

## **4. Ergebnisse**

Entsprechend der Zielsetzung meiner Arbeit zur Anwendung equiner Zytokine sind die Ergebnisse in mehrere Teilbereiche gegliedert: Klonierung eq. Zytokine; Expression rekombinanter Zytokine; Isolierung, Differenzierung und Charakterisierung monozytärer Zellen unter Einsatz der rek. eq.Zytokine.

### **4.1 Klonierung equiner Zytokine**

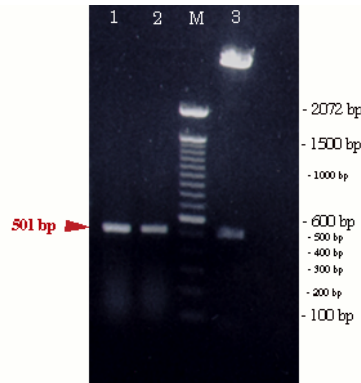
Aus venösem Pferdeblut wurden Monozyten und Lymphozyten isoliert. Dieses Verfahren konnte durch zweimalige Gradientenaufreinigung, zuerst über Ficoll 0,1090 und danach über Ficoll 0,1077 optimiert werden (3.2.3).

Die Lymphozyten in Kultur wurden mit Con A, PHA, PWM oder PMA/Calonophor (3.2.3) stimuliert, um deren Zytokinproduktion anzuregen. Nach 16 h bzw. 48 h wurden die Zellen geerntet, RNA extrahiert (3.4.1.1) und für die Erstellung von cDNA-Banken genutzt.

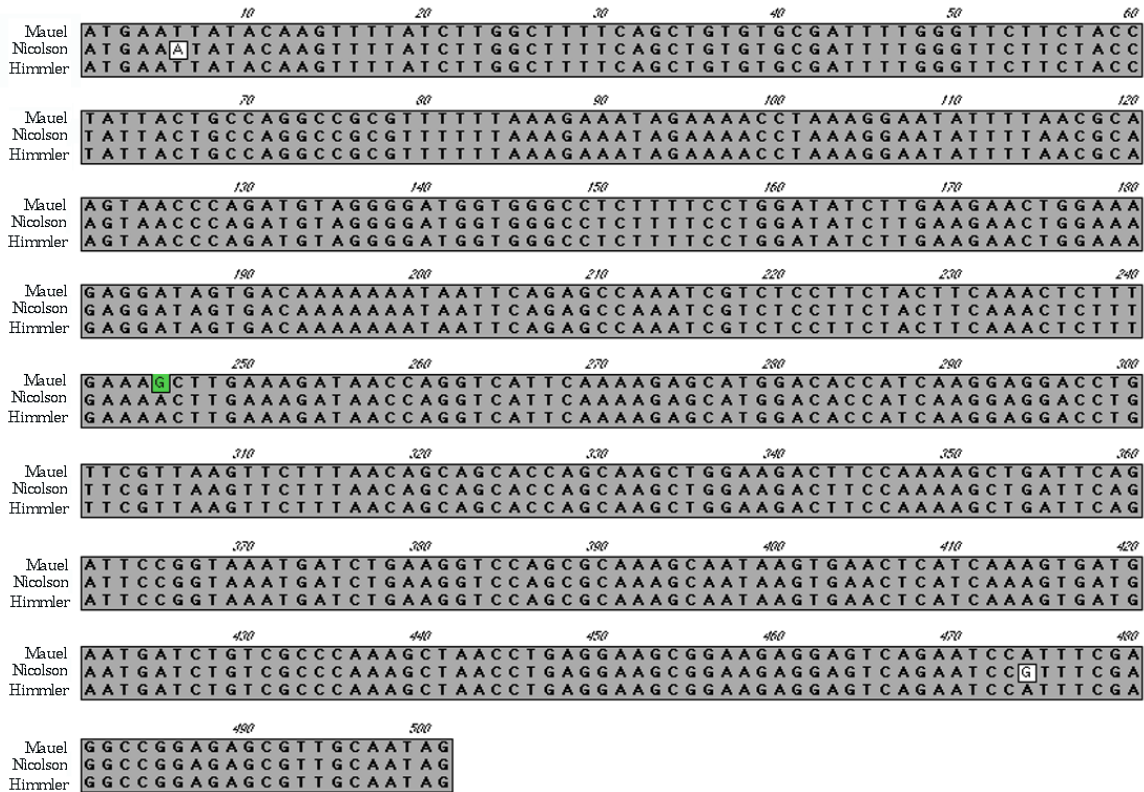
#### **4.1.1 eq.IFN $\gamma$**

Das Gen für IFN des Pferdes liegt kloniert vor (Himmler & Grünig, 1993: GenBank: U04050; Nicolson, 1994: GenBank: D28520). Rekombinantes Protein war jedoch nicht verfügbar. Weitgehende Aussagen zur biologischen Funktion fehlen, wobei die immunologische Wirkung vorwiegend von Bedeutung ist.

Ziel war es die cDNA, für den gesamten offenen Leserahmen (ORF) zu gewinnen, um die Expression des Proteins durchzuführen. Die Primer (Tab. 2) wurden aus den publizierten Sequenzen am 3' und 5' Ende abgeleitet. Mit diesen konnte IFN aus stimulierten Pferdeblutzellen amplifiziert (Abb.1), kloniert und sequenziert werden. Das Ergebnis stimmte mit den veröffentlichten Sequenzen weitestgehend überein (Abb.2). Allerdings führt die in der klonierten Nukleotidsequenz gefundene Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Serin.

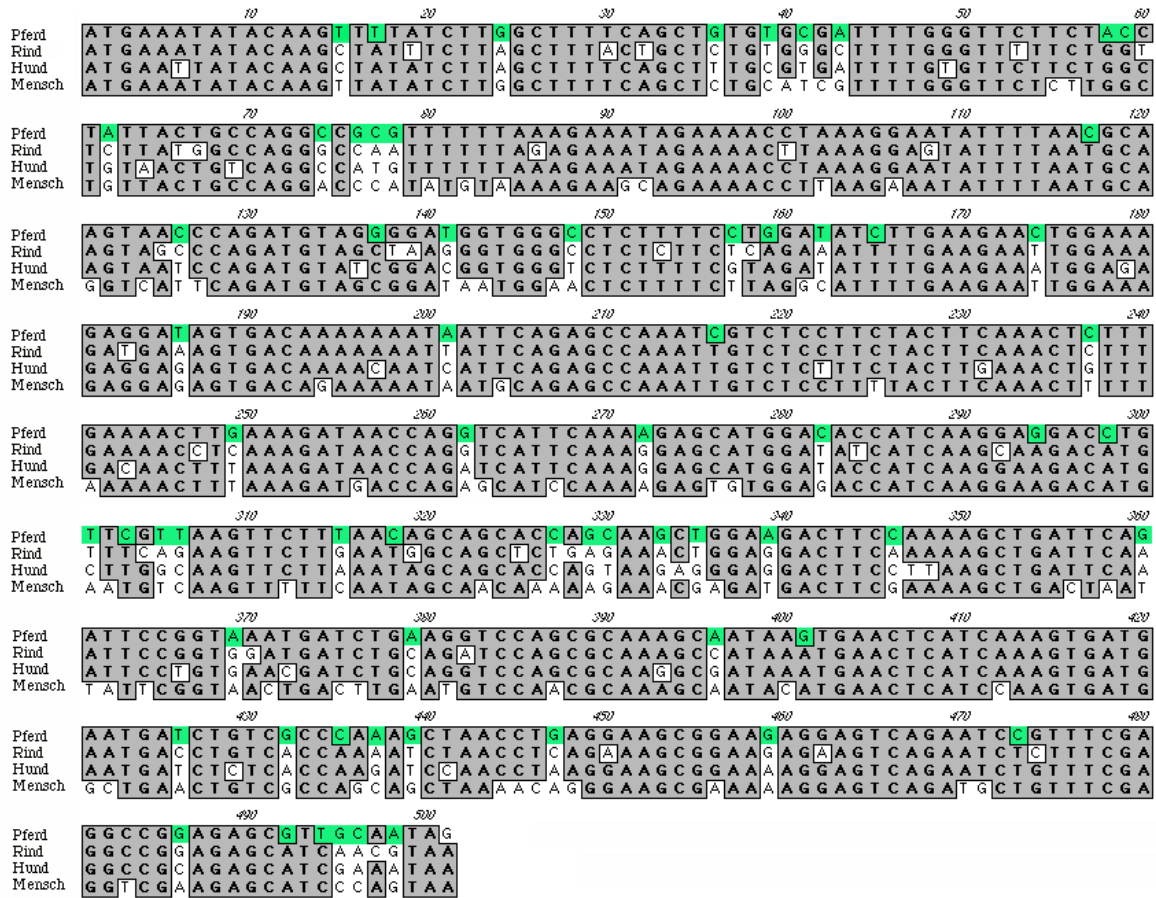


**Abb.1:** IFN RT-PCR aus ConA 48 h stimulierten Lymphozyten. cDNA zweier Pferde in einer Länge von 501 bp Spur 1 + 2. Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* aus pGEM-T Easy Vektor Spur 3. M = 100 bp Leitermarker.



**Abb.2:** Vergleich der cDNA von equinem IFN mit den bereits veröffentlichten GenBank Sequenzen von Nicolson (GenBank: D28520) und Himmler (U04050). Die Punktmutation (Basenaustausch) ist grün hervorgehoben. In der Aminosäuresequenz unterscheidet sich die 82. AS von den anderen beiden Sequenzen (nicht dargestellt).

Um eventuelle Kreuzreaktionen meines eq.IFN mit anderen Spezies zu überprüfen, wurde diese Sequenz mit der vom Rind, vom Hund und vom Menschen auf identische Sequenzabschnitte untersucht (Abb.3:). Die einzelnen Spezies unterscheiden sich lediglich durch Punktmutationen im Austausch einer anderen Base. Die Gemeinsamkeiten zwischen Pferd und Rind betragen 82%, Pferd und Hund 85% und Pferd und Mensch 77%.



**Abb.3:** Vergleich der cDNA IFN von Pferd (GenBank: D28520), Rind (M29867), Hund (AF126247) und Mensch (XM-006883). Die Unterschiede in der Sequenz vom Pferd zu den anderen Spezies sind grün unterlegt.

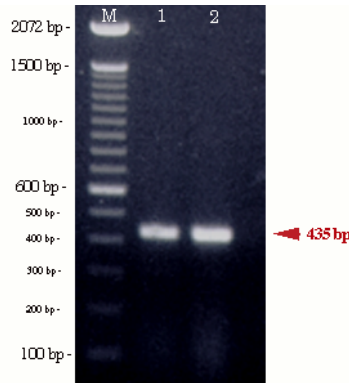
Aus der cDNA ergibt sich folgende Proteinsequenz (Abb.4). Die Anzahl der AS des Pferdes stimmt mit der anderer Spezies überein. Auf Aminosäure-Ebene betragen die Ähnlichkeiten von Pferd und Rind 84% (76% Identität), Pferd und Hund 87% (80% Identität) und zu Mensch 77% (67% Identität).

|        |   |     |     |     |     |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|        |   | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pferd  | M | N   | Y   | T   | S   | F   | I   | L | A | F | Q | L | C | A | I | L | G | S | S | T | Y | Y | C | Q | A | A | F | F | K | E | I | E | N | L | K | E | Y | F | N | A | S | N | P | D | V | G | D | G | G | P | L | F | L | D | I | L | K | N | V | K |
| Rind   | M | K   | Y   | T   | S   | F   | I   | L | A | L | L | L | C | G | L | L | G | F | S | G | S | Y | G | Q | G | Q | F | F | R | E | I | E | N | L | K | E | Y | F | N | A | S | S | P | D | V | A | K | G | G | P | L | F | S | E | I | L | K | N | V | K |
| Hund   | M | N   | Y   | T   | S   | Y   | I   | L | A | F | Q | L | C | V | I | L | C | S | S | G | C | N | C | Q | A | M | F | F | K | E | I | E | N | L | K | E | Y | F | N | A | S | N | P | D | V | S | D | G | G | S | L | F | V | D | I | L | K | K | V | R |
| Mensch | M | K   | Y   | T   | S   | Y   | I   | L | A | F | Q | L | C | I | V | L | G | S | L | G | C | Y | C | Q | D | P | Y | V | K | E | A | E | N | L | K | K | Y | F | N | A | G | H | S | D | V | A | D | N | G | T | L | F | L | G | I | L | K | N | V | K |
|        |   | 70  | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pferd  | E | D   | S   | D   | K   | K   | I   | I | Q | S | Q | I | V | S | F | Y | F | K | L | F | E | S | L | K | D | N | Q | V | I | Q | K | S | M | D | T | I | K | E | D | L | F | V | K | F | E | N | S | S | T | S | K | L | E | D | F | Q | K | L | I | Q |
| Rind   | D | E   | S   | D   | K   | K   | I   | I | Q | S | Q | I | V | S | F | Y | F | K | L | F | E | N | L | K | D | N | Q | V | I | Q | R | S | M | D | I | I | K | Q | D | M | F | Q | K | F | L | N | G | S | S | E | K | L | E | D | F | K | K | L | I | Q |
| Hund   | E | E   | S   | D   | K   | T   | I   | I | Q | S | Q | I | V | S | F | Y | L | K | L | F | D | N | F | K | D | N | Q | I | I | Q | R | S | M | D | T | I | K | E | D | M | L | G | K | F | L | N | S | S | T | S | K | R | E | D | F | L | K | L | I | Q |
| Mensch | E | E   | S   | D   | R   | K   | I   | M | Q | S | Q | I | V | S | F | Y | F | K | L | F | K | N | F | K | D | D | Q | S | I | Q | K | S | V | E | T | I | K | E | D | M | N | V | K | F | F | N | S | N | K | K | K | R | D | D | F | E | K | L | T | N |
|        |   | 130 | 140 | 150 | 160 |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pferd  | I | P   | V   | N   | D   | L   | K   | V | Q | R | K | A | I | S | E | L | I | K | V | M | N | D | L | S | P | K | A | N | L | R | K | K | R | K | R | S | Q | N | P | F | R | G | R | R | A | L | Q |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Rind   | I | P   | V   | D   | D   | L   | Q   | I | Q | R | K | A | I | N | E | L | I | K | V | M | N | D | L | S | P | K | S | N | L | R | K | K | R | K | R | S | Q | N | L | F | R | G | R | R | A | S | T |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Hund   | I | P   | V   | N   | D   | L   | Q   | V | Q | R | K | A | I | N | E | L | I | K | V | M | N | D | L | S | P | R | S | N | L | R | K | K | R | K | R | S | Q | N | L | F | R | G | R | R | A | S | K |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Mensch | Y | S   | V   | T   | D   | L   | N   | V | Q | R | K | A | I | H | E | L | I | Q | V | M | A | E | L | S | P | A | K | T | G | K | R | K | R | S | Q | M | L | F | R | G | R | R | A | S | Q |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**Abb.4:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von IFN verschiedener Spezies. Die dunkelgrauen Bereiche kennzeichnen die identischen AS und die hellgrauen bzw. beim Pferd gelben Bereiche die ähnliche AS. In den weißen bzw. beim Pferd roten Bereichen unterscheiden sich die einzelnen Spezies in ihrer Aminosäuresequenz voneinander.

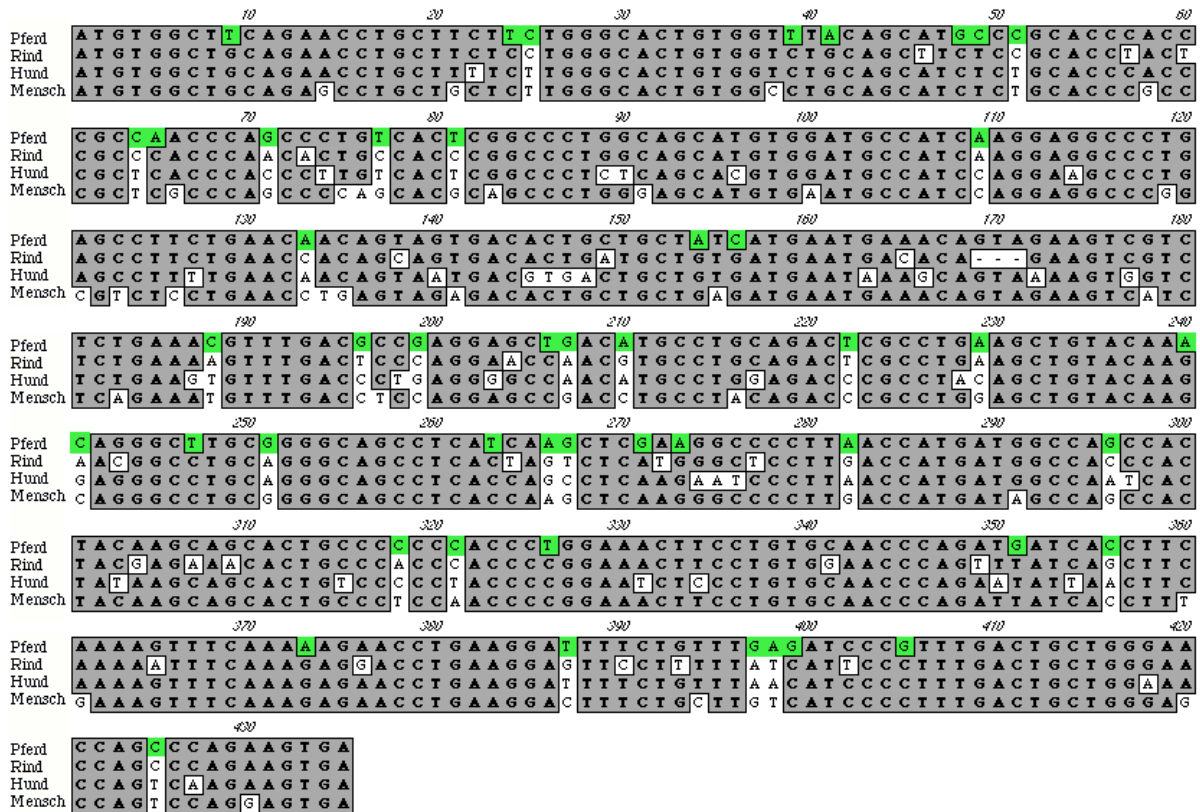
#### 4.1.2 eq.GM-CSF

Für die DNA von eq.GM-CSF liegt bisher nur eine Teilsequenz von 159 Basenpaaren vor, sie ist allerdings als Information zur Herstellung von Klonierungsprimern nicht geeignet, da die bekannte Sequenz den mittleren Bereich der cDNA darstellt (Heymer, 1993). Mit Hilfe des Computerprogrammes Mac Vector (GCG) wurden aus Übereinstimmungen am 5`- und 3`-Ende der veröffentlichten cDNAs anderer Spezies spezifische Primer ausgesucht. Dabei ergaben sich folgende Schwierigkeiten: Zunächst wurde ein falsches Amplifikat der richtigen Größe (ca. 430 bp) hergestellt. Dieses war sehr ungewöhnlich, da in der PCR entweder kein Amplifikat oder eines einer anderen Größe auftrat. Der Fehler konnte erst nach Klonieren und anschließendem Sequenzieren entdeckt werden. Daraufhin wurde mit modifizierten (längeren) Primern (GM3v, GM4r, Tab.2) die cDNA in voller Länge amplifiziert (Abb.5), kloniert und sequenziert (3.4).



**Abb.5:** GM-CSF RT-PCR an ConA 48 h stimulierten Lymphozyten. cDNA zweier Pferde in einer Länge von 435 bp. M = 100 bp Leitermarker.

Ausgehend von den auf Homologie basierenden Primern, betrug die Identität der cDNA von Pferd zum Rind 85%, zum Hund 83% und zum Menschen 84% (Abb.6).



**Abb.6:** Vergleich der, mit aus Homologien abgeleiteten Primern, der cDNA GM-CSF von Pferd, Rind (GenBank: U22385), Hund (S49738) und Mensch (XM-003751). Die Unterschiede in der Sequenz vom Pferd zu den anderen Spezies sind grün unterlegt.

Die abgeleiteten Proteinsequenzen der einzelnen Spezies zeigten, ähnlich wie bei IFN , nur einzelne AS-Austausche (Abb.7). Die Sequenzähnlichkeit von Pferd zum Rind beträgt 83% (76% Identität), zum Hund 81% (72% Identität) und zum Menschen 82% (76% Identität).

|        |   |     |     |    |     |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|-----|-----|----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|        |   | 10  | 20  | 30 | 40  | 50  | 60  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pferd  | M | V   | L   | Q  | N   | L   | L   | L | G | T | V | V | Y | S | M | P | A | P | T | R | Q | P | S | P | V | T | R | P | W | Q | H | V | D | A | I | K | E | A | L | S | L | L | N | N | S | S | D | T | A | A | I | M | N | E | T | V | E | V | V |   |
| Rind   | M | V   | L   | Q  | N   | L   | L   | L | G | T | V | V | C | S | F | S | A | P | T | R | P | P | N | T | A | T | R | P | W | Q | H | V | D | A | I | K | E | A | L | S | L | L | N | H | S | S | D | T | D | A | V | M | N | D | T | - | E | V | V |   |
| Hund   | M | V   | L   | Q  | N   | L   | L   | L | G | T | V | V | C | S | I | S | A | P | T | R | S | P | T | L | V | T | R | P | S | Q | H | V | D | A | I | Q | E | A | L | S | L | L | N | N | S | N | D | V | T | A | V | M | N | K | A | V | K | V | V |   |
| Mensch | M | V   | L   | Q  | N   | L   | L   | L | G | T | V | A | C | S | I | S | A | P | A | R | S | P | S | P | S | T | Q | P | W | E | H | V | N | A | I | Q | E | A | R | R | L | L | N | L | S | R | D | T | A | A | E | M | N | E | T | V | E | V | I |   |
|        |   | 70  | 80  | 90 | 100 | 110 | 120 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pferd  | S | E   | T   | F  | D   | A   | E   | E | L | T | C | L | Q | T | R | L | K | L | Y | K | Q | G | L | R | G | S | L | I | K | L | E | G | P | L | T | M | M | A | S | H | Y | K | Q | H | C | P | P | T | L | E | T | S | C | A | T | Q | M | I | T | F |
| Rind   | S | E   | K   | F  | D   | S   | Q   | E | P | T | C | L | Q | T | R | L | K | L | Y | K | N | G | L | Q | G | S | L | T | S | L | M | G | S | L | T | M | M | A | T | H | Y | E | K | H | C | P | P | T | P | E | T | S | C | G | T | Q | F | I | S | F |
| Hund   | S | E   | V   | F  | D   | P   | E   | G | P | T | C | L | E | T | R | L | Q | L | Y | K | E | G | L | Q | G | S | L | T | S | L | K | N | P | L | T | M | M | A | N | H | Y | K | Q | H | C | P | P | T | P | E | S | P | C | A | T | Q | N | I | N | F |
| Mensch | S | E   | M   | F  | D   | L   | Q   | E | P | T | C | L | Q | T | R | L | E | L | Y | K | Q | G | L | R | G | S | L | T | K | L | K | G | P | L | T | M | I | A | S | H | Y | K | Q | H | C | P | P | T | P | E | T | S | C | A | T | Q | I | I | T | F |
|        |   | 130 | 140 |    |     |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Pferd  | K | S   | F   | K  | K   | N   | L   | K | D | F | L | F | E | I | P | F | D | C | W | E | P | A | Q | K |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Rind   | K | N   | F   | K  | E   | D   | L   | K | E | F | L | F | I | I | P | F | D | C | W | E | P | A | Q | K |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Hund   | K | S   | F   | K  | E   | N   | L   | K | D | F | L | F | N | I | P | F | D | C | W | K | P | V | K | K |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Mensch | E | S   | F   | K  | E   | N   | L   | K | D | F | L | L | V | I | P | F | D | C | W | E | P | V | Q | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**Abb.7:** Vergleich der Aminosäuresequenz von GM-CSF, die sich aus den DNA Sequenzen aus Abb.6 ergaben. Die dunkel grauen Bereiche kennzeichnen die identischen AS und die hellgrauen bzw. beim Pferd gelben Bereiche die Homologien. In den weißen bzw. beim Pferd roten Bereichen unterscheiden sich die einzelnen Spezies in ihrer Aminosäuresequenz voneinander.

Bei der erhaltenen Sequenz war zu berücksichtigen, daß die Anfangs- und Endsequenzen durch die verwendeten Primer vorgegeben sind, die nicht pferdespezifisch sind.

Um das 3'Ende der cDNA von eq.GM-CSF charakterisieren zu können, wurden mehrere Verfahren der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) erprobt. Die Charakterisierung des C-Terminus erfolgte mit einem RT-PCR Primer (RACE RTIII), der aus Oligo (dT) mit 2 variablen Basen am 3'Ende bestand. Diese beiden Basen sollten eine sogenannte Ankerfunktion ausüben, um am Anfang das PolyA zu binden. Am anderen Ende des Oligo (dT) besaß dieser Primer eine Sequenz, die als Binderegion für die in der PCR verwendeten Primer diente. Die RT-PCR Reaktion wurde mit der Omniscript Revertase durchgeführt (3.4.1.5). In der PCR wurden die beiden unspezifischen Primer (UPML,UPMS), die die Sequenz des RT-PCR Primers beinhalten und je ein spezifischer Primer (GM-Rv1) eingesetzt und - wie unter 3.4.1.5 beschrieben - durchgeführt. Im Anschluß daran wurde eine „nested“-PCR (Primer: NUP, GM-Rv2) durchgeführt und ggf. in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die darin enthaltenen Banden in einer Größe von ca. 600 bp wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und in pGEM

Vektor kloniert (3.4.2.4). Durch Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Sequenz überprüft werden (Abb.8). Um den erhaltenen längeren offenen Leserahmen am 3`Ende zu bestätigen, wurde die cDNA von 3 weiteren Pferden (Tab.3) untersucht. Sie stimmten mit der ersten Sequenz überein.

**Tab.3:** Rasse und Geschlecht der untersuchten Pferde

| <b>Pferd</b>  | <b>Rasse</b> | <b>Geschlecht</b> |
|---------------|--------------|-------------------|
| Cherie        | Traber       | Stute             |
| Fiodora       | Vollblut     | Stute             |
| Jamina        | Pony         | Stute             |
| Dr. Doolittle | Warmblut     | Hengst            |

Die oben aufgeführten Pferde wurden zur Bestimmung der eq.GM-CSF Sequenz herangezogen. Die RNA der identischen Pferde wurde jeweils doppelt amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Ein Vergleich der kürzeren GM-CSF Sequenz (eq.GM-CSF ORF) mit der vollständigen (eq.GM-CSF RACE) zeigte, daß gegenüber anderen Spezies eine Base (Guanin) im 3`Bereich des ORF fehlt und der offene Leserahmen dadurch verschoben wurde. Der Leserahmen von eq.GM-CSF RACE endet erst an der Base 459 mit dem Stopkodon TAG (Abb.8).

Nach dem Stopkodon (TAG) folgten für das GM-CSF typische Poly ATTTA-Motive und ein Polyadenylierungssignal (AATAAA). Diese ATTTA-Motive wurden bei Genen gefunden, deren mRNA Transkripte durch eine kurze Halbwertszeit gekennzeichnet waren (Shaw & Kamen, 1986). Die Motive wurden für die Instabilität der Moleküle verantwortlich gemacht.

```

eq.GM-CSF ORF 10 20 30 40 50 60
eq.GM-CSF RACE ATGTGGCTTCAGAACCTGCTTCTTCTGGGCACTGTGGTTTACAGCATGCCCGCACCCACC

eq.GM-CSF ORF 70 80 90 100 110 120
eq.GM-CSF RACE CGCCAACCCAGCCCTGTCACTCGGCCCTGGCAGCATGTGGATGCCATCAAGGAGGCCCTG

eq.GM-CSF ORF 130 140 150 160 170 180
eq.GM-CSF RACE AGCCTTCTGAACAACAGTAGTGACACTGCTGCTATCATGAATGAAACAGTAGAAGTCGTC

eq.GM-CSF ORF 190 200 210 220 230 240
eq.GM-CSF RACE TCTGAAACGTTTGACGCCGAGGAGCTGACATGCCTGCAGACTCGCCTGAAGCTGTACAAA

eq.GM-CSF ORF 250 260 270 280 290 300
eq.GM-CSF RACE CAGGGCTTGC GGGGCAGCCTCATCAAGCTCGAAGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCAC

eq.GM-CSF ORF 310 320 330 340 350 360
eq.GM-CSF RACE TACAAGCAGCACTGCCCCCCACCCTGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATGATCACCTTC

eq.GM-CSF ORF 370 380 390 400 410 420
eq.GM-CSF RACE AAAAGTTTCAAAAAGAACCTGAAGGATTTCTGTTTGAGATCCCGTTTGACTGCTGGGAA
eq.GM-CSF RACE AAAAGTTTCAAAAAGAACCTGAAGGATTTCTGTTTGAGATCCCGTTTGACTGCTGGGAA

eq.GM-CSF ORF 430 440 450 460 470 480
eq.GM-CSF RACE CCAGCCCAGAAGTAA GGCAGGCCCTTCCAGCTAGGAGC TAG CCCTGGGAGCTCACCTCAC

eq.GM-CSF ORF 490 500 510 520 530 540
eq.GM-CSF RACE GATTGCTGCTGTCCCACTCACAAAGAACCGAAACTCAGGATCTTCAGCTTGGAGGGACCA

eq.GM-CSF ORF 550 560 570 580 590 600
eq.GM-CSF RACE AAGGGTGGGCCATGGCTGTTGAGAACATGGACTTGCTCTGGGCCGTA CTGACCACGATAT

eq.GM-CSF ORF 610 620 630 640 650 660
eq.GM-CSF RACE GGGTGTGGTAGGGGAGTAGGGGATATTTTACACTGGCGGGGATCAGTAATATTTATTTAT

eq.GM-CSF ORF 670 680 690 700 710 720
eq.GM-CSF RACE ATATTTATGTATTTAATATTTATTTATTTATTTAAGCTCATACTCCATATTTATT

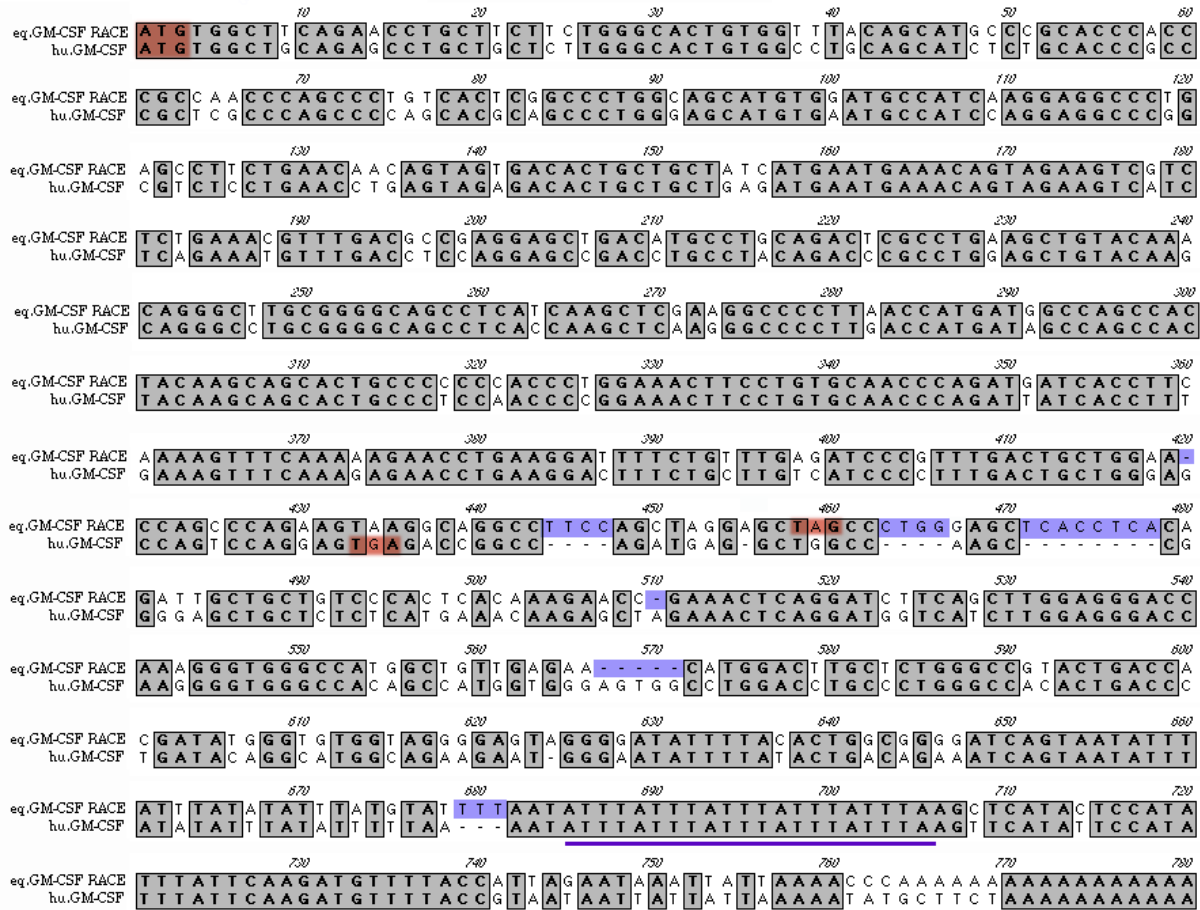
eq.GM-CSF ORF 730 740 750 760 770 780
eq.GM-CSF RACE CAAGATGTTTTACCATTAGAAATAAATTATTA AAACCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**Abb.8:** Vergleich der eq.GM-CSF ORF Sequenz mit der eq.GM-CSF RACE (GenBank: AY040203). Änderungen in der RACE-Sequenz sind hellblau hervorgehoben. Die korrekte Sequenz des C-Terminus ergab sich durch das RACE Verfahren. Das Stopkodon der korrigierten GM-CSF Sequenz ist dunkelrot markiert. Das PolyA ist schwarz unterstrichen, das Polyadenylierungssignal hellgrau und das Poly ATTTA blau.



Der Vergleich der Nukleotidsequenz von Pferd und Mensch bis einschließlich PolyA zeigte deutliche Unterschiede im nicht codierenden Bereich. An den ATTTA-Motiven stimmten sie wiederum weitestgehend überein (Abb.9).



**Abb.9:** Vergleich der cDNA von Pferd und Mensch einschließlich der Sequenz bis PolyA. Die fehlenden bzw. zusätzlichen Basen der eq.GM-CSF Sequenz sind blau hervorgehoben. Die Start- und Stopkodons sind rot. Das Poly ATTTA ist blau unterstrichen.

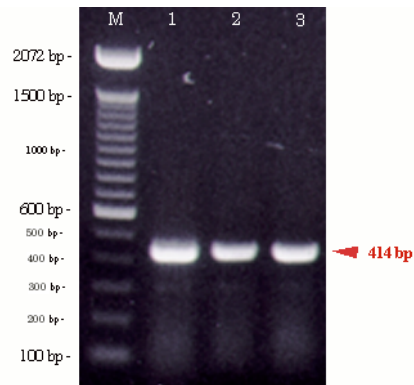
Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen verdeutlichen die Unterschiede im N-Terminus der resultierenden Proteine (Abb.10). Die Sequenzähnlichkeit von Mensch und Pferd liegt bei 77% (davon sind 71% der AS identisch).

|           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| eq.GM-CSF | M | W | L | Q | N | L | L | L | G | T | Y | Y | Y | S | M | P | A | P | T | R | Q | P | S | P | Y | T | R | P | W | Q | H | Y | D | A | I | K | E | A | L | S | L | L | N | S | S | D | T | A | A | I | M | N | E | T | Y | E | Y | Y |   |   |
| hu.GM-CSF | M | W | L | Q | S | L | L | L | L | G | T | Y | A | C | S | I | S | A | P | A | R | S | P | S | P | S | T | Q | P | W | E | H | Y | N | A | I | Q | E | A | R | R | L | L | N | L | S | R | D | T | A | A | E | M | N | E | T | Y | E | Y | I |
| eq.GM-CSF | S | E | T | F | D | A | E | E | L | T | C | L | Q | T | R | L | K | L | Y | K | Q | G | L | R | G | S | L | I | K | L | E | G | P | L | T | M | A | S | H | Y | K | Q | H | C | P | P | T | L | E | T | S | C | A | T | Q | M | I | T | F |   |
| hu.GM-CSF | S | E | M | F | D | L | Q | E | P | T | C | L | Q | T | R | L | E | L | Y | K | Q | G | L | R | G | S | L | T | K | L | K | G | P | L | T | M | I | A | S | H | Y | K | Q | H | C | P | P | T | P | E | T | S | C | A | T | Q | I | I | T | F |
| eq.GM-CSF | K | S | F | K | K | N | L | K | D | F | L | F | E | I | P | F | D | C | W | N | Q | P | R | S | K | A | G | L | P | A | R | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| hu.GM-CSF | E | S | F | K | E | N | L | K | D | F | L | L | Y | I | P | F | D | C | W | - | E | P | Y | Q | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**Abb.10:** Vergleich der Aminosäuresequenz von Pferd und Mensch von Startkodon bis Stopkodon. Die identischen AS sind dunkelgrau, die ähnlichen gelb und die unterschiedlichen sind beim Pferd rot dargestellt.

#### 4.1.3 eq.IL-4

Zu dem von D. Horohov, Baton Rouge, zur Verfügung gestellten, rekombinanten eq.IL-4 wurden trotz Nachfrage keine genaueren Informationen zum Protein mitgeteilt. Obschon eine Bioaktivität gemessen werden konnte, wurde das Protein nicht überexprimiert. In dem gegebenen Expressionssystem ließ es sich daher ohne diese Informationen nicht anreichern oder isolieren. Um proteinchemische Untersuchungen zu ermöglichen, wurde IL-4 neu kloniert. Zur Synthese von IL-4 wurden spezifische Primer, aus den beiden publizierten eq.IL-4 Sequenzen von Vandergriff und Mitarbeitern (GenBank: L06010) und Schrenzel und Mitarbeitern (GenBank: AF035404), entwickelt. Da diese Sequenzen sich in 2 Tripletts unterscheiden, wurden die Primer von der Längeren (Schrenzel) abgeleitet. Der längeren Sequenz wurde der Vorzug gegeben, da die Basenzahl eher mit der anderer Spezies übereinstimmte. Mit diesen Primern wurde die RNA aus stimuliertem Pferdeblut isoliert, cDNA hergestellt und IL-4 amplifiziert (Abb.11).



**Abb.11:** IL-4 RT-PCR aus ConA 48 h stimulierten Lymphozyten. Spuren 1-3 cDNA dreier Pferde in einer Länge von 414 bp (GenBank: AF305617). M = 100 bp Leitermarker.

Überraschend ergaben sich weitere Differenzen zu den veröffentlichten Sequenzinformationen. In der Sequenz von Schrenzel und Mitarbeitern fehlten 4 Triplets und in der von Vandergriff und Mitarbeitern (1994) 6 Triplets (Abb.12). Nach Absprache mit Horohov wurde seine Sequenz von ihm überarbeitet (Horohov, persönliche Mitteilung). Zur Kontrolle wurde von mir die RNA von 4 weiteren Pferden überprüft, die alle bis auf kleine Fehler (Punktmutationen/Basenaustausch) übereinstimmten. Diese Punktmutationen sind auf die relativ hohe Fehlerquote der Reversen Transkription zurückzuführen, wie durch mehrfaches Neuklonieren und Sequenzieren bestimmt werden konnte.

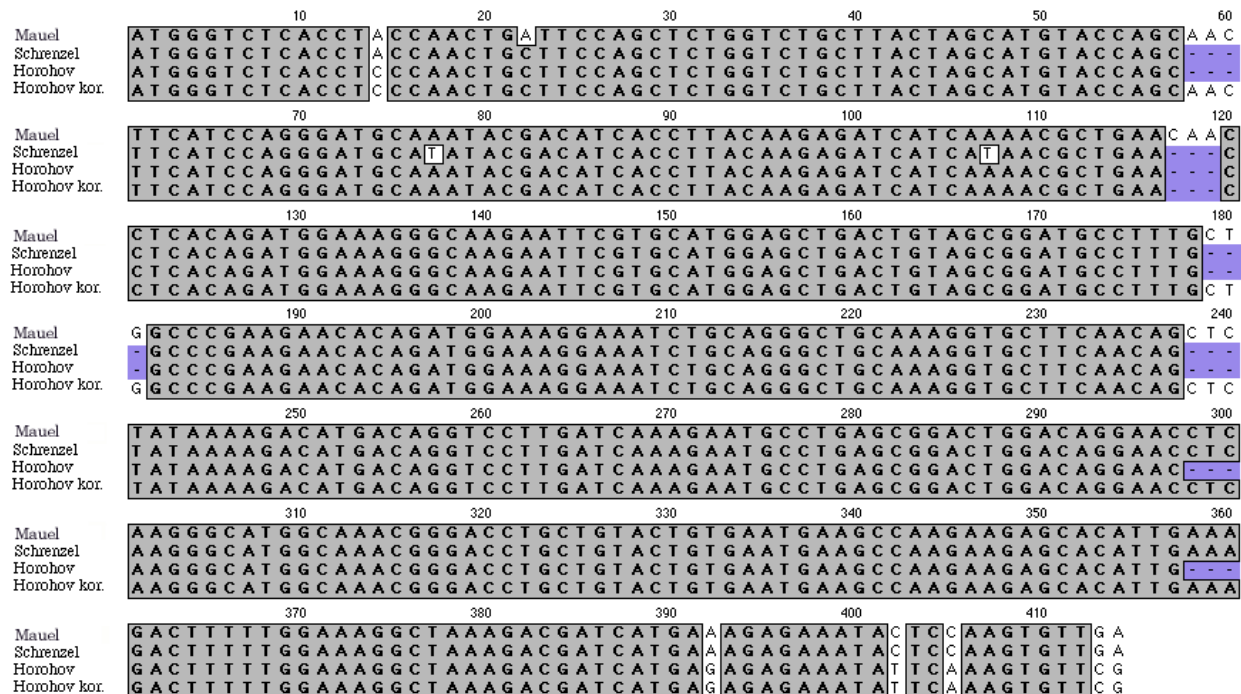
Die von mir klonierte verbesserte eq.IL-4 Sequenz ist in der Zwischenzeit publiziert (Mauel & Steinbach, 2000) und in GenBank (AF305617) eingetragen (Abb.12). Diese Sequenz wurde bei 5 unterschiedlichen Pferden (Tab.4) nachgewiesen, die jeweils doppelt amplifiziert, kloniert und sequenziert wurden. Die 20 Basen am Anfang und am Ende stimmen zwingender Weise mit der Sequenz von Schrenzel und Mitarbeitern überein, da die Primer davon abgeleitet wurden.

**Tab.4:** Rasse und Geschlecht der untersuchten Pferde

| Pferd       | Rasse     | Geschlecht |
|-------------|-----------|------------|
| Fiodora     | Vollblut  | Stute      |
| Nico        | Haflinger | Wallach    |
| Eranda      | Traber    | Stute      |
| Dumas       | Warmblut  | Wallach    |
| Dr Dolittle | Warmblut  | Hengst     |

Die oben aufgeführten Pferde wurden zur Bestimmung der eq.IL-4 Sequenz herangezogen. Die RNA der identischen Pferde wurde jeweils doppelt amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Des weiteren wurde, das F. Steinbach von D. Horohov zur Verfügung gestellte IL-4/CHO mit den gleichen Primern, ebenfalls doppelt amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die daraus resultierende Sequenz stimmte mit der von mir erstellten Sequenz überein. Daher liegt nahe, daß bei der veröffentlichten Sequenz (L06010) die Sequenzierung fehlerhaft war.



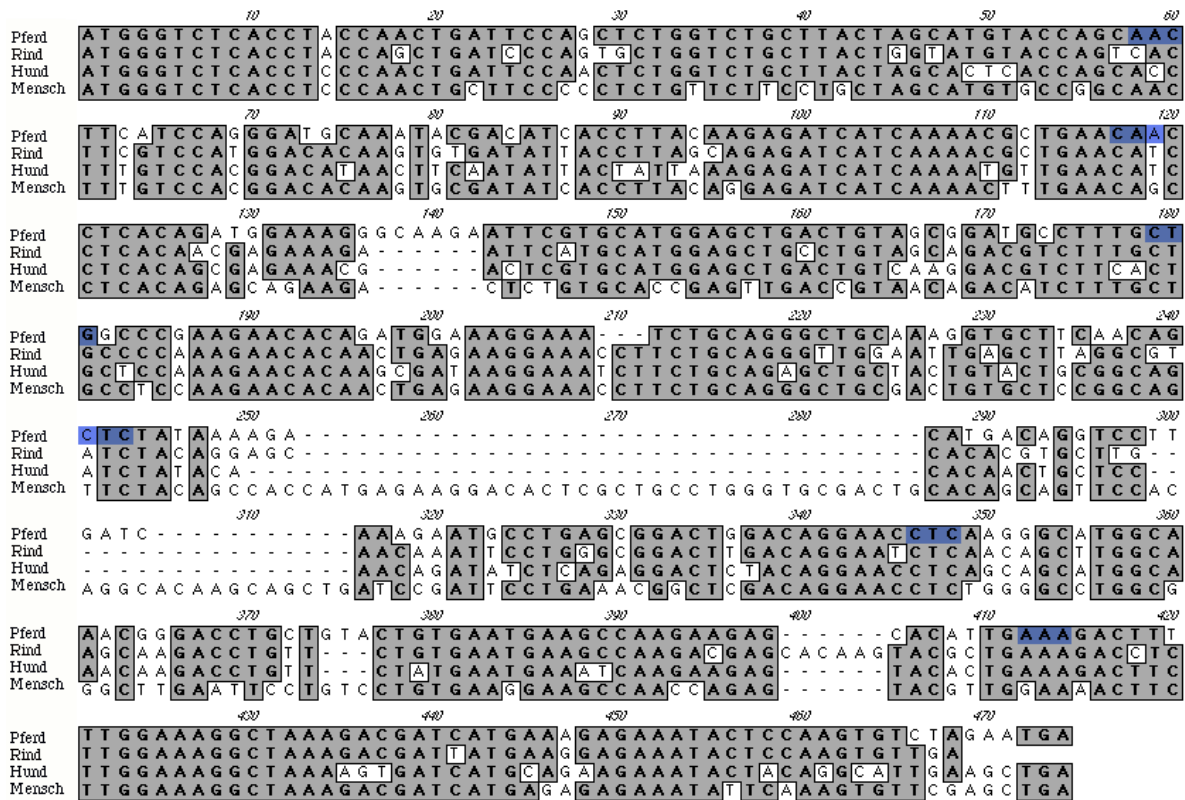
**Abb.12:** Vergleich der von mir erhaltenen cDNA von equinem IL-4 (GenBank: AF305617) mit der von Schrenzel und Mitarbeitern (AF035404) und Horohov, die unter Vandergriff und Mitarbeitern (L06010) veröffentlichten und der von Horohov korrigierten (persönliche Mitteilung). Die fehlenden Triplets sind blau unterlegt.

Der Vergleich der erstellten Proteinsequenzen zeigt deutlich, daß es sich um ganze Triplets bzw. AS handelt, die in den anderen Sequenzen fehlen (Abb.13). In der Sequenz von Schrenzel treten noch drei Mutationen durch Austausch der AS auf, die ich nicht bestätigen konnte. In meiner Sequenz ist eine AS durch eine ähnliche AS ersetzt. Ferner gibt es eine Mutation die beide publizierten Aminosäuresequenzen nicht besitzen (AS 60), die jedoch von D. Horohov in seiner korrigierten Sequenz bestätigt wurde.

|              |      |     |     |      |         |     |     |              |    |      |     |    |     |     |    |    |     |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
|--------------|------|-----|-----|------|---------|-----|-----|--------------|----|------|-----|----|-----|-----|----|----|-----|------|------|------|------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|
|              |      | 10  | 20  | 30   | 40      | 50  | 60  |              |    |      |     |    |     |     |    |    |     |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Mauel        | MGLT | Y   | QLI | PALY | CLLACTS | N   | FI  | QGCKYDITLQEI | I  | KT   | LN  | N  | LD  | GK  | GK | NS | CM  | ELTY | ADAF | A    |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Schrenzel    | MGLT | Y   | QLL | PALY | CLLACTS | -   | FI  | QGC          | Y  | DITL | QEI | I  | TLN | -   | LD | GK | GK  | NS   | CM   | ELTY | ADAF | G    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Horohov      | MGLT | S   | QLL | PALY | CLLACTS | -   | FI  | QGC          | KY | DITL | QEI | I  | KT  | LN  | -  | LD | GK  | GK   | NS   | CM   | ELTY | ADAF | G  |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Horohov kor. | MGLT | S   | QLL | PALY | CLLACTS | N   | FI  | QGC          | KY | DITL | QEI | I  | KT  | LN  | -  | LD | GK  | GK   | NS   | CM   | ELTY | ADAF | A  |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
|              |      | 70  | 80  | 90   | 100     | 110 | 120 |              |    |      |     |    |     |     |    |    |     |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Mauel        | G    | PK  | NT  | DG   | KEI     | CRA | AK  | YL           | QQ | L    | Y   | KR | HR  | SLI | KE | CL | SGL | DR   | NL   | KG   | MA   | NG   | TC | CT | Y  | NE | AK | K  | ST | L  | K |   |
| Schrenzel    | -    | PK  | NT  | DG   | KEI     | CRA | AK  | YL           | QQ | -    | Y   | KR | HR  | SLI | KE | CL | SGL | DR   | NL   | KG   | MA   | NG   | TC | CT | Y  | NE | AK | K  | ST | L  | K |   |
| Horohov      | -    | PK  | NT  | DG   | KEI     | CRA | AK  | YL           | QQ | -    | Y   | KR | HR  | SLI | KE | CL | SGL | DR   | N    | -    | KG   | MA   | NG | TC | CT | Y  | NE | AK | K  | ST | L | - |
| Horohov kor. | G    | PK  | NT  | DG   | KEI     | CRA | AK  | YL           | QQ | L    | Y   | KR | HR  | SLI | KE | CL | SGL | DR   | N    | L    | KG   | MA   | NG | TC | CT | Y  | NE | AK | K  | ST | L | K |
|              |      | 130 |     |      |         |     |     |              |    |      |     |    |     |     |    |    |     |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Mauel        | D    | F   | L   | E    | R       | L   | K   | T            | I  | M    | K   | E  | K   | Y   | S  | K  | C   |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Schrenzel    | D    | F   | L   | E    | R       | L   | K   | T            | I  | M    | K   | E  | K   | Y   | S  | K  | C   |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Horohov      | D    | F   | L   | E    | R       | L   | K   | T            | I  | M    | R   | E  | K   | Y   | S  | K  | C   |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |
| Horohov kor. | D    | F   | L   | E    | R       | L   | K   | T            | I  | M    | R   | E  | K   | Y   | S  | K  | C   |      |      |      |      |      |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |

**Abb.13:** Vergleich der von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz von equinem IL-4. Die fehlenden Aminosäuren bei Schrenzel 4, bei Horohov 6 und bei der korrigierten Horohov Sequenz 1 sind blau unterlegt. Die AS 5 und 131 sind primerbedingt.

Die cDNA von Pferd, Rind, Hund und Mensch zeigten bei IL-4 deutliche Unterschiede in den Basen und deren Anzahl (Abb.14). Die Identität der cDNA Sequenz von Pferd zum Rind beträgt 79%, zum Hund 73% und zum Menschen 67%.



**Abb.14:** Vergleich der cDNA IL-4 von Pferd (GenBank: AF305617), Rind (M77120), Hund (AF054833) und Mensch (NM-000589). Die blau unterlegten Basen stellen die fehlenden Triplets in der Horohov Sequenz dar.

Der Vergleich der Proteinsequenz von Pferd zu den anderen Spezies ergab größere Unterschiede, als bei den anderen in dieser Dissertation behandelten equinen Zytokinen (Abb.15). Das Pferd hat mit dem Rind 73% ähnliche AS (davon sind 65% identisch). Der Hund besitzt noch 69% (54% Identität) und der Mensch nur noch 65% Sequenzähnlichkeit (54% Identität). Dies kann als Merkmal für die beschriebene Speziespezifität von IL-4 angesehen werden.

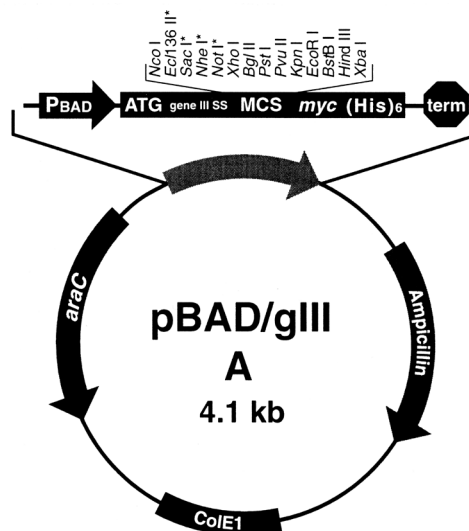


## 4.2 Expression rekombinanter Zytokine

Da die Zytokine GM-CSF, IL-4 und IFN in anderen Spezies (z.B. Mensch), in glykosylierter Form vorliegen, wurden neben dem häufig verwendeten prokaryotischen System, auch mehrere eukaryotische Expressionssysteme getestet.

### 4.2.1 Prokaryotisches Expressionssystem: Vektor pBAD/gIII

Das bakterielle Vektorsystem pBAD/gIII (Abb.16) war im Institut für Virologie bereits im Rahmen einer Promotionsarbeit zu eq.Typ I Interferonen (eq.IFN , eq.IFN ) etabliert worden (Beier, 1999). Die exprimierten Proteine werden mit einer bakteriellen Signalsequenz gIII und einem myc/HisTag versehen. Die Signalsequenz soll das Eindringen des Protein in den periplasmatischen Raum

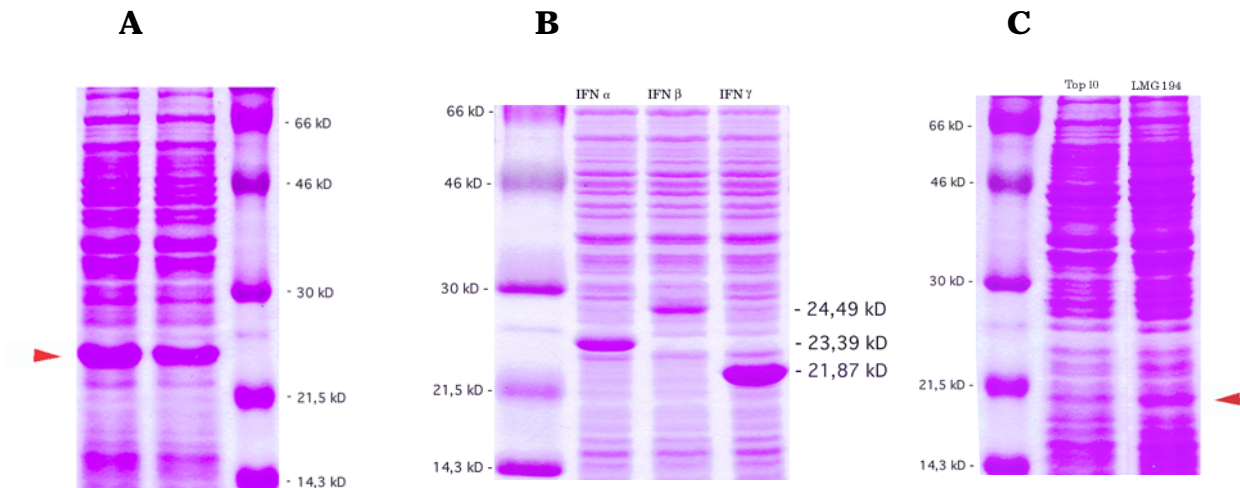


**Abb.16:** Schematische Darstellung des Vektors pBAD gIII (4,1 kb, Invitrogen). gIII ist verantwortlich für die Sekretion des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen Raum. Um eine optimale Sekretion zu erreichen, enthält der Vektor den araBAD-Promotor ( $P_{BAD}$ ), der durch L-Arabinose induziert wird und durch das Regulatorprotein araC reguliert. Weiterhin enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

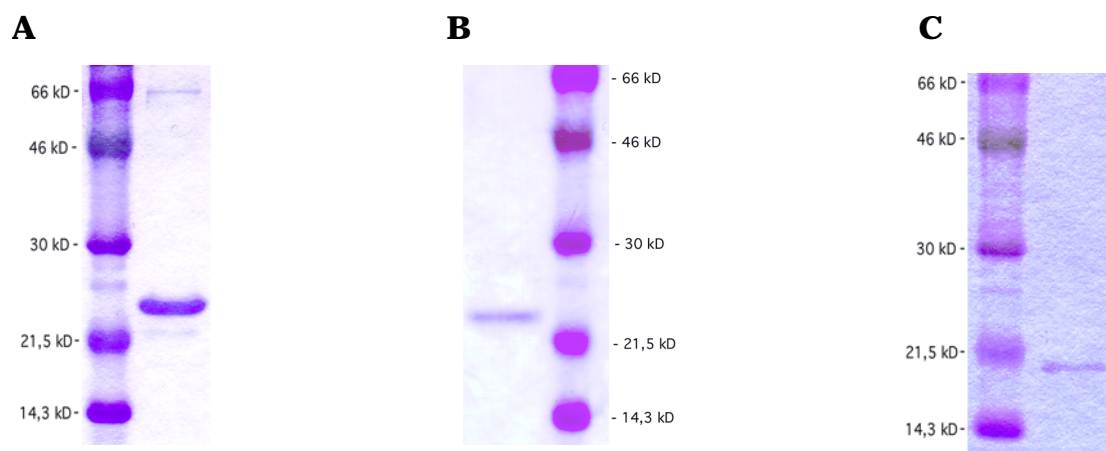


bewirken. Der HisTag am C-Terminus ermöglicht die Aufreinigung des exprimierten Proteins und das myc-Epitop eine Detektion mit Antikörpern. Die Induktion der Protein Expression erfolgt durch L-Arabinose Zugabe.

Die eq.Zytokine wurden zuerst mit speziellen Primern (Tab.2, pBAD/gIII), die die Restriktionsschnittstellen (*NotI/XbaI*) der multiplen Klonierungsstelle (MCS) enthielten, amplifiziert. Dann wurden sie in den Klonierungsvektor ligiert (3.4.2.1) und in *E.coli* (Stamm Top 10) transformiert (3.4.2.4). Anschließend wurden Klone in Übernachtskulturen angezüchtet, das Plasmid präpariert (3.4.2.6) und mit den spezifischen Restriktionsenzymen verdaut (3.4.2.7). Nach Auftrennung im Agarosegel (3.4.1.6) wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und die Zytokin-DNA isoliert (3.4.1.7). Anschließend wurde sie in den Vektor pBAD/gIIIA umklontiert (3.4.2). Einige Klone wurden in Übernachtskulturen angezüchtet, 4 h bei 30°C mit L-Arabinose induziert (3.4.2.5) und das Protein im SDS-Gel dargestellt (3.5.1). Bei einigen Klonen von IFN und GM-CSF konnte eine deutliche Überexpression nachgewiesen werden, dies gilt jedoch nicht für IL-4. Bei IL-4 konnte erst nach Umklonierung in den Bakterienstamm LMG 194 eine schwache Expression mit Arabinose erreicht werden (Abb.17). Eine Schwierigkeit bestand in der Bildung von Einschlußkörpern (inclusion bodies), obschon der Vektor (pBAD/gIII) eigentlich für einen Transport des Proteins in den periplasmatischen Raum optimiert war. Erst nach deren Aufarbeitung (3.5.5) konnten größere Mengen des Proteins gewonnen und über Affinitätschromatographie (3.5.6) aufgereinigt werden (Abb.18).



**Abb.17:** Expression von (A) eq.GM-CSF; (B) eq.IFN und (C) eq.IL-4 in Bakterien. Die Proteine sind mit Coomassie blau gefärbt. Der Marker diente einer ungefähren Schätzung der Molmasse, die berechneten Molmassen für die Interferone sind neben den exprimierten Zytokinen angegeben. A) zeigt 2 Klone eq.GM-CSF. In (B) wurden die eq.Interferone  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  nebeneinander aufgetragen. C) In *E.coli* Top 10 konnte nach Arabinose Zugabe für eq.IL-4 keine Überexpression im Gel dargestellt werden (links), sondern nur nach Umklonierung in den *E.coli* Stamm LMG 194 (rechts).

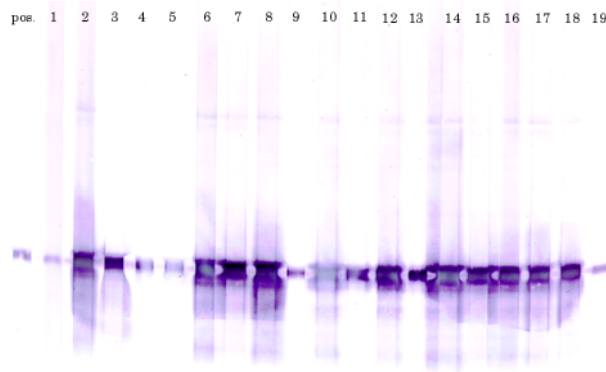


**Abb.18:** Coomassie blau gefärbtes SDS-Gel der Proteine nach Aufreinigung. Die Proteine der Bakterienkulturüberstände wurden über HisTag Säulen aufgereinigt (3.5.4/3.5.5), mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen eluiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Die eluierten Proben wurden mit Coomassie blau gefärbt (3.5.2). Dargestellt ist in (A) eq.GM-CSF, in (B) eq.IFN und in (C) eq.IL-4.

Die rek. Proteine enthielten am N-Terminus ein klonierungsbedingte gIII Signalpeptid und am C-Terminus ein myc/HisTag, die zusammen eine Masse von 4,58 kD ausmachten. Um die tatsächliche Molmasse der exprimierten

eq.Zytokine zu erhalten, mußte die Molmasse um die Größe des Signalpeptids, His- und Myc-Restes vermindert werden. Das bedeutet, daß die Molmasse von eq.GM-CSF bei 19,54 kD, IFN bei 21,87 kD und IL-4 bei 17,65 kD liegt.

Für spätere Untersuchungen des IFN Proteines wurden IFN spezifische monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt. Die Immunisierung der Balb/c Mäuse (3.6.1) erfolgte mit dem aufgereinigten, bakteriellen rek. Protein. Nach der Fusion von Myelomzellen (P3X-Zellen) mit den Milzzellen der immunisierten Maus konnten spezifische Hybridomzellklone mit HAT selektioniert werden. Die Testung erfolgte im ELISA (3.5.4) mit dem bakteriellen rek. Protein. Der ELISA wurde für die positiven Klone mehrmals wiederholt und dann wurden sie im Westernblot getestet (Abb.19). Dazu wurde das aufgereinigte Protein in einem Semidry-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und in einer Kammer mit den unverdünnten Hybridomzell-Überständen für 1 h inkubiert (3.5.3). Als Positivkontrollen dienten Maus-anti-tetra-His Ak und polyklonales anti-Serum.

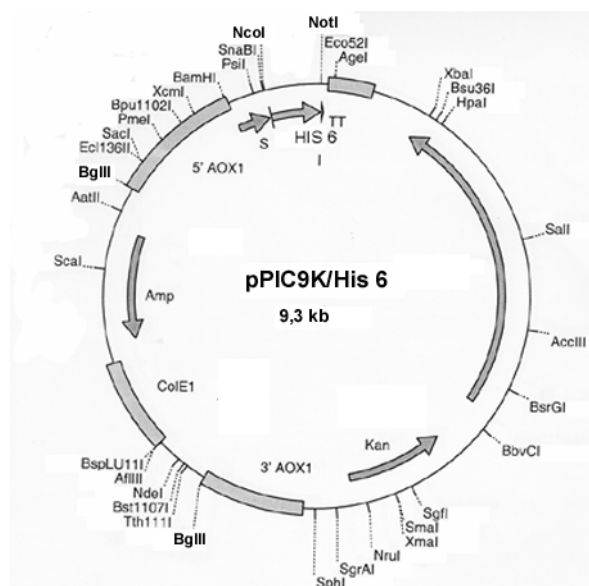


**Abb.19:** Westernblot des in *E.coli* exprimierten eq. IFN . Die Detektion des Proteines erfolgte über die aus bakteriellem rek. Protein hergestellten mAk (Bande 1-19) und als Positivkontrolle polyklonales anti-Serum (Bande pos.).

## 4.2.2 Eukaryotische Expressionssysteme

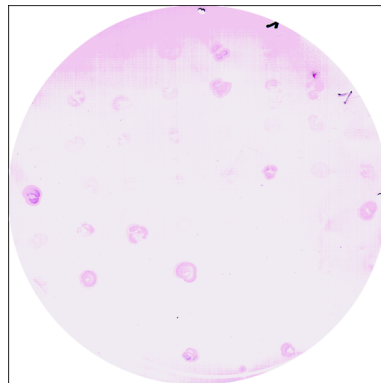
### 4.2.2.1 Expression in Hefe: Vektor pPIC9K/His 6

Die Expression von Fremdproteinen in *P.pastoris* beruht auf der chromosomalen Integration der Expressionskassette, deren Enden partiell homolog zu DNA-Sequenzen des Hefegenoms sind. Dieser Vektoranteil favorisiert eine Integration der Expressionskassette im Bereich der AOX1-Gene von *P.pastoris*. Dieser Integrationsort hat sich bei zahlreichen Transformationen als besonders günstig erwiesen (Cregg et al., 1987; Clare et al., 1991a und 1991b). Das Gen wurde wie beschrieben vor der Transformation mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den Hefevektor (Abb.20) in *E.coli* umkloniert (3.4.2.3).



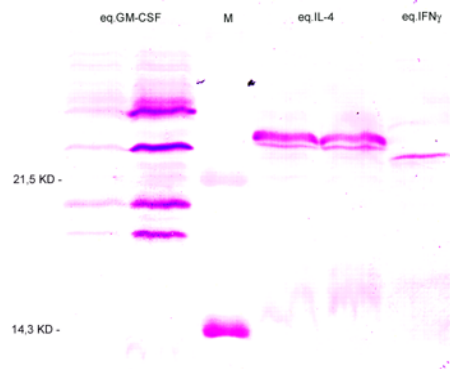
**Abb.20:** Der Hefeexpressionsvektor pPIC9K/His6 (9,3 kb, RWTH Aachen) leitet sich von dem Vektor pPIC9K (9,3 kb, Invitrogen) (Higgins & Cregg, 1998) ab. Er kann in *E.coli* amplifiziert werden und ist integrativ in *P.pastoris*. Durch homologe Rekombinationen wird die Expressionskassette stabil in das Hefegenom integriert. Die Expressionskassette des Vektors besteht aus der AOX1-Promotersequenz, an die sich das Sekretionssignal des  $\alpha$ -Präpro-Paarungsfaktors aus *S. cerevisiae* anschließt, das die Sekretion des exprimierten Fremdproteins in das Kulturmedium bewirkt. Die 3'-UT wird von der 3'-AOX1-Transkriptionsterminationssequenz gebildet. Des Weiteren trägt der Vektor das His6-Gen, das für die Histidinoldehydrogenase kodiert und als Selektionsmarker zur Identifizierung rekombinanter Hefezellen fungiert, sowie das Km-Gen, das neben Kanamycin auch Resistenz gegen das Antibiotikum g418 verleiht.

Nach Linearisierung des Plasmids (*BgIII*) erfolgte die Transformation der Konstrukte in den *P.pastoris* Stamm GS 115 mittels Elektroporation (3.4.3.3). Nach 3-4 tägiger Inkubation wurden Hefeklone im Schachbrettmuster auf Masterplatten übertragen und nach Anwachsen durch Abklatsch auf Nitrocellulosemembran transferiert. Diese Membranen wurden für 2 Tage auf induzierende methanolhaltige Agarplatten gelegt und anschließend im Kolonie-Blot (3.4.3.6) auf Proteinexpression getestet (Abb.21).



**Abb.21:** Kolonie-Blot vom Abklatsch der Expressionskulturen. Die Detektion der Proteine erfolgte über HisTag durch die Nachweis-Antikörper Maus-anti-tetra-His. Die violett dargestellten Kolonien sind His positiv.

Hierzu wurden als Nachweis-Antikörper Maus-anti-tetra-His verwendet. Die Überexpression war sehr gering, so daß die positiven Klone in Flüssigkultur angezüchtet und die Expression der Fremdproteine mit Methanol erneut induziert wurden. Die Überstände wurden im Westernblot (3.5.2) mit Maus-anti-tetra-His Antikörpern und NBT/BCIP-Farbreaktion getestet, wobei auch hier eine schwache Farbreaktion beobachtet werden konnte und bei GM-CSF multiple Banden auftraten. (Abb.22)



**Abb.22:** Westernblot der in *P.pastoris* exprimierten eq.Zytokine. Die im Kolonie-Blot leicht positiven Klone wurden angezchtet, induziert und im Westernblot dargestellt. Die Detektion der Proteine erfolgte über HisTag durch Antikörper Maus-anti-tetra-His. M = Marker

Zusätzlich wurden die positiven Klone auf Agarplatten mit unterschiedlich hohen g418 Konzentrationen selektioniert (Scorer et al., 1994). Dies dient der Identifizierung möglicher multi-copy Klone, d.h. Klone, die mehr als eine Expressionskassette ins Genom integriert haben. Dabei korreliert die Anzahl der integrierten Expressionskassetten mit dem Resistenzgrad gegen g418 (Kanamycin Resistenzgen). Entsprechend haben multi-copy Klone eine höhere Antibiotika-Toleranz als Klone, die nur eine Kopie der Expressionskassette enthalten. Wichtig für die erfolgreiche Selektion war das Auftragen identischer Konzentrationen der Klone und eine Auswertung nach max. 4 Tagen (3.4.3.5). Für die Klone IL-4 D2 und IL-4 H1 bzw. IFN A6 und IFN B8 bzw. GM-CSF G12, GM-CSF H1 und GM-CSF D11 konnte eine Resistenz gegen 2 mg/ml bzw. 0,5 mg/ml nachgewiesen werden, so daß die Klone mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere Expressionskassetten integriert hatten (Tab.5). Diese in beiden Tests positiven Klone wurden zur Fermentation eingesetzt, die an der RWTH Aachen in Kooperation mit Stefan Hellwig (AG Prof. R. Fischer) erfolgte. Die rek. Zytokine konnten nicht im Überstand der Hefekulturen nachgewiesen werden. Sie konnten nur in sehr geringen Mengen aus der Hefe isoliert und dargestellt werden (Daten nicht dargestellt).

**Tab.5:** g418 Selektion rekombinanter *P. pastoris* Klone.

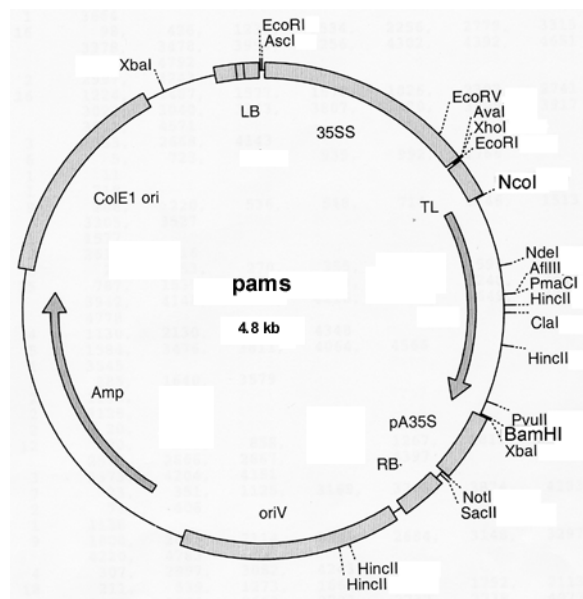
| Klon       | Konzentration des Antibiotikums g418 |            |           |         |         |
|------------|--------------------------------------|------------|-----------|---------|---------|
|            | 0,0 mg/ml                            | 0,25 mg/ml | 0,5 mg/ml | 1 mg/ml | 2 mg/ml |
| IFN A6     | +                                    | +          | +         |         |         |
| IFN B8     | +                                    | +          | +         |         |         |
| IFN A7     | +                                    | +          |           |         |         |
| IFN D11    | +                                    | +          |           |         |         |
| IL-4 D2    | +                                    | +          | +         | +       | +       |
| IL-4 H1    | +                                    | +          | +         | +       | +       |
| GM-CSF G12 | +                                    | +          | +         | +       | +       |
| GM-CSF H1  | +                                    | +          | +         | +       |         |
| GM-CSF A6  | +                                    | +          |           |         |         |
| GM-CSF D11 | +                                    | +          | +         |         |         |
| Ko         | +                                    |            |           |         |         |

+= Wachstum

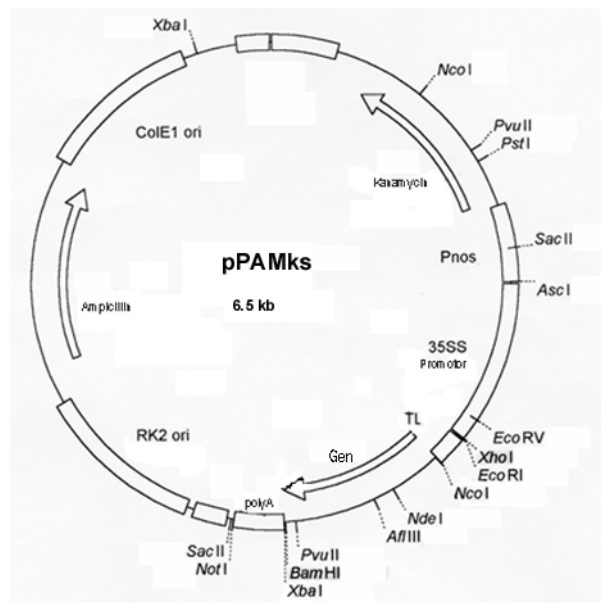
#### 4.2.2.2 Expression in Pflanzen: Vektoren pams und pPAMks

Diese Vektoren wurden mir freundlicherweise von *Thomas Rademacher*, Institut für Biologie der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden die Zytokine in einem Zwischenschritt über die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* in den Vektor pams (Abb.23) kloniert. Da der Pflanzenvektor keine direkte multiple Klonierungsstelle besitzt und selbst zwei *NcoI* Schnittstellen hat, mußte der Zwischenvektor pams verwendet werden. Dazu wurden geeignete Primer hergestellt (Tab.2, pPAMks), die im Fall des 3'Primers vor dem Stopkodon eine carboxyterminale KDEL-Aminosäuresequenz und HisTag integriert hatten. Diese KDEL-Sequenz soll sicher stellen, daß das Protein nach dem Transport im endoplasmatischen Retikulum (eR) zurückgehalten wird und diene gleichzeitig, wie auch der HisTag, dem Antikörpernachweis im Westernblot. Am 5'Primer wurde, wie auch im Säugetier System die Kozak-Sequenz berücksichtigt (Lukaszewicz et al., 2000). Anschließend wurde das eingefügte Insert in den

Vektor pPAMks über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BamHI* (Abb.24) umklontiert (3.4.2.4).



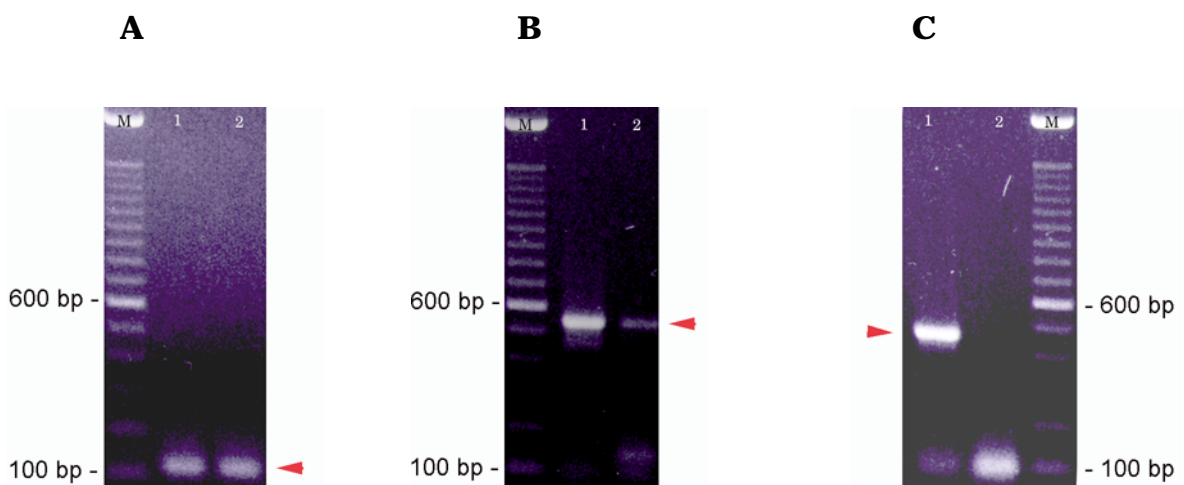
**Abb.23:** Der Zwischenvektor pams (4,8 kb, RWTH Aachen) wird in *E.coli* repliziert. Er besitzt den 35SS-Promotor, er ist nicht geeignet für Ampicillin resistente Bakterien. Als direkter Pflanzenvektor kann er keine Verwendung finden, da ihm die Selektionierung mit g418 fehlt. oriV, origin of replication in vegetation; LB, left boder; RB, right boder; TL, Tobacco Etchvirus leader.



**Abb.24:** Dieser Pflanzenexpressionsvektor pPAMks (6,5 kp; RWTH Aachen) wird sowohl in *E.coli* als auch in *A.tumefaciens* repliziert. Er enthält den 35SS Promotor und den Promotor der Nopalsynthese (Pnos). Ferner besitzt er Resistenzgene für Ampicillin, Kanamycin und Cabenicillin.

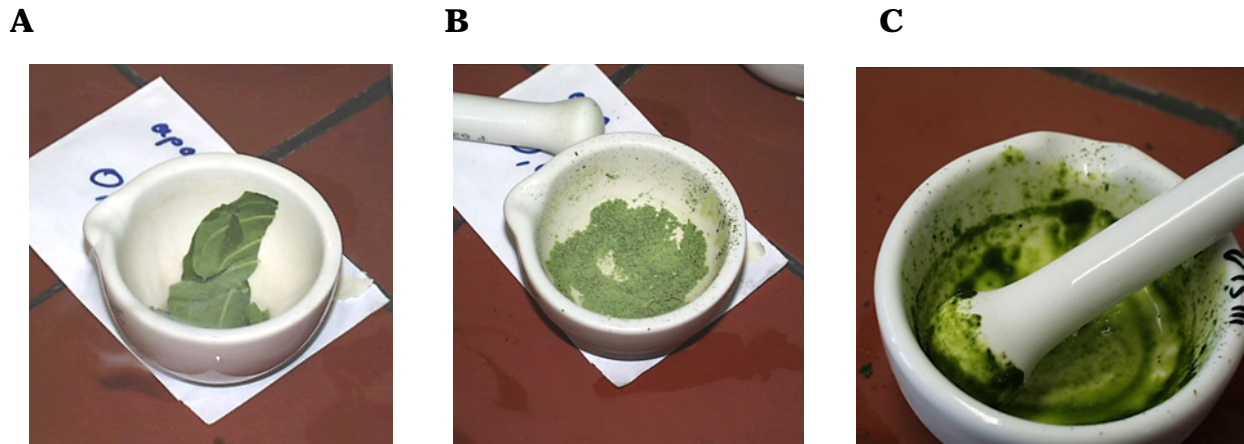


Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* XL-Gold, wurden positive Klone durch einen Testverdau mit *EcoRI* und *AscI* identifiziert. Für die transiente Expression der Zytokine in *N.tabacum* wurde die Plasmid-DNA zunächst in kompetente *A.tumefaciens* durch Hitzeschock (3.4.5.3) transformiert. Die Klone, die auf den Selektivplatten mit Kanamycin gewachsen waren, wurden in einer Kontroll-PCR (3.4.5.4) auf das Vorhandensein der pPAMks-Plasmide analysiert (Abb.25). Von zwei der positiven Klone wurden Stammkulturen angelegt.

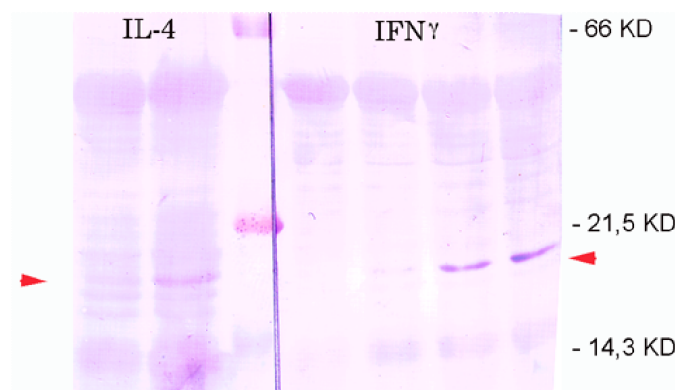


**Abb.25:** Kontroll-PCR der rek. Agrobakterien. A) Spur 1+2 eq.GM-CSF mit internen Primern, die ein Amplifikat der Größe 111 bp herstellen, B) Spur 1+2 eq.IFN der Größe 540 bp und C) Spur 1 eq.IL-4 der Größe 460 bp und Spur 2 negative Transformation in Agrobakterien. M = 100 bp Leitermarker.

Die weiteren Experimente konnten von mir im Institut für Biologie VII, der RWTH Aachen durchgeführt werden. Dort wurden die Agrobakterien in Acetosyringon-haltigen Medien 30 h bei 28°C kultiviert (3.4.5.5). Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert, ÜN in Induktionsmedium bei 28°C kultiviert, erneut sedimentiert und in MMA-Medium 2 h bei RT inkubiert. Pro Konstrukt wurden drei frisch geerntete Tabakblätter in den rek. *A.tumefaciens*-Kulturen durch die Vakuuminfiltration (3.4.5.6) transformiert. Die transiente Expression der Proteine in den Pflanzenzellen erfolgte für 3 Tage in der Phytokammer. Die Isolierung der Proteine erfolgte durch Aufschluß der Blätter (3.5.7) (Abb.26). Die so hergestellten Extrakte wurden im Westernblot analysiert (3.5.2) (Abb.27).



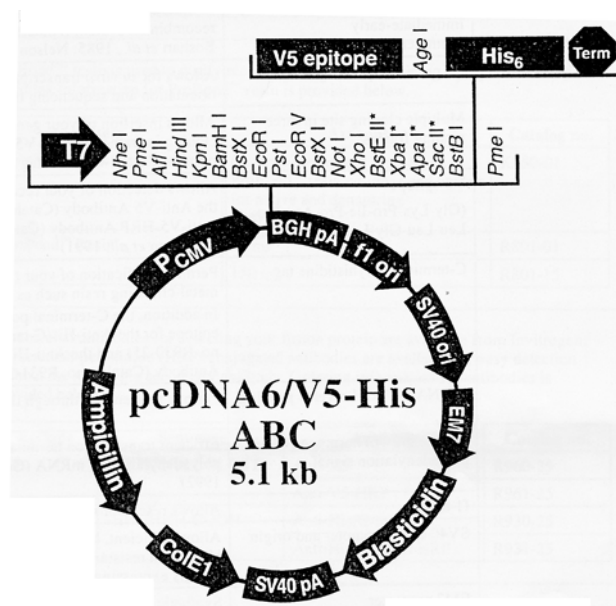
**Abb.26:** Aufschluß der rek. Proteine aus Tabakblättern. A) die Tabakblätter wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren, in einen Mörser gegeben und B) zu feinem Pulver zerrieben. C) Mit Extraktionspuffer versetzt, wurden sie aufgeschlossen.



**Abb.27:** Westernblot der transienten Expression in *N.tabacum*. Die Detektion der Proteine erfolgte für IL-4 mit polyklonalem humanen IL-4 Antikörpern (RWTH Aachen) und für IFN mit polyklonalem IFN Serum von Mäusen. Die Pfeile markieren die Banden der exprimierten Proteine.

#### 4.2.2.3 Expression in Säugetierzellen: Vektoren pcDNA6/V5-His und BCMGSneo

Zur Expression der eq.Zytokine mußten die entsprechenden cDNAs in einen geeigneten Vektor für Säugetierzellen kloniert werden. Hierzu wurden die eq.Zytokine zunächst erneut mit spezifischen Primern (Tab.2, pcDNA6/V5 bzw. BCMGSneo) amplifiziert und mit den geeigneten Restriktionsenzymen (*AflIII/XbaI* bzw. *XhoI/NotI*) in die Expressionsvektoren pcDNA6/V5-His und BCMGSneo ligiert (3.4.2.3). Ferner wurde darauf geachtet, daß beim 5´Primer vor dem ATG die Kozak Consensus Sequenz berücksichtigt wurde (Kozak, 1989). Diese Sequenz initiiert die Translation von dem ersten ATG an. Der Vektor pcDNA6/V5-His (Abb.28) wurde gewählt, um den Nachweis und die Aufreinigung der exprimierten Zytokine über HisTag zu ermöglichen, da bislang keine eq.Antikörper verfügbar sind und Antikörper gegen humane Zytokine nur bedingt kreuzreagieren.

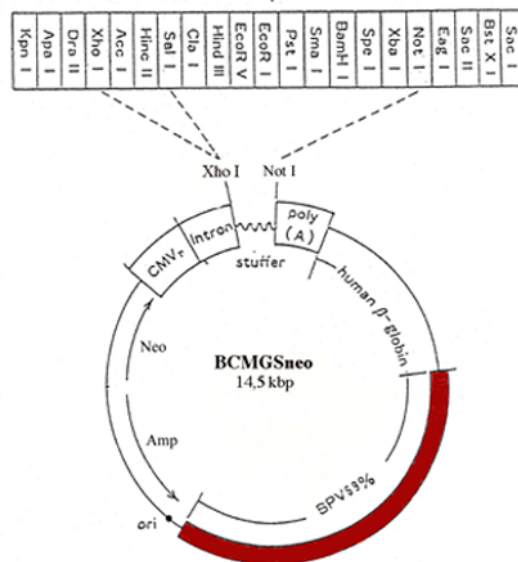


**Abb.28:** Der Säugetier Expressionsvektor pcDNA6/V5-His (5,1 kb, Invitrogen) leitet sich von dem pcDNA 3.1 Vektor ab. Er zeichnet sich durch Selektion mit Blastidicin in Säugetierzell-Linien, als auch in *E.coli* aus und ermöglicht eine Aufreinigung mit His- oder V5 Antikörpern.

Dieses Vektorsystem erwies sich als wenig geeignet, da es bei IFN Schwierigkeiten mit der Wahl der Restriktionsenzyme gab (interne

Schnittstellen). Nachdem dieses Problem gelöst werden konnte, gelang jedoch die Transfektion in P3X-Zellen mit dem IFN -Plasmid nicht. IL-4 haltige Plasmide wurde erfolgreich in P3X-Zellen transfiziert, doch in *in vitro* Versuchen ließ sich für IL-4 nur eine sehr geringe biologische Aktivität zeigen (4.3.2.1).

Als geeignetes Expressionssystem erwies sich der Vektor BCMGSneo (Abb.29). Dieser wird nicht in das Genom der Zelle integriert, sondern kann sich selbstständig episomal replizieren (Karasuyama et al., 1990). Ferner hat sich dieses Vektorsystem bei der rek. Zytokinexpression als erfolgreich erwiesen (Karasuyama & Melchers, 1988). Die P3X-Zellen (Maus B-Zell-Linie), sind spezialisiert für die Protein Sekretion und des weiteren sind sie in der Lage, unter serumfreien Bedingungen zu wachsen.

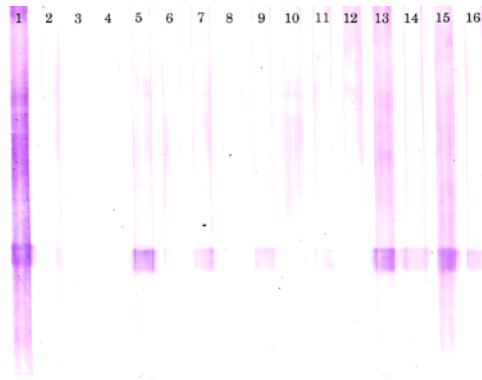


**Abb.29:** Das Säugetierzell-Expressionssystem BCMGSneo (14,5 kb, Karasuyama, Tokio) besitzt einen BPV- Promotor. Das Plasmid wird nicht wie bei vielen anderen eukaryotischen Expressionssystemen in das Genom der Zelle integriert, sondern besitzt die Fähigkeit sich selbstständig episomal zu replizieren. Zur Selektion der transfizierten Zellen dient das Km-Gen, das eine Kanamycin- und auch g418-Resistenz verleiht.

Das Plasmid wurde wie oben beschrieben unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme (*XhoI* und *NotI*) in *E.coli* XL-10 umklontiert. Anschließend wurden ausreichende Mengen an Plasmid-DNA in einer DNA-Minipräparation

(3.4.2.6) hergestellt, die dann zur Transfektion in P3X-Zellen eingesetzt wurden (3.4.4.1).

Im Westernblot wurde rek. IFN mit dem aus bakteriellem rek. Protein hergestellten mAk nachgewiesen (Abb.30). Es wurde wie unter 4.2.1 vorgegangen. Die geringe Menge der positiven mAk ließ darauf schließen, daß einige der mit dem bakteriellen Protein getesteten positiven mAk gegen gIII oder das myc/His Epitop gerichtet waren.

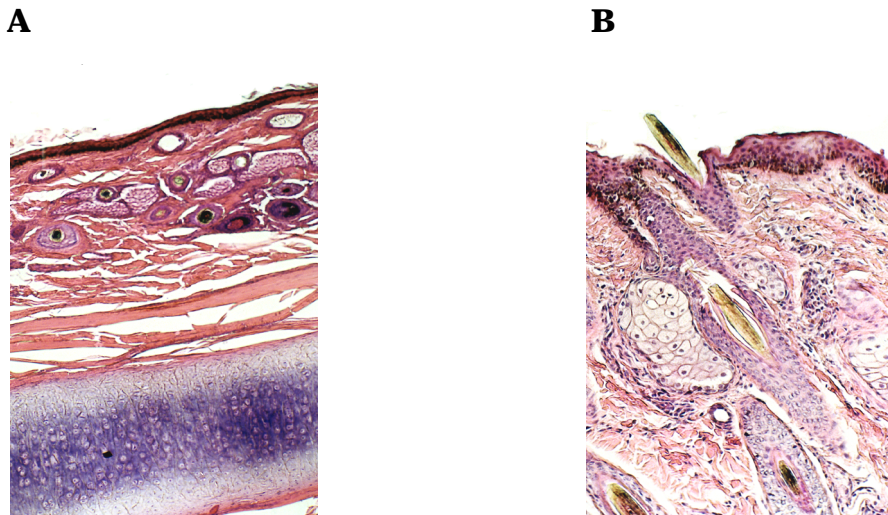


**Abb.30:** Westernblot unter Verwendung des in P3X-Zellen exprimierten eq. IFN. Die Detektion des Proteines erfolgte über die hergestellten mAk (Spur 2-16) und als Positivkontrolle polyklonales anti-Serum (Spur 1).

## 4.3 Isolierung, Differenzierung und Charakterisierung monozytärer Zellen

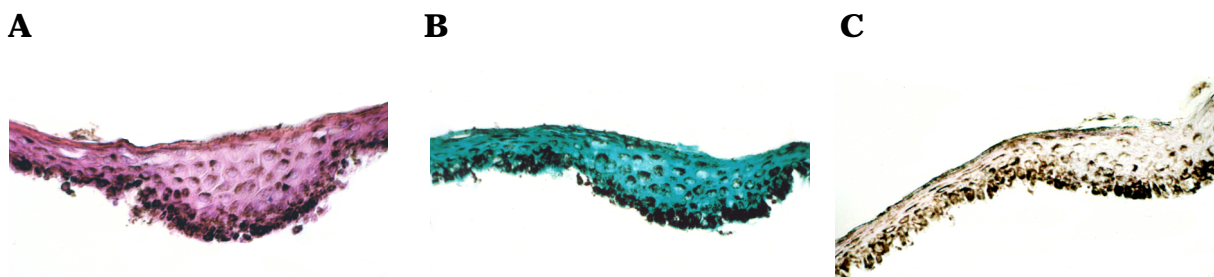
### 4.3.1 Isolierung der Langerhans Zellen aus der Haut

Die Langerhans Zellen (LC), die in der Haut und in den Schleimhäuten liegen, gelten als Prototyp unreifer dendritischer Zellen (Steinman, 1991; Peters et al., 1996; Banchereau & Steinman, 1998). Pferdeohren wurden gewählt, da die Haut relativ dünn ist und ohne viel Bindegewebe direkt auf dem Knorpel aufliegt. Von den einzelnen Arbeitsschritten wurden histologische Präparate (in Kooperation mit dem Institut für Veterinär-Pathologie, FU Berlin) angefertigt (Abb.31).

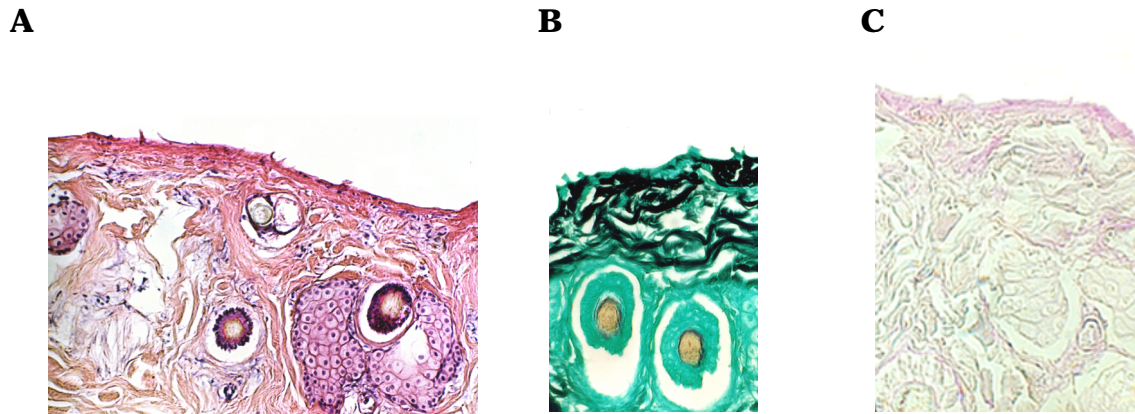


**Abb.31:** Übersicht der Haut des Pferdeohres. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) stellt sich der Knorpel und die Zellkerne blau dar, das übrige Gewebe in verschiedenen Rotabstufungen. A) Dem Knorpel liegt die Dermis mit den Drüsen und Haarfollikeln auf und daran schließt sich die dünne Epidermis an (Vergr.: 25x). B) In stärkerer Vergrößerung: obere Dermis mit Haarfollikel nebst Talgdrüse und darüberliegender Epidermis (Vergr.: 50x).

Die Haut wurde vorsichtig vom Knorpel präpariert und mit Trypsin oder mit Dispase II (Boehringer Ingelheim) behandelt, um die Epidermis von der Dermis zu trennen. Dieses gelang mit Trypsin nur schlecht und nur unter starker mechanischer Einwirkung (3.2.1). Dispase II hingegen löst die Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis auf (Abb.32 + 33).

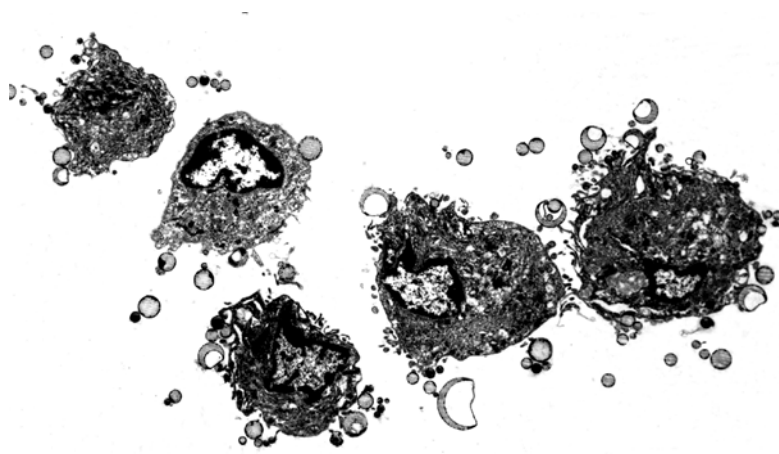


**Abb. 32:** Darstellung der Epidermis nach der Präparation. Die histologischen Schnitte wurden mit unterschiedlichen Färbetechniken gefärbt. A) HE-Färbung B) Grocott-Färbung C) PAS-Reaktion. Mit der PAS-Reaktion, so wie auch mit der Grocott Färbung ließe sich die Basalmembran darstellen. (Vergr.: 100x) Diese war jedoch nach Dispase II Verdau nicht mehr zu sehen.



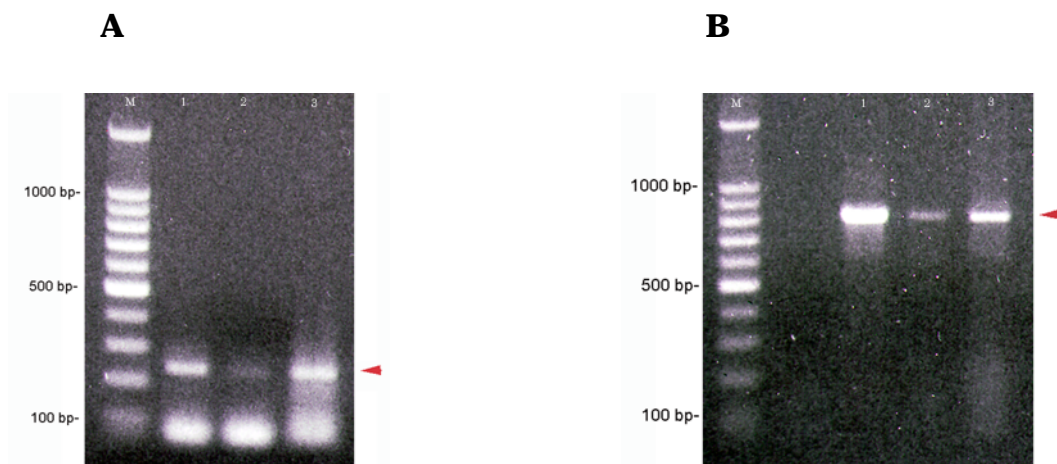
**Abb. 33:** Darstellung der Dermis nach der Präparation. Nach Inkubation der Haut in Dispase II ließ sich die Epidermis von der Dermis lösen. Die Basalmembran ist vollständig entfernt. A) HE-Färbungen B) Grocott-Färbung und C) PAS-Reaktion (Vergr.: 50x bzw. 100x)

Um die LC von den übrigen Hautzellen zu isolieren, wurden sie mit MHC II-Antikörpern über Magnetsorting aufgereinigt. Die gewonnenen Epithelzellen besaßen eine Reinheit von ca. 50%. Es stellte sich heraus, daß in der Kultur noch eine Vielzahl von Melanozyten vorhanden waren. Erst nach wiederholter Aufreinigung über den Magneten konnte eine Reinheit von 90% erreicht werden. Dieses Verfahren brachte nur eine geringe Ausbeute (ca.  $10^5/10 \text{ cm}^2$ ). Des weiteren zeigten die Magnet positiven Zellen z.T. große schwarze Granula (durch Endozytose aufgenommenes Melanin). Um diesen nicht erwünschten Effekt zu unterbinden, wurde unpigmentierte Haut verwendet. Allerdings läßt sich bei der Kultivierung der LC ÜN eine Aktivierung und Modifizierung nicht ausschließen. Die so isolierten LC konnten elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Abb.34). Die für LC aus der Haut anderer Spezies typischen Birbekgranula konnten an Hand der EM Fotos, aufgrund ähnlicher Strukturen, nur vermutet werden. Detaillierte Untersuchungen müssen in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt werden.



**Abb.34:** Elektronenmikroskopische Darstellung aus der Haut isolierter LC. Die runden Anschnitte sind die anti-MHC II gekoppelten Eisenpartikel, die der Aufreinigung der LC von anderen Hautzellen dienen.(Verg.: 1:1200)

Von den isolierten LC wurde die RNA extrahiert und für die Erstellung der einzelnen cDNAs genutzt. Mit spezifischen Primern konnte bestätigt werden, daß diese Zellen CD1a und IL-1 positiv waren (Abb.35).



**Abb.35:** RT-PCR aus Magnet-isolierten LC. A) Zeigt den Nachweis von CD1a. Spur 1 + 2 sind 2x Magnet, isolierte LC aus unpigmentierter Haut und Spur 3 ist eine Kontrolle aus Epithelzellen. B) zeigt den Nachweis von IL-1 an den identischen Proben. M = 100 bp Leitermarker.



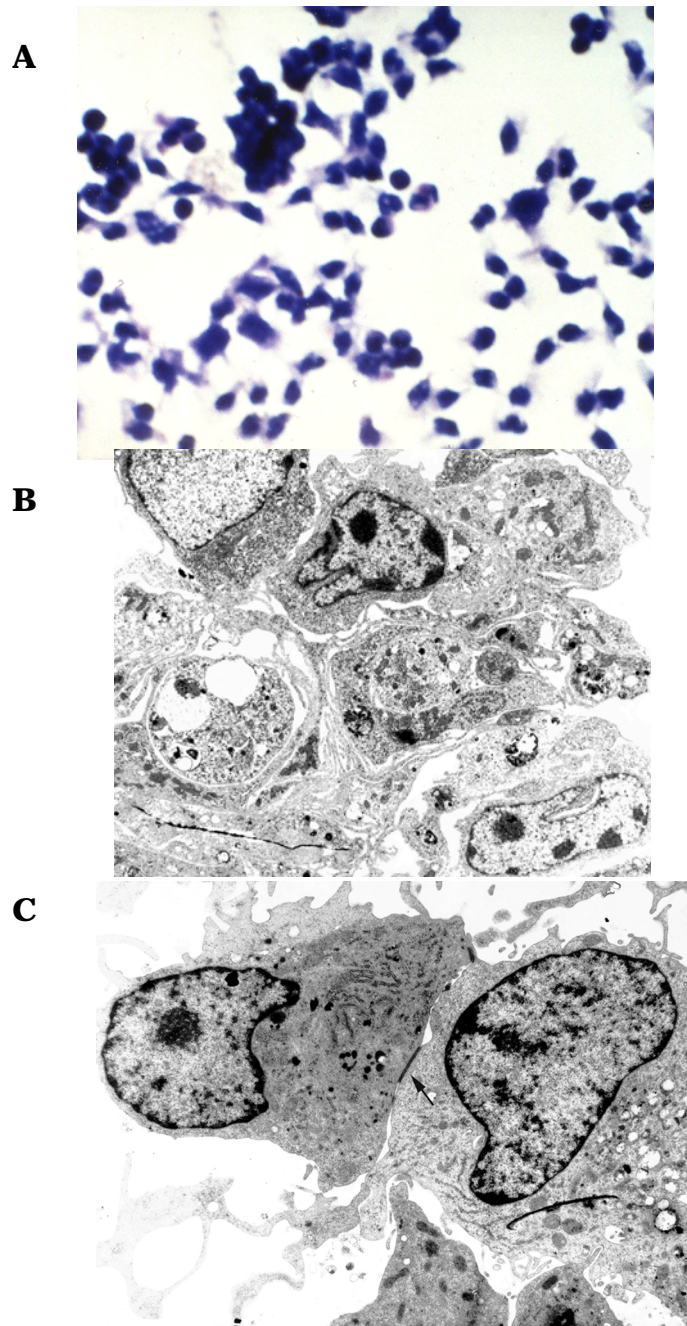
### **4.3.2 Differenzierung und morphologische Darstellung equiner monozytärer Zellen**

Die unter 4.1 beschriebenen, isolierten Monozyten wurden in Kultur genommen. Monozyten besitzen die Fähigkeit, zu adhären. Dieses Phänomen wurde bei der Reinigung durch mehrfaches Waschen und Umsetzen der Überstände genutzt. Die Gesamtzahl der so isolierten Monozyten lag bei  $1-4 \times 10^6$  Zellen/500 ml Blut. Die Monozyten wurden *in vitro* in RPMI-Medium mit 10% FCS, 5 ml Gentamycin (10 mg/ml) und 5 ml 1 M HEPES auf einer 6-Loch-Platte kultiviert. Um eine Differenzierung zu dendritischen Zellen (DC) oder Makrophagen zu erreichen, wurden die Zellen mit den rek. eq.Zytokinen, Interleukin 4 (IL-4), Interferon (IFN ) und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF), die im eukaryotischen System exprimiert wurden, stimuliert. Die frisch isolierten, equinen monozytären Zellen wurden wie in der Humanmedizin beschrieben, mit eq. IFN kultiviert, um eine Differenzierung zu Makrophagen und mit eq.GM-CSF und eq.IL-4, um eine Differenzierung zu DC zu erzielen (Steinman, 1991; Peters et al., 1996). Phänotypisch und morphologisch wurden die monozytären Zellen lichtmikroskopisch (3.3.1), elektronenmikroskopisch (3.3.2) und im Durchflußzytometer (3.3.3) untersucht. Die funktionelle Charakterisierung wurde in der gemischten Leukozyten Reaktion (3.3.4) durchgeführt.

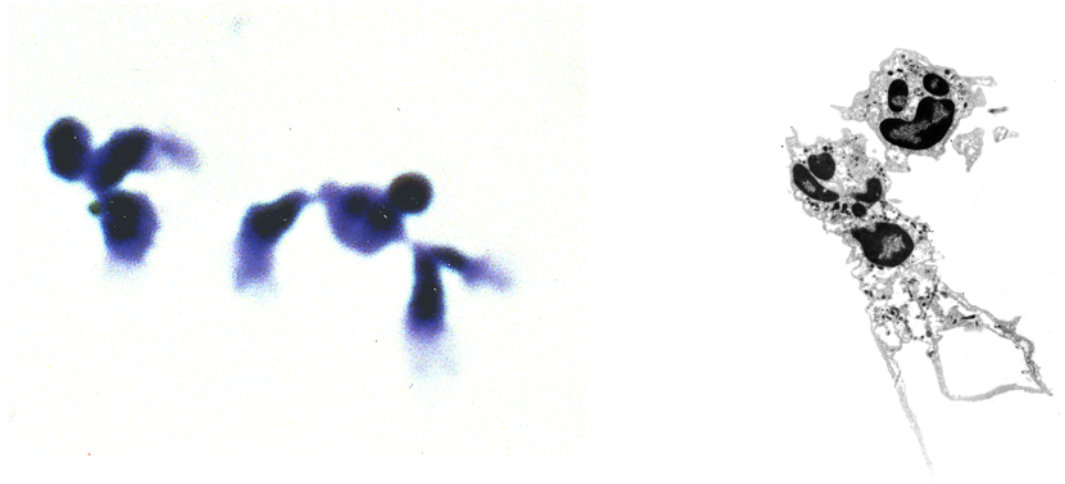
#### **4.3.2.1 Herstellung von eq.MoDC**

Die einzelnen Zytokine zeigten unterschiedliche Wirkungen auf die, aus equinem Blut isolierten monozytären Zellen. Eq.IL-4 führte zu einer langen Streckung adhärenter Zellen. Die mit GM-CSF behandelten Zellen blieben adhärent (nicht dargestellt). Durch Zugabe von eq.IL-4 und eq.GM-CSF oder hu.GM-CSF stimulierte Monozyten, zeigten lichtmikroskopisch nach 24-48 h keine oder geringgradige Adhärenz und nach 4-7 Tagen lagen vermehrt nicht-adhärente polymorphe langgestreckte Zellen vor (Abb.36 + 37). Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung besaßen diese Zellen eine längliche

ovale Form mit einigen Pseudopodien (Abb.36 + 37). Deutlich war auch ein Zell-Zell-Kontakt der MoDC untereinander zu erkennen.

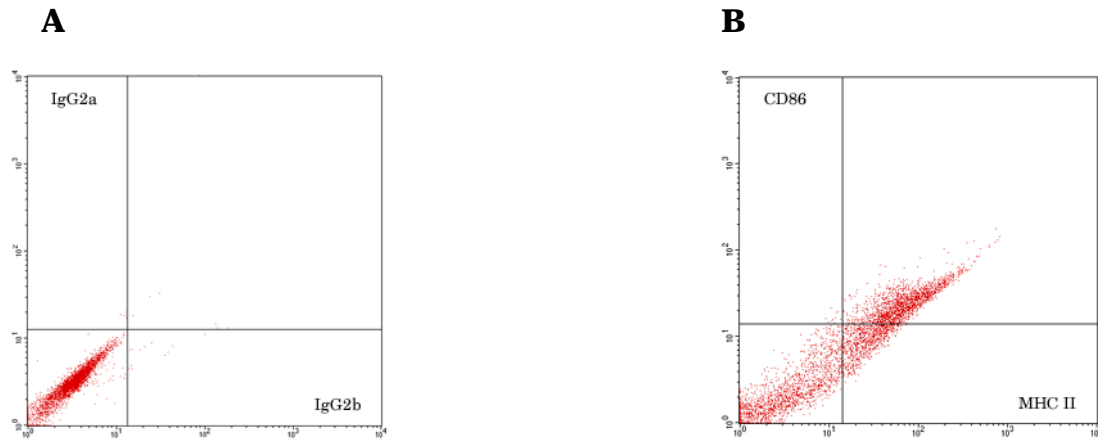


**Abb.36:** Darstellung der mit eq.GM-CSF und eq.IL-4 stimulierten monozytären Zellen aus Pferdeblut nach 4 d Kultur. A) Lichtmikroskopische Darstellung der MoDC mit deutlich sichtbaren Schleimern (veiled cells) Giemsa-Färbung (Vergr.: 50x). B) Elektronenmikroskopische Untersuchung in Cluster zusammenliegende MoDC (Vergr.: 1:2665) und C) zwei MoDC die über einen Zellkontakt verbunden sind (schwarzer Pfeil)(Vergr. 1:5230).

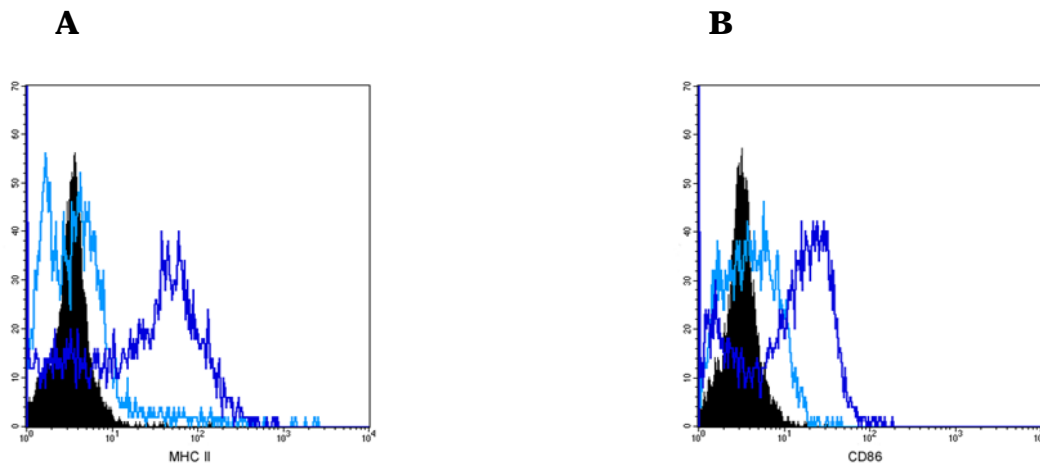


**Abb.37:** Nach 7 Tagen Kultivierung mit eq.GM-CSF und eq.IL-4 zeigten die MoDC deutliche Pseudopodien. A) Lichtmikroskopische Untersuchung GIEMSA gefärbter Zellen (Vergr.: 100x) und B) elektronenmikroskopische Untersuchung (Vergr.: 1: 8060).

Die MoDC wurden ferner mit der Fluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer auf das Vorliegen bestimmter Oberflächenantigene untersucht (Abb.38). Im Streudiagramm wurde durch die Vorwärtsstreuung die Größe und durch die Seitwärtsstreuung die Granularität der Zellen bestimmt. Diese Parameter gaben bereits Auskunft darüber, um welche Blutzellen es sich handelte. Lymphozyten und NK sind sehr kleine und nicht granuläre Zellen. Die Monozyten erfahren in der Vorwärtsstreuung eine Verschiebung nach rechts. Zur Definition der negativen Zellen wurden Kontrollantikörper gleichen Isotyps (Isotypkontrolle) verwendet. Für die Oberflächenanalyse der eq.MoDC wurden fluoreszenzmarkierte, kreuzreagierende mAk aus der Humanmedizin verwendet. CD86 und MHCII sind Marker, die auf DC vorkommen. Um eine Population identifizieren zu können, wurde bei der Direktmarkierung eine Kombination aus MHC II/CD86 Ak verwendet. Diese Kombination war möglich, da der Ak MHC II mit FITC markiert und CD86 mit PE markiert war. Die stimulierten monozytären Zellen wurden täglich über 7 d markiert, um die Differenzierung vom Monozyten zur DC zu zeigen (Abb.39).



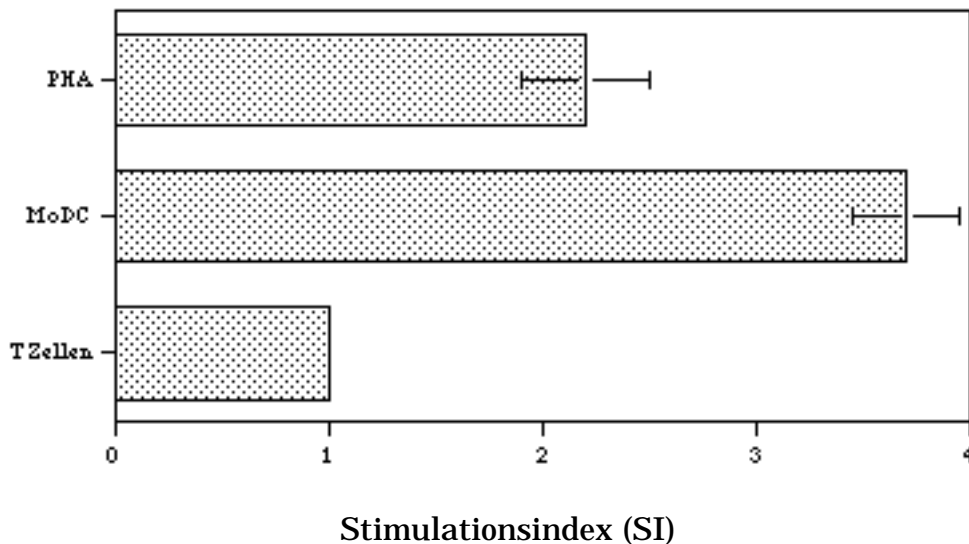
**Abb.38:** Fluoreszenzanalyse der Expression von MHC II (FITC) und CD86 (PE) auf equinen MoDC. Als Negativkontrolle dienten jeweils geeignete isotypspezifische Oberflächenmarker IgG2a und IgG2b. Die unmarkierten Zellen liegen im unteren linken Quadrat. A) zeigt die mit IgG2a und IgG2b markierten Zellen und dient als Kontrollwert. B) zeigt monozytäre Zellen die 7 d kultiviert wurden. Diese Zellen sind MHC II<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup>.



**Abb.39:** Vergleichsdarstellung der Expression von A) MHC II und B) CD86 von Tag 0 und Tag 7 bei equinen MoDC. Hellblaue Linie stellt die Expression von Tag 0 dar, die dunkelblaue von Tag 7. Die Isotypkontrolle ist schwarz dargestellt.

Nach der phänotypischen und morphologischen Charakterisierung der aus Pferdeblut hergestellten MoDC wurde eine funktionelle Untersuchung durchgeführt (Abb.40). Wie in mehreren Veröffentlichungen beschrieben, eignete sich zum funktionellen Nachweis die gemischte Leukozyten Reaktion (MLR) (Nussenzweig et al., 1980; Van Voorhis et al., 1983; Young & Steinman, 1988). In diesem Versuch wurde die Fähigkeit der MoDC untersucht, Lymphozyten eines

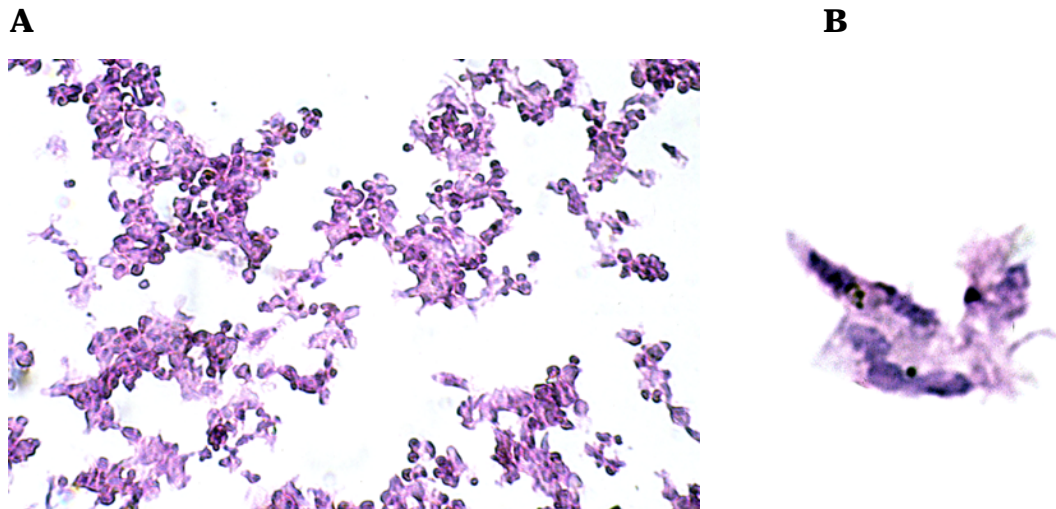
anderen Pferdes ohne Antigen zu stimulieren. Dazu wurden MoDC nach 4 d und 7 d Kultivierung in der MLR verwendet. Dabei zeigte sich, daß nur MoDC nach 7 d deutliche Lymphozyten stimulierende Kapazität besitzen.



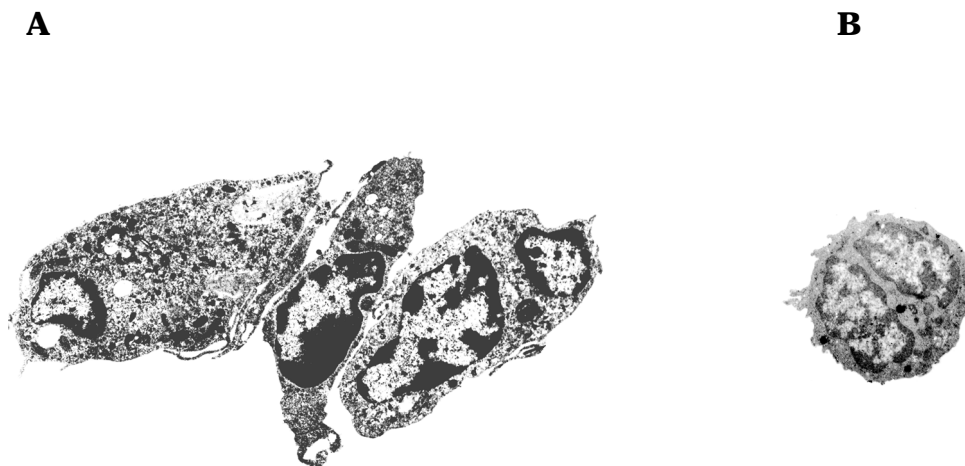
**Abb.40:** Gemischte Leukozytenreaktion unter Verwendung eq.MoDC und Lymphozyten eines zweiten Pferdes. Unstimulierte T Zellen liefern den Basiswert (=1). Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten (in Doppelbestimmung) mit Standardabweichung mit eq.GM-CSF stimulierten MoDC. Als positiv Kontrolle dienten PHA stimulierte Lymphozyten.

#### 4.3.2.2 Differenzierung monozytärer Zellen mit $IFN\gamma$ zu Makrophagen

Um die Differenzierung vom Monozyten zum Makrophagen zu zeigen, wurden Monozyten mit eq. $IFN$  behandelt. Nach 48 h bilden sich bei adhärennten Zellen Cluster, die weiterhin adhärennt blieben. Die Zellen zeigten deutliche Granulierung (Abb.41) und stellten sich im Elektronenmikroskop als große Zellen mit Granula dar (Abb.42).

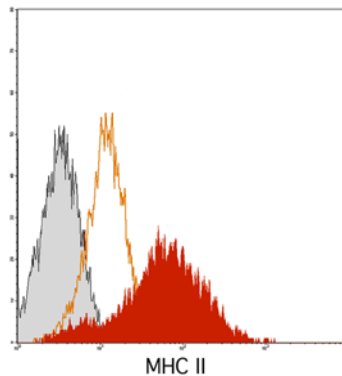


**Abb.41:** Lichtmikroskopische Darstellung monozytärer Zellen, die mit eq.IFN zur Differenzierung angeregt wurden (HE Färbung). In Clustern zusammen liegende Zellen. A) Verg.: 50x und B) Verg.: 100x.



**Abb.42:** Elektronenmikroskopische Darstellung von monozytären Zellen, die mit eq.IFN mehrere Tage kultiviert wurden. A) PBM kultiviert mit eq.IFN differenzierten zu Makrophagen ähnlichen Zellen (Verg.: 1:4160) und B) PBM kultiviert mit sterilfiltriertem P3X Überstand (Negativkontrolle, Verg.: 1:4160).

Die Fluoreszenz-Analyse mit MHC II als Oberflächenmarker zeigte nach drei Tagen eine deutliche Expression von MHC II Molekülen im Gegensatz zu nicht stimulierten Kontrollzellen (Abb.43).



**Abb.43:** Vergleichsdarstellung der Expression von MHC II von Tag 0 und Tag 3. Orange Linie stellt die Expression von Tag 0 dar, die rot von Tag 3. Die Isotypkontrolle ist grau dargestellt.

IFN wurde weiterhin auf seine antivirale Wirkung im VSV-Inhibitionstest untersucht (3.5.8.2), als Positivkontrolle diente eq. IFN (Beier, 1999).

In dem Inhibitionstest nach Marquart und Mitarbeiter (1992) wurden equine PBMC mit Verdünnungsreihen von IFN inkubiert (3.5.8.3). In beiden Versuchen konnte für IFN keine antivirale Wirkung gezeigt werden. Ferner war auch von dem in Säugetierzellen exprimierten IFN, das aufgrund seiner immunmodulatorischen Wirkung als bioaktiv anzusehen ist, nur ein geringer antiviraler Einfluß zu erkennen (nicht dargestellt).