

7 Zusammenfassung

Monozyten spielen eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr, sie fungieren als professionelle antigenpräsentierende Zellen und induzieren die adaptive Immunantwort. Das Zytokin Interferon-gamma (IFN γ) stellt den wichtigsten Aktivator von Makrophagen und einen bedeutenden Mediator in der Pathophysiologie zellulärer Entzündungsreaktionen dar.

Um die Mechanismen zu verstehen, die auf molekularer Ebene der Aktivierung von Makrophagen zugrunde liegen und diese vermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit eine der komplettesten Untersuchungen einer für IFN γ -induzierte Gene angereicherten cDNA Genbank aus humanen aktivierten Makrophagen-Vorläuferzellen durchgeführt. Aus der Fülle isolierter cDNA-Klone wurde eine ausgewählte Anzahl weitergehend analysiert.

Insgesamt 23.700 cDNA-Klone einer unidirektionalen subtraktiven cDNA Genbank wurden mittels differentieller Hybridisierung untersucht. Der experimentell ermittelte Anreicherungsfaktor zeigte, daß diese Anzahl untersuchter Klone mehr als 1×10^6 Klone der ursprünglichen cDNA Bank entspricht und damit als repräsentativ anzusehen ist. 1728 cDNA-Klone wurden isoliert. Davon wurden 469 cDNA-Klone in der vorliegenden Arbeit vollständig über PCR, Sequenzanalyse und Datenbankabgleich analysiert. Hierbei wurde ein Großteil der in der Literatur beschriebenen IFN γ -regulierten Gene aufgefunden. Ebenso wurden 34 humane cDNAs, die bisher nicht im Zusammenhang mit einer Regulation durch Interferon beschrieben wurden, und 78 cDNAs noch unbekannter Funktion isoliert.

Das Expressionsmuster ausgewählter cDNAs wurde über eine Northern-Blot-Analyse untersucht:

- Die Tryptophan 2,3-Dioxygenase stellt ein Schlüsselenzym für die physiologische Regulation des Tryptophan-Stoffwechsels dar, eine Expression der mRNA war nicht nur wie bisher beschrieben in Leber- und Gehirnzellen, sondern auch in TPA-induzierten prämonozytischen Zellen zu beobachten.
- Syntaxin10 ist ein Rezeptor-Protein auf der Zielmembran des Golgi-Apparates, welches den Andock- und Fusionsvorgang der Vesikel festlegt. Es fand sich eine konstitutive Expression in Makrophagen-Vorläuferzelllinien.
- Die 43 kDa membranassoziierte 5-Phosphatase ist ein Enzym der Phosphoinosidkaskade, die der Signalübertragung vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren dient; eine Superinduktion der mRNA war nach Behandlung mit TPA, IFN γ und Cycloheximid zu beobachten.
- Die GEM-GTPase ist eine monomere GTPase an der Zytosolseite der Plasmamembran, es fand sich ebenfalls eine Superinduktion durch TPA, IFN γ und Cycloheximid.

- cDNA-Klon 2687 stellt ein zweites humanes Coronin-ähnliches Protein mit einer Homologie von 84% über den sequenzierten Nukleinsäurebereich zu p57 dar und wird in Makrophagen-Vorläuferzellen exprimiert. Möglicherweise nimmt das humane Homolog ähnlich dem Coronin an der Signübertragung der Chemotaxis teil.
- cDNA-Klon 904-5 kodiert für ein kleines Protein (246 Aminosäuren) mit potentieller Sezernierungssequenz, die Expression in Makrophagen-Vorläuferzellen wird sowohl durch TPA, IFN γ als auch Dibutyryl-cAMP induziert. Im humanen Gewebe ist die Bildung des Transkriptes vor allem in Lunge, Plazenta, Herz und Gehirn nachweisbar.

Summary

Molecular analysis of a subtractive cDNA library from activated macrophages

Christina Schoemperlen

Macrophages play key roles in the immunological resistance. They can present processed antigen allowing the development of an adaptive immune response. The cytokine Interferon-gamma (IFN γ) is the main activator of macrophages and an important mediator in pathophysiology of cellular inflammation.

In order to understand the molecular basis of the underlying mechanisms, in this study one of the most complex IFN γ -induced cDNA library from human activated premonocytic cells was analyzed, and a selected number of many isolated interesting cDNA clones were characterized.

A total of 23.700 cDNA clones of the subtractive cDNA library were screened by differential hybridization. The enrichment factor determined experimentally showed that this number of clones corresponds to more than 1×10^6 clones of the original library. Therefore the library used can be considered to be representative.

1728 cDNA clones were isolated and out of these 468 cDNA clones were amplified and characterized by nucleotide sequence analyses and database search. It was found a large proportion of the IFN γ -regulated genes described in literature as well as 34 cDNAs not previously described for humans as being regulated by interferon and 78 cDNAs with unknown function.

In addition, mRNA expression of several cDNAs was analyzed in Northern blots.

- Tryptophan 2,3 dioxygenase is a key enzyme in the physiological regulation of the tryptophan metabolism. It could be shown that the mRNA is not only expressed in liver and brain cells, as is commonly described, but also in TPA-induced premonocytic cells.
- Syntaxin 10 is a receptor protein, localized on the target membrane of the Golgi system, which determines the specificity of the docking and fusion of vesicles. It was constitutively expressed in premonocytic cells.
- 43 kDa membrane-associated 5-phosphatase is an enzyme of the phosphoinositide cascade, performing in the signaling pathway of many G protein receptors. Northern blot analysis of TPA, IFN γ and cycloheximid treated cells revealed a super-induced mRNA.
- GEM GTPase is a monomer GTPase on the cytosolic side of the plasma membrane, which was also super-induced by TPA, IFN γ and cycloheximid.
- cDNA clone 2687 is a second human coronin-like protein with a nucleic acid sequence homology of 84% to p57 and was expressed in premonocytic cells. It is assumed that the coronin-like protein, like coronin itself, plays a part in the signal transduction pathways of chemotaxis.
- cDNA clone 904-5 codes for a small protein (246 amino acids) with a potential secretory signal sequence and it was induced by TPA, IFN γ and dibutyryl-cAMP in premonocytic cells. It could be demonstrated that the expression of the mRNA in human tissue predominantly takes place in lung, placenta, heart and brain.