

Aus dem
Institut für Virologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Herstellung und Charakterisierung rekombinanter
equiner Interferone: Expressionsklonierung,
Darstellung der Proteine und der biologischen Aktivität**

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

vorgelegt von
Ilka Beier
Tierärztin aus Kyritz

Berlin 1999
Journal-Nr.: 2290

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. D. Ebner

Zweiter Gutachter: PD Dr. J. Walter

Tag der Promotion: 09.07.1999

Meinem Vater
und
Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Literaturübersicht	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Einteilung und allgemeine Eigenschaften	2
1.2.1. Typ-I-Interferon	4
1.2.2. Typ-II-Interferon	5
1.3. Biologische Aktivität	6
1.3.1. Typ-I-Interferon	7
1.3.2. Typ-II-Interferon	8
1.4. Entstehungs- und Wirkungsablauf	10
1.5. Klinische Anwendung	13
1.6. Bedeutung verschiedener equiner Viren	17
1.6.1. Stomatitis Vesicularis	17
1.6.2. Equine Herpesvirus-Infektionen	18
1.6.3. Bornasche Krankheit	21
1.6.4. Rhinovirusinfektionen	23
1.7. Expressionsvektoren und Plasmide	24
1.7.1. Prokaryotische Expressionssysteme	24
1.7.2. Eukaryotische Expressionssysteme	25
2. Problemstellung	26
3. Materialien und Methoden	27
Materialiennachweis	27
3.1. Herstellung kompetenter Zellen	30
3.2. Transformation kompetenter Zellen	31
3.3. Blau/Weiß-Selektion	32
3.4. DNA-Präparationen	32
3.4.1. Minipräparation	32

Inhaltsverzeichnis

	Seite
3.4.2. Großpräparation von Plasmid-DNA	33
3.5. Restriktionsenzym-Verdauung	34
3.6. Glyceroldauerkulturen	35
3.7. Agarosegelelektrophorese	35
3.8. Isolierung von DNA-Fragmenten	36
3.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
3.9.1. Verwendete Primer	37
3.9.2. Amplifikationsreaktion	37
3.10. Ligation	38
3.11. Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation	39
3.12. Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Tfx-Methode	39
3.13. Zellklonierung mit g418	40
3.14. Herstellung von Bakterienlysaten	40
3.15. Probenkonzentrierung mittels Mikrokonzentratoren	41
3.16. Bakterienprotein-Extraktion und Reinigung sogenannter Einschlußkörperchen (unlöslicher Proteine)	41
3.17. Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	42
3.18. Proteinaufreinigung über die Blue-Sepharose 6 Fast-Flow-Säule	43
3.19. SDS-PAGE	44
3.20. Silberfärbung	46
3.21. Coomassiefärbung	47
3.22. Herstellung polyklonaler Seren	48
3.23. Western-Blot	48
3.24. Virusanzucht und -reinigung	50
3.24.1. Virusvermehrung und -reinigung von EHV-1 und EHV-4	50
3.24.2. Virusvermehrung BDV	51
3.25. Virustitration	51
3.26. Virushemmtest auf 24-Loch-Platten	52
3.27. VSV-NT mit Extinktionsmessung	53
3.28. Borna-ELISA	54

	Seite
4. Ergebnisse	56
4.1. Eukaryotisches System	56
4.2. Prokaryotisches System	60
4.2.1. Vektor pBK CMV	60
4.2.1.1. Einfluß verschiedener Parameter auf die IFN-Expression	60
4.2.1.2. Kinetik der Interferonwirkung	61
4.2.1.3. Vergleich verschiedener Zellen	63
4.2.1.4. Vergleich verschiedener equiner Viren	65
4.2.1.5. Proteinexpression mittels pBK CMV-Vektor	66
4.2.2. Vektor pASK IBA2	67
4.2.2.1. Proteinexpression mittels pASK IBA2-Vektor	68
4.2.3. Vektor pMAL-c2	69
4.2.4. Vektor pBAD gIII	70
5. Diskussion	73
5.1. Biologische Aktivität und Proteinnachweis im eukaryotischen System	74
5.2. Untersuchungen verschiedener Vektorsysteme im prokaryotischen System	74
6. Zusammenfassung	83
7. Summary	84
8. Literaturverzeichnis	85
Eidesstattliche Erklärung	
Danksagung	
Lebenslauf	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AHT	Anhydrotetracyclin
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	Aqua bidestillata
aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäuren
BDV	Borna Disease Virus
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMC	Carboxymethylcellulose
CPE	Zytopathogener Effekt
DMEM	Dulbecco modified Minimal Essential Medium
ED	equine Dermiszellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
et al.	und Mitarbeiter
FIV	Felines Immundefizienz Virus
g 418	Geneticin
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LEI	Leibowitz Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messengerRNA
NA	Nähragar
NB	Nährbouillon
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NT	Neutralisationstest
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	plaque forming unit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rec.	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE-Puffer	Tris-Eisessig-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit (Einheit)
U/ml	Einheit pro Milliliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
x-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- -D-galaktopyranosid
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1. LITERATURÜBERSICHT

1.1. Einleitung

Die Arbeit hat zum Ziel, rekombinante equine Interferone (rec.eqIFN) in pro- und eukaryotischen Zellen zu synthetisieren, die Proteine darzustellen sowie ihre biologische Wirksamkeit in verschiedenen Zellkultursystemen *in vitro* zu testen.

Seit der Beschreibung eines löslichen Faktors durch Isaacs und Lindenmann (1957), der aus virusinfiziertem Gewebe freigesetzt wurde und mit der Virusreplikation im nichtinfizierten Gewebe interferierte, erfolgte eine intensive Erforschung dieser Proteine (Isaacs et al., 1957). Schon wenige Jahre später wurde ein sogenannter „Priming“-Effekt beschrieben, der durch die Produktion von Interferon (IFN) in einem Zellsystem ausgelöst werden kann. Dies kann durch die Vorbehandlung mit kleinen Interferondosen vor der eigentlichen IFN-Induktion erfolgen (Lockart, 1963) oder wenn vor der Induktion von Interferon durch aktive Viren die IFN-produzierenden Zellen mit inaktivierten Viren derselben Virusart vorbehandelt werden (Mahdy und Ho, 1964). Wie in der Arbeit von H.D. Schmatz (1976) aufgeführt, wurde von verschiedenen Wissenschaftlern Anfang der 60er Jahre der Zusammenhang von IFN- und Zellproteinstoffwechsel beschrieben. Kleinschmidt (1972) entdeckte, daß Interferon nicht direkt gegen das Virus wirkt, sondern ein weiteres Protein anregt, welches eine direkte Hemmung auf die Virusvermehrung ausübt. Eine Zusammenfassung über den Erkenntnisstand bis Anfang der 70er Jahre gibt die Arbeit von S. Schmatz (1975). Durch die vielfältigen biologischen Wirkungen der Interferone versprach man sich in ihrem klinischen Einsatz große Erfolge. Viele Arbeiten berichten über klinische Versuche mit Interferonen, deren Ergebnisse jedoch aus heutiger Sicht zum Großteil neu hinterfragt werden müssen, da u.a. nicht mit gereinigtem Interferon gearbeitet wurde.

Das Aufstreben der Molekularbiologie brachte auch in der Interferonforschung eine rasante Entwicklung. Durch die exakte Bestimmung der Sequenzen war man jetzt u.a. in der Lage, Interferone zu klonieren und in geeigneten Mengen herzustellen. Durch Immunisierungen wurden monoklonale Antikörper produziert.

Vor allem in der Humanmedizin setzte man große Hoffnungen in den klinischen Einsatz von Interferonen, die zum Teil schon erfolgreich zur Anwendung kommen

(siehe auch: 1.5.). In der Veterinärmedizin ist hingegen noch relativ wenig zu Interferonen bekannt. Aufgrund der unterschiedlichen molekularen Eigenschaften der Virus-Wirt-Beziehungen, können die Ergebnisse nicht beliebig auf andere Spezies übertragen werden.

1.2. Einteilung und allgemeine Eigenschaften

Das Interferonsystem ist ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen und Teil der ersten Abwehrlinie gegen eindringende Mikroorganismen (Artursson, 1993).

Die Interferone werden in zwei Gruppen eingeteilt, IFN-I und IFN-II. Zur ersten Gruppe werden IFN- α , IFN- β , und IFN- ω gezählt, zur Gruppe II IFN- γ (u.a. Pestka et al., 1987; Allen und Diaz, 1996). Möglicherweise existieren aber noch andere Interferone. Ihre Stärke wird anhand ihrer antiviralen Aktivität in Zellkulturen gemessen. Die Induzierung und Produktion variiert sehr stark zwischen den Spezies (Pestka et al., 1987). Da die unterschiedlichen IFN-Typen von verschiedenen Zellen produziert werden, sprach man früher auch von Leukozyten-IFN (IFN- γ), Fibroblasten-IFN (IFN- β) und bei IFN- α von Immun-IFN. Letzteres wird von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und T-Zellen produziert und besitzt immunmodulatorische Wirkungen (u.a. Friedman, 1977). In der Regel synthetisiert eine Zelle nicht nur einen, sondern mehrere IFN-Typen. Zum Beispiel ist die Herstellung von IFN- α meist mit der von IFN- β verbunden. Beide benutzen den gleichen Zellrezeptor (Raziuddin et al., 1984).

Interferone stellen eine Form von Zytokinen mit einer außergewöhnlich weiten Reihe von biologischen Eigenschaften dar. Einige davon sind allen gemeinsam. Ihr Molekulargewicht beträgt 16-25 kD. Ihr isoelektrischer Punkt liegt zwischen pH 4,5 und pH 5,0. Interferone sind ribonuklease- und desoxyribonuklease-stabil (Heidel, 1974). Sie besitzen keine Virusspezifität, jedoch sind nicht alle Viren interferonsensitiv. Durch ihre Struktur und die korrespondierenden Rezeptoren besteht eine Artspezifität, so daß Interferone nicht beliebig über Speziesbarrieren verwendet werden können.

Tab.1.1.: Vergleich humaner Interferone

	TYP I		TYP II
	IFN- α	IFN- β	IFN- γ
Bezeichnung			
alter Name	Leukozyten-IFN	Fibroblasten-IFN	Immun-IFN
Molekulargewicht [kDa]	17,5-23	20-23	20(40);25(50)
Aminosäuren	156-172	166	146
Lokalisation	Chromosom 9		Chromosom 12
Anzahl	23	1	I
Rezeptortyp	I		II
Rezeptorlokalisierung	Chromosom 21		Chromosom 6
Induktoren	synthetische Stoffe (ds RNA, Acridinderivate), Viren (insbes. RNA-Viren), Lipopolysaccharid		T-Zell-Mitogene Antigene
Produktionszellen	Leukozyten	Fibroblasten	T-Zellen NK-Zellen
Introns	keine		vorhanden
Disulfidbrücken	2 (AS 1-98 und 29-138)	1 (AS 31-141)	0 (aber 2 Cysteine vorhanden)
Verhalten bei pH 2	stabil		labil
Homologie der AS	> 90% untereinander	ca. 30% zu IFN α	< 20% zu TypI IFN
posttranslationale Modifikation	meist keine	glykosiliert	glykosiliert

1.2.1. Typ-I-Interferon

Die Interferone der Gruppe I besitzen vorwiegend antivirale Wirkungen (Adolf, 1987). Beim Menschen wurden zunächst 16 huIFN- α -Gene beschrieben (Nagata et al., 1986), heute spricht man von 23 nicht-allelen huIFN- α -Genen, inklusive 4 Pseudogenen jedoch nur von einem huIFN- α -Gen. Alle Typ-I-Interferone sind verwandt und zeigen auf der DNA-Ebene untereinander Homologien von ca. 30% (vs.) bzw. ca. 90% (vs.), haben keine Introns und kodieren Polypeptide von 165-166 Aminosäuren (AS) (Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia, 1998). Beim Menschen liegen alle Typ-I-Interferone auf Chromosom 9 (Owerbach et al., 1981). Bei Pferden sind bis 1986 7 Genmitglieder der Typ-I-Interferone kloniert worden. Sie wurden aus Pferdeleber-DNA isoliert und in den Bakterienphagenvektor Lambda EMBL 3A kloniert (Himmler et al, 1986). Bis heute kennt man 4 IFN- α -Gene, 2 IFN- β -Gene, 2 IFN- γ -Gene und 1 IFN- ω -Gen beim Pferd. Alle eqIFN-I sind frei von Introns.

Das reife Protein von **eqIFN- α** ist 161 AS lang und besitzt eine Masse von 18,5 kDa. IFN- α_1 und IFN- α_2 sind auf Nukleotidbasis 98% homolog zueinander und auf AS-Basis zeigen sie eine 99%ige Homologie. Die hier beschriebenen α -Proteine sind 5 AS kürzer als bei den meisten anderen Spezies (Himmler und Grünig, 1997). Die Homologie der Proteine von equinem IFN- α zu Interferonproteinen anderer Spezies ist in Tabelle 1.2. dargestellt.

Humane Fibroblastenkulturen, die mit Viren oder chemischen Induktoren, wie Polyinositolcytidinsäure (poly[I:C]) stimuliert werden, produzieren ein Interferon, welches sich immunologisch von IFN- α unterscheidet und als IFN- β bezeichnet wird. Es besteht aus 166 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 20-23 kD.

Das reife Protein von **eqIFN- β** ist 165 AS lang. Die Homologie von eqIFN- β zu IFN- β anderer Spezies ist in Tabelle 1.2. aufgeführt. IFN- β ist ein Glykoprotein, sehr speziesspezifisch und zeigt auf equinen Zellen antivirale Aktivität (Marquardt et al., 1992a, 1992b, 1994; Himmler et al., 1986) bzw. sehr geringe Kreuzreaktivität auf Zellen anderer Spezies (Himmler und Grünig, 1997). IFN- β besitzt hydrophobe Bereiche und bindet an Lektine wie Concanavalin A.

Tab.1.2.: Homologie der IFN-Proteine

	eqIFN-α	eqIFN-β	eqIFN-γ
huIFN	71-77%	57%	68%
boIFN	65-67%	50-57%	81%
muIFN	54-59%	46%	46%
poIFN	k.A.	66%	73%
ovIFN	k.A.	k.A.	82%
caIFN	k.A.	k.A.	82%
feIFN	k.A.	k.A.	76%

eq-equine, hu-human, bo-bovine, mu-murine, po-porcine, ov-ovine, ca-canine, fe-feline; k.A.: keine Angaben

Des Weiteren wird **IFN- ω** zu den Interferonen der Klasse I gezählt. Dieses Interferon wurde erstmals bei Mensch und Schaf entdeckt (Capon et al, 1985; Hauptmann und Swetly, 1985) und ist ebenfalls glykosyliert. Es zeigt mehr Beziehung zu IFN- α als zu IFN- β , unterscheidet sich aber in der Antigenität und zeigt keine Kreuzreaktivität mit Antikörpern anderer Interferon-Klassen (Adolf, 1987). Das reife Protein ist 172 AS lang. Die Gene von eqIFN- ω_1 und eqIFN- ω_2 sind kloniert worden. Insgesamt wurden acht eqIFN- ω -Proteine nachgewiesen. Alle eqIFN- ω -Gene liegen ebenso wie IFN- ω von Mensch und Meerschweinchen (Coulombel et al., 1991; Diaz et al., 1994), auf einem einzelnen Chromosom (Himmler und Grünig, 1997). Auf IFN- ω wurde in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

1.2.2. Typ-II-Interferon

IFN- γ weicht vom Typ-I-Interferon ab und liegt beim Menschen auf Chromosom 12 (DeGrado et al., 1982; Naylor et al., 1983). Das reife Protein ist 143 AS lang, das Signalpeptid 23 AS. Die Homologie zwischen den einzelnen Spezies ist in Tabelle 1.2. dargestellt. Die aktive Form von IFN- γ ist ein Homodimer aus zwei ineinander verdrehten Molekülen, welche gegenläufig zueinander orientiert aber nicht kovalent verbunden sind. Typ-II-IFN wird bei allen untersuchten Spezies von nur einem Gen, welches 4 kb umfaßt, kodiert. Das Gen von eqIFN- γ umfaßt wie bei

Mensch, Schwein, Hund, Ratte und Maus 4 Exons und 3 Introns (Yip et al., 1982; Himmler et al., 1986). Dieses Typ-II-IFN wird von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen produziert (Trinchieri und Perussia, 1985), die durch Antigene oder Mitogene stimuliert werden (Kasahara et al., 1983). Es besitzt aber andere biologische Aktivitäten und benutzt einen anderen Rezeptor als Typ-I-IFN (Branca und Baglioni, 1981).

1.3. Biologische Aktivität

Tab.1.3.: Aktivitäten humaner Interferone

Aktivitäten, die von IFN-α und IFN-β vermittelt werden
<ul style="list-style-type: none"> • Induktion eines antiviralen Zustandes Induktion der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase Expression von Mx-Protein • Induktion von Klasse-I-MHC-Molekülen • Inhibition des Zellwachstums • Aktivierung von NK-Zellen • Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten • Induktion von Proteinkinasen • Stimulation der B-Zell-Differenzierung
Aktivitäten, die von IFN-γ vermittelt werden
<ul style="list-style-type: none"> • Induktion von Klasse-II-MHC-Molekülen • Induktion der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen • Aktivierung von Makrophagen • Antivirale Aktivität • Aktivierung der Zytotoxizität gegen Tumorzellen • Induktion von Fc-Rezeptoren • Inhibition des Wachstums von intrazellulären Protozoen und Bakterien • Stimulation der IL-1- und IL-2-Synthese • Stimulation der Immunglobulinproduktion in unseparierten PBMC

Literatur u.a.: Pestka et al. (1987), Nash (1996), Schijns und Horzinek (1997)

1.3.1. Typ-I-Interferon

Die Expression von Typ-I-IFN kann in Tieren oder Zellen durch lebende oder abgetötete RNA- oder DNA-Viren induziert werden (Burke, 1977). Zusätzlich gibt es eine Anzahl von natürlichen und künstlichen nichtviralen Substanzen, die effektive IFN-Induktoren sind, wie zum Beispiel einige Pilze, verschiedene intrazelluläre Bakterien (z.B. Mykoplasmen, Rickettsien) bakterielle Stoffwechselprodukte, Mitogene wie Concanavalin A (Marcucci et al., 1984) und Pokeweed Mitogen, sowie natürliche und synthetische Polynukleotide (Wieggers, 1996). Hauptaufgabe von IFN-I ist die antivirale Wirkung. Daneben gibt es aber auch andere biologische Effekte.

Für IFN- α und IFN- β ist eine Makrophagen (M ϕ) aktivierende Funktion beschrieben (Chen und Najor, 1987). Ein Bericht beschreibt auch die Vorbereitung von M ϕ zur Apoptose (programmierter Zelltod) durch IFN- α (Adler et al., 1995).

Seit kurzem wird auch eine Rolle für IFN- α bei der Aktivierung und Differenzierung dendritischer Zellen diskutiert (Steinbach, persönliche Mitteilung). IFN-I ist weiterhin in der Lage, MHC-I als Voraussetzung der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten hochzuregulieren, während andererseits durch verschiedene Viren, wie z.B. Cytomegalovirus (CMV), der MHC-I-Komplex herunterreguliert wird. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Aktivitäten, die durch Typ-I-IFN vermittelt werden, ist in Tabelle 1.3. dargestellt.

Interferon spielt außerdem eine bisher nicht näher bekannte physiologische Rolle. Khan et al. (1989, 1990) wiesen immunreaktives Interferon- α in normalem humanen Gewebe verschiedener Organe nach, ohne daß eine Virusinfektion vorausgegangen war. Außerdem konnten sie in den Chorionzotten der von ihnen untersuchten Plazenten Interferon- α nachweisen.

Gresser (1997) fand heraus, daß die tägliche Behandlung von Mäusen mit ungereinigtem oder teilweise gereinigtem und konzentriertem Typ-I-IFN die Entwicklung von virusinduzierten Leukämien hemmt. Als überraschender Effekt einer weiteren Studie zeigte sich, daß IFN-I das Wachstum transplantiert Tumoren hemmt. Die antitumorale Wirkung funktioniert hierbei über verschiedene Mechanismen. Neben einer Modulation des Immunsystems ist IFN- α auch ein Inhibitor der Angiogenese (Grander et al., 1997). Bei therapeutischen Ansätzen zeigen sich in der Humanmedizin häufig Nebenwirkungen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Muskelschmerzen. Im Falle überschießender

Immunreaktionen könnte Typ-I-IFN auch an der Entstehung von Rheumatischer Arthritis, Diabetes mellitus und Polymyositis beteiligt sein (Foulis et al., 1987, 1991; Gresser, 1997).

1.3.2. Typ-II-Interferon

IFN- γ ist ein Hauptzytokin der Typ-1-Lymphozytenantwort, welche auch TNF- α und IL-2 einschließt (Paul und Seder, 1994).

Es besitzt die Eigenschaft, die Differenzierung und Aktivierung von monozytären Zellen einzuleiten (Chen et al., 1987). Dies konnte sowohl für primäre als auch für monozytäre Zell-Linien wie HL-60, THP-1 und U937 gezeigt werden (Perussia et al., 1983; Hattori et al., 1983; Ball et al., 1984; Gaffney et al., 1988). Hochangereicherte periphere T-Zellen benötigen die Anwesenheit akzessorischer Zellen (Monozyten) zur Aktivierung und Bildung von IFN- γ (Le und Vilcek, 1987).

Frühere biologische Studien weisen darauf hin, daß Interferone einige Unterschiede in ihrer antiviralen Aktivität zeigen, so daß einige Viren (Reo-, Vaccinia-) mehr sensitiv zu IFN- γ , als zu IFN- α und IFN- β (Rubin und Gupta, 1980) waren. Es wurde auch gezeigt, daß IFN- γ einen direkten antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen (Rubin und Gupta, 1980) und eine wichtige Funktion in der Immunregulation hatte. IFN- γ spielt darüber hinaus auch eine Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung dendritischer Zellen, die die Immunreaktion initiieren (Peters et al., 1996). Außerdem wurde deutlich, daß Interferone als vielschichtig wirksame Faktoren in einem Zytokin-Netzwerk mit überlappenden Aktivitäten mit anderen Zytokinen fungieren (Tab.1.4.).

Tab.1.4.: Interferon im Zytokinnetzwerk (nach Schijns,1990)

Verschiedene biologische Aktivitäten von Interferon	Zytokine mit überlappenden Aktivitäten
-Induktion eines antiviralen Zustandes	IFN- α , IFN- β , TNF- α , TNF- β , IL-1
-Wachstumshemmung für Tumorzellen	IFN- α , IFN- β , TNF- α , TNF- β , IL-1, TGF- β
-B-Zell-Aktivierung	IL-1, IL-2, IL-4, IL-6
-B-Zell-Differenzierung	TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-6
-T-Zell-Proliferation	TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-4
-T-Zell-Differenzierung	TNF- α , IL-1(?), IL-2, IL-4, IL-6
-Makrophagen-Aktivierung	TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-4, M-CSF
-NK-Zellen-Aktivierung	IFN- α , IFN- β , TNF- α , TNF- β , IL-1
-MHC-I Induktion	IFN- α , IFN- β , TNF- α , TNF- β
-MHC-II Induktion	(TNF- α ?), IL-4, IL-5
-Erhöhung der Immunität	IL-1, IL-2, TNF- α
-Lymphozytenerneuerung	IFN- α , IFN- β , IL-2

IFN: Interferon; IL: Interleukin; M-CSF: Makrophagenkoloniestimulationsfaktor; TGF- β : Transformationswachstums(growth)faktor; TNF- α : Tumornekrosefaktor; TNF- β = LT: Lymphotoxin

Young und Hardy (1995) führten Untersuchungen zum Einfluß von IFN- α auf die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Monozyten und Makrophagen, T-Zellen und polymorphkernigen Neutrophilen durch. Sie kamen zu der Erkenntnis, daß IFN- α , mehr als jedes andere Zytokin, Einfluß und Auswirkungen auf das Immunsystem hat.

1.4. Entstehungs- und Wirkungsablauf

Der IFN-Mechanismus kann in 2 Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase wird Interferon induziert und dieses bewirkt einen antiviralen Zustand oder andere Aktivitäten in der Zelle. In der zweiten Phase wirkt sich dieser induzierte Zustand auf verschiedene Zellaktivitäten, wie Viruswachstum, Zellreplikation oder Immunabwehr aus (Friedmann, 1977).

Bei einer Infektion heftet sich das infizierende Virus zuerst an eine Zelle an, penetriert durch die Plasmamembran, setzt dort sein genetisches Material frei und repliziert sich. Neue Viren entstehen und infizieren andere Zellen. Im frühen Stadium der Infektion treten Veränderungen im Metabolismus der ersten Zelle auf, u.a. wird die Transkription der IFN-Gene induziert. Die IFN-mRNA, wird im Zytoplasma an Ribosomen in Protein translatiert. Das sezernierte Interferon geht auf die nächsten Zellen über (Baglioni und Nilsen, 1983).

Der erste Schritt bei der Interaktion zwischen Zellen und Interferon ist die Bindung an spezifische Rezeptoren (Branca und Baglioni, 1981). Deren Anzahl variiert zwischen einigen hundert bis zu mehreren tausend pro Zelle. IFN- α und IFN- β benutzen dabei den gleichen Rezeptortyp (Flores et al., 1991), während IFN- γ einen eigenen besitzt. Raziuddin et al. (1984) zeigten mit ihren Ergebnissen, daß die Rezeptoren für huIFN- α und huIFN- β durch Chromosom 21 und für huIFN- γ durch Chromosom 6 kodiert werden. Es ist allerdings nicht geklärt, ob die Rezeptoren den limitierenden Faktor für die Sensivität zu IFN darstellen. Der durch die Bindung des Interferons an den Rezeptor entstandene Komplex wird durch Endozytose internalisiert, was nach der Signaltransduktion zur Auslösung der IFN-Wirkungen auf die Zielzelle führt. Auch interferonresistente Zell-Linien können IFN an Rezeptoren binden. Verschiedene Beobachtungen ließen eine mögliche Rolle der Membranganglioside für die IFN-Bindung vermuten. Die biologische Relevanz der Ganglioside für die Bindung und Wirkung von IFN wurde erkannt, als eine Vorbehandlung von gangliosidarmen Zellen mit Gangliosiden deren Sensivität für IFN erhöhte (Vengris et al., 1976). Obwohl die Vereinigung des IFN-Rezeptorkomplexes mit der Zellmatrix ein unumgänglicher Faktor für die Wirkung des Interferons darstellt (Hamilton et al., 1986), ist Interferonbindung jedoch nicht ausreichend, um eine Wirkung auszulösen.

In der Zelle stimuliert Interferon die Synthese von verschiedenen Enzymen, wobei die Proteinkinase, die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase und das Mx-Protein besonders

wichtig sind. Mx-Protein wird dabei nur von IFN-I aktiviert (Samuel, 1991; Nash, 1996). Die Enzyme inhibieren selektiv verschiedene Viren (z.B. Mx: Influenza, VSV; 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase: Coronavirus, Picornavirus) (Samuel, 1991). Die Proteinkinase transferiert die Phosphatgruppe auf den Initiationsfaktor IF-2. Dieser hält normalerweise den Initiationskomplex der Proteinsynthese zusammen. Die phosphorylierte Form ist jedoch nicht wirksam. Die virale mRNA bleibt somit untranslatiert und wird von Ribonukleasen abgebaut. Die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase dagegen katalysiert die Polymerisierung von Adennucleotiden zu einer langen Kette. Es entsteht 2'-5'-Oligoadenylsäure. Diese aktiviert inaktivierte Ribonukleasen und die virale mRNA wird abgebaut. Am besten erforscht ist der Wirkungsmechanismus über Mx. Das Mx-Gen ist der Prototyp für IFN-aktivierende Gene mit der Funktion, Zellen gegenüber viralen Einflüssen resistent zu machen (Arnheiter und Meier, 1990; Ronni et al., 1995; Schultz et al., 1995). Dafür reichert sich das Protein im Zellkern an und blockiert die Synthese der viralen mRNA durch Interaktion mit viralen Polymerasen. Es gibt Zellen, die nach transgener Expression des Mx-Proteins die Replikation des Masernvirus auf der Ebene der Transkription unterdrücken, wogegen andere Enzyme die Translation bestimmter Glykoproteine verhindern (Schnorr et al., 1993). Die Mx-Gen-Expression ist ein guter Marker für das Vorhandensein geringer biologisch aktiver Mengen an IFN-I während viraler Infektionen (Roers et al., 1994). Möglicherweise besitzt Mx noch andere wichtige Funktionen (Staheli und Haller, 1987). Im Gegensatz zur Maus ist das Mx-Protein beim Menschen im Zytoplasma lokalisiert (Pestka et al., 1987).

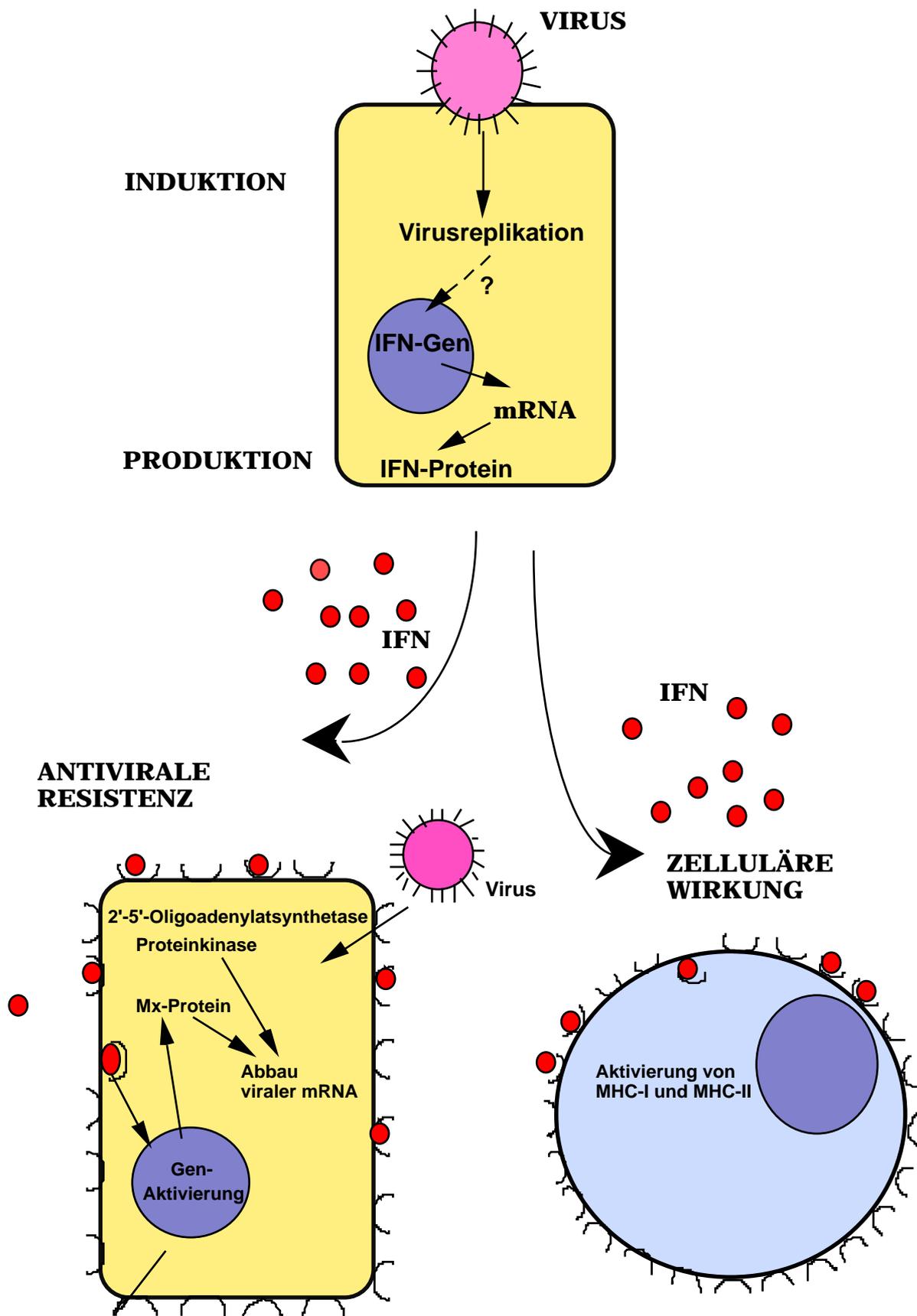


Abb.1.1.:Schematische Darstellung für den Entstehungs- und Wirkungsablauf von IFN (Erläuterungen siehe Text)

1.5. Klinische Anwendung

Seit der Entdeckung der Interferone wurden große Hoffnungen in ihren klinischen Einsatz gesetzt und umfangreiche Versuche durchgeführt. Aus der Humanmedizin sind eine Vielzahl von Studien zur klinischen Bedeutung und Applikation bekannt. Da es sich bei der Erforschung von Zytokinen und Interferonen um einen relativ jungen Forschungszweig handelt, werden sie bei vielen Krankheiten noch experimentell erprobt. Die anfängliche Euphorie, Interferone stellen Mittel der Wahl bei Krebserkrankungen und Virusinfektionen dar, mußte allerdings revidiert werden. Trotzdem werden Typ-I-Interferone bei vielen Erkrankungen mit Erfolg eingesetzt (z.B.: Multiple Sklerose, Haarzell-Leukämie, chronische Hepatitis B) und befinden sich bei anderen, u.a. der adjuvanten Tumorthherapie bei minimaler Tumorresterkrankung, in der experimentellen Erprobung (Kirchner et al., 1993).

Alle drei Klassen der humanen Interferone sind als Medikamente erhältlich, wobei es sich meist um Kombinationspräparate handelt. Entweder sind dieses gentechnisch hergestellte rekombinante Interferone oder biochemisch aus einer Lymphoblastenkultur aufgereinigte Interferone. Die Nebenwirkungen einer Interferontherapie sind meist gering und äußern sich in grippeähnlichen Symptomen; bei Langzeittherapien kann es auch zu Appetitlosigkeit sowie Leuko- und Thrombopenien führen. Mit Absetzen der Therapie verschwinden diese Erscheinungen jedoch wieder.

Seit 1991 ist Interferon für die Behandlung der chronischen Hepatitis B und C zugelassen. Dabei zeigten sich bei 35% der behandelten Hepatitis B Patienten und bei 50% der Hepatitis C Patienten Erfolge. Die Rückfallraten betragen etwa 5% bei der chronischen Hepatitis B und 50% bei der chronischen Hepatitis C. Teilweise wurden dabei Wiederholungstherapien angewandt (Kohara et al., 1995; Ounanian et al., 1995).

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Behandlung mit Interferon bei Condylomata acuminata (Genitalwarzen). Diese durch Papillomaviren hervorgerufene Krankheit tritt heute ca. dreimal so häufig wie Herpes genitalis auf. Gute Erfolge werden mit einer Kombinationstherapie aus Podophyllum-Präparaten und IFN- erzielt. IFN- wird als Salbe direkt auf die betreffenden Regionen aufgetragen (Kirchner et al., 1993).

Auch die durch Herpes-simplex-Viren hervorgerufene Herpeskeratitis, insbesondere die oberflächliche Form, Keratitis dendritica, kann erfolgreich mit IFN- enthaltenden Präparaten therapiert werden (Nicholl und Preston, 1996). Bei

Infektion der Augentropfen wird IFN- kombiniert mit Aciclovir verabreicht (Kirchner et al., 1993).

Vor allem in der Tumorthherapie erhoffte man sich mit dem Einsatz von Interferon große Erfolge. Die Erwartungen konnten nicht erfüllt werden, obwohl Interferon in einigen Fällen zur Therapie genutzt werden kann. An dieser Stelle sollen nur einige Beispiele kurz angeführt werden.

Bei der Haarzell-Leukämie, bei der eine Verminderung sämtlicher Blutzellen (Pancytopenie) auftritt, sprachen 80-95% der behandelten Patienten auf die Therapie mit IFN- an und ihre Blutwerte normalisierten sich. Durch die Verbesserung der Blut- und Knochenmarkparameter waren weniger Bluttransfusionen notwendig und lebensbedrohliche Zustände verringern sich. Allerdings war eine langfristige Interferonbehandlung notwendig (Quesada, 1987).

Zwischen 60-80% aller behandelten Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, die gleichzeitig das sogenannte Philadelphia-Chromosom (verkürztes Chromosom 22) haben, sprachen auf eine Interferontherapie an. Bei 20% dieser Patienten verschwanden die Blutzellen mit dem Philadelphia-Chromosom. Die Amplifizierung von tumorös entarteten Zellen konnte durch IFN- signifikant inhibiert werden (Gordon et al., 1998).

Interferon, als intranasales Spray benutzt, zeigte Schutz beim Menschen vor Rhino-, Corona- und Influenzaviren (Seahorn et al., 1990). Weiterhin wurde Interferon erfolgreich bei der Behandlung von Multipler Sklerose, vor allem IFN- (u.a. The IFN- Multiple Sclerosis Collaborative Research Group, 1995), multiplen Myelomen, beim Non-Hodgkin-Syndrom, bei malignen Melanomen und bei Nierenzellkarzinomen, um nur einige Beispiele zu nennen, eingesetzt. Während IFN- in der Pathogenese von Multipler Sklerose involviert zu sein scheint, konnte durch den Einsatz von IFN- eine Inhibition des Krankheitsgeschehens erreicht werden. Bei multiplen Myelomen, beim Non-Hodgkin-Syndrom, bei malignen Melanomen, beim septikämischen Schock, bei chronischer Polyarthritits und bei Nierenzellkarzinomen wurde IFN-, teilweise mit guten Erfolgen, eingesetzt (Machold et al., 1992; Döcke et al., 1997).

Tab.1.5.: Einige Beispiele zur klinischen Bedeutung der Interferone beim Menschen

Interferon	Erkrankung	Ergebnis
IFN-α	-Haarzell-Leukämie	-Verbesserung von Blut-und Knochenmarkparametern bei 80-95% der Patienten
+IL-2	-metastatische Nierenzellkarzinome	-langfristige Verbesserung bei 30% der Patienten
+Chemotherapie	-AIDS-assoziierte Kaposi Sarkome	-vollständige Heilung bzw. teilweise Besserung bei 30-40% der Patienten
+Podophyllum	-Condylomata acuminata	-gute Erfolge
IFN-β	-Multiple Sklerose	-58% weniger aktive Läsionen nach 6 Monaten
+IFN-	-Chronische Hepatitis-B	-Verbesserung bei 35% der Patienten (Rückfall 5%)
	-Chronische Hepatitis-C	-Verbesserung bei 50% der Patienten (Rückfall 50%)
+Acyclovir	-Herpes-Enzephalitis	-verstärkte Wirkung von Acyclovir
IFN-γ	-Chronische Polyarthrit	-Beeinflussung der Makrophagenaktivität -Reduzierung der Gelenkschmerzen -Verbesserung verschiedener klinischer Parameter, dadurch weniger Kortikosteroidgaben
	-oberflächliche Dermatiden	-Reduzierung von Entzündungen, klinischen Symptomen und Eosinophilie
	-septikämischer Schock	-Erhöhung der Monozytenaktivität bei den meisten Patienten (8 von 9)

Eine Literaturzusammenstellung von Selbitz et al. (1980) erläutert die klinische Perspektive von Interferon bei Rindern, Schafen, Schweinen, Pferden, Geflügel und Hunden. Aber erst die Möglichkeiten der Herstellung von rekombinanten Interferonen haben in den folgenden Jahren Fortschritte erbracht.

Lefevre et al. (1990a, 1990b) konstruierten rekombinante Plasmide für die Synthese von porcinem IFN- α in E. coli und wiesen nach, daß dieses rekombinante IFN *in vitro* stark wirksam ist. Pseudorabies Virus (PHV-1) wurde als Induktor von IFN- α und IFN- γ beschrieben. Die Verabreichung von IFN- α in die Nasenmukosa bei Schweinen schützte die Tiere vor Aujeszkyscher Krankheit und

das Gewebe vor zytopathogenen Effekten durch virulentes Pseudorabies Virus (Artursson, 1993).

Bei der Behandlung durchfallkranker Kälber konnte in einer Doppelblindstudie kein maßgeblicher Unterschied zwischen huIFN- und Placebo-behandelten Tieren nachgewiesen werden (Hellmeier, 1988). Bei Rindern wies Hritz (1994) nach experimenteller Infektion mit *Theileria annulata* die Bildung von IFN- durch T-Lymphozyten nach.

Bei der Untersuchung von Effekten des humanen IFN- auf experimentell induzierte Equine Herpesvirus (EHV)-1-Infektionen bei Pferden konnten erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontrollgruppen festgestellt werden (Seahorn et al., 1990). Chong und Duffus (1992) führten Untersuchungen zur Immunantwort bei spezifisch pathogenfreien Fohlen gegen EHV-1-Infektionen durch, wobei ein Nachweis antiviraler Aktivitäten im Nasensekret bei allen Fohlen ab dem 2. Tag p.i. erbracht wurde. Die Dauer des schützenden Effektes hängt von der IFN-Dosis ab (Marquardt et al., 1994). Auch konnte bei hohen Konzentrationen eine IFN- β abhängige Inhibition der T-Zell-Aktivierung (durch Lektine oder Superantigen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes) festgestellt werden (Marquardt et al., 1992a, 1992b). Bis heute wurde IFN- nur auf seine inhibitorische Aktivität gegen VSV getestet. Deshalb können auch keine genauen Angaben über die Effizienz gegenüber anderen viralen Infektionen gemacht werden. *In vivo* Applikationen bei gesunden Pferden wurden gut toleriert und zeigten kaum Nebenwirkungen. Auch über die Rolle von Interferonen im Endometrium von Pferden ist man noch im Unklaren (Schijns und Horzinek, 1997).

Obwohl *in vitro* und z.T. *in vivo* sehr vielversprechende Ergebnisse erlangt wurden, konnten in der veterinärmedizinischen Praxis keine durchschlagenden Ergebnisse erzielt werden. Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß in den vergangenen Jahrzehnten sehr viele, vor allem auch klinische Versuche durchgeführt wurden, die zum Teil sehr unzureichende Schlüsse auf die Wirksamkeit von Interferon zulassen (siehe auch Tabelle 1.6.).

Tab.1.6.: Beispiele klinischer Studien mit Interferon bei Haustieren

Tierart	Erkrankungen	Ergebnis
Rind	-Atemwegserkrankungen durch Herpesviren	-experimentell: positive Erfolge mit IFN- u. IFN-
	-Mastitis (Staph. aureus) (E. coli)	-exp. positive Erfolge -exp. positive Erfolge
	-Bovine Tuberkulose	-von kurzzeitigem Stoppen des Tumorwachstums bis zu vollständiger Heilung
Schaf	-Clostridienerkrankungen	-IFN- unterstützend bei Impfprogrammen
Schwein	-Aujeszkysche Krankheit	-mit IFN- exp. positive Erfolge
Pferd	-Herpesvirus-Infektionen -Rhinovirus-Infektionen	-keine relevanten klinischen Ergebnisse
Hund	-Leishmaniose	-IFN- unterstützend bei Behandlung
Katze	-FIV	-exp.: Rolle der IFN in der Immunabwehr
	-Feline Infektiöse Peritonitis	
Geflügel	-Salmonella typhimurium	-exp.: Resistenzsteigerung
	-Marek'sche Krankheit	-exp.: MDV-Proteine werden durch IFN- gehemmt

zusammengestellt u.a. nach Schijns und Horzinek, 1997

1.6. Bedeutung verschiedener equiner Viren

Von den equinen Viren haben unter anderem die equinen Herpesviren 1-4 und das Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) eine, auch wirtschaftliche, Bedeutung in Deutschland. Daneben sind bei Pferden Erkrankungen durch Rhinoviren sowie in anderen Ländern unter anderem das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) von Bedeutung.

1.6.1. Stomatitis Vesikularis

Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) besitzt auch in der Interferonforschung eine besondere Bedeutung durch seinen Einsatz im Labor. Zur Familie Rhabdoviridae gehörend handelt es sich um ein einsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Virus. Im Labor wird es als Referenzvirus zur Bestimmung antiviraler Aktivitäten von Interferon eingesetzt. Die Mengenangabe wird in biologischen Einheiten ausgedrückt (U: units): Eine Einheit ist die Menge an Interferon, die die Virusreplikation in der Zellkultur um die Hälfte reduziert. In der Humanmedizin

wird durch Angabe von Referenzwerten mit internationalen Einheiten (IU) gearbeitet.

Klinisch handelt es sich bei der Stomatitis vesicularis um eine hochkontagiöse, fieberhafte Infektionskrankheit bei Pferden, Maultieren und Rindern, seltener beim Schwein. Es zeigen sich Aphten in der Maulhöhle, an der Zunge, am Euter sowie an Hufen bzw. Klauen, weshalb differentialdiagnostisch die Maul- und Klauen-Seuche ausgeschlossen werden muß (Rodriguez et al., 1993). Der Krankheitsverlauf ist meist gutartig. Antigenetisch ist VSV nicht einheitlich. Es werden 5 Serotypen unterschieden (Argentina, Indiana, Cocal, Alagoas, New Jersey). Die Virusvermehrung wird in Zellkulturen, kleinen Versuchstieren und bebrüteten Hühnereiern durchgeführt. Sie läuft einher mit einem lytischen CPE und ist *in vitro* durch die Bildung großer Mengen von defekten interferierenden Partikeln charakterisiert. *In vivo* konnte dieses Phänomen nicht nachvollzogen werden (Letchworth et al., 1996). VSV wird über infizierten Bläscheninhalt und Speichel ausgeschieden und über direkten oder indirekten Kontakt (Küchenabfälle) übertragen. Außerdem wird die Übertragung durch Arthropoden diskutiert (Wagner, 1990; Letchworth, 1998). Die Inkubationszeit beträgt 24 h. Zur Diagnose wird das Aphtenmaterial untersucht und es erfolgt eine Virusanzüchtung. Nach überstandener Infektion entwickeln die Tiere eine Immunität für diesen Serotyp, die 6-12 Monate anhält. Gelegentlich kann eine Übertragung des Virus auf den Menschen mit influenzaähnlichen Symptomen erfolgen.

1.6.2. Equine Herpesvirusinfektionen

Von den 5 bei Pferden bekannten equinen Herpesviren (EHV) bekannt, zählen die Virustypen 1, 3 und 4 zu den Alphaherpesvirinae, während die Typen 2 und 5 Vertreter der Gammaherpesvirinae darstellen (Roizman et al., 1992; Crabb und Studdert, 1995a, 1995b). Bei den Herpesviren handelt es sich um doppelsträngige, behüllte DNA-Viren mit komplexem ikosaedrischem Aufbau.

Besondere Bedeutung hat der Erreger des Virusabortes, das equine Herpesvirus 1 (EHV-1). Schon 1932 wurden durch Dimock und Edwards Herpesviren als Erreger eines infektiösen Aborts beschrieben. Während man bis vor einigen Jahren noch den Subtyp 1 für die Aborte und den Subtyp 2 für die respiratorischen Erkrankungen (Rhinopneumonitis) verantwortlich machte (Mayr et al., 1965), ist heute erwiesen, daß es sich zwar um immunologisch eng verwandte, jedoch verschiedene Viren handelt. Der Erreger der Rhinopneumonitis wird daher als

EHV-4 bezeichnet. Das EHV-3 verursacht das Koithalexanthem. Ein weiteres EHV-Virus ist das equine Zytomegalovirus EHV-2, welches bei gesunden und Pferden mit unterschiedlicher Symptomatik, wie Keratokonjunktivitis und respiratorischen Störungen, isoliert wurde.

EHV-1 und **EHV-4** können beide den Virusabort der Stuten und die Rhinopneumonitis hervorrufen. EHV-1 Stämme werden vor allem aus abortierten Fohlen und EHV-4 Stämme aus Pferden mit Rhinopneumonitis isoliert (u.a. Studdert, 1983; Meyer et al., 1987). Erste genetische Untersuchungen ergaben eine gerade 17%ige DNA-Homologie (Studdert et al., 1981; Allen und Turtinen, 1982; Studdert, 1983; Chowdhury et al., 1986; Chowdhury, 1987). Nachdem das gesamte Genom von EHV-1 (Telford et al., 1992) und ein großer Teil von EHV-4 sequenziert war, wurden allerdings Homologien von 65-85% in der Nucleotidsequenz gefunden (Crabb und Studdert, 1995a, 1995b), was serologische Kreuzreaktionen und Überschneidungen bei den einzelnen Krankheitsbildern erklärt. Für die Untersuchung der EHV-1/-4-Infektionen stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung: SPF-Fohlen (Chong et al., 1991, 1992) sowie für EHV-1-Infektionen Maus- und Hamstermodelle (Stokes et al., 1989; Awan et al., 1990). Die Erreger werden vor allem über das Nasensekret ausgeschieden und durch direkten Kontakt oder Tröpfcheninfektion übertragen. Eintrittspforten sind Respirations- und Geschlechtstrakt. Bei der respiratorischen Erkrankung beträgt die Morbidität bis zu 100%. Etwa 65% der Aborte ereignen sich im 8. Trächtigkeitsmonat, 35% im 9. und 10. Monat (Rolle et al., 1993). Über die Epizootiologie der zentralnervösen Erscheinungen durch EHV-1 und EHV-4 herrscht noch Unklarheit. Primär vermehrt sich der Erreger in der Nasenschleimhaut und wird über das Lymph- und Kapillarsystem im ganzen Körper verteilt (Welch et al., 1992; Gibson et al., 1992b), was zu einer Virämiephase führt (Slater et al., 1994). Bei wiederholten Infektionen kann eine Virämie auch ausbleiben (Martens et al., 1989; Gibson et al., 1992a, 1992b). Bei der natürlichen EHV-Infektion entwickelt der Organismus eine zelluläre und humorale Immunantwort, die bis zu 9 Monaten anhält und durch die viralen Glykoproteine B, C und D hervorgerufen wird (Onions, 1991; Ostlund et al., 1991). T-Zellreaktionen beginnen wenige Tage *post infectionem* und erreichen in der 2. Woche ihren Höhepunkt. Ein Anstieg der neutralisierenden Ak ist ca. 14 Tage nach der Infektion zu beobachten, erreicht nach 33 Tagen ihr Maximum und fällt von diesem Niveau nach ca. 4 Monaten langsam wieder ab (Gibson et al., 1992b; Chong

et al, 1992). Die Bedeutung der neutralisierenden Ak ist nicht ganz klar. Es kann trotz ihrer Anwesenheit bei EHV-1 Infektionen zu Krankheitserscheinungen kommen (Bryans, 1969) und bei Infektionen mit EHV-4 ist die Induktion von neutralisierenden Ak sowohl im Mausmodell (Azmi und Field, 1993) als auch beim Pferd sehr schwach ausgeprägt (Tewari et al., 1993). Zur Prophylaxe stehen verschiedene Impfstoffe zur Verfügung, deren Wirksamkeit allerdings umstritten ist. Eine Studie von Bürki et al. (1989) zeigte, daß die Induktion von neutralisierenden Ak bei den Lebendimpfstoffen effektiver war, als bei attenuierten Impfstoffen. Dabei waren Wiederholungsimpfungen im Abstand von 6 Monaten allerdings Voraussetzung. Einen weiteren Überblick über die Verbreitung und Bedeutung von EHV-1/-2 und -4-Infektionen gibt Wolfinger (1998).

Das equine Zytomegalovirus **EHV-2** ist immunologisch gut von den anderen equinen Herpesviren abzugrenzen. Bei Untersuchungen von Browning und Studdert (1987a, 1987b) fielen 4 Isolate auf, die sich von den anderen deutlich unterschieden. Weitere Untersuchungen von Agius et al. (1992) wiesen andere antigenetische Eigenschaften als EHV-2 auf, weshalb sie als eigenständige equine Viren, EHV-5, bezeichnet wurden. Aufgrund der Ähnlichkeit des Genoms zu humanen Gammaherpesviren (z.B.: Epstein-Barr-Virus) wurden sie auch dieser Gruppe zugeordnet (Telford et al., 1993). Die Bedeutung von EHV-2-Infektionen ist noch unklar. Ca. 45-85% aller Pferde sind latente Virusträger (Wolfinger, 1998). Gelegentlich treten klinische Symptome wie Keratokonjunktivitis und Respirationserkrankungen auf.

EHV-3 ruft das Koitalexanthem, eine gutartig verlaufende Deckinfektion hervor. Es handelt sich hierbei um einen eigenständigen Erreger. Die Übertragung erfolgt durch den Deckakt und enge Kontakte. Die Trächtigkeit wird bei Stuten dadurch aber nicht beeinträchtigt. Die Inkubationszeit variiert zwischen 2 und 10 Tagen. Eine Immunität entwickelt sich nur örtlich begrenzt und hält in der Regel nur wenige Monate an (Rolle et al., 1993).

1.6.3. Bornasche Krankheit

Die Bornasche Krankheit (BK) ist eine nichteitrigte Enzephalomyelitis, deren klinisches Bild schon seit 200 Jahren bekannt ist (Zwick, 1939). Der Erreger, das Borna Disease Virus (BDV), gilt als neurotrop. Er ist mit einer lipidhaltigen Hülle umgeben und enthält eine einsträngige, unsegmentierte RNA (Ludwig und Bode, 1997). Schon Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts konnte die Virusätiologie durch die Übertragung ultrafiltrierten Gehirnmaterials von Pferden auf Kaninchen nachgewiesen werden (Zwick und Seifried, 1925). Eine umfassende Zusammenfassung zur Geschichte dieser Erkrankung und zur BDV-Infektion allgemein wurde von Dürrwald und Ludwig (1997) veröffentlicht. Typisch für diese klinische Erkrankung ist der akute Verlauf einer neurologischen Symptomatik mit letalem Ausgang. Während bis in die Mitte der 60er Jahre noch über 100 Todesfälle/Jahr in Sachsen auftraten, konnte seit Anfang der 70er Jahre ein starker Rückgang verzeichnet werden (Dürrwald und Ludwig, 1997). Nach Inkubationszeiten, die von Wochen bis Monaten dauern können, treten erste Anzeichen von Leistungsschwäche und Verhaltensänderungen auf, gefolgt von verringerter Futteraufnahme, Lähmungserscheinungen und zentralnervösen Störungen (Ludwig et al., 1985).

Die Krankheit trat vorrangig im mitteleuropäischen Raum auf. Da therapeutische Maßnahmen versagten, versuchte man mit Hilfe von verschiedenen Impfverfahren, die Verbreitung der Bornaschen Krankheit einzuschränken. Hiermit konnten keine Erfolge erreicht werden. Beim Einsatz der Lebendimpfstoffe bestand eher die Gefahr der Erregerausbreitung. Deshalb sind Impfungen seit 1992 nicht mehr zugelassen. Verschiedene Berichte über Erkrankungen anderer Tierarten und Virusnachweise lassen auf ein größeres Wirtsspektrum des BDV schließen, als anfangs angenommen wurde (Ludwig und Bode, 1997). So sind Spontaninfektionen beim Kaninchen (Johannsen und Bergmann, 1971), bei der Katze (Lundgren et al., 1993), beim Esel (Dürrwald, 1993), bei Straußen (Malkinson et al., 1993) und beim Rind (Bode et al., 1994b) beschrieben worden. Kokorsch führte 1997 umfassende Untersuchungen zur BK bei der Katze durch. Die Ergebnisse ergaben, daß es BDV-Infektionen bei der Katze in Deutschland gibt. In Fortführung dieser Studien konnte durch serologische und Antigen-Untersuchungen die BDV-Infektion bei kranken und gesund erscheinenden Katzen in Deutschland eindeutig belegt werden (Hübner, 1999).

Für Untersuchungen stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, wobei das Kaninchen (Zwick, 1939) und die Ratte (Hirano et al., 1983) eine bedeutende Rolle spielen. Im Gegensatz zur Ratte erkranken Mäuse nicht, bleiben jedoch persistent infiziert und bilden hohe Ak-Titer aus (Kao et al., 1984). Die Übertragungsweise der BK wurde bisher noch nicht geklärt. Der Erreger dagegen konnte im Speichel, im Augen- und Nasensekret (Czech, 1993), im Harn und in der Milch infizierter Kaninchen nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Verbreitung des Erregers im Tier weisen mit dem intraaxonalen Transport Parallelen zur Tollwut auf (Gosztonyi und Ludwig, 1995).

Die Rolle des Immunsystems ist bei BDV, wie bei verschiedenen anderen Viren, ambivalent. Es werden humorale, auch neutralisierende Antikörper gebildet (Ludwig et al., 1993). Tritt nach intensiver Virusreplikation eine zelluläre Immunantwort auf, kann dies zu einer Verschlechterung des klinischen Krankheitsbildes führen, wie experimentell an der Ratte studiert worden ist (Stitz et al., 1995).

Der Erreger der BK ist ein neurotropes Virus, das gegenüber Hitze, Säure, Lipidlösungsmitteln und UV-Bestrahlung sehr labil ist (Ludwig et al., 1988), was auf ein behülltes Virus schließen läßt. Diese Untersuchungen wurden durch elektronenmikroskopische Studien erhärtet (Zimmermann et al., 1994; Kohno et al., 1998). Die durch Filtrationsexperimente geschätzte Größe beträgt 80-100 nm (Danner und Mayr, 1979). BDV bildet keinen CPE aus und kann somit nur durch immunchemische Nachweismethoden anhand der Fokusbildung titriert werden (Ludwig et al., 1993). Experimentelle Infektionen mit BDV induzieren die Bildung von neutralisierenden Antikörpern bei Pferden, Kaninchen, Ratten, Mäusen, Hamstern und Hühnern (Ludwig et al., 1993). Die Mechanismen der Neutralisation und ihre Bedeutung im Krankheitsgeschehen sind allerdings bisher noch unklar. Lange Zeit konnte die Diagnose der BK nur *post mortem* gestellt werden (Gosztonyi und Ludwig, 1995). Heute dagegen ist eine *intra-vitam*-Diagnose möglich (Bode et al., 1994c), die eine Verbindung der Darstellung von BDV in Monozyten mittels Durchflußzytometrie (Bode et al., 1994a) und bei experimenteller Infektion sowohl während der akuten Krankheitsphase als auch bei persistenter Infektion mit der reversen Transkriptase-PCR möglich macht (Sierra-Honigmann et al., 1993; Steinbach, 1994). Es gelang außerdem der Nachweis von Antigen und RNA (Bode et al., 1995). Die Möglichkeit einer BDV-Infektion beim Menschen wird seit Mitte der 80er Jahre diskutiert (Rott et al., 1985). Es war von großem Interesse, daß BDV-

spezifische Antikörper bei Patienten mit psychiatrischer und neurologischer Symptomatik (Bode et al., 1992, 1993), bei AIDS-Patienten (Bode et al., 1988), bei Patienten mit chronischen Parasitosen (Riegel, 1990) und bei Drogensüchtigen (Bode et al., 1988) nachzuweisen war. Ein Überblick über BDV-Infektionen des Menschen auch in anderen Ländern ist bei Bode und Mitarbeiter (1995) zusammengefaßt. Die Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß BDV beim Menschen in bestimmte, mitunter chronische Krankheiten des Nervensystems, und hier vor allem Affektstörungen, involviert ist. Inwieweit BDV ursächlich am Krankheitsgeschehen beteiligt ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten (Ludwig und Bode, 1997).

1.6.4. Rhinovirusinfektionen

Das equine Rhinovirus ist ein Mitglied der Familie der Picornaviridae und besitzt eine Affinität zum Respirationstrakt. Es handelt sich um ein segmentiertes, unbehülltes RNA-Virus. Die Infektion ist bei Pferden weit verbreitet, jedoch selten mit klinischen Krankheitserscheinungen verbunden. Zwischen 70 und 90% aller Pferde haben hohe AK-Titer. Bis auf zwei Isolate lassen sich alle Stämme einem Serotyp zuordnen. Ausgeschieden werden die Rhinoviren mit dem Nasensekret und die Infektion erfolgt in den meisten Fällen über Kontakt, gelegentlich auch aerogen. Die Inkubationszeit beträgt 4-7 Tage. Häufig verläuft die Rhinovirusinfektion beim Pferd klinisch inapparent. Der direkte Erregernachweis ist sehr schwierig und der sichere Nachweis der Rhinovirusinfektion ist durch AK-Untersuchungen an Serumpaaren mit dem Neutralisationstest (NT) möglich. AK entwickeln sich 7-14 Tage *post infectionem*. Eine spezifische Impfprophylaxe ist gegenwärtig nicht notwendig, da hohe AK-Titer vor Infektionen schützen und Fohlen durch maternale AK vor Neuinfektion geschützt sind. Eine Empfänglichkeit des Menschen für equine Rhinoviren wird diskutiert (Mayr, 1987; Gerber, 1994).

1.7. Expressionsvektoren und Plasmide

Expressionsvektoren sind komplex aufgebaute DNA-Moleküle, die je nach Anforderungen entsprechende Gensequenzen enthalten.

Bei der Expression wird die kodierende Region der cDNA eines Gens in einen Klonierungsvektor eingebaut und anschließend in die Wirtszelle eingeschleust. Dort wird das entsprechende Protein exprimiert und kann so in größeren Mengen gewonnen werden.

Ein Klonierungsvektor ist ein DNA-Molekül, welches in der Lage ist, sich in der Wirtszelle zu replizieren und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Ein solcher Vektor sollte möglichst klein sein; im Idealfall unter 10 kb. Künstlich hergestellte Plasmide erfüllen diese Anforderungen der Rekombinations-technologie (Brown, 1996).

Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle ein eigenständiges Dasein führen. Sie enthalten 1 oder 2 Gene mit nützlichen Eigenschaften, wie zum Beispiel Antibiotikaresistenz, die im Labor häufig als Selektionsmarker genutzt wird. Mindestens ein Bereich des Plasmids wirkt als Replikationsstartpunkt, wodurch sich das Plasmid in der Zelle unabhängig vom Bakterienchromosom vermehren kann (Brown, 1996; Lehninger, 1996).

In einer einzelnen Zelle können gleichzeitig mehrere Plasmide unterschiedlichen Typs vorhanden sein. E.coli-Zellen können bis zu 7 verschiedene Plasmide gleichzeitig enthalten. Das Vorkommen von Plasmiden in Bakterien ist weit verbreitet. In anderen Organismen finden sie sich wesentlich seltener.

1.7.1. Prokaryotische Expressionssysteme

Ein prokaryotisches Expressionssystem muß bestimmte Signale enthalten, damit das Gen zum Beispiel in E.coli exprimiert wird (siehe auch Brown, 1996; Lehninger, 1996; Stryer, 1996).

Besonders wichtig sind dabei:

1. der Promotor
2. der Terminator
3. die Ribosomenbindungsstelle

Der Promotor kennzeichnet einen DNA- Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens beginnen soll. Bei E.coli wird der Promotor vom Sigmafaktor erkannt, einem Bestandteil des Transkriptionenzyms RNA-

Polymerase. Der Terminator ist ein kurzer DNA-Abschnitt, an dem die Transkription endet. Die Ribosomenbindungsstelle ist eine kurze Nucleotidsequenz, an die das Ribosom bindet (Brown, 1996; Stryer, 1996; Lehninger, 1996). Bei Genen höherer Organismen erkennt E.coli oft die Expressionssignale nicht, deshalb wird eine entsprechende Sequenz in einen Vektor eingebaut, der dann die zusätzlichen Expressionssignale enthält. Solche Klonierungsvektoren bezeichnet man als Expressionsvektoren. Der Promotor ist der wichtigste Teil des Expressionsvektors. Er setzt die Anheftung der RNA-Polymerase an die DNA in Gang. Außerdem bestimmt er die Geschwindigkeit und damit auch die Menge an Protein die hergestellt wird. Anhand dieser Eigenschaften kann man zwischen starken und schwachen Promotoren unterscheiden.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Steuerbarkeit. Bei E.coli kennt man zwei Haupttypen der Genregulation: die Induktion und die Repression. Durch Zusatz bestimmter regulierender chemischer Verbindungen zum Wachstumsmedium wird entweder ein induzierbares Gen an- bzw. ein reprimierbares Gen abgeschaltet. Die Steuerung der Expression ist insofern bedeutend, da eine übermäßige Produktion bestimmter Proteine sich schädigend auf die Bakterien auswirken kann oder eine zu starke Transkription möglicherweise die Replikationsfähigkeit des rekombinierten Plasmids beeinträchtigt.

Ein Beispiel für einen Promotor, der die oben angeführten Eigenschaften in sich vereinigt ist der lac-Promotor. Dieser reguliert die Transkription des *lacZ*-Gens und wird von Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG) induziert.

1.7.2. Eukaryotische Expressionssysteme

Um den Schwierigkeiten der gentechnischen Proteinproduktion in E.coli zu entgehen, kam man zu der Überlegung, einzellige Eukaryoten wie Hefen und Fadenpilze, die den Tieren näher stehen, als Expressionssysteme zu entwickeln. Außerdem erhoffte man sich größere Proteinausbeuten. Zum Teil konnten sich diese Hoffnungen erfüllen und verschiedene Mikroorganismen, wie Hefen, Pilze, Insektenzellen und pflanzliche Zellen, werden heute als Expressionsvektoren für die gentechnische Proteinproduktion genutzt (Brown, 1996).

2. PROBLEMSTELLUNG

Natürliche Interferone stellen wichtige Faktoren in der viralen Abwehr dar. Ziel meiner Arbeit war es, rekombinante Interferone des Pferdes herzustellen. Dafür wurden mir von der Fa. Bender und Co. (Wien) Ausgangsplasmide, die die entsprechenden DNA-Abschnitte der equinen Interferone - , - und - enthielten, zur Verfügung gestellt.

Zum einen sollten verschiedene pro- und eukaryotische Zellen auf ihre Verwendung als Expressionssysteme für verschiedene Plasmide getestet werden. Zum anderen sollte über den Einsatz ausgesuchter Viren die antivirale Aktivität verschiedener Zellen bestimmt werden. Ein weiterer Teil meiner Arbeit bestand in der Aufreinigung der Interferon-DNA und der Darstellung der Proteine.

Bisher wurde am Institut für Virologie noch nicht mit entsprechender Expressionstechnologie gearbeitet. Daher war es nötig, verschiedene Systeme gegeneinander auszutesten und die geeignetsten pro- und eukaryotischen Systeme zu finden.

Verwendete Enzyme

Alkalische Phosphatase, aus Kälberdarm einschließlich Puffer	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim

Kits

T4 DNA Ligase Kit	Boehringer, Mannheim
Strep-tag-Kit	Institut für Bioanalytik
1-kb-DNA-Marker	Gibco
Silver- Staining-Kit	Pharmacia Biotech
B-Per-Kit	Pierce
Xpress-system protein purification	Invitrogen

Chemikalien

Acrylamid	Gibco
Antibiotika: Ampicillin	Sigma
Kanamycin	Sigma
Bisacrylamid	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
EDTA 2H ₂ O	Serva
Ethidiumbromid	Serva
Glycerin	Roth
Kälberseren	Institut für
Fetales Kälberserum (FKS)	Immunpräparate und
Neonatales Kälberserum (NKS)	Nährmedien Berlin
Nähragar	Difco
Orange G-Ladepuffer	Sigma
Sodiumdodecylsulfat	Serva
TEMED	Roth
Tris	Serva
Zellkulturmedien	
DMEM	Serva
Leibowitz	Biochrom KG
CMC	Serva
RPMI 1640	Institut für
	Immunpräparate und
	Nährmedien Berlin
Regenbogenfarbmarker (high)	Amersham

Verbrauchsmaterialien

Filterpapier NA 45	Schleicher & Schuell
Nitrocellulose-Filterpapier	Genofit
Röntgenfilm b-max	Amersham
Zellzuchtplatten	Nunc
Mikrotiterplatten	
24-Loch-Platten	
Milliporefilter	Nunc
Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf

Geräte

Blotter	Biometra
CO ₂ -Feuchtbrutschrank	Heraeus
Hybridisierungssofen	Biometra
Lichtmikroskop, Telaval	Carl Zeiss, Jena
Power Macintosh 7100/80 mit Software zur Bildverarbeitung	
Schüttler	Infors AG, Bottmingen
Thermoschüttler	B.Braun, Biotech
Thermocycler	Perkin Elmer
Tischzentrifuge 4515 C	Eppendorf
Transilluminator	Hoefer
Varifuge 3.2 RS	Heraeus
Ultrazentrifuge	DuPont
Western-Blot-Gerätschaft	Biometra

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von Merck (Darmstadt) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen.

3.1. Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen sind in der Lage, Plasmide aufzunehmen. Zur Amplifizierung der rekombinanten Plasmide wurden diese kompetenten Zellen aus dem E.coli-Stamm DH-5 hergestellt. Für die Expressionsklonierung kamen außerdem die Stämme XL-1 Blue und TB 1 zum Einsatz. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Die Ausgangszellen lagen als Glycerinkulturen vor. Davon wurde eine Öse abgenommen, auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach einer Wachstumszeit von 10-15 Stunden erfolgte das Ausstreichen einer Einzelkolonie auf einer neuen Agarplatte und eine erneute Inkubation bei 37°C. Eine Kolonie davon wurde auf 10 ml Nährbouillon I (NB I) gegeben und für 14 -16 h bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 2,2 ml des Ansatzes zu 220 ml vorgewärmter NB I. Diese Zellsuspension mußte weiter bis zu einer $OD_{600}=0,29 - 0,31$ geschüttelt werden. Dann wurde der Ansatz für 10 min unter ständigem leichtem Schütteln im Eisbad gekühlt. Nach Zentrifugation (4°C, 3000 U/min, 10 min, K23-Fa.Janetzki) konnte der Überstand vorsichtig abgegossen werden. Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle im Eisbad durchgeführt. Es folgte eine Suspension des Pellets in 100 ml Transformationspuffer I (TFP I) und für 10 min leichtes Schütteln. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde wiederum der Überstand abgegossen. Die Zellen konnten jetzt weiterverwendet werden, oder das Pellet wurde in 8 ml TFB II suspendiert und 10 min im Eisbad leicht geschwenkt. Danach erfolgte eine Portionierung in Eppendorf-Reaktionsgefäße, die bei -70°C eingefroren wurden.

Verwendete Lösungen:

Nährbouillon NB I für 1 l:

24 g Nährbouillon I

1 g Glucose

2,04 mg $MgCl_2$

100-200 μg Ampicillin/ml

Transformationspuffer TFB I für 400 ml : 12 ml 1 M Kaliumacetat
40 ml 1 M KCl
4 ml 1 M CaCl₂

Der Ansatz wurde mit 200 ml Aqua bidest. gemischt und der pH-Wert auf 6,05-6,10 eingestellt. Danach erfolgte der Zusatz von 20 µl 1 M MgCl₂ und eine erneute pH-Einstellung auf 5,8 mittels Eisessig. Nach Zugabe von 48 ml Glycerol wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 400 ml aufgefüllt und durch 22 µm Millipore-Filter steril filtriert.

Transformationspuffer TFB II : 5 ml 0,2 M Hepes
1 ml 1 M HCl
7,5 ml 1 M CaCl₂

Nach Zugabe von ca. 60 ml H₂O erfolgte ein Einstellen des pH-Wertes mit HCl bzw. KOH auf 6,5. Nach Zufügen von 12 ml Glycerol wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und steril filtriert.

3.2. Transformation kompetenter Zellen

Ein Ligationsansatz inkubierte mit 180 µl kompetente Zellen für 30 min im Eisbad, 2 min bei 42°C und nochmals 5 min auf Eis. 4 Volumen LB-Medium wurden zugesetzt und für 1 h in den Brutschrank (37°C) gestellt. Die so behandelte Zellsuspension konnte in unterschiedlichen Volumina (100 µl, 200 µl, Rest) auf LB-Agarplatten (170 µg Amp./ml) ausgestrichen werden.

Verwendete Lösungen:

Ansatz für 1l LB-Medium:

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast	5g
NaCl	10g
pH7,0 überprüfen	

Nähragar:

Agar Noble	3g
in 200 ml LB-Medium lösen und 20 min autoklavieren	

3.3. Blau/Weiß Selektion

Zum Testen des Bakterienstammes XL-1 Blue, transformiert mit dem pBK-Vektor (mit CMV Promotor), auf das Vorhandensein von Fremd-DNA im pBK-Vektor wurde seine Fähigkeit, blaue oder weiße Kolonien zu bilden, untersucht. Dazu wurden Agarplatten mit ca. 20 ml Nähragar unter Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin gegossen. Pro Platte wurden 35 µl X-gal(5%) und 15 µl IPTG(20%) zugegeben, mit einem Glasspatel ausgestrichen und trocken gelassen. Anschließend folgte ein Ausstrich jeweils einer Öse der transformierten Bakterien pro Platte. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Vorhandensein eines Inserts färbten sich die Kolonien weiß und bei Nichtvorhandensein blau.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium: siehe 3.2.

Nähragar: siehe 3.2.

3.4. DNA-Präparationen

3.4.1. Minipräparation

Die zu selektierenden Bakterienkolonien wuchsen auf Nähragar unter Zusatz von 100-200 µg Ampicillin/ml bzw. 50 µg Kanamycin/ml über Nacht bei 37°C . Davon wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml Nährbouillon I (NB I) bei 37°C und 270 U/min angezogen. Anschließend erfolgte ein Abkühlen der Bakteriensuspension für 10 min im Eisbad und danach ein Pelletieren der Zellen bei 3 000 U/min für 15 min. Das Zellpellet wurde in 150 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Lysozymbilösung (Stammlösung 20 mg Lysozym/ml Lösung I) mußte die Lösung mit Hand geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wurde 430 µl Lösung II zugegeben, gründlich durchmischt und 5 min im Eisbad gekühlt. Nach weiterer Zugabe von 320 µl 3M Natriumacetat (pH4,6) wurde mit Hilfe des Schüttlers (Vibrofix VF 1, Fa. Janke und Kunkel) die Lösung kräftig durchmischt und für weitere 20 min im Eisbad gekühlt. Eine Klärung des Reaktionsansatzes konnte durch Zentrifugation bei 5000 U/min bei 4°C für 20 min erreicht werden. Dem in 1,5 ml Eppendorfröhrchen dekantierten Überstand

wurden 550 µl Isopropanol zugegeben und die pDNA bei RT innerhalb von 20 min ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 14 000 U/min pelletierten die gefällten Nukleinsäuren innerhalb von 10 min. Das mit 500 µl ca. 8°C kaltem, 70%igem Ethanol gewaschene, 5 min bei 14 000 U/min zentrifugierte und luftgetrocknete Pellet wurde in 80 µl TE-Puffer (pH 8) gelöst und mit 0,2 µg RNase anschließend bei 37°C für 20 min inkubiert. Nach Abzentrifugation nicht gelöster Bestandteile war der Überstand für weitere Untersuchungen zu verwenden.

Verwendete Lösungen:

Nähragar:	siehe 3.2.
Nährbouillon I:	25 g/l Nährbouillon I sowie 1 g/l Glucose 10 mM MgCl ₂ 100-200 µg Ampicillin/ml
Lösung I:	25 mM Tris/HCl pH7,5 10 mM EDTA pH8,0 15% (w/v) Saccharose
Lösung II:	0,2 M NaOH 1% SDS
TE-Puffer:	1 M Tris/HCl-Lösung (pH8,0) 0,5 M EDTA-Lösung (pH8,0) mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

3.4.2. Großpräparation von Plasmid-DNA

Bakterienkolonien für Plasmid-DNA-Großpräparationen wurden in 500 ml NB I-Medium angezogen. Die DNA-Präparation erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben, jedoch mit einem entsprechend vielfachen Volumen der Reagentien. Der DNA-Isolation schloß sich eine Reinigung im Cäsiumchloridgradienten an.

Die Reinigung von Plasmid-DNA aus Großpräparationen, erfolgte mittels CsCl₂-Gradientenzentrifugation. Nach Mischung von 4,5 g CsCl₂, 4,08 ml gelöste pDNA und 0,42 ml Ethidiumbromidlösung sowie dem Einbringen des Gemisches in Quick-seal Röhrchen (Volumen 5 ml, Fa.Beckmann) und exaktem gegeneinander Austarieren, wurden die Röhrchen verschlossen und bei RT im VTI 80 Rotor (Fa. Beckmann) bei 65 000 U/min für 22 Stunden in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (L8-M) zentrifugiert. Nach dieser Zeit waren unter UV-Licht im Zentrum des Gradienten zwei Banden zu erkennen. Die untere, zirkuläres Plasmid enthaltende Bande, wurde mit Hilfe einer Einwegspritze mit aufgesetzter Kanüle abgesaugt und in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Zugabe des doppelten Volumens Isoamylalkohols zu der DNA-Lösung diente dem Auswaschen von Ethidiumbromid. Dem Durchmischen des Ansatzes schloß sich eine Inkubation von 20-30 min bei RT an. Unter Verwurf der jeweils oberen Phase erfolgte ein Wiederholen der Prozedur so lange, bis die untere Phase farblos erschien. Zu 1 ml der gereinigten DNA-Lösung wurde ein gleiches Volumen Wasser und 8 ml 96%iges Ethanol (20°C) zugegeben und die DNA über Nacht bei RT ausgefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (Zentrifuge K 23, Fa.Janetzki) für 15 min bei 5000 U/min und 4°C. Das gewonnene Plasmid-DNA-Pellet wurde 2-3mal mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und nach dem Trocknen in 500-1000 µl TE-Puffer (pH 8) gelöst.

3.5. Restriktionsenzym-Verdauung

Zur restriktionsenzymatischen Spaltung wurde virale oder Plasmid-DNA in Ansätzen bis 1µg DNA mit Restriktionsenzymen in 25 µl Volumen, 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker wurden -Hind III und x-Hae III aufgetragen.

<u>25 µl Ansatz:</u>	DNA	8 µl
	Puffer	2,5 µl
	Enzym	je 1 µl
	Aqua bidest	12,5 µl

3.6. Glyceroldauerkulturen

Von den entsprechenden Klonen wurden Übernachtskulturen angesetzt und am nächsten Tag 100 µl davon in 5 ml ampicillinhaltiges (100µg/ml) LB-Medium überführt. Die Bakterien inkubierten bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 850 µl der Kultur in ein 2ml-cryo-Röhrchen (Nunc). Weiterhin wurden 150 µl steriles Glycerol hinzugefügt und mittels Vortexer durchmischt. Die Bakterien sollten bei -70°C gelagert werden.

Zum erneuten Ausstreichen wurde mit einer sterilen Impföse an der Oberfläche der Dauerkultur gekratzt, die anhaftenden Bakterien auf einer LB-Ampicillin-Platte verstrichen und die Platte bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.7. Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus und zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben auf Agarose-Gele in Horizontalgelapparaturen (Fa. Biometra) aufgetragen. Die Agarose kochte in 1 x TAE-Puffer auf und kühlte dann im Wasserbad auf 60°C zum Gießen ab. Nach Abkühlung wurden 100 ml der Agaroselösung 4 µl Ethidiumbromid Stock-Lösung (10 mg/ml) zum Anfärben der DNA zugesetzt. Die Auftrennung kleinerer Fragmente (<1 kb) erfolgte auf 1%igen Agarosegelen. Bei größeren Fragmenten oder genomischer DNA kamen 0,7%ige Gele zur Verwendung. Zum Laden des Gels wurde DNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Elektrophorese startete mit 40 V und nach dem Einlaufen der DNA in das Gel betrug die Stromspannung 60 V. Nach Beendigung des Laufs konnten die DNA-Banden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera unter Vorsatz eines Orange-Filters fotografiert werden (Polaroidfilm Typ 665).

Verwendete Lösungen:

TAE-Puffer (50x):

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	242,5 g
Na-Acetat	20,65 g
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	18,5 g
auf pH8,0 einstellen	
Aqua dest.	ad 1 l

3.8. Isolierung von DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Auftrennung der gespaltenen DNA wurde ein ca. 0,5 x 1,0 cm großes Stück der NA 45-Membran (Fa. Schleicher & Schuell) senkrecht, quer zur Laufrichtung, vor die gewünschte Bande über einen Schnitt in das Agarosegel eingeführt. Bei Fortsetzung der Elektrophorese für ca. 15-20 min lief das DNA-Fragment auf die Membran auf. Die nun mit DNA beladene Membran wurde mit Aqua bidest. gespült, um Agarosereste zu entfernen und anschließend in 150 µl Elutionspuffer überführt, dem 1 µl transferRNA (Stammlösung 20 µg/µl) zugesetzt wurde. Die nachfolgende Inkubation bei 56°C für 30 min diente der Verdrängung der DNA durch die RNA. Die DNA-freie NA 45-Membran wurde entfernt und aus dem DNA-haltigen Überstand konnte dann die DNA mit 96%igem Ethanol unter Zusatz von Na-Acetat ausgefällt werden. Nach 2maligem Waschen der DNA mit 70%igem Ethanol, Trocknen und Lösen in Aqua bidest. waren die gewonnenen Fragmente für die Ligation verwendbar.

Verwendete Lösungen:

Elutionspuffer:

1 M NaCl

20 mM Tris/HCl (pH8,0) siehe 3.24.1.

1 mM EDTA siehe 3.24.1.

3.9. Polymerasekettenreaktion

3.9.1. Verwendete Primer

Die in den Untersuchungen verwendeten Primer und die eingebauten Schnittstellen:

Tab.3.1.: PCR: -Interferon (pASK-Vektor, pBAD-Vektor) und -Interferon (pMal-Vektor; pBAD-Vektor)

PRIMER	NUCLEOTIDSEQUENZ
-Eco RI pASK -Pst I ,i'	5'-TTT GAATTC GCTCTGCCTGTTTCCTTACTGATG-3' 5'-TTACT GCAGACT CTGCGGCAAGTTTGTGGA-3'
-Eco RI pMal -Hind III ,i'	5'- AGAATTC CCACCTACAGGTGGATCCTC-3' 5'- CCCAAGCTT TTCAGTTTTGGAGGTAATC-3'
- NcoI pBAD - XbaI ,i'	5'-TG TCG TCC ATG GGA TGT GAC CTG CCT CAC ACC CAT -3' 5'-ATA TTC TAG ACT CTG CGG CAA GTT TGT GG -3'
- NcoI pBAD - XbaI ,i'	5'-TG TCG TCC ATG GTG AAC TAT GAC TTG CTT C -3' 5'-TA TTC TAG AGG GTT TTG GAG GTA ATC TGT G -3'

Die hervorgehobenen Buchstaben kennzeichnen die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme. Die Kennzeichnung ,i' (invers) weist auf die 3'-5'-Leserichtung des Primers (rückwärts, bezogen auf seine Sequenz).

3.9.2. Amplifikationsreaktion

Die Amplifikationsreaktionen wurden in Ansätzen von insgesamt 50 µl durchgeführt.

Tab.3.2.: PCR-Ansatz

	Ansatz 50 µl
10x PCR-Reaktionspuffer	5,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	2,0 µl
dNTP (5 mM)	4,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	2,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
DNA	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Die einzelnen Komponenten wurden in 0,5 ml Amp-Tubes (Perkin Elmer) pipettiert, mit zwei Tropfen Paraffinöl überschichtet und kurz anzentrifugiert, um ein Verdampfen des Reaktionsansatzes zu verhindern.

Die Polymerasekettenreaktion verlief nach folgendem Programm :

Tab.3.3.: Ablauf der PCR

-Vorheizen		72°C	2 min
-Denaturierung		94°C	2 min
-50 Zyklen	Denaturierung	94°C	30 sec
	Annealing (pASK IBA2)	68°C	30 sec
	(pMal c2)	64°C	30 sec
	(pBAD gIII)	60°C	60 sec
	(pBAD gIII)	60°C	60 sec
-Synthese		72°C	4 min
-Kühlung auf 4°C			

Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgte das Pipettieren des Reaktionsansatzes (ohne DNA), die Zugabe der zu amplifizierenden DNA und die PCR in getrennten Räumen. Die Arbeitsplätze und Gerätschaften wurden vor und nach der Nutzung mit UV-Licht bestrahlt.

3.10. Ligation

Vektor und PCR-Fragmente (bzw. Plasmide) wurden einem Restriktionsverdau (3.5.) unterzogen und die geschnittenen DNA-Fragmente aufgereinigt. Das Lösen der DNAs erfolgte in einer Konzentration von 0,1 µg/µl in TE-Puffer. 0,1 µg Vektor-DNA und 0,4 µg DNA der Fragmente wurden mit 11 µl H₂O zusammenpipettiert und bei 45°C 5 min inkubiert. Auf Eis fand die Zugabe von T4-DNA-Ligase (0,2 Weiss U), 2 µl Ligase 10x Puffer und 2 µl ATP (5mU) statt. Die Ligation erfolgte in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die 10-18 h bei 8-10°C inkubiert wurden.

Verwendete Lösungen:

TE-Puffer:

s. 3.4.1.

3.11. Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Membranen eukaryotischer Zellen (hier P3X, 44, bat) für Makromoleküle mittels eines hohen elektrischen Spannungsfeldes durchlässig gemacht. Die einzusetzenden Zellen müssen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und sollen in antibiotikafreiem Medium gewachsen sein. 1×10^7 Zellen konnten durch Zentrifugation (4°C , 5 min, 1500 U/min) geerntet werden. Anschließend resuspendierten sie in 5 ml PBS (Mg^{++} bzw. Ca^{++} -frei, eiskalt) und es erfolgte eine weitere Zentrifugation (4°C , 5 min, 1500 U/min). Danach wurden die Zellen ein weiteres Mal in eiskaltem PBS ($1-7 \times 10^7$ Zellen/ml) resuspendiert. Bei 4°C erfolgte das Verbringen der Aliquots von 0,5 ml in die 6-Loch-Platten (Fa. Nunc). In diese wurden anschließend jeweils 40 μg CsCl_2 -gereinigte DNA pro Loch zugegeben. Die Flüssigkeiten mußten miteinander vermischt und dann für weitere 5 min auf Eis stehen gelassen werden. Die Platten wurden bei Raumtemperatur in die Elektroporationsapparatur (Fa. Hoefer) verbracht und der Strom angelegt (Elektrodenabstand 0,4 cm, Spannung 4250V/cm, 25 μF , 0,4 msec.). Danach standen die Platten 10 min auf Eis. Die transfizierten Zellen mußten in 10 ml antibiotikafreies Medium überführt werden und 48 h inkubieren (37°C , 5% CO_2). Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel und Zugabe von g418 (Geneticin) zur Selektion (s. 3.13.). Diese Methode wurde nicht optimiert.

3.12. Transfektion eukaryotischer Zellen nach der Tfx-Methode

Für einen Transferansatz werden je 2 Zellkulturflaschen (28 cm^2) mit je 2×10^6 Zellen benötigt. 1 Stunde vorher erfolgte ein Mediumwechsel. Die Gewebeflaschen wurden mit 4,5 ml Transfermedium beschickt. Pro Flasche betrug die Ansatzlösung 500 μl . In ein Röhrchen wurden 400 μl serumfreies Medium, 2 μg DNA und 4,5 μl TFX (lipophile Kationen) miteinander vermischt. Das Gemisch stand 15 min zum Einwirken und danach mußte jeweils die Hälfte des Ansatzes (200 μl) in ein Loch einer 24-Loch Platte mit P3X-Zellen (10^6 Zellen) vermischt werden. Die Platte wurde dann für 2 h in einen Feuchtbrutschrank gestellt. Danach erfolgte eine Zugabe von 1 ml serumhaltigem Medium in jedes Loch. Nach 48 h Wachstumszeit wurden die Zellen unter erneutem Mediumwechsel in größere

Kulturgefäße umgesetzt. Diese Transformation fand unter optimierten Bedingungen statt.

3.13. Zellklonierung mit g418

Geneticin (g418) dient bei der Transfektion eukaryotischer Zellen als Selektionsmarker. Um eine g418-Resistenz zu erreichen, wurden P3X Zellen mit den Bakterienklonen 40 (-IFN), 37 (-IFN) sowie 51 (-IFN) transfiziert und nach der Transfektion mit 50% konditioniertem Medium beschickt.

Nach 48 h kamen die Zellen mit 125 µg g418/ml in Selektion. Nach weiteren 72 h wurden ca. 75% des Mediums entfernt und mit 250 µg g418/ml in 50% konditioniertem Medium gefüttert. In den folgenden 14 Tagen erfolgte mehrfacher Mediumwechsel mit 250 µg g418/ml.

Danach wurden die Zellen in 24-Loch-Platten umgesetzt und weiterhin mit 250 µg g418/ml Medium behandelt. 7 Tage später fand eine Umsetzung der ersten Klone auf 6-Loch-Platten statt. Nach weiteren 3 Tagen wurden diese Klone in 50 ml-Flaschen umgesetzt und g418 wurde dabei abgesetzt, da jetzt davon ausgegangen werden konnte, daß die noch vorhandenen Zellen alle gegen g418 resistent waren. Analoges Verfahren erfolgte mit allen anderen Zell-Linien.

3.14. Herstellung von Bakterienlysaten

Aus Glycerinkulturen der entsprechenden Klone 40 (IFN-), 37 (IFN-) und 51 (IFN-) wurde steril Material entnommen und in Gefäße mit 5 ml Nährboullion I (NB I), welche mit Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) versetzt waren, gegeben. Die Bakterienkulturen wuchsen bei 37°C und 160 U/min über Nacht auf dem Bakterienrüttler HT (Fa. Biotech). Aus diesen Kulturen wurde jeweils 1 ml entnommen und in ein neues Reagenzglas mit 4 ml antibiotikahaltigem Nährmedium überführt. Diese Kulturen wuchsen ein weiteres Mal auf dem Rüttler bis zu einer Dichte von OD= 0,5. Nun erfolgte die Zugabe der Induktoren (Anhydrotetracyclin, AHT bzw. Isopropyl- -D-Thiogalaktosid, IPTG). Die Kulturen verblieben für weitere 3 h bei unterschiedlichen Temperaturen (s. 4.2.1.1.) auf dem Rüttler. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in der Varifuge 3,2 RS für 20

min bei 3000 U/min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets für den weiteren Gebrauch bei -70°C eingefroren.

Verwendete Lösungen:

NB I

siehe 3.1.

3.15. Probenkonzentrierung mittels Mikrokonzentrat

Für die Konzentrierung der Proteine wurden verschiedene Proben von Bakterienlysaten und der Zell-Linie P3X eingesetzt. Es kamen Microcon-10 und -50 Gefäße der Fa. Amicon zum Einsatz.

Zuerst wurde das Sammelgefäß in das dazugehörige Eppendorfggefäß gesteckt und mit 0,5 ml der Probenflüssigkeit befüllt. Dabei war darauf zu achten, daß man mit der Pipettenspitze nicht die Membran beschädigte. Das Gefäß wurde verschlossen und die Probe 30 min bei 12 000 U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dann folgte ein Entfernen der Sammelgefäße aus den Auffanggefäßen, wurde umgedreht in ein anderes Eppendorfggefäß gesteckt und diese bei 3 500 U/min für ca. 3 min zentrifugiert. Damit befand sich das Konzentrat mit Proteinen zwischen 10 kD und 50 kD (ca. 5-10 µl) in dem 2. Auffanggefäß und konnte für Neutralisationstests und SDS-PAGE verwendet werden.

3.16. Bakterienprotein-Extraktion und Reinigung sogenannter Einschlußkörperchen (unlöslicher Proteine)

Das Pellet von einem 50 ml Bakterienkulturansatz $OD_{600}=0,5$ wurde in 5 ml B-PER Reagent gelöst, kurz gemischt und anschließend für 20-30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Durch erneute Zentrifugation (15 000 U/min, 15 min) konnten die löslichen von den unlöslichen Proteinen getrennt werden.

Für die Reinigung der Einschlußkörperchen (inclusion bodies) wurden nochmals 5 ml B-PER Reagent zum Pellet zugesetzt dieses resuspendiert. Dann erfolgte ein Zusatz von 100 µl Lysozym (Stammlösung: 10 mg/ml). Das Gemisch wurde gut geschüttelt und inkubierte 5 min bei RT. Anschließend wurden 15 ml des 1:10 verdünnten B-PER Reagents zu dieser Suspension gegeben und mit dem Vortexer gemischt. Durch Zentrifugation (15 000 U/min, 15 min) konnten die Einschlußkörperchen pelletiert werden. Das Pellet wurde in 20 ml des 1:10

verdünnten B-PER Reagents resuspendiert. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt.

3.17. Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Es wurden 2 Verfahren eingesetzt: Aufreinigung mit Hilfe von StrepTactin (StrepTag-Vektor) des Instituts für Bioanalytik, Göttingen sowie über eine Nickelsäule (Xpress; ProBond / pBAD gIII) der Fa. Invitrogene.

Die Bakterien wurden laut den entsprechenden Arbeitsanleitungen angezüchtet und die Proteinexpression induziert. Nach Ernte der E.coli-Zellen und selektivem Aufschluß des periplasmatischen Raumes oder Gewinnung eines Gesamtlisates konnten die Proben in der jeweiligen Affinitätssäule eingesetzt werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT. Nachdem die Säulen für die Reinigung der entsprechenden Proben präpariert waren, konnten diese aufgetragen und in einzelnen Fraktionen gewonnen werden. Die Säulen wurden für den weiteren Gebrauch nach Arbeitsanleitung gereinigt.

Verwendete Lösungen:

StrepTag-System:

Puffer W:	Tris/HCl	100 mM pH8,0
	EDTA	1 mM
Puffer E:	Puffer W	
	+ Desthiobiotin	2,5 mM
Puffer R:	Puffer W	
	+ HABA	1 mM

Xpress-System:

Bindepuffer:	Na ₃ PO ₄ NaCl pH 7,8	20 mM 500mM
Waschpuffer:	Na ₃ PO ₄ NaCl pH 6,0	20 mM 500 mM
Waschpuffer:	Na ₃ PO ₄ NaCl pH 5,5	20 mM 500 mM
Elutionspuffer:	Na ₃ PO ₄ NaCl pH 4,0	20 mM 500 mM

3.18. Interferonaufreinigung über die Blue-Sepharose® 6 Fast-Flow-Säule

Eine Säule, die zur Aufreinigung von Typ-I-Interferon geeignet ist (Fa. Pharmacia Biotech) wurde nach Arbeitsanweisung zusammengebaut und mit 10 ml Blue Sepharose gefüllt. Bevor die Probe über eine peristaltische Pumpe in die Säule überführt wurde, fand ein Durchlauf mit ca. 100 ml Äquilibrierungspuffer statt. Danach folgte ein Durchpumpen von ca. 30 ml der Probe (Zellkulturüberstand + 2g NaCl) durch die Säule, wurde aufgefangen und ein zweites Mal durch die Säule gepumpt. Ca. 2 ml des durchgelaufenen ZKÜ wurde gewonnen und der Rest verworfen. Anschließend wurde wieder ca. 50 ml Äquilibrierungspuffer auf die Säule gegeben, um Reste des ZKÜ auszuspülen. Dann mußte mit Hilfe von Elutionspuffer die zurückgehaltenen Proteine aus der Säule ausgewaschen und in ca. 1 ml-Fractionen in Eppendorfgläsern gewonnen werden. Diese wurden dann für weitere Versuche (SDS-PAGE, Neutralisationstest) verwendet. Zur Reinigung der Säule kamen abwechselnd je 50 ml Äquilibrierungspuffer, low- und high-Regenerierungspuffer zum Einsatz, die mehrmals durch die Säule gepumpt wurden.

Verwendete Lösungen:

Blue Sepharose Gel:

Äquilibrierungspuffer: 0,02 M Natriumphosphat pH7,2
1 M NaCl
in 100 ml Aqua bidest. lösen

Elutionspuffer: 50 ml Äquilibrierungspuffer
50 ml Ethylenglycol

Regenerationspuffer:

high (pH8,5): 0,1 M Tris-HCl
0,5 M NaCl
in 100 ml Aqua bidest. lösen

low (pH4,5): 0,1 M Natriumacetat
0,5 M NaCl
in 100 ml Aqua bidest. lösen

3.19. SDS-PAGE

Vor Gebrauch der Minigelkammer (Biometra) erfolgte eine sorgfältige Reinigung der Glasplatten mit Alkohol. Die Platten wurden mit Silikondichtungen abgedichtet und mit Klammern fixiert. Mit Hilfe des Kammes konnte eine Markierung gesetzt und das Trenngel vorsichtig blasenfrei zwischen die zwei Glasplatten bis zur Markierung gegossen werden. Anschließend wurde es mit ca. 1 ml Aqua dest. überschichtet, um das Gel während der Polymerisation vor Austrocknung zu schützen. Filterpapier diente zum Absaugen des Wassers und das Sammelgel mußte bis kurz vor dem Ende der Glasplatten aufgegossen werden. Dann wurde der Kamm langsam in das noch flüssige Sammelgel geschoben, um Luftblasen zu vermeiden. Nach dem Polymerisieren wurde der Kamm langsam gezogen, die Gummidichtung entfernt und das Gel in die Kammer eingesetzt. Bevor die einzelnen Proben (ca. 20 µl) aufgetragen wurden, erfolgte ein Vermischen mit halben Volumen Laufpuffer und Kochen für 5 min im Wasserbad. Die angelegte Stromstärke betrug ca. 15 mA durch das Sammelgel und ca. 30 mA durch das Trenngel. Der Lauf war beendet, als die Bromphenolblaubande das Ende des

Trenngels erreicht hatte. Das Gel konnte jetzt für die Coomassiefärbung, Silberfärbung oder den Westernblot verwendet werden.

Verwendete Lösungen: (Mengenangaben pro Gel - 10x15 Kammer= 6x8 cm Gel)

<u>-Trenngel</u> (6 ml pro Gel):	<u>15 %</u>	<u>12,5%</u>
30%Acrylamid/0,8%Bisacrylamid	3,0 ml	2,5 ml
1,88M Tris/HCl pH8,8	1,2 ml	1,2 ml
0,5% SDS	1,2 ml	1,2 ml
Aqua dest.	0,6 ml	1,1 ml
TEMED	5 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat 10%	30 µl	30 µl

<u>-Sammelgel</u> (2 ml pro Gel)	<u>5 %</u>
30%Acrylamid/0,8%Bisacrylamid	0,33 ml
0,625M Tris/HCl pH6,8	0,4 ml
0,5% SDS	0,4 ml
Aqua dest.	0,87 ml
TEMED	2 µl
Ammoniumpersulfat 10%	10 µl

<u>-Elektrophoresepuffer</u> (1l, 10fach)	
Tris Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	5 g
pH8,3	

<u>-Laufpuffer</u> (2,5fach,)	
0,625M Tris/HCl pH6,8	2,0 ml
SDS	0,2 g
Glycerin	5,0 ml
β-Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau	0,1 ml
Aqua bidest.	2,4 ml

3.20. Silberfärbung

Zuerst wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer in eine Petrischale mit der Fixierlösung überführt und 30 min geschwenkt. Anschließend verblieb das Gel für weitere 30 min in einer Sensibilisierungslösung. Dann wurde das Gel 3mal für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Als nächster Schritt folgte die Silberreaktion, wofür das Gel für 20 min in die entsprechende Reaktionslösung gelegt wurde. Anschließend kam wieder 2mal für 1 min der Waschschrift mit Aqua dest.. Dann mußte das Gel für ca. 5 min in die Entwicklungslösung verbracht, nach dem Stoppen nochmals 3mal für 5 min mit Aqua dest. gewaschen und zum Schluß 30 min in eine Konservierungslösung gelegt werden. Alle Schritte erfolgten unter leichtem Schwenken.

Abschließend wurde das Gel ca. 1 h bei 40°C in einem Vakuumtrockner auf Fließpapier (Fa. Schleicher & Schuell) aufgetrocknet.

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung

Ethanol	100 ml
Eisessig	25 ml
auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen	

Sensibilisierungslösung

Ethanol	75 ml
Glutardialdehyd 25% (w/v)	1,25 ml
Natriumthiosulfat 5% (w/v)	10 ml
Natriumacetat	17 g
auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen	

Silberreaktionslösung

Silbernitratlösung 2,5% (w/v)	25 ml
Formaldehyd 37% (w/v)	0,1 ml
auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen	

Entwicklungslösung

Sodiumcarbonat	6,25 g
Formaldehyd 37% (w/v)	0,05 ml
auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen	

Stopplösung

Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O	3,65 g
auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen	

Konservierungslösung

Ethanol	75 ml
Glycerol 87% (w/w)	11,5 ml
auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen	

3.21. Coomassiefärbung

Alternativ dazu erfolgte die Fixierung und Färbung der Proteinbanden nach der Coomassiefärbemethode. Dazu wurden die Gele 2 h in die Färbelösung verbracht und anschließend bis zum vollständigen Entfärben in den Entfärber gelegt (mehrmals wechseln). Im Gegensatz zur Silberfärbung ist diese Färbemethode weniger aufwendig aber auch weniger sensitiv.

Verwendete Lösungen:

Färbe- und Fixierlösung:	Coomassie Blue R 250	2,5 g
	Methanol	50 ml
	Ethanol	425 ml
	Aqua bidest	425 ml
	Eisessig	100 ml
Entfärber:	Aqua bidest.	225 ml
	Ethanol	225 ml
	Eisessig	50 ml

3.22. Herstellung polyklonaler Seren

Mittels Immunisierung sollen Antikörper hergestellt werden. Hierfür wurden Balb/c Mäuse (8-10 Wochen alt) mit 100 µl Interferonproben (Proteine, Peptide oder Einschlußkörper) vermischt mit 100 µl Freund'schem Adjuvans (FA) immunisiert. Bei der ersten Immunisierung kam komplettes FA zum Einsatz, die weiteren Immunisierungen erfolgten mit inkomplettem FA.

Die erste Immunisierung erfolgte subkutan, die zweite intramuskulär und die dritte intraperitoneal im Abstand von jeweils drei Wochen. Nach weiteren 3 Wochen folgte eine Entnahme von ca. 400 µl Blut aus dem Plexus intraorbitalis. Dieses wurde mehrmals 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert, um das Serum zu gewinnen, welches zur weiteren Verwendung (Westernblot, ELISA) bei -20°C eingefroren wurde.

3.23. Western-Blot

Die PVDF-Membran wurde entsprechend der Gelgröße (6 x 8 cm) zurechtgeschnitten und für 30 sec in 100%iges Methanol gelegt. Danach äquilibrierte die Membran für 15 min in schwachem Anodenpuffer. Zur gleichen Zeit wurden 3 Blottingpapiere (à 1,5 mm; Fa. Schleicher & Schuell) in Kathodenpuffer, ein weiteres Blottingpapier in schwachem Anodenpuffer und zwei weitere Blottingpapiere in starken Anodenpuffer gelegt. Das Polyacrylamidgel äquilibrierte 15 min in Kathodenpuffer. Der nun folgende Elektrotransfer erfolgte im Semidry-Verfahren. Der Sandwichaufbau auf dem Sartoliblitter (Fa. Biometra) sah wie folgt aus:

- 3 Filter à 1,5 mm (Kathodenpuffer)
- Polyacrylamidgel
- PVDF-Membran
- 1 Filter à 1,5 mm (schwacher Anodenpuffer)
- 2 Filter à 1,5 mm (starker Anodenpuffer)

Nach Entfernen aller Luftblasen, wurde die Kammer geschlossen und es erfolgte der Blotvorgang (500 V, 196 mA, 45 min). Anschließend wurde die PVDF-Membran luftgetrocknet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der immunologische Proteinnachweis erfolgte nach dem Chemilumineszenz-verfahren. Die PVDF-Membran wurde für 20-30 sec in Methanol eingelegt, dann 5 min in Transferpuffer

Standard und kurz in Aqua dest. geschwenkt. Danach schwenkte die Membran für 90 min bei RT in BB-Puffer. Der 1. Ak wurde 1:1000 in BB-Puffer verdünnt und die Membran für 60 min bei RT geschwenkt. Es folgte 4maliges Waschen je 10 min in BB-Puffer. Unter Schwenken inkubierte die Membran in dem 2. Ak (1:1000 verdünnt mit BB-Puffer) 45 min bei RT. Anschließend wurde sie erneut 4 x 10 min mit BB-Puffer und dann 2 x 10 min in Assay-Puffer gewaschen. Die PVDF-Membran mußte dann für 5 min mit CDP-Star bedeckt sein. Die überschüssige Lösung konnte vorsichtig mit einem Papiertuch aufgesogen werden. Von einer Plastikhülle umgeben wurde die PVDF-Membran in eine Röntgenkassette gelegt und in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Belichtungsdauer der Filme war unterschiedlich (20 sec -10 min). Nach der Belichtung schwenkte sie für 1 min in Entwickler, wurde kurz mit Wasser abgespült, für 3 min in Fixierlösung getaucht und getrocknet.

Verwendete Lösungen:

starker Anodenpuffer:	300 mM Tris-Base, pH10,4 10% Methanol
schwacher Anodenpuffer:	25 mM Tris-Base, pH10,4 10% Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM Tris-Base, pH9,4 40 mM -Aminocapronsäure 10% Methanol
Transfer-Puffer:	150 mM Glycin 20 mM Tris-Base 20% Methanol
BB-Puffer:	0,2% I-Block 1x PBS 0,1% Tween 20
Assay-Puffer:	0,1 M Diethanolamin 1 mM MgCl ₂ pH 10,0

3.24. Virusanzucht und -reinigung

3.24.1. Virusvermehrung und -reinigung von EHV-I und EHV-4

Zur Virusvermehrung von EHV-I und EHV-4 wurden die ED-Zellen mit einer Infektionsmultiplizität (m.o.i.) von 10^1 PFU pro Zelle infiziert, um die Bildung defekter Partikel zu verhindern. Das Inokulum blieb unter gelegentlichem Schwenken für 1 h auf den Zellen. Freies Virus wurde abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen, mit frischem Nährmedium (EDM+5%FKS) versehen und bis zur Ausbildung eines vollständigen zytopathogenen Effekts (CPE) weiter inkubiert. Die Zentrifugation des Überstandes der infizierten Zellen für 10 min bei 8000 U/min (4°C) im GSA Rotor (Fa. Sorvall) diente der Entfernung von Zelltrümmern. Anschließend wurde der Überstand auf ein 5 ml-Saccharosekissen (20% Saccharose in TE-Puffer) geschichtet und in einem SW-27 (Fa. Beckmann) Rotor 2 h bei 27 000 U/min ultrazentrifugiert. Das Pellet resuspendierte in 2 ml Zellkulturmedium und wurde sterilfiltriert.

Verwendete Lösungen:

1 M Tris/HCl:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan		121,14 g
Aqua dest.	ad	1000 ml
pH7,4 mit HCl einstellen		

0,2 M EDTA:

Ethylendiamintetracetat-Dinatriumsalz-Dihydrat		74,4 g
Aqua dest.	ad	1000 ml
pH7,2		

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer):

1 M Tris/HCl, pH7,4		10 mM (10,0 ml)
0,2 M EDTA, pH7,2		3 mM (15,0 ml)
Aqua dest.	ad	1000 ml

20 % (w/v) Saccharose in TE-Puffer

3.24.2. Virusvermehrung BDV

Die Virusfreisetzung aus den permanent infizierten Oligodendroglia-Zellen (OL/TL) erfolgte in Anlehnung an die bei Pauli und Ludwig (1985) beschriebene Methode. Dazu wurden 25 dicht gewachsene Maxi-Gewebekulturschalen der permanent infizierten Oligodendrozyten mit 20mM Tris/HCl gewaschen und die Platten anschließend 90 min bei 37°C mit der Tris/250 mM MgCl₂-Lösung inkubiert. Die gesammelten Überstände zentrifugierten 5 min bei 4000 U/min und wurden mit Zwittergent (Calbiochem, La Jolla, CA, Endkonzentration 0,002%) versetzt. Die Überstände kamen dann 1 h bei RT auf einen Schüttler und zentrifugierten anschließend in einem SW 27 Rotor 1 h mit 27 000 U/min bei 4°C. Die Pellets wurden in 2 ml des Zellkulturmediums resuspendiert und 10 sec. bei 40 mA (Kontrollstufe 3) mit Ultraschall (Brand Sonifier, B15, Branson Sonipower Cooperation, USA) behandelt. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration der Virussuspension.

Verwendete Lösungen:

20 mM Tris/HCl:

1 M Tris/HCl	20 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH7,5	

Tris/250 mM MgCl₂:

MgCl ₂ -Hexahydrat	250 mM
Tris/HCl	20 mM (ad 1000ml)
pH7,5	

Zwittergent 10%(w/v)

3.25. Virustitration

Die Titerbestimmung erfolgte im Plaquetest. In 6 Eppendorfgefäßen kamen jeweils 0,9 ml Nährmedium. Als erstes wurden 0,1 ml der entsprechenden Virussuspension in das erste Eppendorfgefäß gegeben und gründlich durchmischt. Nach Überführung von 0,1 ml dieser Lösung in das zweite Eppendorfgefäß erfolgte wieder eine gründliche Durchmischung. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt

bis man im letzten Eppendorfggefäß angelangt war. Aus jedem dieser Eppendorfggefäße wurden 0,2 ml Lösung in absteigender Reihenfolge auf mit Zellen bewachsene 24-Loch-Platten übertragen. Aus statistischen Gründen wurden Doppelwerte angelegt. Nach 2 Stunden wurde mit 0,6 ml CMC-Medium überschichtet. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 37°C im CO₂-Feuchtbrutschrank. Die Färbung und Fixierung der Zellen ist unter 3.26. beschrieben. Zur Titerberechnung diente folgende Formel:

$$\text{Virustiter} = \frac{\text{Anzahl Plaques (Loch 1 + Loch 2)} / 2}{\text{eingesetzte Verdünnung} \times \text{eingesetztes Volumen}} \quad (\text{PBE} / \text{ml})$$

Tab.3.4.: Verwendete Zell-Linien

Name der Zell-Linie	Art der Zell-Linie
44	BLV-infizierte Lammnierzelle
PO	nichtinfizierte Lammnierzelle
bat	nichtinfizierte Fledermauslungenzelle
P3X 63Ag8.653	nichtproduzierende Myelomazelle

3.26. Virusneutralisationstest auf 24-Loch-Platten

Für die Testung der verschiedenen Proben auf ihren Interferongehalt kamen 24-Loch-Platten der Firma Nunc mit einem gleichmäßig ausgebildeten ED-Zellrasen zum Einsatz. Das verbrauchte Zellzuchtmedium mußte zunächst fast vollständig abpipettiert werden. Danach kam die entsprechend zu testende Menge an Probenmaterial und die einzusetzende Menge an verdünntem EHV-1 bzw. VSV dazu. Anschließend erfolgte eine Einwirkzeit von 1 h. Abschließend wurde 1 ml CMC-Medium aufgetragen und die Platten wieder in den CO₂-Brutschrank zurückgestellt. Dort verblieben die Platten zwischen 24 und 48 h.

Wurde statt des CMC-Mediums mit LEI/DMEM gearbeitet, entfiel die Einwirkzeit von einer Stunde. Anschließend erfolgte die Fixierung und Färbung.

Zuerst wurde vorsichtig das Medium aus den einzelnen Plattenlöchern abpipettiert. Anschließend mußte mit PBS gewaschen werden. In jedes Loch wurden 0,5 ml

4%iges Formaldehyd gegeben und der Zellrasen für 20 min fixiert. Nach Abgießen des Formaldehyds kam in jede Vertiefung 1 ml der Giemsa-Färbelösung (20 Tropfen Stammlösung auf 10 ml Aqua dest.). Nach weiteren 20 min wurde die Färbelösung sorgfältig abgegossen, die Platte nochmals vorsichtig mit Aqua dest. gespült und über Nacht im Brutschrank bei 37°C zum Trocknen aufbewahrt. Danach konnten die entstandenen CPE ausgezählt werden.

3.27. VSV-NT mit Extinktionsmessung

In Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm wurden 1×10^6 Zellen eingesäht und 2 Tage bis auf eine Dichte von ca. 6×10^6 angezüchtet. Je Schale kamen 3 ml Trypsin dazu und zum Einwirken für ca. 5 min in den Feuchtbrutschrank. Anschließend erfolgte eine Vermischung der gelösten Zellen mit ca. 27 ml Medium, um eine ausreichende Virusmenge für 3 Mikrotiterplatten zu bekommen.

Für die Extinktionsmessung kamen Mikrotiterplatten der Fa.Nunc zum Einsatz. Pro Loch erfolgte eine Vorlage von 100 µl Nährmedium (EDM + 10% FKS). Die Reihe A wurde dabei übersprungen. Danach kamen von A1 - A12 nach Vorgabe des Protokolls in jedes Loch 200 µl IFN. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angelegt indem je 100 µl IFN in die nachfolgende Reihe übernommen wurde. Die überschüssigen 100 µl der Reihe H konnten verworfen werden. Nun kamen in jedes Loch 100 µl ED-Zellen dazu und die Platten inkubierten im Feuchtbrutschrank bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden in jedes Loch 50 µl VSV-Stamm Indiana (10^4 PFU/50µl) dazupipettiert und die Platten für weitere 24 Stunden in den Feuchtbrutschrank gestellt.

Am darauffolgenden Tag fixierten, färbten und lösten die Zellen. Dazu mußte das Medium durch vorsichtiges Ausschütten der Mikrotiterplatten entfernt werden. Dann wurden in jedes Loch 100 µl der Lösung I pipettiert, vorsichtig ausgeschüttet und dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Anschließend mußte die Mikrotiterplatte für ca. 40 min bei 37°C trocknen. Danach wurde in jedes Loch 50 µl der Lösung II pipettiert. Dieser Farbstoff wirkte 5 min ein. Dann konnte der Farbstoff durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte entfernt werden und die Platte wurde solange mit Aqua bidest. gewaschen, bis der ungebundene Farbstoff vollständig entfernt war (ca. 5mal). Die Platten sollten nun ca. 30 min bei 37 °C trocknen. Anschließend löste der am Zellprotein gebundene Farbstoff durch Zugabe von 100 µl/Loch der Lösung III.

Die optische Dichte ergab sich durch Messung der Werte bei 590 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers (Spektra, Fa. SLT).

Die Ergebnisse wurden in Laboreinheiten (LU) angegeben, wobei 1 LU die Menge an Interferon ist, die die Hälfte aller Zellen einer Kultur vor viraler Infektion schützt.

Verwendete Lösungen:

Lösung I	Physiologische NaCl-Lsg.
Lösung II:	5% (w/v) Kristallviolett in Ethanol
Lösung III:	1% SDS (w/v) in Ethanol

3.28. Borna-ELISA

Auf Mikrotiterplatten wurden Verdünnungsreihen von IFN wie beim Neutralisationstest mit VSV angelegt. Es kamen ED-Zellen und EEL-Zellen zur Verwendung, welche mit 50 µl BDV (10^3 FFU) infiziert waren. Der Testansatz wurde 5 Tage bei 37°C inkubiert und mit 100 µl einer 4%igen Formaldehydlösung in PBS für 30 min bei RT fixiert. Zum Nachweis intrazellulären BDV-spezifischen Antigens sind die Zellen nach Entfernen der Fixierlösung zunächst 30 min bei RT mit 100 µl 1%iger Triton X-100 Lösung behandelt worden, um die zellulären Membranen für die Antikörper durchlässig zu machen. Danach wurden die Testansätze 3mal gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30 min Inkubation bei RT mit 100 µl einer 1:100 Verdünnung eines oder mehrerer monoklonaler AK gegen das s-AG. Nach erneutem dreimaligen Waschen mußten die Ansätze 30 min bei RT mit 50 µl anti-Maus-Peroxidase-Antikörper (Dako, Verdünnung 1:500) inkubiert werden. Nach weiterem 3maligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Substratlösung/Loch. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt, sobald die Positivkontrolle deutlich gefärbte Foci zeigte. Titerangaben des IFN erfolgten analog zum Plaquetest, hier jedoch als mikroskopische Auswertung.

Verwendete Lösungen:

1% Triton X-100:

Triton X-100	10 ml
PBS	ad 1000 ml

Waschlösung:

FKS	1 ml
PBS	ad 100 ml

Natriumacetatpuffer:

Eisessig	2 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH 5,5 mit NaOH einstellen	

Substratlösung:

3-Amino-9-ethylcarbazol	10 mg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	3 ml
Natriumacetatpuffer	ad 50 ml
3% H ₂ O ₂	0,5 ml
(unmittelbar vor Gebrauch zufügen)	

4. ERGEBNISSE

Die Gene der Interferone - , - und - wurden beim Pferd bereits sequenziert (Himmler et al., 1986; Grünig et al., 1994; Himmler und Grünig, 1997). Rekombinante Proteine sind jedoch nicht bzw. nicht mehr verfügbar. Es fehlen auch weitgehend Aussagen zur biologischen Funktion, wobei zwischen antiviralen und immunologischen Wirkungen zu unterscheiden ist.

Da Interferon- und - in glykosylierter Form vorliegen, sollte neben dem häufig verwendeten prokaryotischen System auch die Expression im eukaryotischen System getestet werden. Zusätzlich wurden verschiedene Vektorsysteme verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Promotoren und Induktoren unterscheiden. Zum Teil verfügen sie über bakterielle Signalsequenzen und zusätzliche Nukleotidsequenzen, die die Aufreinigung des exprimierten Proteins am Amino- (NH₂-) oder Carboxy- (COOH-) Terminus ermöglichen.

Im ersten Teil meiner Arbeit habe ich mich mit der Herstellung, Produktion und Darstellung rekombinanter equiner Interferone im eukaryotischen System befaßt. Ein weiterer Teil behandelt das prokaryotische System sowie den Einsatz verschiedener Vektorsysteme. Ein Teil meiner Arbeit bestand somit auch im Vergleich verschiedener Systeme zur Expression dieser Interferone.

4.1. Eukaryotisches System

Zuerst wurden die zur Verfügung gestellten Plasmide pAH51/2 mit der kodierenden Region für eqIFN- , pAH62/0 mit der kodierenden Region für eqIFN- und pGN20 mit der kodierenden Region für eqIFN- in *E. coli* (DH-5) kloniert (3.1.). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III und Kpn I wurde der für die Interferone kodierende cDNA-Bereich aus diesem Ausgangsplasmid ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pBK CMV (Fa. Stratagene) kloniert (3.2., 3.10., 3.11., 3.12.). Der Vektor ist für Pro- und Eukaryoten entwickelt worden und hatte sich schon bei Versuchen zur Expression von Proteinen des Bovinen Leukose Virus in unserem Institut bewährt (Blankenstein, persönliche Mitteilung).

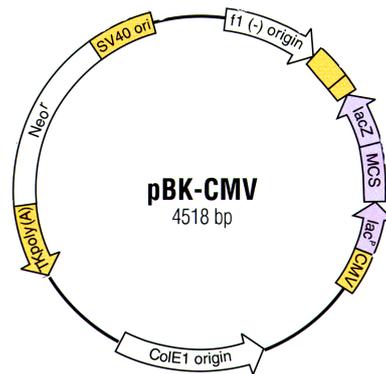


Abb. 4.1a.: Expressionsvektor pBK CMV (Fa. Stratagene). Es handelt sich hierbei um einen 4,5 kb Phagemidvektor. Dieser Vektor wurde im prokaryotischen System über die Kanamycin-Resistenz selektioniert. Der Promotor ist ein IPTG-induzierbarer *lac*Promotor. Außerdem enthält der Vektor ein *lacZ* Gen, so daß mittels x-gal-Umsatz eine blau/weiß-Selektion möglich ist. Die eukaryotische Selektion erfolgt über Geneticin (g418), welches über das Neomycin-Resistenzgen arbeitet. Die Expression in diesem System wird über den CMV-Promotor reguliert.

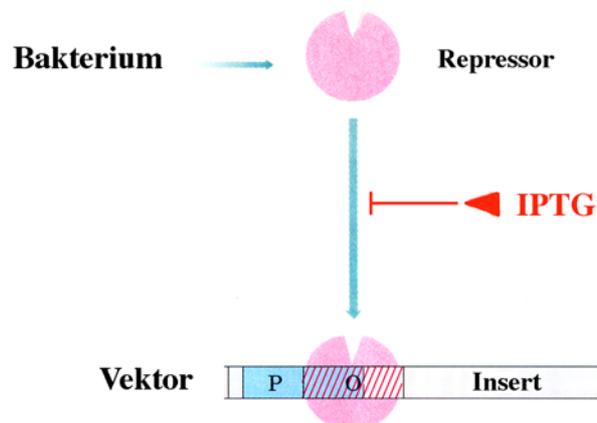


Abb. 4.1b.: Funktionsweise des *lac*-Operons (modifiziert nach Lehninger, 1998)

Da die Produktion eines Fremdproteins meist einen Wachstumsnachteil für die betreffende *E.coli*-Zelle mit sich bringt, ist es notwendig die Synthese rekombinanter Proteine gezielt zu regulieren. Daher werden Promotoren verwendet, deren Aktivität durch einen Repressor, der an den Operator bindet, blockiert werden kann. Zur Produktion des Zielproteins muß die Repression in einem bestimmten Wachstumsstadium aufgehoben werden. Dies geschieht durch Zugabe eines nicht metabolisierbaren, chemischen Induktors. In diesem Fall handelt es sich um IPTG, das an den Repressor bindet und somit die Wechselwirkung mit dem Operator verhindert.

Von den transfizierten permanenten Zell-Linien (44-1, 44-4, PO, bat) konnten die interferonhaltigen Zellkulturüberstände (ZKÜ) gewonnen und für einen Neutralisationstest (NT) eingesetzt werden. Die Zellkulturüberstände wurden erst abgenommen, nachdem eine äußerst hohe Zelldichte erreicht war und eine Proteianreicherung im Zellkulturüberstand eingetreten sein sollte. Die ersten Neutralisationstests erfolgten auf equinen Dermis (ED)-Zellen mit EHV-1 (50-100 PFU/Loch) (3.26.).

Bei der Zell-Linie PO konnte kein biologisch aktives Interferon nachgewiesen und im NT keine Hemmung festgestellt werden. Bei den anderen Zell-Linien wurde zwar Interferonaktivität gemessen, jedoch war die Virusinhibition äußerst gering (Abb.:4.2.). Es gelang trotz verschiedener Transfektionsmethoden (Elektroporation (3.11.); TFX-Methode (3.12.)) keine Steigerung der Interferonexpression.

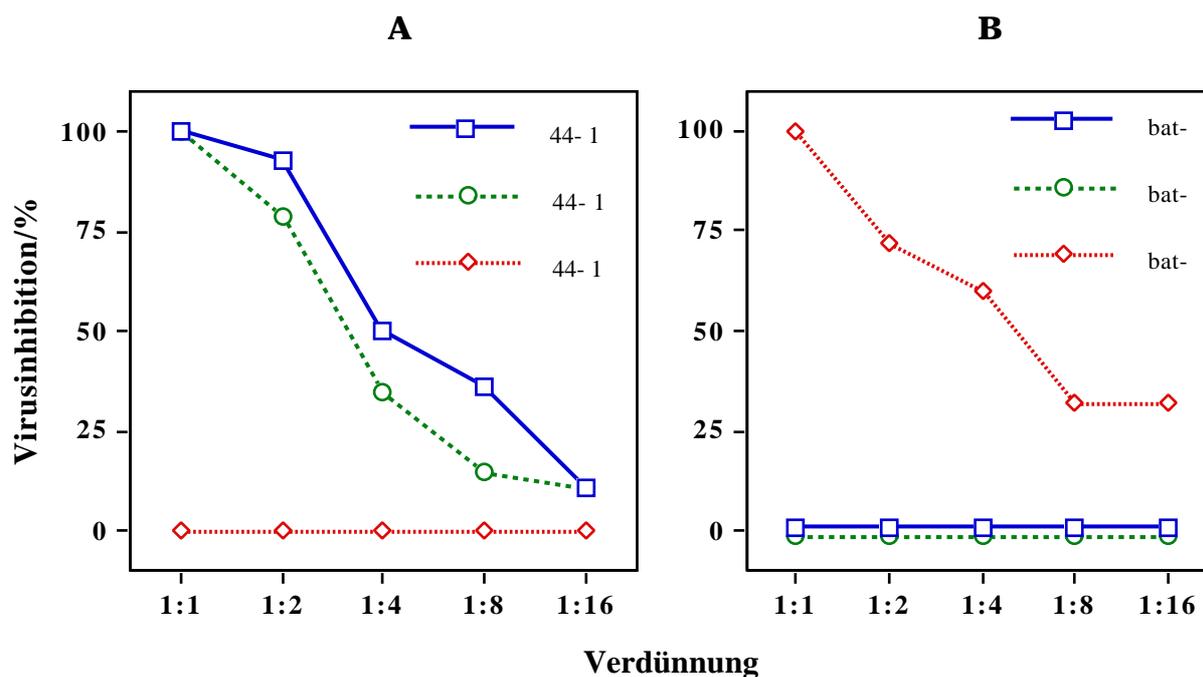


Abb.4.2.:A EHV-1 Inhibition durch ZKÜ der Linie 44-1. Bei diesem Subtyp der Lammnierzell-Linie vom Schaf konnte nur bei Typ-I-IFN eine Expression nachgewiesen werden. Bei relativ niedrigen Verdünnungsstufen (1:4) ist ein starker Inhibitionsverlust festzustellen. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 Versuchsreihen. Die Standardabweichung beträgt 20%.

B EHV-1 Inhibition durch ZKÜ der Linie bat. Bei der Fledermauslungenzell-Linie konnte nur bei Typ-II-IFN eine Expression nachgewiesen werden. Auch hier fällt die Inhibition sehr schnell ab. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 Versuchsreihen. Die Standardabweichung beträgt 20%.

Nach der SDS-PAGE konnten allerdings Banden im Bereich von ca. 20 kD nachgewiesen werden (siehe Abb.4.3.). Bei den ZKÜ-Proben, die vor dem NT über die Blue-Sepharose -Säule bearbeitet wurden (3.18.), um eine höhere Konzentration an Typ-I-IFN zu bekommen, ergaben sich im NT mit VSV Interferonkonzentrationen < 10 U/ml.

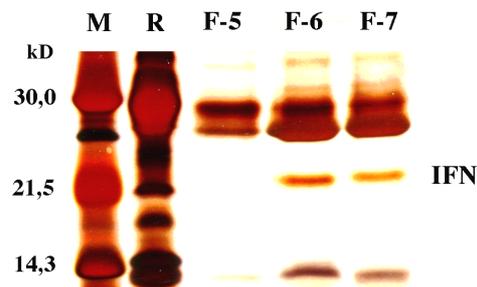


Abb.4.3.:Reinigung von rec.eqIFN- über die Blue-Sepharose®-Säule. Zellkulturüberstände wurden über eine Blue-Sepharose®-Säule gegeben. Gebundene Proteine wurden anschließend eluiert. Zellkulturüberstände und konzentriertes Eluat in verschiedenen Fraktionen (F-5, F-6, F-7) wurden zusammen mit einem Marker (M) und Retentat (R) durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung nachgewiesen. Neben einigen unspezifischen Banden wird auch eine zusätzliche Bande im zu erwartenden Bereich sichtbar.

Das eukaryotische System erwies sich aufgrund verschiedener Probleme (z.B. Anzucht) als ungeeignet und es gelang nicht, eine stabile Transfektion in diesem System zu erreichen. Die Mengen an exprimiertem Interferon waren für eine weitergehende Untersuchung nicht ausreichend, weshalb wurden im eukaryotischen System keine weiteren Experimente durchgeführt wurden. Die Anzüchtung und Vermehrung von Fremdproteinen in Prokaryoten gilt als weniger aufwendig und schneller. Die weiteren Versuche wurden daher im prokaryotischen System durchgeführt, wo auch im Verlauf der Arbeit wesentlich mehr Vektorvarianten verfügbar waren.

4.2. Prokaryotisches System

4.2.1. VEKTOR pBK-CMV

Nach Ligation der IFN-cDNA mit dem Vektor pBK CMV (3.10.) und anschließender Transformation in E.coli (DH-5) (3.11., 3.12.) wurden mehrere Klone gepickt und die Anzüchtung in Nährbouillon unter Zusatz von Kanamycin und IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid) (3.14.) durchgeführt. Nach Gewinnung der Bakterienlysate erfolgte eine Minipräparation (3.4.1.) und nach der Restriktionsenzymanalyse (3.5.) wurden die geeigneten Klone ausgewählt und Proteine exprimiert.

Die ersten Versuche führten wir mit Klonen von allen 3 Interferonen in Neutralisationstests (3.26.) mit EHV-1 durch (Daten nicht gezeigt). Spätere Neutralisationstests wurden mit VSV durchgeführt (siehe auch Abb. 4.6a.). Nur nach Transformation des Expressionsvektors mit IFN- zeigte sich signifikante biologische Aktivität. Die folgenden Versuche in diesem System wurden deshalb zunächst mit IFN- vorgenommen.

4.2.1.1. Einfluß verschiedener Parameter auf die IFN-Expression

Um eine Steigerung der Interferonexpression zu erreichen, wurden verschiedene Versuche auf Mikrotiterplatten durchgeführt und in Neutralisationstests (3.27.) gemessen.

Durch Zusatz von IPTG sollte eine Expressionssteigerung von Proteinen erreicht werden. IPTG ist ein Induktor, der durch Bindung an einen Repressor den Promotor indirekt aktiviert. IPTG wurde den Bakterienkulturen zugesetzt, wenn diese eine OD= 0,5 erreicht hatten. Die Bakterien wurden dann für weitere 3 h angezüchtet (3.14.). Diese Phase wurde in Vorexperimenten bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C, 37°C) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Nachdem eine optimale Expressionstemperatur von 30°C ermittelt wurde, sollte nun die optimale IPTG-Konzentration bestimmt werden.

Dazu wurden IPTG-Konzentrationen (IPTG 20%[w/v]) von 60-960 μ l/50 ml Bakterienansatz getestet. Die stärkste Expression zeigte sich bei Zusatz von 240 μ l (Abb. 4.4.) je Ansatz. Eine weitere Erhöhung der IPTG-Konzentration

brachte keine Aktivitätssteigerung des Interferons (Daten nicht gezeigt). Die biologische Aktivität wurde im Neutralisationstest mit VSV (1×10^5 PFU/ml) ermittelt. Die Menge an Interferon wird in units (U) angegeben. Ein unit ist die Menge an Interferon, die 50% der Zellen vor Infektion schützt, wobei die Infektion so gewählt wird, daß bei der Viruskontrolle 100% der Zellen zerstört werden. Die Titerauswertung erfolgte mikroskopisch oder mittels ELISA-Reader (3.27.).

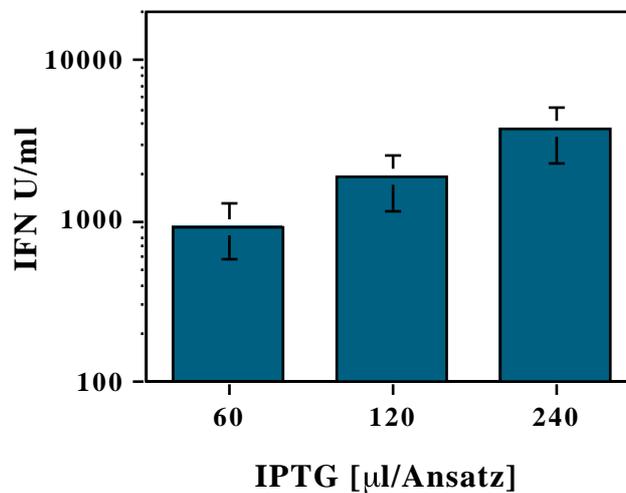


Abb.4.4.: Expression von rec.eqIFN- mittels pBK CMV Vektor in E.coli. Deutlich sichtbar die Wirkung von IPTG auf die Menge an exprimiertem Interferon (bestimmt im VSV-Neutralisationstest). Es handelt sich um Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchsreihen.

4.2.1.2. Kinetik der Interferon-Wirkung

Dieser Versuch sollte zeigen, welche Einwirkzeit von Interferon die Zellen am besten vor der Virusinfektion schützt. Als Interferonquelle wurde E. coli, transformiert mit IFN- in pBK CMV (Klon 40), der nach Zugabe von 240 µl IPTG/50 ml Bakterienlösung (40_{240}) 3 h bei 160 U/min und 30°C angezüchtet wurde, genommen.

Es wurden Einwirkzeiten des Interferons zwischen 2 und 72 h getestet. Der stärkste Virushemmeeffekt zeigte sich bei 6 h Einwirkzeit (Abb.4.5.).

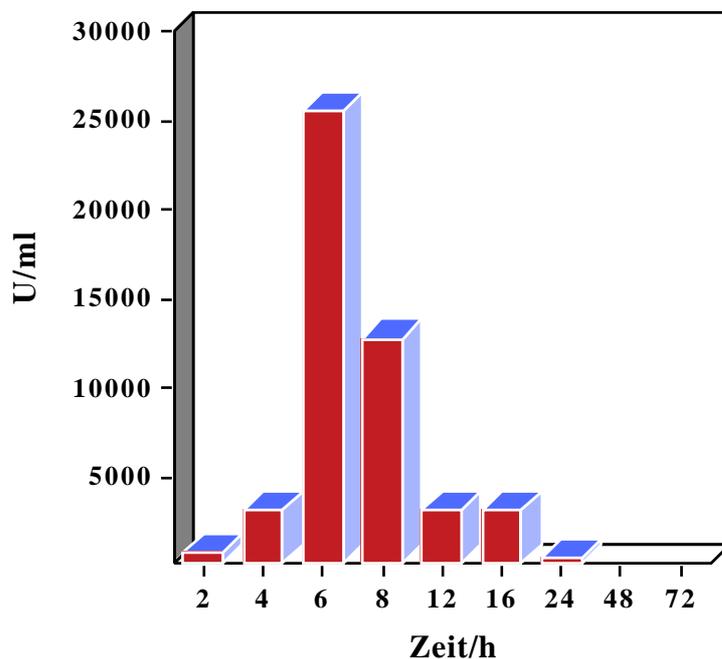


Abb.4.5.: Bestimmung der zeitabhängigen Interferon- -Aktivität in Abhängigkeit bei Inkubationszeit mit den Zielzellen im NT. Rec.eqIFN- benötigte einige Stunden bis zum Wirkungseintritt und wies in seiner Wirkungsdauer eine zeitliche Begrenzung auf. Die Daten beziehen sich auf eines von mehreren gleichartig durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob ein wiederholtes Auftragen von Interferon auf bereits mit der gleichen Menge Interferon behandelte Zellen eine Verstärkung der Virushemmung bewirken würde.

Dazu wurden zur gleichen Zeit 3 Mikrotiterplatten mit jeweils 10^4 Zellen je Loch ($100 \mu\text{l}$) angesetzt. Die Platten **1** und **2** bekamen jeweils eine Verdünnungsreihe mit dem Lysat der Probe $40_{240 \text{ IPTG}}$. Nach 6 h Einwirkzeit wurde auf Platte **1** $50 \mu\text{l}$ VSV (1×10^5 PFU/ml) aufgetragen. Platte **2** bekam ein zweites mal die gleiche Menge der Probe $40_{240 \text{ IPTG}}$ zugesetzt und auf Platte **3** wurde erstmalig die Interferonprobe gegeben. Nach weiteren 16 h wurde auch auf die Platten **2** und **3** $50 \mu\text{l}$ VSV (1×10^5 PFU/ml) aufgetragen. Nach jeweils 24 h Einwirkzeit des Virus wurden die Reaktionen abgestoppt und ausgewertet.

Es zeigte sich, daß eine wiederholte Interferongabe keine verstärkte Virushemmung nach sich zog (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.3. Vergleich verschiedener Zell-Linien

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluß Interferon auf verschiedene Zellen hat, wenn diese anschließend mit VSV infiziert werden. Dazu wurden equine Dermiszellen (ED), Madin Darby Bovine Kidney-Zellen (MDBK) und equine embryonale Lungenzellen (EEL) miteinander verglichen. Dadurch konnte ein Vergleich von Zell-Linien verschiedener Spezies (Rind, Pferd) angestellt werden und es wurden primäre (EEL) und permanente (ED) Zell-Linien miteinander verglichen.

Hierfür wurden vom IFN- γ -Lysat (40_{240}) Verdünnungsreihen eingesetzt. Die Interferonproben zeigten auf ED-Zellen die höchste Aktivität. Sie betrug auf ED-Zellen $4,96 \times 10^4$ U/ml, auf MDBK-Zellen $3,2 \times 10^3$ U/ml und auf EEL-Zellen 2×10^2 U/ml (siehe Tab.4.1.).

Die ED-Linie hob sich durch die einfache Anzucht (Monolayer nach 24 h) hervor. Gleiches traf auf die MDBK-Zellen zu. Bei den EEL-Zellen dauerte die Ausbildung eines vollständigen Monolayers mit ca. 72 h am längsten. Bei einigen Neutralisationstests, fiel beim Einsatz größerer Mengen von IFN- γ eine Inhibition des Zellwachstums auf. Dies zeigte sich sowohl im pro- als auch im eukaryotischen System.

Tab.4.1.: Aktivität equiner Interferone auf verschiedenen Zell-Linien (getestet im NT)

Zell-Linie	Interferonaktivität in U/ml
ED	$4,96 \times 10^4$
MDBK	$3,2 \times 10^3$
EEL	2×10^2

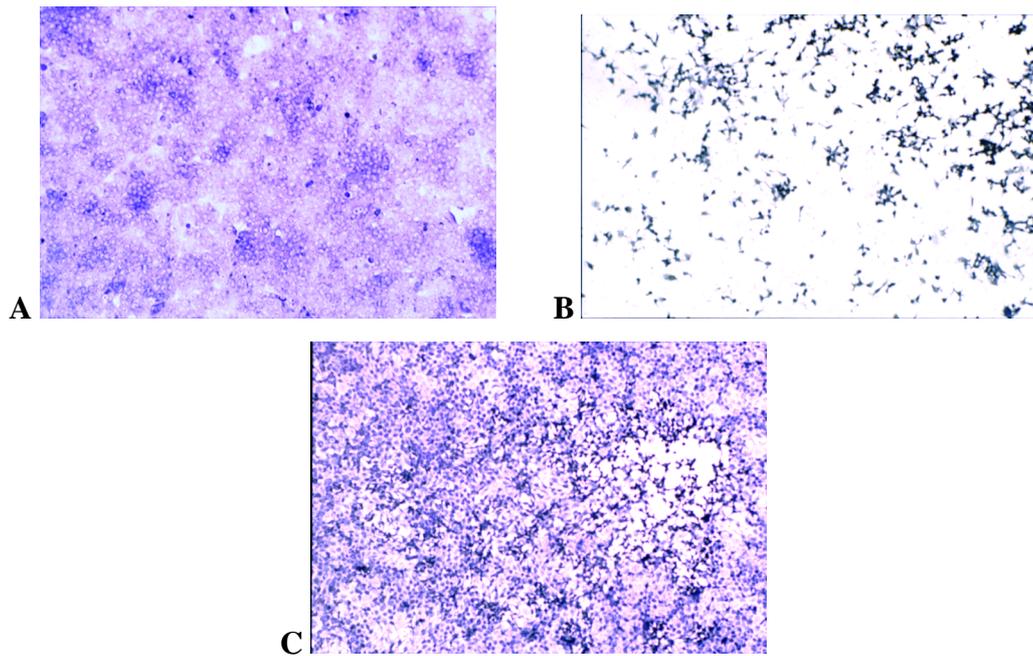


Abb.4.6a.: Inhibition der VSV-Replikation in ED-Zellen durch rec.eqIFN- β .
A Zell-Kontrolle; **B** Virus-Kontrolle; **C** Reduktion der VSV Wirkung auf einzelne kleine Plaques.

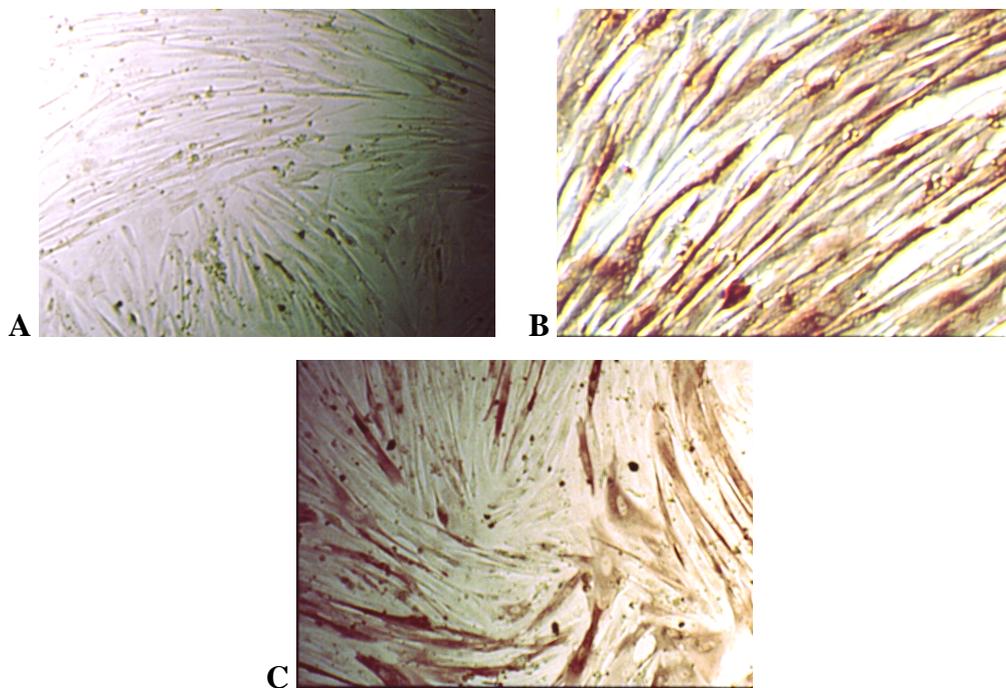


Abb.4.6b.: Inhibition der BDV-Replikation in EEL-Zellen durch rec.eqIFN- β .
A Zell-Kontrolle; **B** Virus-Kontrolle; **C** Reduktion der BDV Wirkung auf einzelne kleine Foci.

4.2.1.4. Vergleich verschiedener equiner Viren

Neben dem Standardvirus VSV war es interessant zu sehen, wie sich Interferon beim Einsatz anderer Viren, die Pferde-Zellen infizieren, verhält. Es wurden VSV, EHV-1, EHV-4, Rhino- und Borna-Viren miteinander verglichen. VSV wurde als laborübliches Standardvirus eingesetzt, hatte aber gegenüber EHV-1 den Nachteil, nicht so scharfe und damit gut auswertbare Plaques auszubilden. Bei EHV-4 war mit ca. 48 h eine lange Einwirkzeit des Virus notwendig, was sich nachteilig auf den Zellrasen bei ED-Zellen auswirkte. Bei den Tests mit Rhinoviren ergab sich eine auffällig hohe Virusinhibition. Eine durch Bornaviren hervorgerufene Infektion konnte im Zell-ELISA (3.28.) auf der EEL-Linie (Abb. 4.6b.) nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.2.). Von ED wurden nur 1-10 % der Zellen infiziert.

Um eine vollständige Infektion aller Zellen zu erhalten, mußten unterschiedliche Virusmengen eingesetzt werden. Interferon-Aktivität und Virusmenge korrelierten nicht miteinander. Auffällig hingegen war, daß die beiden Viren mit der kürzesten Replikationszeit (VSV, Rhino) ebenso wie EHV-4 am deutlichsten inhibiert werden.

Tab. 4.2.: Wirkung von rec.eqIFN- auf equine Viren unterschiedlicher Familien

Virus	Viren pro Loch (in 50µl)	Aktivität in U/ml
VSV	1x10 ⁴ PFU	1,6x10 ³
EHV-1	1x10 ³ PFU	8x10 ²
EHV-4	5x10 ³ PFU	1,6x10 ³
RHINO	2x10 ³ PFU	3,2x10 ³
BORNA	1x10 ³ FFU	8x10 ²

4.2.1.5. Proteinexpression mittels pBK CMV-Vektor

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war die Darstellung der IFN-Proteine, um Antikörper herstellen zu können. Hierbei ergaben sich verschiedene Probleme. Der für die Expression von IFN verwendete Expressionsvektor pBK CMV kodierte ebenfalls für andere Proteine und es war in verschiedensten Versuchen nicht möglich, das von mir gesuchte Interferonprotein eindeutig darzustellen. Auch konnte für dieses Vektorsystem keine Möglichkeit zur Aufreinigung gefunden werden, um das entsprechende IFN-Protein von den anderen Proteinen zu trennen.

Insgesamt waren die Ergebnisse in Bezug auf die Interferonaktivität sehr unbefriedigend und es wurde ein anderes Expressionssystem, das Strep-tag-System, getestet (3.17.).

4.2.2. VEKTOR pASK-IBA2

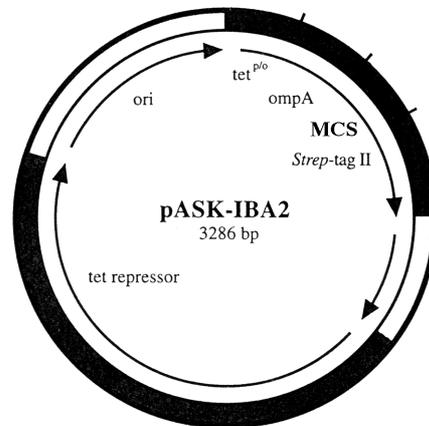


Abb.4.7.:Schematische Darstellung des Klonierungs- und Expressionsvektors pASK-IBA2 (Institut für Bioanalytik). Dieses System basiert auf einem Vektor, der die Vorteile des Tetracyclinpromotors nutzt. Die Expressionskassette steht unter der Transkriptionskontrolle des tetA-Promotors/Operators. Der tet-Promotor wird durch Zugabe von sehr geringen, nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen (200 µg/ml Kultur) an Anhydrotetracyclin (AHT) induziert (Skerra, 1994). Durch Klonierung der IFN-cDNA in den Vektor wird das eqIFN-Protein mit dem Strep-tag II exprimiert. Dadurch kann es durch Affinitätschromatographie mittels immobilisierten StrepTactin von den bakteriellen Proteinen abgetrennt werden.

Für die Klonierung von eqIFN war es notwendig, Primer zu designen und durch diese einen Ansatz für die DNA-Polymerase zu schaffen. Nach der PCR wurde die DNA mittels Restriktionsenzyme in den pASK-Vektor eingebaut und über *E.coli* Anzucht amplifiziert. Die Bakterienlysate wurden mit PBS gelöst und in mehreren Frieren/Tauen-Schritten bearbeitet. Diese Proben wurden im Neutralisationstest eingesetzt; es konnte jedoch nur geringe biologische Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Andererseits wurden die einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE (3.19.) aufgetrennt.

4.2.2.1. Proteinexpression mittels pASK-IBA2-Vektor

Mit dem Strep-tag-System bestand die Möglichkeit, das Interferonprotein darzustellen, bei dem die löslichen Proteine in den periplasmatischen Raum abgegeben werden. Da die unlöslichen Proteine auch gleichzeitig eine nicht funktionelle Form darstellen, war vor allem die lösliche, funktionelle Form der Proteine interessant. Laut Arbeitsanweisung konnte die Ausbeute an löslichem Protein durch Senken der Anzuchtstemperatur während der Inkubationszeit mit AHT (3 h) erhöht werden und die Expression war bei 30°C stärker als bei 37°C (Daten nicht gezeigt). Ein Versuch, diesen Test auch bei 22°C durchzuführen, scheiterte an räumlichen Bedingungen in unserem Institut.

Beim Auftrennen der Proben durch SDS-PAGE, stellte sich heraus, daß ein Großteil der Interferonproteine in der unlöslichen Form vorhanden sein müßte. So war im Proteingel kaum ein Nachweis des Interferons möglich und erst nach Aufreinigung der Proben über die Strep-tag-Säule (3.17.) gelang im Westernblot ein Nachweis von IFN- (Klon 15). Da die Proteine in den Einschlußkörperchen der Bakterien vermutet wurden, schlossen wir sie mit Hilfe von B-PER -Reagent auf (3.16.). Das Interferon konnte nun schon in der SDS-PAGE (3.19.) dargestellt werden (Abb.:4.8.).

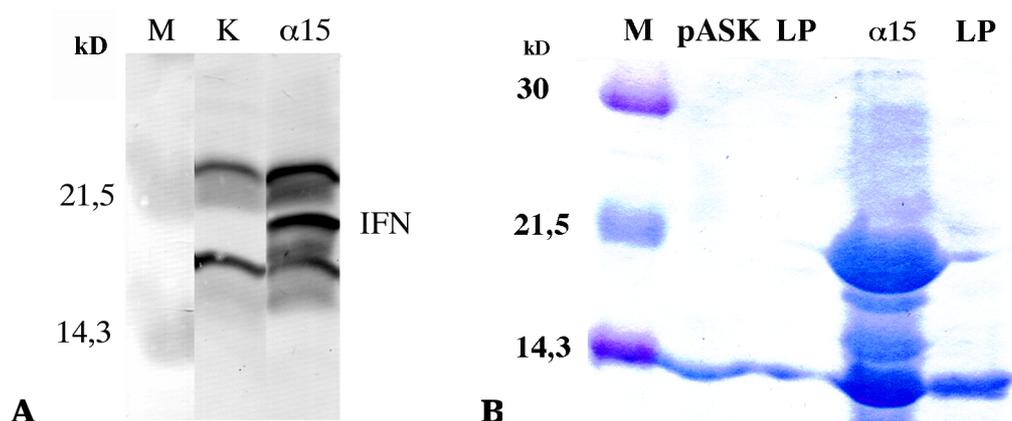


Abb.4.8.: **A** IFN- -Darstellung im Westernblot. Neben unspezifischen Banden zeigte sich bei der Lysatprobe (α15) eindeutig eine zusätzliche Bande in der Größe von ca. 20 kD. M: Marker; K: Kontroll-Lysat
B SDS-PAGE (Coomassie) Darstellung von IFN- nach Aufschluß der Einschlußkörper. M: Marker; pASK: Kontrolle; LP: Laufpuffer; α15: IFN-

4.2.3. VEKTOR pMAL-c2

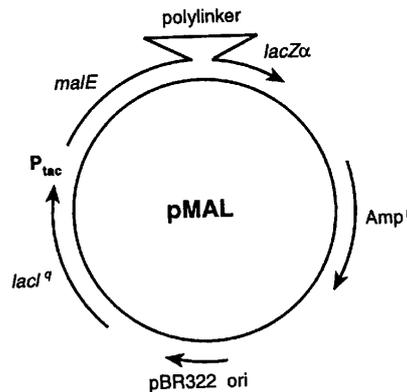


Abb.4.9.: Schematische Darstellung des Vektors pMAL-c2 (Fa. New England Biolabs). Hierbei handelt es sich um einen 6,7 kb Vektor. Dieser enthält einen starken tac-Promotor (P_{tac}). Durch das malE-Gen wird das Maltose-binding-Protein (MBP) kodiert. Nach Einbringen des Fremdgens resultiert daraus die Expression des MBP-Fusion-Protein. Der lac-Repressor ($lacI^q$) inhibiert indirekt P_{tag} , wenn keine Induktion durch IPTG erfolgt.

Da mit den bisher verwendeten Vektoren pBK CMV und pASK IBA2 in Bezug auf die Expression von IFN- γ und IFN- β keine Erfolge erzielt werden konnten, wurde IFN- γ in pMAL c2 kloniert. Nach Klonierung und Anzuchtung des Proteins in E.coli wurden nach entsprechender Vorbehandlung die einzelnen Proben auf die SDS-PAGE aufgetragen (Abb.4.10.).

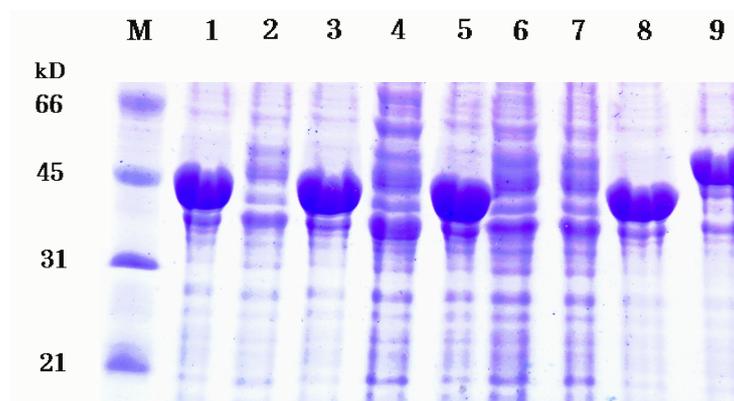


Abb.4.10.: SDS-PAGE (Coomassie) von IFN- γ in pMAL c2.

M:Marker; 1,3,5,8: MBP (ca.42 kD), 2,4,6,7: kein relevantes Protein nachweisbar; 9: MBP und Teile des IFN-Proteins (ca. 50 kD)

Vollständig exprimiertes IFN-Protein müsste eine Bande von 62,1 kD (MBP: 42,7 kD + IFN- γ : 19,4 kD) ergeben.

4.2.4. VEKTOR pBAD gIII

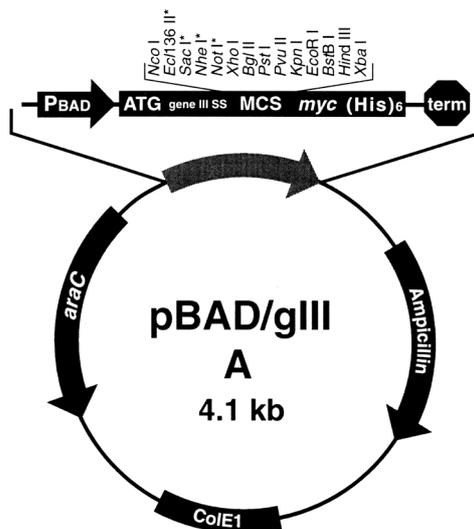


Abb.4.11a.: Schematische Darstellung des Vektors pBAD gIII. GenIII kodiert für eine Aminosäuresequenz, die für die Sekretion des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen Raum verantwortlich ist. Um eine optimale Sekretion zu erreichen, enthält der Vektor den araBAD-Promotor (P_{BAD}), der durch Arabinose induziert wird und durch das Regulatorprotein AraC reguliert. Weiterhin enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

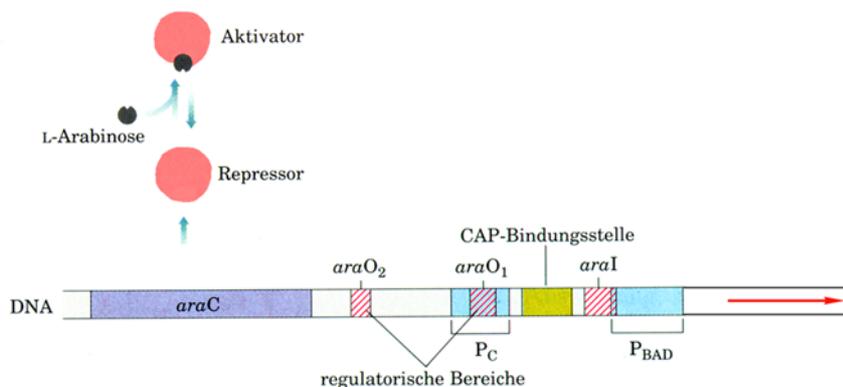


Abb.4.11b.: Schematische Darstellung des Arabinose-Operons (modifiziert nach Lehninger, 1998). Optimale Expressionsmengen können durch gezielte und vielfältige Regulation des araBAD-Promotors erreicht werden. Beim Arabinose (ara)-Operon treten mehrere Regulationsmechanismen auf. Das Regulatorgen *araC* kodiert das AraC-Protein (AraC). Durch die Bindung von Arabinose ändert sich die Repressorform des AraC-Proteins in eine Aktivatorform. Die CAP (Katabolit-Gen-Aktivator-Protein) -Bindungsstelle vermittelt die repressive Wirkung der Glukose, so daß bei geringem Glukosespiegel AraC verstärkt als Repressor auftritt. Die Abschnitte *araO*₂ und *araO*₁ sowie *araI* sind Ansatzstellen des AraC-Proteins. P_{BAD} stellt den Promotor für die Gene *araBAD* dar, welche bei pBAD gIII durch ein Insert (z.B. IFN-Gen) ersetzt werden.

Nach Ligation von IFN- α und IFN- β mit dem Vektor pBAD gIII (3.10.) und Transformation in E.coli (3.12.) erfolgte eine Anzucht auf Nähragar. Anschließend wurden einzelne Klone entnommen und in Bakterienübernachtskulturen angezüchtet. Nach 3 h Induktion mit Arabinose wurden die Proben entsprechend weiterbehandelt (3.14.) und im Neutralisationstest (3.27.) eingesetzt. Dabei konnten für IFN- α bei einzelnen Klonen hohe Aktivitäten ermittelt werden, während bei IFN- β keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tab.4.3.). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen.

Tab.4.3.: Aktivitäten von IFN in pBAD gIII, ermittelt im NT

Interferon	Aktivität in U/ml
IFN- α (Klon 9 und 12)	$3,3 \times 10^5$
IFN- β (Klon 1 und 2)	keine Aktivität

Die Proben (α -9, α -10, α -12, β -1, β -2, C) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und es konnten Banden in der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abb.4.12.).

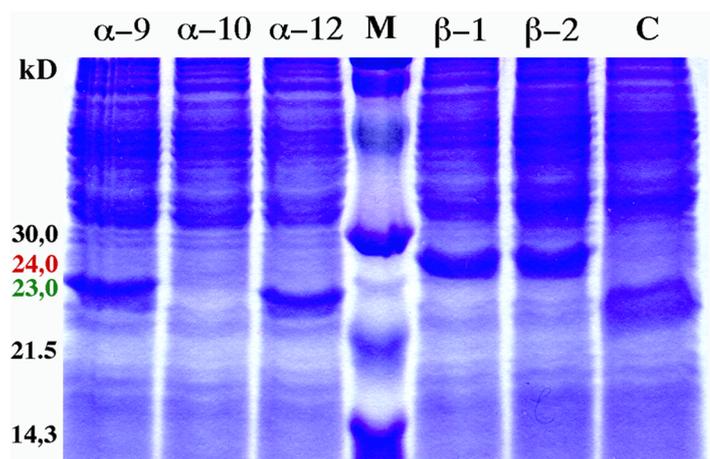


Abb.4.12.: SDS-PAGE (Coomassie) der Bakterienlysate von IFN- α und IFN- β in pBAD gIII. M: Marker; C: Calmodulin-Positivkontrolle; 9, 10, 12: IFN- α ; 1, 2: IFN- β . Die Bandengröße von IFN- α (23,0 kD) setzt sich aus der Größe von IFN- α ohne Signalpeptid (18,5 kD) und der Summe aus Signalpeptid+Myc+His+Tag (4,5 kD) zusammen. Bei IFN- β ergibt sich die Bandengröße (24,0 kD) aus IFN- β ohne Signalpeptid (19,5 kD) und der Summe von Myc+His+Tag (4,5 kD).

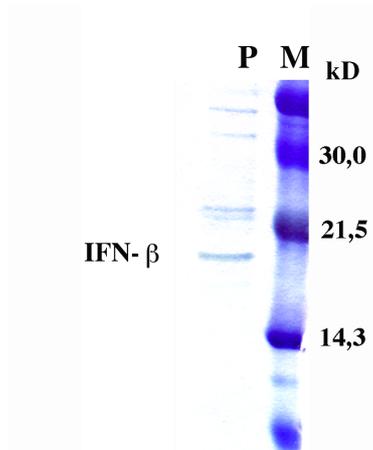


Abb.4.13.: Darstellung von IFN- β in der SDS-PAGE (Coomassie) nach Aufreinigung über eine Nickelsäule (Xpress-System: Invitrogene). P: Probe; M: Marker

Durch Immunisierung von Mäusen (3.22.) mit dem Peptid SB-1 (Sequenz: CNLEEIMEEESSTWGN) gelang es, polyklonale Antikörper gegen IFN- β zu gewinnen. Diese konnten im Westernblot (3.23.) gegen IFN- β nachgewiesen werden (Abb.4.14.).

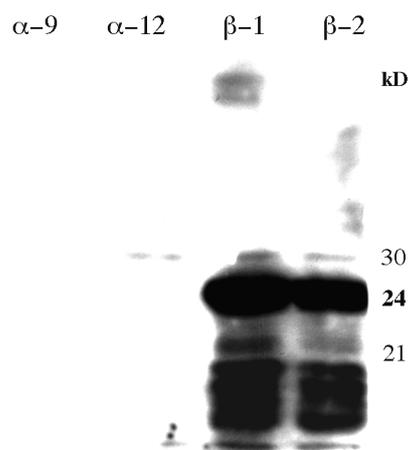


Abb.4.14.: IFN- α und IFN- β im Western-Blot (Chemilumineszenz). Der Marker wurde vor der Filmentwicklung entfernt. Bei IFN- β in pBAD gIII (-1, -2) sind im Bereich von 24 kD deutliche Banden zu erkennen, während bei IFN- α (-9, -12) keine Reaktion erfolgte.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten bereits sequenzierte cDNAs von equinen Interferonen in pro- und eukaryotische Expressionssysteme verbracht werden, um diese zu exprimieren.

Nachfolgendes Schema gibt einen groben Überblick über den Arbeitsablauf. Die gestrichelten Pfeile verdeutlichen dabei noch ausstehende Versuche, um die Nutzung der rekombinanten Interferone in den verschiedenen Bereichen möglich zu machen.

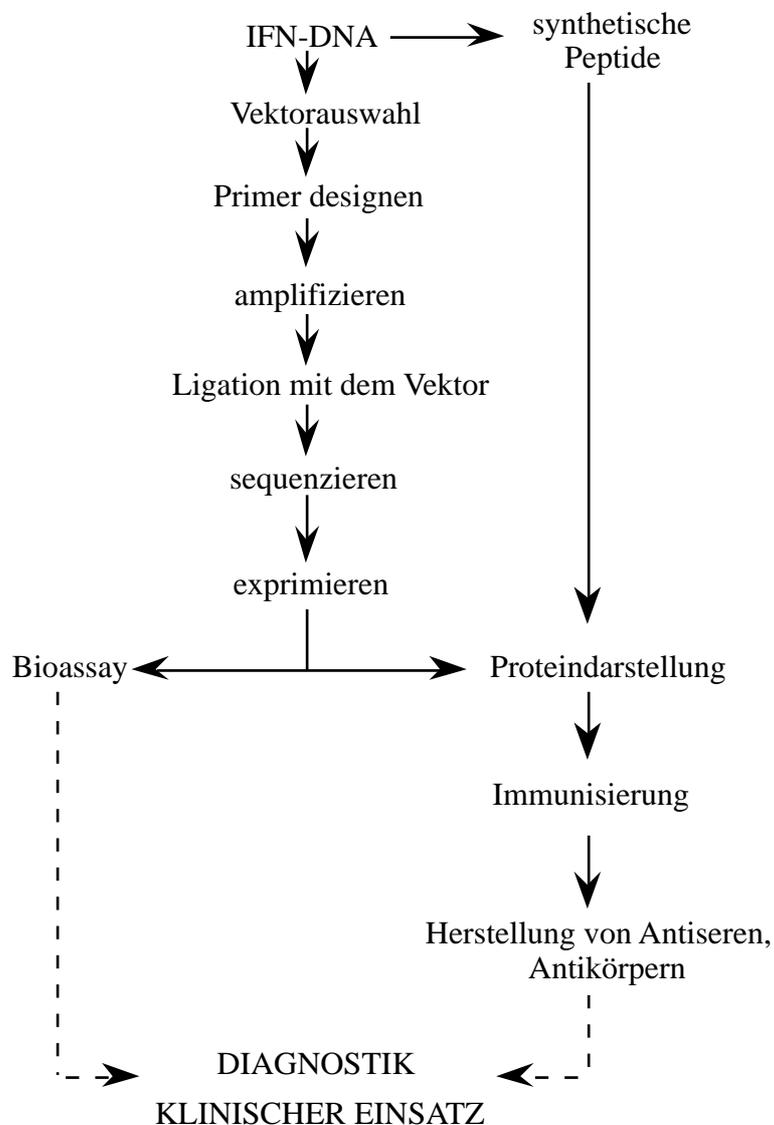


Abb. 5.1.: Arbeitsablauf der Promotionsarbeit

5.1. Biologische Aktivität und Proteinnachweis im eukaryotischen System

Bei den ersten Neutralisationsversuchen im eukaryotischen System stellte sich heraus, daß nicht alle von mir eingesetzten eukaryotischen Zell-Linien für eine IFN-Produktion geeignet waren. So konnte mit den Zellkulturüberständen der PO-Zell-Linie keine Virushemmung gemessen werden, was auf eine fehlende Transfektion oder auf Unfähigkeit der Zell-Linie zur Interferonexpression schließen ließ. Bei den anderen Zell-Linien (44-1, 44-4, bat) konnten zwar Virushemmungen gezeigt werden, jedoch waren diese sehr gering. Wahrscheinlich ist auch hier eine nur unzureichende bzw. transiente Transfektion erfolgt. Ebenso ergaben sich bei der Darstellung der IFN-Proteine Schwierigkeiten. Zwar konnten in der SDS-PAGE Banden im Bereich von ca. 20 kD nachgewiesen werden, es fehlte aber ein entsprechender Nachweis der IFN-Aktivität im Bioassay. Auch die vorherige Aufreinigung der Zellkulturüberstände über die Blue-Sepharose-Säule zur Erhöhung der IFN-Konzentration bei Typ-I-IFN brachte keine positiven Ergebnisse. Das ist möglicherweise mit der nicht ausreichenden Homologie zwischen humanen und equinen Interferonen zu erklären (IFN- 77%, IFN- 57%). Da die Reinigungssäule für humane Interferone entwickelt wurde (Knight und Fahey, 1981), fehlte eventuell die entsprechende Sensitivität für equine Interferone. Weil die Aufreinigung bei Raumtemperatur durchgeführt wurde und sich diese Prozedur über mehrere Stunden hinzog, ist ein Aktivitätsverlust des Interferons durch die einwirkende Temperatur nicht auszuschließen.

Da das Arbeiten mit dem eukaryotischen System sehr aufwendig war und keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden alle weiteren Versuche im prokaryotischen System durchgeführt.

5.2. Untersuchungen verschiedener Vektorsysteme im prokaryotischen System

Folgende Probleme können bei der Expression in E.coli auftreten:

- fehlende Glykosylierung
- E.coli kann die Nukleotidsequenz des Fremdgens nicht optimal für die Expression nutzen

- E.coli verarbeitet das Protein nicht richtig, d.h. das erzeugte Protein wird nicht richtig gefaltet, damit unlöslich und bildet im Bakterium Einschlußkörper
- Sequenzen des Fremdgens können bei E.coli als Terminationssignale wirken, was zum vorzeitigen Kettenabbruch führt
- exprimiertes Fremdgen ist toxisch für E.coli

Das zuletzt aufgeführte Problem zeigte sich beim Vektor pMAL c2. Dieser Vektor arbeitet mit dem starken tac-Promotor und enthält ein Gen, welches das Maltose-Binding-Protein (MBP) kodiert und woraus die Expression eines MBP-Fusions-Proteins folgt. Dieses besitzt eine Affinität zu Maltose und kann in einem einzigen Reinigungsschritt gewonnen werden. Der Vektor wurde in E.coli transformiert. Nach Induktion der Expression wurde durch das Bakterium eine Zerstörung des Vektors vorgenommen, was in der SDS-PAGE in Form unterschiedlich großer Proteinbanden resultierte (Zimmermann, persönliche Mitteilung) (Abb.:4.10.). Vermutlich erwies sich die Expression des IFN-Proteins als wachstumshemmend für die Bakterien.

Zu Beginn meiner Arbeit mit der Interferonexpression im prokaryotischen System wurden die cDNAs aller drei Interferone mit dem Vektor pBK CMV ligiert und in E.coli transformiert. Es konnten im Neutralisationstest bei allen Interferonen Aktivitäten nachgewiesen werden. Jedoch nur die Werte von IFN- α erwiesen sich als signifikant. Deshalb wurde zunächst in allen weiteren Versuchen mit diesem Vektor IFN- α (Klon-40) eingesetzt und verschiedene Versuche zur Verbesserung der Expression von Interferon durchgeführt.

Wie in der Literaturzusammenstellung erwähnt, ist der Promotor ein wichtiger Teil des Expressionsvektors. Bei dem Vektor pBK CMV handelt es sich im prokaryotischen System um den lac-Promotor, der durch IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid) induziert werden kann. Es handelt sich hierbei um eines der klassischen Expressions- und Regulationssysteme von Bakterien (Brown, 1996; Lehninger, 1998). Das Problem bei der IPTG-Regulation ist, daß nur eine sehr grobe Beeinflussung möglich ist. So kann es bei zu starker Induktion des Promotors zu einer Überexpression des Inserts kommen. Vor allem durch Variationen der Menge und der Temperatur (4.2.1.1.) während der Expression gelang es, eine Steigerung der IFN-Aktivität zu erreichen.

Die Arbeiten von Marquardt et al. (1994) zur Wirkung des equinen Interferon- β ergaben, daß es dosisabhängige Wirkungseffekte gibt, die unter anderem die Dauer der Wirkung betreffen. So konnte gezeigt werden, daß der maximale

Schutz gegen die Replikation von Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV) *in vitro* und *in vivo* nach 6 Stunden erreicht wird. In Bezug auf IFN- konnte ich diese Ergebnisse *in vitro* bestätigen. Der maximale Schutz durch IFN trat nach 6 h ein, fiel in den folgenden 18 h wieder ab und nach ca. 24 h konnte keine Virusinhibition mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.5.). Eine weitere Möglichkeit, die IFN-Wirkung im Neutralisationstest durch wiederholtes Auftragen zu steigern, wurde von mir untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine wiederholte IFN-Gabe keine verstärkte Hemmung des Virus hervorrief. Über analoge Ergebnisse berichten Marquardt et al. (1994) bei rec.eqIFN- .

Wie erwähnt, waren die Gene der equinen Interferone bereits früher charakterisiert worden (Himmler et al., 1986; Grünig et al., 1994). Dabei erfolgten zwar erste Versuche zur Funktion von eqIFN- , doch wurden erfolgversprechendere Ergebnisse bei eqIFN- erzielt und demzufolge weiterverfolgt. EqIFN- ₁ wurde von Adolf et al. (1990) in hochgereinigter Form (>98%) aus rekombinanten E. coli-Extrakten über HPLC präpariert. Unter *in vitro* Bedingungen reichten auf permanenten Zell-Linien Mengen im Picogramm-Bereich aus, um ein VS-Testvirus vollständig zu inhibieren (Marquardt et al., 1992a, 1992b, 1994). EqIFN- , welches in E. coli synthetisiert wurde, wies eine dreimal höhere antivirale Aktivität auf E.derm-Zellen auf, als eqIFN- unter gleichen Expressions- und Wachstumsbedingungen (Himmler et al., 1986). Die antivirale Aktivität von hoch gereinigtem eqIFN- variierte zwischen 10^8 und 10^9 U/mg (Adolf et al., 1990). In meiner Arbeit konnten diese Ergebnisse nicht nachvollzogen werden. Nur für IFN- konnte ich relevante Ergebnisse erzielen, während bei IFN- entweder keine oder nur sehr geringe Aktivitäten gemessen werden konnten. Die Unterschiede der Interferonaktivitäten zwischen natürlichem und rekombinantem humanen IFN- erklären Adolf et al. (1990) mit der unterschiedlichen Menge an inkorrekten Disulfidbrücken bei E.coli-hergestelltem Interferon. Lokalisation und Anzahl der Disulfidbrücken bei eqIFN sind noch nicht geklärt.

Während ich mit ED-Zellen (ein Subtyp der NBL-6) problemlos arbeiten und für alle Interferone Ergebnisse erzielen konnte (wobei mit IFN- aufgrund zu geringer Aktivitäten zunächst nicht weitergearbeitet wurde), fanden Marquardt et al. (1992a) keine equine Zell-Linie, die gut zu handhaben und sensitiv für rec.eqIFN- war. Die frei erhältliche E.derm (ATCC: NBL-6) erschien ihnen aufgrund ihrer Wachstumsverhältnisse und der schlechten CPE-Ausbildung als ungeeignet. Ebenso konnte Heinz (1992) auf der primären embryonalen equinen Dermis-Zell-Linie (EED) keinen Nachweis für Interferonaktivität erbringen. Dies und die Tatsache, daß IFN- in meinen Experimenten wesentlich weniger

Zellen mit der höchsten IFN-Sensitivität (Tab. 4.1.). Doch auch auf den bovinen Zellen (MDBK) konnte ich eine IFN-spezifische Aktivität nachweisen. Interferon gilt als speziesspezifisch; so kann man bei diesen Ergebnissen davon ausgehen, daß die MDBK-Zellrezeptoren so weit modifiziert sind, daß eine Sensitivität für eqIFN vorhanden ist. Außerdem ist zu bedenken, daß der Typ-I-Rezeptor speziessübergreifend auch bei anderen Zellen eine ausreichende Affinität zu IFN- α hat. So zeigt rec.eqIFN- α auch auf humanen Lungenkarzinomzellen (A 549) infiziert mit Enzephalomyelitisvirus (EMCV) antivirale Aktivität, jedoch in wesentlich geringerem Maße als auf homologen Systemen (Himmler und Grünig, 1997).

Die Arbeitsgruppen um Adolf und um Marquardt (1990, 1992b) halten MDBK für unempfindlich für eqIFN- α , andere Autoren (Ley et al., 1970; Yilma et al., 1982; Yilma, 1983) teilten diese Meinung nicht. Bei ihren Untersuchungen wurde eqIFN- α durch das Nukleinsäureanalogon poly[I:C] in equinen Fibroblasten induziert und zeigte vergleichbare Aktivitäten auf Zellen anderer Spezies. Es ist wahrscheinlich, daß superinduzierte equine Fibroblasten nicht nur IFN- α sondern auch IFN- β produzieren. Natürliche eqIFN- α Präparationen, die durch Induktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Newcastle Disease Virus gewonnen wurden, besaßen höhere Aktivität auf bovinen und ovinen Zellen, als auf equinen (Yilma et al., 1982). Dies kann mit Verunreinigungen (BVDV: Bovines Virus Diarrhoe Virus) im Serum und damit einer zusätzlichen IFN-Induktion zusammenhängen. Diese häufig widersprüchlichen Untersuchungen, durchgeführt mit rohen Präparationen nicht aufgereinigter Proteine, belegen die Notwendigkeit eingehender Untersuchungen der biologischen Aktivität mit hochreinem rec.eqIFN.

Da bisher noch keine größeren Mengen an rec.eqIFN- α produziert worden sind, existieren keine detaillierten Untersuchungen der biologischen und biochemischen Möglichkeiten des IFN- α . Himmler et al. (1986) wiesen für equines IFN- α eine antivirale Aktivität nach, die sich in analog niedrigen Bereichen meiner ersten Aktivitätsbestimmungen befanden.

Bisher wurde rec.eqIFN fast ausschließlich auf seine inhibitorische Aktivität gegenüber VSV untersucht (Himmler und Grünig, 1997). Auch bei meinen Versuchen ist deshalb VSV als Testvirus eingesetzt worden. VSV besitzt in Europa zwar klinisch keine Bedeutung bei Pferden, wird aber in der wissenschaftlichen Arbeit als Standardvirus verwendet und dementsprechend liegen ausreichende Referenzwerte vor (Lewis, 1987). Ein weiterer Grund zur Auswahl dieses Virus war für mich, daß VSV alle von mir untersuchten Zellen

infizierte. Pica et al. (1996) zeigten die Unterdrückung der VSV-Replikation in Abhängigkeit von der IFN- Dosis, sogar wenn es erst nach der Virusinfektion dazugegeben wurde. Maheshwari et al. (1979, 1980a, 1980b) berichteten in verschiedenen Veröffentlichungen, daß IFN-behandelte Zellen infektiöse VSV-Partikel mit niedriger Infektiosität produzieren. Dieser Zustand wird durch eine signifikante Reduktion der Glykoproteine und Membranproteine der infektiösen VSV-Partikel durch die IFN-behandelten Zellen hervorgerufen. Ito und Montagnier (1977) zeigten die Abhängigkeit der Sensitivität eines Virus zu Interferon von den Zellen (und nicht von der Methode), in denen ein Test durchgeführt wird.

Weiterhin wollte ich klären, wie sich IFN in Bezug auf andere equine Viren verhält. Hierfür sind neben VSV, EHV-1, EHV-4, Rhino- und Bornaviren getestet worden. Bornaviren wurden auf EEL-Zellen getestet, da bei ED-Zellen nur eine Infektionsrate von 1-10 % zu erreichen war. Bedenkt man die niedrige Sensitivität der EEL-Zellen, kann man feststellen, daß Bornaviren stark inhibiert werden, also sehr sensitiv für Interferon sind. Allerdings müßte in weiterführenden Untersuchungen mittels ELISA und PCR geklärt werden, ob eventuell auch persistente bzw. latente Infektionen vorliegen. Von Rheinbaben et al. (1985) wiesen nach, daß exogenes homologes IFN die Expression von BDV-Antigen in infizierten Kaninchengehirn-Zellen vollständig inhibiert, wenn es 24 h *post infectionem* dazugegeben wurde. Dagegen trafen Hallensleben und Staeheli (1999) die Aussage, daß in persistent infizierten Zellen keine virale Inhibition durch Interferon festzustellen ist, wobei zu beachten ist, daß sie mit anderen Zellsystemen (Rattenlungenzellen) und anderem Viren arbeiteten.

Rhinovirusinfektionen spielen in der Pferdemedizin klinisch eine eher ungeklärte Rolle, sind jedoch weit verbreitet. Aus den Ergebnissen geht eine relativ hohe antivirale Aktivität von eqIFN- gegenüber Rhinoviren hervor. Bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Phillpotts et al., 1984) zeigte sich IFN- -Prophylaxe effektiv gegen Rhinoviren (und gegen Influenzaviren). Ebenso beschrieben Finter et al. (1991) eine Rhinovirushemmung nach intranasaler Anwendung von IFN- . Hierbei wurde Interferon als intranasales Spray eingesetzt. Billiau (1984) war nach eingehender Untersuchung zur topischen Anwendung von Interferon der Meinung, daß IFN- nicht für den klinischen Einsatz gegen Rhinovirusinfektionen geeignet ist. Zu analogen Ergebnissen bezüglich der topischen Anwendung von IFN- kamen sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin weitere Arbeitsgruppen (Sperber et al., 1989; Rosenquist und Allen, 1990).

Besonders equine Herpesviren besitzen eine klinische Bedeutung. Hierbei sind EHV-1 und EHV-4 hervorzuheben. In meinen Untersuchungen zeigte rec.eqIFN- zu EHV nur etwas geringere antivirale Aktivitäten als zu den untersuchten RNA-Viren. Das deckte sich mit Untersuchungen zu HSV-1 und HSV-2, die gegen alle 3 Interferone (, ,) sensitiv sind (Overall et al., 1980). Bei klinischen Untersuchungen zur oralen Applikation von huIFN- bei Pferden, die anschließend mit EHV-1 infiziert wurden, konnten Seahorn et al. (1990) keine Unterschiede zu placebobehandelten Tieren feststellen. Allerdings wiesen Edington et al. (1989a, 1989b) nach, daß alle equinen Interferone durch Trypsin inaktiviert werden. So kann man bei oraler Verabreichung von Interferon von einer Inaktivierung schon im Magen-Darm-Trakt ausgehen, wodurch entsprechende Studien zur oralen Applikation fragwürdig werden. Edington et al. (1989a, 1989b) konnten für eqIFN- und - aus Zellkulturüberständen keine antivirale Aktivität gegenüber EHV-1 nachweisen. Interessant ist allerdings, daß die IFN-Konzentration im Serum mit erhöhter Infektionsdosis, und damit auch verstärkten klinischen Symptomen, stieg (Seahorn et al., 1990). Letchworth und Carmichael (1983, 1984) führten Untersuchungen mit BHV-2 und bovinen Interferonen durch. Zum einen zeigten sie, daß Interferon durch BHV induziert wird und zum anderen bewirkte das induzierte Interferon eine Suppression der bovinen Herpesviren. Sie konnten auch einen Einfluß der Temperatur auf bovine Interferone nachweisen. So zeigte sich bei 40°C (gegenüber Untersuchungen bei 30°C) eine starke Unterdrückung der BHV-2-Replikation und eine hohe Interferoninduktion. Weiterhin wurden Untersuchungen mit dem Pseudorabiesvirus durchgeführt. Schijns et al. (1991) fanden dabei heraus, daß IFN- und IFN- einen antiviralen Zustand in nervalen Zellen induzieren können. Chen et al. (1988) konnten eine erhöhte Resistenz bei IFN- -transgenen Mäuse zeigen. Die Höhe der Resistenz korrelierte mit der Konzentration an IFN- im Serum.

Um eine effizientere Expression zu erreichen, wurde ein weiteres Expressions- und Reinigungssystem, das StrepTag-System eingesetzt. Der Vektor pASK IBA2 enthält einen starken Tetracyclinpromotor. Der tetA-Promotor wird durch Zugabe von sehr geringen, nicht antibiotisch wirkenden Konzentrationen an Anhydrotetracyclin (AHT) induziert (Skerra, 1994). Der tetA-Promotor/Operator unterliegt keinen weiteren zellulären Regulationsmechanismen, während der lac-Promotor zum einen von der Katabolitrepression und zum anderen durch chromosomal kodierte Repressormoleküle beeinflusst wird. Daher besteht bei der Verwendung des tet-Systems, zusätzlich zur verbesserten Regulation, keine

Einschränkung in der Wahl des Kulturmediums oder des E.coli Expressionsstammes. Auch in diesem Vektorsystem konnte eine Expression von IFN- erreicht werden.

Die OmpA-Signalsequenz soll die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma von E.coli vermitteln. Durch Lösen des Bakterienlysates in PBS und anschließendem Frieren/Tauen gelang es, eine geringe biologische Aktivität nachzuweisen. Erst nach Aufarbeitung der Einschlußkörper (siehe 3.16.) konnte der Hauptanteil des IFN-Proteins gewonnen werden. Dies bedeutet aber, daß es größtenteils in biologisch inaktiver Form vorlag, und damit nicht nutzbar war. Die Reinigung des Proteins in diesem System erfolgte durch die selektive Bindung zwischen dem Strep-tag II-Peptid und StrepTactin, so daß das Protein gezeigt werden konnte.

Der pBAD gIII-Vektor wurde für die regulierte Expression sezernierter rekombinanter Proteine und ihre Aufreinigung in E.coli gewählt. Mit diesem Vektor gelang es, für eqIFN- eine mehrfach höhere biologische Aktivität ($3,3 \times 10^5$ U/ml) nachzuweisen und das Protein in der SDS-PAGE darzustellen. Auch für eqIFN- gelang die Expression. Es wurde aber keine biologische Aktivität im Neutralisationstest gemessen. Auch ein Einsatz verschiedener Zell-Linien brachte keine positiven Ergebnisse für IFN- .

Da eine Sequenzierung der IFN- -cDNA und der benachbarten Vektorregionen vorgenommen wurde (Daten nicht gezeigt), konnte eine fehlerhafte Sequenz für die IFN- -cDNA und eine falsche Position im Vektor ausgeschlossen werden. Eine unvollständige bzw. fehlende Faltung bei rekombinanten Interferonen erklärt möglicherweise den Umstand, daß in meinen Experimenten für IFN- keine antivirale Aktivität nachgewiesen werden konnte. Weiterhin könnten die Modifizierungen an den N- und C-Termini die Konfiguration beeinflussen und damit die Rezeptorbindung verhindern. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die fehlende Glykosylierung einen Einfluß auf die Faltung hat und für die biologische Aktivität von IFN- benötigt wird.

Das "GenIII"-Protein sollte die Sekretion des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen Raum vermitteln. In der Tat konnte das Protein in entsprechenden Präparationen oder Gesamtlysaten nachgewiesen werden. Dabei erfolgte eine Reinigung über Interaktion zwischen der His-Modifikation am N-terminalen Ende des Interferonproteins und der Nickelsäule. Die Auftrennung des aufgereinigten Proteins erfolgte über die SDS-PAGE. Durch Einsatz von IFN- -Antikörpern, die durch Immunisierung von Mäusen gewonnen wurden, konnte dieses im Western-Blot dargestellt werden. Ohne Signalpeptid beträgt

das berechnete theoretische Molekulargewicht von rec.eqIFN- 18,466 kD und von rec.eqIFN- 19,467 kD. Beim Nachweis der Proteine in der SDS-PAGE ergaben sich bei meinen Untersuchungen für IFN- eine Bande von ca. 23 kD und für IFN- eine Bande von ca. 24 kD im Vektor pBAD gIII als Summe des IFN-Proteins und der modifizierten Anhänge.

Es konnte die Expression von rec.eqIFN-Typ-I im prokaryotischen System initiiert und etabliert werden. Dabei waren verschiedene Schwierigkeiten zu überwinden, die nicht zuletzt durch den Anteil hydrophober Aminosäuren bedingt waren. Für weitere Versuche sollte an die Erfahrungen mit dem Vektor pBAD gIII angeknüpft werden. Durch Abspaltung kann die Modifizierung am N-Terminus entfernt und dadurch eventuell eine stärkere Rezeptorbindung bewirkt werden. Alternativ sollten auch andere Expressionssysteme (Eukaryoten, Hefen) eingesetzt werden.

Wenn die Expression auf die Herstellung von rec.eqIFN- ausgedehnt werden soll, muß eine weitere Schwierigkeit überwunden werden: Das Expressionssystem muß geeignet sein, Monomere zu erzeugen, die zu dem gewünschten Homodimer zusammengefügt werden. Wie einleitend erwähnt, besitzen Typ-I-Interferone auch immunregulatorische Funktionen (Parronchi et al., 1992; Wenner et al., 1996; Luft et al., 1998; McRae et al., 1998; Milone und Bocarsly, 1998). Dabei fehlen Untersuchungen in der Veterinärmedizin, insbesondere bei Pferden. Hier können in der Zukunft weitergehende Forschungen durchgeführt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante equine Interferone (rec.eqIFN) in verschiedenen Vektorsystemen exprimiert, ihre antivirale Aktivität bestimmt und ihre Proteine dargestellt.

Aus bekannten Sequenzen (Plasmiden), wurde der kodierende Bereich der DNA zunächst in einen pro- und eukaryotischen Expressionsvektor (pBK CMV) verbracht. Im eukaryotischen System konnte biologische Aktivität nachgewiesen werden, jedoch war diese sehr gering. Im prokaryotischen System gelang für rec.eqIFN- und für rec.eqIFN- sowohl auf Proteinbasis als auch in bioaktiver Form ein Nachweis. IFN- wurde in verschiedenen Bioassays zur Bestimmung der antiviralen Aktivität und der Sensivität verschiedener Zellen (ED, EEL, MDBK) und verschiedener equiner Viren (EHV, VSV, Rhino, Borna) eingesetzt.

Von weiteren Vektoren, die zum Einsatz kamen, erwies sich einer (pMAL c2) als ungeeignet. Weiterhin erfolgte die Klonierung von IFN- in den prokaryotischen Vektor pASK IBA2, der mit dem Strep-tag-System arbeitet. Hauptsächlich konnte nur unlösliches Protein gewonnen werden. Nach Aufspaltung von Einschlußkörperchen und Aufreinigung des IFN-Proteins mit der Strep-tag-Säule gelang eine Darstellung des Proteins mittels SDS-PAGE.

Mit einem dritten Vektor (pBAD gIII) gelang eine wesentliche Steigerung der Expression von IFN- um mehrere Potenzen und die Darstellung der IFN- - und IFN- -Proteine mittels SDS-PAGE. Durch Immunisierung von Mäusen konnten Antikörper gegen IFN- hergestellt und Proteine im Westernblot nachgewiesen werden.

Nachdem die Expression von rekombinanten Typ-I-Interferonen optimiert wurde, ist ein späterer klinischer bzw. diagnostischer Einsatz möglich.

7. SUMMARY

“Production and characterization of recombinant equine interferons (rec.eqIFN): expression cloning, demonstration of the proteins and the biological activity.”

In this thesis rec.eqIFN were expressed in several vector systems. The antiviral activity was determined and the proteins displayed.

The coding part of the IFN-DNA was cloned in a pro- and eucaryotic vector system (pBK CMV). In the eucaryotic system, biological activity was shown only to a very low extend. In the procaryotic system rec.eqIFN- and rec.eqIFN- were detected on protein basis and in the bioactive form. In different bioassays with rec.eqIFN- the antiviral activity and sensitivity of different cells (ED, EEL, MDBK) and different equine viruses (EHV, VSV, RHINO, BDV) were determined.

One of the next vectors (pMal c2) was not suitable for IFN-expression. Furthermore rec.eqIFN- was cloned in the procaryotic vector pASK IBA2, that uses the Strep-tag-system. Principally it was only possible to get insoluble protein. After splitting the inclusion bodies and purification of the IFN-protein with the Strep-tag-column the protein could be demonstrated by means of SDS-PAGE.

With the third vector (pBAD gIII) an essential enhancement of the antiviral activity of rec.eqIFN- and - -proteins by several fold was achieved. After immunization of mice it was possible to produce antibodies against rec.eqIFN- and to show the proteins in western-blot.

After optimizing the expression, interferons can be used for clinical therapy or for diagnostic use.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adler, B., H. Adler, T. W. Jungi & E. Peterhans (1995):
Interferon-alpha primes macrophages for lipopolysaccharide-induced apoptosis.
Biochem Biophys Res Commun, **215**, 921-927.
- Adolf, G. R. (1987):
Antigenic structure of human interferon omega 1 (interferon alpha II1): comparison with other human interferons.
J Gen Virol, **68**, 1669-1676.
- Adolf, G. R., E. Traxler & I. Maurer-Fogy (1990):
Recombinant equine interferon-b1: Purification and preliminary characterization.
J Gen Virol Res, **10**, 255-267
- Agius, C. T., H. S. Nagesha & M. J. Studdert (1992):
Equine herpesvirus 5: comparisons with EHV2 (equine cytomegalovirus), cloning, and mapping of a new equine herpesvirus with a novel genome structure.
Virology, **191**, 176-86.
- Allen, G. & M. O. Diaz (1996):
Nomenclature of the Human Interferon Proteins
J Interf and Cytok Res, **16**, 181-184
- Allen, G. P. & L. W. Turtinen (1982):
Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1.
J Virol, **44**, 249-55.
- Arnheiter, H. & E. Meier (1990):
Mx Proteins: antiviral proteins by chance or by necessity?
New Biolog, **2(10)**, 851-857
- Artursson, K. (1993):
Studies on the IFN- / system of pigs
Vet Med Diss., Uppsala
- Awan, A. R., Y. C. Chong & H. J. Field (1990):
Transcript analysis of the equine herpesvirus 1 glycoprotein B gene homologue and its expression by a recombinant vaccinia virus.
J Gen Virol, **71**, 1131-1140
- Azmi, M. & H. J. Field (1993):
Interactions between equine herpesvirus type 1 and equine herpesvirus type 4: T cell responses in a murine infection model.
J Gen Virol, **74**, 2339-2345
- Baglioni, C. & T. W. Nilsen (1983):
Mechanisms of antiviral action of interferon.
Interferon, **5**, 23-42
- Ball, E. D., P. M. Guyre, L. Shen, J. M. Glynn, C. R. Maliszewski, P. E. Baker & M. W. Fanger (1984):
Gamma interferon induces monocytoid differentiation in the HL-60 cell line.
J Clin Invest, **73**, 1072-1077

- Billiau, A. (1984):
The clinical application of fibroblast interferon-an overview
Med Oncol Tumor Pharmacother, **1(2)**, 87-96
- Bode, L., F. Steinbach & H. Ludwig (1994a):
A novel marker for Borna disease virus infection [letter].
Lancet, **343**, 297-8
- Bode, L., R. Dürrwald & H. Ludwig (1994b):
Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease.
Vet Rec, **135**, 283-4
- Bode, L., R. Dürrwald, P. Köppel & H. Ludwig (1994c):
Neue Aspekte der equinen Borna.Virus-Infektion mit und ohne
Krankheit.
Prakt. Tierarzt, **12**, Sonderdruck
- Bode, L., R. Ferszt & G. Czech (1993):
Borna disease virus infection and affective disorders in man.
Arch Virol Suppl, **7**, 159-67
- Bode, L., Riegel, S., Lange, W. & H. Ludwig (1992)
Human infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients
with chronic disease and healthy individuals
J med Virol, **36**, 309-315
- Bode, L., S. Riegel, H. Ludwig, J. D. Amsterdam,
W. Lange & H. Koprowski (1988):
Borna disease virus-specific antibodies in patients with HIV infection and
with mental disorders.
Lancet, **II**, 297-298
- Bode, L., W. Zimmermann, R. Ferszt, F. Steinbach & H. Ludwig (1995):
Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric
patients.
Nat Med, **1**, 232-236
- Branca, A. A. & C. Baglioni (1981):
Evidence that types I and II interferons have different receptors.
Nature, **294**, 768-770
- Brown, T.A.(1996):
Gentechnologie für Einsteiger
Spektrum, 2.Auflage, 1996
- Browning, G. F. & M. J. Studdert (1987a):
Epidemiology of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus).
J Clin Microbiol, **25**, 13-6
- Browning, G. F. & M. J. Studdert (1987b):
Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses.
J Gen Virol, **68**, 1441-1447
- Bryans, J.T. (1969):
On immunity to disease caused by equine herpesvirus-1
J Am Vet Med Assoc, **155**, 294-300
- Burke, D. C. (1977):
The status of interferon.
Sci Am, **236**, 42-50

-
- Bürki, F., C. Pallan & N. Nowotny (1989):
Training the immune system of foals against equine rhinopneumonitis infection by frequent inoculation of commercially available vaccines.
Wiener Tierärztliche Monatsschrift, **76**, 137-142
- Capon, D. J., H. M. Shepard & D. V. Goeddel (1985):
Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides.
Mol Cell Biol, **5**, 768-779
- Chen, B. D. & F. Najor (1987):
Macrophage activation by interferon alpha + beta is associated with a loss of proliferative capacity: role of interferon alpha + beta in the regulation of macrophage proliferation and function.
Cell Immunol, **106**, 343-354
- Chen, L., Y. Suzuki & E. F. Wheelock (1987):
Interferon-gamma synergizes with tumor necrosis factor and with interleukin 1 and requires the presence of both monokines to induce antitumor cytotoxic activity in macrophages.
J Immunol, **139**, 4096-4101
- Chen, X. Z., J. S. Yun & T. E. Wagner (1988):
Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human beta 1 interferon.
J Virol, **62**, 3883-3887
- Chong, Y. C. & W. P. Duffus (1992):
Immune responses of specific pathogen free foals to EHV-1 infection.
Vet Microbiol, **32**, 215-28
- Chong, Y. C., W. P. Duffus & D. Hannant (1992):
Natural killer cells in normal horses and specific-pathogen-free foals infected with equine herpesvirus.
Vet Immunol Immunopathol, **33**, 103-13
- Chong, Y. C., W. P. Duffus, H. J. Field, D. A. Gray, A. R. Awan, M. A. O'Brien & D. P. Lunn (1991):
The raising of equine colostrum-deprived foals; maintenance and assessment of specific pathogen (EHV-1/4) free status [see comments].
Equine Vet J, **23**, 111-5
- Chowdhury, S. I., W. Hammerschmidt, H. Ludwig, P. Thein & H. J. Buhk (1986):
Rapid method for the identification and screening of herpesviruses by DNA fingerprinting combined with blot hybridization
J Virol Methods, **14**, 285-291
- Chowdhury, S.I. (1987):
The equine herpesviruses: a contribution to the classification and molecular biology, their genome relationship to other herpesviruses and the genomic termini of equine herpesvirus typ I (EHV-I) with special emphasis on their role in variability and replication.
Vet Med Diss., FU Berlin
- Coulombel, C., G. Vodjdani & J. Doly (1991):
Isolation and characterization of a novel interferon-alpha-encoding gene, IFN-alpha 11, within a murine IFN cluster.
Gene, **104**, 187-195

- Crabb, B. S. & M. J. Studdert (1995a):
Equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus).
Adv Vir Res, **45**, 153-190
- Crabb, B. S. & M. J. Studdert (1995b):
Expression of small regions of equine herpesvirus 1 glycoprotein C in Escherichia coli.
Vet Microbiol, **46**, 181-191
- Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia (1998):
Version 3.0
www.copewithcytokines.de
- Czech, G. (1993):
Borna-Virus Infektionen im Tiermodell: Serologische, virologische und molekularbiologische Untersuchungen.
Biolog. Diss., FU Berlin
- Danner, K. & A. Mayr (1979):
In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus.
Arch Virol, **61**, 261-71
- DeGrado, W. F., Z. R. Wasserman & V. Chowdury (1982):
Sequence and structural homologies among type I and type II interferons.
Nature, **300**, 379-381
- Diaz, M. O., S. Bohlander & G. Allen (1994):
Nomenclature of the human interferon genes.
J Interferon Res, **14**, 221-222
- Dimock, W.W. & P.R. Edwards (1932):
Infections of fetuses and foals.
Kentucky. Agric. Expt. Stud. Suppl. Res. Bull. **333**
- Döcke, W. D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H. D. Volk & W. Kox (1997):
Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment.
Nat Med, **3**, 678-681
- Dürwald, R. & H. Ludwig (1997):
Borna Disease Virus (BDV), a (Zoonotic ?) Worldwide Pathogen. A Review of the Historie of the Disease and the Virus infection with Comprehensive Bibliography
J Vet Med B, **44**, 1-38
- Dürwald, R. (1993):
Die natürliche Borna-Virus-Infektion der Einhufer und Schafe: Untersuchungen zur Epidemiologie, zu neueren diagnostischen Methoden (ELISA, PCR) und zur Antikörperkinetik bei Pferden nach Vakzination mit Lebendimpfstoff.
Vet Med Diss., FU Berlin
- Edington, N., Bridges, C. G. & L. Griffith (1989a):
Further Investigations of Equine Interferons *In Vitro*.
J Interferon Res, **9**, 385-387

-
- Edington, N., Bridges, C. G. & L. Griffith (1989b):
Equine Interferons Following Exposure to Equid Herpesvirus-1 or-4.
J Interferon Res, **9**, 389-392
- Finter, N. B., S. Chapman, P. Dowd, J. M. Johnston, V. Manna, N. Sarantis, N. Sheron, G. Scott, S. Phua & P. B. Tatum (1991):
The use of interferon-alpha in virus infections.
Drugs, **42**, 749-765
- Flores, I., T. M. Mariano & S. Pestka (1991):
Human interferon omega (omega) binds to the alpha/beta receptor.
J Biol Chem, **266**, 1875-1877
- Foulis, A. K., M. A. Farquharson & A. Meager (1987):
Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus.
Lancet, **II**, 1423-7142
- Foulis, A. K., M. McGill & M. A. Farquharson (1991):
Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells.
J Pathol, **165**, 97-103
- Friedman, R. M. (1977):
Antiviral activity of interferons.
Bacteriol Rev. **41**, 543-567
- Gaffney, E. V., S. E. Lingenfelter, G. A. Koch, P. J. Lisi, C. W. Chu & S. C. Tsai (1988):
Regulation by interferon gamma of function in the acute monocytic leukemia cell line, THP-1.
J Leukoc Biol, **43**, 248-255
- Gerber, H. (1994):
Pferdekrankheiten, Band 1: Innere Medizin einschließlich Dermatologie
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Gibson, J. S., J. D. Slater, A. R. Awan & H. J. Field (1992a):
Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation.
Arch Virol, **123**, 351-66
- Gibson, J. S., T. O'Neill, A. Thackray, D. Hannant & H. J. Field (1992b):
Serological responses of specific pathogen-free foals to equine herpesvirus-1: primary and secondary infection, and reactivation.
Vet Microbiol, **32**, 199-214
- Gordon, M. Y., S. B. Marley, J. L. Lewis, R. J. Davidson, D. X. Nguyen, F. H. Grand, T. A. Amos & J. M. Goldman (1998):
Treatment with interferon-alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with chronic myeloid leukemia but spares normal CFU-GM.
J Clin Invest, **102**, 710-5
- Gosztonyi, G. & H. Ludwig (1995):
Borna disease-neuropathology and pathogenesis.
In: Koprowski, H. & W. I. Lipkin (eds), Borna disease. *Curr Top Microbiol*, **190**, Springer Berlin, 39-73

- Grander, D., O. Sangfelt & S. Erickson (1997):
How does interferon exert its cell growth inhibitory effect?
Eur J Haematol, **59**, 129-35
- Gresser, I. (1997):
Wherefore interferon?
J Leukoc Biol, **61**, 567-74
- Grünig, G., A. Himmler & D. F. Antczak (1994):
Cloning and sequencing of equine interferon- cDNA.
Immunogenetics, **39**, 448-449
- Hallensleben, W. & P. Staeheli (1999):
Inhibition of Borna disease virus multiplication by interferon: cell line differences in susceptibility.
Poster, Jahrestagung Gesellschaft für Virologie
- Hamilton, T. A., S. D. Somers, D. L. Becton, A. Celada, R. D. Schreiber & D. O. Adams (1986):
Analysis of deficiencies in IFN-gamma-mediated priming for tumor cytotoxicity in peritoneal macrophages from A/J mice.
J Immunol, **137**, 3367-3371
- Hattori, T., M. Pack, P. Bougnoux, Z. L. Chang & T. Hoffman (1983):
Interferon-induced differentiation of U937 cells. Comparison with other agents that promote differentiation of human myeloid or monocyte like cell lines.
J Clin Invest, **72**, 237-44
- Hauptmann, R. & P. Swetly (1985):
A novel class of human type I interferons.
Nucleic Acids Res, **13**, 4739-4749
- Heidel, G. (1974):
Interferone, Interferoninduktoren
Monatsh Veterinärmed, **29**, 227-232
- Heinz, H. (1992):
Signalinduktion von rekombinantem equinen Interferon- 1 (rEqIFN-b1) und seine funktionelle Wirkung auf neutrophile Granulozyten (PMN) und mononukleäre Blutzellen (MNC) des Pferdes.
Vet Med Diss., TiHo Hannover
- Hellmeier, A. (1988):
Doppelblindstudie zur Wirksamkeitsbestimmung eines Interferonpräparates bei der Behandlung durchfallkranker Kälber.
Vet Med Diss., LMU München
- Himmler, A. & G. Grünig (1997):
The Cloning of equine Type I and II Interferons
in: *Cytokines in Veterinary Medicine* (Eds. Schijns, V.E.J.C. & M.C. Horzinek), Cab International, Wallingford, Uk

-
- Himmler, A., R. Hauptmann, G. R. Adolf & P. Swetly (1986):
Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of equine type I
interferons.
DNA, **5**, 345-356
- Hirano, N., M. Kao & H. Ludwig (1983):
Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected
rats.
J Gen Virol, **64**, 1521-1530
- Hritz, H., (1994):
In vitro-Untersuchungen zur Funktion von T-Helferzellen im Verlauf
einer *Theileria annulata* (DSCHUNKOWSKY UND LYHS, 1904)-
Infektion bei Rindern: Entwicklung zytostatischer Aktivität und
Produktion von IL-2 und Gamma-IFN.
Vet Med Diss, FU Berlin
- Hübner, J. (1999):
Die Bornavirusinfektion bei Katzen in Deutschland.
Vet Med Diss., FU Berlin, in Vorbereitung
- Isaacs, A. & J.Lindenmann (1957):
Virus Interference:The Interferon
Proc R Soc Med SerB, **47**, 258-267
- Isaacs, A., J.Lindenmann & R.C.Valentine (1957):
Virus Interference:Some properties of interferon
Proc R Soc Med SerB, **47**, 268-273
- Ito, Y. & L. Montagnier (1977):
Heterogeneity of the sensitivity of vesicular stomatitis virus to interferons.
Infect Immun, **18**, 23-27
- Johannsen, U. & A. Bergmann (1971):
Zum spontanen Auftreten der Bornaschen Krankheit (nichteitrigen
Meningoencephalitis) bei Kaninchen.
Mh Vet Med, **26**, 931-939
- Kao, M., H. Ludwig & G. Gosztonyi (1984):
Adaptation of Borna disease virus to the mouse.
J Gen Virol, **65**, 1845-1849
- Kasahara, T., J. J. Hooks, S. F. Dougherty & J. J. Oppenheim (1983):
Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by
human T cells and T cell subsets.
J Immunol, **130**, 1784-1789
- Khan, N. U., A. Gibson & A. K. Foulis (1990):
The distribution of immunoreactive interferon-alpha in formalin-fixed
paraffin-embedded normal human foetal and infant tissues. *Immunology*,
71, 230-235
- Khan, N. U., K. A. Pulford, M. A. Farquharson, A. Howatson, C. Stewart, R.
Jackson, A. M. McNicol & A. K. Foulis (1989):
The distribution of immunoreactive interferon-alpha in normal human
tissues.
Immunology, **66**, 201-206

- Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P. & L. Rink (1993):
Cytokine und Interferone
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Kleinschmidt, W. J. (1972):
Biochemistry of interferon and its inducers.
Ann Rev Biochem, **41**, 517-542
- Knight Jr., E. & D. Fahey (1981):
Human fibroblast interferon
J Biol Chem, **256**, 3609-3611
- Kohara, M., T. Tanaka, K. K. Tsukiyama, S. Tanaka, M. Mizokami,
J. Y. Lau & N. Hattori (1995):
Hepatitis C virus genotypes 1 and 2 respond to interferon-alpha with
different virologic kinetics.
J Infect Dis, **172**, 934-938
- Kohno, T., T. Goto, T. Takasaki, C. Morita, T. Nakaya, K. Ikuta, I. Kurane,
K. Sano & M. Nakai (1998):
Fine structure and morphogenesis of Borna Disease Virus.
J Virol, **73**, 760-766
- Kokorsch, J. (1997):
Die Borna-Virus-Infektion bei der Katze: Molekularbiologische
Charakterisierung des felinen Borna-Virus.
Vet Med Diss., FU Berlin
- Le, J. & J. Vilcek (1987):
Accessory function of human fibroblasts in mitogen-stimulated
interferon-gamma production by T-lymphocytes.
J Immunol, **139**, 3330-3337
- Lefevre, F., D. Mege, R. L'Haridon, S. Bernard, V. C. De & B. C. La (1990a):
Contribution of molecular biology to the study of the porcine interferon
system.
Vet Microbiol, **23**, 245-257
- Lefevre, F., R. L'Haridon, C. F. Borrás & B. C. La (1990b):
Production, purification and biological properties of an Escherichia coli-
derived recombinant porcine alpha interferon.
J Gen Virol, **71**, 1057-1063
- Lehninger, A. L. (1996):
Biochemie
Verlag Chemie
- Letchworth, G. J. (1998):
Persönliche Mitteilung
- Letchworth, G. J. 3d & L. E. Carmichael (1983):
Production of interferon by bovine peripheral blood monocytes infected
with bovid herpesvirus 2.
Vet Microbiol, **8**, 69-80
- Letchworth, G. J. 3d & L. E. Carmichael (1984):
The effect of temperature on production and function of bovine
interferons.
Arch Virol, **82**, 211-221

-
- Letchworth, G. J., J. C. Barrera, J. R. Fishel & L. Rodriguez (1996):
Vesicular stomatitis New Jersey virus RNA persists in cattle following
convalescence.
Virology, **219**, 480-484
- Lewis, J. A. (1987):
Biological assays for interferons
in: *Lymphokines and interferons, a practical approach*
Ed. by Clemens, Morris and Gearing
IRL Press
- Ley, K. D., D. Burger & J. B. Henson (1970):
Equine interferon: Characterization of a viral inhibitor induced in equine
kidney cell cultures with statolon.
J Infect Dis, **121**, 335-338
- Lockart, R. Z. (1963):
Production of interferon by L-cells infected with Western equine
encephalomyelitis virus.
Biochem Biophys Res Comm, **15**, 513-518
- Ludwig, H. & L. Bode (1997):
The neuropathogenesis of Borna disease virus infections.
Intervirology, **40**, 185-197
- Ludwig, H., K. Furuya, L. Bode, N. Klein, R. Dürrwald & D. S. Lee (1993):
Biology and neurobiology of Borna disease viruses (BDV), defined by
antibodies, neutralizability and their pathogenic potential.
Arch Virol Suppl, **7**, 111-133
- Ludwig, H., L. Bode & G. Gosztonyi (1988):
Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system.
Prog Med Virol, **35**; 107-151
- Ludwig, H., W. Kraft, M. Kao, G. Gosztonyi, E. Dahme & H. Krey (1985):
Borna-Virus-Infektion (Borna Krankheit) bei natürlich und
experimentell infizierten Tieren: ihre Bedeutung für Forschung und
Praxis.
Tierärztl Prax, **13**, 421-53
- Luft, T., K. C. Pang, E. Thomas, P. Hertzog, D. N. Hart,
J. Trapani & J. Cebon (1998):
Type-I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells.
J Immunol, **161**, 1947-1953
- Lundgren, A. L., G. Czech, L. Bode & H. Ludwig (1993):
Natural borna disease in domestic animals others than horses and sheep.
J Vet Med B, **40**, 298-303
- Machold, K. P., K. Neumann & J. S. Smolen (1992):
Recombinant human interferon gamma in the treatment of rheumatoid
arthritis: double blind placebo controlled study.
Ann Rheum Dis, **51**, 1039-1043

- Mahdy, M. S. & M. Ho (1964):
Potentiating effect of fractions of eastern equine encephalomyelitis virus on interferon production.
Proc Soc Exptl Biol Med, **116**, 174-177
- Maheshwari, R. K. & R. M. Friedmann (1979):
Production of vesicular stomatitis virus with low infectivity by interferon-treated cells.
J Gen Virol, **44**, 261-264
- Maheshwari, R. K., D. K. Banerjee, C. J. Waechter, K. Olden & R. M. Friedmann (1980a):
Interferon treatment inhibits glycosylation of a viral protein.
Nature, **287**, 454-456
- Maheshwari, R. K., F. T. Jay & R. M. Freidmann (1980b):
Selective inhibition of glycoprotein and membrane protein of vesicular stomatitis virus from interferon-treated cells.
Science, **207**, 540-541
- Malkinson, M., Y. Weisman, E. Ashash, L. Bode & H. Ludwig (1993):
Borna diseases in ostriches.
Vet Rec, **133**, 304
- Marcucci, F., B. Klein, P. Altevogt, S. Landolfo & H. Kirchner (1984):
Concanavalin A-induced interferon gamma production by murine spleen cells and T cell lines. Lack of correlation with Lyt 1,2 phenotype.
Immunobiology, **166**, 219-227
- Marquardt, J., H. Heinz, J. Heymer, E. Deegen, G. R. Adolf & W. Leibold (1992a):
A method for the assay of "difficult" interferons exemplified with recombinant equine interferon-beta 1.
J Interferon Res, **12**, 83-85
- Marquardt, J., J. Heymer, H. Heinz, E. Deegen, G. R. Adolf & W. Leibold (1992b):
Monitoring of effects induced by recombinant equine interferon-beta1 in whole blood and separated fractions of peripheral blood of horses.
J Vet Med B, **39**, 327-336
- Marquardt, J., J. Heymer, H. Heinz, G. R. Adolf & E. Deegen (1994):
Kinetics of inhibition of replication of vesicular stomatitis virus in blood mononuclear cells of horses after in vitro and in vivo treatment with recombinant equine interferon-beta1.
A Journal Vet Res, **55**, 1093-1100
- Martens, J.G., R.J. Martens, R.A. Crandell, S. McConnell & S. Kit (1989):
Molecular confirmation of an abortigenic strain of equine herpesvirus 1 (subtype 1) in a pregnant mare study.
Cornell Vet, **79**, 363-371
- Mayr, A. (1987):
Respiratorische Infektionskrankheiten bei Pferden.
Tierärztl. Prax. Suppl, **2**, 1-4

-
- Mayr, A., H.O. Böhm, J. Brill & S. Woyciechowska (1965):
Charakterisierung eines Stutenaborts aus Polen und Vergleich mit
bekannten Rhinopneumonitis-Stämmen des Pferdes.
Arch Virusforsch, **17**, 217-230
- McRae, B. L., R. T. Semnani, M. P. Hayes & G. A. van Seventer (1998):
Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th 1 cell
development.
J Immunol, **160**, 4298-4304
- Meyer, H., P. Thein & P. Hubert (1987):
Characterization of two equine herpesvirus (EHV) isolates associated
with neurological disorders in horses.
Zbl Vet Med B, **34**, 545-548
- Milone, M. C. & P. F. Bocarsly (1998):
Themannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood
dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses.
J Immunol, **161**, 2391-2399
- Nagata, K., N. Kikuchi, O. Ohara, H. Teraoka, N. Yoshida & Y. Kawade (1986):
Purification and characterization of recombinant murine immune
interferon.
Febs Lett, **205**, 200-204
- Nash, A.A., (1996):
Immunity to Viruses
in *Immunology*, 4th Ed., Mosby Verlag London (Eds.: I. Roitt,
J. Brostoff, D. Male)
- Naylor, S. L., A. Y. Sakaguchi, T. B. Shows, M. L. Law,
D. V. Goeddel & P. W. Gray (1983):
Human immune interferon gene is located on chromosome 12.
J Exp Med, **157**, 1020-1027
- Nicholl, M. J. & C. M. Preston (1996):
Inhibition of herpes simplex virus type 1 immediate-early gene
expression by alpha interferon is not VP16 specific.
J Virol, **70**, 6336-6339
- Onions, D. (1991):
Equine herpesvirus: new approaches to an old problem [editorial].
Equine Vet J, **23**, 6-7
- Ostlund, E. N., G. P. Allen, M. R. Yeargan, L. D. Coogle,
W. e. Plowright, P. e. Rosedale & J. F. Wade (1991):
The antibody response of horses to specific antigenic domains on equid
herpesvirus-1 glycoproteins B and C. *Equine Infectious Diseases VI:*
Proceedings of the Sixth International Conference.
- Ounanian, A., N. Gueddah, A. Rolachon, M. A. Thelu,
J. P. Zarski & J. M. Seigneurin (1995):
Hepatitis C virus RNA in plasma and blood mononuclear cells in patients
with chronic hepatitis C treated with alpha-interferon.
J Med Virol, **45**, 141-145

- Overall, J. C. Jr, T. J. Yeh & E. R. Kern (1980):
Sensitivity of herpes simplex virus types 1 and 2 to three preparations of human interferon.
J Infect Dis, **142**, 943
- Owerbach, D., W. J. Rutter, T. B. Shows, P. Gray, D. V. Goeddel & R. M. Lawn (1981):
Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9.
Proc Natl Acad Sci USA, **78**, 3123-3127
- Parronchi, P., M. DeCarli, R. Manetti, C. Simonelli, S. Samppognaro, M. Piccinni, D. Macchia, E. Maggi, G. del Prete & S. Romagnani (1992):
IL-4 and IFN (α and γ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th-1 or Th-2 human T cell clones.
J Immunol, **149**, 2977
- Paul, W. E. & R. A. Seder (1994):
Lymphocyte responses and cytokines.
Cell, **76**, 241-251
- Pauli, G. & H. Ludwig (1985):
Increase of virus yields and release of Borna disease virus from persistently infected cells.
Virus Res, **2**, 29-34
- Perussia, B., E. T. Dayton, V. Fanning, P. Thiagarajan, J. Hoxie & G. Trinchieri (1983):
Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway.
J Exp Med, **158**, 2058-2080
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. & Samuel, C.E. (1987)
Interferons and their actions
Ann Rev Biochem, **56**, 727-777
- Peters, J. H., R. Gieseler, B. Thiele & F. Steinbach (1996):
Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants.
Immunol Today, **17**, 273-278
- Phillipotts, R.J., P.G. Higgins, J.S. Willman, D.A. Tyrell, D.S. Freestone & W.M. Shepherd (1984):
Intranasal lymphoblastoid interferon („Wellferon”) prophylaxis against rhinovirus and influenza virus in volunteers.
J Interferon Res, **4(4)**, 535-541
- Pica, F., A. Rossi, N. Santirocco, A. Palamara, E. Garaci & M.G. Santoro (1996):
Effect of combined alpha IFN and prostaglandin A1 treatment on vesicular stomatitis virus replication and heat shock protein synthesis in epithelial cells.
Antiviral Res, **29**, 187-198
- Quesada, J. R. (1987):
Alpha interferons in hairy cell leukaemia: a clinical model of biological therapy for cancer.
Interferon, **8**, 111-134

-
- Raziuddin, A., F. H. Sarkar, R. Dutkowski, L. Shulman, F. H. Ruddle & S. L. Gupta (1984):
Receptors for human alpha and beta interferon but not for gamma interferon are specified by human chromosome 21.
Proc Natl Acad Sci USA, **81**, 5504-5508
- Riegel, S. (1990):
Nachweis von Serumantikörpern gegen Borna-Virus-spezifisches Antigen beim Menschen
Vet Med Diss.,FU Berlin
- Rodriguez, L. L. , G. J. Letchworth, C. F. Spiropoulou & S. T. Nichol (1993):
Rapid detection of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction.
J Clin Microbiol, **31**, 2016-2020
- Roers, A., H.K. Hochkeppel, M.A. Horisberger, A. Hovanessian & O. Haller (1994):
MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitiv marker for endogenous type I interferon.
J Infect Dis, **169**, 807-813
- Roizman, B., R.C. Desroisiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A.C. Minson & M.J. Studdert (1992):
The familie Herpesviridae. an update
Arch Virol, **123**, 425-449
- Rolle, M., A. Mayr, B. Gedek, O. R. Kaaden & H. Mahnel (1993):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Ronni, T., T. Sareneva, J. Pirhonen & I. Julkunen (1995):
Activation of IFN-alpha, IFN-gamma, MxA and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells.
J Immunol, **154**, 2764-2774
- Rosenquist, B. D. & G. K. Allen (1990):
Effect of bovine fibroblast interferon on rhinovirus infection in calves.
Am J Vet Res, **51**, 870-873
- Rott, R., S. Herzog, B. Fleischer, A. Winokur, D. J. Amsterdam, W. Dyson & H. Koprowski (1985):
Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders.
Science, **228**, 755-756
- Rubin, B. Y. & S. L. Gupta (1980):
Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents.
Proc Natl Acad Sci USA, **77**, 5928-5932
- Samuel, C. E. (1991):
Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities.
Virology, **183**, 1-11

- Schijns, V. E. & M.C. Horzinek (1997):
Cytokines in Veterinary Medicine
Cab International, Wallingford, Uk
- Schijns, V. E., R. Van der Neut, B. L. Haagmans, D. R. Bar,
H. Schellekens & M. C. Horzinek (1991):
Tumour necrosis factor alpha, interferon-gamma and interferon-beta
exert antiviral activity in nervous tissue cells.
J Gen Virol, **72**, 809-815
- Schijns, V.E. (1990):
In vivo antiviral activity of IFN-
Vet Med Diss., Univ. Utrecht
- Schmatz, H.D. (1976):
Hemmung von Paramyxoviren durch Interferon
Vet Med Diss., Univ. Gießen
- Schmatz, S. (1975):
Synergismus von Virusmischinfektionen durch das Interferon- eine
Literaturstudie
Vet Med Diss., Univ. Gießen
- Schnorr, J. J., S. S. Schneider, J. A. Simon, J. Pavlovic,
M. A. Horisberger & M. V. ter Meulen (1993):
MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a
stably transfected human monocytic cell line.
J Virol, **67**, 4760-4768
- Schultz, U., J. Kock, H. J. Schlicht & P. Staeheli (1995):
Recombinant duck interferon: a new reagent for studying the mode of
interferon action against hepatitis B virus.
Virology, **212**, 641-649
- Seahorn, T. L., K. G. Carter, J. G. Martens, R. A. Crandell, M. T. Martin, W. L.
Scrutchfield, J. M. Cummins & R. J. Martens (1990):
Effects of human alpha interferon on experimentally induced equine
herpesvirus-1 infection in horses.
Am J Vet Res, **51**, 2006-2010
- Selbitz, H.-J., A. Voigt & W. Schönherr (1980):
Über Möglichkeiten der Nutzung der Interferone in der
Veterinärmedizin.
Mh Vet Med, **35**, 769-771
- Sierra-Honigmann, A. M., S. A. Rubin, M. G. Estafanous,
R. H. Yolken & K. M. Carbone (1993):
Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow
cells of neonatally and chronically infected rats.
J Neuroimmunol, **45**, 31-36
- Skerra, A. (1994):
Use of the tetracyclin promotor for the tightly regulated production of a
murine antibody fragment in *Escherichia coli*.
Gene, **151**, 131-135

-
- Slater, J. D., Borchers, K., Thackray, A.M. & H.J. Field (1994):
The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse.
J Gen Virol, **75**, 2007-2016
- Sperber, S. J., P. A. Levine, J. V. Sorrentino, D. K. Riker & F. G. Hayden (1989):
Ineffectiveness of recombinant interferon-beta serine nasal drops for prophylaxis of natural colds.
J Infect Dis, **160**, 700-705
- Staeheli, P. & O. Haller (1987):
Interferon-induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus.
Interferon, **8**, 1-23.
- Steinbach, F. (1994):
Isolierung und Charakterisierung equiner peripherer Blutmonozyten und ihre Bedeutung für Herpes-(EHV-1) und Borna-(BDV-) Virusinfektionen.
Vet Med Diss., FU Berlin
- Stitz, L., B. Dietzschold & K. M. Carbone (1995):
Immunopathogenesis of Borna Disease.
In: Koprowski, H. & W. I. Lipkin (eds), *Borna disease*.
Curr Top Microbiol, **190**, Springer Berlin, 75-92
- Stokes, A., G. P. Allen, L. A. Pullen & P. K. Murray (1989):
A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 13, 14 and 17/18.
J Gen Virol, **70**, 1173-1183
- Stryer, L. (1996):
Biochemie
Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft
- Studdert, M. J. (1983):
Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1.
Arch Virol, **77**, 249-258
- Studdert, M. J., T. Simpson & B. Roizman (1981):
Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases.
Science, **214**, 562-564
- Telford, E. A., M. J. Studdert, C. T. Agius, M. S. Watson, H. C. Aird & A. J. Davison (1993):
Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses.
Virology, **195**, 492-499
- Telford, E. A., M. S. Watson, K. McBride & A. J. Davison (1992):
The DNA sequence of equine herpesvirus-1.
Virology, **189**, 304-316

- Tewari, D., J. S. Gibson, J. D. Slater, N. T. O., D. Hannant, G. P. Allen & H. J. Field (1993):
Modulation of the serological response of specific pathogen-free (EHV-free) foals to EHV-1 by previous infection with EHV-4 or a TK-deletion mutant of EHV-1.
Arch Virol, **132**, 1-2
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group.(1995):
Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial.
Neurology, **199**, 1277-1285
- Trinchieri, G. & B. Perussia (1985):
Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects.
Immunol Today, **6**, 131-136
- Vengris, V.E., F.H. Reynolds jr., M.D. Hollenberg & P.M. Pitha (1976):
Interferon action: role of membran gangliosides.
Virology, **72**, 486-493
- von Rheinbaben, F., L. Stitz & R. Rott (1985):
Influence of interferon on persistent infection caused by Borna disease virus in vitro.
J Gen Virol, **66**, 2777-2780
- Wagner, R. R. (1990):
Rhabdoviridae
in *Fields Virology, Specific Virus Families*
Raven Press, New York, 1990
- Weiss, S., S. Zeuke & A. Heim (1999):
Suppression der Interleukin-8 Expression: eine indirekt antivirale Aktivität von Interferon- γ , aber nicht Interferon- α in Coxsackievirus B3 (CVB3) infizierten humanen myokardialen Fibroblasten
Poster, Jahrestagung Gesellschaft für Virologie
- Welch, H. M., C. G. Bridges, A. M. Lyon, L. Griffiths & N. Edington (1992):
Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues.
J Gen Virol, **73**, 261-268
- Wenner, C. A., M. L. Guler, S. E. Macatonia, A. O'Garra & K. M. Murphy (1996):
Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development.
J Immunol, **156**, 1442
- Wieggers, P., (1996):
Bildung von TNF und IFN bei der Infektion mit intrazellulären (*Theileria* spp.) und extrazellulären (*Trypanosoma* spp.) Parasiten.
Vet Med Diss., FU Berlin
- Wolfinger, U. (1998):
Verbreitung und Bedeutung von Infektionen mit equinen Herpesviren vom Typ 1, 2 und 4 (EHV-1, -2, -4) beim Pferd.
Vet Med Diss., FU Berlin

-
- Yilma, T. (1983):
Sensitivity of ovine choroid plexus cells to human and other animal IFNs.
J Gen Virol, **64**, 2013-2016
- Yilma, T., T. C. McGuire & L. E. Perryman (1982):
Preliminary characterization of equine interferons and their antiviral activities on bovine, ovine and human cells.
J Int Res, **2**, 363-370
- Yip, Y. K., B. S. Barrowclough, C. Urban & J. Vilcek (1982):
Molecular weight of human gamma interferon is similar to that of other human interferons.
Science, **215**, 411-413.
- Young, H. A. & K. J. Hardy (1995):
Role of interferon-gamma in immune cell regulation.
J Leukoc Biol, **58**, 373-381
- Zimmermann, W., H. Bretter, M. Rudolph & H. Ludwig (1994):
Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome.
J Virol, **68**, 6755-6758
- Zwick, W. & O. Seifried (1925):
Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen).
Berl Tierärztl Wschr, **41**, 129-132
- Zwick, W. (1939):
Über die Bornasche Krankheit.
Z Infkrkht Haustiere, **54**, 1-7

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, April 1999

DANKSAGUNG

Herrn Univ.- Prof. Dr. sc. D. Ebner, Institut für Virologie, Standort Mitte, des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Dissertation sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung recht herzlich.

Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Ludwig, Institut für Virologie, Standort Dahlem, danke ich für das Bereitstellen der Räumlichkeiten und Materialien während meiner Arbeitszeit am Standort Dahlem.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Blankenstein für das Einführen in die wissenschaftliche Arbeit, die jahrelange Betreuung und die Hinweise zur Gestaltung der Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Falko Steinbach, durch dessen Anregungen, Diskussionen und immerwährende Unterstützung die Arbeit wesentlich gefördert wurde.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Erika Kinder und Frau Dr. Sabine Müller für die schnelle und kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Frau Dr. Angelika Bondzio danke ich für die Hilfe und Ratschläge in Bezug auf methodische Fragen.

Herrn Dr. Wolfgang Zimmermann (IMB, Jena) danke ich für die Unterstützung bei meinen Untersuchungen zu rec.eqIFN- .

Allen Mitarbeitern des Institutes am Standort Mitte besonders Frau Y. Scheibe, Frau A. Reum und am Standort Dahlem besonders Frau A. Büchel und Frau T. Leiskau möchte ich recht herzlich für die freundliche Zusammenarbeit danken.

Meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme, gilt mein ganz besonderer Dank. (Im Nachhinein auch für den Antrieb !)

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Ilka Beier
Eltern: Dr. Dagmar Beier, Tierärztin
Dr. Dietrich Beier, Tierarzt †
Geburtstag: 08.02.1972
Geburtsort: Kyritz, Landkreis Ostprignitz-Ruppin
Anschrift: Bielefelder Str.11, 10709 Berlin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1978 - 1988 Polytechnische Oberschule in
Wusterhausen/Dosse
1988 - 1990 Erweiterte Oberschule in
Kyritz

Studium

1990 - 1991 studienvorbereitendes Praktikum
im Institut für Virologie des Fachbereiches
Veterinärmedizin der
Humboldt-Universität zu Berlin
1991 - 1996 Studium der Veterinärmedizin an
der Freien Universität Berlin,
Standort Mitte
-Staatsexamen-
01/1997 Approbation
seit 01/1997 Doktorandin im Institut für Virologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der
FU Berlin
05/97-04/98 Teilzeitassistentin in Kleintierpraxis
Dr. A. Grünberg, Berlin