Durchführung:

Je nach aufzutrennenden Fragmentgrößen wird die Konzentration der Agarose variiert. Bei kleinen Fragmenten bis zu 500 bp wählt man bis zu 2% Agarose wohingegen für mehrere kB große Fragmente 0,8% ige Agarosegele erforderlich sind. Die Agarose wird in kochendem TAE-Puffer gelöst, abgekühlt und bei einer ca. 37°C warmen Agaroselösung kann Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugegeben werden. Die noch flüssige Agarose wird in Gelwannen mit einem Kamm für die Geltaschen, gegossen und bis zum Erstarren abgekühlt. Das erkaltete Gel wird mitsamt Wanne in eine Elektrophorese Apparatur gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die zuvor mit Auftragspuffer versetzten DNS-Proben werden in die Taschen des Gels pipettiert und je nach Gelgröße und Konzentration eine Spannung von 60 bis 150 V angelegt. Die Auswertung der Gel-Elektrophorese erfolgt durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht bei 280 nm.

Für eine weitere Verwendung der aufgetrennten Fragmente (z.B. für eine Ligation) können diese anstatt mit 280 nm mit 325 nm Bestrahlt werden und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) und Protokoll laut Hersteller.

2.10.4 cDNS Synthese

Für die Durchführung der Realtime - PCR (Siehe Kapitel 2.10.5) war das Umschreiben der RNS in DNS nötig. Hierfür wurden 1-3 µg RNS in 10 µl DEPC- H₂O gelöst. Zu der RNS wurden 1 µl oligodT, 1 µl dNTP pipettierte und der gesamte Ansatz anschließend bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und 4 µl 5x transkriptions Puffer, 2 µl DTT, 1 µl RNase out und 1 µl Reverse Transkriptase (MMLV) dazugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend auf 80 µl Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt.

2.10.5 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen, einzelsträngige DNS als Template für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um auf diesem Weg viele Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz zu erstellen (Mullis und Faloona, 1987). Nach Hitzedenaturierung hybridisieren spezifische Primer, die jeweils an die einzelsträngigen 3' Enden der zu amplifizierenden Sequenz binden. Die Verlängerung der DNS erfolgt durch eine thermostabile DNS-Polymerase. Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine wiederkehrende Schleife von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und DNS-Verlängerung über 30-35 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNS-Fragments.

Tabelle 2-17: Standard PCR - Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen
DNS	ca. 100 ng
Primer 1 (20 - 100 µM)	1 µl
Primer 2 (20 - 100 µM)	1 µl
10x Puffer (Kapitel 2.3.1)	5 µl
dNTP (Kapitel 2.3.1)	10 µl
Taq-Polymerase (5 Einheiten/µl)	1-2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Die Sequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Primer sind in Kapitel 2.6 angegeben.

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gemischt, kurz gevortext und abzentrifugiert. Vor dem Start der Reaktion wurde diese noch mit 50 µl Mineralöl beschichtet, um ein Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu vermeiden. Die Durchführung des Reaktionszyklus ist unter den in Tabelle 2-18 angegebenen Bedingungen nachzulesen.

Tabelle 2-18: Standard PCR - Bedingungen

Funktion	ohne Hotstart		mit Hotstart		
	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	
DNS-Denaturierung	5 min	95°C	5 min	95°C	
Taq - Zugabe (nur Hotstart)			10 min	80°C	
DNS-Denaturierung	1 min	95°C	1 min	95°C	x 30
Primerhybridisierung	30 sec	56-63°C	30 sec	56-63°C	
Extension	1 min 30 sec	72°C	1 min 30 sec	72°C	
Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	24 h	4°C	24 h	4°C	

2.10.5.1 Realtime - PCR („quantitative Echtzeit - Polymerase - Kettenreaktion“)

Zur Bestimmung der mRNA Menge eines bestimmten Gens kann eine quantitative PCR-Reaktion durchgeführt werden. Hierfür wird zusätzlich zum PCR-Ansatz eine cDNA spezifische, am 5'-Ende Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte (Fluorescein (FAM)) Sonde zum Reaktionsansatz gegeben. Diese markierte Sonde bindet spezifisch an das Amplifikat und kann über eine, nach erfolgter Amplifikation emittierte Fluoreszenz (518 nm) in speziellen Thermocyclern (IQ5 I-Cycler, Biorad, München) detektiert werden. Licht wird erst nach der Bindung an den amplifizierten DNS-Strang emittiert, da zusätzlich noch ein „Quencher“ am 3'-Ende an die Sonde gebunden ist, der die Fluoreszenz freier Sonde unterbindet. Nach der Bindung an das DNS-Amplifikat wird der Quencher abgespalten und Licht emittiert. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional mit der Menge der amplifizierten DNS an. Je nach Ausgangsmenge an cDNA-Template wird eine Mindestfluoreszenz nach wenigen oder vielen Zyklen erreicht.

In dieser Arbeit wurde ein System von Roche verwendet bei dem man mit einem definierten Satz an Sonden fast das gesamte Transkriptom von Mensch und Maus untersuchen kann. Dies wird durch kurze, nur 8-9 bp lange Sonden erreicht. In Tabelle 2-19 ist der Reaktionsansatz zur Durchführung der Realtime - PCR gezeigt.

Tabelle 2-19: Realtime - PCR - Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen
Mastermix	12,5 µl
Primer 1 (20 µM)	0,3 µl
Primer 2 (20 µM)	0,3 µl
spezifische Sonde	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	6,4 µl
cDNA	5 µl

In folgender Tabelle 2-20 sind die Bedingungen zur Durchführung der Realtime-PCR aufgezeigt.

Tabelle 2-20: Realtime - PCR - Bedingungen

Funktion	Dauer	Temperatur	
DNA-Denaturierung	7 min	95°C	x 40
DNA-Denaturierung	20 sec	95°C	
Primerhybridisierung / Extension	1 min	60°C	
Lagerung	∞	4°C	

2.10.6 Sequenzanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden alle DNS Sequenzierungen von der Firma GATC-Biotech durchgeführt.

2.10.7 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zum Klonieren von Vektoren eignen. Die durch Restriktionsverdau erstellten Fragmente chromosomaler DNS wurden auch als Sonden verwendet, um spezifische Sequenzen durch Hybridisierung zu identifizieren (Kapitel 2.10.8). Zur Überprüfung der einzelnen Plasmide wurden Restriktionsenzyme ausgesucht, die ein spezifisches Bandenmuster erzeugten. Für den Komplettdigestion von DNS wurden 2-5 Einheiten Restriktionsenzym pro μg Plasmid-DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro μg genomischer DNS eingesetzt. Der allgemeine Ansatz eines Restriktionsverdaus ist in Tabelle 2-21 gezeigt.

Tabelle 2-21: Standard Restriktionsverdau

	Plasmid	Plasmid
DNS (alle Angaben für 2 μg DNS)	2 μg	2 μg
Puffer	2 μl	2 μl
BSA (best. Enzyme)	----	1 μl
Enzym	1 μl	1 μl
H ₂ O _{bidest}	ad to 20 μl	ad to 20 μl

Bei den einzelnen Verdaus wurden Bedingungen für eine optimale Enzymaktivität ausgewählt. Der Anteil an Enzym sollte 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Reaktion durch hohe Glycerolkonzentration des Enzymkonservierungsmittels beeinflusst werden kann.

2.10.8 Southernblot Analyse

Diese Methode wird zum Nachweis spezifischer DNS-Sequenzen in genomischer DNS verwendet (Southern, 1975). Durch DNS/DNS Hybridisierung mit einer komplementären, markierten Sonde können die gesuchten DNS-Sequenzen detektiert werden.

Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen

Nach dem Restriktionsverdau der genomischen DNS mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen wurden die DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch aufeinander folgende Säure- und Alkalibehandlung wurden die Fragmente in kleinere Stücke zerlegt und denaturiert. Mittels eines Kapillarblots wurden sie auf eine Nylonmembran transferiert.

Durchführung:

20 µg der chromosomalen DNS wurden in einem Restriktionsverdau mit hoch konzentrierten Enzymen (50 U/µl) über Nacht geschnitten und am nächsten Tag mittels DNS-Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid bei 30 V über Nacht aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde ein Längenstandard verwendet (z.B. Fotografie mit Lineal). Das fotografierte Agarosegel wurde zur partiellen Depurinierung in 0,25 N HCl für etwa 10 Minuten geschwenkt. Ein anschließendes Bad in 0,4 N NaOH für weitere 30 Minuten führte zur Denaturierung und Spaltung der DNS an den depurinierten Stellen.

In der Zwischenzeit wurde die Nylonmembran auf die Größe des Agarosegels zurechtgeschnitten, mit H₂O_{bidest} befeuchtet und in 0,4 N NaOH etwa 15 min äquilibriert.

Aufbau des Kapillarblots:

Zuerst wurde ein Gelträger auf die Ränder von zwei mit 0,4 N NaOH Blotlösung gefüllten Wannen gestellt und darauf luftblasenfrei folgende Schichten platziert:

- mit Blotlösung befeuchtetes 3 mm Whatmanpapier, dessen Enden in Blotlösung eintauchen
- Gel mit der Oberseite nach unten
- Nylonmembran
- 2 Lagen befeuchtetes 3 mm Whatmanpapier
- 6 Lagen trockenes 3 mm Whatmanpapier
- ca. 10 cm Zellstoffpapier
- Glasplatte

Der Kapillarblot wurde mit etwa 0,5 kg beschwert und über Nacht bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wurde die Blotlösung nach oben gesaugt, und die DNS-Fragmente wurden auf die Nylonmembran transferiert.

Die geblottete Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen um letzte Gelreste zu entfernen. Nachdem die Membranvorderseite markiert wurde und leicht angetrocknet war, wurde die DNS durch UV-Bestrahlung kreuzvernetzt und somit fixiert.

Radioaktive Markierung der Sonde

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wurde das Klenow-Fragment benutzt, welches an einer einzelsträngigen DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten dCTP zu unmarkierten Nukleotiden wurde die neu synthetisierte DNS radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1984). In dieser Arbeit wurde der "rediprime"-Kit (Amersham), mit dem bis zu 25 ng DNS unter Verwendung von 50 μCi ^{32}P -dCTP markiert werden können. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit NucTrap Säulen (Stratagene) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS Hybridisierung

Die DNS/DNS Hybridisierung zwischen der markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu passenden, nachzuweisenden chromosomalen DNS-Sequenz führt zur Bildung des stabilen, doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybridmoleküle können durch anschließende Detektion der Markierung sowohl mit radioaktiver Belichtung eines Filmes als auch bei Benutzung eines Phosphoimagers sichtbar gemacht werden. Die benötigten Lösungen sind in Kapitel 2.3.1 aufgeführt.

Durchführung:

Die Membran wurde über Nacht bei 65°C in 20 ml frischer Hybridisierungslösung prähybridisiert, am nächsten Tag die markierte, hitzedenaturierte Sonde und 5 mg hitzedenaturierte Lachsspermien-DNS zugeben. Die Membran wurde über Nacht bei 65°C hybridisiert.

Durch zweimaliges stringentes Waschen mit Lösung I für 30 Minuten bei 65°C und einmaligem stringentem Waschen mit Lösung II für 30 Minuten bei 65°C wurde unspezifisch gebundene Sonde abgewaschen. Die spezifisch gebundene Radioaktivität konnte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji) detektiert werden.

2.10.9 Ligation von DNS-Molekülen

T4 Bakteriophagen DNS Ligase katalysiert die Bindung von Phosphodiestergruppen eines 5'-Phosphats und eines 3'-Hydroxylendes linearer DNS-Moleküle. Dabei spielt es keine Rolle ob die Enden glatt sind oder ob 3' bzw. 5' Überhänge vorliegen. Die Enden müssen allerdings kompatibel sein, d.h. gleiche Enden besitzen (glatt:glatt, 3':5' oder 5':3' Überhänge).

Durchführung:

Für eine effiziente Ligation von doppelsträngiger DNS ist ein passendes, molares Verhältnis der zu ligierenden DNS Fragmente nötig. Es sollte bei Vektor zu DNS-Fragment in etwa 1 : 3 sein. Zu diesem DNS Ansatz gibt man 2 µl 10 x Puffer und 1-2 Einheiten T4 DNS Ligase und füllt den Ansatz bis auf 20 µl mit H₂O_{bidest} auf. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 16°C.

Alternativ verwendet wurden in dieser Arbeit zwei Kits. Zum einen der TA - Cloning® Kit von Invitrogen und zum anderen ein „fast ligation Kit“ von Takara. Für beide Kits erfolgte die Ligation entsprechend den Herstellerangaben.

2.10.10 ELISA

2.10.10.1 Protein Kinase A (PKA) Assay

Die Aktivität von PKA, als einer der primären Mediatoren einer cAMP Modulation, wurde aus Knochenmarksmakrophagen von PUMA-G^{-/-} Mäusen mit einem nicht radioaktiven „PKA Kinase Activity Assay Kit“ von Stressgen bestimmt. Der Kit basiert auf dem ELISA Prinzip. Durch PKA wird ein, an ein 96-well-Platte gekoppeltes, Substrat phosphoryliert und nach Phosphorylierung mit spezifischen polyklonalen Antikörpern detektiert. An den Phospho-Substrat Antikörper bindet anschließend ein „horse radish Peroxidase“ gekoppelter Antikörper, der durch eine Farbreaktion die vorherige PKA-Aktivität nachweist.

Durchführung:

Unbehandelte und stimulierte Zellen wurden zuerst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in der 10 cm Zellkulturschale mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer (Kapitel 2.3) für 10 Minuten inkubiert. Lysierte Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte geschabt, in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, drei mal für 20 Sekunden in ein

Ultraschallbad getaucht und bei 13000 Upm zentrifugiert (15 Minuten bei 4°C). Mit Teilen des Überstands wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt und der Rest für den Assay in ein neues kaltes Reaktionsgefäß gegeben.

Die Durchführung des PKA Assays erfolgte strikt nach dem Kit beiliegenden Protokoll des Herstellers.

2.10.10.2 Zyklisches Adenosin Monophosphat ELISA

Die Messung des intrazellulären cAMP erfolgte mit einem „Cyclic AMP EIA Kit, Format A“ der Firma Biomol. Die Durchführung erfolgte nach dem Kit beiliegenden Protokoll. Der Kit beruht auf der Detektion der kompetitiven Reaktion eines polyklonalen Antikörpers gegen endogenes, intrazelluläres cAMP aus der Probe oder cAMP welches kovalent mit alkaliner Phosphatase verknüpft ist. Nach gleichzeitiger Inkubation und nachfolgender Substratumsetzung konnte anhand der enzymatischen Farbreaktion die Konzentration des cAMP in der Probe bestimmt werden.

Durchführung:

Zuerst wurden die Zellen (unstimuliert und mit IFN γ stimuliert) in PBS gewaschen, gezählt, in 300 μ l PBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit IBMX (300 μ M) 30 Minuten bei 37°C gefolgt von Nikotinsäurezugabe (200 μ M) für weitere 20 Minuten inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (4°C, 5 Minuten, 2500 Upm) wurde das Zellpellet in 250 μ l 0,1 N HCl 20 Minuten bei RT gut resuspendiert und lysiert. Nach der Zelllyse wurden die festen Zellbestandteile abzentrifugiert (RT, 5 Minuten, 2500 Upm), 200 μ l des Überstandes mit gelöstem cAMP für die ELISA-Reaktion mit Acetylierungsreagenz (Triäthylamin und Acetic Anhydrid im Verhältnis 2:1) versetzt und auf Eis gestellt. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangabe.

2.10.11 Western Blot

Mit Western Blot Analyse wurden verschiedene Proteine in Zelllysaten durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen mit 50 μ l bis 500 μ l „Schindler Puffer“ (Kapitel 2.3) als Basislysepuffer und weiteren, frischen Zugaben (Tabelle 2-22) lysiert.

Tabelle 2-22: Zusammensetzung des Lysepuffers

	Volumen
Schindlers Puffer	1 ml
Na ₃ VO ₄	50 µl
Proteininhibitor Cocktail	50 µl

Das Lysat wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 13000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Zum Überstand wurde je nach Lysatvolumen Auftragspuffer gegeben (zu 50 µl Lysat 30 µl Auftragspuffer)

Tabelle 2-23: Zusammensetzung des 5 x Auftragspuffers

	Volumen
SDS	10 %
β-Mercaptoethanol	25 %
Tris HCL pH 6,8	30 mM
Bromphenolblau	0,15 %
Glycerin	45 %

Die Lysate mit Auftragspuffer wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gradienten Gel (4% bis 12%) 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Der Gellauf erfolgte in Laufpuffer (Kapitel 2.3) mit dem NuPAGE[®] Electrophorese System von Invitrogen nach Protokollangaben des Herstellers für 90 Minuten bei 200 V gekühlt auf Eis. Im Anschluss wurde das Gel auf eine Nylonmembran für Proteingele (Schleicher & Schuell BioScience) mit Transferpuffer mit 20% Methanol in dem selben NuPAGE[®] Electrophorese System (Kapitel 2.3) geblottet. Der Aufbau des Blots erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Zum Detektieren der geblotteten Proteine wurde die Membran zuerst mit 5% Milchpulver, gelöst in TBS-T (Kapitel 2.3), für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt um eine unspezifische Proteinbindung des Antikörpers zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in 5% Milchpulverlösung nach Angaben des Antikörperherstellers verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper abzuwaschen wurde der Blot bei RT für 30 Minuten bei mehrmaligem Wechsel des Waschpuffers (TBS-T) gewaschen. Der „horse radish Peroxidase“ gekoppelte Sekundär-Antikörper wurde ebenfalls in 5% Milchpulver gelöst und für zwei Stunden mit der Membran inkubiert und im Anschluss wieder mehrmals insgesamt 30 Minuten gewaschen. In der Dunkelkammer erfolgte die Proteindetektion mit Chemolumineszenzlösung (ECL, Amersham, Braunschweig) mit anschließender Exposition und Entwicklung (Curix 60, Agfa,

Köln) des durch Chemolumineszenz belichteten Films (HyperfilmTM-ECL, Amersham, Braunschweig).

3 Ergebnisse

3.1 PUMA-G Ergebnisse

3.1.1 Expression von PUMA-G

3.1.1.1 PUMA-G Expression nach verschiedenen Stimuli

Die Expression von PUMA-G verläuft in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich. So ist PUMA-G z.B. in Adipozyten permanent und in Makrophagen nur nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation (in einer Kinetik von 0 bis 24 Stunden gezeigt) exprimiert (Schaub *et al.*, 2001; Tunaru *et al.*, 2003). Die Daten für die $\text{IFN}\gamma$ Induzierbarkeit konnten durch die Methodik der Realtime - PCR mit einer spezifischen Sonde für PUMA-G bestätigt werden. Ana1 Zellen, eine Monozyten/Makrophagen Zelllinie aus C57/BL6 Mäusen, wurden hier unterschiedlich lang (2h, 6h und 16h) mit $\text{IFN}\gamma$ (10 ng/ml) stimuliert, lysiert, die RNS extrahiert und in cDNS umgeschrieben. Anschließend wurde zur Analyse eine PUMA-G spezifische Realtime - PCR durchgeführt (Abb. 3.1). Nach zwei Stunden war die Menge der PUMA-G cDNS im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen um den Faktor 15 höher. Nach sechs bzw. 16 Stunden wurde PUMA-G um den Faktor 27 bzw. 35 hochreguliert. Eine Normalisierung der Messwerte erfolgte anhand der β -Aktin Expression.

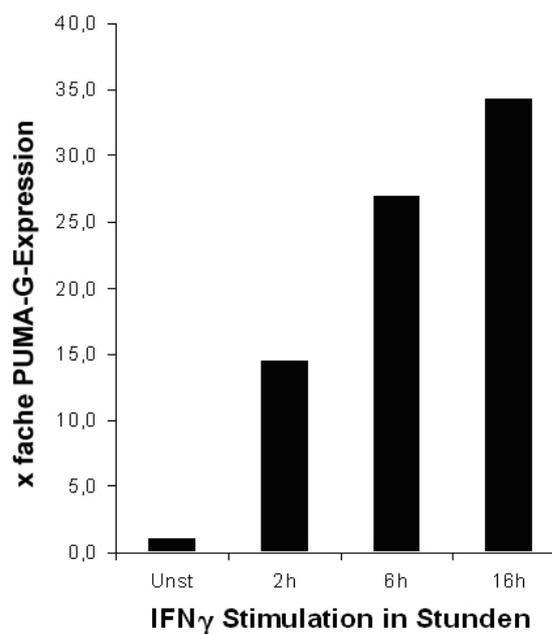


Abb. 3.1: Regulation von PUMA-G in Ana1 Zellen nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zusätzlich wurden Ana1 mit weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen und TLR Antagonisten für 16 Stunden inkubiert, lysiert, RNS extrahiert und in cDNS umgeschrieben. Mittels Realtime - PCR konnte neben IFN γ auch bei anderen Stimuli eine Hochregulation der PUMA-G messenger RNS detektiert werden. So zeigte die Einfachstimulation mit LPS (TLR4 Ligand) mit 100 ng/ml, LTA (TLR2 Ligand) mit 1 μ g/ml, CpG (1668; TLR9 Ligand) mit 1 μ Mol, IL1 β mit 10 ng/ml und R848 (TLR7/8 Ligand, 1 μ g/ml) eine Hochregulation um mindestens Faktor fünf (Abb. 3.2). Die Doppelstimulation mit IFN γ und TNF α (beide 10 ng/ml) führte zu einer synergistischen Hochregulation verglichen zu den Einfachstimulationen. In diesem Experiment war die IFN γ Stimulation nicht so effektiv wie in den Vorexperimenten. TNF α allein war nur um Faktor zwei in der Lage die Expression von PUMA-G nach 16 Stunden Stimulation zu beeinflussen. Typ I Interferon (IFN β mit 10 ng/ml) als auch pIC (TLR3 Ligand) mit 1 μ g/ml hatten keinen Einfluss auf die PUMA-G-Expression. Auch in diesem Experiment wurde auf β -Aktin normalisiert.

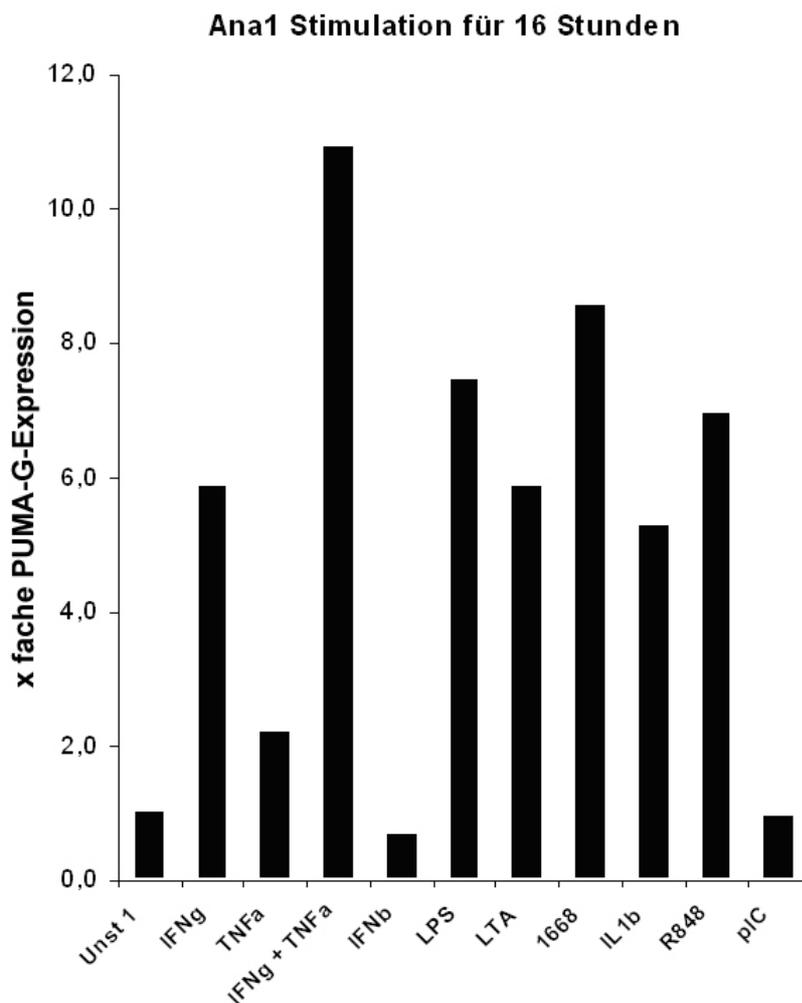


Abb. 3.2: Regulation von PUMA-G in Ana1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli für 16 Stunden.

3.1.2 Körpergewichtsbestimmung PUMA-G defizienter Tiere

Nikotinsäure wurde früher als Medikament gegen Hyperlipidämie (A.G.Olsson, 1994) eingesetzt und nach Tunaru et al. (Tunaru *et al.*, 2003) bindet diese an PUMA-G. Da das humane Ortholog von PUMA-G, HM74a in der Regulation des Fettsäurespiegels beteiligt ist, sollte die Gewichtszunahme PUMA-G defizienter Tiere während der Entwicklung beobachtet werden. Hierzu wurden PUMA-G^{-/-} Tiere ab vier Wochen bis 50 Wochen bei normaler Ernährung gewogen. Die Anzahl der gewogenen Tiere beläuft sich minimal auf 20 Tiere und maximal auf 37 (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Anzahl der gewogenen PUMA-G Tiere

Alter in Wochen		4	5	6	8	12	16	20	30	50
Weibchen	WT	32	37	35	37	31	30	28	32	25
	KO	20	24	28	28	24	20	23	27	24
Männchen	WT	24	29	29	31	28	27	29	30	29
	KO	21	26	24	26	24	25	27	27	23

Bei den weiblichen Tieren konnte über die gesamte Messdauer keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und PUMA-G defizienten Tieren gemessen werden (Abb. 3.3).

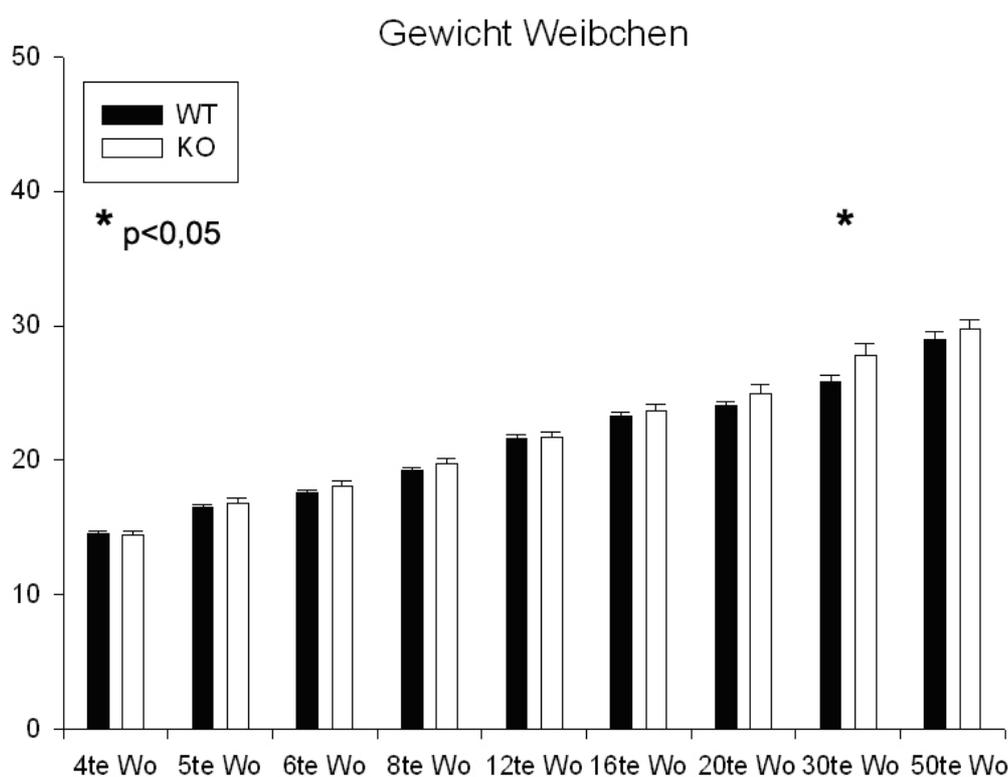


Abb. 3.3: Gewicht von weiblichen Tieren der Linie PUMA-G über einen Zeitraum von 50 Wochen bei normaler Ernährung.

Nur bei Tieren mit einem Alter von 30 Wochen war ein Gewichtsunterschied signifikant ausgeprägt. Insgesamt lag das Gewicht bei den Weibchen im Rahmen der natürlichen Schwankungen zwischen 14,5 Gramm bei vier Wochen und 30 Gramm bei 50 Wochen alten Tieren.

Bei den Männchen hingegen konnte man von der 5ten Woche an bis zu einem Alter von 30 Wochen signifikante Unterschiede im Gewicht erkennen (Abb. 3.4). PUMA-G defiziente männliche Mäuse waren ab der 5ten Woche etwa 6% schwerer als vergleichbare Wildtyp Tiere. Dieser Unterschied blieb bis zur 30ten Woche mit nun 7,6% erhöhtem Gewicht bestehen. In jüngeren (<5 Wochen) oder älteren (>30 Wochen) Tieren glich sich das Gewicht wieder dem von Wildtyp Tieren an. Die Gewichtsuntersuchung der männlichen PUMA-G^{-/-} Tiere war im vorliegenden Experiment mit Anfangswerten von 16 Gramm bei vier Wochen alten Tieren erfasst worden und erreichte bei der letzten Messung im Alter von 50 Wochen Werte bis 41 Gramm.

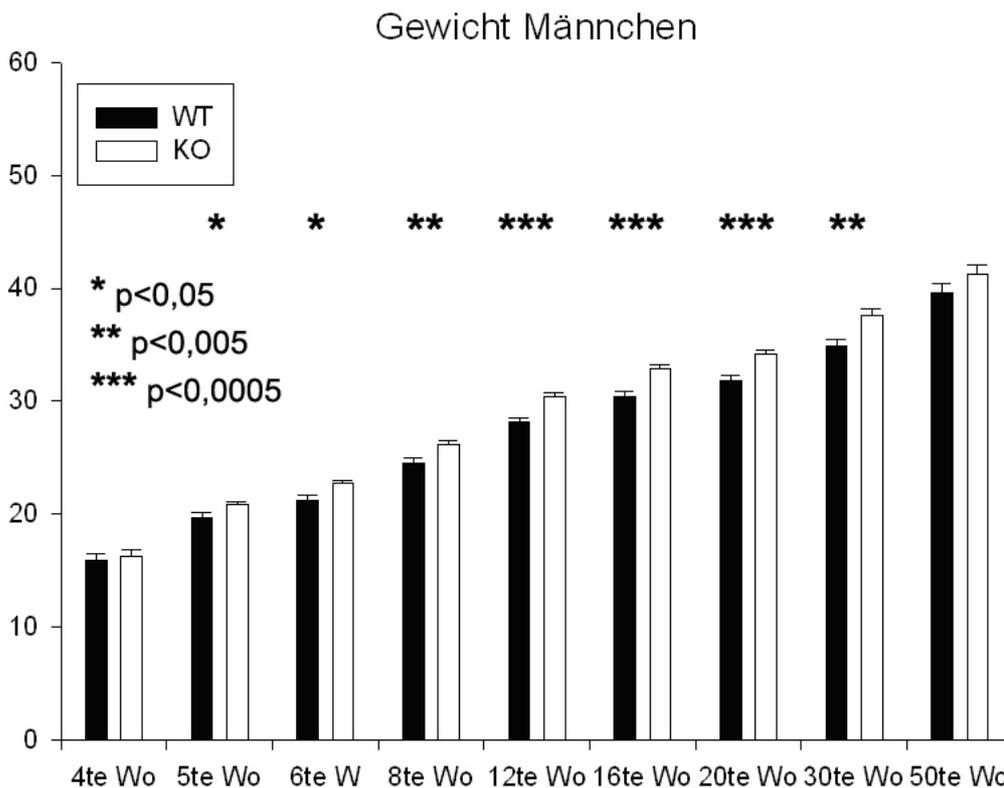


Abb. 3.4: Gewicht von männlichen Tieren der Linie PUMA-G über einen Zeitraum von 50 Wochen bei normaler Ernährung.

3.1.3 Blutzuckerbestimmung

Um aufzuklären, wieso männliche PUMA-G defiziente Tiere zu Übergewichtigkeit neigten, wurde gemessen, ob eine Störung im Blutzuckerspiegel dieser Tiere auftrat. Bei Menschen mit Übergewicht ist Diabetes eine häufige Nebenerkrankung. Hierzu wurden PUMA-G^{-/-} und Kontrolltiere eine Nacht lang ohne Futter gehalten. Am nächsten Tag, wurde der Blutzuckerspiegel mit einem handelsüblichen Blutzuckermessgerät (Accu Check Sensor Comfort, Roche) bei fünf Tieren pro Gruppe gemessen. Der Test wurde an zwei unterschiedlichen Tagen wiederholt. Die erste Messung ergab einen minimal erhöhten Spiegel in den PUMA-G defizienten Tieren (Abb. 3.5 links). Dieses Ergebnis konnte allerdings bei der zweiten Messung nicht bestätigt werden (Abb. 3.5 rechts). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied der Blutzuckerwerte konnte nicht festgestellt werden.

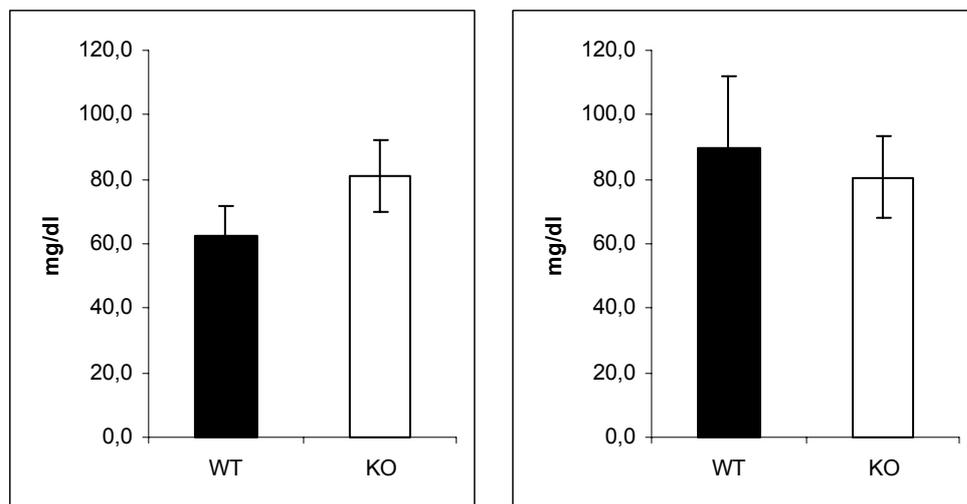


Abb. 3.5: Blutzuckerbestimmung in Wildtyp und PUMA-G^{-/-} Tieren nach 12 stündiger Fastenzeit. Jede Grafik zeigt einen Messtag und fünf Tiere pro Gruppe.

Die Mittelwerte der Blutzuckerbestimmung erreichten bei den Messgruppen der Wildtyp Tiere und PUMA-G^{-/-} Mäuse ähnliche Werte (Abb. 3.6). Der normale Wert für Glucose im Blutplasma liegt bei Mäusen im Bereich von 120 bis 150 mg/dl. Nach einer Fastenzeit von ca. zwölf Stunden betrug er bei beiden Gruppen etwa 80 mg/dl.

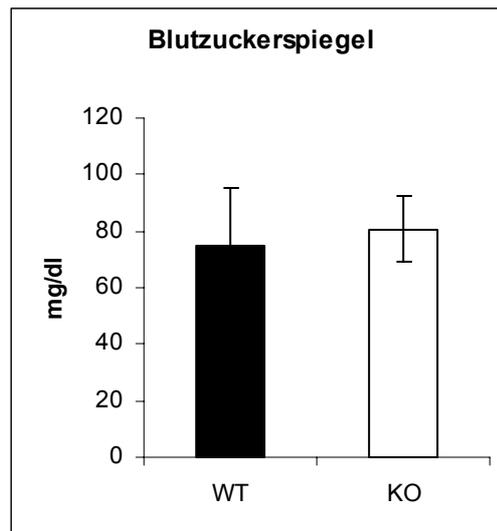


Abb. 3.6: Blutzuckerbestimmung in Wildtyp und PUMA-G^{-/-} Tieren nach 12-stündiger Fastenzeit. Mittelwert aus Messungen an zwei verschiedenen Tagen und fünf Tieren pro Gruppe.

3.1.4 Histologie von zwei Jahre alten Mäusen

Bei Untersuchungen älterer Tiere aus den Gewichtsstudien der Linie PUMA-G viel auf, dass mehrere dieser Tiere Neoplasien in bestimmten Organen entwickelten (Tabelle 3-2). Um genauere Rückschlüsse auf die Art der Neoplasien und deren Lokalisation zu erhalten, wurden Tiere mit einem Alter über 16 Monaten getötet und nach Entnahme der Organe Cryo- und Paraffinschnitte erstellt. Diese Schnitte wurden anschließend mit Hämalaun und Eosin oder mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern angefärbt und am Mikroskop betrachtet.

Tabelle 3-2: Neoplasiehäufigkeit von Tieren der Linie PUMA-G mit einem Alter von mindestens 16 Monaten

	PUMA-G ^{+/+}		PUMA-G ^{+/-}		PUMA-G ^{-/-}	
	neg	pos	neg	pos	neg	pos
Insgesamt	8	3	19	14	14	19
Neoplasiehäufigkeit	27,3%		42,4%		57,6%	

Die ersten Neoplasien konnten im mesenterialen Lymphknoten gefunden werden. Von dort streuten sie über die Milz, Leber bis in die Lunge. Bei einzelnen Tieren konnten bei starker Streuung auch in den peripheren Lymphknoten Neoplasien beobachtet werden. In den Hämalaun/Eosin gefärbten Präparaten (H/E-Färbung) wurden neoplastische Infiltrate in Lunge, Milz und Leber nachgewiesen. Teilweise erreichten die Neoplasien eine Größe von

bis zu 3 cm Länge in der Milz. Der peritoneale Lymphknoten wuchs sogar auf eine Größe von bis zu einem Zentimeter (Abb. 3.7).

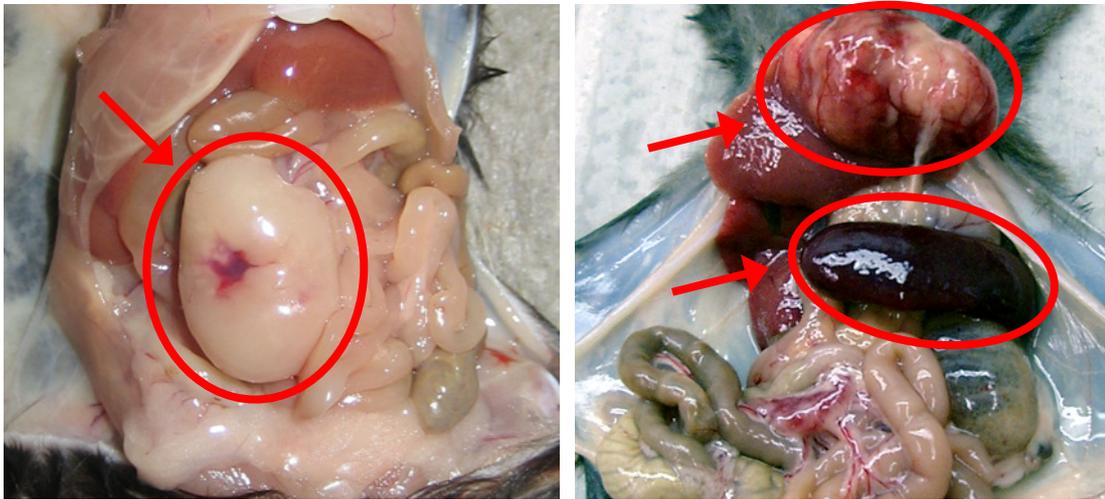


Abb. 3.7: Fotos von Neoplasien von PUMA-G^{-/-} Mäusen. (Alter: >16 Monate). Neoplasien sind mit roten Elypsen und Pfeilen markiert. Bilder von zwei verschiedenen Mäusen. Linkes Bild: neoplastischer mesenterialer Lymphknoten, rechtes Bild: Splenomegalie (unten) und Infiltrat in der Leber (oben).

In Paraffinschnitten von Leber und Lunge konnte man wie auch in der Milz deutliche Infiltrate erkennen (Abb. 3.8). Beim linken Bild mit Lebergewebe erkennt man rechts oben ein großes Blutgefäß mit großem Infiltrat und links daneben kleinere Gefäße mit einem weiteren, kleineren Infiltrat am linken Bildrand. Im Lungenschnitt waren die Alveolen gut sichtbar, was auf eine funktionsfähige Lunge hinwies. Ein Blutgefäß mit deutlich abgrenzbarem Lumen umgeben von einem verdickten Rand war in direktem Kontakt mit einem großen Infiltrat (linker unterer Bildabschnitt) auszumachen (Abb. 3.8. rechts)

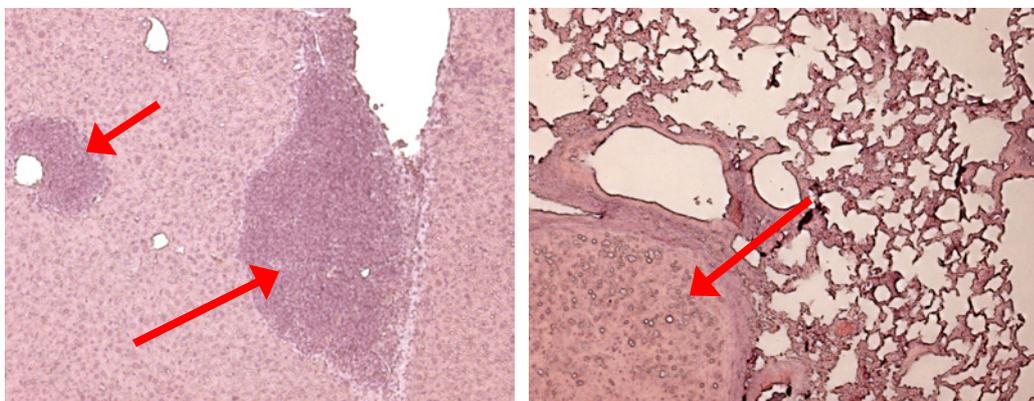


Abb. 3.8: H/E Färbung von infiltriertem Gewebe. Links Leber mit zwei Infiltraten, rechts Lunge mit einem großen Infiltrat. Rote Pfeile zeigen die Infiltrate an.

In immunhistochemischen Schnitten auf Leber oder neoplastischem Gewebe aus dem peritonealen Lymphknoten konnte die Art der Neoplasie auf lymphatische Zellen eingegrenzt werden. So besteht dieses neoplastische Gewebe größtenteils aus B- und T- Zellen (Abb. 3.9). Kennzeichnend gemacht wurden diese mit Antikörpern gegen B220 (Abb. 3.9 a, b) und CD19 (ohne Abbildung) für B-Zellen, CD3 für T-Zellen (Abb. 3.9 c, d) bzw. CD4 (T_H - Zellen) als weiterer Marker (Abb. 3.9 e, f).

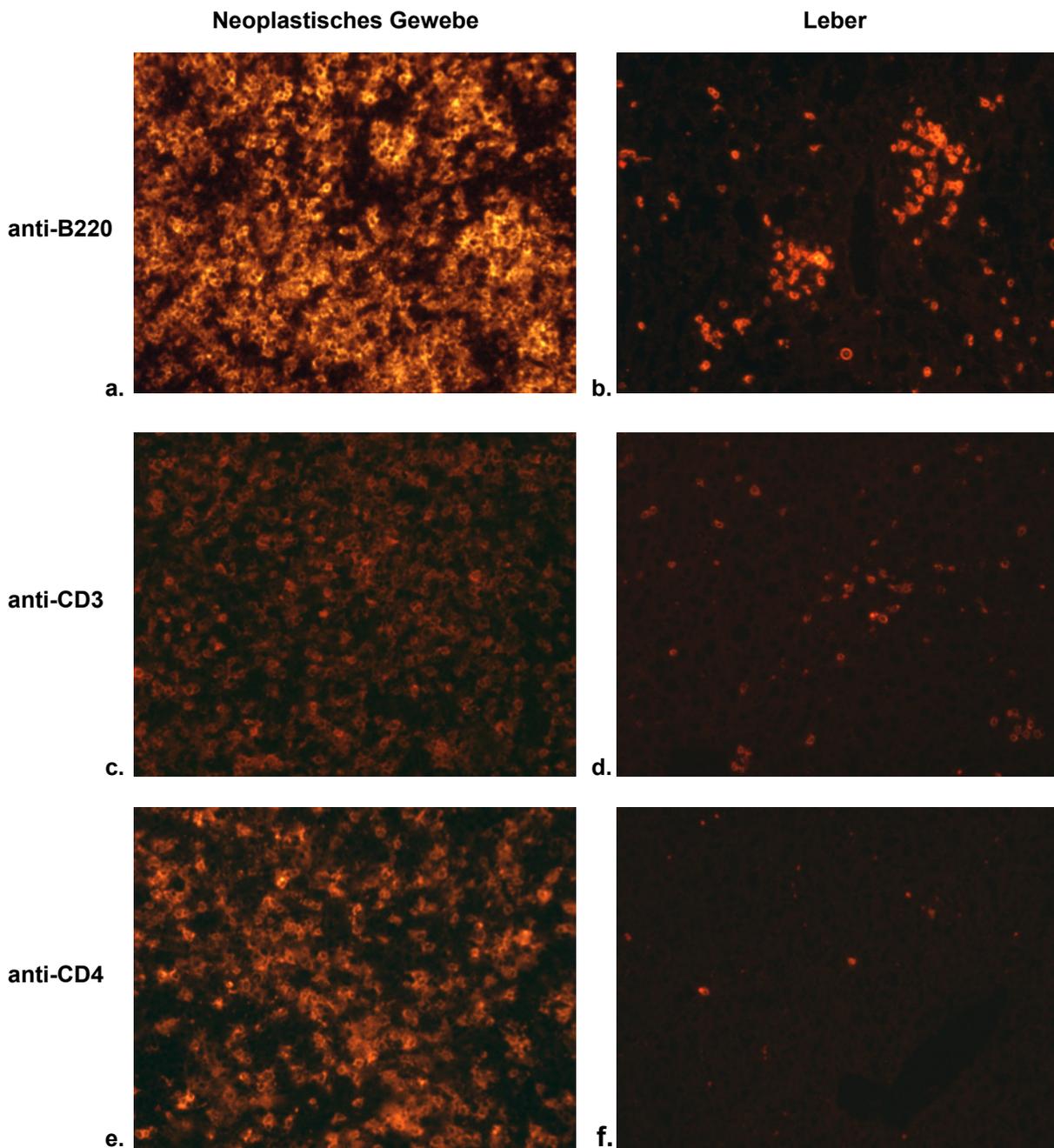


Abb. 3.9: Immunhistochemische Schnitte von Leber. Linke Seite neoplastisches Gewebe, rechte Seite Leberschnitte. In den Bildern a und b wurde mit anti B220-PE, in c und d mit anti CD3-PE und in e und f mit anti CD4-PE gefärbt. In Bild b erkennt man in der Leber neoplastische B-Zell Infiltrate.

Die PE-gekoppelten Antikörper (B220, CD19, CD3 und CD4) färbte die Mehrzahl der Zellen innerhalb des neoplastischen Gewebes. Im Kontrast dazu zeigten dieselben Färbungen in der Leber für CD3 und CD4 eine normale Verteilung der wenigen positiven Zellen zwischen den dicht aneinander liegenden Hepatozyten (Abb. 3.9 d, f). In unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen ist keine Häufung von Fluoreszenz markierten Zellen sichtbar. Im oberen rechten Bild erkennt man B220 positive Zellen in neoplastischen Infiltraten und ein einzelnes freies Blutgefäß in der Leber. In einer Wildtyp-Kontroll Leber waren nur vereinzelte B-Zellen vorhanden wohingegen bei den hier in der Leber vorhandenen Infiltraten das Verhältnis von Hepatozyten zu B-Zellen stark in Richtung der B-Zellen verschoben ist. Eine Färbung mit anti CD31-PE (Monozyten, Blutplättchen und Endothelzellen) auf neoplastischem Gewebe zeigte eine starke Bildung von Blutgefäßendothel innerhalb der Neoplasie (Abb. 3.10), was auf ein andauerndes neoplastisches Wachstum hinweist.

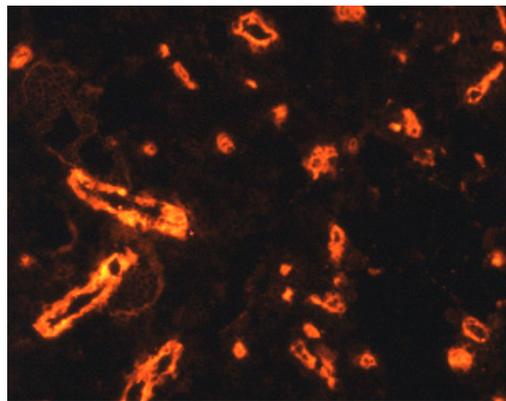


Abb. 3.10: Immunhistochemischer Schnitt von neoplastischem Gewebe mit einer Immunfluoreszenz Färbung gegen CD31-PE.

3.1.5 PUMA-G Knochenmarksmakrophagen

Um für weitere Versuche PUMA-G defiziente Makrophagen in ausreichender Menge zu erhalten, wurden diese aus Knochenmark mit Differenzierungsmedium, welches das Zytokin „Macrophage - colony stimulating factor“ (M-CSF) enthielt, zwölf Tage lang kultiviert. Nach dieser Zeitspanne sollten sich fast ausschließlich Makrophagen (BMDMC „bone marrow derived macrophage cells“) entwickeln. Um die Reinheit der Makrophagen aus den Knochenmarkszellen zu testen, wurden die Zellen der Kultur im FACS auf ihre Zusammensetzung untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern spezifisch für Makrophagen- (CD11b), B-Zellen (B220), T-Zellen (CD3) sowie für dendritische Zellen (CD11c) gefärbt (Abb. 3.11).

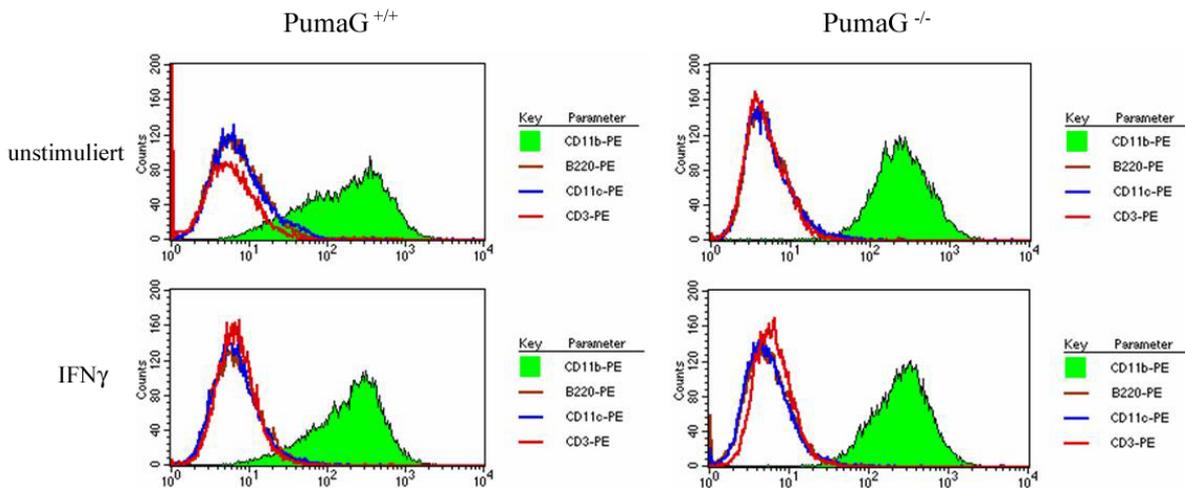


Abb. 3.11: Analyse von ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen nach zwölf tägiger Kultivierung in Differenzierungsmedium mit und ohne IFN γ Stimulation über 18 Stunden. Rot : CD3, blau : CD11c, braun : B220 und grün : CD11b

Es wurden sowohl aus Knochenmark von PUMA-G defizienten Tieren als auch aus Wildtyp Tieren BMBMCs ausdifferenziert. Ein Teil der Zellen wurden zusätzlich für 18 Stunden mit IFN γ (10 ng/ml) stimuliert um Populationsänderungen durch den IFN γ Stimulus zu erkennen. In Abb. 3.11 erkennt man den Reinheitsgrad der Makrophagenpopulation am Verlauf der Kurven, wobei sich in allen vier Ansätzen ein ähnliches Bild zeigt. Es war keine erhöhte Zahl an T-, B- oder dendritische Zellen, sondern nur wie erwartet eine deutliche Verschiebung der Zahl an Makrophagen hin zu höheren Werten, hier mit CD11b, nachgewiesen. Es war kein Unterschied bei PUMA-G defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen zu sehen, bis auf eine breitere Verteilung der CD11b positiven Zellen.

Als weiterer Punkt musste für die folgenden Experimente noch abgeklärt werden, ob Nikotinsäure, ein Ligand von PUMA-G, nach einer Aktivierung der Makrophagen mit IFN γ die Zelldifferenzierung beeinflusst. Dafür wurden Ana1 Zellen kultiviert und über Nacht mit IFN γ und Nikotinsäure stimuliert. Für CD80 (B7.1), einem co-stimulatorischem Ligand für CD28 und CTLA-4, konnte gezeigt werden, dass keine abnorme Expression in den Zellen stattfand (Abb. 3.12).

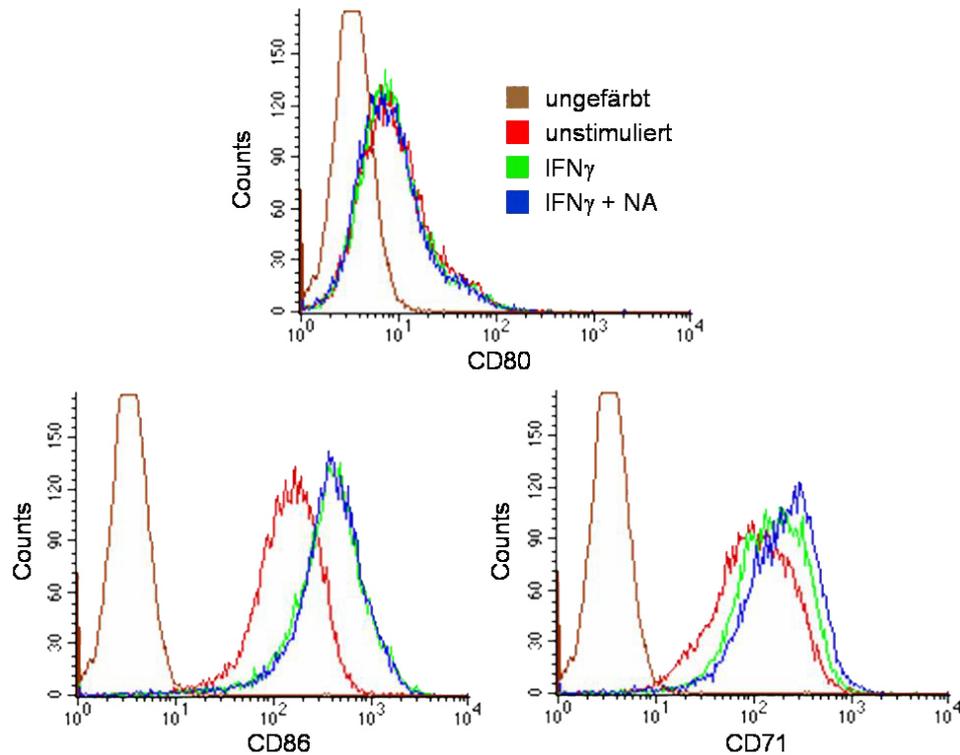


Abb. 3.12: FACS Färbung der Zell-Marker CD80, CD86 und CD71 auf Ana1 Zellen nach IFN γ und Nikotinsäure Stimulation über Nacht. NA = Nikotinsäure

Im Gegensatz dazu war CD86 (B7.2), ein Aktivierungsmarker, welcher auf Monozyten/Makrophagen, aktivierten B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert wird, stark exprimiert und wurde nach Aktivierung der Zellen mit IFN γ nach oben reguliert. Eine zusätzliche Gabe von Nikotinsäure veränderte das Expressionsniveau nicht. Es wäre denkbar gewesen, dass Nikotinsäure Einfluss auf die Zellteilung nimmt. Um dies auszuschließen wurde als weitere Kontrolle die Proliferation anhand von CD71, dem Transferrin Rezeptor, überprüft. Dieser Rezeptor wird auf proliferierenden Zellen exprimiert. Nach Gabe von IFN γ steigt die Expression von CD71 an und mit zusätzlichem Stimulus Nikotinsäure wird diese CD71 Expression noch erhöht. Eine Kontrolle bei der nur Nikotinsäure gegeben wird, wurde nicht durchgeführt, da dessen Rezeptor, PUMA-G, auf Makrophagen nur nach IFN γ Stimulation exprimiert wird.

3.1.6 Veränderung des cAMP-Spiegels durch Nikotinsäure

Zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) ist ein zellulärer, häufig genutzter second messenger, der von der Adenylat Cyclase aus ATP synthetisiert werden kann. Die Regulation von intrazellulärem cAMP erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die die Adenylat Cyclase, aktivieren oder inhibieren können. Die Aktivierung oder Inhibierung erfolgt über die Bindung des zugehörigen G-Proteins. PUMA-G ist als G-Protein gekoppelter Rezeptor in der Lage, inhibitorisches G-Protein zu aktivieren und somit den cAMP Spiegel intrazellulär durch Inhibierung der Adenylat Cyclase negativ zu beeinflussen (Tunaru *et al.*, 2003).

Für die Bestimmung des cAMP Spiegels in Ana1 Zellen mittels ELISA, wurden diese zuerst über Nacht mit IFN γ (10 ng/ml) inkubiert, um die PUMA-G Expression in den Zellen zu induzieren. Die Zugabe von IFN γ führte zu einem leichten Anstieg des cAMP Levels im Zelllysat der Ana1 Zellen. Nach der Zugabe von unterschiedlichen Mengen Nikotinsäure konnte konzentrationsabhängig ein deutlicher Abfall des intrazellulären cAMP Spiegels gemessen werden (Abb. 3.13). Bei einer physiologisch hohen Konzentration von 200 μ M Nikotinsäure wurde das cAMP Niveau bis auf die Hälfte reduziert.

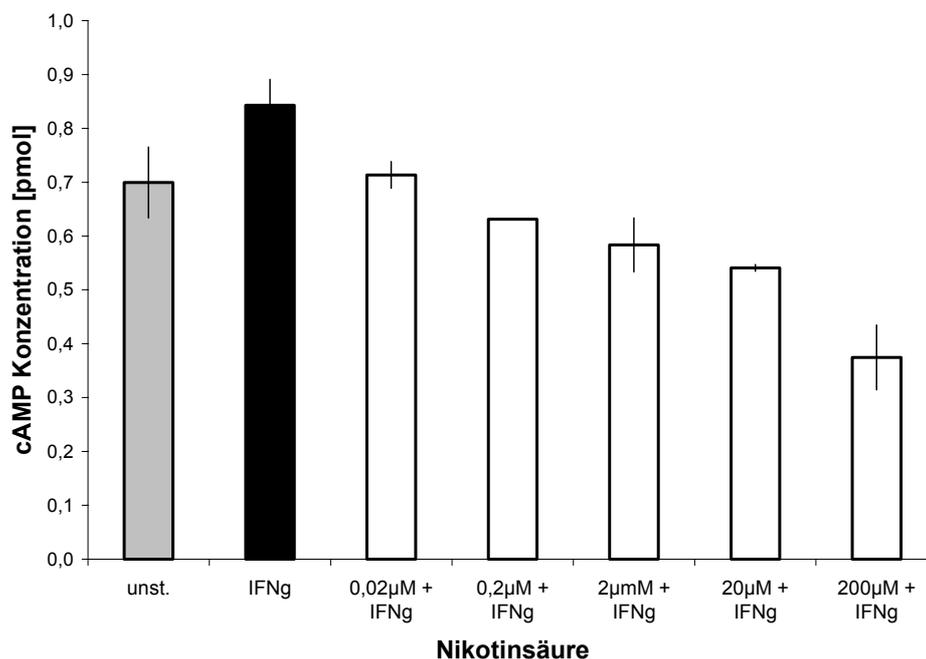


Abb. 3.13: cAMP Spiegel in Ana1 Zellen nach IFN γ Stimulation und verschiedenen Dosen an Nikotinsäure.

Um die Rolle von PUMA-G zu untersuchen wurden für weitere Experimente Zellen von PUMA-G defizienten Tieren verwendet. In BMDMC von Wildtyp und PUMA-G defizienten Tieren zeigte sich ein leicht verändertes Bild. Makrophagen aus Wildtyp Tieren reagierten auf IFN γ Stimulation mit einem geringen Anstieg von 10% und die zusätzliche Nikotinsäuregabe

bewirkte ein starkes Absinken des Spiegels um 40% (Abb. 3.14). In PUMA-G defizienten Makrophagen konnte weder der anfängliche Anstieg noch das darauf folgende Absinken des cAMP Spiegels gemessen werden. Nach der IFN γ Gabe fiel der cAMP Spiegel um 15% und bei einer zusätzlichen Nikotinsäure Gabe war ein Anstieg um 20% messbar. Diese Daten wurden durch drei unabhängige Experimente bestätigt. Die Werte ohne Nikotinsäure wurden jeweils auf 100% gesetzt.

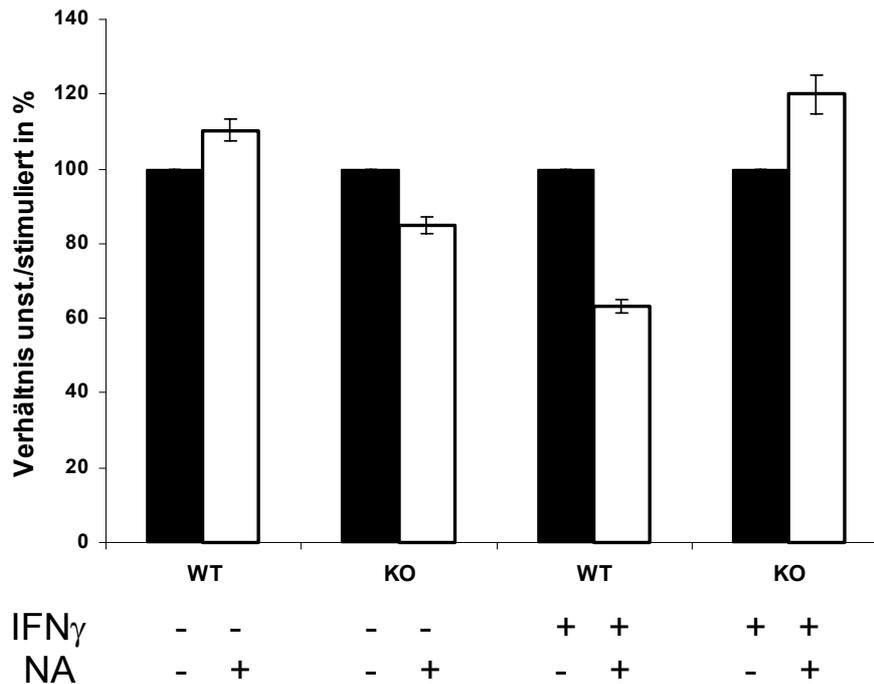


Abb. 3.14: cAMP Spiegel in BMDMC nach IFN γ Stimulation und 200 μ M Nikotinsäure. Angegeben sind die Verhältnisse von Zellen ohne NA zu Zellen mit NA Inkubation; NA = Nikotinsäure

3.1.6.1 Protein Kinase A Assay

In eukaryotischen Zellen werden die meisten Effekte, welche durch cAMP vermittelt werden, durch eine einzelne Protein Kinase, die durch cAMP aktiviert wird, vermittelt. Dieses Schlüsselenzym ist Protein Kinase A (PKA), das die Aktivität von Zielproteinen durch Phosphorylierung von spezifischen Serin- oder Threoninresten verändert. Um zu testen, ob in PUMA-G defizienten BMDMC die Aktivität von PKA nach Nikotinsäure Stimulation im Vergleich zu Wildtyp Zellen verändert ist, wurde die Aktivität der PKA mittels eines „Active PKA ELISA“ getestet. Hierfür wurden PUMA-G^{+/-} und PUMA-G^{-/-} BMDMC über Nacht mit 10ng/ml IFN γ inkubiert, dann für 20 Minuten mit 200 μ M Nikotinsäure stimuliert, anschließend lysiert und mittels ELISA die PKA Aktivität bestimmt. Weder durch IFN γ noch durch Nikotinsäure Stimulation änderte sich die Aktivität von PKA in PUMA-G^{+/-} Zellen oder

in PUMA-G^{-/-} BMDMC signifikant (Abb. 3.15 Beispiexperiment aus zwei Experimenten). Eine generell geringere Aktivität in PUMA-G^{-/-} Zellen beruht auf einer geringeren Anzahl an in den Assay eingesetzten Zellen.

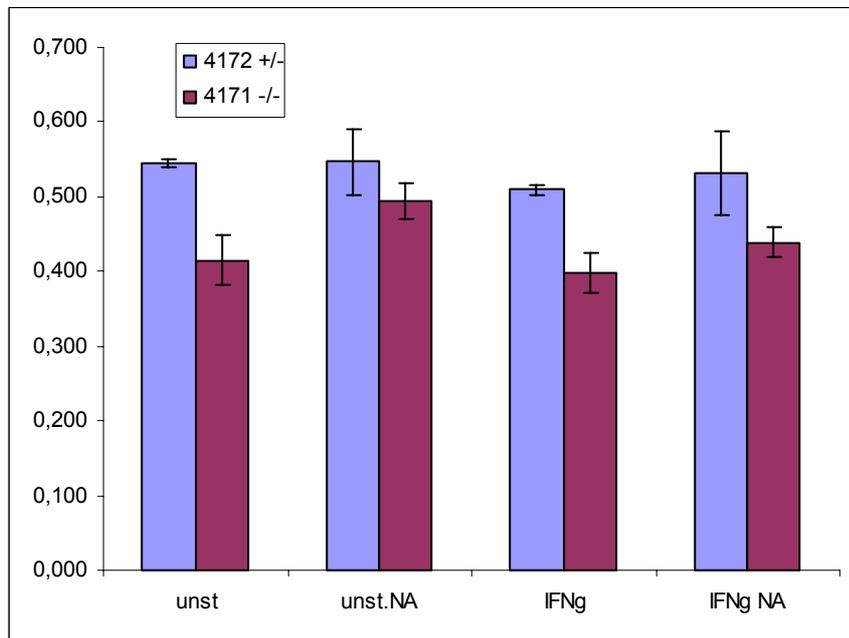


Abb. 3.15: PKA Aktivitätsbestimmung aus BMDMC von PUMA-G^{+/-} und PUMA-G^{-/-} Mäusen. Stimulation über Nacht mit 10 ng/ml IFN γ und 20 Minuten mit 200 μ M Nikotinsäure (NA)

3.1.7 Ana1 Makrophagen Phagozytose

Eine der Hauptaufgaben von Makrophagen ist die Beseitigung von Pathogenen durch Phagozytose und die Präsentation von fremden Antigenen an der Zelloberfläche. Hierfür muss der Makrophage diese fremden Antigene zuerst aufnehmen. Dies geschieht in Form der Phagozytose und Endozytose von Pathogenen und infizierten Zellen. Damit ein Makrophage diese phagozytotische Aktivität entwickeln kann, muss er zuvor aktiviert worden sein. Sein Energiehaushalt könnte dadurch erhöht und somit der Stoffwechsel angeregt sein. PUMA-G spielt in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels eine Rolle. Adipozyten exprimieren HM74b, das humane Ortholog von PUMA-G, konstitutiv (Tunaru *et al.*, 2003). Zusätzlich bringt eine Stimulation mit LPS Adipozyten dazu eine gesteigerte Expression von TLR2 bzw. TLR4 zu entwickeln, wie es auch bei Makrophagen der Fall ist (Lin *et al.*, 2000). Um zu testen, ob die Phagozytose von Makrophagen durch den Rezeptor PUMA-G, welcher eine Rolle im Fettsäurestoffwechsel spielt, beeinflusst wird, wurden Zellen mit IFN γ stimuliert. Diese stimulierten Makrophagen wurden mit fluoreszierenden Mikropartikel, so genannten

Microspheres inkubiert und anschließend mikroskopisch und durchflusscytometrisch ausgewertet. Für die Etablierung des Phagozytose - Systems mit fluoreszierenden Microspheres wurde zuerst mit Ana1 Monozyten/Makrophagen gearbeitet.

Wie sich zeigte, konnten Ana1 Zellen die Microspheres problemlos phagozytieren (Abb. 3.16). In einem Zeitraum von bis zu 180 Minuten stieg der Anteil an phagozytierenden Monozyten/Makrophagen stetig an. Ebenso stieg die Anzahl der Zellen, die mehr Microspheres phagozytiert hatten. Bei der Kontrolle auf Eis waren nur wenige Zellen sichtbar, die überhaupt Microspheres aufgenommen hatten, der Grossteil an Microspheres lag außerhalb der Zellen. Nach 30 Minuten Phagozytose erkannte man wenige freie, aber viele Zellen mit einzelnen und noch einige ohne fluoreszierende Microspheres wohingegen nach 90 Minuten die meisten Makrophagen phagozytiert hatten. Nach 180 Minuten hatten nahezu alle Zellen mehrere Microspheres aufgenommen.

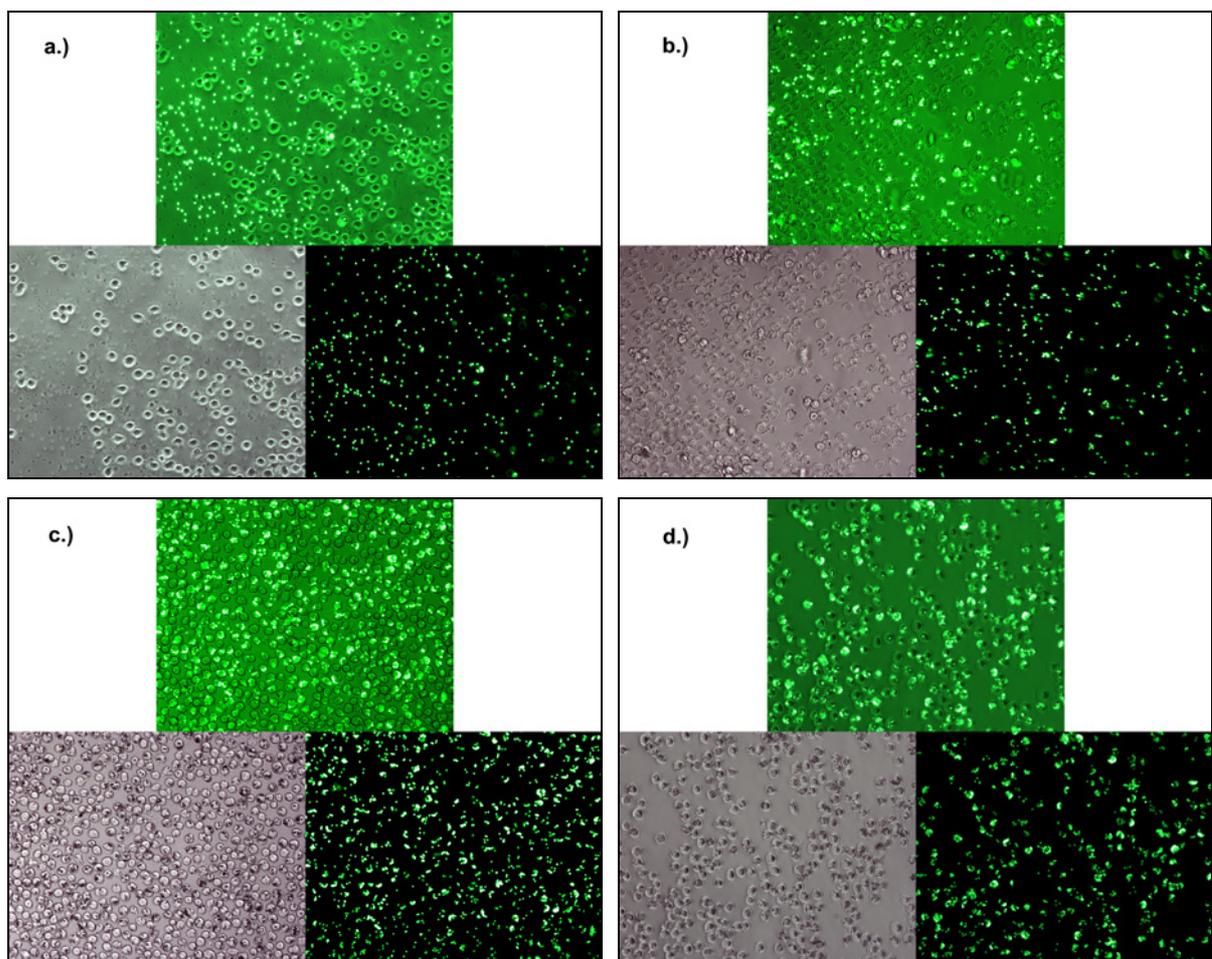


Abb. 3.16: Ana1 Monozyten/Makrophagen inkubiert mit fluoreszierenden Microspheres und mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. a.) unstimulierte Kontrolle (30 min auf Eis), b.) 30 Minuten, c.) 90 Minuten und d.) 180 Minuten Phagozytose.

Nach der Analyse der Zellen im Durchflusszytometer war dieses Ergebnis noch eindeutiger (Abb. 3.17). Im unteren Intensitätsbereich der Fluoreszenz waren noch bis zu neun einzelne Peaks erkennbar, die jeweils für ein, zwei, drei bis neun Microspheres pro Zelle stehen. Diese Kinetik (0 bis 180 Minuten Inkubation) zeigte eine Verschiebung in Richtung von vielen Microspheres pro Zelle. Im höheren Fluoreszenzbereich „verschmelzen“ die Peaks und eine distinkte Unterscheidung ist nicht mehr möglich. Bei den Kontroll-Zellen, die 30 min auf Eis standen, sieht man wenige Zellen, die überhaupt phagozytiert haben in Peak 1. Ein zweiter Peak ist ansatzweise noch vorhanden. Wie bei den mikroskopischen Betrachtungen erkennt man nach 30 minütiger Inkubation schon viele Zellen mit bis zu drei Microspheres und wenige mit mehr. Nach 90 Minuten stieg sowohl die Anzahl der phagozytierenden Zellen als auch die Zahl von Microspheres pro Zelle, der Anteil mit nur einem Microspheres sank deutlich. Nach 180 Minuten sank dieser Anteil sogar bis auf das Niveau der Kontrollzellen. Die Zahl an Makrophagen mit vielen fluoreszierenden Microspheres hingegen stieg sehr stark an.

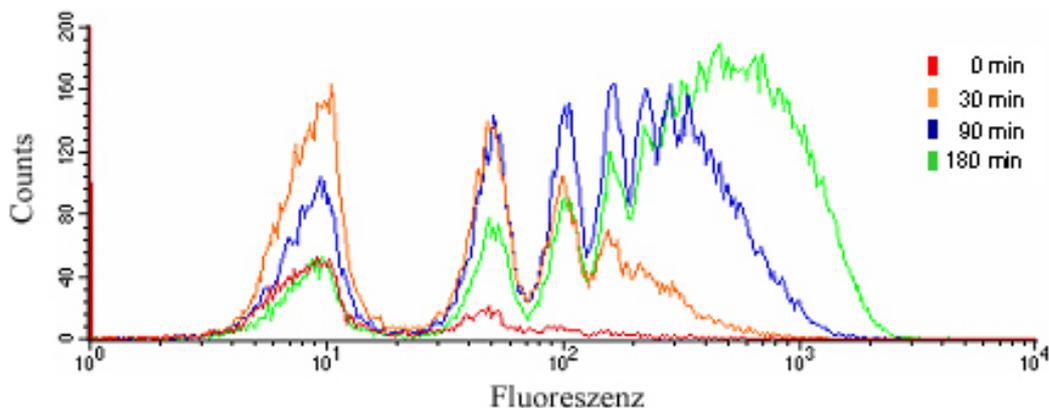


Abb. 3.17: Durchflusszytometrische Auswertung von Ana1 Zellen nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und Inkubation mit fluoreszierenden Microspheres. In rot: 0 Min Eis-Kontrolle, orange: 30 min, blau: 90 min und grün: 180 min Inkubation.

Nachdem geklärt ist, dass die Phagozytose im Bereich von null bis 180 Minuten eine gut aufgelöste Kinetik zeigt wurde in folgenden Experimenten der Einfluss der Interferon γ Konzentration untersucht. Beim Vergleich der Zellzahlen, die phagozytiert haben, kann man, in Bezug auf die Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$, einen leichten Trend erkennen (Abb. 3.18).

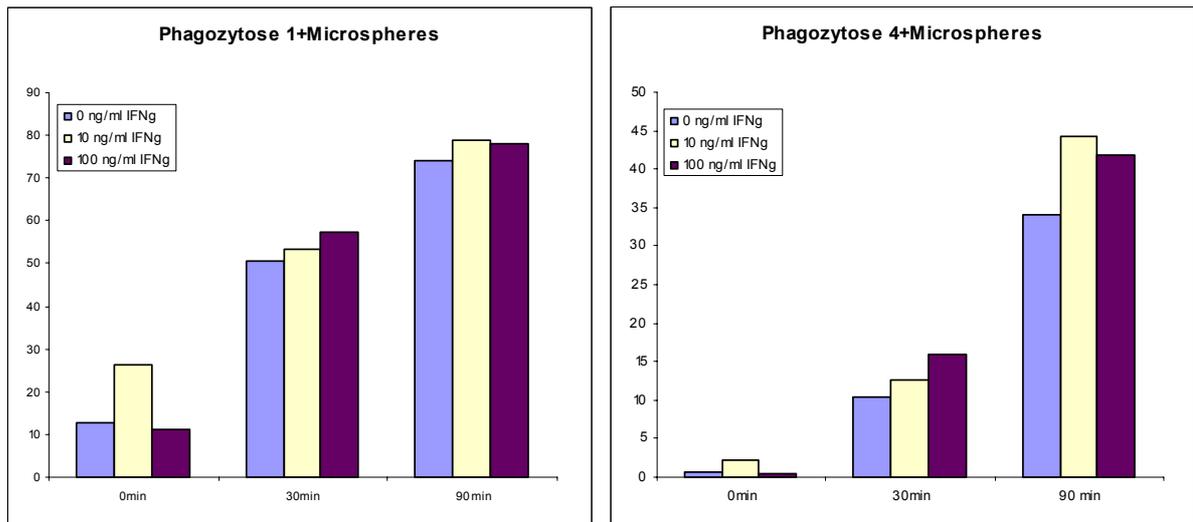


Abb. 3.18: Wirkung von IFN γ auf die Phagozytoseleistung von Ana1 Zellen. Linkes Diagramm: Prozent phagozytierender Zellen von fluoreszierenden Microspheres. Rechtes Diagramm: Anteil der Zellen die mindestens vier fluoreszierende Microspheres phagozytiert haben. Dargestellt ist eine Kinetik von 0 Minuten bis 90 Minuten.

So ist nach 30 Minuten in Abhängigkeit der Interferon γ Konzentration der Anteil an Zellen die überhaupt phagozytieren geringfügig höher (von 50% bis 60%) (Abb. 3.18 links). Nach 90 Minuten hat eine Erhöhung der Interferon γ Konzentration keine weitere Steigerung der Phagozytose zur Folge. Der maximal erreichbare Anteil an phagozytierenden Zellen lag bei ca. 80%. Etwas deutlicher war dieser Unterschied bei den Zellen zu sehen, die mehr als vier Microspheres phagozytierten (Abb. 3.18 rechts). Hier sieht man bei den Kontrollen nur minimale Mengen, wohingegen, Interferon γ abhängig, nach 30 Minuten zwischen 10% und 15% der Zellen schon mehrere Partikel phagozytierten. Nach 90 Minuten ist bei den stark phagozytierenden Zellen ein Interferon γ abhängiger Anstieg sichtbar, der jedoch auch schon bei niedriger Interferon γ Konzentration das Plateau erreicht. In einem einzelnen Experiment mit GFP exprimierenden Listerien konnte eine gesteigerte Phagozytose der Listerien durch IFN γ und Nikotinsäure gezeigt werden (Abb. 3.19).

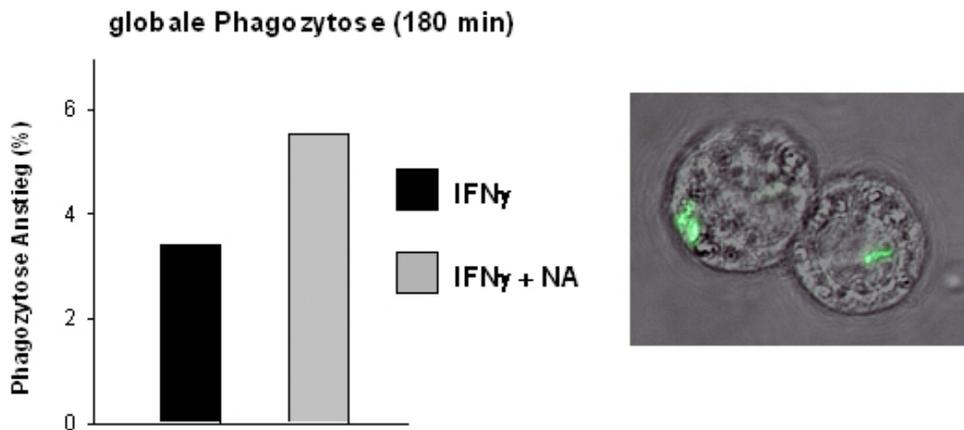
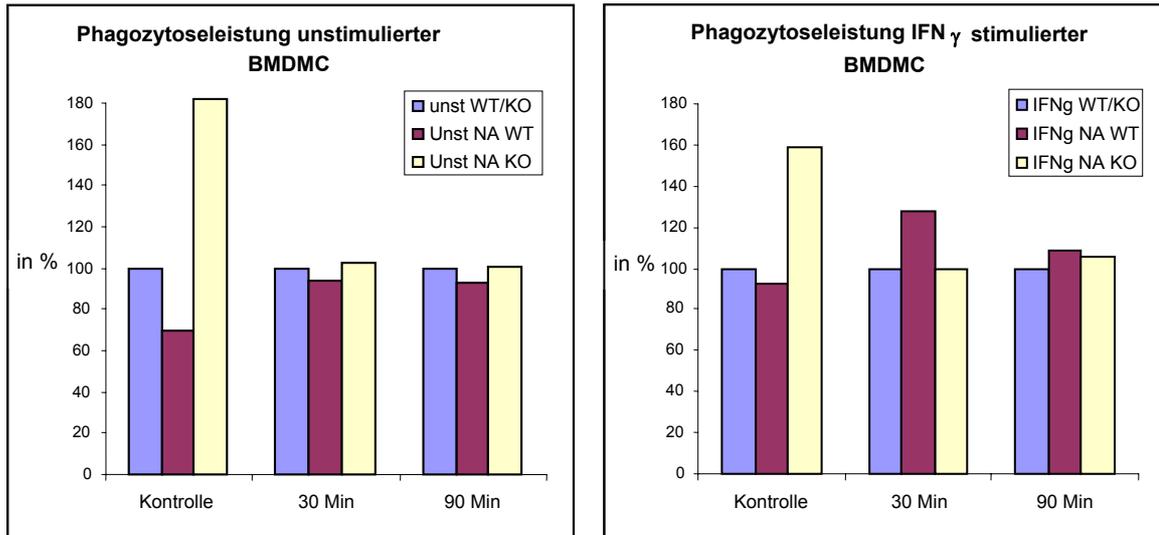


Abb. 3.19: Phagozytose von fluoreszierenden Listerien in Ana1 Zellen.

Die Phagozytoseleistung in PUMA-G defizienten Tieren wurde mit aus Knochenmark differenzierten Makrophagen durchgeführt. Hierfür wurden BMDMC ausdifferenziert, mit IFN γ (10 ng/ml) für 16 Stunden stimuliert und unterschiedliche Zeiten (0, 30 und 90 Minuten) mit fluoreszierenden Microspheres inkubiert. In den durchgeführten Experimenten konnten die Daten der Vorexperimente mit Ana1 Zellen nicht bestätigt werden (Abb. 3.20). Hierbei konnte der die Phagozytoserate steigernde Effekt nicht reproduziert werden und das Fehlen des Rezeptors PUMA-G hatte keine Auswirkung. Nikotinsäure selbst hatte keinen Einfluss auf die Phagozytose durch BMDMC, wie man in den beiden linken Grafiken der Abb. 3.20 sehen kann. Weder nach 30 noch nach 90 Minuten Inkubation verstärkte oder verminderte sich die Phagozytose im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die großen Unterschiede in der Kontrolle waren in den geringen Zellzahlen für phagozytierende Zellen begründet. Auch nach Interferon γ Stimulation mit zusätzlicher Nikotinsäure Gabe war ein konstanter Effekt, wie bei der Zelllinie Ana1, zu keinem Zeitpunkt erkennbar. Insgesamt wurde dieses Experiment sieben Mal wiederholt und lieferte keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisse. Hiervon sind zwei Experimente exemplarisch gezeigt.

Beispiel Experiment 1 (Maus Nr.: 1953 PUMA-G^{+/-}; Maus Nr.: 2252 PUMA-G^{-/-})



Beispiel Experiment 2 (Maus Nr.: 915 PUMA-G WT; ; Maus Nr.: 980 PUMA-G^{-/-})

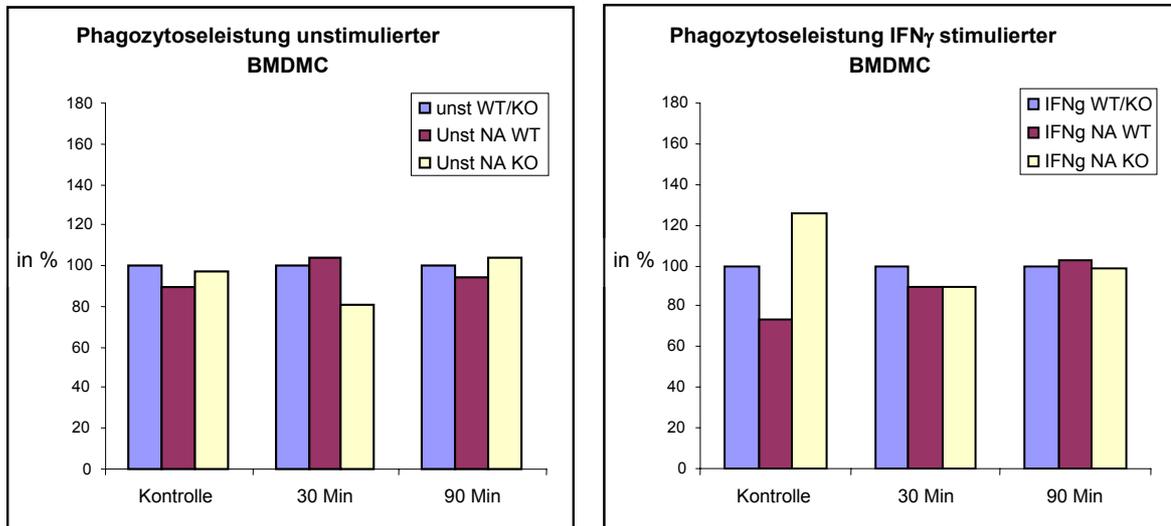


Abb. 3.20: Phagozytose von fluoreszierenden Microspheres von Knochenmarksmakrophagen. Zwei Beispielerperimente zeigen keine Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Phagozytoseleistung nach Doppelstimulation mit IFN γ und Nikotinsäure. Blau: Kontrollwert auf Eis (auf 100% gesetzt), braun: Stimulierte Wildtyp Zellen im Verhältnis zu unstimulierten Wildtyp Zellen; gelb: Stimulierte PUMA-G^{-/-} Zellen im Verhältnis zu unstimulierten PUMA-G^{-/-} Zellen; unst. = unstimuliert, IFNg = IFN γ stimuliert, NA = Nikotinsäure, WT = Wildtyp, KO = PUMA-G^{-/-}

3.2 Jak2 Ergebnisse

3.2.1 Generierung einer Jak2 aktivierungsdefizienten Mauslinie

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Generierung einer Jak2 Kinase aktivierungsdefizienten Maus-Mutante. Eine Jak2-defiziente Mutante wurde 1998 generiert. (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998). Jak2 defiziente Tiere sterben embryonal am Tag e12,5 durch akute Anämie und haben sehr wenige Erythrozyten-Vorläuferzellen. Dies konnte einer defekten Signaltransduktion am Erythropoietin-Rezeptor zugeschrieben werden, der für die adulte Hämatopoese essentiell ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Hypothese nachgegangen, ob eine aktivierungsdefiziente Jak2-Mutante ähnlich extreme Effekte nach sich zieht wie die komplette Abwesenheit von Jak2. Es wäre z.B. eine Chaperon Funktion von Jak2 denkbar bzw. die geringe Grundaktivität, wie sie von Chatti *et al.* (Chatti *et al.*, 2004) beschrieben wird, reicht aus um die Erythropoese zu ermöglichen. Für die Erzeugung der Mauslinie musste deren Genom, d.h. die codierenden Bereiche für das *jak2* Gen so verändert werden, dass eine Aktivierung durch Phosphorylierung im „activation loop“ unterbunden wird.

3.2.1.1 Herstellung der aktivierungsdefizienten Jak2 Maus-Mutante durch Punktmutationen

Die Aktivierung von Jak2 wird durch Phosphorylierung der beiden Tyrosine 1007 und 1008, die im Exon 21 kodiert werden, ermöglicht. Um dies zu verhindern sollten diese beiden Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht werden. Dies wurde durch Einfügen von zwei Mutationen im 3' Bereich des Exon 21 erreicht. Die Mutationen in den Codons für die beiden Aminosäuren 1007 und 1008 wurden mittels spezifischer Primer (Kapitel 2.6.1), die bis auf zwei Basen identisch zur genomischen Sequenz waren, in einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingefügt. Hierbei wurden die mittleren Basen des Codons für Tyrosin von Adenin zu Thymin ausgetauscht (Abb. 3.21). Dabei entstand das Codon für Phenylalanin (Tyrosin 1007/1008 zu Phenylalanin (Y1007/8F)). Durch diese Mutation sollte die Phosphorylierung der Tyrosine und somit die Aktivierung von Jak2 unterbunden werden. Die angrenzenden codierenden Bereiche wurden in dieser Arbeit nicht verändert. Darüber hinaus konnte zum späteren Screening der Mutation durch die zwei Basenaustausche eine Schnittstelle für EcoRI eingefügt werden.

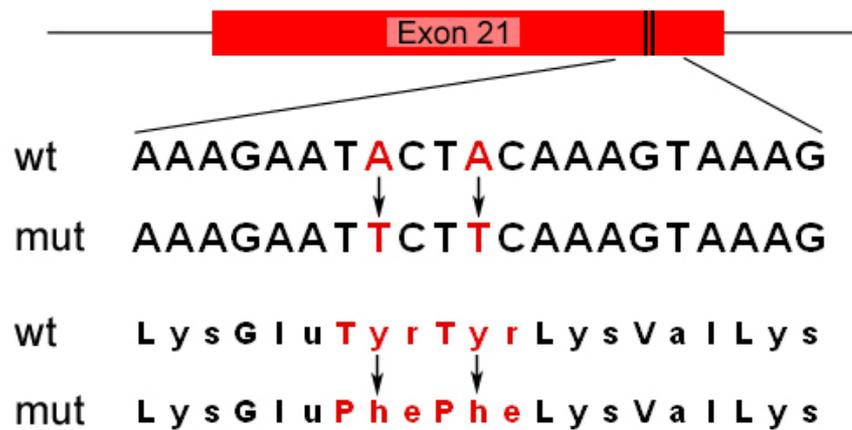


Abb. 3.21: Mutationsstrategie, die zum Aminosäureaustausch von AS 1007/8 Tyrosin zu Phenylalanin (Y1007/8F) führt.

3.2.1.2 Klonierungsstrategie des Rekombinationsvektors

Strategie 1

Für den Targetvektor wurde der kleinere homologe Bereich aus 629 Basenpaare mit Exon 20 und dem mutierten Exon 21, als kurzer Arm bezeichnet, verwendet. Der lange Arm (längerer homologer Bereich) wurde 3' des kurzen Armes gelegt und umfasste 3300 Bp intronische Sequenz. In Abb. 3.22 wird die Lage des Ziellokus für das Einbringen der Mutation und die homologen Bereiche aufgezeigt. Der ganze genomische *jak2* Locus umfasst ca. 60 kb. Der zu targetende Bereich liegt im 3' Ende des Gens und schließt in etwa einen Bereich von 7 kb ein.

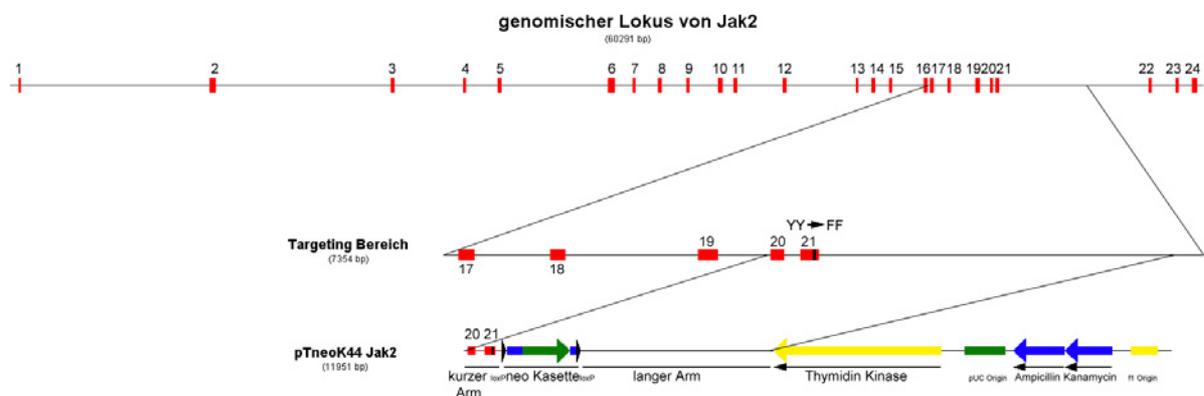


Abb. 3.22: Schematischer Überblick der ersten targeting Strategie. Oben: gesamter *jak2* Locus; Mitte: Detailansicht des zu targetenden Locus; Unten: linearisierter Targetvektor

Thymidinkinase (TK) Kasette:

Durch den Einbau einer viralen Thymidinkinase Kasette in dem Targetvektor war eine Negativselektion von Zellen möglich. Bei ES-Zell Klonen bei denen die Insertion nicht homolog erfolgte, sondern zufällig im Genom geschah, wurde mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch die gesamte heterologe DNS des Targetkonstruktes inseriert. Sie waren in Folge dessen sensitiv für die Phosphorylierung und den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogs Gancyclovir in die DNS. Dieses Thymidinanalogon unterbindet weitere Zellteilungen, da die Replikation der DNS gestört wird. Bei homolog rekombinierten ES-Zell Klonen hingegen wurde, auf Grund der heterologen DNS, diese Kasette nicht eingebaut. Sie sind demzufolge resistent gegen Gancyclovir, da dieses nicht durch die virale Thymidinkinase aktiviert werden kann (Wurst und Joyner, 1993).

Nach siebenmaligem Elektroporieren des mit NotI am kurzen Arm linearisierten Targetvektors in E14.1 murine embryonale Stammzellen (SvJ129/Ola) und anschließender Doppelselektion mit G418 und Gancyclovir, wurden mehr als 1000 Klone gepickt und in 96-well Platten kultiviert. Da mit „Screening-PCR“ und PCR-Southern Blot in keinem der 1000 Klone eine homologe Rekombination nachweisbar war, wurde diese targeting Strategie verworfen und ein neuer Vektor mit verlagerten homologen Bereichen kloniert (Abb. 3.27).

3.2.1.3 Sequenzanalyse

Der erste Targetvektor umfasste den genomischen Bereich des Exons 20 und 21 mit anschließender Intronsequenz. In diesem Bereich stimmten die beiden verwendeten Datenbanken Ensembl und Celera in ihrer Basenanordnung überein. Beim Erstellen des zweiten Vektors hingegen zeigten sich die sequentiellen Unterschiede anhand der Klonierungsarbeiten. Dieses Konstrukt lag etwas weiter in 5' Orientierung des ersten Konstrukts und beinhaltete den Bereich um die Exons 18 mit 21. Da genau das Exon 18 in der Ensembl Sequenz fehlt und sich durch die Klonierung und Sequenzierung dieses Bereiches zeigte, dass die Celera Sequenz korrekt ist, wurde im Verlauf dieser Arbeit nur noch auf die Celera Sequenz zurückgegriffen. Bei der Generierung des ersten Targetvektors war noch keine Lizenz für die Celera Datenbank erworben.

Jak2 Sequenzanalyse

cDNS

Um die in der Kapitel 3.2.1 erwünschte Genmutation zu erreichen, war zuvor noch eine Datenbanksuche für die bekannte Jak2 cDNS Sequenz nötig. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz aus der öffentlich zugänglichen Datenbank Ensembl verwendet. Anhand dieser Sequenz wurde auch das erste Targetvektor Konstrukt erstellt. Das zweite Konstrukt bezieht sich auf die Sequenz der Celera Datenbank (siehe Kapitel 3.2.1.2). Die Gesamtzahl der Exons stimmt in beiden Datenbanken überein. Im Vergleich (Stand Dezember 2002), sowohl der cDNS als auch des genomischen Lokus von *jak2* dieser beiden unterschiedlichen Datenbanken ergaben sich im Bereich um die Exons 1 und 2, 17 bis 19 und im letzten Exon 24 (nach Celera Nomenklatur) deutliche Unterschiede (Abb. 3.24).

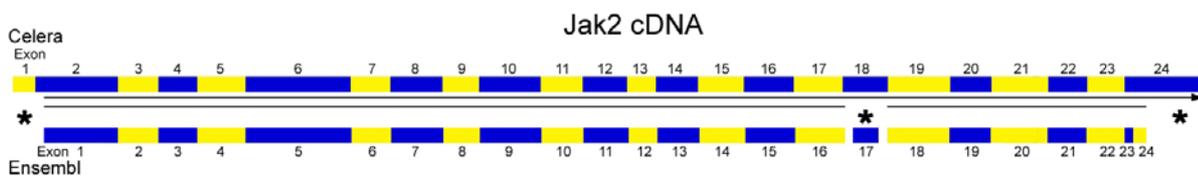


Abb. 3.24: Schematischer Vergleich der Jak2 cDNS aus den Datenbanken von Celera (oben) und Ensembl (unten). * markieren Bereiche, die nur in einem von beiden Datensätzen vorhanden sind. Die Linien zwischen den Balken zeigen die dazugehörige translatierten Bereiche (Daten von Dezember 2002).

Das vollständige Exon 1 und der gesamte Bereich des zweiten Exons vor dem Start ATG in Exon 2 fehlten in der Ensembl Sequenz. Des weiteren fehlte ein großer Teil inklusive des Exons 18 in der Ensembl Datenbank. Die automatische Exonererkennung des Ensembl Algorithmus erkannte jedoch im Intronbereich ein putatives Exon, welches nur durch 1 Base als Intron vom darauf folgenden Exon 19 getrennt war. Ein weiterer Unterschied der beiden Sequenzen war im letzten Exon (24) zu finden. Während Exon 24 bei Celera ein Exon ist, wird dieses in der Ensembl Datenbank in zwei aufgeteilt und der größere 3' Bereich des Exons fehlt. Die Teilung in diese beiden Exons (Ensembl 23 und 24) hat ebenfalls zur Folge, dass durch das Intron dazwischen ein weiterer Sequenzunterschied vorhanden ist (Abb. 3.25).

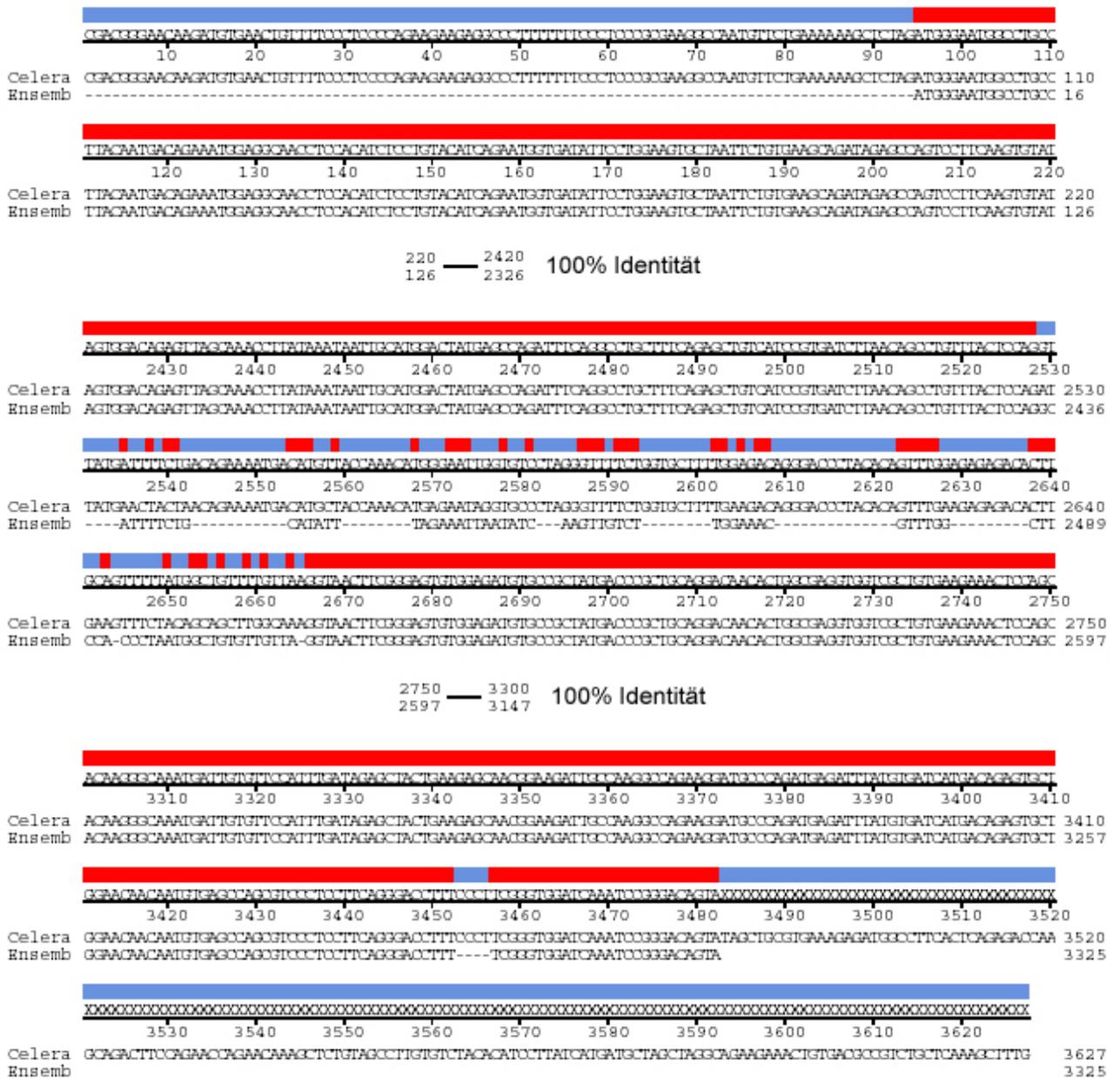


Abb. 3.25: Sequenzalignment der cDNS von Jak2. Oben Celera, unten Ensembl; Identische Bereiche in rot, Unterschiedliche Bereiche in blau; Dargestellt sind nur der 3' (unten), 5' (oben) und der Bereich um das fehlende Exon 18 (mitte);

Die Ensembl Sequenz führt somit als ganzes nicht zu einem einzigen, vollständigen open reading frame (ORF) von *jak2*, da zum einen mehrere Exons teilweise vollständig fehlen und zum anderen die Sequenz entweder frühzeitig mit einem Stop-Codon endet oder bei manueller Korrektur des ORF der 3' Bereich nicht komplett vorhanden ist. Die Sequenz von Celera beinhaltet sowohl ein untranslatiertes Exon 1 im 5' Bereich als auch den kompletten ORF von *jak2* incl. Stop-Codon.

Genomischer Lokus

Da die Arme der Targetvektoren genomische Homologie aufweisen müssen, enthalten diese auch Introns. Deshalb wurde neben der cDNS Sequenz auch die genomische Sequenz des *jak2* Lokus genauer untersucht. Die Datenbanken zeigten nicht nur auf cDNS, sondern auch auf genomischer Ebene im Vergleich zueinander fehlende Sequenzen. Die in Abb. 3.26 grün markierten Bereiche fehlten in der jeweils anderen Sequenz. Bei ihnen handelt es sich um nicht sequenzierte Abschnitte bestehend aus poly-(N).

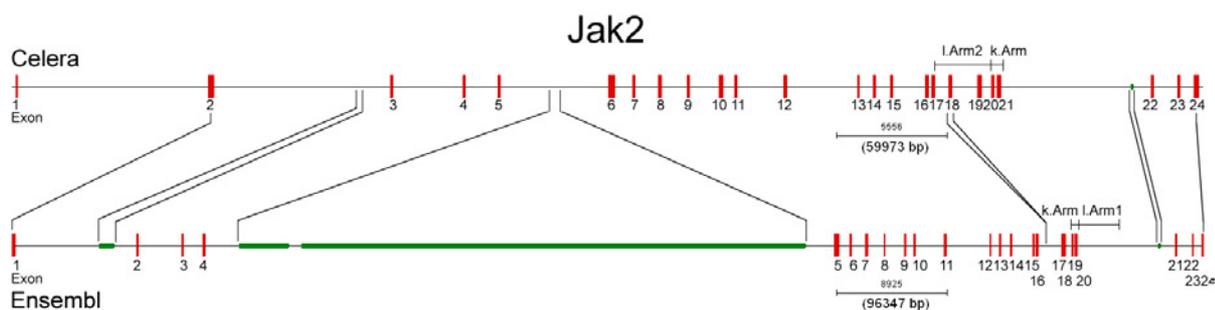


Abb. 3.26: Schematischer Vergleich des genomischen *jak2* Lokus aus den Datenbanken von Celera (oben) und Ensembl (unten). Exons in rot, unsequenzierte poly-(N) Bereiche in grün. Homologe Bereiche (kurze und lange Arme) für die beiden Targetvektoren um Exon 21 bzw. Exon 20

Am auffälligsten zeigt sich der Unterschied anhand eines sehr großen Bereichs in der Ensembl Sequenz. In etwa die Hälfte der Sequenz besteht aus einem Bereich unsequenzierter DNS. Wegen dieser großen Bereiche ist auch der gesamte Genlokus von *Jak2* bei Celera mit ca. 60 kb und Ensembl mit fast 100 kb sehr unterschiedlich. Am entscheidendsten war jedoch der fehlende Bereich um das Exon 18 (Celera) in der Ensembl Sequenz, da dieser Bereich in den zweiten Targetvektor eingebracht werden sollte.

Strategie 2

Bei der zweiten Strategie wurde nur der homologe Bereich für den kurzen Arm beibehalten, da dieser die zwingend erforderliche Mutation enthält. Der homologe lange Arm wurde bei diesem Vektor 5' des kurzen Arms gelegt. Er umfasste die Exone 18 und 19 und einen weiten Bereich des Introns 17. Er besteht insgesamt aus 2780 Bp und wird vom kurzen Arm durch die im Intron zwischen Exon 19 und 20 liegende Neomycin Kasette getrennt (Abb. 3.27).

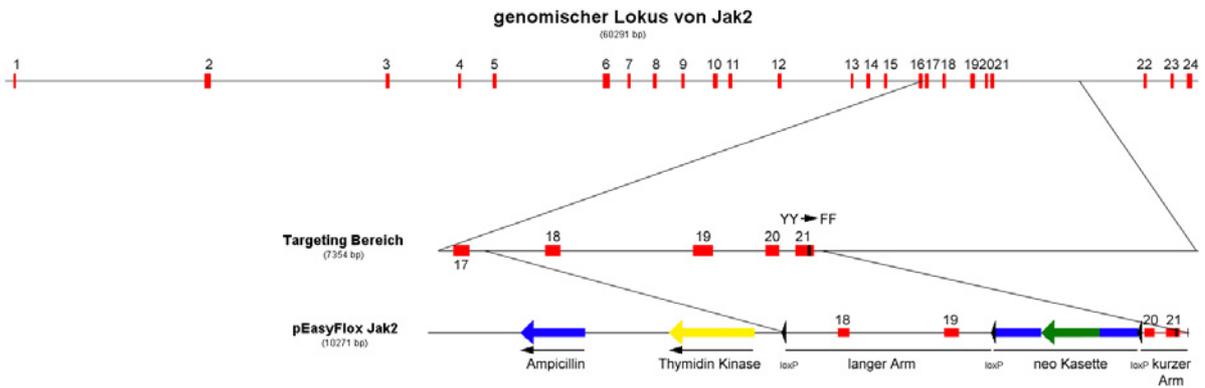


Abb. 3.27: Schematischer Überblick der zweiten targeting Strategie. Oben: gesamter *jak2* Lokus; Mitte: Detailansicht des zu targetierenden Lokus; Unten: linearisierter Targetvektor

Als Grundvektor diente hier das pEasyFlox Plasmid, welches schon eine gefloxtete Neomycin Kasette und das Gen für die Thymidinkinase enthält (Abb. 3.28). Die Länge des zweiten Targetkonstruktes beläuft sich insgesamt auf 10,2 kb. Der kurze Arm wurde über BamHI und der lange Arm anschließend über XbaI einkloniert. Der Vektor wurde anhand von Restriktionsanalyse und Sequenzierungen verifiziert.

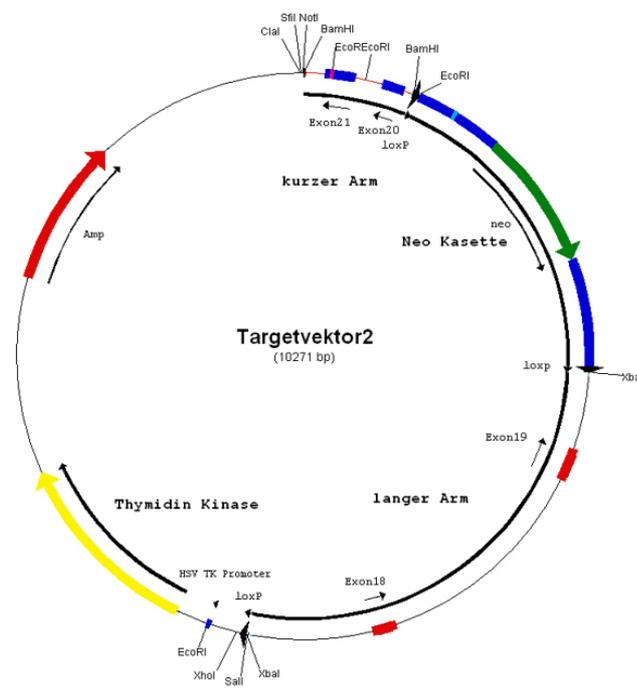


Abb. 3.28: Schematische Übersicht des zweiten Targetvektors mit kurzem homologem Arm, langem homologem Arm, Neomycin-Kasette und Thymidinkinase Kasette

3.2.1.4 Generierung von Jak2 mutierten embryonalen Stammzellen

Nachdem für die Elektroporation des mit NotI linearisierten zweiten Vektors genügend E14.1 ES Zellen kultiviert waren, konnten nach einer 12-tägigen Doppelselektion wiederum mehr als 1000 Kolonien gepickt werden. Diese Kolonien wurden einzeln kultiviert und auf zwei Replikate verdoppelt. Eines davon wurde bei -80°C tief gefroren und das zweite fand Verwendung beim Screening nach positiven Klonen. Hierfür wurde eine etablierte Screening PCR durchgeführt. Dabei wird nur dann ein Amplifikat erzeugt, wenn das Targetingkonstrukt homolog mit der genomischen DNS rekombinierte. Einer der Screening PCR Primer liegt innerhalb der Neomycin-Kassette, die nur auf dem Targetvektor zu finden ist, der andere bindet außerhalb des Targetvektors an die genomische DNS (Abb. 3.29). Somit kommt es nur bei homolog rekombinierten Klonen zur erfolgreichen Amplifikation.

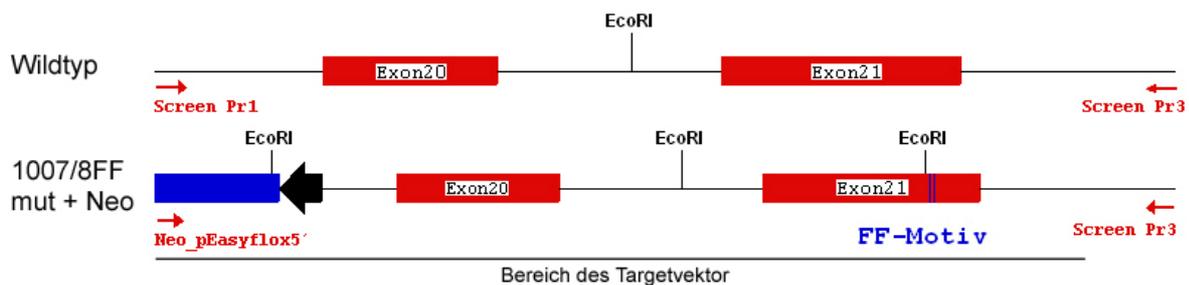


Abb. 3.29: Schematische Darstellung des getargeteten Lokus für die Screening PCR.
 rot: Exons, blau: Teil der Neo-Kassette; kleine rote Pfeile: verwendete Primer für die Screening PCR

Die Amplifikate wurden anschließend in 1%igen Agarosegelen nach Größe aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer spezifischen Sonde, die den amplifizierten Bereich umspannte, im Southern Blot auf positive Klone hin überprüft (Abb. 3.30). In der exemplarischen Abbildung kann man im linken Agarosegelbild bei Klon 142 schon eine Bande sehen, die nach Blotten und Hybridisieren mit der radioaktiven Sonde noch verstärkt wird. Zusätzlich erkennt man auf dem rechten Blot weitere Signale von Amplifikaten aus Kolonien, die erst durch die radiaktive Markierung sichtbar wurden und somit ebenfalls von putativ positiv rekombinierten ES-Zell Klonen stammten.

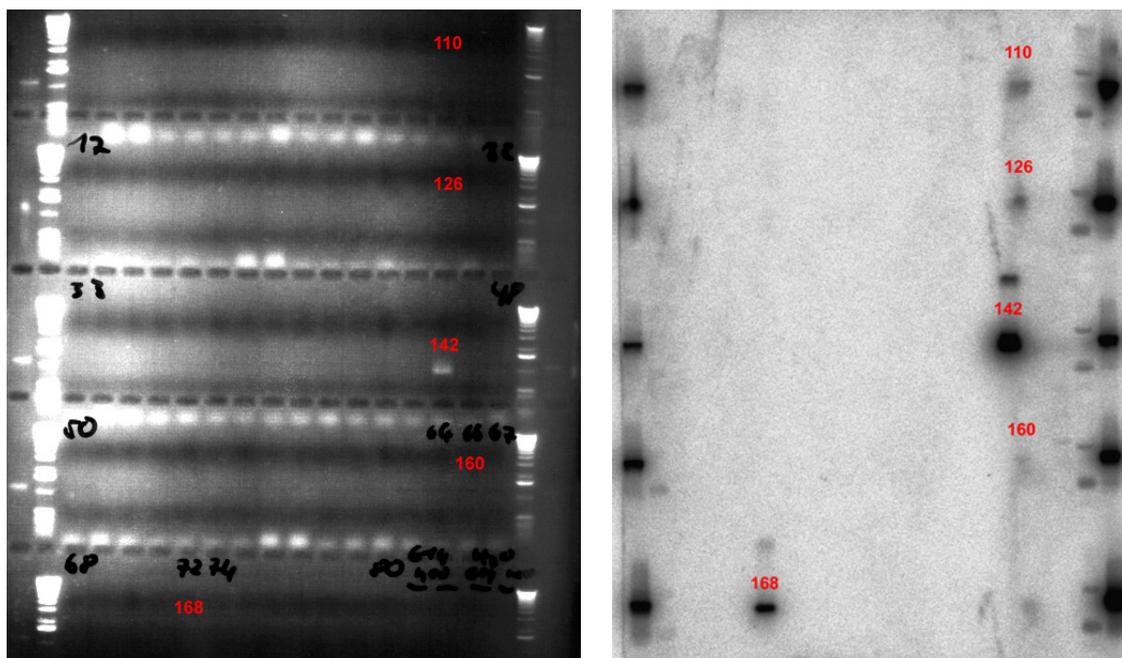


Abb. 3.30: Screening von 80 gepickten Klonen; a. Agarosegel mit nach Größe aufgetrennten Screening PCR Produkten; Die innere Spuren ES-Zell Kolonien und in den beiden Spuren 1+20 mit Positivkontrolle, Spuren 2+19 mit 1kb Marker und Spuren 3-18 ES-Zell Kolonien; b. auf Nylonmembran geblottete und mit spezifischer, radioaktiv markierter Sonde hybridisierte PCR-Produkte; rot beschriftet putativ positive Signale

Nach gezielter Analyse der putativ positiven Klone zeigte sich anhand der Screening PCR und eines anschließenden EcoRI Verdau des PCR-Produktes ein unerwartetes Ergebnis. In der Wildtyp Situation sollte man nach dem Verdau zwei Banden (423 Bp und 330 Bp) erhalten (Abb. 3.31). Der vollständig getargetete Locus sollte nach Verdau ohne Mutation drei Banden (423, 330 und 238 Bp) zeigen und mit eingebrachter Y1007/8F Mutation vier Banden, wobei die 423 Bp Bande durch die mit der Mutation neu entstandenen EcoRI Schnittstelle in zwei kleinere (226 Bp und 194 Bp) geschnitten wird. Abb. 3.31 zeigt sowohl eine Wildtyp als auch eine PCR für das rekombinierte Allel jeweils nach EcoRI Verdau. Die Wildtyp-PCR dient als Kontrolle für die Funktionalität der PCR-Reaktion selbst. Es sind in der „Knock-out“ PCR sowohl bei Klon #142 als auch bei Klon #214 drei Banden zu sehen. Somit sind diese beiden Klone falsch positiv. Bei Klon #92 sind jedoch fünf Banden sichtbar. Dieses Bandenmuster lässt sich nur als Bandenmuster der beiden rekombinierten Allele mit und ohne integrierter Mutation erklären.

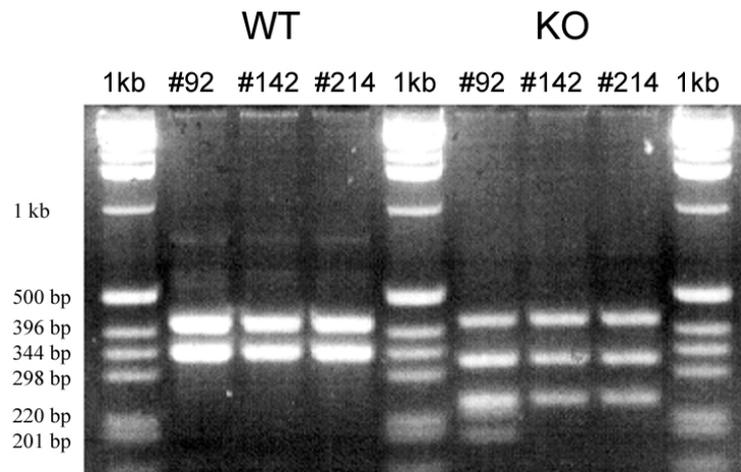


Abb. 3.31: Agarosegelbild der putativ positiven Klone nach Screening PCR mit anschließendem EcoRI Verdau; links Wildtyp Allel, rechts „Knock-out“ Allel; Klon #92 im „Knock-out“ Allel mit verändertem „Mischklon“ Bandenmuster

Daher wurde Mischklon #92 aufgetaut, vereinzelt, 90 einzelne Kolonien gepickt und diese anschließend analysiert. Von allen 90 gepickten Kolonien wurden die zwölf am besten wachsenden Subklone expandiert, Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert, DNS gewonnen und mit PCR auf homologe Rekombination hin untersucht (Abb. 3.32). Neun dieser zwölf Klone zeigten in der „Knock-out“ PCR ein positives Signal und drei trugen nur das Wildtyp Allel.

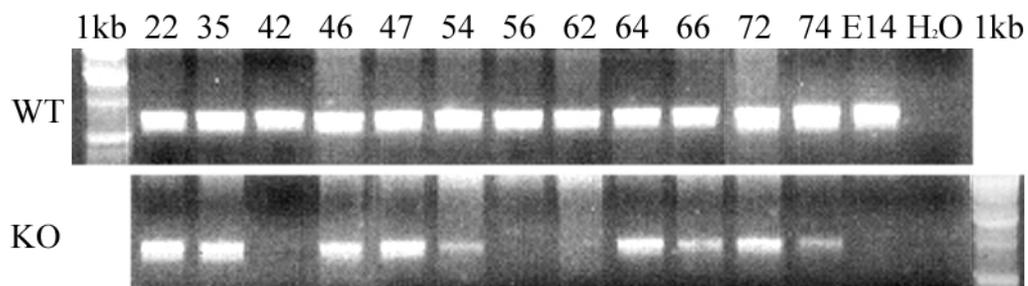


Abb. 3.32: Agarosegelbild mit Screening-PCR der vereinzelt und gepickten zwölf Klone; oben Wildtyp Allel, unten „Knock-out“ Allel

Positive Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI der 977 Bp großen KO-Bande identifiziert (Abb. 3.33). Vier (#22, #35, #54, #64) der zwölf Klone waren negativ und drei (#42, #56 und #62) nicht getargetet. Bei Klon #66 und #74 konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Die restlichen drei Klone (#46, #47 und #72) wurden als eindeutig positiv identifiziert.

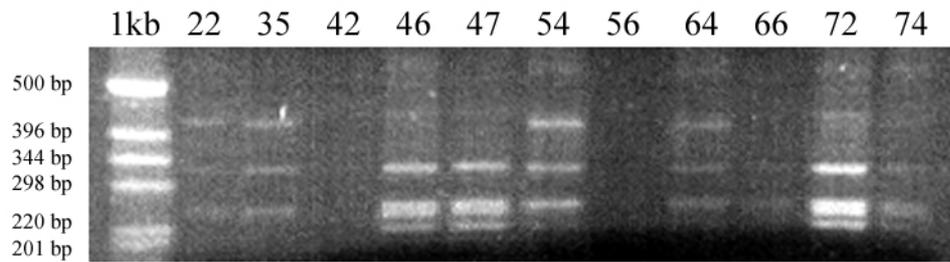


Abb. 3.33: Agarosegelbild der Screening-PCR mit anschließendem EcoRI Verdau von vereinzelt positiven Klonen

Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurden nur noch die beiden Klone #92/46 und #92/72 verwendet, da für die weiteren Analysen nur von diesen genügend Material vorhanden war. Der Klon #92/47 hätte erneut kultiviert werden müssen und wurde daher nur als Backup in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Mit einem NcoI Verdau und einem Southern Blot wurde der homolog rekombinierte Locus in den Klonen #92/46 und #92/72 genauer untersucht. Hierfür wurde die verdaute DNS in einem 1% Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer spezifischen, radioaktiv markierten flankierenden Sonde hybridisiert. Die Sonde bindet im Wildtyp Allel an ein 7,7 kb großes Fragment. Das homolog rekombinierte Allel hingegen ist mit 5,7 kb durch die in der Neo-Kassette liegende NcoI Schnittstelle deutlich kleiner. Eine Schematische Übersicht ist in Abb. 3.34 dargestellt.

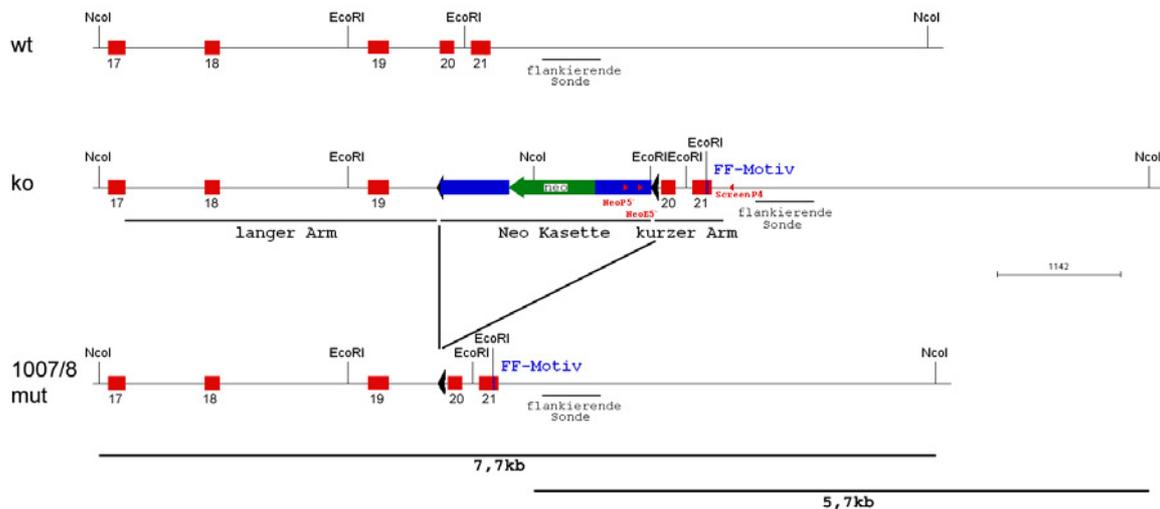


Abb. 3.34: Übersicht über den Ziellokus von *jak2*; oben Wildtyp Situation, Mitte homolog rekombinierter Locus und unten der *jak2* Locus nach Deletion der Neo-Kassette; FF-Motiv: Y1007/8F Mutation; flankierende Sonde: Bindestelle für radioaktiv markierte Sonde

In der Kontrollbande mit verdauter E14.1 DNS erkennt man nur das Wildtyp Allel mit 7,7 kb. Im Gegensatz dazu ist in den beiden, durch PCR positiv identifizierten Klonen sowohl das Wildtyp (7,7 kb) als auch das rekombinierte Allel (5,7 kb) sichtbar (Abb. 3.35). Am oberen Rand der Abbildung erkennt man die Lauffront der DNS.

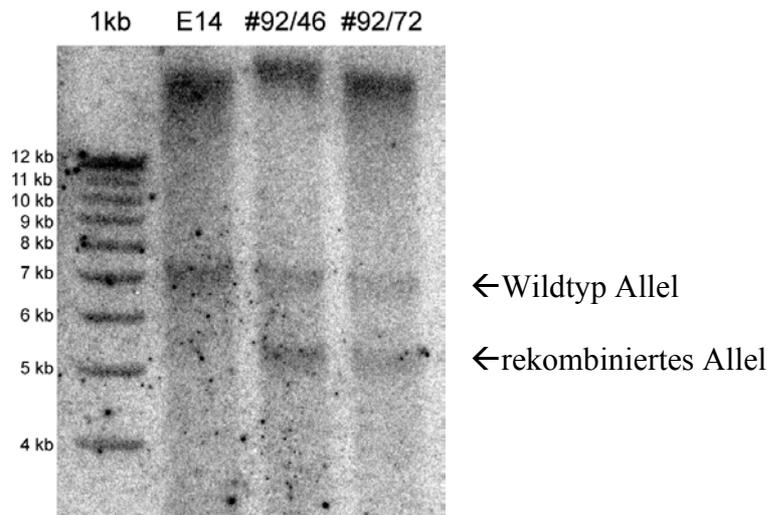


Abb. 3.35: *jak2* Southern Blot der mit *NcoI* verdauten genomischen DNS ausgewählter PCR-positiver Klone; Sonde: flankierende Sonde; Wildtyp Bande bei 7,7kb, „Knock-out“ Bande bei 5,5kb; Kontrolle E14.1 DNS

Um auszuschließen, dass bei der Elektroporation und anschließender Doppelsektion nicht zusätzlich eine weitere Integration an zufälliger Stelle erfolgte, wurden die positiven Klone mit Southern Blot auf die Neomycin-Kassette hin untersucht. Bei Kolonien bei denen eine weitere zufällige Integration stattfand, sollte sich ein verändertes Bandenmuster ergeben. Für diesen Southern Blot wurde der selbe genomische Verdau wie zuvor verwendet (Abb. 3.36). Nur in den positiven Klonen ist eine Bande bei 5,5kb zu sehen. Dies zeigt, dass es keine weitere Insertion des Targetvektors ins Genom gab.

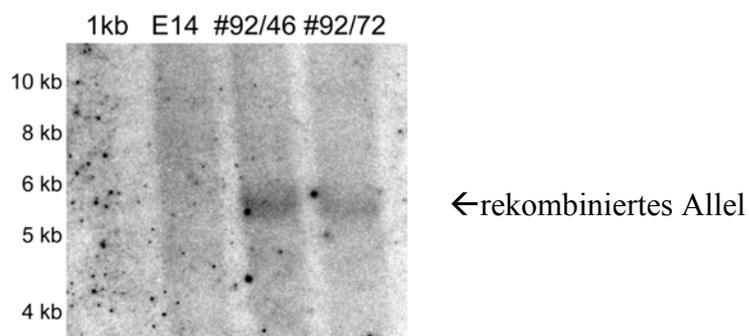


Abb. 3.36: Neo Southern Blot der mit *NcoI* verdauten genomischen DNS ausgewählter positiver Klone; Sonde: Neo-Sonde

3.2.2 Generierung der *Jak2* mutanten Mauslinie

3.2.2.1 Chimärengenerierung

Die Klone #92/46 und #92/72 wurden in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert und anschließend in pseudoschwangere CD1 Weibchen transferiert. Aus diesen Mischblastozysten entstehen so genannte chimäre Mäuse. Diese Chimären kann man leicht von Mäusen unterscheiden die keine homolog rekombinierten ES-Zellen enthalten, da die Fellfarbe aus beiden Mauslinien unterschiedlich im Genom codiert ist. Die C57BL/6 Mauslinie hat eine schwarze und E14.1 (SvJ129) agoutifarbene Fellfarbe (Abb. 3.37; Bild links). Geschlechtsreife chimäre Mäuse wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart und die Nachkommen auf Keimbahntransmission hin getestet. Die Wahrscheinlichkeit für die Vererbung des mutierten *jak2* Gens beträgt 50%, da die ES-Zelllinie heterozygot für *jak2* ist.

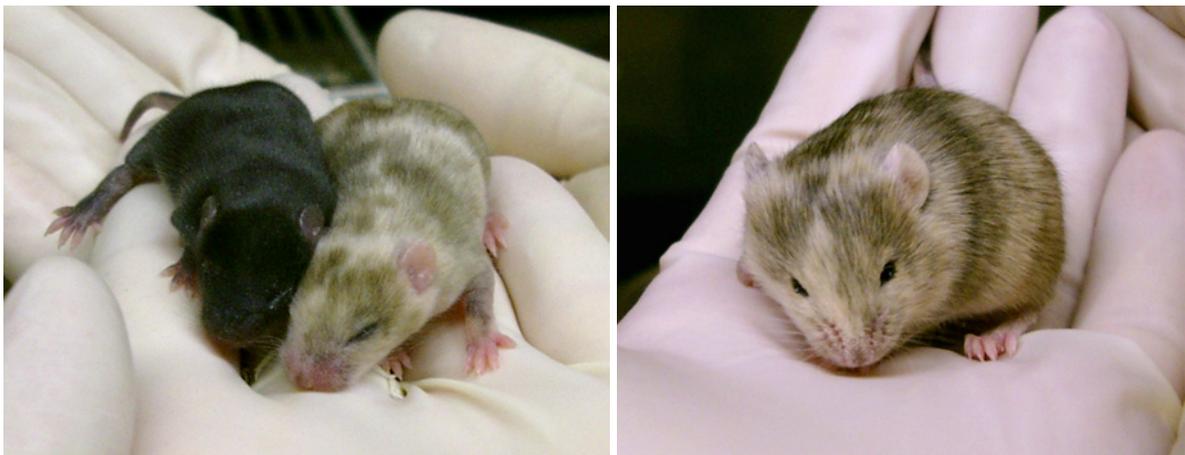


Abb. 3.37: Junge Mäuse im Alter von 7 bzw. 12 Tagen. Bild links: schwarze C57BL/6 Maus mit chimärem Geschwister (7 Tage alt). Bild rechts: Chimäre SvJ129Ola-C57BL/6 im Alter von 12 Tagen

3.2.2.2 Genomische Analyse der *Jak2* mutierten Mauslinie

Der Nachweis, dass die Mutation auch an die Nachkommen weitervererbt wurde, wurde anhand eines Southern Blot erbracht (Abb. 3.38). Aufgereinigte DNS aus Schwanzbiopsien wurde mit dem Restriktionsenzym *NcoI* verdaut und die Fragmente in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNS geblottet und mit einer radioaktiv markierten, spezifischen flankierenden Sonde hybridisiert. Die Sonde bindet im Wildtyp Allel an einem 7,7 kb großen Fragment und im homolog rekombinierten Allel an einem 5,7 kb Fragment (Abb. 3.38). Ebenso wie die zuvor positiv getesteten Klone zeigte die Spur mit der DNS der Maus 3334 beide Allele (*Jak2*^{+/-}). Bei der Maus #2666 ist wie bei der E14.1 Kontrolle nur die

7,7 kb große Wildtyp Bande zu sehen ($Jak2^{+/+}$).



Abb. 3.38: *jak2* Southern Blot aus Schwanzbiopsien von N1 Nachkommen der chimären Tiere. Spuren 1 und 7 mit 1kb-Marker, Spuren 2 und 6 mit Kontrolle und Wildtyp Probe ($Jak2^{+/+}$), Spuren 3, 4 und 5 mit $Jak2^{+/-}$ Proben

Um eine schnellere Typisierung der Nachkommen zu erreichen wurde eine PCR-Strategie gewählt, bei der die beiden *jak2* Allele (WT und MutY1007/8F) spezifisch unterschieden werden konnten. Hierfür wurden PCR Primer gewählt, die an ihrem 3' Ende mit den mutierten bzw. mit den ursprünglichen Basen endeten ($Jak2^{WT}Typ5'$ und $Jak2^{Mut}Typ3'$). Die für die PCR nötigen zweiten Primer $Jak2^{Typ3'}$ und $Jak2^{TypB5'}$ sind in Abb. 3.39 schematisch zu sehen.

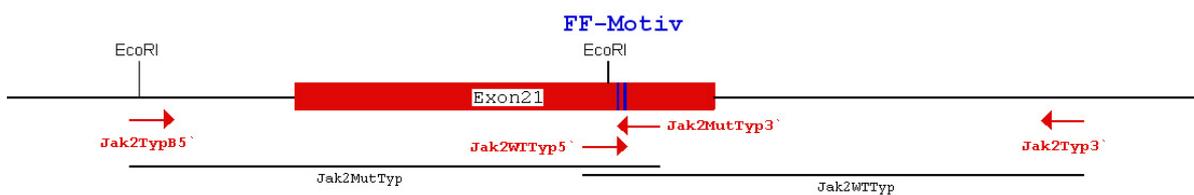


Abb. 3.39: Typisierungs-PCR Strategie über die Mutation im Exon 21; FF-Motiv: Y1007/8F Mutation; Primer: rote Pfeile

In Abb. 3.40 sieht man eine Typisierung als Beispiel. Alle Tiere tragen wie erwartet das Wildtyp Allel wohingegen drei Tiere die Mutation vererbt bekommen haben und heterozygot für *jak2* sind.

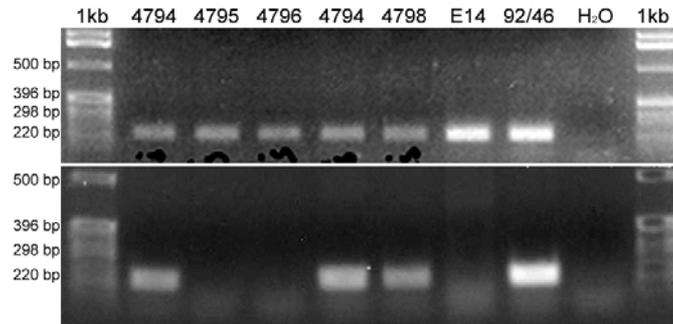


Abb. 3.40: Agarosegelbild einer beispielhaften Typisierungs PCR. Oben Wildtyp Allel, unten mutiertes Allel. Kontrollen: E14, injizierter Klon 92/46 und Negativkontrolle H₂O.

Da der rekombinierte genomische Locus noch die codierende Sequenz für Neomycin innerhalb des in Exon 21 mutierten *jak2* enthielt, war dieses Allel nicht funktionell und phänotypisch wie ein Jak2-„Knock out“ zu sehen. Um die Neomycin-Kassette zu deletieren, wurden Tiere, welche heterozygot für *jak2* waren, mit CRE Deleter Mäusen verpaart. Diese transgenen Tiere tragen CRE X-chromosomal und exprimieren die Rekombinase ubiquitär. In Abb. 3.41 erkennt man im oberen Abschnitt bei Maus #4594 keine Bande für das rekombinierte Allel mit Neomycin Kassette, jedoch deutlich die Bande für den Nachweis der Mutation in Exon 21 im unteren Bereich und somit einer Maus, welche heterozygot für das mutierte *jak2* Allel war. Somit wurde die von loxP Signalen flankierte Neomycin Kassette erfolgreich aus dem murinen Genom entfernt und die Mutation in Exon 21 erhalten (Jak2^{+*m*}). Dementsprechend sollte eine vollständige Transkription von mutiertem *jak2* möglich sein.

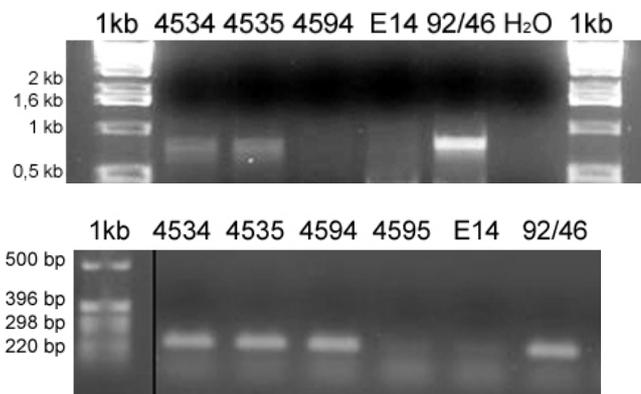


Abb. 3.41: Nachweis des genomisch funktionellen *jak2* Mut Y1007/8F Allels; oben: Screening PCR; unten: Typisierungs-PCR für die Mutation (MutY1007/8F Allel)

Nach Mendel sollte die Vererbung eines dominanten Merkmals, welches nur auf zwei Allelen im Genom codiert ist, an die Nachkommen phänotypisch im Verhältnis 3:1 (dominanter Phänotyp : rezessiver Phänotyp) und genotypisch 1:2:1 (Homozygot dominant : Heterozygot : Homozygot rezessiv) sein. Bei der Auswertung der Nachkommen, die aus einer Verpaarung mit für Jak2^{Y1007/8F} heterozygoten Eltern entstammten, konnte gezeigt werden, dass alle Tiere mindestens ein Wildtyp Allel für *jak2* trugen (29:68:0). Somit war zu vermuten, dass durch die eingeführte Mutation Y1007/8F eine essentielle Funktion von Jak2 zerstört wurde und keine Nachkommen mit dem Genotyp Y1007/8F lebensfähig sind. Dementsprechend beschränkte sich die Phänotypenanalyse auf Untersuchungen der Embryonen und auf embryonale Zellen in Kultur.

3.2.3 Phänotypanalyse

3.2.3.1 Embryonen Analyse

Embryonale Letalität

Jak2 defiziente Tiere sterben embryonal an einer Anämie am Tag e12,5. Dies ist bedingt durch einen Defekt in der definitiven Erythropoese in der fötalen Leber. Um zu untersuchen ob homozygot mutante Embryonen (Jak2^{m/m}), wie bei Jak2 defizienten Tieren, nicht in der Lage sind in der fötalen Leber mit der definitiven Erythropoese zu beginnen, wurden heterozygote Jak2^{+/m} Tiere miteinander verpaart und die Embryonen am Tag e12,5 entnommen. Insgesamt wurden 33 Embryonen untersucht. Davon waren einer Wildtyp (Jak2^{+/+}), 27 heterozygot (Jak2^{+/m}) und fünf homozygot (Jak2^{m/m}) mutant (Ratio: 1:27:5; Jak2^{+/+}:Jak2^{+/m}:Jak2^{m/m}) (Abb. 3.42).

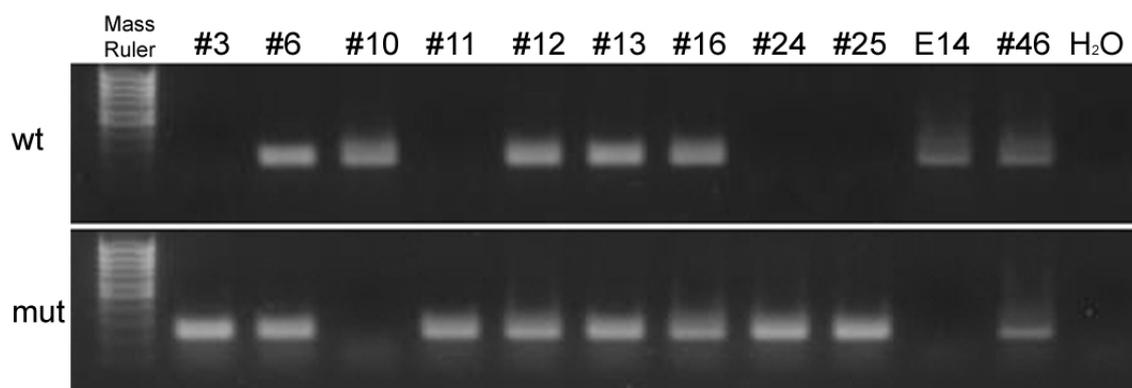


Abb. 3.42: Typisierungs PCR mehrerer Embryonen aus Jak2^{+/m} x Jak2^{+/m} Kreuzungen; oben Wildtyp Allel und unten Mut Y1007/8F Allel; Kontrollen: E14, injizierter ES-Zell Klon 46 und Negativkontrolle (H₂O)

Makroskopische Untersuchung

Im Größenvergleich zeigten sich zwischen Wildtyp und homozygot mutanten Embryonen keine gravierenden Unterschiede. Die Entwicklung der Organe und Extremitäten schienen identisch. Das Herz schlug, bei beiden Genotypen deutlich sichtbar, rhythmisch. In Bezug auf die fötale Blutbildung waren jedoch deutliche Unterschiede sichtbar (Abb. 3.43). Die Leber war bei den homozygot mutanten $Jak2^{m/m}$ Embryonen (rechtes Bild) im Vergleich zu Wildtyp Embryonen (linkes Bild) sehr blass. Zu diesem Zeitpunkt waren die Embryonen noch lebendig. Die Blutgefäße für die Versorgung des fötalen Gehirns waren in Wildtyp Embryonen deutlich zu erkennen, wohingegen bei $Jak2^{m/m}$ Embryonen die Blutgefäße wahrscheinlich aufgrund der fehlenden adulten Erythropoese nicht sichtbar waren. Der Dottersack war sowohl beim Wildtyp Embryo als auch bei den mutanten Embryonen durchblutet.

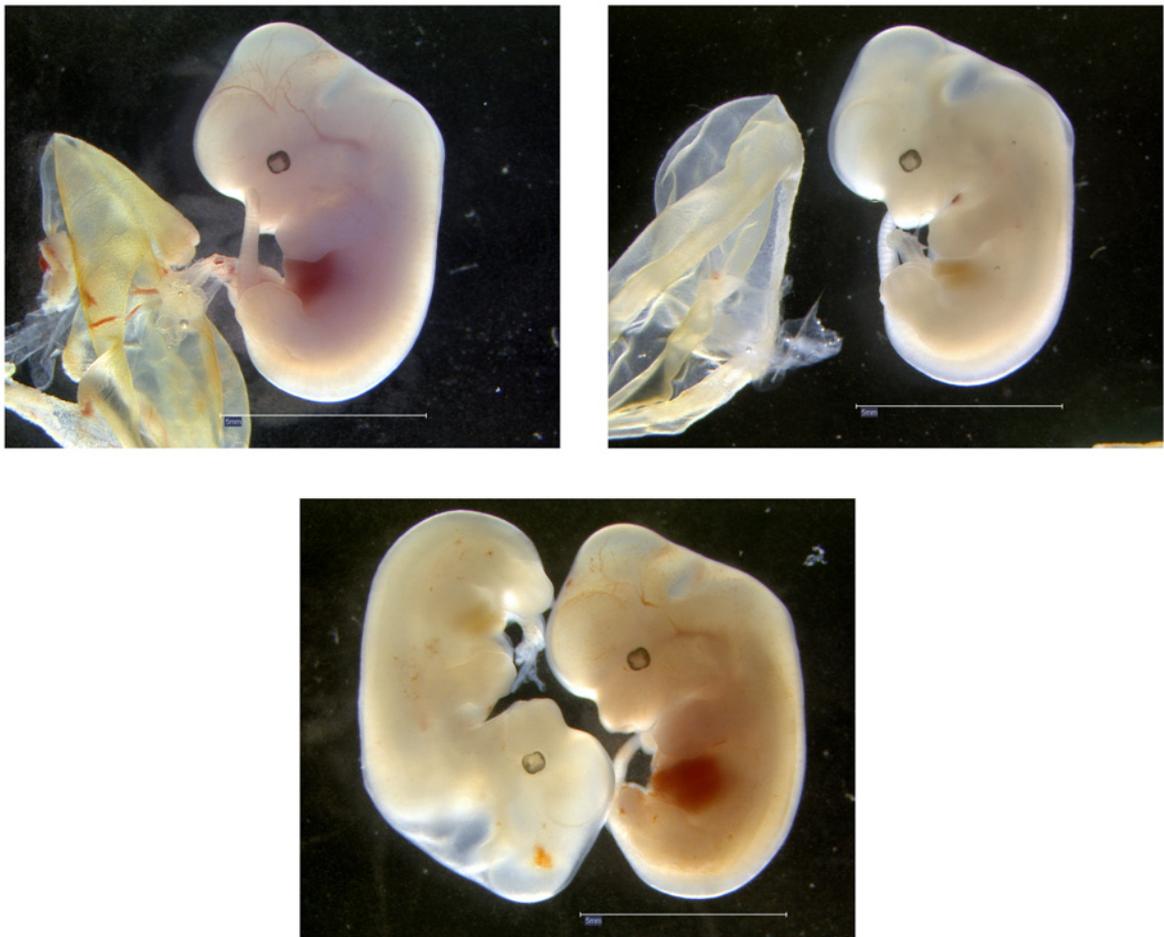


Abb. 3.43: Digitalfotos von Embryonen am Tag e12,5. links oben Wildtyp, rechts oben $Jak2^{m/m}$; unten direkter Vergleich beider Allele; man beachte die deutlich sichtbaren, rot gefärbten fötalen Lebern des Wildtyp Embryos im Vergleich zum $Jak2^{m/m}$ Embryo. Im oberen linken Bild erkennt man zusätzlich die Blutgefäße des Gehirns, die im rechten mutanten Embryo nicht sichtbar sind; Größenangabe: 5mm

Oberflächlich betrachtet sind die Lebern der Embryonen morphologisch vergleichbar (Abb. 3.44). Man erkennt die einzelnen Leberlappen und größeren Blutgefäße. Bei der Größe konnte man allerdings signifikante Unterschiede erkennen. Die Leber aus mutanten Embryonen war verglichen zu Lebern aus Wildtyp Embryonen um den Faktor 2-3 kleiner. Hier erkannte man den Unterschied in der Bildung von Erythrozyten noch deutlicher. In mutanten fötalen Lebern war keinerlei Erythropoese sichtbar, wohingegen in der Wildtyp Leber eine rote Färbung die normale Erythropoese anzeigt.

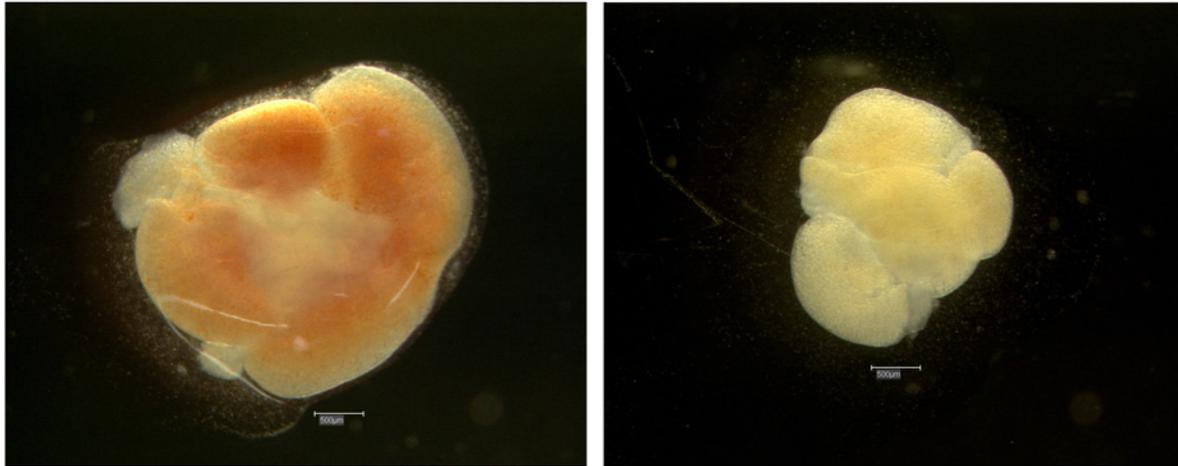


Abb. 3.44: Digitalfotos embryonaler Lebern (Tag e12,5) im Vergleich. Links Wildtyp Leber, rechts $Jak2^{m/m}$ Leber; Größenangabe 500 μ m.

3.2.3.2 $Jak2$ Proteinanalyse aus embryonalen Fibroblasten

Durch die eingeführte Mutation bestand die Gefahr eines durch Splicing veränderten Proteins oder eine erhöhte Instabilität der mRNA, so dass kein Protein gebildet werden kann. Der Nachweis, dass trotz der Mutation weiterhin $Jak2$ Protein translatiert wird, wurde mittels Western Blot Analyse erbracht (Abb. 4.3). Hierfür wurden heterozygote Tiere verpaart und am Tag e12,5 die Embryonen präpariert. Aus diesen wurden embryonale Fibroblasten (mEF) isoliert und kultiviert. Die Western Blot Analyse wurde im Labor von M. Müller, Wien durch Birgitt Strobl ausgeführt und ergab, dass mutiertes $Jak2$ -Protein in $Jak2^{m/m}$ embryonalen Fibroblasten gebildet wird (Daten nicht gezeigt; C. Wufka, S. Strobl, M. Müller, K. Pfeffer Manuskript in Vorbereitung).

3.2.3.3 Biochemische Analysen

STAT5 Aktivierung

Es wurde beschrieben, dass Jak2 defiziente Mausembryonen nicht älter werden als e12,5 Tage (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998). Dies ist der Zeitpunkt, an dem die definitive adulte Erythropoese für das Überleben des Embryos essentiell wird (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998). Bei den Jak2 defizienten Embryonen ist dies nicht mehr möglich, sie sterben an einer akuten Anämie. Für die Bildung von roten Blutkörperchen ist, unter anderem, Erythropoietin nötig (Wu *et al.*, 1995). Vorläuferzellen der Erythrozyten brauchen für ihr überleben ein EpoR Signal. Ohne dieses gehen sie in Apoptose. Der Botenstoff Erythropoietin bindet an seinen Rezeptor, von dort wird das Signal über Jak2 und STAT5 weitergeleitet. Aktivierte (phosphorylierte) STAT5 Dimere translozieren in den Nukleus und starten dort die Transkription verschiedener Gene.

Zur Analyse, ob in Jak2^{m/m} Embryonen die EpoR-Signaltransduktion blockiert ist wurden die zuvor präparierten Lebern (Abb. 3.44) durch ein Zellsieb zu Einzelzellen separiert. Diese konnten anschließend mit Erythropoietin stimuliert werden. Die Analyse der mutierten fötalen Leberzellen zeigte, dass nach 30 minütiger Erythropoietin Stimulation das EpoR Signal nicht weitergeleitet werden konnte (Abb. 3.45, rechter Blot), d.h. das Jak2Y1007/8F Protein war nicht mehr in der Lage, am Epo-Rezeptor STAT5 am Tyrosin 694 zu phosphorylieren und somit können vermutlich keine aktiven STAT5 Dimere gebildet werden (Abb. 3.45). In heterozygoten embryonalen Leberzellen konnte die Signalweiterleitung vollständig ablaufen (linker Blot), d.h. das Jak2Y1007/8F-Protein wirkt nicht als transdominant negatives Protein. Die Zellzahl der Leber war deutlich geringer in den Jak2^{m/m} verglichen zu Jak2^{+/+} Tieren und somit auch die Beladung der einzelnen Spuren unterschiedlich. Die Zellzahl einer Wildtyp Leber ist vergleichbar mit drei gepoolten Jak2^{m/m} Lebern. Dies konnte anhand des β -Aktin Blots nachgewiesen werden.

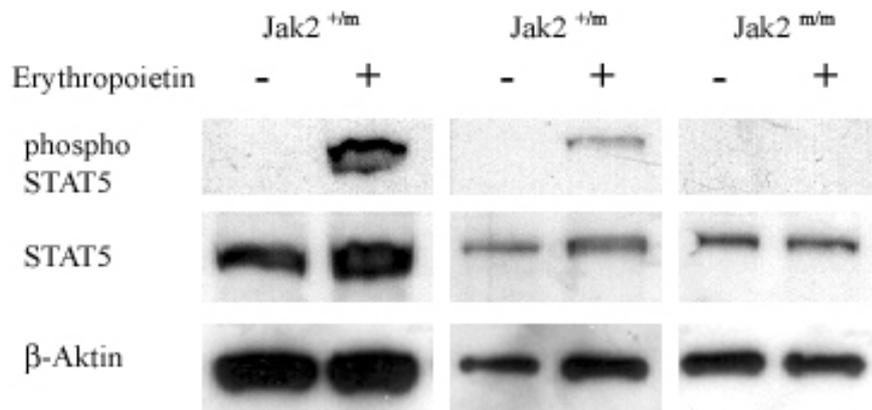


Abb. 3.45: Anti-phospho Tyrosin AS694 STAT5 Western Blot fötaler Leberzellen von e12,5 Tagen alten Embryonen, die mit Erythropoietin für 30 Minuten stimuliert wurden. Western Blot links und rechts drei Lebern gepoolt, in der Mitte eine Leber; Ladekontrolle Western Blot mit anti β-Aktin

STAT1 Aktivierung

Jak2 spielt auch im Interferon Gamma Rezeptor (IFN γ R) Signalweg eine zentrale Rolle. Nachdem IFN γ an seinen Rezeptor gebunden hat, werden die beiden Janus Kinasen Jak1 und Jak2 die mit den beiden Rezeptor-Ketten assoziiert sind in räumliche Nähe gebracht, aktiviert und es kommt zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 (O'Shea, 1997; Darnell, Jr., 1997). Die Aktivierung von STAT1 ist ein schneller Vorgang, der innerhalb von Minuten abläuft. Nun sollte untersucht werden, ob in der homozygot mutierten Jak2 Variante der Signalweg des IFN γ R beeinflusst ist. Dazu wurde die STAT1 Phosphorylierung in embryonalen Fibroblasten der unterschiedlichen Genotypen analysiert. Embryonale Fibroblasten mit den Genotypen Jak2^{+/+}, Jak2^{+m} und Jak2^{m/m} wurden mit IFN γ stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden im Gradienten- (4-12%) SDS Gel aufgetrennt und geblottet. Nach Inkubation mit einem anti-phospho Tyrosin 701 STAT1 spezifischen Antikörper erkannte man eine starke Phosphorylierung am Tyrosin 701, die in den Jak2^{+/+} und Jak2^{+m} mEFs bis zu 30 min unverändert blieb (Abb. 3.46 oben und mitte). Nach 2 Stunden nahm die Phosphorylierungsstärke deutlich ab, fiel auf ein niedrigeres Niveau und war bis zu 18 Stunden nachzuweisen. In homozygot mutanten mEFs (Jak2^{m/m}) war diese Kinetik stark verändert. Erste schwache Signale konnten nach 10 Minuten Stimulation detektiert werden, die bis zum Zeitpunkt von 18 Stunden etwas stärker wurden, allerdings nicht annähernd die Stärke des Wildtypsignals erreichten (Abb. 3.46 unten).

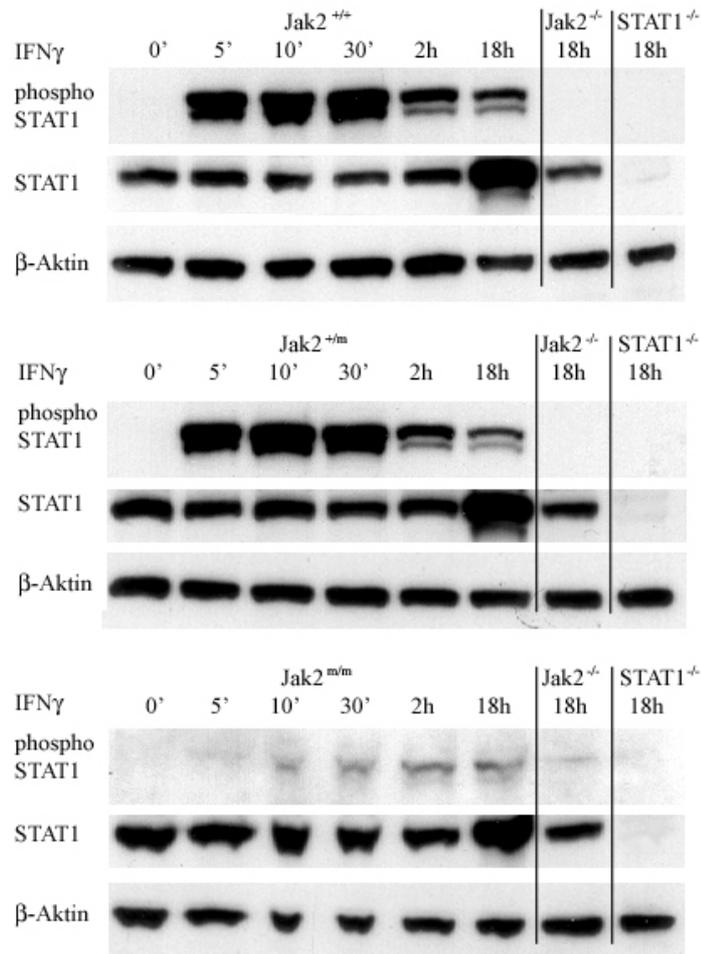


Abb. 3.46: Anti-phospho Tyrosin AS701 STAT1 Western Blot. mEF mit IFN γ stimuliert und zu unterschiedlichen Zeiten lysiert. Ladekontrolle: Western Blot mit anti β -Aktin

Wie im rechten Teil der Blots zu sehen ist, konnte in STAT1 defizienten mEF STAT1 nicht nachgewiesen werden, wohingegen in Jak2 defizienten mEF STAT1 Protein noch vorhanden war, welches noch minimal phosphoryliert werden konnte. Diese Phosphorylierung war allerdings deutlich schwächer im Vergleich zu mEF, die Jak2 noch in mutierter Form besaßen (Abb. 3.46 unten). STAT1 wird jedoch nicht nur an Tyr701, sondern auch an Ser727 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wurde ebenfalls untersucht. Die Serin (AS727) Phosphorylierung von STAT1 nach IFN γ Stimulation scheint ebenfalls stark gehemmt zu sein. Hier kann man bei heterozygoten bzw. Wildtyp Zellen bei 18 Stunden IFN γ Stimulation ein sehr starkes Signal sehen, wohingegen bei den homozygot mutierten mEF-Zellen nach 18 Stunden eine schwache Phosphorylierung nachweisbar war (Abb. 3.47). In Jak2 defizienten mEF war keinerlei Serin-Phosphorylierung nachweisbar.

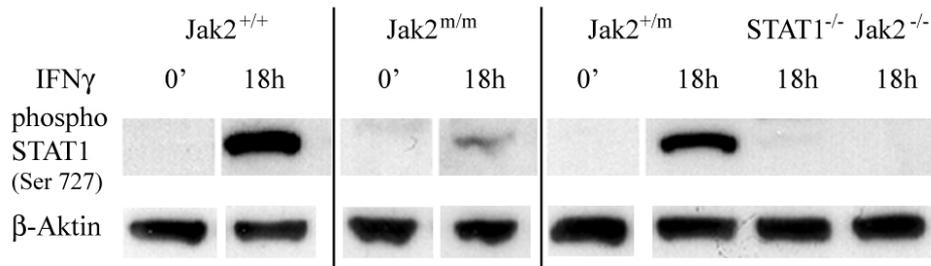


Abb. 3.47: Anti-phospho Serin AS727 STAT1 Western Blot; mEF mit 18 Stunden IFN γ Stimulation. Ladekontrolle: Western Blot mit anti β -Aktin

3.2.3.4 Infektion mit Vaccinia Viren

Die STAT1 Phosphorylierung ist essentiell für eine durch IFN γ induzierte Genregulation. Durch eine virale Infektion kann von verschiedenen Viren eine STAT1 Phosphorylierung gezielt inhibiert werden (Yokota *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2001), da IFN γ die Replikation bestimmter Viren in der Infektion inhibiert. Anhand eines Infektionsmodells wurde der Effekt der Jak2 Mutation Y1007/8F auf das Wachstum von Vaccinia Viren untersucht. Das Wachstum von Vaccinia Virus ist streng IFN γ abhängig und durch dessen Vorhandensein stark gehemmt (Legrand *et al.*, 2004). Hierfür wurden die Viren auf konfluent gewachsene mEF gegeben, welche zuvor mit unterschiedlichen Dosen IFN γ (0, 5 und 500 U/ml siehe Legende Abb. 3.48) für 48 Stunden präinkubiert wurden. Nach jeweils 16, 24, 48 und 72 Stunden wurden die infizierten Zellen bei minus 20°C tief gefroren. Die Virustiterbestimmung erfolgte anhand einer Verdünnungsreihe der Viren und Infektion von konfluent gewachsenen unbehandelten Fibroblasten. Murine Wildtyp Fibroblasten waren, im Gegensatz zu STAT1-defizienten Fibroblasten, in der Lage, auch nach relativ geringen Dosen IFN γ das Virenwachstum stark zu hemmen. Sie erreichten einen um bis zu drei Log-Stufen niedrigeren Virustiter (Abb. 3.48 oben). Selbst die physiologisch sehr hohe Dosis von 500 U/ml IFN γ führte bei STAT1^{-/-} mEF zu keiner Wachstumsinhibition (Abb. 3.48 mitte). Die Wachstumskurve war vergleichbar zu der von unstimulierten Wildtyp Fibroblasten. Wie STAT1 defiziente mEF waren Jak2 defiziente mEF ebenfalls nicht mehr in der Lage, auf IFN γ Stimulation hin das Virenwachstum zu inhibieren (Abb. 3.48 unten).

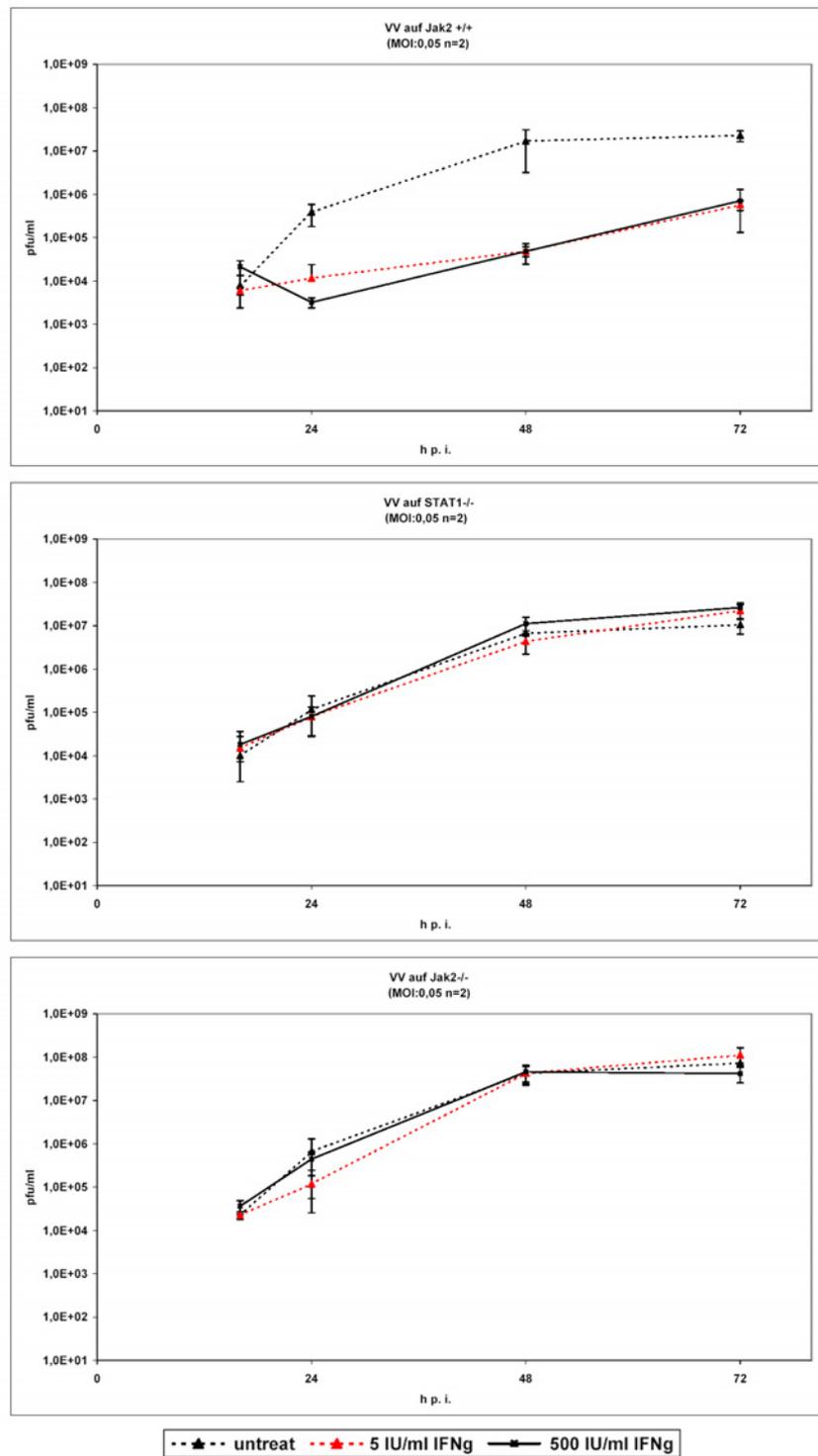


Abb. 3.48: Wachstumskurven von Vaccinia Virus in Wildtyp, STAT^{-/-} und Jak2^{-/-} mEF. Vorinkubation mit IFN γ für 48h; zwei infizierte Wells pro Zeitpunkt; Ratio Virus : mEF 1:20

Vergleichbar zu den Jak2^{m/-} EF waren die Ergebnisse von mEF mit mutiertem Jak2 Protein. Bei einem ersten Experiment mit Jak2^{m/m} mEF wurden 0, 5 und 500 U/ml IFN γ (siehe Legende Abb. 3.49) verwendet. In den Wildtyp und Jak2^{m/+} Fibroblasten war wieder eine starke IFN γ medierte Hemmung der VV-Replikation zu erkennen (Abb. 3.49). Jak2

defiziente Fibroblasten konnten wiederum trotz hoher $\text{IFN}\gamma$ Konzentration Viren im Wachstum nicht inhibieren (Abb. 3.49 oben rechts). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei mutierten Jak2 mEF (Abb. 3.49 unten rechts). Die Wachstumskurven haben den selben Verlauf wie bei $\text{Jak2}^{-/-}$ mEF. Die Anwesenheit von Jak2 Protein kann die Hemmung im Vergleich zum Jak2 „Knock-out“ somit nicht aufheben, d.h. aktives, an Y1007/8 phosphoryliertes Jak2 Protein ist unbedingt nötig, um Vaccinia Viren nach $\text{IFN}\gamma$ Stimulation im Wachstum effizient zu inhibieren. Durch sehr hohe Dosen $\text{IFN}\gamma$ (500 ng/ml) konnte allerdings ein signifikanter geringer inhibitorischer Effekt erzielt werden. Im Vergleich zu unbehandelten mutierten Fibroblasten ist in diesem Experiment das Virenwachstum zu jedem Zeitpunkt mindestens um den Faktor zwei niedriger. Betrachtet man den zweiten Messzeitpunkt (24h) lässt sich sogar eine Dosisabhängigkeit des Virenwachstums erkennen, die von unbehandelten und mit 500 U/ml Interferon γ behandelten mEF den Faktor 500 erreicht. Von 72 bis 96 Stunden konnte in keinem Ansatz ein gesteigertes Virenwachstum mehr gemessen werden.

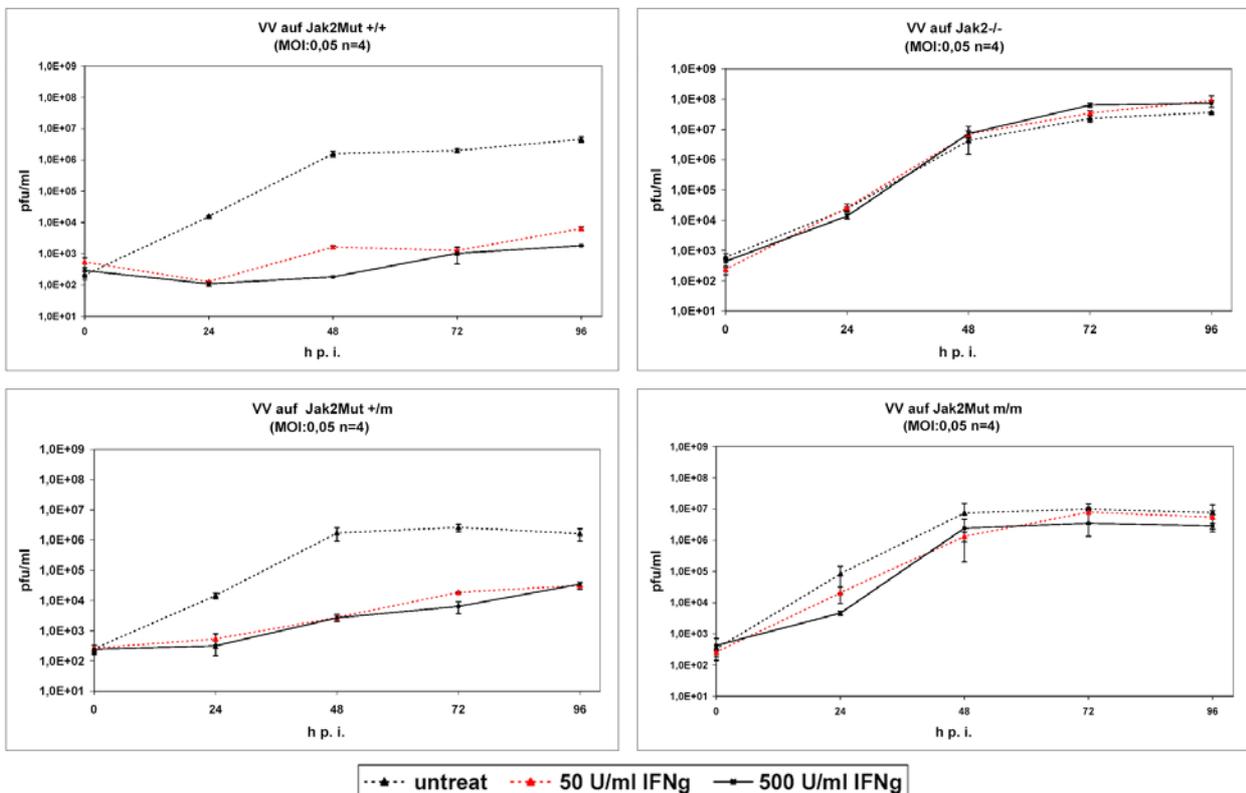


Abb. 3.49: Wachstumskurven von Vaccinia Virus in Wildtyp, $\text{Jak2}^{m/-}$, $\text{Jak2}^{m/m}$ und $\text{Jak2}^{-/-}$ mEF. Vorinkubation mit $\text{IFN}\gamma$ für 48h; vier infizierte Wells pro Zeitpunkt; Ratio Virus : mEF 1:20

3.2.3.5 IFN γ responsive Transkription

Wie vorher gezeigt ist nach Jak2^{Y1007/8F} Mutation der IFN γ Signalweg über STAT1 nicht vollständig inaktiviert und phosphoryliertes STAT1 ist in den Zellen noch nachweisbar (Kapitel 3.2.3.3; Abb. 3.46). Ebenso konnte ein geringer IFN γ Effekt auf murinen embryonalen Fibroblasten auf die Vermehrung von Vaccinia Viren gezeigt werden (Kapitel 3.2.3.4; Abb. 3.49). Inwieweit sich die Mutation auf die Transkription von IFN γ regulierten Genen auswirkte, wurde mittels Realtime-PCR mit der mRNA von IFN γ stimulierten murinen Fibroblasten analysiert. Hierzu wurden mEF für zwei und 16 Stunden mit 10 ng/ml bzw. 250 ng/ml IFN γ stimuliert. Neben Jak2^{m/m} wurden als Positivkontrolle Wildtyp Fibroblasten eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurden noch Fibroblasten, welche definierte Defekte in der Signalweiterleitung von IFN γ aufweisen, in den Experimenten verwendet. Hierbei handelte es sich um Zellen mit den Genotypen Jak2^{-/-}, STAT1^{-/-} und IFN γ R^{-/-}. Die Gene in Tabelle 3-3 wurden mit spezifischen Sonden und Primern (Kapitel 2.6.1 und 2.6.2) in einer Realtime - PCR analysiert. Die dafür nötige cDNA wurde zuvor aus den mit IFN γ stimulierten Zellen aus mRNA gewonnen. Diese mRNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 3-3: Gene, die in einer Realtime - PCR auf IFN γ responsive Transkription getestet wurden.

Gen	Kurzbeschreibung
<i>irf1</i>	„Interferon-regulatory factor 1“, Transkriptionsfaktor
<i>irf2</i>	„Interferon-regulatory factor 2“, Transkriptionsfaktor
<i>Irf5</i>	„Interferon-regulatory factor 5“, Transkriptionsfaktor
<i>Irf8</i>	„Interferon-regulatory factor 8“, Transkriptionsfaktor
<i>stat1</i>	Transkriptionsfaktor
<i>stat3</i>	Transkriptionsfaktor
<i>stat4</i>	Transkriptionsfaktor
<i>cxcl9 / mig</i>	„monokine induced by IFN-gamma“, Chemokin, bindet an CXCR3 (GPCR)
<i>cxcl10 / ip10</i>	„interferongamma inducible Protein 10“, Chemokin, bindet an CXCR3 (GPCR)
<i>cxcl11 / i-tac</i>	„interferon-inducible T cell- α chemoattractant“, Chemokin, bindet an CXCR3 (GPCR)
<i>indo</i>	„indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase“
<i>mgbp2</i>	„guanylate nucleotide binding protein 2“
<i>puma-g / hm74a</i>	„G protein-coupled receptor 109A“
<i>pkc</i>	„protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator“

Positiv regulierte Gene

In Abb. 3.50 sind vier Gene (*stat1*, *irf1*, *indo* und *mgbp2*) mit einer verzögerten Regulation in Jak2Y1007/8F mEF zu sehen. In Wildtyp Fibroblasten erfolgt die IFN γ abhängige Genregulation für *irf1*, *indo* und *mgbp2* nach Stimulation für einen kurzen Zeitraum (2 h) auch bei niedriger Zytokinkonzentration. Hier wird eine Hochregulation von über 20 fach bei dem Transkriptionsfaktor IRF1 bis zu einem Faktor von ca. 400 bei *indo* erreicht. Die hohen Expressionswerte bei *indo* beruhen darauf, dass in unstimulierten Zellen keine *indo* Expression nachweisbar war. Für die mathematische Auswertung des Experiments war die als Vergleichswert nötige unstimulierte Kontrolle zwingend erforderlich und deshalb wurde die *indo* Expression für die unstimulierte Kontrolle arbiträr auf den letzten Zyklus der PCR festgelegt. Alle anderen in dieser Arbeit getesteten Gene sind auch in unstimulierten Wildtyp Zellen basal exprimiert.

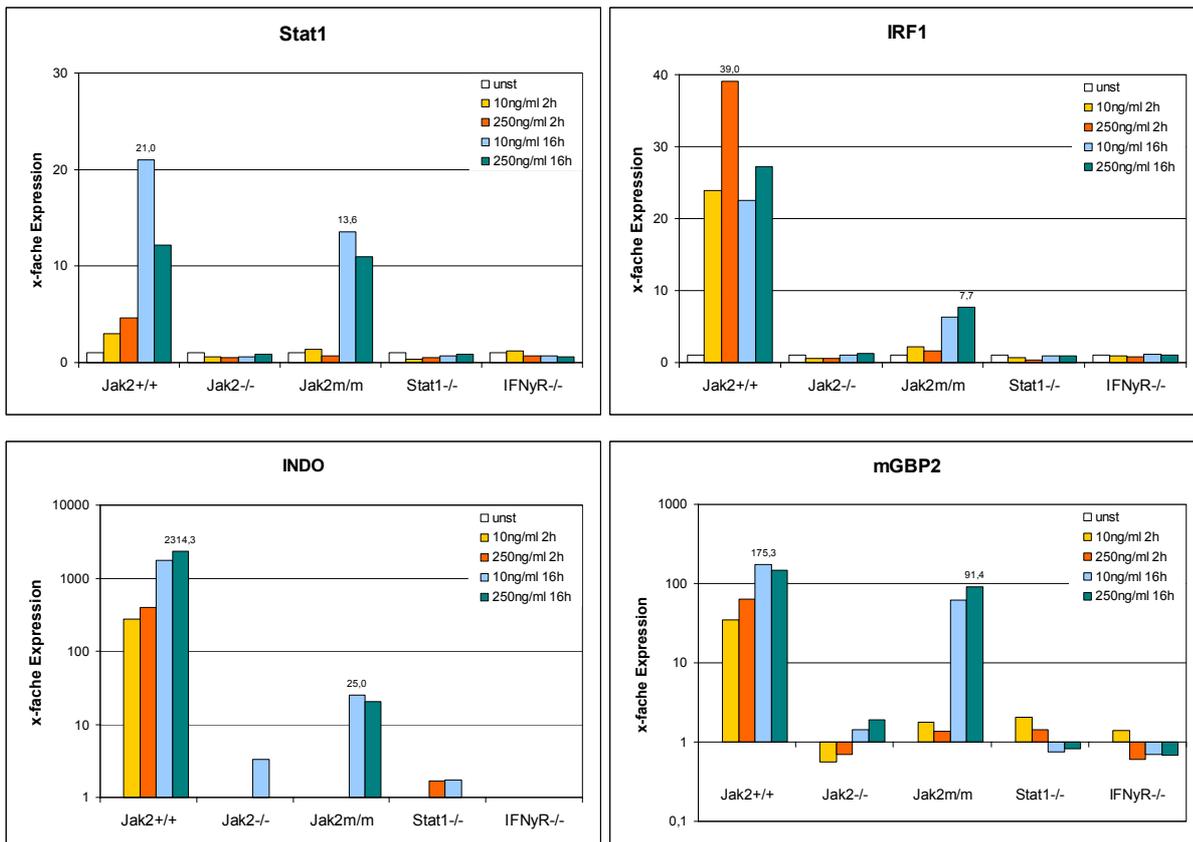


Abb. 3.50: Realtime - PCR von Genen, die in Jak2Y1007/8F mutierten embryonalen Fibroblasten nach Stimulation mit IFN γ positiv reguliert werden. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml bzw. 250 ng/ml für zwei bzw. für 16 Stunden.

In Jak2Y1007/8F mutierten Fibroblasten erkennt man nach 2-stündiger Stimulation, also in der frühen Phase, keine Hochregulation. Bei längeren Inkubationszeiten von 16 Stunden blieb die Menge an mRNS in Wildtyp Zellen für *irf1* auf erhöhtem Niveau und stieg zusätzlich für

stat1, *indo* und *mgbp2* an. Bei dieser längeren Stimulationszeit mit IFN γ konnte auch bei allen vier untersuchten Genen ein Anstieg der Transkription bei den Jak2Y1007/8F mutierten embryonalen Fibroblasten beobachtet werden. Dieser Anstieg erreichte bei *mgbp2* und *stat1* sogar ein Transkriptionsniveau wie es bei Wildtyp Zellen zu finden ist. Die Kontrollzelllinien zeigten zu keinem Zeitpunkt bzw. keiner IFN γ Konzentration eine gesteigerte mRNS Menge nach Stimulation.

Transkription der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11

In Abb. 3.51 sind die Ergebnisse für die Realtime - PCR der Transkripte für die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 gezeigt. Laut Literatur sind diese Gene durch IFN γ induzierbar (Luster *et al.*, 1985; Dajotoy *et al.*, 2004; Widney *et al.*, 2000).

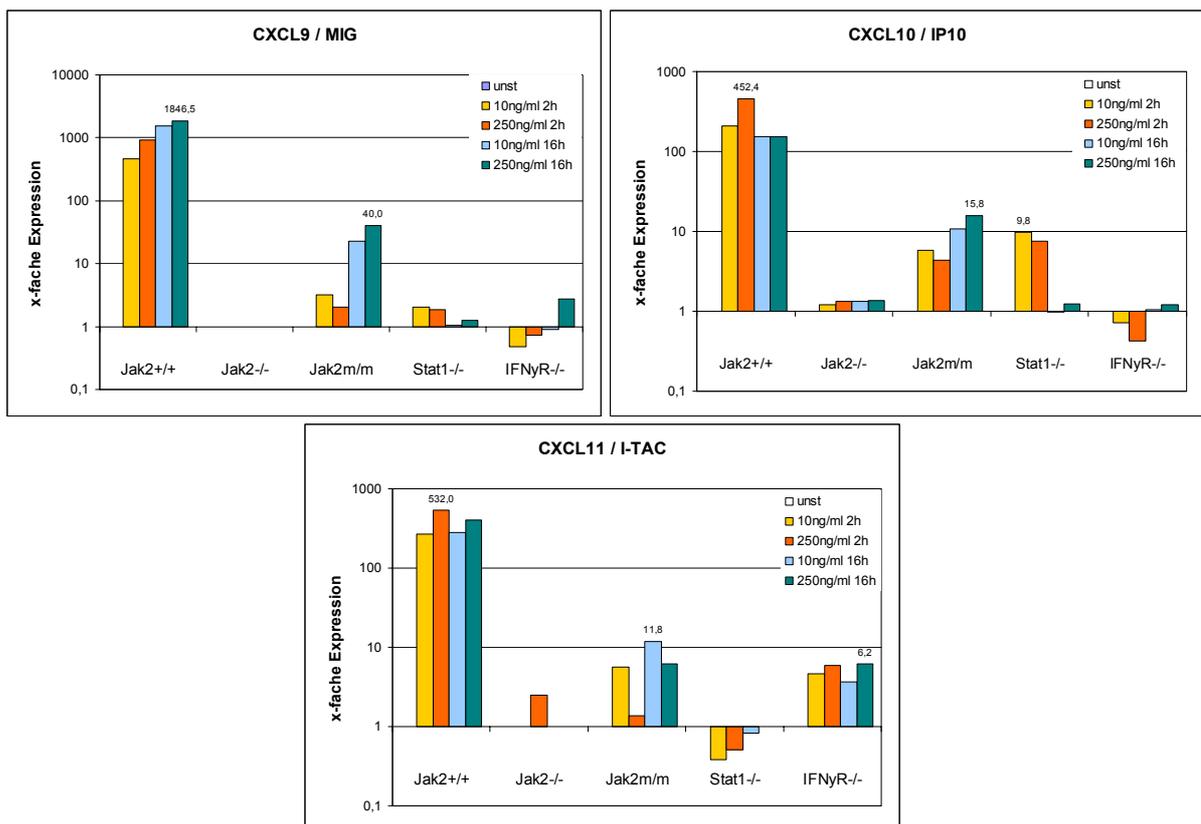


Abb. 3.51: Realtime - PCR von Chemokinen die über IFN γ reguliert werden können und in Jak2Y1007/8F Fibroblasten noch reguliert werden. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml bzw. 250 ng/ml für zwei bzw. für 16 Stunden.

In allen drei Grafiken erkennt man, dass die aus Wildtyp Zellen gewonnene mRNS für die Chemokine durch IFN γ schon nach zwei Stunden mit 10 ng/ml mehr als 200 fach hoch reguliert wurde. Nach 16 Stunden mit 250 ng/ml wurde ein Faktor von bis zu 1800 erreicht.

Bei Jak2^{Y1007/8F} mutierten embryonalen Fibroblasten erfolgte die Regulation verzögert, d.h. erst nach 16 Stunden war bei allen drei Chemokinen eine signifikante Regulation erkennbar. Jak2 defiziente Zellen zeigten wiederum keinerlei Regulation. Die leicht erhöhten Werte für *cxcl11* (auch als *i-tac* bezeichnet) in den IFN γ ^{-/-} Fibroblasten stammen aus sehr späten Zyklen (nach Zyklus 35 von 40) der Realtime-PCR, d.h. in den cDNS Proben der Zelllinie IFN γ ^{-/-} war im Vergleich zu Wildtyp oder Jak2^{m/m} Fibroblasten (Zyklus 20 bis 30) wesentlich weniger Transkript von *cxcl11* vorhanden. In STAT1 defizienten Zellen konnte eine erhöhte Expression von *ip10* nur nach kurzer, zwei stündiger Stimulation beobachtet werden.

Nicht regulierte Gene

Die weiteren getesteten IFN γ regulierten Gene *irf8*, *irf2*, *pkr* und *stat3* (Abb. 3.52), sowie *irf5* und *stat4* wiesen in Jak2^{m/m} Zellen keine Hochregulation auf. Hier lag die Expression in fast jedem Ansatz unter einem Faktor 3,6, der keine signifikante Aussage zulässt. Einzig bei *irf8* und *irf5* war eine geringe Regulation von 12,5 bzw. 5,7 Fach in Wildtyp Fibroblasten zu beobachten. Die stärkste Regulation erfolgte in diesen Zellen jeweils bei einer Stimulation mit 250 ng/ml IFN γ für zwei Stunden.

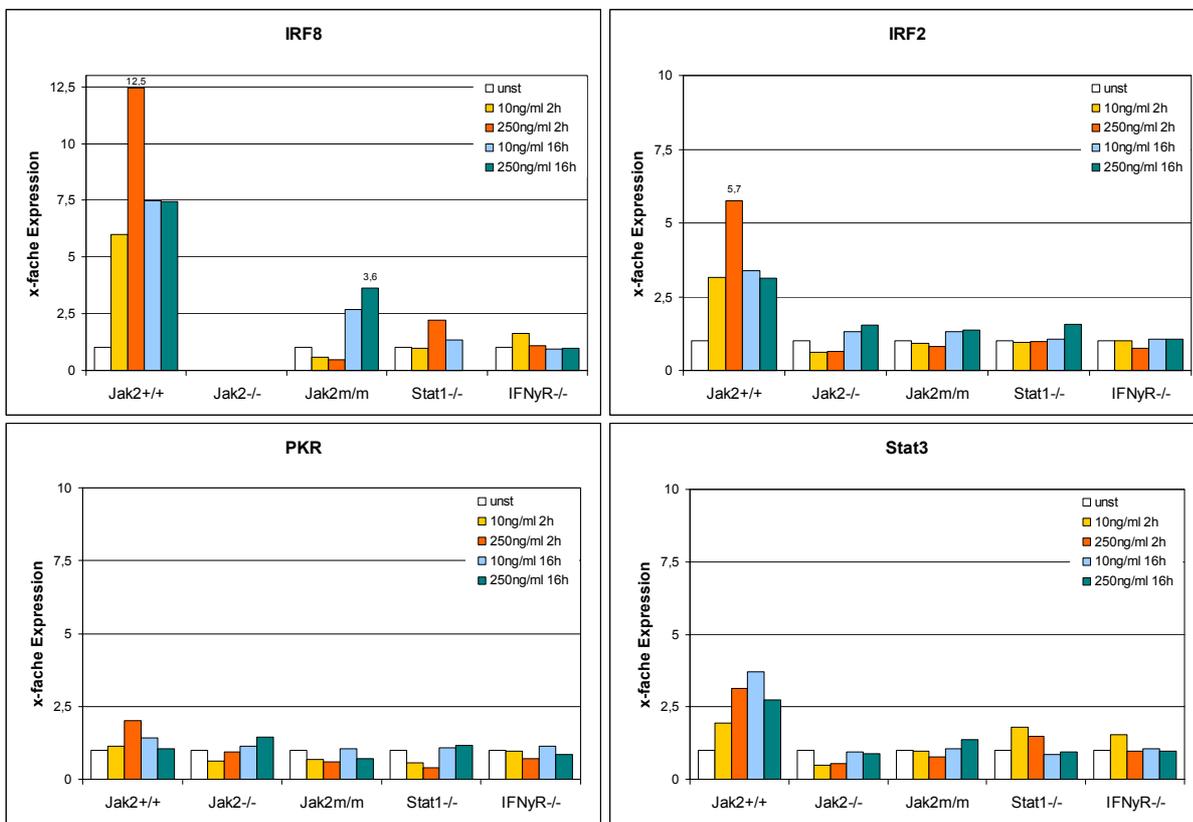


Abb. 3.52: Realtime - PCR von durch IFN γ unregulierten Genen. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml bzw. 250 ng/ml für zwei bzw. für 16 Stunden.

4 Diskussion

4.1 PUMA-G Diskussion

4.1.1 Regulation des Fettstoffwechsels

Über den GPCR GPR109A (PUMA-G) ist bekannt, dass er als Rezeptor für Nikotinsäure fungiert (Tunaru *et al.*, 2003; Soga *et al.*, 2003). Nikotinsäure ist ein Medikament, welches schon früh gegen Pellagra eingesetzt wurde (ELVEHJEM, 1952). Zusätzlich zeigten Altschul *et al.*, dass Nikotinsäure den Cholesterolspiegel im Blutplasma signifikant senken kann (ALTSCHUL *et al.*, 1955). Kurze Zeit später folgte die Erkenntnis über die Hemmung der Lipolyse in Adipozyten (Carlson und Oro, 1962) und das Absinken des Spiegels an freien Fettsäuren (FFS) durch Nikotinsäure. Daraufhin wurde Nikotinsäure als Medikament gegen Hyperlipidämie eingesetzt und zeigte in Langzeitbehandlungen sogar einen schützenden Effekt bei der koronaren Herzkrankheit (A.G.Olsson, 1994). In welcher Weise Nikotinsäure die Zusammensetzung der Lipide im Blut beeinflusst, ist bis heute allerdings nicht exakt geklärt. Bisher ist nur bekannt, wie der Spiegel an freie Fettsäuren (FFS) durch Nikotinsäure (A.G.Olsson, 1994) und somit auch PUMA-G verändert wird.

Wie sich durch Untersuchungen in dieser Arbeit herausstellte, ist bei PUMA-G defizienten Mäusen die Körpermasse geschlechtsspezifisch erhöht. Über einen Zeitraum von 50 Wochen wurde bei gleich bleibender Ernährung die Gewichtszunahme beobachtet. Bei weiblichen Tieren traten über den gesamten Zeitraum keine signifikanten Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu war bei männlichen PUMA-G defizienten Tieren ab der fünften bis zur 30 ten Lebenswoche eine Gewichtszunahme von über 6% messbar.

Vergleicht man die Verteilung der Lipidanteile im menschlichen Blut, dann ist bei Frauen das Verhältnis der verschiedenen „high density lipoproteine“ (HDL) anders als bei Männern (Patsch *et al.*, 1974). Das Verhältnis bei Frauen ist zu Gunsten von HDL₂ (verglichen mit HDL₃) verschoben. Auch ist die Wirkung von Nikotinsäure, in Bezug auf das HDL Verhältnis, in beiden Geschlechtern unterschiedlich. Nach Nikotinsäuregabe kommt bei Frauen mehr HDL₂ im Blut vor wohingegen bei Männern in etwa gleich viel HDL₂ und HDL₃ vorhanden ist (Shepherd *et al.*, 1979). Die unterschiedliche Gewichtsverteilung bei Mäusen könnte mit der Wirkung von Nikotinsäure auf den Fettstoffwechsel bei Frauen und Männern im Einklang stehen. Demzufolge könnte die PUMA-G Defizienz nur beim männlichen Geschlecht auftreten, da hier die Regulation des Fettstoffwechsels in stärkerem Maße

beeinträchtigt ist.

Fettleibigkeit ist häufig auch mit einem höheren Spiegel an FFS verbunden (Baldeweg et al., 2000; Bolinder et al., 2000) und ein erhöhter FFS Spiegel beeinträchtigt die Fähigkeit von Insulin die Aufnahme von Glukose in Muskelzellen zu stimulieren (Itani et al., 2002). Ein weiterer Effekt bei Fettleibigkeit ist das Auftreten von *Diabetes mellitus* Typ2, bei dem im Alter Körperzellen immer schlechter auf Insulin reagieren können. Dies führt zu extrem hohen Blutzuckerwerten. In PUMA-G defizienten Mäusen konnte allerdings in Bezug auf Diabetes und den Blutzuckerspiegel kein Unterschied verglichen zu Wildtyp Mäusen gefunden werden, womit eine Funktion von PUMA-G in der Regulation des Blutzuckerspiegels eher nicht wahrscheinlich ist.

4.1.2 PUMA-G^{-/-} und intrazelluläre cAMP-Spiegel

Im Zytoplasma von Zellen unterliegt der cAMP Spiegel einer äußerst fein eingestellten Regulation. cAMP hat diverse Wirkungen auf verschiedene zelluläre Prozesse wie z.B. den Zellzyklus, den Stoffwechsel und Reaktionen auf unterschiedliche Hormone und Neurotransmitter (<http://www.eurekah.com/> Bioscience Collection 2005; Tasken und Aandahl, 2004). Eine Fehlregulation kann schwere Folgen für den Organismus haben, die in der Entstehung von Magengeschwüren und *Diabetes mellitus* resultieren. Die Regulation des cAMP Spiegels erfolgt über GPCR, G-Proteine und Aktivierung beziehungsweise Inhibierung der Adenylat Cyclase. Es gibt Erkenntnisse über Mutationen in G_{sα}, die eine Tumorbildung induzieren können. Dies ist bei 30% bis 40% der „growth hormone“ (GH) sekretierenden Hypophysenadenomen der Fall (Lania et al., 2003). Bei diesen Mutationen kommt es zur konstitutiven Aktivierung der Adenylat Cyclase und damit in der Folge zur Induktion diverser nach geschalteter Prozesse. In der Zellkultur weisen GH-Hypophysenzellen ein verstärktes Wachstum bei erhöhten cAMP Werten auf (Ham et al., 1997). Bei Menschen mit GH-Hypophysenadenomen kommt es auch trotz geringer Adenomzahlen zu starken Krankheitssymptomen, die aus der starken Ausschüttung von GH resultieren könnten (Lania et al., 2003).

Als weiteres Beispiel kommt es im Fettgewebe der weiblichen Brust durch erhöhte Aromatase, einem Protein welches für die Östrogen Produktion nötig ist, zur Tumorbildung (James et al., 1987). Hierfür ist ein erhöhter cAMP Spiegel verantwortlich, der zur gesteigerten Produktion von Aromatase führt, die die Sekretion von Östrogen erhöht (Harada, 1997). Das stärkere

Östrogensignal führt daraufhin zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen (Chen et al., 1999). Auch in manchen Prostatakarzinomen, die durch eine gesteigerte Produktion von Prostata spezifischem Antigen (PSA) diagnostiziert werden, kann ein erhöhter cAMP Spiegel beobachtet werden. PSA hat Promoterbereiche an die CREB bindet (Sadar et al., 1999). Diese Beispiele belegen die Beteiligung eines fehlregulierten cAMP Spiegels an diversen Tumorarten. In BMDMC aus PUMA-G defizienten Mäusen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der cAMP Spiegel in Makrophagen nach Ligandenbindung an PUMA-G nicht wieder gesenkt werden kann. Dies ist im Einklang mit Tunaru et al., die zeigten, dass auch in PUMA-G defizienten Adipozyten ein erhöhtes cAMP Niveau durch Fehlen des inhibitorischen GPCR nach Inkubation mit Nikotinsäure nicht wie in Wildtyp Zellen auf ein niedrigeres Niveau gebracht werden konnte (Tunaru *et al.*, 2003). Zusätzlich entwickeln sich in PUMA-G defizienten Tieren mit einer Wahrscheinlichkeit von 57,6% bei PUMA-G^{-/-} Neoplasien im Vergleich zu 27,3% bei PUMA-G^{+/+}. Eine Veränderung der Aktivität des durch cAMP aktivierten Proteins PKA konnte nicht nachgewiesen werden und kommt somit als Ursache für die Entstehung der Neoplasie nicht in Betracht. Inwiefern diese Neoplasien durch einen fehlregulierten cAMP Spiegel entstehen oder eine Nebenerscheinung aus der Generierung des Mausstammes sind, kann zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden. Es wäre auch denkbar, dass durch die noch vorhandene Neomycin-Kassette, die bei der Generierung der Knock-out Zelllinie eingeführt wurde, oder durch die lange Lebenszeit der Mäuse zufällig Neoplasien in den beschriebenen Geweben entstanden.

4.1.3 Erweiterte Expressionsanalyse von *puma-g*

Viele Gene sind in den Körperzellen differentiell reguliert und andere wiederum, wie β -Aktin, konstitutiv exprimiert. Bei GPR109A (in der Maus PUMA-G und im Menschen mit dem Ortholog HM74a), wurde mittels Affymetrix Transkriptomanalyse eine Verteilung der Expression in mehreren Geweben bestimmt (Abb. 4.1) (Su *et al.*, 2002). In humanen Geweben erhält man eine relativ breite Expression mit Höchstwerten in Trachea, Milz und Lunge. Auch die Expression von *puma-g* ist gewebespezifisch. Teilweise wird es konstitutiv exprimiert, wie in Adipozyten (Tunaru *et al.*, 2003), oder spezifisch induziert wie in Makrophagen (Schaub *et al.*, 2001).

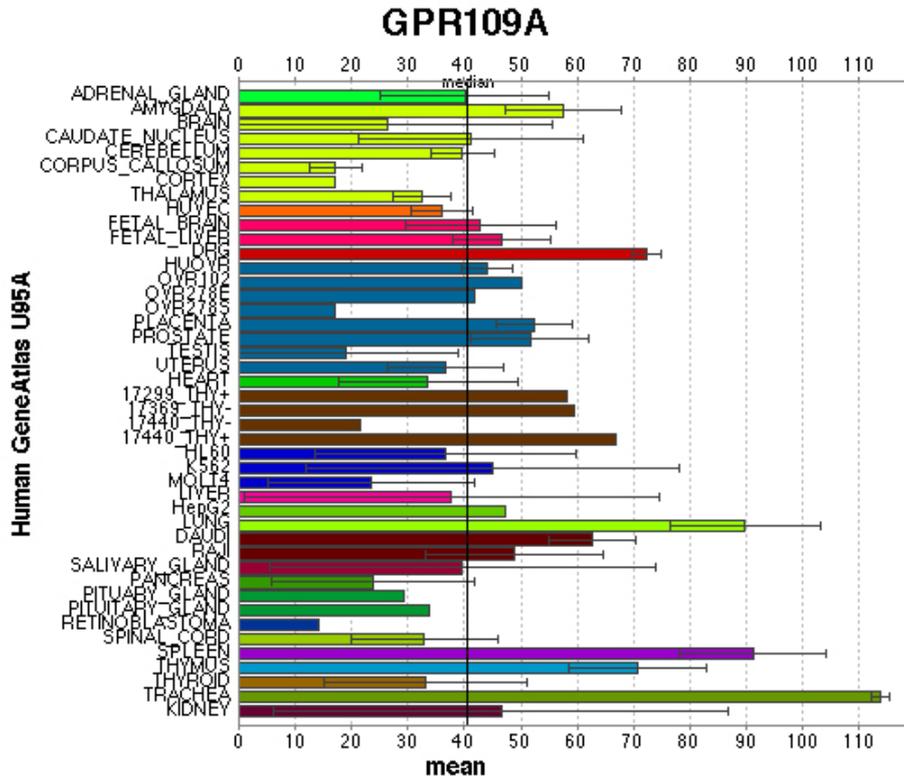


Abb. 4.1: Humane, gewebespezifische Expression von GPR109A (PUMA-G bzw. HM74A) (Su *et al.*, 2002).

In bisherigen Arbeiten über PUMA-G wurde die Induzierbarkeit nur auf Interferone und TNF hin getestet und erreichte nach zwei Stunden die stärkste Expression, was auf eine primär responsive Genexpression hinweist (Schaub *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von *puma-g* nach Interferon γ Stimulation bis zu 16 Stunden ansteigt und zu diesem Zeitpunkt mehr als doppelt soviel PUMA-G mRNA vorliegt im Vergleich mit der Expression nach zwei Stunden Stimulationsdauer. Inwieweit andere Stimuli die Expression von PUMA-G *in vitro* beeinflussen, wurde in dieser Arbeit mit Ana1 Monozyten/Makrophagen gezeigt. Die Zellen wurden mit verschiedenen, immunologisch aktiven Substanzen für 16 Stunden inkubiert und das gesamte Transkriptom aus den Zellen extrahiert. Die anschließende relative Quantifizierung mit Realtime - PCR Analyse ergab, dass neben IFN γ auch noch andere Stimuli in der Lage sind PUMA-G positiv zu regulieren. Eine Stimulation der Zellen über Toll-Like Rezeptoren (TLR2, TLR4, TLR7/8 und TLR9) zeigte ein ebenso starkes Signal wie LTA und LPS zusätzlich zur bekannten IFN γ Induktion. Nach dieser 16 stündigen Inkubation kann eine sekundäre Regulation von PUMA-G nicht ausgeschlossen werden. Es wäre durchaus denkbar, dass durch den Primärstimulus eine ganze Kaskade an Reaktionen zur Transkription von PUMA-G ausgelöst wird, welche dann zu einem starken Anstieg der PUMA-G mRNA führen. Im Promoterbereich von *puma-g* finden

sich zwei GAS (gamma activation site) Stellen, was für die direkte Induzierbarkeit von PUMA-G durch IFN γ spricht (Schaub *et al.*, 2001), da an diese GAS Promotersequenzen ein STAT1 homodimerer Transkriptionsfaktor, der nach einem IFN γ Signal gebildet wird, bindet (O'Shea, 1997).

Nachdem PUMA-G konstitutiv in Adipozyten exprimiert ist, während er in Makrophagen erst nach Stimulation vorhanden ist, könnte PUMA-G neben der Funktion in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels auch eine immunologische Funktion haben. Unter den GPCR bilden die Chemokinrezeptoren eine eigene Untergruppe in den Rhodopsin-like GPCR. Ihre Funktion liegt in der Chemotaxis von verschiedenen Immunzellen (Janeway Jr. *et al.*, 2001). Inwiefern PUMA-G mit seiner Funktionalität in den Bereich der Pathogenabwehr oder Fettstoffwechsel einzuordnen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, konnte jedoch nicht abschließend aufgeklärt werden.

4.1.4 Immunologische Relevanz von PUMA-G

Phagozytose ist ein wichtiger Mechanismus der bei Makrophagen beobachtet wird, wenn sie Pathogene gezielt abtöten und damit zu deren Entfernung aus dem Organismus beitragen. Für ein schnelles und effizientes Wirken dieses Abwehrmechanismus ist es nötig, dass Makrophagen durch pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon γ aktiviert werden. Makrophagen verändern auf diesen Stimulus hin ihre Genexpression und schalten antimikrobielle Effektormechanismen gegen Bakterien, Pilze und Viren ein (Ihle *et al.*, 1995; Boehm *et al.*, 1997; Lengeling *et al.*, 2001). Wie diese Effektormechanismen im Detail funktionieren, ist bislang nur teilweise geklärt. So können IFN γ Rezeptor und TNF Rezeptor p55 defiziente Tiere intrazelluläre Bakterien nicht mehr abwehren (Pfeffer *et al.*, 1993). Diese defizienten Tiere sind nicht mehr in der Lage *Listeria monocytogenes* in ihrer Replikation zu hemmen (Pfeffer *et al.*, 1993; Endres *et al.*, 1997). Es existieren Mechanismen wie chemische Agenzien, wie die Bestandteile des „oxidative burst“ oder Stickstoffmonoxid (NO) im Phagolysosom. Zusätzlich sind die Zellen in der Lage sauerstoffunabhängige Mechanismen, wie Proteasen oder antimikrobielle Peptide (Defensine) und die 47 kDa / 65 kDa GTPasen (Taylor *et al.*, 2000; Collazo *et al.*, 2001) für die Pathogenabwehr einzusetzen. Da diese Mechanismen nicht für eine vollständige Pathogenabwehr ausreichend sind müssen weitere, bisher unbekannte Mechanismen existieren. Diese zu entdecken ist ein interessantes Gebiet in der biomedizinischen Forschung. In welcher Weise PUMA-G in die Regulation der

Effektormechanismen eingreift, wenn durch Phagozytose Pathogene aufgenommen wurden, sollte in dieser Arbeit dargestellt werden. Es wurden sowohl Ana1 Zellen im Vorversuch als auch BMDMC aus PUMA-G^{-/-} Mäusen mit IFN γ stimuliert und die Rate der Phagozytose von fluoreszierenden Microspheres bestimmt. Interessanterweise zeigte sich in der Zellkultur mit Ana1 Zellen eine IFN γ abhängige Phagozytoseleistung, welche sich jedoch mit BMDMC nicht bestätigen ließ. Somit ist eine zentrale Funktion von PUMA-G bei der Pathogenabwehr durch Phagozytose auszuschließen. Die Diskrepanz in den Ergebnissen, die beim Vergleich von Zellkultur und *ex vivo* Zellen auftraten legt nahe, dass nicht alle Aspekte einer solchen Fragestellung ohne Tiermodelle geklärt werden können.

4.2 Jak2 Diskussion

4.2.1 Jak2 Phosphorylierungen und deren Wirkung

Die Aktivität von Janus Kinasen wird über Tyrosin Phosphorylierungen kontrolliert. Die Signalweiterleitung am Rezeptor beginnt mit der trans-Phosphorylierung der Kinasen. Die so aktivierten Janus Kinasen aktivieren wiederum an den Rezeptor rekrutierte STAT Moleküle durch Phosphorylierung (Darnell, Jr. *et al.*, 1994; Ihle und Kerr, 1995). Janus Kinasen haben alle in etwa 20 Exons und über 1000 AS. In ihrer gesamten AS-Sequenz besitzen sie viele Tyrosine, von denen einige phosphoryliert werden (Matsuda *et al.*, 2004). In den jeweiligen Domänen haben diese Phosphorylierungen sehr spezifische Wirkungen. Alle Kinasen der Jak-Familie weisen innerhalb ihrer Proteinsequenz sieben homologe Bereiche auf, so genannte Janus Kinase homologe (JH) Domänen. In der JH2 Domäne z.B. führt die Mutation von Tyrosin Y570 zu Phenylalanin zu einem konstitutiven Signal durch Jak2 und verlängert die Aktivität während der Zytokinstimulation (Feener *et al.*, 2004; Argetsinger *et al.*, 2004). Ebenso führt eine Mutation in JH2 zu erhöhter Aktivität im einzigen Jak Ortholog von *Drosophila melanogaster* (Hopscotch) (Cools *et al.*, 1999). Bei der Funktion dieser so genannten Pseudokinasedomäne kann man somit von einer Aktivitätsregulation sprechen. In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass die beiden Tyrosine 1007 und 1008 in der JH1 Domäne nach Phosphorylierung zu einer gesteigerten Aktivität führen. Diese Domäne wird auch als Kinasedomäne bezeichnet. In allen untersuchten Arten sind innerhalb der Janus Kinasen dreizehn Tyrosine konserviert und innerhalb der Säugetierarten in Jak2 mehr als 40 (Matsuda *et al.*, 2004). Beispielsweise werden an die phosphorylierten Tyrosine Y813 und Y966 werden verschiedene Signalproteine rekrutiert. An pT813 kann SH2-B β (Kurzer *et al.*, 2004) und an pY966 p70 (Carpino *et al.*, 2002) binden.



Abb. 4.2: Phosphorylierungsstellen der Janus Kinasen. weißes „Y“: konserviertes Tyrosin, schwarzes „Y“: konserviertes Tyrosin innerhalb der Säugetiere (Matsuda *et al.*, 2004).

Inwieweit nun der Aminosäureaustausch der beiden Tyrosine Y1007/8 in der JH1 Kinase Domäne von Jak2 innerhalb des „activation-loop“ eine Rolle spielt, sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Basierend auf den *in vitro* Ergebnissen von Chatti *et al.* (Chatti *et*

al., 2004) wurde für die genaue Analyse ein *in vivo* Modell erstellt. In Bezug auf die biologische Funktionen von Jak2 sollte die *in vivo* Analyse der Y1007/8F Mutation entscheidende neue Erkenntnisse liefern.

4.2.2 Datenbankanalyse des genomischen *jak2* Lokus

jak2 ist als Gen und Protein schon lange bekannt (Wilks *et al.*, 1991). Die genaue Sequenz des gesamten Genlokus jedoch wurde erst durch systematische Sequenzierung im Rahmen des Genomprojekts möglich. Celera war die erste Firma, die bis auf wenige unsequenzierte Bereiche das gesamte humane Genom kommerziell veröffentlichte (Venter *et al.*, 2001). Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch noch einige Fehler in den Datenbanksequenzen, die mittlerweile jedoch größtenteils korrigiert wurden. Das Humane Genom Projekt gab nur Tage danach die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms bekannt (Lander *et al.*, 2001). Das murine Genom folgte kurze Zeit später im Mai 2002 (Waterston *et al.*, 2002). Als freie, öffentliche Datenbank stellte Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) ebenfalls mit den kompletten Genomen verschiedener Arten wie Mensch, Maus, Ratte und weiteren Arten diese Sequenzen der gesamten Wissenschaft zur Verfügung (erstmalig Juli 2001).

Beim Vergleich der genomischen murinen *jak2* Sequenzen zu Beginn der Vorarbeiten der Datenbanken von Ensembl (Release 9, Dezember 2002) und Celera (Januar 2003) ergaben sich gravierende Unterschiede. Fehlende 3' und 5' Genbereiche, fehlende Exons in Ensembl, große Poly(N) Bereiche, neu definierte Exons (Exon 18 nach Ensembl) und Introns, bestehend aus einer einzigen Base. Diese Unterschiede könnten zum einen auf die für die Sequenzierung verwendeten unterschiedlichen Mauslinien beruhen und zum anderen darauf, dass viele von Ensembl's Genfindungsalgorithmen nicht ausgereift waren. Die großen Bereiche bei *jak2* in der Ensembl Datenbank, die entweder nicht sequenziert waren oder bei denen die Zuordnung der sequenzierten Bereiche zueinander nicht lückenlos erfolgte, so dass diese Lücken mit Poly(N) aufgefüllt wurden erklären den enormen Größenunterschied von ca. 40 kB des *jak2* Lokus in den beiden Datenbanken. Bei der Überprüfung des genomischen *jak2* Lokus in den Datenbanken auf eine biologisch sinnvolle Struktur konnte man feststellen, dass die kommerzielle Sequenz aus der Celera Datenbank in den untersuchten Bereichen um das Exon 21 mit der tatsächlichen übereinstimmt. Nach Überarbeitung der Datensätze stimmen die aktuellen Ensembl Sequenzen (Release 41, Nov 2006) nun ebenfalls mit der tatsächlichen *jak2* Sequenz, die auch in dieser Arbeit ermittelt wurde, überein. Datenbanken

werden häufig automatisch aktualisiert und generiert. Dies lässt für zukünftige, auf Datenbanksequenzen beruhende Forschung, nur den Schluss zu, dass eine Überprüfung der Daten und Vergleiche aus verschiedenen Quellen unumgänglich und eine Überprüfung auf Stimmigkeit hin zusätzlich im Labor nötig ist. In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich verschiedener Datenbanken die richtige Sequenz von *jak2* erkannt, mit der PCR Analyse des genomischen Lokus verifiziert und für die weitere Arbeit verwendet werden. Alternativ, jedoch wesentlich zeitaufwändiger und kostspieliger, hätte auch der genomische Lokus durch Subklonieren von BACs sequenziert werden können.

4.2.3 Generierung der Jak2 aktivierungsdefizienten Mauslinie

Mittels gezielter Veränderung, einer Mutagenese von Genen in der Keimbahn von Mäusen, können neue Mauslinien generiert werden, die gewünschte Gendefekte aufweisen. Damit können auch neue Einblicke in die Funktion der verschiedensten Gene *in vivo* erlangt und somit komplexe biologische Mechanismen aufgeklärt werden (Pfeffer und Mak, 1994). Da die Jak2 defiziente Maus embryonal am Tag e12,5 an akuter Anämie verstirbt, stellte sich die Frage, ob es wie bei der Jun Kinase (Hurd *et al.*, 2002) eine Kinase unabhängige Funktion von Jak2 gibt. Neben den auch funktionell bekannten Domänen wie die SH2 Domäne zur Protein-Protein Interaktion gibt es noch zwei große N-Terminal liegende Domänen. Die Pseudokinasedomäne und die Kinasedomäne. Sowohl die SH2 als auch beide Kinasedomänen sind für die Kinasefunktion unablässig. Um eine Kinase unabhängige Funktion zu finden, wurde das Protein selbst mit allen Domänen erhalten und nur die Aktivierung der Kinase unterbunden. Hierfür sind die beiden Tyrosine 1007 und 1008 von entscheidender Bedeutung. Sie werden phosphoryliert und aktivieren somit Jak2 (Feng *et al.*, 1997). Eine gewisse Grundaktivität von Jak2 wie sie von Chatti *et al.* (Chatti *et al.*, 2004) gezeigt wurde wird somit nicht beeinflusst.

Die Erzeugung dieser aktivierungsdefizienten Jak2 Mausmutante erfolgte mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen. Hierbei wurde der Ziellokus um das Exon 21 mit den mutierten Aminosäuren Y1007/8F ersetzt. Eine gefloخته, zusätzlich eingebrachte Neomycin-Resistenz Kasette wurde durch Verpaarung mit einer ubiquitär Cre exprimierenden Mauslinie deletiert. Die hier im *jak2* Gen generierte Mutation im Exon 21 durch Basenaustausch von in den Codons für die Aminosäuren 1007 und 1008 führte zum korrespondierenden Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Phenylalanin. Hiermit wurde

gewährleistet, dass eine Aktivierung durch Konformationsänderung von Jak2 durch Phosphorylierung der beiden Tyrosine ausblieb. Der erste Targetvektor zum Einbringen der Mutation in das Genom der E14.1 Zellen konnte keine homolog rekombinierten ES-Zellen erzeugen. Dessen Strategie beruhte darauf, dass möglichst wenig codierende Sequenz von der Rekombination betroffen werden sollte, da der Großteil des Konstruktes aus dem großen Intron 21 bestand. Nur der kurze homologe Arm beinhaltete, neben der nötigen Mutation in Exon 21, auch das Exon 20. Kritisch zu beachten war hierbei, dass die eingebrachte Neomycin Kasette nicht den ORF von *jak2* zerstört. Um sicherzustellen, dass die Neomycin Kasette die Transkription von *jak2* nicht unterbinden würde, musste diese nach dem Targeting wieder entfernt werden. Dies wurde durch Flankieren der Kasette mit loxP Motiven erreicht. Ebenso musste das verbleibende loxP Signal weit genug vom Splicedonor des Exon 21 entfernt sein, um nach Excision der Neomycin Kasette mittels des Cre/loxP System möglichst wenig zusätzliche Mutationen einzufügen. Die zu deletierende Neomycin Kasette wäre im ersten Targetvektor im Intron 21 integriert worden. Somit wäre das einzelne loxP Signal in der Sequenz des Introns 21 zu liegen gekommen. Weshalb diese „targeting“ Strategie nicht erfolgreich war, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Bei der zweiten „targeting“ Strategie wurde der lange Arm vom 3' Bereich des Exons 21 in den 5' Bereich verlegt. Hierbei wurde der Datenbankfehler in der Ensembl Sequenz offensichtlich. Ein nicht vorhandenes Exon konnte durch Sequenzieren nachgewiesen und im Vergleich mit der Celera Datenbank als Exon 18 identifiziert werden. Infolge dessen wurde nur noch mit den Celera Daten weitergearbeitet. Die Neomycin Kasette wurde ins Intron 19 integriert und nach Keimbahntransmission *in vivo* durch Verpaarung mit Cre-Deleter Mäusen deletiert, so dass das verbleibende einzelne loxP Signal im Intron 19 verblieb.

Bevor jedoch diese Verpaarungen angesetzt werden konnten, musste der positive Klon für die Injektion identifiziert werden. Wie sich zeigte war der gefundene positiv rekombinierte Klon ein Mischklon, der nach Reklonierung in C57/BL6 Blastozysten injiziert wurde. Das Auftreten von Mischklonen ist ein seltenes jedoch nicht unwahrscheinliches Ereignis. Es könnte beim „Ausplattieren“ der elektroporierten ES-Zellen geschehen, dass sowohl eine homolog rekombinierte als auch eine ES-Zelle mit zufällig integrierter DNS in direkter Nachbarschaft zueinander sind. In den ersten beiden Tagen ohne Selektionsmedium oder in den zwei Folgetagen mit Einfachselektionsmedium wäre es denkbar, dass der positive Klon Teile des Negativen komplett umschließt und somit diese nicht in direkten Kontakt zu den Selektionsfaktoren kommen und weiter wachsen können. Ein weiterer Punkt könnte beim Aufnehmen der einzelnen Klone eine „Vermischung“ von zwei ES-Zell Kolonien sein.

4.2.4 *jak2* Expressions-Analyse

Um sicherzustellen, dass Jak2Y1007/8F als mutiertes Protein transkribiert und translatiert werden konnte, wurde bei der Generierung der mutanten Mauslinie viel Wert auf eine möglichst minimal veränderte genomische Struktur gelegt. Durch einfaches Einbringen der Neomycin Kasette, z.B. in ein Exon oder Ersetzen von Exons eines Gens mit dem Ziel den ORF des Gens komplett zu zerstören, kann ein trunkiertes Protein entstehen, bei dem durch Splicing die eingebrachte Kasette entfernt und somit der Bereich mit der Kasette nicht mehr im Protein vorhanden ist. Das translatierte Protein selbst kann dann, evtl. mit veränderter Funktion, stabil exprimiert werden (Beer et al., 2005). Ebenso könnte durch einfache Punktmutationen in der Nähe von Splicestellen das Spliceverhalten geändert werden und durch Exonskipping neue Proteinspezies entstehen (Kammler *et al.*, 2001; Freund *et al.*, 2003). Diese Mutationen können Bindestellen für SR-Proteine zerstören oder neu schaffen, die sogar bis zu 100 Basen entfernt von der zugehörigen Splicestelle sein können und nur wenige Basen groß sind. Es wäre möglich, dass durch Mutationen die Stabilität der mRNA beeinflusst und diese durch „nonsense mediated mRNA decay“ abgebaut wird (Maquat, 2005) oder das Protein direkt nach der Translation zum Abbau mit Ubiquitin markiert wird (Seyffert *et al.*, 1998). Bei *jak2* mit den mutierten AS Y1007/8F waren die Mutationen nur 36 bzw. 39 Basen von der Exongrenze entfernt. Laut einem SR-Proteinbindestellensuchalgorithmus (ESE Finder, Release 2.0 <http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) sollten dadurch theoretisch drei Bindestellen von SR-Proteinen wegfallen. Einmal wäre SC35 und zweimal SRp40 betroffen. Auch das im Intron 19 des *jak2* Gens verbleibende loxP-Signal lag nur 52 Basen weit vom nächsten Spliceacceptor entfernt. Beide Mutationen hatten jedoch keinen Einfluss auf verändertes Spliceverhalten und somit auch kein trunkiertes Protein zur Folge, da die Proteingröße in der Western Blot Analyse identisch zu der von Wildtyp Zellen stammenden Jak2 Protein war (Abb. 4.3).

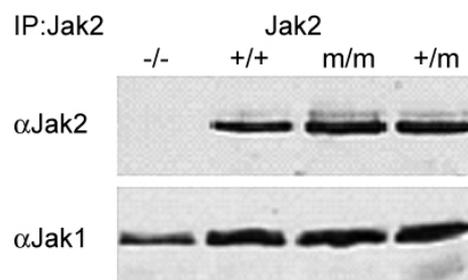


Abb. 4.3: Jak2 Western Blot von mEF mit und ohne Mutation Y1007/8F. Immunpräzipitation mit antiJak2, Western Blot mit antiJak2; Ladekontrolle Western Blot mit antiJak1

Ebenso war absolut kein Unterschied in der Proteinmenge bei $Jak2^{m/m}$ - im Vergleich zu $Jak2^{+/m}$ - oder Wildtyp Zellen festzustellen (Abb. 4.3) was wiederum gegen einen erhöhten Abbau des translatierten Proteins spricht. Das mutierte Protein wurde allerdings nicht auf seine genaue Aminosäuresequenz hin untersucht. Um jedoch absolut sicher zu sein, wurde der genomische Lokus von *jak2* aus $Jak2^{m/m}$ Zellen mittels PCR amplifiziert, subkloniert und sequenziert.

4.2.5 Jak2Y1007/8F Mauslinie

In der Vererbungslehre nach Mendel sollte die Vererbung eines Merkmals, das auf zwei Allelen kodiert wird, phänotypisch ein Verhältnis von 3:1 (dominantes : rezessives Merkmal) und genotypisch von 1:2:1 (homozygot dominant : heterozygot : homozygot rezessiv) bei diploiden Organismen haben (Seyffert W. et al., 1998). Die konventionelle Inaktivierung von *Jak2* führte zu nicht lebensfähigen homozygot mutanten Tieren. $Jak2^{-/-}$ Tiere sterben embryonal um den Tag e12,5 (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998). Inwieweit sich eine aktivierungsdefiziente *Jak2* Mutante von der „Knock-out“ Linie unterscheidet, sollte hier untersucht werden. Nachdem für das mutierte Allel keine homozygot lebenden Tiere geboren wurden und das Verhältnis bei den lebenden Tieren in etwa bei 1:2 (Wildtyp : heterozygot Mutant) war (Kapitel 3.2.2.2), lag der Schluss nahe, dass es sich ebenfalls um embryonale Letalität handelt. Untersuchungen der Embryonen zeigten für den Tag e12,5 lebende Embryonen mit schlagenden Herzen. Jedoch hatten alle $Jak2^{m/m}$ Embryonen, wie bei *Jak2* defizienten Embryonen (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998), keine eigene Erythropoese in der fötalen Leber und konnten somit in ihrer weiteren Entwicklung nicht voranschreiten, da die Sauerstoffversorgung der Organe nicht gegeben war. Der Embryo beginnt um den Tag e10 mit der adulten Hämatopoese in der fötalen Leber. Davor wird er noch von der Mutter per Diffusion mit Sauerstoff versorgt. Die blutarme Leber der homozygot mutierten Embryos wies neben der fehlenden Färbung auch einen deutlichen Größenunterschied auf, der wiederum auf die fehlenden, neu gebildeten Blutzellen zurückzuführen war. Inwiefern andere embryonale Organe betroffen waren, wurde nicht genauer untersucht. Im Gegensatz zum konventionellen *Jak2* „Knock-out“, bei dem kein Protein vorliegt, war in den murinen embryonalen Fibroblasten *Jak2* weiterhin nachweisbar. Das mutierten Protein alleine konnte allerdings die embryonale Letalität nicht verhindern. Die volle Kinaseaktivität ist nötig um lebensfähige Tiere zu erhalten.

4.2.6 Jak-STAT und die zentrale Rolle in der Blutbildung

Die embryonale Blutbildung wird bei der Maus wie beim Menschen über Erythropoietin (Epo) gesteuert. Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen brauchen für ihr Überleben ein EpoR Signal. Ohne dieses gehen sie in Apoptose (S Gilbert, 2000). Zellen, die Epo mit ihrem Epo-Rezeptor erkennen, reagieren darauf mit der Transkription verschiedener Gene. Diese Genregulation wird möglich, wenn die Bindung von Epo an den Rezeptor, auch in den Zellkern signalisiert wird. Dies geschieht über den Jak-STAT Signalweg unter Nutzung von Jak2 und STAT5. Nachdem Epo an den Rezeptor bindet wird Jak2, das an den EpoR Ketten gebunden ist phosphoryliert und somit aktiviert. Jak2 phosphoryliert Bindestellen von STAT5 am EpoR und phosphoryliert dann an den Rezeptor rekrutiertes STAT5. Phosphorylierte STAT5 Proteine dimerisieren, wandern in den Zellkern, binden an spezifische DNA Muster, so genannte „response elements“, und regulieren mit anderen Transkriptionsfaktoren diverse Gene (Reich und Liu, 2006). Da bei den Jak2 homozygot mutanten Tieren die Zellen CFU-E und BFU-E in der fötalen Leber kaum nachweisbar waren, konnte daraus geschlossen werden, dass die adulte Hämatopoese gestört war (Neubauer *et al.*, 1998). Fötale Leberzellen, welche mit Erythropoietin stimuliert wurden, waren nicht mehr in der Lage die Aktivierung von STAT5 zu medieren. Demzufolge konnte das Epo-Überlebenssignal nicht weitergeleitet werden und die Erythrozyten Vorläuferzellen starben ab. EpoR defiziente Tiere weisen ebenfalls diesen letalen, anämischen Phänotyp (Wu *et al.*, 1995), jedoch in abgeschwächter Form (Neubauer *et al.*, 1998) auf. Neue Ergebnisse von STAT5 defizienten Tieren zeigen, dass diese nicht an einer Anämie sterben. Es gibt wenige STAT5a/b doppeldefiziente überlebende Tiere (Hoelbl *et al.*, 2006). Inwiefern ein letaler Phänotyp beim EpoR und bei Jak2 im Kontrast zu dem lebenden STAT5 „Knock-out“ Tieren steht ist noch genauer zu untersuchen. Es wäre möglich, dass ein neues oder bisher nicht charakterisiertes Molekül die STAT5 Rolle im Erythropoietin Signalweg bei einem Ausfall von STAT5 übernehmen kann. Andererseits wird diskutiert, ob die STAT5a/b Knockouts komplett sind. Die Mutation in den AS Y1007/8F hat jedenfalls genauso schwerwiegende Folgen wie eine Defizienz für den Epo-Rezeptor oder Jak2.

Jak2 ist allerdings noch in weiteren Signalwegen beteiligt wie IL-3, GM-CSF und Wachstums-Hormon („Growth hormone“) (Leonard und O'Shea, 1998). Somit wird sich die Mutation sowohl der „Knock-out“ als auch der AS Austausch Y1007/8F nicht nur auf die Blutbildung auswirken, sondern auch auf andere, noch genauer zu untersuchende Systeme. Dem Zusammenwirken diverser Faktoren liegt wohl auch die embryonale Letalität zu Grunde. Ein weiterer Punkt könnte auch eine gestörte Blutgefäßbildung sein. In konditionalen

Jak2 „Knock-out“ Tieren (Krempler et al., 2004), bei denen Jak2 spezifisch in den Brustdrüsen ausgeschaltet wurde, konnte gezeigt werden, dass die Gefäßbildung, im Speziellen die Gefäßverzweigung, gestört ist. Ebenso ist dort die Muttermilchproduktion nicht möglich (Wagner et al., 2004). Inwiefern sich jedoch die Y1007/8F Mutation auf weitere Jak2 Signalsysteme auswirkt, wurde in dieser Arbeit nicht genauer untersucht. Dieser Aspekt lässt noch einen großen Spielraum für zukünftige Experimente offen. So könnte man z. B. immunhistologische Schnitte von Embryonen auf das Vorhandensein von Blutgefäßen untersuchen.

4.2.7 Jak-STAT und die IFN γ R-Signaltransduktion

IFN γ wird unter anderem von Lymphozyten sekretiert und wurde primär als antiviraler Mediator charakterisiert. Mittlerweile sind viele weitere Funktionen hinzugekommen, wie die Aktivierung von Phagozyten, wie Makrophagen und Monozyten zur gesteigerten Pathogenabwehr, Hochregulation von MHC Molekülen und somit gesteigerte Antigenpräsentation (Janeway Jr. et al., 2001), sowie Einflüsse auf Proliferation und Apoptose und die Regulation verschiedenster Gene, deren Funktion bis zum heutigen Tag teilweise noch nicht aufgeklärt ist (Boehm et al., 1998; Degrandi unveröffentlicht). Die Komplexität der diversen IFN γ Wirkungen beruht unter anderem darauf, dass viele durch IFN γ regulierte Gene selbst Transkriptionsfaktoren sind (Boehm et al., 1998) wie z.B. IRFs. Die Signalweitergabe der IFN γ Stimulation läuft ebenso über Jak und STAT Moleküle wie bei Erythropoietin. Im Gegensatz dazu spielt hierbei jedoch nicht STAT5 die entscheidende Rolle sondern STAT1. Dabei ist Jak2 mit der IFN γ R2-Kette und Jak1 mit der IFN γ R1-Kette assoziiert. Aktiviertes, phosphoryliertes STAT1 bildet Dimere, die in den Nukleus translozieren und dort an „Gamma Activation Sites“ (GAS) binden und somit die Gentranskription mit initiieren (Decker et al., 1997).

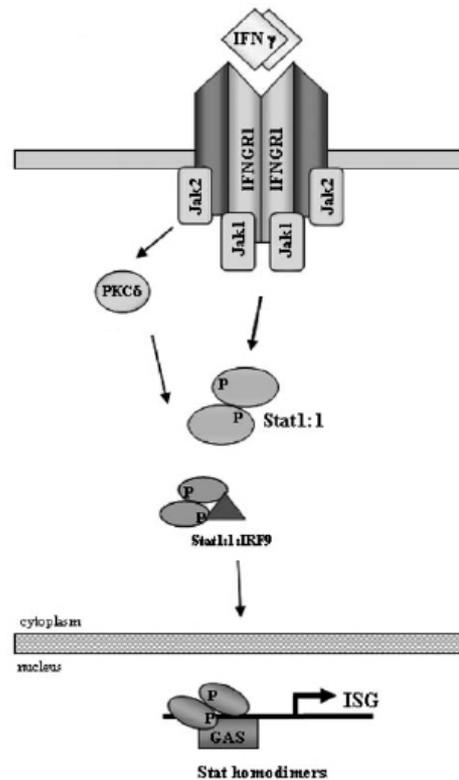


Abb. 4.4: Interferon γ induzierter Jak-STAT Signalweg. Nach IFN γ Bindung an den Rezeptor folgt sowohl Jak1, Jak2 und PKC δ Aktivierung. Dies führt zu STAT1 Tyrosin und Serin Phosphorylierung und Translokation in den Nukleus (Brierley und Fish, 2005).

Bislang ist unklar, wie die exakte Phosphorylierungsreihenfolge am IFN γ Rezeptor abläuft und ob zuerst die Kinase Jak1 oder Jak2 phosphoryliert wird und diese dann wiederum die jeweils andere Kinase aktiviert. Bei Jak2 defizienten mEF zeigt sich eine sehr geringe STAT1 Phosphorylierung, die jedoch nicht durch IFN γ induzierbar ist. Dies konnte in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden. Bei mutiertem Jak2 ist die STAT1 Phosphorylierung nach IFN γ Stimulation zeitabhängig ab zehn Minuten nachweisbar. Hier könnte demzufolge noch ein schwaches Signal im Zellkern ankommen. Ob diese geringe Menge an phosphoryliertem STAT1 (Y701) ausreicht, um die Transkription entscheidend zu beeinflussen, wurde in weiteren Experimenten noch geklärt. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein IFN γ Signal im Zellkern von Jak2^{Y1007/8F} mutierten Fibroblasten zu einer verzögerten Transkription eines Teils von IFN γ induzierten Genen führt. So stieg die Menge an mRNS des Transkriptionsfaktors IRF1, dessen Gen im Promoter eine GAS Bindestelle besitzt, um einem Zeitraum von zwei bis 16 Stunden verzögert an. Nachgeschaltete Gene, wie *mgbp2*, die eine IRF1 Bindestelle im Promoter besitzen zeigten demzufolge ebenfalls eine verzögerte Transkription, die sogar noch eine vergleichbare Intensität wie in Wildtyp Zellen erreichte. Genauso wie bei *irf1* und *mgbp2* verhielt es sich

bei den Genen für *stat1* und *indo*. Die Chemokine CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) und CXCL11 (I-TAC) zeigten ebenso eine verzögerte Transkription. Die gesteigerte Transkription von *ip10* nach IFN γ Gabe in STAT1 defizienten Zellen könnte durch eine Interaktion des Interferon Typ2 Signalwegs mit STAT2 Protein stammen, wie er von Khan et al. (Khan *et al.*, 2004) bei der CMV Abwehr postuliert wird. Daraus resultierende Effekte auf immunologische Abwehrmechanismen sollten in weiteren Infektions- und Stimulationsexperimenten, mittels Western Blot, ELISA oder Proliferations Assays untersucht werden. Die geringere Menge an phosphoryliertem STAT1 könnte auch aus einer verzögerten *stat1* Transkription und somit einer geringeren STAT1 Menge in den mutierten Zellen hervorgehen. Es ist jedoch zu vermuten, dass dieser Mengeneffekt einen geringeren Einfluss auf die Unterschiede zwischen Jak2Y1007/8F mutierten und Wildtyp Zellen hat, da die STAT1 Proteinmenge initial hoch ist und zu späteren Zeitpunkten auch gesteigerte Proteinmengen sowohl in Wildtyp als auch in mutierten Zellen nachweisbar waren. Die STAT1 Phosphorylierung am Tyrosin 701 ist jedenfalls essentiell für die Transkription von Genen die nur eine GAS Sequenz im Promoter haben jedoch nicht nötig für die Transkription von Genen die zusätzlich noch eine ICS-2 Bindestelle aufweisen (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Ein Electro Mobility Shift Assay (EMSA) könnte z.B. zeigen, ob STAT1 Dimere aus Jak2^{m/m} Zellen nach IFN γ Stimulation an die GAS Sequenzen der DNS im Zellkern binden kann. Des weiteren könnte man die Regulation strikt IFN γ abhängiger Gene zusätzlich noch mittels Northern Blot oder Gene Array Technologie untersuchen.

Die Mutation Y1007/8F beeinflusst nicht nur die Phosphorylierung von Tyrosin in den STAT1 Molekülen, sondern auch die STAT1 Serin Phosphorylierung ist nur in ähnlich schwacher Form möglich. Nach Interferon Typ I und II Stimulation werden STAT1 Moleküle neben Tyrosin 701 auch am Serin 727 phosphoryliert (Uddin *et al.*, 2002). Die Serin Phosphorylierung wird nach IFN γ Stimulation allerdings nicht durch Jak2, welches eine Tyrosin-Kinase ist, durchgeführt, sondern von PKC δ als Serin-Kinase. Ob durch die Jak2 Mutation auch die PKC δ Funktion beeinflusst wird, ist fraglich. Es könnte ein weiteres Jak2 abhängiges Protein geben, welches PKC δ aktiviert oder die Tyrosin Phosphorylierung von STAT1 hat direkt die PKC δ induzierte Serin Phosphorylierung zur Folge. Dies könnte man untersuchen indem man die Aktivität von PKC δ nach IFN γ Stimulation in mEF prüft. Zu vergleichen wären hier Wildtyp Fibroblasten mit Jak2 defizienten Fibroblasten und Fibroblasten der aktivierungsdefizienten Jak2 Mutante.

4.2.8 Virale Infektion

Vaccinia Virus (VV), ein der Gattung Orthopoxvirus in der Familie der Pockenviren angehöriges Virus, diente in dieser Arbeit als Pathogen, um die biologisch relevante Wirkung von IFN γ in den mutierten mEF auf Viren zu testen. Der Vermehrungszyklus von VV in Fibroblasten ist nach ca. 18 bis 20 Stunden beendet und die neuen Viren infizieren die nächsten Zellen. Die durch die virale Zellyse hervorgerufenen Plaques lassen sich im Lichtmikroskop deutlich erkennen. Vaccinia Virus selbst ist in seinem Wachstum in murinen EF stark IFN γ abhängig. So zeigten Kohonen-Corish et al. (Kohonen-Corish *et al.*, 1990) mit rekombinantem VV, welches für IFN γ rekombinant war, dass Nacktmäuse eine Infektion mit diesem Virus überlebten wenn mit Viren infizierte Zellen IFN γ produzierten und abgetötet werden konnten, wohingegen Nacktmäuse die mit Wildtyp VV infiziert wurden, starben. Wie sich herausstellte, unterbinden Wildtyp Fibroblasten eine Vaccinia Replikation schon nach geringen Dosen IFN γ Stimulation. STAT1 bzw. Jak2 defiziente Fibroblasten sind aufgrund ihres gestörten IFN γ Signalweges nicht mehr in der Lage Vaccinia Viren im Wachstum zu hindern. Ebenso zeigten für Jak2 mutierte Fibroblasten in dieser Arbeit, dass sie nicht mehr in der Lage sind das Virenwachstum so stark zu hemmen, dass ein weiteres Wachstum der Fibroblasten möglich ist. Somit ist auch durch die Y1007/8F Mutation der Signalweg so stark eingeschränkt, dass infizierte Zellen nicht mehr effektiv die Virusreplikation hemmen können. Wie aber der Western Blot mit der Kinetik für Y701 phosphoryliertes STAT1 erstmals zeigte, ist Jak2Y1007/8F trotz der Mutation noch in der Lage geringe Mengen an STAT1 zu phosphorylieren. Diese geringen Mengen an aktivem STAT1 Transkriptionsfaktor führen auch zu einer verzögerten Transkription von IFN γ regulierten Genen (Kapitel 3.2.3.5.) Diese geringe transkriptionelle Aktivität könnte der Grund dafür sein, dass das Vaccinia Wachstum in Jak2^{m/m} Zellen nach Stimulation mit 500 U/ml IFN γ leicht gehemmt wird und 24 Stunden nach Infektion sogar ein um Faktor 500 niedrigerer Virustiter gemessen werden konnte. Für eine effiziente Virenabwehr reicht diese Restaktivität allerdings nicht mehr aus. Es wäre interessant zu untersuchen wie mutierte Fibroblasten mit noch höheren Dosen IFN γ auf eine Vaccinia Infektion reagieren. Evtl. könnte durch den extrem starken Stimulus von 5000 U/ml noch mehr STAT1 aktiviert werden und die Hemmung des Virenwachstums wäre noch stärker oder sogar vollständig. Sehr interessant wäre hierbei die Analyse an einem frühen Zeitpunkt von 24 Stunden, bei dem die Viren nur einen einzigen Vermehrungszyklus durchlaufen haben, da hier nur eine einzige Neuinfektion die Zellen infiziert und alle Viren in etwa zum gleichen Zeitpunkt die infizierten Zellen lysieren und Plaques entstehen. Zusätzlich

könnte das Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu Zielzellen reduziert, und Wildtyp, Jak2^{-/-} und Jak2Y1007/8F Fibroblasten im Vergleich zueinander mit gleichen Virusdosen infiziert werden. Hierbei könnten auch Jak2Y1007/8F mutierte Zellen mit ihrer verzögerten IFN γ Antwort in der Lage sein das Virenwachstum vollständig zu hemmen, während in Jak2 defizienten Zellen weiterhin keine Hemmung möglich sein sollte.

5 Zusammenfassung

Für die Abwehr von Pathogenen ist Interferon γ (IFN γ) für das Immunsystem ein sehr wichtiger regulatorischer Faktor. Die Aktivierung von Makrophagen durch IFN γ hat bei der Etablierung einer effektiven und schnellen Immunantwort eine zentrale Rolle.

puma-g ist ein Gen welches in Makrophagen erst nach IFN γ Stimulation exprimiert wird und in Adipozyten konstitutiv abgelesen wird. Funktionell beeinflusst PUMA-G als G-Protein gekoppelter Rezeptor die Adenylat Cyclase und somit den intrazellulären cAMP Spiegel und letztendlich den Spiegel an freien Fettsäuren (FFS) und Lipoproteinen. Die Analyse von PUMA-G defizienten Mäusen zeigte in männlichen Tieren im Alter von fünf bis zu 30 Wochen ein erhöhtes Körpergewicht, welches jedoch nicht auf eine Fehlregulation des Blutzuckerspiegels zurückzuführen war. Ein Grund für die geschlechtsspezifische Gewichtsdivergenz könnte in einer unterschiedlichen Verteilung der HDL-Spezies in beiden Geschlechtern liegen. Nikotinsäure (NS), ein Ligand für PUMA-G, führt im Körper zu einem Absinken des FFS Spiegels und Anstieg von HDL. Nicht nur in Adipozyten, sondern auch in Makrophagen kann der intrazelluläre cAMP Spiegel durch NS Bindung an PUMA-G negativ reguliert werden. Ob in PUMA-G^{-/-} Tieren wegen einer Fehlregulation des intrazellulären cAMP Spiegels die Häufigkeit von Neoplasien zunahm oder ob andere Faktoren eine erhöhte Gewebeentartung zur Folge hatten konnte nicht abschließend geklärt werden.

Durch Realtime - PCR konnte gezeigt werden, dass PUMA-G in Makrophagen nicht exklusiv durch IFN γ reguliert wird. Auch andere immunologisch relevante Agenzien führen zu einer gesteigerten Expression. So wird durch LPS und andere TLR-Liganden die *puma-g* Expression beeinflusst. Eine zentrale Rolle für die Pathogenabwehr von Makrophagen durch Phagozytose kann PUMA-G allerdings nicht zugewiesen werden. In Experimenten mit fluoreszierenden Microspheres konnte bei BMDMC keine unterschiedliche Phagozytoseleistung von PUMA-G^{-/-} Zellen nachgewiesen werden.

Jak2 ist eine Januskinase, die im Signalweg von IFN γ eine entscheidende Rolle spielt. Das IFN γ Signal wird über den IFN γ -Rezeptor, Jak1, Jak2 und über STAT1 in den Zellkern weitergeleitet. Da eine Defizienz von Jak2 embryonal letal ist, stellte sich die Frage in wie weit ein Kinaseaktivierungsdefizientes Jak2 Molekül diese Aufgabe noch erfüllen kann. Um dies zu untersuchen wurde eine Jak2Y1007/8F mutierte Mauslinie erzeugt bei der aufgrund der Mutationen Jak2 nicht mehr aktiviert werden kann, das Jak2 Protein jedoch im Gegensatz zu Jak2^{-/-} Tieren vorhanden war. Eine Sequenzierung des genomischen Locus in

Jak2^{m/m} Tieren bestätigte die eingebrachte Mutation. Das mutierte Protein konnte den letalen Phänotyp der Jak2 „Knock-out“ Mutante nicht retten, da auch mit der Jak2Y1007/8F Mutation die Signaltransduktion am Epo Rezeptor und somit die adulte Hämatopoese gestört war. Dies zeigte sich anhand einer blutarmen, kleineren Leber. In den embryonalen Lebern von Jak2^{m/m} Tieren konnte das für die blutbildenden Vorläuferzellen notwendige Erythropoietin Signal nicht über Phosphorylierung von STAT5 in den Zellkern weitergeleitet werden. Im Gegensatz dazu war die IFN γ Rezeptor Signaltransduktion noch partiell möglich. Das IFN γ Signal führt intrazellulär zu einer Phosphorylierung von STAT1 sowohl an Tyrosin 701 als auch an Serin 727. In den mutierten murinen embryonalen Fibroblasten konnte durch die verbliebene Grundaktivität STAT1 noch abgeschwächt und verzögert phosphoryliert werden, so dass noch aktiver STAT1 Transkriptionsfaktor gebildet werden konnte. Eine daraus resultierende Transkription nachgeschalteter Gene war detektierbar, erfolgte allerdings ebenso verzögert. Die abgeschwächte Antwort konnte auch im Infektionsmodell mit Vaccinia Viren nach IFN γ Stimulation von Fibroblasten beobachtet werden. Die Analyse von Jak2Y1007/8F exprimierenden Zellen kann zukünftig wichtige Erkenntnisse für die molekulare Signaltransduktion des IFN γ Rezeptor, Jak1, Jak2, STAT-Komplexes liefern.

6 Literaturverzeichnis

A.G.Olsson (1994) *Nicotinic Acid and Derivates*. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Verlag, pp. 349-400.

Aaronson,D.S. and Horvath,C.M. (2002) *A road map for those who don't know JAK-STAT*. Science, 296, 1653-1655.

Alcami,A. and Smith,G.L. (1995) *Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity*. J. Virol., 69, 4633-4639.

ALTSCHUL,R., HOFFER,A. and STEPHEN,J.D. (1955) *Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man*. Arch. Biochem., 54, 558-559.

Argetsinger,L.S., Kouadio,J.L., Steen,H., Stensballe,A., Jensen,O.N. and Carter-Su,C. (2004) *Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity*. Mol. Cell Biol., 24, 4955-4967.

Bacon,K.B., Flores-Romo,L., Life,P.F., Taub,D.D., Premack,B.A., Arkinstall,S.J., Wells,T.N., Schall,T.J. and Power,C.A. (1995) *IL-8-induced signal transduction in T lymphocytes involves receptor-mediated activation of phospholipases C and D*. J. Immunol., 154, 3654-3666.

Bacon,K.B., Quinn,D.G., Aubry,J.P. and Camp,R.D. (1993) *Interleukin-8-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in human peripheral blood lymphocytes*. Blood, 81, 430-436.

Bai,M., Trivedi,S. and Brown,E.M. (1998) *Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells*. J. Biol. Chem., 273, 23605-23610.

Baldeweg,S.E., Golay,A., Natali,A., Balkau,B., Del Prato,S. and Coppack,S.W. (2000) *Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans*. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Eur. J. Clin. Invest, 30, 45-52.

Baldwin,J.M. (1993) *The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors*. EMBO J., 12, 1693-1703.

Baron S, Peake R, James D, Susman M, Kennedy C, Singleton M and Schuenke S (1996) Medical Microbiology. The University of Texas Medical Branch at Galveston.

Beer,S., Scheikl,T., Reis,B., Huser,N., Pfeffer,K. and Holzmann,B. (2005) *Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice*. Mol. Cell Biol., 25, 9646-9660.

Berg, Tymoczko, Stryer and Clarke (2002) Biochemistry. W. H. Freeman and Company.

Beuvink,I., Hess,D., Flotow,H., Hofsteenge,J., Groner,B. and Hynes,N.E. (2000) *Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland,*

and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated *in vitro* DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, 275, 10247-10255.

Binari,R. and Perrimon,N. (1994) *Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in Drosophila.* *Genes Dev.*, 8, 300-312.

Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.

Bockaert,J. and Pin,J.P. (1999) *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.* *EMBO J.*, 18, 1723-1729.

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

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

Bolinder,J., Kerckhoffs,D.A., Moberg,E., Hagstrom-Toft,E. and Arner,P. (2000) *Rates of skeletal muscle and adipose tissue glycerol release in nonobese and obese subjects.* *Diabetes*, 49, 797-802.

Bossis,I., Voutetakis,A., Bei,T., Sandrini,F., Griffin,K.J. and Stratakis,C.A. (2004) *Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm.* *Endocr. Relat Cancer*, 11, 265-280.

Brierley,M.M. and Fish,E.N. (2005) *Stats: multifaceted regulators of transcription.* *J. Interferon Cytokine Res.*, 25, 733-744.

Briscoe,J., Rogers,N.C., Witthuhn,B.A., Watling,D., Harpur,A.G., Wilks,A.F., Stark,G.R., Ihle,J.N. and Kerr,I.M. (1996) *Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state.* *EMBO J.*, 15, 799-809.

Buhl,A.M., Johnson,N.L., Dhanasekaran,N. and Johnson,G.L. (1995) *G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly.* *J. Biol. Chem.*, 270, 24631-24634.

Camp,R.D., Bacon,K.B. and Fincham,N.J. (1990) *Lymphocyte chemoattractants in psoriasis and normal skin.* *J. Invest Dermatol.*, 95, 22S-23S.

Carlson,L.A. and Oro,L. (1962) *The effect of nicotinic acid on the plasma free fatty acid; demonstration of a metabolic type of sympathicolysis.* *Acta Med. Scand.*, 172, 641-645.

Carlson,L.A., Oro,L. and Ostman,J. (1968) *Effect of nicotinic acid on plasma lipids in patients with hyperlipoproteinemia during the first week of treatment.* *J. Atheroscler. Res.*, 8, 667-677.

Carpino,N., Kobayashi,R., Zang,H., Takahashi,Y., Jou,S.T., Feng,J., Nakajima,H. and Ihle,J.N. (2002) *Identification, cDNA cloning, and targeted deletion of p70, a novel, ubiquitously expressed SH3 domain-containing protein.* *Mol. Cell Biol.*, 22, 7491-7500.

Charles A. Janeway, Paul Travers and Mark Walport (2007) *Immunobiology*. B&T; Auflage: 6 Pap/Cdr (2005).

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P. and Stark, G.R. (2000) *How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene*. EMBO J., 19, 4111-4122.

Chatti, K., Farrar, W.L. and Duhe, R.J. (2004) *Tyrosine phosphorylation of the Janus kinase 2 activation loop is essential for a high-activity catalytic state but dispensable for a basal catalytic state*. Biochemistry, 43, 4272-4283.

Chen, S., Zhou, D., Okubo, T., Kao, Y.C. and Yang, C. (1999) *Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation*. Endocr. Relat Cancer, 6, 149-156.

Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1997) *G protein beta gamma subunits*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37, 167-203.

Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 69, 2110-2114.

Colamonici, O.R., Domanski, P., Sweitzer, S.M., Lerner, A. and Buller, R.M. (1995) *Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling*. J. Biol. Chem., 270, 15974-15978.

Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Woude, G.F., Sher, A. and Taylor, G.A. (2001) *Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection*. J. Exp. Med., 194, 181-188.

Colledge, M. and Scott, J.D. (1999) *AKAPs: from structure to function*. Trends Cell Biol., 9, 216-221.

Collins, S. and Surwit, R.S. (2001) *The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis*. Recent Prog. Horm. Res., 56, 309-328.

Cools, J., Peeters, P., Voet, T., Aventin, A., Mecucci, C., Grandchamp, B. and Marynen, P. (1999) *Genomic organization of human JAK2 and mutation analysis of its JH2-domain in leukemia*. Cytogenet. Cell Genet., 85, 260-266.

Cooper, D.M., Mons, N. and Karpen, J.W. (1995) *Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling*. Nature, 374, 421-424.

Cox, G.W., Mathieson, B.J., Gandino, L., Blasi, E., Radzioch, D. and Varesio, L. (1989) *Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver*. J. Natl. Cancer Inst., 81, 1492-1496.

Cumbay, M.G. and Watts, V.J. (2004) *Novel regulatory properties of human type 9 adenylyl cyclase*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 310, 108-115.

Dajotoy, T., Andersson, P., Bjartell, A., Lofdahl, C.G., Tapper, H. and Egesten, A. (2004) *Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon*

stimulation with IFN-gamma. J. Leukoc. Biol., 76, 685-691.

Dalton,D.K., Pitts-Meek,S., Keshav,S., Figari,I.S., Bradley,A. and Stewart,T.A. (1993) *Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes*. Science, 259, 1739-1742.

Darnell,J.E., Jr. (1997) *STATs and gene regulation*. Science, 277, 1630-1635.

Darnell,J.E., Jr., Kerr,I.M. and Stark,G.R. (1994) *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 264, 1415-1421.

de Rooij,J., Zwartkruis,F.J., Verheijen,M.H., Cool,R.H., Nijman,S.M., Wittinghofer,A. and Bos,J.L. (1998) *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 396, 474-477.

Deb,D.K., Sassano,A., Lekmine,F., Majchrzak,B., Verma,A., Kambhampati,S., Uddin,S., Rahman,A., Fish,E.N. and Plataniias,L.C. (2003) *Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma*. J. Immunol., 171, 267-273.

Decker T, Müller M and Stockinger S (2005) *THE YIN AND YANG OF TYPE I INTERFERON ACTIVITY IN BACTERIAL INFECTION*. Nature Reviews Immunology.

Decker,T., Kovarik,P. and Meinke,A. (1997) *GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression*. J. Interferon Cytokine Res., 17, 121-134.

Dhanasekaran,N. and Dermott,J.M. (1996) *Signaling by the G12 class of G proteins*. Cell Signal., 8, 235-245.

Diviani,D. and Scott,J.D. (2001) *AKAP signaling complexes at the cytoskeleton*. J. Cell Sci., 114, 1431-1437.

Durbin,J.E., Hackenmiller,R., Simon,M.C. and Levy,D.E. (1996) *Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease*. Cell, 84, 443-450.

ELVEHJEM,C.A. (1952) *Nutritional interrelationships*. Int. Z. Vitaminforsch. Beih., 23, 299-308.

Endres,R., Luz,A., Schulze,H., Neubauer,H., Futterer,A., Holland,S.M., Wagner,H. and Pfeffer,K. (1997) *Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI*. Immunity., 7, 419-432.

Fagerlund,R., Melen,K., Kinnunen,L. and Julkunen,I. (2002) *Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5*. J. Biol. Chem., 277, 30072-30078.

Feener,E.P., Rosario,F., Dunn,S.L., Stancheva,Z. and Myers,M.G., Jr. (2004) *Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling*. Mol. Cell Biol., 24, 4968-4978.

Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1984) *"A technique for radiolabeling DNA restriction*

- endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. Anal. Biochem., 137, 266-267.*
- Feng,J., Witthuhn,B.A., Matsuda,T., Kohlhuber,F., Kerr,I.M. and Ihle,J.N.** (1997) *Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop.* Mol. Cell Biol., 17, 2497-2501.
- Feng,W.G. and Chang,Z.L.** (1998) *Expression of cytokine mRNA during immunomodulation of murine suppressor macrophages.* Cell Res., 8, 317-322.
- Feng,W.G., Wang,Y.B., Zhang,J.S., Wang,X.Y., Li,C.L. and Chang,Z.L.** (2002) *cAMP elevators inhibit LPS-induced IL-12 p40 expression by interfering with phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages.* Cell Res., 12, 331-337.
- Foss,K.B., Landmark,B., Skalhegg,B.S., Tasken,K., Jellum,E., Hansson,V. and Jahnsen,T.** (1994) *Characterization of in-vitro-translated human regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinases.* Eur. J. Biochem., 220, 217-223.
- Frank,D.A., Mahajan,S. and Ritz,J.** (1997) *B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues.* J. Clin. Invest., 100, 3140-3148.
- Freund,M., Asang,C., Kammler,S., Konermann,C., Krummheuer,J., Hipp,M., Meyer,I., Gierling,W., Theiss,S., Preuss,T., Schindler,D., Kjems,J. and Schaal,H.** (2003) *A novel approach to describe a U1 snRNA binding site.* Nucleic Acids Res., 31, 6963-6975.
- Fukao,T., Lopaschuk,G.D. and Mitchell,G.A.** (2004) *Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry.* Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 70, 243-251.
- Gao,B.N. and Gilman,A.G.** (1991) *Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 88, 10178-10182.
- Gauzzi,M.C., Velazquez,L., McKendry,R., Mogensen,K.E., Fellous,M. and Pellegrini,S.** (1996) *Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase.* J. Biol. Chem., 271, 20494-20500.
- George,S.R., O'Dowd,B.F. and Lee,S.P.** (2002) *G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery.* Nat. Rev. Drug Discov., 1, 808-820.
- Guillou,J.L., Nakata,H. and Cooper,D.M.** (1999) *Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases.* J. Biol. Chem., 274, 35539-35545.
- Ham,J., Ivan,M., Wynford-Thomas,D. and Scanlon,M.F.** (1997) *GH3 cells expressing constitutively active Gs alpha (Q227L) show enhanced hormone secretion and proliferation.* Mol. Cell Endocrinol., 127, 41-47.
- Harada,N.** (1997) *Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 61, 175-184.
- Hengel,H., Reusch,U., Gutermann,A., Ziegler,H., Jonjic,S., Lucin,P. and Koszinowski,U.H.** (1999) *Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse.* Immunol. Rev., 168, 167-176.

- Hoelbl,A., Kovacic,B., Kerenyi,M.A., Simma,O., Warsch,W., Cui,Y., Beug,H., Hennighausen,L., Moriggl,R. and Sexl,V.** (2006) *Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation.* Blood, 107, 4898-4906.
- Horvath,C.M.** (2000) *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals.* Trends Biochem. Sci., 25, 496-502.
- Horvath,C.M. and Darnell,J.E.** (1997) *The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus.* Curr. Opin. Cell Biol., 9, 233-239.
- Huang,S., Hendriks,W., Althage,A., Hemmi,S., Bluethmann,H., Kamijo,R., Vilcek,J., Zinkernagel,R.M. and Aguet,M.** (1993) *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor.* Science, 259, 1742-1745.
- Hurd,C., Waldron,R.T. and Rozengurt,E.** (2002) *Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus.* Oncogene, 21, 2154-2160.
- Ihle,J.N. and Kerr,I.M.** (1995) *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily.* Trends Genet., 11, 69-74.
- Ihle,J.N., Witthuhn,B.A., Quelle,F.W., Yamamoto,K. and Silvennoinen,O.** (1995) *Signaling through the hematopoietic cytokine receptors.* Annu. Rev. Immunol., 13, 369-398.
- Itani,S.I., Ruderman,N.B., Schmieder,F. and Boden,G.** (2002) *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha.* Diabetes, 51, 2005-2011.
- James,C., Ugo,V., Le Couedic,J.P., Staerk,J., Delhommeau,F., Lacout,C., Garcon,L., Raslova,H., Berger,R., Bennaceur-Griscelli,A., Villeval,J.L., Constantinescu,S.N., Casadevall,N. and Vainchenker,W.** (2005) *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.* Nature, 434, 1144-1148.
- James,V.H., McNeill,J.M., Lai,L.C., Newton,C.J., Ghilchik,M.W. and Reed,M.J.** (1987) *Aromatase activity in normal breast and breast tumor tissues: in vivo and in vitro studies.* Steroids, 50, 269-279.
- Janeway Jr., Travers, Walport and Shlomchik** (2001) Immunobiology. Garland Publishing.
- Ji,T.H., Grossmann,M. and Ji,I.** (1998) *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions.* J. Biol. Chem., 273, 17299-17302.
- Jordan,B.A., Cvejic,S. and Devi,L.A.** (2000) *Opioids and their complicated receptor complexes.* Neuropsychopharmacology, 23, S5-S18.
- Kammler,S., Leurs,C., Freund,M., Krummheuer,J., Seidel,K., Tange,T.O., Lund,M.K., Kjems,J., Scheid,A. and Schaal,H.** (2001) *The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA.* RNA., 7, 421-434.
- Kawasaki,H., Springett,G.M., Mochizuki,N., Toki,S., Nakaya,M., Matsuda,M.,**

- Housman,D.E. and Graybiel,A.M.** (1998) *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1*. Science, 282, 2275-2279.
- Khan,S., Zimmermann,A., Basler,M., Groettrup,M. and Hengel,H.** (2004) *A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction*. J. Virol., 78, 1831-1842.
- Kirchner H, Kruse A, Neustock P and Rink L** (1994) Cytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems. Spektrum Akademische Verlag.
- Kohonen-Corish,M.R., King,N.J., Woodhams,C.E. and Ramshaw,I.A.** (1990) *Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon-gamma*. Eur. J. Immunol., 20, 157-161.
- Kopperud,R., Christensen,A.E., Kjarland,E., Viste,K., Kleivdal,H. and Doskeland,S.O.** (2002) *Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions*. J. Biol. Chem., 277, 13443-13448.
- Krempler,A., Qi,Y., Triplett,A.A., Zhu,J., Rui,H. and Wagner,K.U.** (2004) *Generation of a conditional knockout allele for the Janus kinase 2 (Jak2) gene in mice*. Genesis., 40, 52-57.
- Kroeger,K.M., Pflieger,K.D. and Eidne,K.A.** (2003) *G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways*. Front Neuroendocrinol., 24, 254-278.
- Kuby J** (1998) Immunology. Freeman.
- Kuby J, Goldsby R, Kindt T and Osborne B** (2004) Immunology. Palgrave Macmillan.
- Kuhn,R., Rajewsky,K. and Muller,W.** (1991) *Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice*. Science, 254, 707-710.
- Kurzer,J.H., Argetsinger,L.S., Zhou,Y.J., Kouadio,J.L., O'Shea,J.J. and Carter-Su,C.** (2004) *Tyrosine 813 is a site of JAK2 autophosphorylation critical for activation of JAK2 by SH2-B beta*. Mol. Cell Biol., 24, 4557-4570.
- Lafont,V., Decker,T. and Cantrell,D.** (2000) *Antigen receptor signal transduction: activating and inhibitory antigen receptors regulate STAT1 serine phosphorylation*. Eur. J. Immunol., 30, 1851-1860.
- Lander,E.S., Linton,L.M., Birren,B., Nusbaum,C., Zody,M.C., Baldwin,J., Devon,K., Dewar,K., Doyle,M., FitzHugh,W., Funke,R., Gage,D., Harris,K., Heaford,A., Howland,J., Kann,L., Lehoczky,J., Levine,R., McEwan,P., McKernan,K., Meldrim,J., Mesirov,J.P., Miranda,C., Morris,W., Naylor,J., Raymond,C., Rosetti,M., Santos,R., Sheridan,A., Sougnez,C., Stange-Thomann,N., Stojanovic,N., Subramanian,A., Wyman,D., Rogers,J., Sulston,J., Ainscough,R., Beck,S., Bentley,D., Burton,J., Clee,C., Carter,N., Coulson,A., Deadman,R., Deloukas,P., Dunham,A., Dunham,I., Durbin,R., French,L., Grafham,D., Gregory,S., Hubbard,T., Humphray,S., Hunt,A., Jones,M., Lloyd,C., McMurray,A., Matthews,L., Mercer,S., Milne,S., Mullikin,J.C., Mungall,A., Plumb,R., Ross,M., Shownkeen,R., Sims,S., Waterston,R.H., Wilson,R.K., Hillier,L.W., McPherson,J.D., Marra,M.A., Mardis,E.R., Fulton,L.A., Chinwalla,A.T., Pepin,K.H., Gish,W.R., Chissoe,S.L., Wendl,M.C., Delehaunty,K.D., Miner,T.L., Delehaunty,A.,**

Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la, B.M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. and Chen, Y.J. (2001) *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 409, 860-921.

Lania, A., Mantovani, G. and Spada, A. (2003) *Genetics of pituitary tumors: Focus on G-protein mutations*. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.), 228, 1004-1017.

Laskin, D.L. and Pendino, K.J. (1995) *Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35, 655-677.

Legrand, F.A., Verardi, P.H., Jones, L.A., Chan, K.S., Peng, Y. and Yilma, T.D. (2004) *Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes*. *J. Virol.*, 78, 2770-2779.

Lengeling, A., Pfeffer, K. and Balling, R. (2001) *The battle of two genomes: genetics of bacterial host/pathogen interactions in mice*. *Mamm. Genome*, 12, 261-271.

Leonard, W.J. and O'Shea, J.J. (1998) *Jaks and STATs: biological implications*. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 293-322.

Lin, Y., Lee, H., Berg, A.H., Lisanti, M.P., Shapiro, L. and Scherer, P.E. (2000) *The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes*. *J. Biol. Chem.*, 275, 24255-24263.

Liptakova, H., Kontsekkova, E., Alcamí, A., Smith, G.L. and Kontsek, P. (1997) *Analysis of an interaction between the soluble vaccinia virus-coded type I interferon (IFN)-receptor and*

human IFN-alpha1 and IFN-alpha2. Virology, 232, 86-90.

Luster,A.D., Unkeless,J.C. and Ravetch,J.V. (1985) *Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins*. Nature, 315, 672-676.

Maquat,L.E. (2005) *Nonsense-mediated mRNA decay in mammals*. J. Cell Sci., 118, 1773-1776.

Marie,I., Durbin,J.E. and Levy,D.E. (1998) *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. EMBO J., 17, 6660-6669.

Marshall,G.R. (2001) *Peptide interactions with G-protein coupled receptors*. Biopolymers, 60, 246-277.

Matsuda,T., Feng,J., Witthuhn,B.A., Sekine,Y. and Ihle,J.N. (2004) *Determination of the transphosphorylation sites of Jak2 kinase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 325, 586-594.

McBride,K.M., Banninger,G., McDonald,C. and Reich,N.C. (2002) *Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha*. EMBO J., 21, 1754-1763.

Melen,K., Kinnunen,L. and Julkunen,I. (2001) *Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs*. J. Biol. Chem., 276, 16447-16455.

Meraz,M.A., White,J.M., Sheehan,K.C., Bach,E.A., Rodig,S.J., Dighe,A.S., Kaplan,D.H., Riley,J.K., Greenlund,A.C., Campbell,D., Carver-Moore,K., DuBois,R.N., Clark,R., Aguet,M. and Schreiber,R.D. (1996) *Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway*. Cell, 84, 431-442.

Metpally,R.P. and Sowdhamini,R. (2005) *Cross genome phylogenetic analysis of human and Drosophila G protein-coupled receptors: application to functional annotation of orphan receptors*. BMC. Genomics, 6, 106.

Michel,J.J. and Scott,J.D. (2002) *AKAP mediated signal transduction*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 42, 235-257.

Milligan,G. (2004) *G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology*. Mol. Pharmacol., 66, 1-7.

Monnot,C., Bihoreau,C., Conchon,S., Curnow,K.M., Corvol,P. and Clauser,E. (1996) *Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants*. J. Biol. Chem., 271, 1507-1513.

Moore,K.W., de Waal,M.R., Coffman,R.L. and O'Garra,A. (2001) *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu. Rev. Immunol., 19, 683-765.

Morrison,T.E., Mauser,A., Wong,A., Ting,J.P. and Kenney,S.C. (2001) *Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein*. Immunity., 15, 787-799.

- Mui,A.L., Wakao,H., O'Farrell,A.M., Harada,N. and Miyajima,A.** (1995) *Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs.* EMBO J., 14, 1166-1175.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A.** (1987) *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzymol., 155, 335-350.
- Musso,T., Johnston,J.A., Linnekin,D., Varesio,L., Rowe,T.K., O'Shea,J.J. and McVicar,D.W.** (1995) *Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7.* J. Exp. Med., 181, 1425-1431.
- Nakamura,T. and Gold,G.H.** (1987) *A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia.* Nature, 325, 442-444.
- Neubauer,H., Cumano,A., Muller,M., Wu,H., Huffstadt,U. and Pfeffer,K.** (1998) *Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis.* Cell, 93, 397-409.
- O'Shea,J.J.** (1997) *Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet?* Immunity., 7, 1-11.
- Parganas,E., Wang,D., Stravopodis,D., Topham,D.J., Marine,J.C., Teglund,S., Vanin,E.F., Bodner,S., Colamonici,O.R., van Deursen,J.M., Grosveld,G. and Ihle,J.N.** (1998) *Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors.* Cell, 93, 385-395.
- Patsch,J.R., Sailer,S., Kostner,G., Sandhofer,F., Holasek,A. and Braunsteiner,H.** (1974) *Separation of the main lipoprotein density classes from human plasma by rate-zonal ultracentrifugation.* J. Lipid Res., 15, 356-366.
- Perrimon,N. and Mahowald,A.P.** (1986) *l(1)hopsotch, A larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in Drosophila.* Dev. Biol., 118, 28-41.
- Pfeffer,K. and Mak,T.W.** (1994) *Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice.* Annu. Rev. Immunol., 12, 367-411.
- Pfeffer,K., Matsuyama,T., Kundig,T.M., Wakeham,A., Kishihara,K., Shahinian,A., Wiegmann,K., Ohashi,P.S., Kronke,M. and Mak,T.W.** (1993) *Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection.* Cell, 73, 457-467.
- Reich,N.C. and Liu,L.** (2006) *Tracking STAT nuclear traffic.* Nat. Rev. Immunol., 6, 602-612.
- Rhee,S.G.** (2001) *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C.* Annu. Rev. Biochem., 70, 281-312.
- Robishaw,J.D. and Berlot,C.H.** (2004) *Translating G protein subunit diversity into functional specificity.* Curr. Opin. Cell Biol., 16, 206-209.
- Romano,C., Yang,W.L. and O'Malley,K.L.** (1996) *Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer.* J. Biol. Chem., 271, 28612-28616.

S Gilbert (2000) *Developmental Biology*. SINAUER ASSOCIATES, INC..

Sadar,M.D., Hussain,M. and Bruchovsky,N. (1999) *Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence*. *Endocr. Relat Cancer*, 6, 487-502.

Saharinen,P. and Silvennoinen,O. (2002) *The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction*. *J. Biol. Chem.*, 277, 47954-47963.

Saharinen,P., Takaluoma,K. and Silvennoinen,O. (2000) *Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain*. *Mol. Cell Biol.*, 20, 3387-3395.

Sanford KK and et al. (1948) *The growth in vitro of single isolated tissue cells*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 229-246.

Schall,T.J., Bacon,K., Toy,K.J. and Goeddel,D.V. (1990) *Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES*. *Nature*, 347, 669-671.

Schaub,A., Futterer,A. and Pfeffer,K. (2001) *PUMA-G, an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily*. *Eur. J. Immunol.*, 31, 3714-3725.

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

Seyffert W., Gassen H.G., Hess O., Jäckle H. and Fischback K.-F. (1998) *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag.

Shepherd,J., Packard,C.J., Patsch,J.R., Gotto,A.M., Jr. and Taunton,O.D. (1979) *Effects of nicotinic acid therapy on plasma high density lipoprotein subfraction distribution and composition and on apolipoprotein A metabolism*. *J. Clin. Invest*, 63, 858-867.

Siegel, Agranoff, Fisher, Albers and Uhler (1998) *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. American Society for Neurochemistry.

Skrabanek,L., Campagne,F. and Weinstein,H. (2003) *Building protein diagrams on the web with the residue-based diagram editor RbDe*. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3856-3858.

Soga,T., Kamohara,M., Takasaki,J., Matsumoto,S., Saito,T., Ohishi,T., Hiyama,H., Matsuo,A., Matsushime,H. and Furuichi,K. (2003) *Molecular identification of nicotinic acid receptor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 364-369.

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

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

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

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

Su,A.I., Cooke,M.P., Ching,K.A., Hakak,Y., Walker,J.R., Wiltshire,T., Orth,A.P., Vega,R.G., Sapinoso,L.M., Moqrich,A., Patapoutian,A., Hampton,G.M., Schultz,P.G. and Hogenesch,J.B. (2002) *Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 99, 4465-4470.

Symons,J.A., Alcami,A. and Smith,G.L. (1995) *Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity.* Cell, 81, 551-560.

Taggart,A.K., Kero,J., Gan,X., Cai,T.Q., Cheng,K., Ippolito,M., Ren,N., Kaplan,R., Wu,K., Wu,T.J., Jin,L., Liaw,C., Chen,R., Richman,J., Connolly,D., Offermanns,S., Wright,S.D. and Waters,M.G. (2005) *(D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G.* J. Biol. Chem., 280, 26649-26652.

Takaoka,A. and Yanai,H. (2006) *Interferon signalling network in innate defence.* Cell Microbiol., 8, 907-922.

Takeda,K., Noguchi,K., Shi,W., Tanaka,T., Matsumoto,M., Yoshida,N., Kishimoto,T. and Akira,S. (1997) *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 94, 3801-3804.

Tasken,K. and Aandahl,E.M. (2004) *Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A.* Physiol Rev., 84, 137-167.

Tasken,K., Andersson,K.B., Skalhegg,B.S., Tasken,K.A., Hansson,V., Jahnsen,T. and Blomhoff,H.K. (1993) *Reciprocal regulation of mRNA and protein for subunits of cAMP-dependent protein kinase (RI alpha and C alpha) by cAMP in a neoplastic B cell line (Reh).* J. Biol. Chem., 268, 23483-23489.

Tau,G. and Rothman,P. (1999) *Biologic functions of the IFN-gamma receptors.* Allergy, 54, 1233-1251.

Taylor,G.A., Collazo,C.M., Yap,G.S., Nguyen,K., Gregorio,T.A., Taylor,L.S., Eagleson,B., Secretst,L., Southon,E.A., Reid,S.W., Tessarollo,L., Bray,M., McVicar,D.W., Komschlies,K.L., Young,H.A., Biron,C.A., Sher,A. and Vande Woude,G.F. (2000) *Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97, 751-755.

Terrillon,S. and Bouvier,M. (2004) *Roles of G-protein-coupled receptor dimerization.* EMBO Rep., 5, 30-34.

Tortolani,P.J., Lal,B.K., Riva,A., Johnston,J.A., Chen,Y.Q., Reaman,G.H., Beckwith,M., Longo,D., Ortaldo,J.R., Bhatia,K., McGrath,I., Kehrl,J., Tuscano,J., McVicar,D.W. and O'Shea,J.J. (1995) *Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies.* J. Immunol., 155, 5220-5226.

Tunaru,S., Kero,J., Schaub,A., Wufka,C., Blaukat,A., Pfeffer,K. and Offermanns,S. (2003) *PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic*

effect. Nat. Med., 9, 352-355.

Turner,L., Ward,S.G., Sansom,D. and Westwick,J. (1996) *A role for RANTES in T lymphocyte proliferation.* *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 93S.

Uddin,S., Sassano,A., Deb,D.K., Verma,A., Majchrzak,B., Rahman,A., Malik,A.B., Fish,E.N. and Plataniias,L.C. (2002) *Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727.* *J. Biol. Chem.*, 277, 14408-14416.

Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannenhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Di,F., V, Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nuskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferreira,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N. and Nodell,M. (2001) *The sequence of the human genome.* *Science*, 291, 1304-1351.

Wadleigh,D.J., Reddy,S.T., Kopp,E., Ghosh,S. and Herschman,H.R. (2000) *Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7*

macrophages. J. Biol. Chem., 275, 6259-6266.

Wagner, K.U., Krempler, A., Triplett, A.A., Qi, Y., George, N.M., Zhu, J. and Rui, H. (2004) *Impaired alveologenesis and maintenance of secretory mammary epithelial cells in Jak2 conditional knockout mice*. Mol. Cell Biol., 24, 5510-5520.

Wang, Y., Malabarba, M.G., Nagy, Z.S. and Kirken, R.A. (2004) *Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function*. J. Biol. Chem., 279, 25196-25203.

Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby, A., Kolbe, D.L., Korf, I., Kucherlapati, R.S., Kulbokas, E.J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J.P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J.P., Von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C. and Lander, E.S. (2002) *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 420, 520-562.

Wehner R and Gehring W (1995) Zoologie. Thieme.

Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005) *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. Physiol Rev., 85, 1159-1204.

WHEELOCK,E.F. and SIBLEY,W.A. (1965) *CIRCULATING VIRUS, INTERFERON AND ANTIBODY AFTER VACCINATION WITH THE 17-D STRAIN OF YELLOW-FEVER VIRUS.* N. Engl. J. Med., 273, 194-198.

Widney,D.P., Xia,Y.R., Lulis,A.J. and Smith,J.B. (2000) *The murine chemokine CXCL11 (IFN-inducible T cell alpha chemoattractant) is an IFN-gamma- and lipopolysaccharide-inducible glucocorticoid-attenuated response gene expressed in lung and other tissues during endotoxemia.* J. Immunol., 164, 6322-6331.

Wilks,A.F., Harpur,A.G., Kurban,R.R., Ralph,S.J., Zurcher,G. and Ziemiecki,A. (1991) *Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase.* Mol. Cell Biol., 11, 2057-2065.

Wojchowski,D.M., Gregory,R.C., Miller,C.P., Pandit,A.K. and Pircher,T.J. (1999) *Signal transduction in the erythropoietin receptor system.* Exp. Cell Res., 253, 143-156.

Wu,H., Liu,X., Jaenisch,R. and Lodish,H.F. (1995) *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor.* Cell, 83, 59-67.

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

Yokota,S., Yokosawa,N., Kubota,T., Suzutani,T., Yoshida,I., Miura,S., Jimbow,K. and Fujii,N. (2001) *Herpes simplex virus type 1 suppresses the interferon signaling pathway by inhibiting phosphorylation of STATs and janus kinases during an early infection stage.* Virology, 286, 119-124.

Yoshimura,M. and Cooper,D.M. (1993) *Type-specific stimulation of adenylyl cyclase by protein kinase C.* J. Biol. Chem., 268, 4604-4607.

Zhong,W.W., Burke,P.A., Drotar,M.E., Chavali,S.R. and Forse,R.A. (1995) *Effects of prostaglandin E2, cholera toxin and 8-bromo-cyclic AMP on lipopolysaccharide-induced gene expression of cytokines in human macrophages.* Immunology, 84, 446-452.

Zhou,Y.J., Chen,M., Cusack,N.A., Kimmel,L.H., Magnuson,K.S., Boyd,J.G., Lin,W., Roberts,J.L., Lengi,A., Buckley,R.H., Geahlen,R.L., Candotti,F., Gadina,M., Changelian,P.S. and O'Shea,J.J. (2001) *Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases.* Mol. Cell, 8, 959-969.

Zhou,Y.J., Hanson,E.P., Chen,Y.Q., Magnuson,K., Chen,M., Swann,P.G., Wange,R.L., Changelian,P.S. and O'Shea,J.J. (1997) *Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 94, 13850-13855.

Zimmermann,B., Chiorini,J.A., Ma,Y., Kotin,R.M. and Herberg,F.W. (1999) *PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I.* J. Biol. Chem., 274, 5370-5378.

7 Danksagung

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

Für die freundliche Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gierl.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Sandra Beer für das Korrekturlesen des Manuskripts und für die fachliche Unterstützung, die vielen Ratschläge und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte.

Dankeschön auch an Stefanie Kutsch für viele exzellente fachliche Diskussionen, die konstruktive Zusammenarbeit im Labor und die freundschaftliche Unterstützung auch beim Gegenlesen des Manuskripts.

Danke für die Unterstützung bei der Arbeit mit Vaccinia Virus an Mirko Trilling

Vielen Dank an Karin Berr für die vielen interessanten und äußerst amüsanten bayrischen Gespräche und natürlich auch fürs Korrekturlesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Daniel Degrandi für die gute Zusammenarbeit im Labor und die spaßige Zeit in der WG.

Für die große Unterstützung mit „meinen“ Mäusen und viel Spaß im Schreibraum bedanke ich mich aufs herzlichste bei Nicole Krafzik.

Zusätzlich bedanke ich mich noch bei Alexandra Kresse und Carolin Konermann für die freundschaftliche Beziehung im Labor.

Ein ganz besonderer Danke geht an Julia Brandt für ihre Freundschaft, Unterstützung und ihr Vertrauen in mich, das mich auch in schlechten Zeiten zuversichtlich bleiben ließ.

Mein größter Danke geht an meine Familie für die großartige Hilfe und Unterstützung in allen Lebenssituationen, die Geborgenheit und unendliche Geduld.