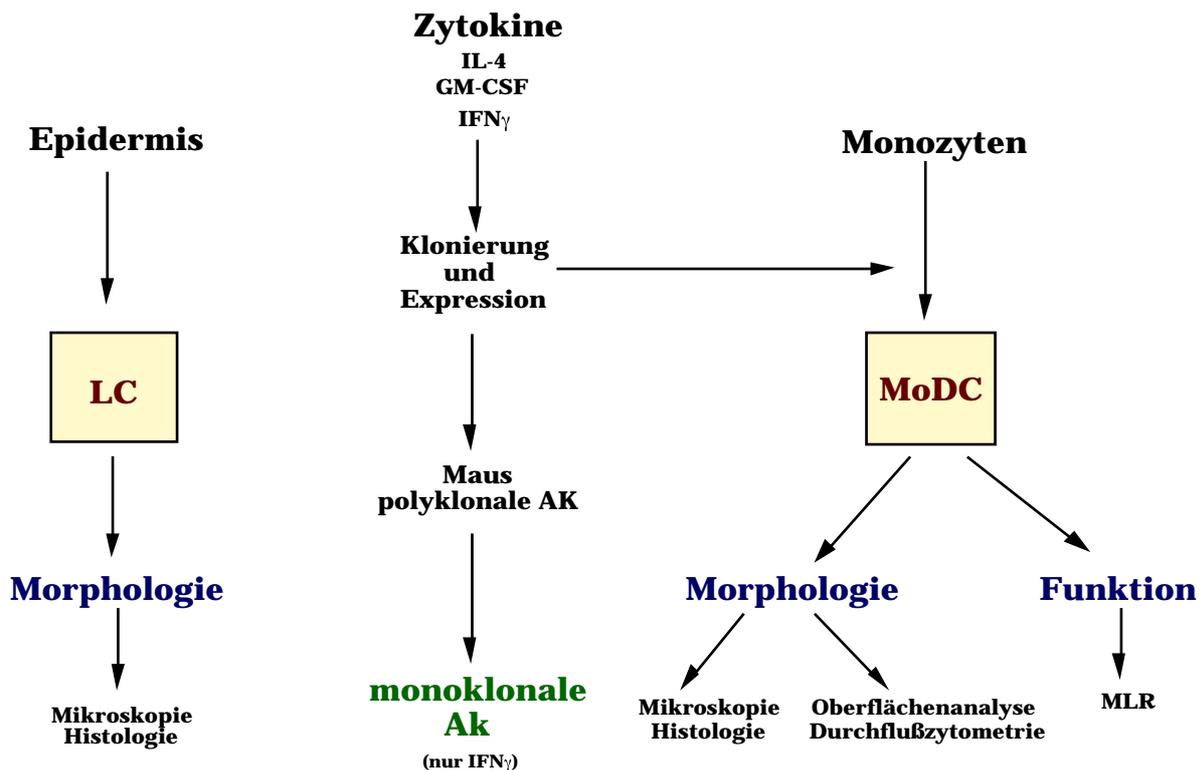


5. Diskussion

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. Um DC in großen Mengen aus Monozyten zu erhalten (MoDC), sind pferde-spezifische Zytokine notwendig. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten daher im ersten Teil equine Zytokine kloniert und exprimiert werden. Die Zytokine GM-CSF, IL-4 und IFN sind für die Differenzierung monozytärer Zellen essentiell (Peters et al., 1996). IFN sollte nicht nur für die Monozytenaktivierung und Stimulierung der MoDC verwendet werden, sondern auch für die Herstellung mAk, um eine Th1 Immunantwort nachweisen zu können. Parallel sollten DC aus der Haut bzw. dem Lymphknoten isoliert werden. Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der Promotionsarbeit gibt Schema 2.



Schema 2: Arbeitsablauf der Dissertation. Die Zytokine GM-CSF, IL-4 und IFN wurden kloniert und exprimiert. IFN wurde gleichzeitig zur monoklonalen Antikörperherstellung bei Mäusen eingesetzt. LC wurden aus der Haut isoliert, MoDC aus Monozyten differenziert. Die Zellen wurden histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Ferner wurde bei den MoDC eine Oberflächenanalyse im Durchflußzytometer (FACS) durchgeführt und funktionell ihre Aktivität in der gemischten Leukozyten Reaktion (MLR) getestet .

5.1 Klonierung und Sequenzierung der equinen Zytokine

Eq. IFN ließ sich, wie in anderen Veröffentlichungen beschrieben, aus stimulierten PBMC klonieren (Himmler et al., 1986; Grünig et al., 1994; Himmler & Grünig, 1997). Die erhaltene DNA-Sequenz stimmte bis auf eine Punktmutation (Basenaustausch) mit der von Himmler und Grünig (GenBank: U04050) und Nicolson und Mitarbeitern (GenBank: D28520) veröffentlichten Sequenz überein. In der Aminosäuresequenz führte diese Punktmutation zu einem Austausch der Aminosäure 82 von Asparagin zu Serin. Vergleiche der Aminosäuren anderer Spezies (z.B. Mensch, Rind und Hund) zeigten, daß alle 166 AS enthalten. Die humane Signalsequenz besteht aus den ersten 23 AS (Farrar & Schreiber, 1993). Die equine Signalsequenz ist nicht bekannt. Entsprechend der Charakteristika von Signalpeptiden wurden von dem Computerprogramm MacVector (GCG) für die equine Sequenz mögliche Schnittstellen für die Signalpeptidase ermittelt (14 AS, 17 AS, 18 AS oder 19 AS). Da die biologische Aktivität im bakteriellen System nicht im Vordergrund stand, wurde für die Klonierung für den pBAD/gIII Vektor eine mögliche Signalpeptidase (18 AS) gewählt.

Ferner unterscheiden sich die Positionen der N-Glykosylierungsstellen zwischen humanem und equinem IFN. Für die equine Sequenz wurden 2 N-Glykosylierungsstellen an Position 39 und 106 vorhergesagt, für das Humane an Position 48 und 120 (Kelker et al., 1983).

Bei der Klonierung von eq. GM-CSF wurde anfangs ein falsches Amplifikat der richtigen Größe hergestellt. Dieses war sehr ungewöhnlich, da in der PCR entweder kein Amplifikat oder eines einer anderen Größe vermutet wird. Erst nach Sequenzierung dieses Amplifikates konnte der Fehler erkannt werden. Unter Verwendung abgeleiteter, längerer Primer, aus dem GM-CSF Leserahmen anderer Spezies, konnte schließlich eine zu GM-CSF anderer Spezies ähnliche DNA amplifiziert werden. Dieses Ergebnis ist mittlerweile von anderen Gruppen bestätigt worden (Vecchione et al., 2001; Bublot et al., GenBank: AX057390). Diese Sequenzen wurden analog aus Consensusprimern anderer Spezies von ATG bis TGA amplifiziert.

In weiteren Experimenten konnte das 3' Ende der cDNA von eq. GM-CSF bis PolyA mittels RACE-Verfahren von mir charakterisiert werden. Dieses

Verfahren ist in der Literatur beschrieben (Gubler & Hoffman, 1983; Okayama & Berg, 1992; Liu & Gorovsky, 1993; Baier et al., 1997). Erst nach Optimierung der Methode durch Einbringung eines Ankers in den RT-Primer, die Auswahl spezieller Primer mit hohen annealing Temperaturen und Modifizierung der Protokolle gelang es, das 3'Ende vollständig zu klonieren und sequenzieren. Dabei zeigte sich im Bereich des ursprünglich verwendeten 3'Primer eine Deletion. Der erhaltene codierende Bereich weicht daher von dem aller anderer Spezies ab. Das eigentliche Stopkodon liegt bei Position 459. Dadurch wurde die entsprechende Proteinsequenz um 8 AS verlängert. Die Identifizierung des 5'Endes war für den offenen Leserahmen (ORF) nicht von Bedeutung, da dort auftretende Deletionen oder Insertionen mit einer Verschiebung des Leserahmens zu einer Zerstörung des equinen Zytokins führen würden. Dies ist für zukünftige Ansätze von Interesse, um evtl. weitere Regulationssequenzen demonstrieren zu können.

Die Signalsequenz, die den Transport in das endoplasmatische Retikulum ermöglicht, ist nicht konserviert. Die humane Signalsequenz besteht aus den ersten 17 AS (Demetri & Griffin, 1991). Die von dem Computerprogramm MacVector (GCG) zur Auswahl gestellten Signalpeptide für die equine Sequenz bestanden aus 15 bzw. 35 AS. Nur durch Proteinsequenzierung kann (wie auch bei eq. IFN) erst in nachfolgenden Experimenten die eigentliche Signalsequenz von eq. GM-CSF ermittelt werden. Die N-Glykosylierungsstellen zwischen Mensch und Pferd stimmten überein.

Die Pferdesequenz besitzt ähnliche Regulationssequenzen im Bereich des C-Terminus, wie sie für die humane Sequenz beschrieben wurden (Shaw & Kamen, 1986). GM-CSF besitzt am untranslatierten 3'Terminus eine ATTTA Sequenz, die für eine Instabilität der mRNA verantwortlich ist (Shaw & Kamen, 1986). Solche ATTTA-Motive (wie sie auch bei IL-1, TNF vorkommen) könnten mit der Koordination der Zytokinexpression zusammenhängen (Bagby et al., 1988).

Bei IL-4 ergaben sich beim Vergleich der veröffentlichten Sequenzen Abweichungen. So fehlen der Sequenz von Vandergriff und Mitarbeitern (GenBank: L06010) 2 Tripletts verglichen mit der von Schrenzel und Mitarbeitern (GenBank: AF035404). Meine erhaltene Sequenz war um 6 bzw. 4 Tripletts länger als die beiden untersuchten Sequenzen. Die resultierende neue

eq.IL-4 Sequenz (Mauel & Steinbach, 2000; GenBank: AF305617) und das abgeleitete Protein waren an diesen Positionen (AS 20, AS 40, AS 61, AS 80, AS 100 und AS 120) mit anderen Spezies homolog (Abb. 15). Als weitere Bestätigung diente die Klonierung von IL-4 aus der RNA transfizierter Zellen (CHO), die F. Steinbach von D. Horohov, Baton Rouge, zur Verfügung gestellt wurden. Diese Sequenz enthielt ebenfalls 6 Tripletts mehr, als die von gleichem zuvor veröffentlichte (Vandergriff et al., 1994). D. Horohov wurde in der Zwischenzeit von meinen divergierenden Ergebnissen informiert und übersandte eine neue Sequenz, die immer noch eine Triplettdelation (AS 40) enthielt. Eine Liste bereits klonierter pferde-spezifischer Zytokine zeigt Tabelle 6.

Um einen Polymorphismus bedingt durch Rasse oder Geschlecht ausschließen zu können, wurde die Klonierung an verschiedenen Pferderassen und Geschlechtern wiederholt. Die resultierenden Sequenzen zeigten eine Reihe von Punktmutationen, aber keine Deletionen. Die verbleibende Variabilität ließ zunächst den Schluß zu, daß ein einzelner Nukleotid-Polymorphismus (SNP) beim Pferd im codierenden Bereich von IL-4 vorkommen könnte. In der Folge wurde die Klonierung, ausgehend von der RNA, an allen 5 Pferden wiederholt. Nun zeigte sich, daß andere Punktmutationen auftraten, womit sehr wahrscheinlich ist, daß diese auf Fehler der Reversen Transkription zurückzuführen waren. Zur Überprüfung wurden Kontrollexperimente mit unterschiedlichen Reversen Transkriptasen (MMLV, MMLV/H-, Omniscript und AMV/H-) und zwei Kontroll-RNA (Borna Disease Virus p24 und p40, Briese et al., 1992) durchgeführt, diese zeigten jedoch bei 5711 Basen keine Mutation. Lediglich Menge und Qualität, der aus der PCR resultierenden Banden waren unterschiedlich (nicht dargestellt).

Im Proteinvergleich der einzelnen Spezies zeigte sich, daß die humane Sequenz zusätzlich 15 AS im mittleren Bereich besitzt. Rind und Pferd besitzen an unterschiedlichen Stellen 2 AS mehr (Abb. 15). Trotz dieser Unterschiede ist die Signalsequenz von Mensch und Pferd konserviert (24 AS), beide Sequenzen besitzen 2 N-Glykosylierungsstellen, deren Positionen nicht konserviert sind (human 62 AS und 129 AS; equin 40 AS und 105 AS) (Perlman & Halvorson, 1983; von Heijne, 1983; Yokota et al., 1988).

Tab.6: Equine Zytokine

| Zytokin | GenBank-Nummer |
|----------------|-----------------------|
| IL-1 | D42146 |
| IL-1 | U92481 |
| IL-2 | X69393 |
| IL-4 | AF305617 |
| IL-5 | U91947 |
| IL-6 | U64794 |
| IL-8 | AF062377 |
| IL-10 | U38200 |
| IL-11 | unveröffentlicht |
| IL-12p35 | Y11130 |
| IL-12p40 | Y 11129 |
| IL-18 | Y11131 |
| GM-CSF | AY040203 |
| IFN- 1 | M14540 |
| IFN- | M14546 |
| IFN- | U04050 |
| TNF | M64087 |
| TGF- 1 | X99438 |
| Eotaxin | AJ251188 |
| MCP-1 | AJ251189 |

Die aufgeführten eq.Zytokine sind zum Teil mehrfach in die GenBank eingetragen. Die Tabelle gibt die GenBank-Nummern der Erstveröffentlichung oder eine Sequenz wie sie von mir, bzw. in der *AG Pferde Immunologie* verifiziert werden konnte, an.

5.2 Expression rekombinanter equiner Zytokine

E.coli wird häufig als bakterielles Expressionssystem verwendet, da die Techniken etablierte sind. Der von mir genutzte Vektor pBAD/gIII (Invitrogen) wurde in einer anderen Promotionsarbeit bereits erfolgreich für die Überexpression von IFN γ und IFN β eingesetzt (Beier, 1999). Dieser Vektor besitzt am N-Terminus die Signalsequenz gIII. Diese soll den Transport in den periplasmatischen Raum ermöglichen, um eine korrekte Faltung sekretorischer Proteine zu erreichen. Die eukaryotische zytokin-spezifische Signalsequenz wurde bei der Amplifizierung entfernt. Für GM-CSF und IFN γ wurden mögliche Signalsequenzen ausgewählt. Dies schien trotz eines evtl. Einflusses auf die Bioaktivität erlaubt, weil für die Herstellung mAk gegen IFN γ und polyklonaler anti-Seren gegen GM-CSF und IL-4 Bioaktivität und Glykosylierung vernachlässigt werden können. Polyklonale anti-Seren banden an den Überständen der von eukaryotischen Zellen exprimierten Proteine. Bei der Herstellung mAk gegen eq. IFN γ entstanden auch solche die gegen gIII bzw. die myc/His Epitope gerichtet waren, die eukaryotisch hergestellte rek. Proteine (ohne zusätzliche Epitope) im Westernblot nicht erkannten (Abb.30). Die hohe Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von IFN γ führt zu einer Kreuzreaktion mit den humanen Antikörpern (Steinbach et al., 2002). Rekombinantes hu. IFN γ zeigte jedoch keine biologische Kreuzreaktivität auf Monozyten. Ursache dafür könnte das Glykosylierungsmuster- oder der eq. IFN γ -Rezeptor sein.

Für GM-CSF und IFN γ konnte eine starke Überexpression des rek. Proteins gezeigt werden. Das rek. Protein von IL-4 jedoch ließ sich erst nach Umklonierung in einen anderen *E.coli* Stamm (LMG 194) allerdings nur schwach darstellen. Möglicherweise unterscheiden sich die t-RNA Muster (anti-Kodons) der beiden *E.coli* Stämme. Eventuell könnte auch ein vermehrter Abbau des Proteins stattgefunden haben. Außerdem könnte eine erhöhte Toxizität des Proteins für das Bakterium angenommen werden. Weitergehende Untersuchungen können diese Fragen klären.

Ein anderes Problem des bakteriellen Systems stellte die Bildung von Einschlußkörpern (inclusion bodies) dar. Sie entstehen bei einer nicht korrekten Faltung des Proteins. Die inclusion bodies konnten gereinigt und die rek. Proteine im SDS-Gel dargestellt werden. Die Banden für IFN γ und IL-4 liefen

gering höher, als es für die mit einem Computerprogramm errechneten Molmasse von 21,87 kD IFN und 17,65 kD IL-4 zu erwarten waren. Die in den Einschlußkörpern (inclusion bodies) nicht abgespaltene gIII-Sequenz und die Epitope am C-Terminus wurden bei der Berechnung berücksichtigt. Die Differenz im Laufverhalten von eq.GM-CSF im SDS-Gel kann durch eine nicht ausreichende Denaturierung des Proteins verursacht worden sein. Von Bedeutung könnte auch der Prolingehalt sein. Viel Prolin in einer Aminosäuresequenz führt zu scheinbar höheren Molmassen im SDS-Gel (See & Jackowski, 1988). Weiterhin kann bereits 1 AS-Austausch zu einer Mobilitätsveränderung des Proteins im SDS-Gel von $\pm 10\%$ führen (Seeburg et al., 1984). Eine genauere Analyse der Molmasse wurde zunächst nicht vorgenommen, da alle Plasmide vor der Expression sequenziert wurden.

Als Alternative zum bakteriellen Expressionssystem wurde mir durch die Kooperation mit Prof. Fischer von der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen angeboten, die Klonierung der Zytokine in ein Hefe-Expressionssystem durchzuführen. Die Umklonierung der Zytokine in den Hefe-Vektor pPIC9K/His6 konnte schnell und unverzüglich durchgeführt werden, dagegen bereitete die Identifizierung eines zufriedenstellend exprimierenden Klons Schwierigkeiten. Die Detektion der Expression erfolgte im Kolonie-Blot mit Tetra-His-Antikörpern über den C-Terminalen HisTag. Mit diesem ließ sich eine leichte Überexpression der Zytokine nachweisen. Um eine weitere sukzessive Reduzierung positiver Klone zu erreichen, wurde über Geneticin (g418) Resistenz selektioniert. Die Selektion mit g418 diente der Identifizierung möglicher „multi-copy“-Klone, d.h. Klone, die mehrere Kopien der Expressionskassette ins Genom integriert hatten. Dabei korreliert die Anzahl der integrierten Expressionskassetten mit dem Resistenzgrad gegen g418, so daß „multi-copy“- Klone eine höhere Antibiotikum-Toleranz zeigen als Klone, die nur eine Kopie enthalten.

Scorer und Mitarbeiter (1994) beschrieben, daß die Transformationseffizienz von der Wahl der zur Linearisierung verwendeten Restriktionsenzyme abhängig ist. Er beobachtete, daß die mit *SacI* geschnittenen Vektoren eine durchschnittlich 20-fach höhere Transformationsrate aufwiesen als die mit *BglII*. Dies könnte einer der Gründe sein, die geringe Anzahl positiver Klone zu erklären. Ferner wurde beschrieben, daß die Kolonie-Blot-Analyse nicht immer zur Identifizierung

von rek. Hefeklonen herangezogen werden kann (Raven, 1999). Zur endgültigen Bestätigung der Expression rek. Proteine war die Anzucht ausgewählter Klone notwendig. Jeweils zwei positiv getestete Klone jedes Zytokins wurden in kleinen Mengen fermentiert. Anders als erwartet, lag das Fremdprotein intrazellulär vor (nicht dargestellt). Ursache dafür könnte das Vorhandensein einer doppelten Signalsequenz (hefe-spezifische und säugetier-spezifische Signalsequenz) sein. Die Funktion des Hefe-Signalpeptides könnte durch das zweite säugetier-spezifische Signal beeinträchtigt worden sein. Ein solcher Einfluß war für die Bioaktivität, nicht jedoch für die Expression, als möglich erachtet worden. Hier hätte eine Umklonierung erfolgen können. Die im Westernblot der equinen Zytokine ersichtlichen Molmasse waren höher als im bakteriellen System, was auf die zusätzliche Signalsequenz (-Region) und Glykosylierung zurückzuführen sein dürfte.

Bei parallelen Projekten mit anderen Proteinen, die an der RWTH Aachen durchgeführt wurden (ohne doppelte Signalsequenz), konnten ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Der ursprüngliche Ansatz war, dieses System zu nehmen, da es als schnell und zuverlässig galt und eine Glykosylierung möglich war. Da beide Punkte sich (nicht nur in meiner Promotionsarbeit) nicht bestätigten, wurde die Versuchsanordnung unter Berücksichtigung nur einer hefe-spezifischen Signalsequenz nicht wiederholt.

Als Alternative zu Hefen wurde mir an der RWTH Aachen die Möglichkeit geboten, das Pflanzenexpressionssystem zu testen. Vorteile dieses Systems waren, daß keine pflanzen-spezifische Signalsequenz benötigt wurde und die Glykosylierung der Proteine, denen der tierischen Proteine näher kommt als bei Hefen (Sturm et al., 1987; Kimura et al., 1988). Zur Erprobung dieses Systems wurde eine transiente Expression durchgeführt. Da der Pflanzenvektor pPAMks keine geeignete Klonierungsschnittstelle besaß, mußte erst eine Zwischenklonierung erfolgen. Dennoch konnte die gesamte Klonierung in wenigen Tagen durchgeführt werden. Um den Transport des Proteins zum eR während der Translation zu erreichen, wurde N-terminal das säuger-spezifische Signalpeptid gelassen. Unmittelbar vor dem Stopkodon wurde die KDEL-Aminosäuresequenz eingefügt (Munro & Pelham, 1987). Sie stellt sicher, daß das Protein nach dem Transport im eR zurückgehalten wird. Des weiteren wurde ein HisTag am C-Terminus angefügt. Die Transformation der Pflanzenblätter wurde

über die „Genfahre“ *A.tumefaciens* durchgeführt. Dieses Verfahren ist kostengünstig und hat sich bei vielen Experimenten bewährt (Hill et al., 1991). Das Agrobakterium heftet sich an die Pflanzenzelle und wird durch phenolische Substanzen, die von der verletzten Pflanzenzelle abgegeben werden oder künstlich durch Acetosyringon zum Gentransfer veranlaßt (Stachel et al., 1986; 1987). Nach Bildung eines DNA-Protein-Komplexes verläßt die DNA durch spezielle Poren das Bakterium und schleust sich in die Pflanzenzellen ein (Howard et al., 1992). Die andere Alternative zur Einbringung von Expressionskassetten wäre die Partikelbeschuß-Technik (Gene gun). Bei dieser Technik werden Gold- oder Wolframpartikel mit Nukleinsäuren überzogen und in intakte Pflanzenzellen geschossen. Diese Technik ist sehr kostenintensiv und eignet sich aus diesem Grund nicht für einen transienten Ansatz (Klein et al., 1992). Außerdem ist es von speziellen Apparaturen abhängig, die nicht zur Verfügung standen.

Bei der von mir durchgeführten transienten Transformation von Tabakblättern, die sich nur zur Optimierung oder zum Test eines Expressionsvektors eignet, werden nicht-integrierte DNA-Kopien, die auch funktionell aktiv sind, nach kurzer Zeit (binnen 4 d) von den pflanzeigenen DNAsen abgebaut (Spiegel, 1998). Die Analyse der genmanipulierten Blätter wurde nach 3-tägiger Inkubation, auf den Erfolg der Transformation im Westernblot überprüft. Bedauerlicherweise konnte nur eine geringe Expression gezeigt werden. Entsprechend war dieses Expressionssystem für die Gewinnung eq.Zytokine im gewünschten Maßstab ungeeignet. Von einer stabilen Transformation wurde abgesehen, da die Herstellung solcher transgenen Pflanzen, von der Transformation ausgehend bis zur Analyse mehrere Monate in Anspruch nimmt. Das System erscheint jedoch prinzipiell geeignet.

Eine weitere etablierte Alternative zur Herstellung bioaktiver rek. Proteine stellte die Expression in Säugetierzellen dar. Bei Glykoproteinen sind tierische Zellen die beste Möglichkeit aktive Proteine herzustellen. Als nachteilig in diesem System gilt die geringe Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselrate der Tierzellen.

Die entsprechenden cDNAs wurden zuerst in den Expressionsvektor pcDNA6/V5-His (Invitrogen) umklontiert. Dieser Vektor wurde gewählt, um eine Aufreinigung des Proteins über den im Vektor enthaltenen HisTag zu ermöglichen.

Problematisch war bei diesem System bereits die Wahl der geeigneten Restriktionsenzyme für IFN . Nach erfolgreicher Klonierung ließ sich das Plasmid nicht in P3X-Zellen (P3X 63Ag8.653) transfizieren. Eq.IL-4 konnte erfolgreich transfiziert werden, doch zeigte es nur eine sehr geringe biologische Aktivität. Mit einem analogen System (pcDNA3.1(-)/Myc-His, Invitrogen) wurde in der Zwischenzeit eq.IL-4 kloniert. Es konnte allerdings nur eine transiente Expression erreicht werden (Dohmann et al., 2000). Da im Zentrum des Interesses die Herstellung bioaktiver rek. Proteine stand, wurde ein alternatives System verwendet, welches sich schon in der Vergangenheit mehrfach bewährt hat (Karasuyama & Melchers, 1988; Graf et al., 1992). Der Vektor BCMGSneo (H. Karasuyama, Tokio) basiert auf dem bovinen Papillomavirus und wird nicht in das Genom der Zelle integriert, sondern kann sich selbständig episomal replizieren (Karasuyama et al., 1990). Die eq.Zytokine wurden umklont und P3X-Zellen mit diesen Plasmiden transfiziert. Bei IL-4 traten zunächst Probleme bei der Klonierung auf, da es sich nicht in den Vektor ligieren ließ. Das Problem konnte gelöst werden, indem der Vektor direkt nach dem Restriktionsenzymverdau mit IL-4 ligiert wurde.

Die Konzentration rek. Proteins für GM-CSF und IL-4 im Überstand reichte allerdings nicht aus, um als Bande im SDS-Gel dargestellt zu werden. Da in diesem System darauf verzichtet wurde einen HisTag zu integrieren (um reines, bioaktives Protein sicher zu gewähren) konnte es nicht über eine HisTag Säule aufgereinigt werden. Auch der Versuch den Überstand zu konzentrieren konnte aufgrund des hohen Serumanteiles (BSA) im Medium nicht weiter verfolgt werden. Als weitere Alternative wurde begonnen, die transfizierten Zellen unter serumfreien Bedingungen anzuzüchten, eine langwierige Methode mit schlechtem Zellwachstum. Diese Untersuchungen sind noch nicht beendet. Für IFN konnten Banden im Westernblot mit polyklonalem Serum nachgewiesen werden.

Assays zum Nachweis der Bioaktivität im humanen und murinen System beruhen in der Regel auf Zell-Linien, die von den zu testenden Zytokinen abhängig sind. Solche Zell-Linien fehlen im equinen System. Für IL-4 ist ein auf der Stimulierung voraktivierter PBMC basierender Bioassay beschrieben (Dohmann et al., 2000). Für IFN kann die Hochregulierung von MHC II Molekülen auf eq.Monozyten als Bioassay verwendet werden. Beide Bioassays

sind aber nicht standardisiert und es fehlen Referenzproteine. Beide Assays sind außerdem vom gewählten System (z.B. Art und Länge der Voraktivierung der PBMC) abhängig. Die daraus resultierenden Angaben stellen sich als nur eine erste Näherung dar, können nur in Laboreinheiten angegeben werden und sind nicht zwischen den Spezies vergleichbar. Eine antivirale Wirkung des bakteriell exprimierten rek. IFN wurde zunächst erfolglos am Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) auf ED-Zellen getestet. Auch in einem VSV-Inhibitionstest mit eq.PBMC, wie für GM-CSF beschrieben, ließ sich nur geringe antivirale Aktivität darstellen (Steinbach et al., 2002).

Die Bioaktivität von eq.GM-CSF (eukariotisches Expressionssystem) zeigte sich an frisch isolierten Pferdemonozyten, die abhängig von der Konzentration und anderen Zytokinen zu MoDC oder Makrophagen differenziert wurden. Ferner wurde für eq.GM-CSF unter Verwendung eines VSV-Inhibitionstest mit eq.PBMC, wie er bei Marquardt und Mitarbeitern (1992) beschrieben war, eine signifikante antivirale Wirkung gezeigt (nicht dargestellt). Durch die Kreuzreaktivität von humanem GM-CSF im eq.System (vergleiche 4.1.2 und 5.4) ergab sich die Möglichkeit einen humanen Bioassay (TF1 Zell-Linie) einzusetzen, um die Aktivität des eq.GM-CSF in erster Näherung zu bestimmen (nicht dargestellt). Da der N-Terminus, bzw. in der korrigierten Version auch der C-Terminus des eq.Proteins im Vergleich zur humanen Variante verändert sind, muß von einer veränderten Affinität an den heterologen Rezeptoren ausgegangen werden.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde nach der Feststellung der Bioaktivität auf eine Bestimmung der Laboreinheiten verzichtet, da die exprimierten Proteine nicht aufgereinigt vorliegen und dies für die Etablierung von Standards (mit Korrelation zu einer Mengenangabe) notwendig ist.

5.3 Langerhans Zellen aus der Haut des Pferdes

Langerhans Zellen (LC) des Pferdes wurden in meiner Promotionsarbeit erstmals aus der Epidermis isoliert. Die Epidermis (im Bereich der von mir untersuchten Partien) bestand nur aus vier bis fünf Zellebenen. Hierbei zeigte sich, daß die für Mäuse und Menschen beschriebene Inkubationszeit für den Dispaseverdau nicht hinreichend war (Romani et al., 1989b). Ferner wurde Melanin von den LC aufgenommen, ein Problem das bei Mäusen und Menschen nicht auftritt. Da die mit dieser Endozytose möglicherweise verbundene Aktivierung nicht erwünscht war, wurde unpigmentierte Haut gewählt. Die equinen LC wurden mit Hilfe von Ferritin markierten MHC II-Antikörpern über Magnetsäulen isoliert (Morris et al., 1992). In diesem relativ langwierigen Verfahren, das mit mehreren Aufreinigungsschritten verbunden war, konnten nur wenige Zellen (ca. $10^5/10\text{ cm}^2$) gewonnen werden.

In der Humanmedizin wurde eine ähnliche Vorgehensweise beschrieben (Pena-Cruz et al., 2001). Dort wurden die LC über Dichtegradienten weiter isoliert. Die isolierten epidermalen LC waren $CD1a^+/CD83^-$ und enthielten Birbeckgranula. Ebenfalls kultivierte dermale LC waren $CD83^+$ und besaßen keine Birbeckgranula. Der Nachweis von $CD1a/CD83$ war für LC des Pferdes nicht möglich, da spezifische Oberflächenmarker des Pferdes fehlen und eine Kreuzreaktion nicht bekannt ist. Zur Charakterisierung wurden die eq.LC elektronenmikroskopisch untersucht. Bei dem morphologischen Erscheinungsbild handelte es sich um LC, jedoch konnten die typischen Strukturen von Birbeckgranula nicht mit Sicherheit gezeigt werden. Hier ist u.a. zu bedenken, daß Birbeckgranula in Kultur verloren gehen und die längeren Aufarbeitungen den Zellen bereits geschadet haben könnten. Ein weiterer Hinweis, daß beim Pferd nur wenig LC in der Epidermis vorkommen, entstammt aus einer laufenden Promotionsarbeit (R. Stark, persönliche Mitteilung), da in der Haut nur wenige Zellen mit S-100 oder MHC II Antikörpern nachgewiesen werden konnten. In der Arbeitsgruppe Pferdeimmunologie wurden in der Zwischenzeit partielle Sequenzen von eq.CD1a und CD1b (Steinbach & Walter, unveröffentlicht), sowie IL-1 (Steinbach & Mauel, unveröffentlicht) kloniert. Kontroll-PCRs dienten als Nachweis, ob die isolierten epidermalen Zellen $CD1a^+$ und $IL-1^+$ waren. Der positive Nachweis von CD1a (LC spezifisch) und IL-1 ,

das von aktivierten LC gebildet wird, zeigt, daß es sich bei den isolierten Zellen um LC handelte (Enk et al., 1993a; Petzelbauer et al., 1993). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit den gebundenen Ferritinpartikeln stellten eine Reinheit von > 90% dar.

Die Isolierung DC aus dem Lymphknoten ergab kein zufriedenstellendes Ergebnis. Ein Grund dafür war die Schwierigkeit von kurz zuvor getöteten Pferden Lymphknoten zu erhalten, da meist autolytische Prozesse bereits eingesetzt hatten.

5.4 Monozytäre Zellen beim Pferd

Die in der Literatur für das Pferd beschriebenen Methoden zur Herstellung MoDC wurden anfangs untersucht. Entsprechend der Arbeit von Hammond und Mitarbeitern (1999) wurden die PBMC mit 10% Serum des selben Pferdes auf einer Petrischale 2-4 h adhärirt. Anschließend wurden die nicht adhärennten Zellen durch Waschen entfernt. Die adhärennten Zellen wurden mit rek. hu.GM-CSF und rek. eq.IL-4 stimuliert, 7 d kultiviert und dann über einen Metramizid-Gradienten gereinigt. Von dieser Gradientenreinigung ist jedoch bekannt, daß es zu einer akzessorischen Stimulierung und Differenzierung monozytärer Zellen kommt (Fabel et al., 1989). Die wenigen verbleibenden Zellen hatten geringe Ähnlichkeit mit MoDC anderer Spezies. Die geringe Menge isolierter Monozyten hat die Ursache, daß die eq.Monozyten bereits nach 1 h deutlich an Adhärenz verlieren. Durch die im Pferdeserum enthaltenen Faktoren kommt es ferner zu einer Autoaktivierung der Zellen. Die Methode ist daher wesentlich komplexer als die sonst zur Herstellung MoDC verwendeter Verfahren; sie ist nicht hinreichend reproduzierbar und wurde daher nicht weiter verwendet.

Monozyten wurden daher mit der von Siedek und Mitarbeiter (1997) beschriebenen Technik isoliert, in RPMI-Medium mit 10% FCS und Antibiotikum aufgenommen und durch mehrmaliges Waschen mit PBS aufgrund ihrer Adhärenz aufgetrennt. Die nicht adhärennten Zellen wurden ebenfalls über Metramizid weiter gereinigt und damit stimuliert. Mikroskopisch konnten in diesem Versuch keine polymorphen Zellen beobachtet werden und nach 2 Tagen starben die Zellen in Kultur, da kein GM-CSF eingesetzt wurde.

Die Isolierung der monozytären Zellen des Pferdes erfolgte in dieser Arbeit zunächst nach der Auftrennung mit Ficoll. Durch 2-maliges Beschichten des Blutes auf verschiedene Ficolldichten ließ sich diese Methode fürs Pferd verbessern. Die Ausbeute an Monozyten konnte deutlich gesteigert werden. Eine weitere Verbesserung für die Reinheit der monozytären Kultur war die Verkürzung der Intervalle, in denen diese Zellen adhäreren. So zeigte sich, daß Pferdemonozyten bereits nach 1/2 h Intervallen adhärent waren, aber bereits 3 h später nur noch zum Teil am Boden hafteten.

Die isolierten Monozyten wurden mit IL-4 und GM-CSF zur Differenzierung angeregt (Peters et al., 1996). Die Differenzierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch täglich überprüft. Bereits nach 2-3 d besaßen die mit GM-CSF und IL-4 stimulierten Zellen deutliche Ausläufer und zeigten Ähnlichkeit zu humanen MoDC. Des weiteren war kein großer Unterschied zwischen den Zellen, die mit eq.GM-CSF stimuliert wurden und denen mit hu.GM-CSF zu erkennen. Das lieferte einen ersten Hinweis auf die Bioaktivität des von mir hergestellten eq.GM-CSF und spricht gegen die Annahme, daß GM-CSF streng speziesspezifisch ist. Allerdings wurden 2000 U/ml hu.GM-CSF eingesetzt, d.h. 10x mehr als im humanen System benötigt wird (Steinbach et al., 1998b). Dieser Ansatz wurde in den folgenden Experimenten immer nur an ausgewählten Versuchsreihen nach Etablierung der Methode mitgeführt.

Für IL-4 konnte die Speziesspezifität mit hu.IL-4 und GM-CSF stimulierten eq.Monozyten bestätigt werden, denn sie zeigten keine Differenzierung zu MoDC. Monozyten, denen IFN \pm GM-CSF zugegeben wurde, blieben adhärent und bildeten nach 2-3 d Zellcluster. Diese Zellen waren im Gegensatz zu den Kontrollzellen wesentlich größer und granuliert.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die morphologischen Ergebnisse. Birbeckgranula (Birbeck et al., 1961) konnten nicht identifiziert werden. Entsprechend wurden aus Veröffentlichungen Protokolle zum Nachweis bzw. Herstellung von Birbeckgranula untersucht. Paillot und Mitarbeiter (2001) beschrieben, das aus Monozyten des Schweines mit TGF 1 LC herzustellen waren, die Birbeckgranula zeigten. Die eq.MoDC wurden nach diesem Protokoll auch mit TGF 1 stimuliert (nicht dargestellt). TGF 1 gilt als nicht speziesspezifisch. Daher wurde davon ausgegangen, daß es beim Pferd kreuzreagiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit TGF 1 stimulierten MoDC

des Pferdes zeigten ähnliche Strukturen, wie sie bei Paillot und Mitarbeitern (2001) dargestellt sind. Meiner Meinung nach war eine eindeutige Identifizierung von Birbeckgranula nicht möglich, da es sich auch um Endosomenanschnitte handeln könnte. Die Monozyten die mit IFN differenziert wurden, stellten sich elektronenmikroskopisch als große, granulierte Zellen dar. Sie lagen in Clustern zusammen und besaßen nur wenige kurze Pseudopodien.

Im Durchflußzytometer wurden die Oberflächenproteine der monozytären Zellen analysiert. Dazu wurde ein an das Pferd angepaßtes Verfahren verwendet, um die verschiedenen Populationen der PBMC darzustellen (Steinbach & Thiele, 1994). Die monozytären Zellen ließen sich gut von anderen Zellpopulationen oder Zellmaterial in einem Scattergramm abgrenzen. Mit kreuzreagierenden Antikörpern gegen MHC II und CD86 ließen sich die Oberflächenproteine in Doppelmarkierungen charakterisieren. Dabei war darauf zu achten, daß die Negativkontrolle möglichst im unteren linken Quadranten lag. Bei den zu MoDC differenzierenden Monozyten zeigte sich gleichzeitig eine Expression von MHC II/CD86. Im Gegensatz zu nicht stimulierten Kontrollzellen exprimierten M binnen 3 Tagen MHC II (Steinbach et al., 2002).

Die funktionelle Eigenschaft der MoDC T Zellen zu stimulieren, wurde in der gemischten Leukozyten Reaktion (MLR) untersucht (Nussenzweig et al., 1980; Van Voorhis et al., 1983; Young & Steinman, 1988). Wie bereits mikroskopisch als auch im Durchflußzytometer konnte in der MLR ebenfalls bestätigt werden, daß die eq.Monozyten 7 d zur Differenzierung zu MoDC benötigen. Hingegen ist für humane Monozyten eine Differenzierungsdauer von nur 4 d ausreichend (Steinbach et al., 1998b). Mikroskopisch zeigten die Kulturen aus MoDC und T Zellen deutliche große Cluster, während bei den Negativkontrollen, die alleine aus T Lymphozyten und nicht stimulierten monozytären Zellen bestanden, keine oder kaum Cluster zu erkennen waren. Dieses Ergebnis spiegelte sich in dem Stimulationsindex wieder, wobei die MoDC eine höhere Stimulationskapazität als das als Positivkontrolle verwendete Mitogen PHA zeigten. Auch in den weiteren phänotypischen und funktionellen Tests konnte hu.GM-CSF in hoher Konzentration alternativ zu eq.GM-CSF eingesetzt werden.

Kaushansky und Mitarbeiter (1989) definierten mit Hybridmolekülen von Mensch-Maus die Regionen AS 21 bis AS 31 und AS 78 bis AS 94 als Rezeptorbindungsstellen von GM-CSF. Die Aminosäure 21 stellte sich als

notwendig für die Signalübertragung der biologischen Aktivität von GM-CSF heraus (Lopez et al., 1992). Das Pferd besitzt an der Position 21 eine zum Menschen identische Aminosäure und die Region von AS 78 bis AS 94 stimmt weitgehend überein. Dies könnte die Kreuzreaktion zwischen humanem und equinem GM-CSF erklären.

Dendritische Zellen werden in der Humanmedizin bereits vielfältig klinisch eingesetzt. Besonders in der Tumorforschung kommen DC in der Therapie zur Anwendung. In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien an Maus und Mensch kamen DC als natürliches Adjuvans zum Einsatz. DC wurden mit Tumorzell-Lysaten „gefüttert“ und lösten *in vitro* und *in vivo* eine antigen-spezifische T Zell-Antwort aus, wodurch das Tumorwachstum inhibiert werden konnte (Nestlé et al., 1998; 2001; Timmerman & Levy, 1999; Fong & Engelman, 2000). Ein anderer Ansatz war die Hybrid Vaccination bei verschiedenen Tumoren (z.B. Melanom, Nierenzellkarzinom). Durch Fusion der Tumorzelle mit MoDC wurden spezifische Hybride entwickelt, die zum einen tumor-spezifisches Ag enthielten und zum anderen die Fähigkeit der DC besaßen, naive T Zellen zu aktivieren. Diese Therapie führte zu einem Rückgang der Metastasen (Scott-Taylor et al., 2000; Trefzer et al., 2000). Ferner wurden DC mit Tumor spezifischer DNA oder RNA transfiziert. Transfizierte DC mit der mRNA von Tumorzellen induzierten eine Immunität gegen den Tumor und lösten eine CTL Antwort aus (Boczkowski et al., 2000; Heiser et al., 2000; 2001). Nair und Mitarbeiter (2000) zeigten, daß die polypeptide component of telomerase (TERT), die im gesunden Gewebe ruhen und in 85% der Tumore reaktiviert vorliegt, geeignet ist, um bei diesen Tumoren mit TERT RNA-transfizierten DC das Wachstum zu inhibieren. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, daß die Immunisierung mit Tumor RNA effektiver ist.

Infektionen mit Viren wie Masernvirus (MV), Influenzavirus und Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) beeinflussen die Fähigkeit DC in ihrer T Zell-Antwort. MV und LCMV führen zur Inhibition der T Zell-Proliferation. Es kommt zu einer massiven Apoptose der DC und T Zellen. Diese wird als essentieller Mechanismus für die Immunsuppression bei diesen Virusinfektionen gesehen (Borrow et al., 1995; Schnorr et al., 1997; Fugier-Vivier et al., 1997). Influenzavirus infizierte DC lösen eine starke, antigen-spezifische, cytolytische T Zell-Antwort aus (Bhardwaj et al., 1994). Interessante

Gesichtspunkte für den klinischen Gebrauch wären auch beim Pferd die Bedeutung und Anwendung DC bei der Immunantwort gegen verschiedene Virusinfektionen.

Die Bornasche Krankheit (BK) ist eine nichteitrige Enzephalomyelitis, deren klinisches Bild schon seit über 200 Jahren bekannt ist (Zwick, 1939; Dürrwald & Ludwig, 1997). Die Rolle des Immunsystems ist, wie bei verschiedenen anderen Viren, bei BDV ambivalent anzusehen. Kommt es nach intensiver Replikation des Virus zu einer Immunantwort, könnte diese statt zu schützen, einen prognostisch ungünstigen Verlauf herbeiführen, was allerdings mittlerweile in Zweifel gezogen wird (Ludwig & Bode, 2000). Für die BK konnte bereits gezeigt werden, daß die Viren bei einer akuten klinischen Erkrankung des Pferdes oder auch einer occuluten Phase beim Menschen in Monozyten nachgewiesen wurden (Bode et al., 1994; Thein & Steinbach, 2000).

Equines Herpes Virus-1 (EHV-1) kann den Virusabort der Stuten und die Rhinopneumonitis hervorrufen (u.a. Studdert, 1983; Meyer et al., 1987). Bei der natürlichen EHV-Infektion entwickelt der Organismus eine zelluläre und humorale Immunantwort, die durch die viralen Glykoproteine B, C und D hervorgerufen wird (Onions, 1991; Ostlund et al., 1991). Beim Pferd konnte *in vitro* die Stimulation der T Zell-Proliferation und Cytotoxizität nach equiner Herpesvirus 1 (EHV-1) Infektion bei Monozyten bzw. DC gezeigt werden (Slater et al., 1994; Siedek et al., 1999). Bei Versuchen mit Mäusen konnte die Fähigkeit DC gezeigt werden, eine antivirale Immunreaktion zu initiieren. Dabei wurden murine DC mit hitzeinaktiviertem EHV-1 behandelt und die DC dann als Vaccine appliziert. Vakzinierte Mäuse zeigten bei einer Infektion mit EHV-1 nur leichte oder keine klinischen Symptome. Kontrolltiere, die mit Medium, unbehandelten DC oder inaktiviertem Virus immunisiert wurden, zeigten deutliche klinische Symptome und 27% von ihnen starben (Steinbach et al., 1998b).

In zukünftigen Untersuchungen wäre es denkbar die rek. eq.Zytokine und eq. DC zu entsprechenden therapeutischen und diagnostischen Zwecken auch beim Pferd einzusetzen.