

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Hanns Ludwig)

**Klonierung und Expression von eq.IFN γ , eq.GM-CSF
und eq.IL-4 und deren Einfluß auf die monozytären
Zellen des Pferdes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susanne Mael
Tierärztin aus Euskirchen

Berlin 2002
Journal-Nr.: 2625

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Hanns Ludwig

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Andreas Radbruch

Tag der Promotion: 10.07.2002

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	13
1.1 Dendritische Zellen (DC).....	14
1.2 Zytokine.....	21
1.2.1 Interferon (IFN).....	21
1.2.2 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF).....	24
1.2.3 Interleukin 4 (IL-4).....	25
1.3 Vektorsysteme.....	28
2. Problemstellung	30
3. Material und Methoden.....	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Zell-Linien.....	31
3.1.2 Bakterienstämme, Hefen und Pflanzen.....	31
3.1.3 Viren.....	31
3.1.4 Vektorsysteme.....	32
3.1.5 Synthetische Oligonukleotide.....	32
3.1.6 Antikörper und Enzym-konjugierte Nachweisantikörper.....	39
3.1.7 Enzyme und Reaktionskits.....	39
3.1.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	39
3.1.9 Geräte und sonstiges Zubehör.....	40
3.2 Zell-Kultur.....	41
3.2.1 Isolierung von DC aus der Haut.....	41
3.2.2 Isolierung von DC aus den Lymphknoten.....	42
3.2.3 Isolierung von equinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Monozyten.....	43
3.3 Morphologische Untersuchungen.....	44
3.3.1 Lichtmikroskopische Untersuchung.....	44
3.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	45

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Durchflußzytometrie.....	46
3.3.4	Gemischte Leukozytenreaktion (MLR).....	47
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	48
3.4.1	RT-PCR.....	48
3.4.1.1	RNA-Extraktion.....	48
3.4.1.2	Reverse Transkription.....	49
3.4.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	50
3.4.1.4	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	51
3.4.1.5	Agarosegelelektrophorese.....	52
3.4.1.6	Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung.....	53
3.4.2	Klonierung in Bakterien.....	54
3.4.2.1	Ligation.....	54
3.4.2.2	Präparation kompetenter E. coli.....	54
3.4.2.3	Transformation.....	55
3.4.2.4	Blau/Weiß Selektion.....	56
3.4.2.5	Expression rekombinanter Proteine (pBAD/gIII).....	56
3.4.2.6	Plasmid-Präparation.....	57
3.4.2.7	Restriktionsenzymverdau.....	58
3.4.2.8	Glyceroldauerkulturen.....	58
3.4.2.9	DNA-Fällung.....	58
3.4.3	Transformation von <i>P.pastoris</i>	59
3.4.3.1	Anzucht von <i>P.pastoris</i>	59
3.4.3.2	Herstellung elektrokompeter <i>P.pastoris</i>	60
3.4.3.3	Elektrotransformation von <i>P.pastoris</i>	61
3.4.3.4	Expression von Proteinen in <i>P.pastoris</i>	61
3.4.3.5	g418-Resistenz Selektion rekombinanter <i>P.pastoris</i> Klone	62
3.4.3.6	Kolonie-Blot.....	63
3.4.4	Klonierung in tierische Zellen.....	64
3.4.4.1	Transfektion von P3X 63Ag8.653-Zellen.....	64
3.4.4.2	Kryokonservierung von Zellen.....	64
3.4.4.3	g418- bzw. Blasticidin-Resistenz Selektion rekombinanter P3X-Zellen.....	64
3.4.5	Transiente Transformation von Pflanzenzellen.....	65

Inhaltsverzeichnis

3.4.5.1	Anzucht von <i>A.tumefaciens</i> und Herstellung von Stammkulturen.....	65
3.4.5.2	Herstellung kompetenter <i>A.tumefaciens</i>	66
3.4.5.3	Transformation von <i>A.tumefaciens</i>	66
3.4.5.4	Anzucht und Induktion von <i>A.tumefaciens</i> zur Transformation von Tabakblättern.....	67
3.4.5.5	Transformation von Tabakblättern durch Vakuuminfiltration.....	68
3.4.6	DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	69
3.4.6.1	Denaturierung von Doppelstrang-Templates.....	69
3.4.6.2	Sequenzreaktion.....	69
3.4.6.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	71
3.5	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	73
3.5.1	SDS-PAGE	73
3.5.2	Coomassiefärbung.....	74
3.5.3	Westernblot.....	75
3.5.4	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	77
3.5.5	Protein-Extraktion aus Bakterien und Reinigung sogenannter Einschlußkörper (unlöslicher Proteine).....	78
3.5.6	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	78
3.5.7	Isolierung von Proteinen aus <i>N.tabacum</i>	79
3.5.8	VSV-Inhibitionstest der antiviralen Wirkung von eq.IFN	80
3.5.8.1	Virusanzucht.....	80
3.5.8.2	VSV-Inhibitionstest mit ED-Zellen.....	80
3.5.8.3	VSV-Inhibitionstest mit PBMC.....	81
3.6	Herstellung von Antikörpern.....	82
3.6.1	Immunisierung von Mäusen / Herstellung polyklonaler Antiseren.....	82
3.6.2	Herstellung monoklonaler Antikörper	82

Inhaltsverzeichnis

4.	Ergebnisse	84
4.1	Klonierung und Sequenzierung.....	84
4.1.1	eq. IFN	84
4.1.2	eq. GM-CSF.....	87
4.1.3	eq. IL-4.....	93
4.2	Expression der Zytokine.....	99
4.2.1	Prokaryotisches Expressionssystem: Vektor pBAD/gIII.....	99
4.2.2	Eukaryotische Expressionssysteme.....	103
4.2.2.1	Expression in Hefe: Vektor pPIC9K/His6.....	103
4.2.2.2	Expression in Pflanzen: Vektoren pams und pPAMks.....	106
4.2.2.3	Expression in Säugetierzellen: Vektoren pcDNA6/V5-His und BCMGSneo.....	110
4.3	Isolierung, Differenzierung und Charakterisierung monozytärer Zellen	112
4.3.1	Isolierung der Langerhans Zellen aus der Haut.....	112
4.3.2	Differenzierung und morphologische Darstellung equiner monozytärer Zellen	116
4.3.2.1	Herstellung equiner MoDC.....	116
4.3.2.2	Differenzierung monozytärer Zellen mit IFN zu Makrophagen.....	120
5.	Diskussion	123
5.1	Klonierung und Sequenzierung der equinen Zytokine.....	124
5.2	Expression der rekombinanten equinen Zytokine.....	128
5.3	Langerhans Zellen aus der Haut des Pferdes.....	134
5.4	Monozytäre Zellen beim Pferd.....	135
6.	Zusammenfassung	140
7.	Summary	141
8.	Literaturverzeichnis	142

Inhaltsverzeichnis

9.	Anhang	170
9.1	Eigene publizierte Ergebnisse.....	170
9.2	Selbständigkeitserklärung.....	171
9.3	Danksagung.....	172
9.4	Lebenslauf.....	173

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.tumefaciens</i>	Agrobacterium tumefaciens
Abb.	Abbildung
AC	Akzessorische Zellen (accessory cells)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zellen (antigen presenting cells)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser (aqua bidestillata)
AS	Aminosäuren
BDV	Borna Disease Virus
bo.	bovin
bp	Basenpaare
Cb	Cabenicillin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CTL	zytotoxische T Zellen
cv.	Kultivar
d	Tag
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxy Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ED	equine Dermiszellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
EHV	Equines Herpesvirus
eq.	equin
eR	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und Mitarbeiter
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisthiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor
h	Stunde
hu.	human
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- -D-thiogalactopyranosid
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Km	Kanamycin

Abkürzungsverzeichnis

kV	Kilovolt
l	Liter
L.	Linné
LPS	Lipopolysaccharid
LU	Laboreinheit
M	Molar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
Mbq	Mega Becquerel
μ F	Mikrofarad
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
Mo	Monozyten
M	Makrophage
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MLR	gemischte Leukozytenreaktion (mixed leukocyte reaction)
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mRNA	messenger RNA
mu.	murin
NBT/BCIP	Nitroblau Tetrazolium Salz/ 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
<i>N.tabacum</i>	Nicotiana tabacum
	Ohm
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
<i>P.pastoris</i>	Pichia pastoris
P3X	Maus B Zell-Linie P3X 63Ag8.653
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaque forming unit
PHA	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWM	Pokeweed Mitogen
rek.	rekombinant
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

s.c.	subcutan
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Eisessig-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T Zell Rezeptor
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th	T Helferzelle
T _m	optimale Primertemperatur (melting temperature)
TMB	Tetramethylbenzidindihydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
v/v	Volumenprozent vom Gesamtvolumen (volume per volume)
w/v	Massenprozent vom Gesamtvolumen (weight per volume)
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- -D-galaktopyranosid

Chemische Elemente und Verbindungen sind nach internationalem Standard abgekürzt.

9. Anhang

9.1 Eigene publizierte Ergebnisse

Teile der in dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle als Vorträge oder Abstrakte vorgestellt oder sind veröffentlicht:

1. Beier, I., Mauel, S. Blankenstein, P. Ebner, D. & Steinbach, F. (1999)
Expression of rekombinant equine interferons: Cloning, detection and antiviral activity.
Jahrestagung der DGfI, 29.09.-02.10.1999, Hannover (Poster), Immunobiol., **200**, 736-737.
2. Mauel, S. & Steinbach, F. (2000)
Herstellung monozytärer dendritischer Zellen beim Pferd.
Int. Symposium Immunologie des Pferdes, 7.-8.07.2000 Berlin (Vortrag).
3. Beier, I., Mauel, S. & Steinbach, F. (2000)
Expressionsklonierung equiner Interferone (IFN-alpha, -beta und -gamma).
Int. Symposium Immunologie des Pferdes, 7.-8.07.2000 Berlin (Vortrag).
4. Mauel, S. & Steinbach, F. (2000)
Cloning of eq.GM-CSF and eq.IL-4 as prerequisites for immunomodulatory approaches in horses.
EFIS Symposium on Infectious Immunity & Vaccines (Vortrag), Kazimierz Dolny, 21.-22.09.2000.
5. Mauel, S. & Steinbach, F. (2000)
Expression cloning of equine interleukin 4 and equine interferon gamma.
Jahrestagung der DGfI, 29.11-02.12.2000, Düsseldorf (Poster), Immunobiol., **203**, 155.
6. Steinbach, F., Mauel, S. & Beier, I. (2001)
Innate immunity, interferons and immune modulation.
Second Workshop on Allergic Diseases of the Horse;
Hortobagy (Ungarn) 25. -29.04. 2001 (Vortrag).
7. Beier, I., Mauel, S. & Steinbach, F. (2001)
Recombinant equine interferons: Expressioncloning and biological activity
6th IVIS, Uppsala, Sweden (Poster), 15.-20.Juli, 2001.
8. Mauel, S., Commandeur, U. & Steinbach, F. (2001)
Cloning of eq.GM-CSF as an essential factor for equine dendritic cells.
Jahrestagung der DGfI, 26.09.-29.09.2001, Dresden (Poster), Immunobiol., **204**, 317.
9. Steinbach, F., Mauel, S. & Beier, I. (2002)
Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity.
Vet Immunol Immunopathol, **84**, 83-95.
10. Steinbach, F., Deeg, C., Mauel, S. & Wagner B. (2002)
Equine immunology: offspring of the serum horse.
Trends Immunol, **23**, 223-225.

9.2 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Berlin, den 16.04.2002

9.3 Danksagung

Herrn Prof. Hanns Ludwig, Institut für Virologie, danke ich für die Überlassung des Themas und seine über die Jahre gewährte Unterstützung meiner Arbeit.

Die Untersuchungen zu den Pferdezytokinen ergaben sich aus früheren Studien in der Arbeitsgruppe Pferdeimmunologie, die von Herrn Dr. Falko Steinbach am Fachbereich ins Leben gerufen worden ist. Mein ganz besonderer Dank gilt Falko Steinbach für die zahlreichen Anregungen, ständigen Diskussionen und immerwährende freundschaftliche Betreuung der Untersuchungen.

Herrn PD Jakob Walter und den Mitarbeitern der Veterinärpathologie, besonders Robert Stark, sei vielmals für die Hilfestellung bei der Analyse der Hautproben und Frau Irmer für die Unterstützung bei elektronenmikroskopischen und histologischen Arbeiten gedankt.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Rainer Fischer (Institut für Biologie VII, RWTH Aachen) hat mich großzügig in ihr Team aufgenommen und durch freundschaftliche Betreuung von Nicole Raven und Dr. Uli Commandeur wurde ich in die Arbeitsmethoden der Hefen- und Pflanzenmolekularbiologie eingeweiht.

Des weiteren bedanke ich mich herzlich bei den Mitarbeitern der Tierklinik für Fortpflanzung, insbesondere Stephan Reif, für die Bereitstellung von Blutproben gesunder Pferde.

Dr. Sabine Steinbach und Sabine Kallnbach haben durch kritische Durchsicht des Manuskriptes zur Verbesserung beigetragen.

Schließlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Ludwig, hier insbesondere Frau Annelie Büchel für ihre fachliche und menschliche Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten.

Der Akademie für Tiergesundheit, Bonn, sei für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium vielmals gedankt.

Meinen Eltern und Freunden, insbesondere Markus Timmermann möchte ich für ihre ständige Geduld und ihren Zuspruch danken.

9.4 Lebenslauf

Name: Susanne Maria Mauel

Geburtsdatum: 03.07.1972

Geburtsort: Euskirchen

Eltern: Franz Mauel
Karla Mauel, geb. Suchier

Schulbildung:

1979-1983 Franziskus Grundschule Euskirchen
1983-1992 Städtisches Gymnasium Marienschule Euskirchen
06/92 Abitur

Studium:

10/92-04/98 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
04/98 Approbation

Dissertation:

Seit Juli 1998 Dissertation an dem Institut für Virologie der FU Berlin
07/99-10/00 Stipendium der Akademie für Tiergesundheit e. V. (AfT),
Bonn