

Klonierung, Expression und funktionelle
Analyse von Hühner-Interleukin-12

Julia Dreisbach

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Klonierung, Expression und funktionelle Analyse von Hühner-Interleukin-12

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Julia Dreisbach

aus Dettingen an der Erms

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. T. Göbel
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. R. T. Korbel

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Für
Karl Dreisbach und
Lydia Müller

Auch richtete ich mein Herz
darauf, Weisheit zu erkennen
und Erkenntnis von Tollheit
und Torheit zu haben. Doch
erkannte ich, dass auch das
nur ein Haschen nach Wind
ist. Denn wo viel Weisheit ist,
ist viel Verdruss, und wer Er-
kenntnis mehrt, mehrt Kum-
mer (Prediger 1,17+18)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Das Immunsystem	3
2.1.1	Antigenerkennung durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	3
2.1.1.1	Toll-like Rezeptoren	4
2.1.2	Pathogenerkennung und Bekämpfung durch Zellen des adaptiven Immunsystems	8
2.2	Interleukin 12	9
2.2.1	NKSF	9
2.2.2	CLMF	10
2.2.3	Struktur	11
2.2.4	Herkunft	11
2.3	Biologische Funktion	11
2.4	Der IL-12 Rezeptor	13
2.5	Regulation von IL-12	14
2.6	IL-12 bei verschiedenen Säugetieren	16
2.7	Die IL-12 Familie	18
2.8	IL-23	18
2.9	IL-27	19
2.10	Zusammenspiel der Mitglieder der IL-12 Familie	20
3	Zielsetzung	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Tiere und Tierhaltung	25
4.1.1	Hühner	25
4.1.2	Kaninchen	25
4.2	Zellkulturmedien und Zusätze	25
4.2.1	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	25
4.2.2	Standardmedium (10% FCS)	26
4.2.3	HD 11 Medium	26

4.2.4	PBS-EDTA	26
4.2.5	SL-3 Medium	26
4.2.6	Selektionsmedium	27
4.2.7	Einfriermedium	27
4.2.8	ConA-Stammlösung	27
4.3	Kultivierung von HD 11 Zellen	27
4.4	Kultivieren von Schneider-SL-3 Zellen	27
4.5	Einfrieren von Zellen	27
4.6	Auftauen von Zellen	28
4.7	Transiente Transfektion eukaryotischer 293T-Zellen	28
4.7.1	Material	28
4.7.2	Durchführung	28
4.8	Stabile Transfektion von Schneider-SL-3-Zellen	29
4.9	Herstellung eines polyklonalen Antiserums	30
4.9.1	Material	30
4.9.2	Durchführung	30
4.10	Dot-Blot	31
4.10.1	Material	31
4.10.2	Durchführung	31
4.11	α -Flag-ELISA	32
4.11.1	Material	32
4.11.2	Durchführung	33
4.12	Präparation peripherer Blutleukozyten(PBL)	33
4.12.1	Material	33
4.12.2	Durchführung	33
4.13	Gewinnung von Leukozyten aus Organen	33
4.13.1	Material	33
4.14	Trypanblaufärbung	34
4.15	Herstellung von unstimulierten und stimulierten Makrophagen	34
4.15.1	Material	34
4.15.2	Durchführung	35
4.16	Bioassay	35
4.16.1	Material	35
4.16.2	Durchführung	36
4.17	NO-Assay	36
4.17.1	Material	36
4.17.2	Durchführung	37
4.18	RNA-Präparation	38
4.18.1	Material	38
4.18.2	Durchführung	38
4.19	cDNA-Synthese, Reverse Transkription	39
4.19.1	Material	39
4.19.2	Durchführung	39
4.20	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39

4.20.1	Material	39
4.20.2	Durchführung	41
4.21	Agarosegel-Elektrophorese	41
4.21.1	Material	41
4.21.2	Durchführung	42
4.22	PCR-Produkt Aufreinigung	42
4.22.1	Material	42
4.22.2	Durchführung	42
4.23	Linking-PCR	43
4.23.1	Material	43
4.23.2	Durchführung	43
4.24	TA-Klonierung und Plasmidaufreinigung	43
4.24.1	Material	43
4.24.2	Durchführung	44
4.25	DNA-Sequenzierung	44
4.26	Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung	45
4.26.1	Material	45
4.26.2	Durchführung	45
4.27	Ligation	45
4.27.1	Vorbereitung	45
4.27.2	Durchführung	46
4.28	Verwendete Konstrukte	46
4.29	Prokaryotische Expression	46
4.29.1	Material	46
4.29.2	Durchführung	47
4.30	Denaturierende Aufreinigung	47
4.30.1	Material	47
4.30.2	Durchführung	48
4.31	p40 Aufreinigung aus SL-3 Überstand	48
4.31.1	Material	48
4.31.2	Durchführung	48
4.32	Dialyse	49
4.32.1	Material	49
4.32.2	Durchführung	49
4.33	Immunpräzipitation	49
4.33.1	Material	49
4.33.2	Durchführung	50
4.34	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	51
4.34.1	Material	51
4.34.2	Durchführung	52
4.35	Coomassie-Färbung	52
4.35.1	Material	53
4.35.2	Durchführung	53
4.36	Westernblot	53

4.36.1	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose	53
4.36.1.1	Material	53
4.36.1.2	Durchführung	54
4.36.2	Detektion der Proteine	54
4.36.2.1	Material	54
5	Ergebnisse	57
5.1	Analyse der Sequenz des ChIL-12p40	57
5.2	Expression von ChIL-12p40 im prokaryotischen System	58
5.3	Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Anti- serums gegen ChIL-12p40	61
5.4	Expression von ChIL-12p40 in eukaryotischen Systemen	62
5.4.1	ChIL-12p40-pcDNA6-Flag; Expression in 293T-Zellen	63
5.4.2	ChIL-12p40-pCR3-HASP-Flag; Expression in 293T-- Zellen	64
5.4.3	ChIL-12p40pMTV5-Flag; Expression in Schneider-SL- 3-Zellen	66
5.5	Detektion von eukaryotisch hergestelltem ChIL-12p40	68
5.6	Analyse der Sequenz von ChIL-12p35	69
5.7	Klonierung von IL-12p35	70
5.8	Herstellung des Plasmids zur Expression von Flexi-ChIL-12-Flag	72
5.9	Expression von Flexi-ChIL-12-Flag im eukaryotischen System	74
5.10	Biologische Aktivität von ChIL-12p40 auf Milzleukozyten . . .	74
5.11	Expression von ChIL-12p40-Transkripten in verschiedenen Zell- Linien	76
5.12	Steuerung der Synthese von ChIL-12p40, IL-18 und IFN γ durch Toll-like Rezeptoren	78
5.12.1	Detektion von IFN γ im Überstand der stimulierten Makrophagen	78
5.12.2	Nachweis der Transkripte von IL-12p40, IL-18 und IFN γ	79
6	Diskussion	81
6.1	Klonierung und Sequenzanalyse von ChIL-12	81
6.2	Expression von ChIL-12p40 im prokaryotischen System und Generierung eines polyklonalen α ChIL-12p40-Serums	83
6.3	Eukaryotische Expression von ChIL-12p40, Konstruktion und eukaryotische Expression von Flexi-ChIL-12	85
6.4	Analyse der mRNA-Expression von ChIL-12p40	88
6.5	Biologische Aktivität von ChIL-12p40	89
6.6	Ausblick	90
7	Zusammenfassung	91
8	Summary	93

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	v
Literaturverzeichnis	94
A Materialquellen	105
B Geräte in alphabetischer Reihenfolge	107

Abkürzungsverzeichnis

In den Abbildungen wurde der Buchstabencode für Aminosäuren verwendet.

APC Antigen präsentierende Zelle (engl. Antigen Presenting Cell)

APS Ammoniumpersulfat

Aqua bidest. Aqua bidestillata

Aqua dest. Aqua destillata

BAFF B-cell activating factor belonging to the TNF family

BSA Bovines Serumalbumin

CD Cluster of differentiaton

cDNA komplementäre DNA (engl. complementary DNA)

Ch Chicken

ChIL-12 Hühner-IL-12

ConA ConcanavalinA

CpG Deoxycytidylatphosphat-Deoxyguanylat

DC Dendritische Zelle (engl. Dendritic Cell)

DEPC Diethylpyrocarbonat

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleid Acid)

dsRNA doppelsträngige RNA

EDTA Ethylendiamintetraacetic Acid

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EST Expressed Sequence Tag

- FCS** Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
- G-CSF** Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
- GIT** Gastrointestinaltrakt
- Gp130** Glykoprotein 130
- HRP** Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse Reddish Peroxidase)
- i.m.** intramuskulär
- IFN** Interferon
- Ig** Immunglobulin
- IL** Interleukin
- IL12p35** p35-Kette des IL-12
- IL12p40** p40-Kette des IL-12
- IPTG** Isopropylthiogalactose
- JAK** Janus Kinase
- kDa** Kilodalton
- LB** Luria Broth Base
- LPS** Lipopolysaccharid
- MHC** Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
- MR** relatives Molekulargewicht
- mRNA** messenger RNA
- MyD88** Myleoid Differentiation Factor-88
- NF κ B** Nuclear Factor κ B
- NK-Zellen** Natürliche Killerzellen
- nm** Nanometer
- NO** Stickstoffmonoxid
- PAMP** pathogen-associated molecular pattern
- PBL** Periphere Blutleukozyten

PBS Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)

PCR Polymerase Ketten Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)

POD Meerrettich-Peroxidase

poly I:C Polyinosinpolycytodylsäure

RNA Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleid Acid)

RPMI Rosewell Park Memorial Institute

RT Raumtemperatur

RT-PCR Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion

SA-HRP Streptavidin-HRP

SDS Natriumduodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulphate)

SDS-PAGE Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

STAT Signal Transducer and Activator of Transcription

TEMED Tetramethylethyldiamin

T_H1-Zelle T-Helfer1-Zelle

T_H2-Zelle T-Helfer2-Zelle

TLR Toll-like Rezeptor

TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF Tumor-Nekrose Faktor

TRAF TNF-Rezeptor assoziierter Faktor

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TYK Tyrosinkinase

Kapitel 1

Einleitung

Als landwirtschaftliches Nutztier nimmt das Huhn eine oft unterschätzte Rolle ein. Es ist mit der Lieferung von Fleisch und Eiern ein wichtiger Bestandteil der Nahrungsversorgung in Deutschland und vor allem auch in Asien. In Deutschland wurden in Geflügelschlachthöfen (es sind nur die mit einer Kapazität von mindestens 2000 Tieren pro Monat berücksichtigt) insgesamt 928 093,9 Tonnen Geflügelfleisch verarbeitet [80] und 9 374 000 000 Eier erzeugt [79]. Diese Zahl zeigt die enorme Bedeutung des Geflügels als Wirtschaftstier.

Daher ist es wichtig, die Bestände gesund zu erhalten und die Qualität der Lebensmittel hoch zu halten. Eine dauerhafte Krankheitsprophylaxe in Form von Antibiotika ist wegen der Gefahr der Resistenzausbildung gegen bestimmte Keime und wegen befürchteter Rückstände in Ei und Fleisch in der EU verboten. Die Alternative zu prophylaktischem Medikamenteinsatz liegt in der Impfung der Bestände. Daher muss in Deutschland jedes Huhn in seinem Aufzuchtbetrieb gegen Salmonellose geimpft werden [13].

Dies brachte bislang die Probleme gelegentlicher Impfdurchbrüche mit sich. Um einen optimal ausgelegten Impfstoff zu entwickeln ist es zwingend notwendig, die Regulationsmechanismen des Immunsystems zu kennen. Eine wichtige Rolle kommt dabei den Zytokinen als zentralen Regulatoren des Immunsystems zu.

Allerdings ist die Anzahl der rekombinant zur Verfügung stehenden Zytokine des Geflügels relativ gering im Vergleich mit der des Säugers. Da beim Säuger das IL-12 eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Infektionen spielt, besteht die begründete Vermutung, dass dies beim Huhn auch der Fall ist. IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das beim Säuger hauptsächlich von Phagozyten produziert wird und die zellulären Mechanismen, vorrangig des angeborenen Immunsystems, aktiviert.

Ziel dieser Arbeit war es, die immunologischen Werkzeuge für die funktionelle Charakterisierung von ChIL-12 herzustellen und erste Untersuchungen der Funktion von IL-12 beim Huhn durchzuführen.

Kapitel 2

Literaturübersicht

2.1 Das Immunsystem

Sowohl der menschliche als auch der tierische Organismus sind permanent einer Vielzahl von Pathogenen bzw. Mikroorganismen und Fremdstoffen ausgesetzt. Um diese erfolgreich bekämpfen zu können, gibt es sehr unterschiedliche Schutzmechanismen. Einerseits sind mechanische Barrieren, wie zum Beispiel Haut und Schleimhäute ausgebildet, zum anderen gibt es auch chemische Mechanismen wie das salzsaure Milieu des Magens und die Enzyme des Verdauungstraktes, die zur Zerstörung eindringender Mikroorganismen führen. Das alleine wäre aber bei weitem nicht ausreichend, da es Krankheits-erregern immer wieder gelingt, diese Barrieren zu durchbrechen und in den Körper zu gelangen. Hier werden sie sofort vom Immunsystem des Körpers bekämpft. Das Immunsystem ist in zwei funktionelle Einheiten, das angeborene und das erworbene bzw. adaptive Immunsystem, unterteilt. Diese sind jedoch sehr eng miteinander verknüpft.

Sowohl die Mechanismen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems basieren auf der Aktivität weißer Blutzellen, den Leukozyten [36] sowie vieler löslicher Mediatoren wie den Zytokinen mit Interferonen und Tumor-Nekrosefaktoren.

2.1.1 Antigenerkennung durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort gehören Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen und die Granulozyten. Alle diese Zellen entwickeln sich aus gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Diese differenzieren in Megakaryozyten-/Erythrozyten-Vorläuferzellen und in Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen.

Eine Ausnahme hierzu bilden die natürlichen Killerzellen und ein Teil der Dendritischen Zellen, die Plasmazytoiden Dendritischen Zellen. Sie gehen zwar nicht aus der gemeinsamen myeloiden, sondern aus der gemeinsa-

men lymphoiden Vorläuferzelle hervor, werden jedoch auf Grund ihrer Eigenschaften zum angeborenen Immunsystem gerechnet. Zunächst zirkulieren Granulozyten und Monozyten im Blut. Ins Gewebe auswandernde Monozyten differenzieren sich weiter zu Makrophagen und Dendritischen Zellen.

Dendritische Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten stellen eine erste aktive Barriere gegen viele Mikroorganismen dar. Damit das angeborene Immunsystem wirkungsvoll gegen Pathogene und Fremdgewebe im Organismus nicht aber gegen den Organismus selbst arbeitet, braucht es spezifische Rezeptoren, die diese Unterscheidung zwischen körpereigen und körperfremd möglich machen. Ihre Funktion besteht darin, ein Pathogen zu erkennen, seine Phagozytose herbeizuführen und über die Sekretion von Chemokinen, die entsprechende Zellen entlang des chemischen Gradienten anlocken oder durch Zytokine, welche Reaktionen in andere Zellen auslösen, weitere Immunzellen anzulocken und zu aktivieren.

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, sogenannte PRRs (Pattern Recognition Receptors), erkennen bestimmte Muster von Oberflächenmolekülen, sogenannte PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) wie sie nur auf Mikroorganismen, nicht jedoch auf Körperzellen vorkommen [35]. Beispielsweise erkennt der Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien.

Diese Muster sind für ganze Pathogengruppen charakteristisch. Dadurch wird durch eine geringe Anzahl verschiedener Rezeptoren ein breites Spektrum von Pathogenen erkannt. Wird ein Pathogen erkannt und gebunden, wird seine Phagozytose eingeleitet [36] und die Transkription diverser Mediatoren wie Chemokine und Zytokine induziert. Zusätzlich tragen die Zellen auch chemotaktische Rezeptoren, die eine gezielte Migration der Granulozyten zum Infektionsherd ermöglichen.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind mit verschiedenen dieser Rezeptoren ausgestattet, um möglichst viele Pathogene zu erkennen. Charakteristisch für diesen Teil des Immunsystems ist die Tatsache, dass auch nach wiederholter Exposition keine Anpassung oder Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses erfolgt.

Neben den Zellen des angeborenen Immunsystems, sind auch die humoralen Komponenten wie z.B. das Komplementsystem, das Interferonsystem und die Akute-Phase-Proteine Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Das angeborene Immunsystem funktioniert ab dem ersten Tag post partum.

2.1.1.1 Toll-like Rezeptoren

Eine spezielle Gruppe der PRRs des angeborenen Immunsystems sind die Toll-like Rezeptoren. Dabei handelt es sich um ein hochkonserviertes System. Ursprünglich wurde ein Toll Rezeptor bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, dem eine entscheidende Rolle bei der ventro-dorsalen Achsenformation im Embryo zukommt [11].

Die Familie der Toll-like Rezeptoren besteht beim Säuger aus mindestens zehn Mitgliedern, die unterschiedlich auf den Leukozyten verteilt sind, unterschiedliche Pathogenklassen erkennen und die Produktion ähnlicher, aber nicht identischer Muster an proinflammatorischen Mediatoren induzieren [89]. Sie sind membranintegrierte Glykoproteine und werden auf Grund der Homologien ihrer zytoplasmatischen Domäne zu einer großen Superfamilie gerechnet, die auch den IL-1 Rezeptor beinhaltet [6]. Ihnen ist eine extrazelluläre Leucin-reiche Domäne gemeinsam.

Toll-like Rezeptoren interagieren mit ihren Liganden und geben Signale weiter, welche die jeweils passende Reaktion für die Pathogenklasse auslösen [36]. Die Rezeptoren dieser Familie arbeiten alle mit den selben Signalmolekülen wie MyD88, IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK), TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TRAF) 6, Mitogen-aktivierte Protein- (MAP) Kinasen und NF- κ B [5].

Mittlerweile sind beim Menschen elf Toll-like Rezeptoren bekannt, auch wenn noch nicht bei allen die Liganden und die ausgelösten Effekte genauer untersucht sind. Ihnen gemeinsam ist jedoch, dass sie nach Aktivierung durch ihre Liganden die Sekretion pro-inflammatorischer und immunmodulatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1, IL-6, IL-12 und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle, z.B. CD86 induzieren und somit zur Aktivierung des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems führen. Exprimiert werden die TLRs unter anderem auf Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs), Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B- und T- Zellen [53].

Da durch TLRs aktivierte DCs, neben pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 β und IL-6, auch immunmodulatorische Zytokine wie z.B. IL-12, IL-13 und IL-18 sezernieren, können die TLRs die Art der sich entwickelnden Immunantwort über die selektive Induktion bestimmter Zytokine beeinflussen [49]. So führen bakterielle Infektionen, über die Aktivierung von TLRs, vor allem zur Sekretion von IL-12, was die Differenzierung von naiven T-Zellen in T_H1 Zellen fördert [38]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TLRs nicht nur in der frühen Phase einer Infektion wichtig sind, sondern auch als Mittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und Immunmodulatoren von essentieller Bedeutung sind. Eine Übersicht über die bekannten Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden gibt Tabelle 2.1.

TLR 1 bildet zusammen mit TLR 2 einen funktionellen Komplex, der, wenn er durch seinen Liganden (Lipopeptid) aktiviert wird, zu einer starken Produktion von TNF α führt. Es ist bekannt, dass GPI und GPI-Mucin, wie sie in der Membran parasitischer Protozoen, z.B. Trypanosomen, reichlich vorkommen, hohe NO und IL-12 Spiegel bei Makrophagen induzieren, die zuvor mit IFN γ stimuliert wurden [15, 14]. Wird TLR 2 mit Glycosylphosphatidylinositol aktiviert, wird der NF- κ B Weg aktiviert und CD 25 exprimiert. Der zytoplasmatische Anteil des TLR 2 kann mit dem des TLR 6 oder des TLR 1 funktionelle Paare bilden [63]. Die Liganden von TLR 2

TLRs	Herkunft der Liganden	Ligand
TLR 1/2/6	grampositive Bakterien	Lipoproteine, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure
	Staphylokokken	Modulin
	Bakterien	Lipopeptide
	Mykoplasmen, Mykobakterien, Spirochäten	Lipoproteine, Lipopeptide
	Mykoplasmen	MALP-2
	Spirochäten	Glykolipide
	Mycobakterien	Lipoarabino-Mannan
	Porphyromonaden, Leptospiren	LPS
	Hefen	Zymosan
	Trypanosoma cruzi	GPI-Anker
	Klebsiellen	Membranprotein A
Neisseria meningitides	lösliche Faktoren	
TLR 3	Viren	ds RNA
TLR 4	gramnegative Bakterien	LPS
	gramnegative Bakterien	Lipoteichonsäure
	Pflanzen	Taxol
	Respiratorisches Synzytial Virus	F-Protein
	Wirtsorganismus	Hitzeschockprotein 60 Fibronektin-EDA Domäne
TLR 5	begeißelte Bakterien	Flagellin
TLR 7	bislang nur synthetisch	Imidazoquinoline
TLR 8	synthetisch	Imidazoquinoline
	Viren	einsträngige RNA
TLR 9	Bakterien und Viren	unmethylierte CpG-Motive
TLR 10	nicht bekannt	nicht bekannt
TLR 11	uropathogene Bakterien	nicht bekannt

Tabelle 2.1: TLRs und ihre Liganden, modifiziert nach Kaisho 2002 [38] und Akira und Takeda 2004 [6].

und TLR 6 sind teilweise identisch.

Der Toll-like Rezeptor 3 erkennt seinen Liganden, doppelsträngige RNA, nur intrazellulär. Poly I:C ist ein synthetisches Äquivalent zur Doppelstrang-RNA und wird normalerweise für *in vitro* Versuche verwendet. Wird ein TLR 3 mit dsRNA stimuliert, wird der NF- κ B Weg aktiviert und die Synthese der Typ I Interferone (IFN α und IFN β) sowie der Interleukine 6 und 12 induziert, um die Virusreplikation zu hemmen und um die zytotoxische Antworten zu verstärken [7].

Viele der gramnegativen Bakterien und Viren, die Liganden für den TLR

4 stellen, leben intrazellulär. Wird TLR 4 aktiviert, kommt es zur Induktion von IL-12, „IFN γ inducible protein-10“ (IP-10), TNF- α , IFN γ und „monocyte chemotactic protein-5“ (MCP-5) [34]. LPS wird durch die Assoziation von TLR 4 und CD14, dem Makrophagenrezeptor für LPS, erkannt. Durch diese proinflammatorischen Zytokine wird eine lokale Entzündungsreaktion an der Infektionsstelle ausgelöst.

Es ist schon seit längerem bekannt, dass LPS einen septischen Schock auslösen kann. Dazu muss LPS im Blut an LBP (LPS-Bindeprotein) binden. Zusammen binden diese wiederum an CD14 auf Makrophagen, was zur Assoziation mit TLR 4 führt und die NF κ B-Aktivierung im Zellkern und dadurch die Freisetzung von TNF α auslöst. Diese Mechanismen laufen normalerweise ab, um die Ausbreitung von Bakterien zu begrenzen. Laufen sie aber nicht lokal sondern systemisch ab, kommt es zur Entstehung des septischen Schocks. Mäuse mit einem TLR 4 knock out entwickeln auf LPS keinen septischen Schock, da die systemische TNF α Produktion nicht induziert wird. Sie sind aber extrem anfällig für Infektionen mit gramnegativen Bakterien. Außerdem wird nach Stimulation von TLR 4 IL-12 ausgeschüttet, was zur Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H1 Zellen führt [38].

TLR 5 erkennt bakterielles Flagellin und wird auf epithelialen Zellen im unteren Gastrointestinaltrakt [16], auf Monozyten, Dendritischen Zellen und PMNs exprimiert, hingegen kaum auf NK-Zellen [54]. Um Reaktionen gegen im Darm lebende Kommensalen zu verhindern, wird TLR 5 auf den epithelialen Zellen des GIT nur an der basolateralen Membran exprimiert [29]. Daher kommt es nicht zur Aktivierung durch Flagellin von im Darmlumen lebenden Kommensalen.

TLR 6 bildet zusammen mit TLR 2 ein funktionelles Paar. Beide Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche exprimiert und sind verstärkt auf Phagosomen vorhanden, die Zymosan enthalten. Die beiden Rezeptoren interagieren mit ihrer extrazellulären Domäne physikalisch miteinander. Bildet sich durch Kontakt mit dem Liganden das funktionelle Rezeptorpaar, wird auch hier der NF- κ B Weg aktiviert.

Die Liganden für den TLR 7 stammen aus der Imidazoquinolin-Familie. Zwei Vertreter hiervon sind Imiquimod und das potentere R-848. Bisher sind nur synthetische, nicht jedoch natürliche Liganden für den TLR 7 bekannt. Durch Stimulation des TLR 7 auf Peritonealmakrophagen wird eine starke IL-6, IL-12 und TNF α Produktion beobachtet. Diese Aktivierung wird über den MyD88-Weg vermittelt, in MyD88-defizienten Makrophagen ist keine Produktion dieser Zytokine nachweisbar [33].

CpG, ein synthetisches Äquivalent zu bakterieller DNA ist Ligand für den TLR 9. Stimulation mit IL-12 führt nur auf einem kleinen Teil der NK-Zellen zur CD69 Expression, zusammen mit CpG lösen IL-12 oder IL-8 bei allen NK-Zellen die Expression der Stimulationsmarker CD25 und CD69 aus. Außerdem kommt es zur Expression von IFN γ und TNF α in den NK-Zellen und die Zytotoxizität gegenüber Zielzellen steigt deutlich an.

Vier wesentliche Funktionen des IL-12 in Kombination mit Aktivierung von TLR3 oder TLR9 sind [76]:

- *De novo* Expression von Aktivierungsmarkern wie CD69 und CD25
- Freisetzung diverser Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$
- Hochregulierung der Anti-Tumor Zytotoxizität
- (nur in Kombination mit Poly I·C) Zytotoxizität gegen immature DCs

Abschließend kann festgestellt werden, dass alle TLRs, deren Liganden aus intrazellulär vorkommenden Pathogenen stammen, nach ihrer Aktivierung direkt oder indirekt die Sekretion von IL-12 stimulieren.

2.1.2 Pathogenerkennung und Bekämpfung durch Zellen des adaptiven Immunsystems

Obwohl die Mechanismen des angeborenen Immunsystems in der Lage sind, eine Infektion zu verhindern oder Pathogene deutlich zu reduzieren, ist die Elimination der Keime einer bestehenden Infektion und ihre Kontrolle nur möglich, wenn auch das adaptive Immunsystem eingreift [89]. Allerdings dauert es ungefähr eine Woche, bis die adaptiven Mechanismen angelaufen sind. Die beiden Teile des Immunsystems sind nicht nur komplementäre Mechanismen, sie regulieren sich gegenseitig.

Im Gegensatz zu den unspezifischen Antworten des angeborenen Immunsystems sind die Zellen des adaptiven Immunsystems hochspezifisch auf die Bekämpfung einzelner Pathogene ausgerichtet.

Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich die Zellen der adaptiven Immunität. Sie entwickeln sich in zwei Hauptlinien, den B-Lymphozyten und den T-Lymphozyten. Die Rezeptoren der T- und B-Zellen unterscheiden sich grundsätzlich von den Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems.

Während bei den Zellen des angeborenen Immunsystems die Rezeptormoleküle auf allen Zellen einer Zellpopulation gleich sind und nur ein bestimmtes Epitop oder Muster erkennen, erkennt jeder einzelne Lymphozyt ein individuelles Epitop. Diese große Vielzahl an Rezeptoren kommt durch molekulare Mechanismen wie somatische Rekombination, „gene conversion“ oder Hypermutation zustande.

Erkennt eine dendritische Zelle, als Zelle des angeborenen Immunsystems, ein Pathogen, wird sie aktiviert. Sie phagozytiert das Antigen und wandert in den regionären Lymphknoten, um dort auf den MHC Molekülen den T-Lymphozyten das Antigen zu präsentieren. So reift sie zur hocheffizienten Antigen-Präsentierenden-Zelle (APC).

Die Antwort des adaptiven Immunsystems wird durch den Erstkontakt eines T-Lymphozyten mit einer antigenpräsentierenden Zelle im Lymphknoten initiiert. Der Rezeptor der B-Lymphozyten ist ein membrangebundenes

Immunglobulin (Ig). Kann das präsentierte Antigen an dieses Immunglobulin binden, wird die Zelle aktiviert und zur klonalen Expansion angeregt. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette. Die α -Kette entspricht von ihrer Struktur her einer leichten Kette eines Immunglobulins, die β -Kette entspricht einer schweren Immunglobulinkette.

Die T-Lymphozyten wiederum differenzieren sich in zwei Linien, die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen und die $CD4^+$ T-Helferzellen. Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen erkennen virusinfizierte Zellen und töten diese ab, um eine weitere Virusverbreitung zu verhindern.

Die $CD4^+$ T-Helferzellen wiederum differenzieren sich in T_H1 - und T_H2 -Zellen. T_H2 -Zellen erkennen von B-Zellen prozessierte und im MHC II Molekül präsentierte Antigene. Wird nun die T_H2 -Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert, kommt es zur Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-6, welche wiederum die B-Zelle dazu veranlassen, Immunglobuline gegen das von ihr erkannte Antigen zu sezernieren [36].

Die T_H1 -Zellen sind wichtig bei der Erkennung von Bakterien, die sich in Vesikeln innerhalb von Makrophagen vermehren, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* oder *M. leprae*. Die T_H1 Zellen erkennen derart infizierte Makrophagen, interagieren mit ihnen und aktivieren sie. Dadurch wird eine Fusion der Makrophagen-Lysosomen mit dem Bakterienvesikel eingeleitet, auch andere antibakterielle Mechanismen der Makrophagen werden stimuliert, so dass die Pathogene unschädlich gemacht werden. Die Freisetzung von Chemokinen durch die T_H1 -Zellen lockt außerdem weitere Makrophagen an den Infektionsherd.

Ob sich nun vorwiegend eine T_H1 - oder eine T_H2 -Antwort, welche gegen intra- bzw. extrazelluläre Pathogene gerichtet ist, entwickelt, ist abhängig vom Zytokinmilieu, in welchem die klonale Expansion stattfindet [50]. Zuerst wurde IL-4 als mitverantwortlich für die Generierung einer T_H2 -Antwort identifiziert [43], später die zentrale Rolle des IL-12 bei der T_H1 -Antwort entdeckt [46]. Gerade hierbei wird ein enges Zusammenspiel zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem deutlich.

Als ein Bindeglied zwischen den beiden funktionellen Einheiten des Immunsystems und bei der Generierung einer gegen intrazelluläre Infektionen gerichteten Immunantwort spielt IL-12 demnach eine bedeutende Rolle und soll nachfolgend näher betrachtet werden.

2.2 Interleukin 12

2.2.1 NKSF

Im Jahr 1989 veröffentlichten Kobayashi et al. [40] einen Artikel über die Entdeckung eines bislang unbekanntes Faktors, des Natürliche Killerzellen stimulierenden Faktors (NKSF), der in Zusammenhang mit Proliferation, Überlebenszeit und Aktivierung humaner NK- und T-Zellen gebracht wurde.

Beim Test des Überstands einer mit Eppstein-Barr Virus transformierten und mit Phorbol-12,13 dibutyrate (im Folgenden als PDBu bezeichnet) $10^{-7} M$, für 48 h stimulierten humanen B-Lymphoblastoid Zelllinie (RPMI8866) auf PBLs fielen drei Phänomene auf, die mit keinem der anderen, schon bekannten Zytokine in Verbindung gebracht werden konnten. Erstens konnte eine stark erhöhte $IFN\gamma$ -Induktion nachgewiesen werden, zweitens erhöhte sich die spontane Zytotoxizität gegen eine Vielzahl von Zielzelllinien und drittens führte die Stimulation von PBL mit PDBu und PHA zur vermehrten Zellproliferation.

Nach verschiedenen Reinigungs-, Konzentrations- und Analyseverfahren wurden alle drei Aktivitäten einem ca. 70kDa großen anionischen Glykoprotein zugeschrieben. Weitere Strukturanalysen folgten. Unter reduzierenden Bedingungen konnte das 70kDa Glykoprotein in der SDS-Elektrophorese nicht mehr, wohl aber zwei Fraktionen mit Größen von 40kDa und 35kDa nachgewiesen werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich um eine durch Disulfid-Brücken verbundene heterodimere Struktur handelt. Wegen seiner enormen Wirkung auf die NK-Zellen wurde das entdeckte Protein zunächst als NKSF (Natural Killer-Cell Stimulating Factor) bezeichnet.

2.2.2 CLMF

Im Jahr 1990 erschien eine Veröffentlichung über ein neu entdecktes, aus zwei glykosilierten Proteinketten mit 35 kDa und 40 kDa Masse bestehendes Zytokin, eine bis dahin seltene heterodimere Form. Entdeckt wurde das Zytokin bei der Suche nach einem Agonisten, der zusammen mit IL-2 die Toxizität zytotoxischer T-Zellen bei Tumorpatienten erhöht. Stimuliert man humane PBL mit dem Lektin PHA (Phyto-Haem-Agglutinin) sezernieren diese einen Faktor, der, in Synergie mit IL-2, zytotoxische T-Zellen aktiviert. Dieser wurde zunächst CLMF (Cytotoxic lymphocyte maturation factor) genannt.

Isoliert wurde CLMF aus der humanen Lymphoblastoidlinie NC-37. In Kombination mit einer niedrigen IL-2 Dosis induziert CLMF zytolytische Aktivität in LAK-Zellen. Außerdem stimuliert es die Proliferation humaner PHA-aktivierter Lymphoblasten [81]. Es wurde schon in der ersten Veröffentlichung vermutet, dass es sich um den im Jahr zuvor entdeckten NKSF handeln könnte, was jedoch erst später durch Sequenzanalysen bestätigt werden konnte. Des Weiteren wurde entdeckt, dass in den Überständen zum Teil erheblich mehr von der 40 kDa-Kette als von dem 35kDa- Protein nachgewiesen werden konnte. Dies rief die Vermutung hervor, es könnte sich hierbei um das Trägerprotein einer Zytokinfamilie handeln, was sich viel später mit der Entdeckung von IL-23 [62] und IL-27 [66] bewahrheiten sollte.

2.2.3 Struktur

Die Sequenz der IL-12p35-Kette ist homolog der von IL-6 und G-CSF. Ihre Tertiärstruktur besteht aus 4 α -Helices. Die Sequenz von IL-12p40 weist Homologien mit der extrazellulären Domäne der Mitglieder der Hämopoietin-Rezeptoren-Familie auf, vor allem zu IL-6R α und zu CNTFR. Die beiden Ketten werden kovalent durch Disulfidbrücken aneinander gebunden, woraus das IL-12p70-Heterodimer entsteht [40].

2.2.4 Herkunft

IL-12p70 und freies IL-12p40 wird von PBMCs in geringer Menge konstitutiv exprimiert. Auch monozytenfreie PBLs und reine Monozytenkulturen produzieren IL-12. Unter den PBMCs stellen B-Zellen und adhärenente PBMCs die Hauptquelle für IL-12 dar. Induziert wird die Produktion von IL-12 in phagozytischen Zellen durch Bakterien, bakterielle Produkte und intrazelluläre Parasiten [24]. IL-12 wird hauptsächlich von APC wie Dendritischen Zellen und Makrophagen sowie Neutrophilen Granulozyten produziert. Die Produktion in Makrophagen kann durch Interaktion mit aktivierten T-Zellen angeregt werden, welche kostimulatorische Signale durch Moleküle wie den CD40-Ligand geben. Diese Signale scheinen essentiell zu sein, da ohne sie keine IL-12-Produktion stattfindet [42].

2.3 Biologische Funktion

Viele der biologischen Funktionen von IL-12 wurden bislang nur an Lymphozyten studiert, obwohl IL-12 auch Wirkung auf andere Zellen hat. Große Teile der proinflammatorischen Effekte von IL-12 werden durch das von IL-12 induzierte IFN γ mediiert. Dessen Fähigkeit, eine T_H1-Immunantwort zu favorisieren, zeigt die Funktion von IL-12 als immunregulatorisches Zytokin, das eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem schlägt. Durch die Induktion der T_H1-Antwort wird IL-12 zu einem wichtigen Zytokin bei der Abwehr der T_H1-abhängigen Infektionen. Vor allem scheint es bei bakteriellen und fungalen Infektionen und bei Infektionen mit intrazellulären Protozoen eine wichtige Rolle zu spielen.

Lymphozyten, die zu T_H1-Zellen differenzieren, sind auch weiterhin für Stimulationen durch von aktivierten APCs produziertem IL-12 empfänglich. Dies ist essentiell für die optimale Proliferation der T_H1 Zellen und die Produktion von Zytokinen durch die T_H1-Zellen als Antwort auf den Kontakt mit Antigen [52, 48] (siehe auch Abb. 2.1).

Durch die wichtige Rolle, die IL-12 in der T_H1-Antwort spielt, wird es auch zum bedeutenden Faktor bei diversen organspezifischen Autoimmunreaktionen. Im Versuch mit IL-12-knock-out Mäusen konnte festgestellt werden, dass, um kontinuierliche T_H1-Autoimmunreaktionen zu erhalten,

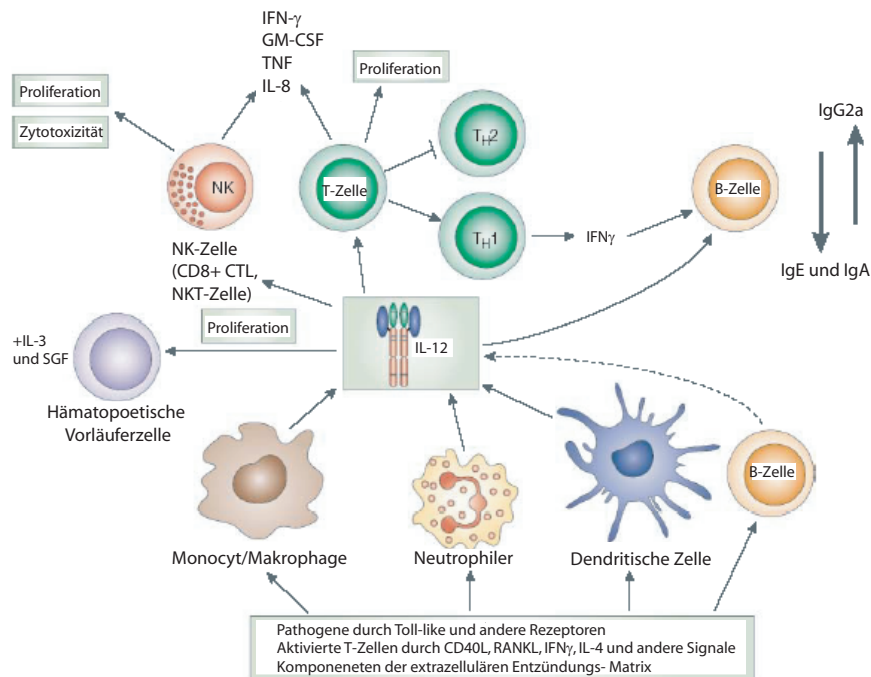


Abbildung 2.1: Zusammenfassung der biologischen Funktionen von IL-12 nach G. Trinchieri [89]. Die Hauptproduzenten von IL-12 sind physiologischer Weise Phagozyten (Monozyten/Makrophagen und Neutrophile) und Dendritische Zellen. Das Zytokin wird als Antwort auf Stimuli durch Toll-like und andere Rezeptoren, durch membrangebundene und lösliche Signale aktivierter T-Zellen, NK-Zellen und Komponenten der extrazellulären Entzündungsmatrix gebildet. Die wichtigsten Zielzellen für IL-12 sind die hämatopoetischen Progenitorzellen, bei denen IL-12 zusammen mit anderen kolonie-stimulierenden Faktoren eine erhöhte Proliferation und vermehrte Koloniebildung auslöst. Bei NK-, NKT- und T-Zellen ist IL-12 für Proliferation, Erhöhung der Zytotoxizität und Expression von zytotoxischen Mediatoren verantwortlich. Ebenso sorgt es für die Produktion von Zytokinen (insbesondere $\text{IFN}\gamma$) und für die Differenzierung zu Zellen, welche Typ 1 Zytokine (T_H1 , T_c1 und $NK1$ Zellen) produzieren. Bei B-Zellen führt es zur Produktion von T_H1 assoziierten Immunglobulinklassen.

IL-12 benötigt wird [75]. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Mäuse mit einem p40-knock-out größere Defizienzen in der Generierung von CD8^+ T-Zellen und bei der Resistenz gegen Infektionen mit Mykobakterien aufwiesen als die p35 knock outs [20].

Obwohl IL-12p40 defiziente Mäuse für die experimentelle allergische Enzephalitis (EAE) nicht empfänglich sind, sind IL-12p35 defiziente Mäuse sogar empfänglicher für die EAE als Wildtyp-Mäuse, was auf die spezielle Bedeutung des IL-12p40 als Bestandteil mehrere Zytokine hinweist (s. Abschnitt 2.7). Die EAE wird also in Abwesenheit von IL-12p70 vertärkt ausgebildet, was mit einer Erhöhung der Spiegel der T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-10 in Verbindung gebracht werden kann [10]. IL-12 wirkt nicht proliferativ auf ru-

hende T-Lymphozyten oder NK-Zellen, es verstärkt aber die durch mitogene Lektine, Alloantigene, CD3-spezifische Antikörper und Phorbol-Diester hervorgerufene Proliferation der Zellen und hat eine direkte proliferative Wirkung auf voraktivierte T- und NK- Zellen [81, 65].

Das Zytokin fördert die Entstehung von zytotoxischen T-Lymphozyten und LAK-Zellen (Lymphokin aktivierte Killerzellen). Daneben erhöht es die zytotoxische Aktivität der CTL und NK-Zellen durch eine Hochregulation der Bildung von Molekülen, die mit den zytotoxischen Granula assoziiert sind, wie Perforin und Granzym und durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. Viele der IL-12 zugeschriebenen Wirkungen auf die B-Zell-Aktivierung und die Produktion bestimmter Antikörper-Isotypen werden indirekt über die durch IL-12 induzierten T_H1 -Zellen und ihre Produkte mediiert [89]. IL-12 induziert bei NK- und T-Zellen die Produktion diverser Zytokine wie GM-CSF, TNF und besonders $IFN\gamma$ [40, 41]. Für die IL-12 induzierte $IFN\gamma$ Produktion werden niedrige Spiegel von IL-1 und TNF benötigt, die auf autokrine Weise von den T- und NK- Zellen produziert werden [27, 22].

IL-12 kann über STAT 4 die Expression der beiden Ketten des IL-18 Rezeptors hochregulieren [55]. Im Gegenzug bewirkt IL-18 die vermehrte Expression von IL-12R β 2 auf ruhenden T-Zellen [18]. Für die Produktion von $IFN\gamma$ werden IL-12 und IL-18 benötigt, vor allem wenn es sich bei den produzierenden Zellen um Makrophagen, DCs und B- Zellen handelt, die nicht als konventionelle Quelle gelten [59]. Ist IL-12 in der frühen Phase der klonalen Expansion gegenwärtig, führt es sowohl bei $CD4^+$ als auch bei $CD8^+$ Zellen zu einem Priming, welches die Zellen bei Restimulation zur Produktion hoher $IFN\gamma$ -Spiegel veranlasst [47]. IL-12 induziert potent T_H1 -Antworten. Dies konnte sowohl durch den Einsatz von rekombinantem IL-12 *in vitro* und *in vivo* als auch durch Studien an IL-12, IL-12R und STAT 4 defizienten Mäusen gezeigt werden [88]. Durch diese Eigenschaft entwickelte sich die Idee, IL-12 als Adjuvans bei Vakzinen zu verwenden, um ein auf T_H1 basierendes immunologisches Gedächtnis zu schaffen [2].

2.4 Der IL-12 Rezeptor

Der membranständige IL-12 Rezeptorkomplex besteht aus zwei Ketten, einer IL-12R β 1 und einer IL-12R β 2 Kette, welche Homologien zur gp130-Kette besitzen. Die IL-12R β 1 Kette ist für die Bindung von IL-12p40 verantwortlich, die IL-12R β 2 Kette für die des IL-12p35. Die Signaltransduktion erfolgt über den Januskinase (Jak)-STAT (signal transducer and activator of transkription) Signaltransduktionsweg [9, 19, 67]. Die IL-12R β 1-Kette ist mit Tyk2 assoziiert, die IL-12R β 2 mit Jak2 [89].

Die spezifischen zellulären Effekte von IL-12 werden hauptsächlich über STAT 4 übertragen, was dadurch nachgewiesen werden konnte, dass STAT

4 defiziente Mäuse den gleichen Phänotyp wie IL-12p40 defiziente Tiere aufweisen [85, 39]. Exprimiert wird der Rezeptor hauptsächlich auf aktivierten T- und NK- Zellen, aber auch auf DCs [31] und B-Zell-Linien [4]. Wird eine T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor aktiviert, wird die Transkription und Expression beider Ketten des IL-12R verstärkt. Diese Hochregulierung, vor allem von IL-12R β 2 wird durch IL-12, IFN α , IFN γ , TNF und den Kostimulator CD28 verstärkt. Auf T-Zellen ist die Expression des IL-12R auf die T_H1 Zellen beschränkt [68, 84].

2.5 Regulation von IL-12

Um funktionelles IL-12 zu produzieren, müssen die Gene für beide Ketten koordiniert exprimiert werden. In Abwesenheit von IL-12p35 oder IL-23p19 (siehe 2.8) wird IL-12p40 als Monomer oder als Homodimer sezerniert, hingegen kann IL-12p35 nur als Heterodimer mit p40 sezerniert werden. IL-12p35 mRNA ist in vielen Zelltypen präsent, so auch in Lymphozyten, von welchen man nicht weiß, dass sie IL-12 produzieren. Es konnte auch im Zellkulturüberstand von IL-12 produzierenden Zellen nie freies IL-12p35 nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu ist die mRNA für p40 auf die Zellen beschränkt, die auch biologisch aktive Heterodimere produzieren [89]. Da die Menge an IL-12p35 selbst in aktivierten Zellen sehr gering ist, hat man vermutet, dass p35 der limitierende Faktor für die Heterodimer-Produktion ist, obwohl die Formation der Heterodimere auch von posttranslationalen Mechanismen kontrolliert wird [77]. Aktiviert wird die Produktion von IL-12 durch diverse Bestandteile von Mikroorganismen, wie Bakterien, intrazellulären Parasiten, Pilzen, Doppelstrang-RNA, bakterielle DNA und CpG-Motiven. Wie stark die Induktion ist, hängt von der Expression der TLRs auf den Phagozyten und DCs, die für die jeweiligen Liganden spezifisch sind, ab. Die initiale Produktion von IL-12 durch Makrophagen auf Stimulation mit löslichen Bestandteilen von *Toxoplasma gondii* findet ohne den Einfluss von IFN γ oder anderer Signale von T-Zellen statt [69], jedoch wird die Produktion von IL-12 Heterodimer durch den Einfluss von CD40- Ligand gefördert. *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass CD8 α ⁺DCs und nicht Makrophagen die ersten Zellen sind, die in der Milz von Mäusen, welche einem löslichen Extrakt von *Toxoplasma gondii* oder LPS ausgesetzt wurden, IL-12 produzieren [78].

Hingegen lösen verschiedene andere Pathogene wie *Brucella abortus* oder CpG-Motive enthaltende bakterielle DNA die frühe Produktion von IL-12 sowohl in CD8 α ⁺DCs als auch in CD8 α ⁻DCs aus. Auf eine Stimulation mit IFN γ wird in den PBMCs keine oder nur eine sehr schwache Produktion von IL-12p40 beobachtet. Dagegen führt eine Stimulation mit LPS zu einer etwa 5-fach höheren Produktion von IL-12p40 als bei unstimulierten Zellen. Kombiniert man die beiden Stimuli, kommt es zu einem dramatischen

Anstieg von IL-12p40. Die Maximale IL-12p40 Produktion zeigt sich bei LPS-Stimulation 16 Stunden nach IFN γ Stimulation. Werden beide Stimuli simultan verwendet, erhöht sich die Produktion von IL-12p40 nur marginal gegenüber einzelner Verwendung von IFN γ oder LPS. Der Verlauf der Produktion des IL-12p70-Heterodimers ähnelt der des IL-12p40, allerdings werden die höchsten Werte bei Stimulation mit LPS nach 24 Stunden Vorbehandlung mit IFN γ gemessen [45].

Misst man die intrazelluläre Produktion von IL-12p40 nach Stimulation von DCs mit CD40L, stellt man fest, dass dadurch die Produktion von IL-12p40 induziert wird. Verwendet man zur Stimulation eine Kombination mit IL-1 β steigt die IL-12p40- Produktion in reifen DCs noch einmal deutlich an, bei unreifen DCs hat IL-1 β keinen signifikanten Einfluss auf die Produktion von IL-12.

Betrachtet man die IL-12p35/p40 Sekretion in den Zellkulturüberstand ergibt sich folgendes Muster: CD40L alleine induziert in reifen DCs niedrige, jedoch messbare Mengen IL-12, in unreifen DCs dagegen etwas mehr, was darauf zurückgeführt wird, dass die TNF α -bedingte Reifung zu einer Verminderung der IL-12 Produktionskapazität führt. Stimuliert man zusätzlich mit IL-1 β ergibt sich für reife DCs etwa die 10-fache, für unreife DCs die 14-fache Menge an IL-12-Heterodimer. Nimmt man zur Stimulation nur IL-1 β führt dies nicht zur IL-12 Produktion.

Humane periphere mononukleäre Blutzellen lassen sich mit einer Kombination aus CD40L, IFN γ und IL-1 β zu einer 7-fach höheren IL-12 Produktion stimulieren als mit einem der beiden Zytokine in Kombination mit CD40L alleine [91]. Erstaunlicher Weise haben auch die Zytokine der T_H2- Antwort einen regulatorischen Effekt auf die Produktion von IL-12 [23]. So verhindern zu einem frühen Zeitpunkt (bis zu 24h) IL-4 und IL-13 die Produktion von IL-12p40, danach jedoch forcieren sie die Transkription von p40, vor allem aber von p35.

Die Negativregulation von IL-12 findet über G α_i -Protein statt, das die Produktion von IL-12 in Makrophagen und DCs limitiert. Dies konnte durch eine erhöhte IL-12 Produktion bei G α_i -defizienten Mäusen gezeigt werden. Das MCP (Monozyten chemotaktisches Protein) und andere Liganden, die die IL-12 Produktion bei Makrophagen hemmen, sind bei DCs unwirksam, was darauf schließen lässt, dass verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren an der Regulation der Produktion von IL-12 durch DCs und Phagozyten beteiligt sind [89].

Ein weiterer inhibitorischer Faktor ist IL-10, der die Transkription beider Gene durch die Produktion eines bislang nicht identifizierten Proteins hemmt [8, 22]. So führt ein IL-10-knock-out bei Mäusen zu letalen systemischen Entzündungen als Antwort auf diverse Pathogene [28]. TGF β (transforming growth factor) reguliert die IL-12 Produktion ebenfalls negativ, er reduziert die Stabilität der IL-12p40 mRNA. Auch IFN α und IFN β unterdrücken die Produktion von IL-12, obwohl sie teilweise überlappende Funktionen haben.

Ebenso verhält es sich mit TNF.

2.6 IL-12 bei verschiedenen Säugetieren

Zuerst wurde IL-12 beim Menschen entdeckt. Es folgte die Klonierung des murinen IL-12 und die der anderen Säugetiere. Im Säugersystem zeigte sich IL-12 als ein hochkonserviertes Zytokin mit großen Sequenzhomologien. Die folgende Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Tierarten auf DNA-Ebene. Im oberen rechten Teil ist die Übersicht über die p40- Kette, im unteren linken Teil über die p35- Kette.

p35→ p40↓	Mensch	Maus	Rind	Katze	Hund	Schaf
Mensch	/	70%	87,8%	84,2%	84,76%	84,5%
Maus	60%	/	75,6%	68,1%	67,59%	n.n.
Rind	82,2%	58,6%	/	84,8%	85,01%	96,3%
Katze	85,1%	55,4%	81,5%	/	92,1%	n.n.
Hund	87%	73%	86%	90,5%	/	n.n.
Schaf	69,1%	n.n.	93,3%	n.n.	n.n.	/

Tabelle 2.2: Übersicht über die Sequenzhomologien des IL-12 zwischen den Spezies [74, 92, 70, 12, 71].

Über die Molekulargewichte der beiden Ketten gibt Tabelle 2.3 Auskunft:

Spezies	p35	p40
Mensch	35 kDa	40kDa
Maus	24,18 kDa	38,24 kDa
Rind	24,94 kDa	37,05 kDa
Hund	24,99 kDa	37,41 kDa
Schaf	29 kDa	

Tabelle 2.3: Darstellung der Molekulargewichte der beiden Ketten des IL-12 bei den verschiedenen Spezies

IL-12 hat bei den bisher erforschten Säugetieren zum größten Teil ähnliche Funktionen. Allerdings gibt es auch immer wieder Unterschiede in der Wirkungsweise und eine Kreuzreaktivität des Zytokins zwischen den Spezies ist nur sehr selten gegeben.

Nachdem sich zeigte, dass humanes IL-12 keine Effekte auf Mäuse-Lymphozyten hervorrief, klonierten D. S. Schoenhaut 1992 das murine IL-12 [74]. Die Gruppe konnte IL-12p35 mRNA in Milz, Thymus, Gehirn und Lunge nachweisen, IL-12p40 mRNA dagegen nur in lymphoiden Zellen. Die murine

p40-Kette wird von 1056 bp codiert und hat 335 Aminosäuren. Murines IL-12 ist auch auf humanen Zellen aktiv. Bei chimären Molekülen zeigte nur die Form murines p35/humanes p40 Aktivität, bei der reversen Chimäre (humanes p35/murines p40) konnte keine biologische Wirksamkeit gezeigt werden. Daraus folgerten Schoenhaut et al., dass die Aktivität des murinen IL-12 auf humanen Zellen von der p35-Untereinheit abhängig sei.

1995 wurde von D. Zarlenga et al. das bovine IL-12 identifiziert und kloniert. Auch hierbei wurden für das Primerdesign die großen Homologien zwischen den Spezies ausgenutzt [92].

1997 wurde die Identifizierung und Klonierung von felinem IL-12 publiziert [70]. Motiviert wurde die Forschung durch die Hoffnung auf neue Therapieansätze bei der feline infektiösen Peritonitis, einer Coronavirus-Erkrankung. Die 685 bp lange p35-Sequenz enthält einen offenen Leserahmen für ein 222 Aminosäuren langes Protein. Die 1006 bp lange p40-Sequenz enthält einen offenen Leserahmen für ein 329 Aminosäuren langes Protein.

In den Jahren 1997/1998 wurde die Klonierung des caninen IL-12 von zwei Gruppen fast zeitgleich publiziert [12, 61]. Durch die große Homologien zu humanem, bovinem und murinem IL-12 konnte mit Hilfe von für die konservierten Regionen spezifischen Primern canines IL-12 in der mRNA stimulierter PBMC nachgewiesen werden.

In der Studie [12] konnte sowohl mit humanem als auch mit caninem IL-12 eine $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in caninen PBMCs ausgelöst werden. Dieses Ergebnis ist aber auf Grund eventueller ConA-Rückstände im verwendeten IL-12 als nicht verifiziert dargestellt. Ein kommerziell erhältlicher ELISA zum Nachweis von humanem IL-12 reagierte nicht mit caninem IL-12. Canines IL-12 stimuliert die Proliferation von PHA-aktivierten caninen Lymphozyten. Außerdem konnte eine erhöhte MHCII- Expression auf FCBR 1-Zellen nachgewiesen werden. Dies weist auch hier auf die Rolle von IL-12 bei der Bekämpfung von intrazellulären Infektionen hin. Da die MHCII- Expression durch $\text{IFN}\gamma$ stimuliert wird, schreiben die Autoren die erhöhte MHCII- Expression der Induktion von $\text{IFN}\gamma$ durch IL-12 zu [61].

Ein Jahr später, 1999 publizierten Nicolson et al. [58] die Identifizierung und Klonierung von equinem IL-12. Auch in diesem Fall konnten die codierenden Gene wegen der großen Homologien zwischen den Spezies durch PCR mit auf die die hochkonservierten Regionen zugeschnittenen Primern amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Im Jahr 2000 veröffentlichten P. Schmid et al. [71] einen Vergleich der IL-12p35 Exon-Struktur von Schaf und Rind und stellten große Sequenzhomologien fest. Außerdem zeigten sich auch große Übereinstimmungen beim Vergleich der Exon-Muster mit denen der Maus.

Im selben Jahr konnten die Gene von ovinem IL-12p40 und IL-12p35 kloniert und exprimiert werden [83]. Das Gen für ovines p35 hat eine Länge von 666 bp, es wird in ein Protein von 221 Aminosäuren translatiert. Das Gen für ovines p40 hat eine Länge von 984 bp, das Protein besteht aus 327 Ami-

nosäuren. Allerdings konnten beim Schaf im Gegensatz zum Menschen keine p40 Homodimere nachgewiesen werden. Das IL-12 des Schafes ist etwas leichter als das humane, die molekulare Masse von p35 beträgt nur ca. 29 kDa, was auf eine Verkürzung von 32 Aminosäuren zurückzuführen ist. Eventuell spielt auch eine unterschiedliche Glykosylierung eine Rolle. Weder humane noch ovine p35 oder p40 Einzelketten haben eine erkennbare Wirkung auf die Proliferation aktivierter PBMNC. Jedoch wirken interessanterweise sowohl ovines als auch humanes IL-12 verstärkend auf die Proliferation ConA-stimulierter oviner PBMNCs. Die selbe Wirkung zeigten beide Chimärenarten von humanem/ovinem IL-12. Das polyklonale, für humanes IL-12 neutralisierende Antiserum, zeigte nur eine minimale neutralisierende Wirkung von ovinem IL-12, dasselbe Antiserum erkennt aber durchaus ovines IL-12 bei Immunpräzipitationen [83].

2.7 Die IL-12 Familie

In den letzten Jahren wurden noch zwei weitere mit IL-12 verwandte Zytokine und ihre Rezeptoren entdeckt, (Abb. 2.2). Es handelt sich hierbei um IL-23 und IL-27. Diese Zytokine werden zusammen mit IL-12 in der sogenannten IL-12 Familie zusammengefasst.

2.8 IL-23

Ein per Computeranalyse entdecktes, mit IL-12p35 entfernt verwandtes Protein p19 bildet zusammen mit IL-12p40 ein neues, biologisch aktives Zytokin, welches von Oppmann et al. [62] IL-23 benannt wurde. Die p19 Kette weist wie die p35 Kette des IL-12 Homologien mit IL-6 und G-CSF auf und wird nur als Heterodimer zusammen mit p40 sezerniert. Es wird von aktivierten Dendritischen Zellen in nachweisbarer Menge gebildet und bindet an den IL-12R β 1, jedoch nicht an den IL-12R β 2. Der IL-23-Rezeptorkomplex wird von zwei Ketten gebildet, der IL-12R β 1 Kette und der IL23R, einer neuen, gp130- ähnlichen Kette [64].

Ähnlich wie IL-12 aktiviert IL-23 Tyk2, Jak2 und STAT1, 3 und 4. Allerdings induziert IL-23 STAT3/4 Heterodimere, das heißt, die reine STAT4-Induktion steht nicht so deutlich im Vordergrund wie bei IL-12. In PHA-Blasten (PHA-stimulierte PBMC) aktiviert es STAT4. Exprimiert und reguliert wird der IL-23 Rezeptorkomplex auf T- und NK- Zellen sowie auf phagozytischen und dendritischen hämatopoetischen Zellen. IL-23 werden ähnliche Funktionen wie IL-12 bei der Induktion von IFN γ , der T_H1-Induktion und Aktivierung der Antigen-Präsentation der DCs zugeschrieben, allerdings überschneiden sich die Funktionen nicht [64]. Im Gegensatz zu IL-12 induziert IL-23 selektiv die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen.

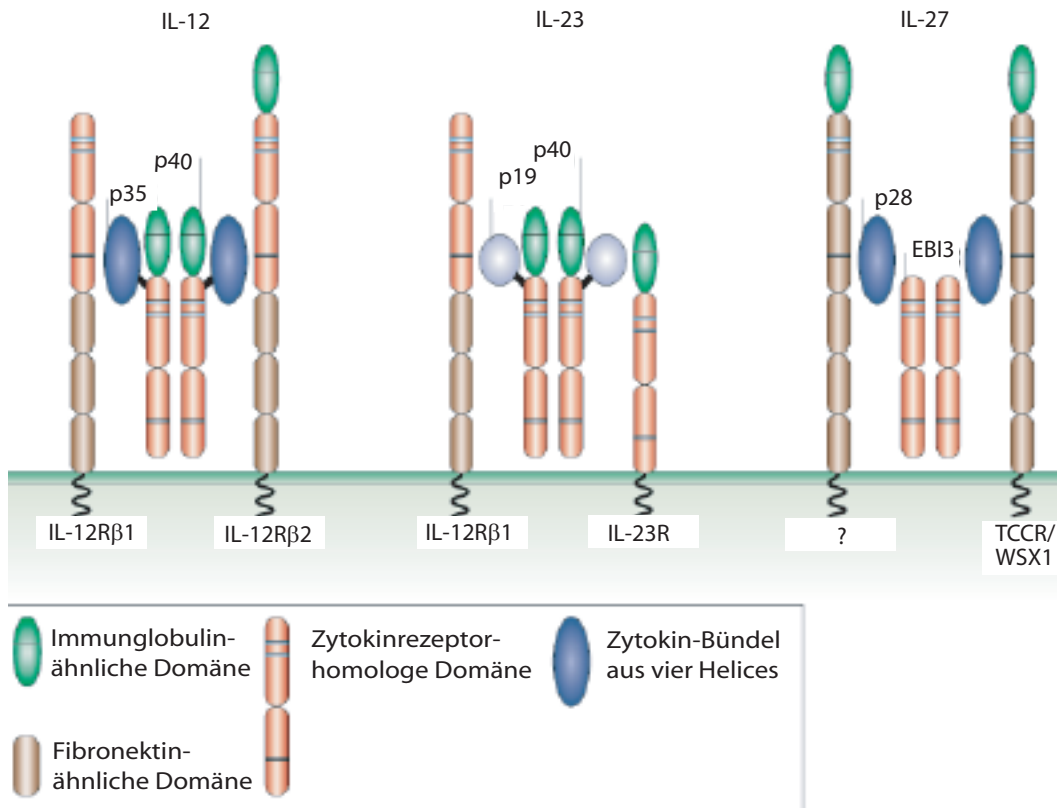


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau der Mitglieder der IL-12 Familie und ihrer Rezeptoren. (Nach: Giorgio Trinchieri [89].)

2.9 IL-27

Auch IL-27 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus EBI3 (Eppstein-Barr Virus induziertes Gen 3), einem Homolog zur p40-Kette des IL-12 und aus p28, einem dem IL-12p35 verwandtem Polypeptid besteht. EBI3 ist schon seit Jahren bekannt und es wurde vermutet, dass es mit IL-12p35 ein Heterodimer bilden könnte, allerdings wurde nie eine biologische Funktion dieses Heterodimers beobachtet. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass EBI3 die Sekretion von p28 auslöst und mit p28 ein nicht kovalent gebundenes Heterodimer, IL-27, bildet [66]. Es ist ein frühes Produkt antigenpräsentierender Zellen und bewirkt eine rasche klonale Expansion naiver $CD4^+$ T-Zellen, jedoch nicht von Gedächtnis $CD4^+$ T-Zellen. Es wirkt stark synergistisch mit IL-12 bei der Induktion der $IFN\gamma$ -Produktion naiver $CD4^+$ T-Zellen.

Der Rezeptorkomplex für IL-27 besteht aus zwei Ketten, dem Orphan-Rezeptor WSX-1/TCCR und dem gp130 [87]. IL-27 aktiviert Jak1, STAT1 und STAT3. Es wird in humanen Phagozyten und DCs sofort nach der Aktivierung produziert, wahrscheinlich früher als IL-12. Es besteht eine Synergie

zwischen IL-27 und IL-12 bei der Induktion der Produktion von $\text{IFN}\gamma$ in T- und NK-Zellen. Außerdem ist IL-27 ein potentes Mitogen für mit anti-CD3 Antikörpern aktivierte naive T-Zellen.

2.10 Zusammenspiel der Mitglieder der IL-12 Familie

Bei Mäusen, die eine IL-12p40, IL-12R β 1 oder STAT4- Defizienz aufweisen fehlt die T_H1 -Antwort nicht komplett, sondern kann auf einem Niveau aufrecht erhalten werden, welches Schutz vor intrazellulären Infektionen gewährt, solange die antiinflammatorischen inhibitorischen Wege wie IL-10 unterdrückt werden [37].

Die Tatsache, dass IL-12 kaum in der Lage ist, die Transkription des T-bet Faktors hervorzurufen, was als eines der ersten molekularen Ereignisse bei der Differenzierung von T- zu T_H1 Zellen gilt, führte zur Hypothese, dass IL-12 mehr für die Expansion und die optimale Aktivierung der T_H1 -Zellen als für die Induktion der T_H1 - Antwort zuständig ist [51]. T-bet wird dagegen sehr effizient über STAT1 von IL-27 induziert.

Ein komplettes Verschwinden der T_H1 -Antwort wird nur bei Mäusen beobachtet, die für das Adaptormolekül MyD88 defizient sind. MyD88 ist essentiell für die Signaltransduktion der Zytokine der IL-1 Familie und für den Großteil der TLRs [37]. Diese Erkenntnisse legten die Theorie nahe, dass IL-27 durch die T-bet-Induktion die frühe Entwicklung der T_H1 -Antwort auslöst, IL-12 für die stabile Fortführung und IL-23 für die T_H1 -Gedächtniszell-Differenzierung zuständig ist.

Allerdings wird dieses einfache Modell durch neue Erkenntnisse und weiterführende Studien in Frage gestellt [87]. Die Entdeckung von IL-23 erklärt die unterschiedlichen Phänotypen der IL-12p40 oder IL-12R β 1 defizienten Mäuse im Vergleich mit den IL-12p35 oder IL-12R β 2 defizienten Mäusen. Bei Ersteren fehlen sowohl die IL-12 als auch die IL-23 Funktionen, bei Letzteren ist IL-23 funktionsfähig, allerdings sind sie oft weniger resistent gegenüber Infektionen als Wildtypmäuse [89].

Die in Abschnitt 2.3 erwähnte T_H1 -medierte Autoimmunreaktion EAE, gegen die p40-knock-outs resistent sind und die bei p35-knock-outs dramatischer verläuft als beim Wildtyp, kann auch bei p19-defizienten Mäusen nicht ausgelöst werden. Dies zeigt die essentielle Rolle von IL-23 bei dieser Krankheit [21]. Eine weitere Autoimmunkrankheit bei der IL-23 eine Rolle spielt, ist die Kollageninduzierte Arthritis (CA). Außer seiner eventuellen direkten proinflammatorischen Rolle kann IL-23 nämlich zu einem spezifischen T-Zell-Aktivierungs-Status führen, der die Produktion von IL-17, einem direkt knochenerosivem Zytokin, veranlasst [3].

Es ist bemerkenswert, dass IL-12 die IL-17-Induktion antagonisiert und somit eine weitere paradoxe schützende Rolle bei Autoimmunreaktionen spielt.

WSX-1/TCCR defiziente Mäuse zeigen eine hohe Empfänglichkeit für Infektionen mit *Leishmania major* und *Listeria monocytogenes* zusammen mit einer nicht funktionierenden oder verspäteten T_H1 -Antwort, was für eine Rolle des IL-27 bei der Initiation der T_H1 -Antwort spricht. Obwohl die frühe $IFN\gamma$ -Antwort bei $WSX-1^{-/-}$ Mäusen auf Stimulation mit Antigen oder IL-12 reduziert war, produzierten $CD4^+$ T-Zellen von $WSX-1^{-/-}$ Mäusen nach Restimulation höhere $IFN\gamma$ -Level als Wildtyp-Zellen [66].

Der aktuelle Stand der Forschung zeigt, dass das zunächst einfach vermutete Zusammenspiel von IL-12, IL-23 und IL-27 mit ähnlichen Funktionen zu verschiedenen Zeiten während der T_H1 -Antwort überdacht werden muss, da die biologischen Funktionen der Zytokine sehr viel komplexer sind als zunächst vermutet.

Kapitel 3

Zielsetzung

IL-12 ist ein wichtiges Immunmodulatorisches Zytokin, daß vor allem bei Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Pathogene eine große Rolle spielt. Da es auch als potentielles Adjuvans neuer Vakzinen diskutiert wird, sollten, um seine Wirkungsweise bei Hühnern studieren zu können, zunächst die immunologischen Werkzeuge hergestellt werden und erste Studien der biologischen Aktivität durchgeführt werden. Im einzelnen sind das:

- Vergleichende Sequenzanalyse des ChIL-12p40 mit dem IL-12p40 anderer Spezies
- Expression von ChIL-12p40 in prokaryotischen und eukaryotischen Systemen, sowie Erarbeitung von Aufreinigungsverfahren für native und denaturierende Aufreinigung von rekombinantem ChIL12p40
- Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen ChIL-12p40 und Analyse der vorliegenden Struktur (Monomer/ Homodimer) des ChIL-12p40
- Identifizierung, vergleichende Sequenzanalyse und Klonierung von ChIL-12p35
- Herstellung eines Flexi-ChIL-12 Plasmides, eukaryotische Expression von Flexi-ChIL-12 und Test des polyklonalen Antiserums zur Erkennung von eukaryotischem Flexi-ChIL-12
- Untersuchungen zur IL-12p40-Funktion, wie das Erstellen eines Expressionsmusters von ChIL-12p40 in verschiedenen Geweben und Zell-Linien, eines Zytokinprofils von Makrophagen nach Stimulation mit diversen TLR- Liganden und erarbeiten eines *in vitro* Zellsystems zur Analyse der IFN γ -induzierenden Wirkung des ChIL-12p40

Kapitel 4

Material und Methoden

Hochzahlen in diesem Kapitel benennen die Bezugsquellen der Chemikalien. Diese sind aufgelöst in Anhang A.

4.1 Tiere und Tierhaltung

4.1.1 Hühner

Für die Versuche mit primären Zellen wurden Blut und Organe von M11-Hühnern (B^{2/2}-Haplotyp) verwendet. Die Tiere wurden vom Institut für Tierzucht in Mariensee bezogen und in kleinen Gruppen in Gitterrostkäfigen gehalten. Sie erhielten handelsübliches Alleinfutter und Wasser ad libitum.

4.1.2 Kaninchen

Zur Gewinnung des polyklonalen Antiserums wurden Kaninchen immunisiert. Die Tiere wurden einzeln gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Immunisierungen wurden der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-2531.6-14/2001 angezeigt.

4.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

4.2.1 Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

8,0 g Natriumchlorid ($NaCl$)²

1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)²

0,2 g Kaliumchlorid (KCl)²

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)²

ad 1000ml aqua dest., auf pH 7,2 einstellen, vor Gebrauch in der Zellkultur autoklavieren.

4.2.2 Standardmedium (10% FCS)

445ml RPMI 1640 mit 0,532 g/l stabilem Glutamin³(im Folgenden RPMI)

50ml fetales Kälberserum³ (fetal calf serum (FCS) , 30 min bei 57°C inaktiviert)

5ml Penicillin-Streptomycin-Lösung³ (100 IE/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin)

Lagerung: FCS und Penicillin-Streptomycin wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

4.2.3 HD 11 Medium

445ml RPMI³

40ml FCS³ (s.o.)

10ml Hühner Serum³ (Chicken Serum)

5ml Penicillin-Streptomycin-Lösung³ (s.o.)

4.2.4 PBS-EDTA

200 mg Ethylendiamintetraacetic Acid Tetra-Natrium Hydrat¹⁹(EDTA)

ad 1 l PBS

4.2.5 SL-3 Medium

10%ig

890ml SF 900 II⁶

100ml FCS³

10ml Penicillin/Streptomycin³

20%ig

40ml SF 900 II⁶

10ml FCS³

4.2.6 Selektionsmedium

969ml SF 900 II⁶
30ml FCS³
1ml Puromycin⁵ 10 μ g/ μ l

4.2.7 Einfriermedium

40ml FCS³
10ml Dimethylsulfoxid² (DMSO)

Lagerung: DMSO wurde bei RT gelagert, das Einfriermedium bei -20°C

4.2.8 ConA-Stammlösung

15 mg Concanavalin A¹ (ConA)

ad 10ml RPMI³. Lagerung: in Aliquots von 500 μ l bei -20°C, Reste wurden nach dem Auftauen verworfen.

4.3 Kultivierung von HD 11 Zellen

Von den adhärent wachsenden HD 11 Zellen wurde zur Teilung das Medium vollständig abgenommen und der Zell-Monolayer zur Entfernung von FCS Resten einmal kurz mit 37°C warmem PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit PBS-EDTA (37°C) bedeckt und ca. 10 min lang bei 40°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut in der gewünschten Dichte in HD 11 Medium aufgenommen und bei 40°C kultiviert.

4.4 Kultivieren von Schneider-SL-3 Zellen

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10% SL-3-Medium im Brutschrank bei 25°C kultiviert. Die Zellen wachsen semi-adhären. Um sie auszudünnen oder zu teilen wurden die Zellkulturflaschen abgeklopft und die Zellen samt Medium mit neuem Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt und auf entsprechend größere oder mehr Zellkulturflaschen verteilt.

4.5 Einfrieren von Zellen

Das Kulturmedium wurde von den adhärent wachsenden HD 11 Zellen vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 37°C warmem PBS gespült und dann in Abhängigkeit von der Zellkulturflaschengröße mit 5-10ml 37°C warmem PBS-EDTA überschichtet und für 10 min bei 40°C

inkubiert. Nach Ablösen aus der Kulturflasche wurden die Zellen einmal in 50ml PBS gewaschen, 10 min bei 225g zentrifugiert, gezählt und mit einer Dichte von $5 \cdot 10^6/ml$ in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die semiadhärenten SL-3 Zellen wurden abgeklopft, in ihrem Medium suspendiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden in Aliquots von 1,0 bis 1,8ml in entsprechende Gefrier Röhrchen überführt und über Nacht in einer Isopropanol haltigen Einfrierbox (Abkühlung $1^\circ C/min$) bei $-80^\circ C$ eingefroren.

4.6 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension möglichst rasch im Wasserbad bei $37^\circ C$ aufgetaut und zügig in ein mit kaltem PBS gefülltes 50ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (225g, 10 min, $4^\circ C$) und nochmals mit 50ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche gegeben.

4.7 Transiente Transfektion eukaryotischer 293T-Zellen

293T-Zellen wurden für die Expression von ChIL-12p40pCR3-HASP-Flag und Flexi-ChIL-12-Flag verwendet.

4.7.1 Material

Metafectene^{TM23}

RPMI 1640³

Plasmid

4.7.2 Durchführung

Die Zellen wurden, je nach gewünschter Ansatzgröße, folgendermaßen ausgesät:

$4,4 \cdot 10^6$ Zellen 14ml Standardmedium in eine Petrischale mit \varnothing 100 mm

$1 \cdot 10^6$ Zellen 3ml Standardmedium in einer Kavität einer 6-Lochplatte

$2,2 \cdot 10^5$ Zellen 0,5ml Standardmedium in einer Kavität einer 24-Lochplatte

und 24 h bei $37^\circ C$ inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen. Die Transfektionsreagentien wurden auch entsprechend der Ansatzgröße wie folgt gemischt:

Petrischale: In einem sterilen 1,5ml Eppendorf-Cup wurden 20µg Plasmid in RPMI 1640 gelöst (Gesamtvolumen = 500µl), in einem zweiten Cup 70µl Metafectene in 430µl RPMI 1640.

6-Lochplatte: In einem sterilen 1,5ml Eppendorf-Cup wurden 2,5µg Plasmid in RPMI 1640 gelöst (Gesamtvolumen = 100µl), in einem zweiten Cup 25µl Metafectene in 75µl RPMI 1640.

24-Lochplatte: In einem sterilen 1,5ml Eppendorf-Cup wurden 1µg Plasmid in RPMI 1640 gelöst (Gesamtvolumen = 50µl), in einem zweiten Cup 3µl Metafectene in 47µl RPMI 1640.

Die Plasmidlösung wurde mit der Metafectenelösung gemischt, 15 min. bei RT inkubiert und tropfenweise auf die adhärennten Zellen gegeben. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Überstände abgenommen, abzentrifugiert und analysiert.

4.8 Stabile Transfektion von Schneider-SL-3-Zellen

Am Abend vor der Transfektion wurden die Schneider-SL-3 Zellen auf Easy-Grip-Petrischalen in verschiedenen Konzentrationen ausgesät. Zur Transfektion wurde die zu 80-90% konfluent gewachsene Petrischale ausgewählt, die restlichen Petrischalen wurden verworfen.

In einem sterilen 1,5ml Eppendorf Cup wurden

- 1µg Plasmid ChIL-12p40pMTV5-Flag
- 0,1µg Puro-Vektor (zur Selektion)
- ad 100µl SF 900 II⁶ (ohne Zusätze)

gemischt. In einem zweiten 1,5ml Eppendorf Cup wurden

- 80µl SF 900 II⁶ (ohne Zusätze)
- 20µl Cellfectin⁶

gemischt. Der Inhalt beider Eppendorf Cups wurde gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 Minuten wurden 800µl SF 900 II zu der Transfektionsmischung zugegeben. Der Zellkulturüberstand der Über-Nacht-Kultur in den Easy-Grip-Petrischalen wurde vorsichtig abgenommen und die 1000µl Transfektionsmischung tropfenweise unter Schwenken der Petrischale zugegeben. Die Zellen wurden 24h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 2ml 20%iges SL-3 Medium zugegeben und weitere 24h bei 25°C inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und folgendermaßen in Selektionsmedium verdünnt:

A: 3ml Zellen in 60ml Selektionsmedium

B: 10ml Zellsuspension A in 40ml Selektionsmedium

C: 1ml Zellsuspension B in 50ml Selektionsmedium

Im Selektionsmedium waren die nicht-transfizierten Zellen einer kleinen Zellkulturflasche als sogenannte „Feeder-Zellen“ enthalten, um das Wachstum der Klone zu verbessern.

Die Zellsuspensionen A, B und C wurden mit jeweils 1ml pro Kavität auf je eine sterile 48-Loch-Flachboden Zellkulturplatte gegeben und 17 Tage bei 25°C kultiviert.

Kavitäten mit sichtbar gewachsenen Einzelklonen wurden durch Aufsuspendieren dupliziert (je 500 μ l Zellsuspension, die Kavitäten wurden mit weiteren 500 μ l Selektionsmedium aufgefüllt). Ein Duplikat wurde mit 1 μ l pro Kavität einer 1M $CuSO_4$ -Lösung (Endkonzentration 1mM) induziert (72h bei 25°C inkubieren), die andere weiter kultiviert.

Die Klone wurden nach Induktion zuerst im Dot-Blot, siehe 4.10, dann im α -Flag-ELISA, siehe 4.11 getestet. Positive Klone wurden auf eine 6-Loch-Platte umgesetzt und weiter kultiviert. Der Klon mit der besten Produktivität wurde weiter kultiviert, auf kleine, mittlere und große Flaschen umgesetzt und schließlich in einer Roller-Bottle bei Raumtemperatur vermehrt. Wenn die gewünschte Zelldichte erreicht war, wurde mit $CuSO_4$ (Endkonzentration 1 mM) die Proteinsynthese induziert.

4.9 Herstellung eines polyklonalen Antiserums

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen ChIL-12p40 wurde ein Kaninchen mit prokaryotisch rekombinant hergestelltem ChIL-12p40 immunisiert.

4.9.1 Material

Freunds komplettes Adjuvans¹⁹

Freunds inkomplettes Adjuvans¹⁹

IL12p40 aus denaturierender Aufreinigung, s. 4.30

4.9.2 Durchführung

Alle Blutentnahmen erfolgten an der Arteria auricularis media.

Vor der ersten Immunisierung wurden dem Kaninchen ca. 15ml Blut abgenommen. Das daraus gewonnene Serum wurde als Präimmenserum in 1ml- Aliquots bei -20°C gelagert und als Negativkontrolle verwendet.

Die erste Immunisierung erfolgte mit 500 μ l dialysiertem, denaturierend aufgereinigtem ChIL12p40 aus E.coli in einer Konzentration von 350 μ g/ml, welches in 500 μ l Freunds kompletten Adjuvans emulgiert wurde.

Die Injektion erfolgte i.m. in den Musculus semimembranosus.

Für die Boosterungen nach vier bzw. acht Wochen wurde bei der Dialyse ausgefallenes, partikuläres ChIL-12p40 in 500 μ l Freund's inkomplettem Adjuvans suspendiert und ebenfalls in den Musculus semimembranosus injiziert.

Im Abstand von ca. vier Wochen wurden dem Kaninchen 20-30ml Blut abgenommen. Das Blut wurde rund vier Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend 10 min bei 1000g zentrifugiert und das Serum in ein 15ml Falcon überführt. Das Serum wurde über Nacht bei 4°C gelagert, anschließend erneut zentrifugiert und als α -ChIL-12p40 Serum in 1ml- Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4.10 Dot-Blot

Der Dot-Blot diente zum schnellen Nachweis von ChIL-12p40 aus den Überständen der mit ChIL-12p40pMTV5-Flag transfizierten Schneider SL-3-Zellen.

4.10.1 Material

Nitrozellulosemembran BA83 Porengröße 0,2 μ m¹⁷

5 % Magermilchpulverlösung, siehe 4.36.1.1

PBS-T, siehe 4.11.1

α -ChIL12p40 Serum (Kaninchen), siehe 4.9 1:10000 in PBS-T verdünnen

α -Rabbit-Ig-POD¹⁹ 1:20 000 in PBS-T verdünnen

Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate¹³

Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)¹

4.10.2 Durchführung

Von den zu untersuchenden Überständen wurden je 5 μ l auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht. Nach dem Antrocknen der Proben wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur mit der 5 % Magermilchpulverlösung blockiert. Anschließend wurde die Membran zuerst 15 min., dann fünf mal fünf Minuten in PBS-T gewaschen. Anschließend wurde 1h mit dem α -ChIL12p40 Serum in der oben angegebenen Verdünnung inkubiert. Das überschüssige Antiserum wurde durch Waschen mit PBS-T (1 x 15 min. und 5 x 5 min.) entfernt. Anschließend wurde mit dem sekundären Antikörper (α -Rabbit-Ig-HRP) für 1h inkubiert und wie oben gewaschen. Zuletzt wurde die Membran 5 min. mit Chemolumineszenz-Substrat inkubiert und entwickelt.

4.11 α -Flag-ELISA

4.11.1 Material

Antikörper

α -Flag Antikörper

α -ChIL-12p40-Serum, siehe 4.9

α -ChBAFF-Serum, von Dr. S. Kothlow zur Verfügung gestellt

α -Rabbit-IgG-POD¹⁹

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3)⁹

6,00 g Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)⁹

ad 1000ml Aqua bidest., bei 4°C lagern

PBS-T

1l PBS, siehe 4.2.1

0,5ml Tween 20²

2% BSA Lösung

2 g BSA (Bovines Serum Albumin)²

ad 100ml PBS-T, vor Gebrauch herstellen

Dilution-Buffer (1% BSA- Lösung)

1 g BSA²

ad 100ml PBS-T, vor Gebrauch herstellen

TMB-Puffer

8,2 g Na-Acetat (CH_3COONa)⁹

3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)⁹

ad 1000ml Aqua bidest., bei 4°C lagern

TMB-Stammlösung

6mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)¹⁹

ad 1ml DMSO (Dimethylsulfoxid)²

TMB-Gebrauchslösung

10ml TMB-Puffer 37°C

332 μ l TMB Stammlösung

3,0 μ l 30% H_2O_2 ²

kurz vor Gebrauch ansetzen, sofort verwenden.

4.11.2 Durchführung

Eine Nunc 96-Loch MaxiSorp Platte wurde über Nacht mit $1\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Flag-Antikörper beschichtet ($100\mu\text{l}$ pro Kavität) Am nächsten Tag wurde die Platte mit Hilfe des ELISA-Washers gewaschen und mit $100\mu\text{l}$ pro Kavität 5% Magermilchpulver in PBS-T, siehe 4.36.1.1 1 Stunde bei 37°C blockiert. Nach erneutem Waschen wurden je $100\mu\text{l}$ /Kavität der zu testenden Überstände auf die Platte gegeben und erneut 1h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift.

Zur Detektion wurde im nächsten Schritt je nach Überstand mit α -ChIL-12p40-Serum oder α -ChBAFF-Serum, (1:500 in PBS-T, siehe 4.11.1 verdünnt) eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit dem sekundären Antikörper, dem α -Rabbit-IgG-POD (1:1000 in PBS-T) erneut für 1h bei 37°C inkubiert. Der ELISA wurde wiederum gewaschen und mit $100\mu\text{l}$ /Kavität TMB Gebrauchslösung ca. 10 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Der dabei entstandene Farbumschlag wurde durch Zugabe von $50\mu\text{l}$ /Kavität 1 M Schwefelsäure abgestoppt und im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

4.12 Präparation peripherer Blutleukozyten(PBL)

4.12.1 Material

Heparinlösung ($500\text{ U}/\text{ml}$)

1ml Heparin-Natrium 20.000^{15}
ad 40ml RPMI³

PBS, s. 4.2.1

Ficoll-Paque-Lösung¹

4.12.2 Durchführung

Die Blutentnahme wurde mit einer mit Heparinlösung vorbereiteten Spritze an der rechtsseitigen V. jugularis durchgeführt. Durch Dichtezentrifugation wurden die Leukozyten isoliert. Dabei wurden 5ml mit Heparin versetztes Vollblut 1:2 mit PBS verdünnt und mit 10ml Ficoll-Paque-Lösung unterschichtet. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) bei 600g wurden die sich in der Interphase befindenden PBL vorsichtig abgesaugt und zweimal mit je 50ml PBS gewaschen.

4.13 Gewinnung von Leukozyten aus Organen

4.13.1 Material

PBS, s. 4.2.1

Ficoll-Paque-Lösung¹

Standardmedium, s. 4.2.2

Zur Organentnahme wurden die Hühner nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Die Milz liegt dorsal des Muskelmagens und wurde nach Eröffnung des Abdomens steril entnommen. Sie wurde sofort nach Entnahme in 4°C kaltes PBS überführt und auf Eis gestellt. Zur weiteren Präparation wurde die Organkapsel eröffnet und die Milz mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Metallsieb (Maschenweite 0,75 x 0,75 mm) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem 50ml Röhrchen zur Sedimentation von größeren Gewebestücken für ca. 10 min auf Eis gestellt.

Danach wurde der Überstand abgenommen, bei 4°C und 225g für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet in 15ml PBS resuspendiert und mit 15ml einer Ficoll-Paque-Lösung unterschichtet. Nach 12-minütiger Dichtezentrifugation bei RT mit 600g, konnten die an der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette abgenommen und zweimal mit kaltem PBS gewaschen werden. Die Leukozyten wurden in Standard-Medium aufgenommen und auf Eis gestellt. Zur Zelldichtebestimmung wurden die Zellen nach einer Trypanblaufärbung ausgezählt.

4.14 Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung ist eine sogenannte lebend/tot-Färbung und dient zur Unterscheidung lebender und toter Zelle. In einer Kavität einer nicht sterilen 96-Loch Platte wurden je 10 μ l Trypanblau-Lösung² und 10 μ l Zellsuspension gemischt. Mit dieser Mischung wurde eine modifizierte Zählkammer nach Neubauer beschickt. Die Zellen wurden nun unter dem Mikroskop gezählt und beurteilt. Anschließend wurde die Zellzahl auf die gewünschte Dichte eingestellt.

4.15 Herstellung von unstimulierten und stimulierten Makrophagen

4.15.1 Material

Standardmedium, s. 4.2.2

Stimulantien

Rekombinantes IFN- γ , in COS-7 Zellen exprimiert

Lipopolysaccharid (LPS) von E.coli, Serotyp O127, B8

Imiquimod

Bakterielle DNA, präzipitiert

Polyinosinpolycytodysäure (poly(I:C)), ein synthetisches Homolog zu dsRNA

Pam3-Cys-Ser-Lys4 (Pam3Cys), ein synthetisches bakterielles Lipopeptid

4.15.2 Durchführung

Aus Hühnerblut gewonnene PBL wurden in Standardmedium auf eine Zelldichte von $1 \times 10^7/ml$ eingestellt und auf Petrischalen mit 100 mm Durchmesser verteilt. Nach 48 h Kultivierung bei $40^\circ C$ waren adhärent wachsende Makrophagen mikroskopisch zu erkennen. Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Makrophagen in der Petrischale dreimal mit PBS gewaschen, um tote und Suspensionszellen zu entfernen und mit frischem Standardmedium überschichtet.

Für die verschiedenen Stimulationen wurde folgendermaßen vorgegangen, siehe Tabelle 4.1.

Stimulans	Konzentration
INF γ	$1 \mu l$ ChCosINF γ/ml Standardmedium
LPS	$1 \mu g/ml$ Standardmedium
Imiquimod	$1 \mu g/ml$
bakterielle DNA	$0,5 \mu g/ml$
Poly I:C	$5 \mu g/ml$
Pam3Cys	$4 \mu g/ml$

Tabelle 4.1: Verschiedene Stimulantien und ihre Konzentrationen zur Herstellung von stimulierten Makrophagen

Nach Ablauf der Stimulationsdauer von sechs Stunden wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, 10 min. bei 250g zentrifugiert und die getrockneten Pellets entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80^\circ C$ gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

4.16 Bioassay

Um die Wirkung verschiedener Zytokine *in vitro* zu beobachten, wurden primäre Milzleukozyten, wie in 4.13 beschrieben, gewonnen und diese mit verschiedenen Zytokinen stimuliert.

4.16.1 Material

dialysierter induzierter SL-3 Zellkulturüberstand des Klons A (im Folgenden „Klon A“)

dialysierter induzierter SL-3 Zellkulturüberstand von nicht transfizierten Zellen (im Folgenden „nicht transfiziert“)

ConA-Stammlösung, s. 4.2.8

rekombinantes Interleukin 2 (IL-2)

Standardmedium, s. 4.2.2

4.16.2 Durchführung

Die Milzleukozyten wurden wie in Abschnitt 4.13 beschrieben gewonnen, auf $5 \cdot 10^6/ml$ in Standardmedium eingestellt und auf Eis gestellt, während die Stimulantien vorbereitet wurden. In einer sterilen 96-Loch Flachbodenplatte wurden folgende Doppelansätze pipettiert, dabei dienten ConA und IL-2 als Positivkontrollen, siehe Tabelle 4.2:

Stimulans	Konzentration
nicht transfiziert	20% Volumenanteil in Reihe A, dann in Reihe B-H \log_2 in Standardmedium
Klon A	20% Volumenanteil in Reihe A, dann in Reihe B-H \log_2 in Standardmedium verdünnt
Con A	10 $\mu g/ml$ in Reihe A-D
IL-2	1:1000 verdünnt in Reihe E-H
Mediumkontrolle	Reihe A-H

Tabelle 4.2: Stimulantien und Kontrollen für den Bioassay und ihre eingesetzte Konzentration

Pro Kavität ergab sich ein Gesamtvolumen von 200 μl . Dieser Ansatz wurde 72 h bei 40°C bebrütet. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und im NO-Assay (siehe 4.17) ausgewertet, oder falls nicht ausreichend HD-11-Zellen zur Verfügung standen bei -80°C gelagert.

4.17 NO-Assay

HD 11 Zellen reagieren *in vitro* auf die Anwesenheit von IFN γ mit der Produktion von Stickstoff-Monoxid (NO). Dies lässt sich für einen indirekten quantitativen Nachweis von IFN γ ausnutzen.

4.17.1 Material

HD 11 Zellen

HD 11 Medium, s. 4.2.3

Trypanblau²

rekombinantes Hühner-Interferon γ (im Folgenden cosIFN γ) aus prokaryotischem Expressionssystem von Prof. T. Göbel zur Verfügung gestellt, in Aliquots von $1ml$ bei $-20^{\circ}C$ lagern.

1mM Natriumnitrit-Lösung

6,9 mg Natriumnitrit ($NaNO_2$)
ad 100ml Aqua bidest.

Griess Reagenz:

Lösung A

1,0 g Sulfanilamid¹⁹
100ml 2,5% Phosphorsäure (H_3PO_4)
lichtgeschützt bei $4^{\circ}C$ aufbewahren

Lösung B

0,3 g Naphtalenethyldiamin¹⁹
100ml 2,5% Phosphorsäure (H_3PO_4)
lichtgeschützt bei $4^{\circ}C$ aufbewahren

4.17.2 Durchführung

Die HD 11 Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber aus der Kulturflasche abgelöst, 10 min bei $250g$ zentrifugiert und in neuem $37^{\circ}C$ warmem HD 11-Medium aufgenommen. Nach einer Trypanblau-Färbung wurden sie in einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer ausgezählt und auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/ ml eingestellt. Diese Zellen wurden mit je $100\mu l$ pro Kavität in einer sterilen 96-Loch Flachbodenplatte ausgesät.

Anschließend wurden je $100\mu l$ der zu testenden Zellkulturüberstände auf die Platte gegeben und 24h bei $40^{\circ}C$ inkubiert. Als Kontrolle für die Sensitivität der HD 11-Zellen auf IFN γ wurde das cosIFN γ 1:100 in HD 11-Medium verdünnt und eine log_2 Verdünnungsreihe angelegt. Auch davon wurden jeweils $100\mu l$ auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden $50\mu l$ des Überstandes je Kavität auf eine unsterile 96-Loch Flachbodenplatte übertragen. Aus den Lösungen A und B wurde durch Mischen gleicher Volumina das Griess-Reagenz kurz vor Gebrauch hergestellt.

Von dieser wurden in jede Kavität $50\mu l$ gegeben und der Farbumschlag im ELISA-Reader bei $540nm$ mit Hilfe der Software Magellan 2 ausgelesen. Zur Kontrolle der Griess-Reaktion und zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden in Reihe 12 $100\mu l$ RPMI-Medium je Kavität vorgelegt, in Reihe 1 $100\mu l$ des NO-Standards gegeben und eine log_2 -Verdünnung angelegt.

4.18 RNA-Präparation

Alle Arbeiten wurden mit RNase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Wiederverwendbare Geräte und Gegenstände wurden nach Benutzung für mindestens eine Stunde mit 3% H_2O_2 inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gespült oder nach Eintauchen in 96% Ethanol abgeflammt.

4.18.1 Material

Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Lagerung der Reagenzien bei RT.

Trizol® Reagenz⁶, Lagerung: 4°C

Chloroform ad analysis⁹

DEPC-Wasser (1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)¹⁹ ad 1000ml Aqua dest. Inkubation für 1 Stunde bei 37°C, dann autoklavieren);

Isopropanol⁹

Ethanol 70%

70ml Ethanol absolut⁹

30ml DEPC-Wasser

4.18.2 Durchführung

Zur RNA-Isolierung aus primären Zellen wurden die jeweiligen Organe (bzw. je nach Größe nur Teile davon) nach Entnahme sofort in einem Handhomogenisator unter Zugabe von 1- 3ml Trizol homogenisiert und in 1ml Fraktionen in 2ml Eppendorfcups überführt.

Bei Zelllinien wurden 5×10^7 bis 1×10^8 Zellen gewonnen, zentrifugiert (10 min, 225g, 4°C) und das trockene Zellpellet mittels einer Spritze mit aufgesetzter 20 G Kanüle in 1ml Trizol resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200µl Chloroform hinzugefügt, kurz geschüttelt, 2 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4°C und 12.000g zentrifugiert, wodurch die organische von der RNA-haltigen wässrigen Phase getrennt wurde.

Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Probengefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt.

Nach kurzem Schütteln wurde zunächst 10 min bei RT und anschließend 30 min bei -20°C inkubiert. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der RNA. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 4°C, 12.000g) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 4°C mit 7500g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 100µl DEPC-Wasser aufgenommen und nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration (OD260) bei -80°C gelagert oder die RNA sofort zur cDNA-Synthese verwendet.

4.19 cDNA-Synthese, Reverse Transkription

Um einen Einblick zu bekommen, welche Gene aktuell transkribiert werden, wird die gesamte RNA präpariert und dann mit Hilfe der RT-PCR in cDNA umgeschrieben, welche dann als Matritze für die Polymerase Ketten Reaktion dient.

4.19.1 Material

umzuschreibende RNA

Revert AidTMH⁻ First standard cDNA synthesis Kit⁸

4.19.2 Durchführung

Nach Herstellervorschrift. Die transkribierte cDNA wurde nach der Reaktion in 80 μ l Aqua bidest aufgenommen.

4.20 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird durch eine hitzeresistente DNA Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern eine bestimmte cDNA Sequenz amplifiziert. Dabei wird das PCR-Reaktions-Gemisch mit Hilfe eines Thermocyclers auf 96°C für 5 sec. erhitzt, um die cDNA zu denaturieren und anschließend 30 sec. bei der Primer-spezifischen Temperatur inkubiert, damit die Primer an der passenden Sequenz der cDNA binden können. Dann folgt eine 2-minütige Inkubation mit einer Polymerase-spezifischen Temperatur (bei Taq 72°C, bei Herculase DNA Polymerase 68°C), bei der der komplementäre DNA Strang synthetisiert wird. Diese drei Schritte werden 35-mal wiederholt. Am Ende wird die Reaktion noch einmal 10 min. bei der Polymerase-spezifischen Temperatur inkubiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

Die Herculase wurde für PCR mit anschließender Klonierung in Expressionsvektoren verwendet, da diese DNA Polymerase bei der Transkription mit weniger Fehlern arbeitet.

4.20.1 Material

Alle Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt.

Spezifische Primer s.u.

TaqDNA Polymerase⁸

10 x Taq- Puffer mit 15 mM $MgCl_2$ ⁸

Herculase® Enhanced DNA Polymerase²¹

10 x Herculase Puffer²¹

dNTP Set⁸Aqua bidest.¹⁹

Die Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer.

Primer (Orient.)	Sequenz	Funktion	Enzymschnittstelle
17 (s)	TACCACAATG TACCCTGGC	β -Aktin	
18 (as)	CTCGTCTTGT TTTATGCGC	β -Aktin	
24 (as)	TTGCAAGAGC GGCCGCCTAG GCTGCGCTGA TGTCATC	IFN γ	
306 (s)	AAGGATCCCT TGAGAGTGCA GCGGTGCGA	ChIl-12p40 mit MHC-SP	BamHI
463 (as)	GAGAAGATCT GGCATAAGA TGCCATTA	IFN γ	
560 (as)	GAATTCCTGC AAAGCGTGGA CCACTCACTC	ChIl-12p40 full length	EcoRI
561 (s)	GGATCCCAGT GGAAACTTAG AGAGAATGTG	ChIl-12p40 full length	BamHI
564 (as)	GAATTCCTAT CTGCAAAGCG TGGACCACTC	ChIl-12p40 zur Klonierung in pCR3	EcoRI
577 (s)	CTGGAATGCG ATGCCTTTTG T	IL-18	
578 (as)	TCATAGGTTG TGCCTTTCAT TATG	IL-18	
584 (s)	CTGCAGCAGT GGAAACTTAG AGAGAATGTG	ChIl-12p40 zur Klonierung in pCR3	PstI
617 (as)	TTACATCTCT GCAGTGAGGG CACTCAGGTA GCCCAGCATC	IL-12p35	
642 (s)	CTGCCACCTC CTGCCACAAA CC	IL-12p35	
662 (s)	TCGGGCGGTG GTGGATCCGG TGGCGGCGGA TCTCTGCCAC CTCCT	IL-12p35/40 flexi	Bam HI
663 (as)	ACCGGATCCA CCACCGCCCG AGCCACCGCC ACCTCTGCAA AGCGT	IL-12p35/40 flexi	Bam HI
664 (s)	ATGGCTATCA TCTACCTCAT CCTCCTG	ChIl-12p40 mit HA SP	

Tabelle 4.3: Verwendete Primer mit Angabe der Leserichtung, der Sequenz, der Funktion und der Enzymschnittstellen

4.20.2 Durchführung

Zur Durchführung der PCR wurde nach folgendem Rezept ein Mastermix angefertigt:

2,8 μ l Wasser

1,5 μ l 10 x Puffer

1,5 μ l dNTP Set 20 mM , Endkonzentration: 2 mM

3,0 μ l Primer sense (s), Endkonzentration: 20 mM

3,0 μ l Primer antisense (as), Endkonzentration: 20 mM

0,2 μ l DNA Polymerase, Endkonzentration: 1 Unit

Dieses Rezept wurde mit der Anzahl der Ansätze plus 2 (Negativkontrolle und Reserve) multipliziert. Jeweils 12 μ l des Mastermixes wurden mit 3 μ l der gewünschten cDNA als Ansatz oder mit 3 μ l Wasser als Negativkontrolle verwendet. Bei der Verwendung eines Plasmids als Matrize wurde dieses zuvor 1:1000 in Wasser verdünnt. Die verschiedenen Ansätze wurden im Thermocycler auf die oben beschriebenen Temperaturen automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

4.21 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Größenanalyse von DNA-Stücken. Dafür sind relativ große Mengen DNA notwendig, wie sie zum Beispiel bei einer PCR oder einem Restriktionsverdau entstehen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung werden die Stücke der Länge nach aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenzgröße dient ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

4.21.1 Material

EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

186,1 g EDTA Di-Natrium Dihydrat ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)¹⁹

20,0 g Natriumhydroxid ($NaOH$)⁹, ad 700ml Aqua dest. , pH 8,0 mit NaOH einstellen, bei RT lagern.

0,5 x TBE- Puffer

54,0 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

27,5 g Borsäure⁹

20,0ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0), ad 10 l Aqua dest. , bei RT lagern.

1 % Agarose

0,5 g Agarose²

50ml 0,5 x TBE Puffer, vor Gebrauch ansetzen.

6 x Loading Dye Solution (Ladepuffer)⁸

GeneRuler™100bp DNA Ladder plus⁸

Ethidiumbromid Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid¹⁹, ad 1ml Aqua dest., bei 4°C aufbewahren, zum Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua dest. verdünnt.

4.21.2 Durchführung

Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde die 1% Agarose verflüssigt und anschließend in eine Elektrophoresekammer mit Probentaschenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 0,5 x TBE- Puffer überschichtet. 5 μ l des PCR-Reaktions-Gemisches bzw 10 μ l des Restriktionsverdau wurden mit 1 μ l bzw. 2 μ l 6x-Loading Dye Solution (mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylen Cyanol FF) in einer Mikrotiterplatte vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe konnte während der elektrophoretischen Auftrennung die zurückgelegte Laufstrecke des Gemisches überprüft werden. Es wurde solange eine konstante Spannung von 120 V angelegt, bis die Proben ausreichend weit im Gel gewandert waren. Das Gel wurde anschließend in der Ethidiumbromid-Gebrauchslösung 30 min. unter Schwenken gefärbt. Die aufgetrennte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

4.22 PCR-Produkt Aufreinigung

4.22.1 Material

QIAquick Gel Extraction Kit¹⁴

4.22.2 Durchführung

Der gesamte Ansatz einer PCR (15 μ l) wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht, wie oben beschrieben. Mit Hilfe eines Skalpell wurde das Fragment der gewünschten Länge aus dem Gel herausgeschnitten, die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Das aufgereinigte PCR-Produkt konnte zur TA-Klonierung verwendet werden.

4.23 Linking-PCR

Um zwei Genstücke, die getrennt voneinander mit den jeweils spezifischen Primern amplifiziert wurden, aneinander zu setzen, wurde die Linking-PCR verwendet. Die Primer für die Amplifikation der einzelnen Genstücke wiesen jeweils einen komplementären Überhang auf, der für das sogenannte „Flexi“-Zwischenstück codieren. Durch dieses Zwischenstück können sich nach der Expression die Proteinketten der beiden Gene aneinander lagern.

4.23.1 Material

Alle Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt.

Spezifische Primer, s. Tabelle 4.3

Herculase® Enhanced DNA Polymerase²¹

10 x Herculase Puffer²¹

dNTP Set⁸

Aqua bidest.¹⁹

4.23.2 Durchführung

Die im ersten Schritt mittels PCR amplifizierten Genstücke wurden per Agarosegel-Elektrophorese analysiert, s. 4.21 und die Bande mit der richtigen Größe aus dem Gel ausgeschnitten und gemeinsam aufgereinigt, s. 4.22. Diese ausgeschnittenen PCR-Produkte dienten als Matrize für die Linking-PCR. Diese wurde wie die o.g. PCR durchgeführt, allerdings wurden 5,8µl der aufgereinigten PCR-Produkte als Matrize verwendet, dafür kein Aqua bidest. Als Primer wurden die jeweils äußeren Primer des erwünschten Gesamtproduktes benutzt. Durch die komplementären Überhänge der mittleren Primer lagerten sich die beiden Genstücke der Matrize aneinander, so dass die beiden Teile uns das Verbindungsstück zusammenhängend abgeschrieben werden konnten. Die Annealing-Zeit wurde auf 3 min pro Zyklus erhöht, um die Synthese des langen Produktes zu garantieren.

4.24 TA-Klonierung und Plasmidaufreinigung

4.24.1 Material

Vektoren

pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit⁶

pcDNA6⁶

pCRT7/NT TOPO® TA Expression Kit⁶

pMTV5

pCR3

DES®TOPO® TA Expression Kit pMT/V5-His TOPO®Vektor⁶

Chemokompetente TOP 10 E-coli⁶

SOC Broth Medium⁶

LB-Agar, 40 g LB Agar Pulver², ad 1000ml Aqua dest., auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern.

LB-Medium, 25 g LB Medium Pulver², ad 1000ml Aqua dest., auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern.

Ampicillin 50 mg/ml, 500 mg Ampicillin¹⁹, ad 10ml Aqua bidest., in Aliquots von 500µl bei -20°C lagern.

NucleoSpin®Plasmid Kit⁷

4.24.2 Durchführung

Um bestimmte Gene, die durch PCR vervielfältigt wurden zu exprimieren bzw. zu sequenzieren, wurden diese mit Hilfe des jeweiligen Expressions-Kits nach Anleitung des Herstellers in einen Vektor kloniert. Die A-Überhänge am 3' Ende des PCR-Produkts, wie sie durch die DNA Polymerase entstehen, wurden durch eine Topoisomerase mit den T-Überhängen des Vektors verbunden, es entsteht ein Plasmid.

Anschließend erfolgte eine Transformation des Plasmids in chemokompetente TOP 10 E-coli und Ausplattierung dieser auf LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotikum. Die Platte wurde 24 h bei 37°C bebrütet und die entstandenen Kolonien mittels PCR getestet.

In 5ml LB Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden die positiven Kolonien über Nacht vermehrt, das Plasmid mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Das Plasmid wurde zur Sequenzanalyse, zum Restriktionsenzymverdau und als Matrize für PCR weiterverwendet.

4.25 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt. Die gewünschten Plasmide wurden in einer Konzentration von 200 ng/µl dorthin geschickt; wenige Tage später waren die Sequenzdaten über das Internet unter www.my-gatc.de abzurufen.

4.26 Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung

Restriktionsenzyme sind rekombinant hergestellte Endonukleasen, die nach Erkennen bestimmter Nukleotidsequenzen (sog. Palindrome) den DNA Strang an diesen Stellen spezifisch schneiden. Werden verschiedene Plasmide mit dem selben Restriktionsenzym geschnitten, können die einzelnen Fragmente in unterschiedlicher Kombination an der Schnittstelle wieder miteinander verbunden (ligiert) werden.

4.26.1 Material

Restriktionsenzym⁸
10 x Puffer (enzymspezifisch)⁸
Aqua bidest.¹⁹

4.26.2 Durchführung

In einem 1,5 ML Eppendorff- Cup wird folgender Ansatz zusammenpipetiert:

- 1,0 μ l Plasmid
- 1,0 μ l 10 x Puffer (enzymspezifisch)
- 0,5 μ l Restriktionsenzym
- 7,5 μ l Aqua bidest.

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, auf Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Aufreinigung entspricht der PCR-Produkt Aufreinigung.

4.27 Ligation

4.27.1 Vorbereitung

Die an der Ligation beteiligten Plasmide lagen bereits vor, das gewünschte Insert wurde mit Hilfe der Enzyme Pst I und Eco RI aus dem subklonierten Plasmid ChIL-12p40 mit MHC-SP in pcDNA3.1 ausgeschnitten. Der Vektor pCR3-HASP-Flag wurde ebenfalls mit Pst I und Eco RI geschnitten. Die Verdauungen wurden jeweils auf 1% Agarosegel analysiert, die gewünschten Fragmente ausgeschnitten und mit dem Quick LigationTM Kit ligiert.

4.27.2 Durchführung

Die Ligation von BamHI/HindIII geschnittenem Vektor und Insert erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde anschließend, wie beschrieben, in chemokompetente E-coli transformiert, diese mit PCR getestet, vermehrt und das Plasmid aufgereinigt.

4.28 Verwendete Konstrukte

Siehe Tabelle 4.4.

Bezeichnung	Vektor	Expressionssystem
ChIL-12p40pcDNA3.1	pcDNA3.1	eukaryotische Expression ohne Epitop
ChIL-12p40pcDNA6-Flag	pcDNA6	eukaryotische Expression mit N-terminalem Flag-Epitop
ChIL-12p40pCRT7-His	pCRT7	prokaryotische Expression mit N-terminalem His-Epitop
ChIL-12p40pMTV5-Flag	pMTV5	Insektenzell-Expression mit N-terminalem Flag-Epitop
ChIL-12p40pCR3-HASP-Flag	pCR3	eukaryotische Expression mit N-terminalem Flag-Epitop
FlagIL-12pcDNA3.1	pcDNA3.1	eukaryotische Expression mit N-terminalem Flag-Epitop
ChBAFFpCRT7-Flag	pCRT7	prokaryotische Expression mit N-terminalem His-Epitop
ChBAFFpcDNA6-Flag	pcDNA6	eukaryotische Expression mit N-terminalem Flag-Epitop

Tabelle 4.4: Konstrukte, die zur Transfektion von pro- bzw. eukaryotischen Zellen verwendet wurden, mit Angabe des verwendeten Vektors, der Expressionssystems und des Epitops

4.29 Prokaryotische Expression

4.29.1 Material

LB-Medium, s. 4.24.1

1M IPTG, 2,38 g Isopropylthiogalactose (IPTG)², ad 10ml Aqua bidest. , in 1ml Aliquots bei -20°C lagern

Ampicillin, s.4.24.1

BL21 (DE3)E.coli⁶

SOC-Broth⁶

4.29.2 Durchführung

Die Konzentration des gewünschten Konstrukts wurde photometrisch bestimmt. Der Bakterienstock wurde auf Eis aufgetaut und 5-10ng des Plasmides dazu pipettiert. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 sec im 42°C warmen Wasserbad erwärmt und sofort wieder auf Eis gestellt. 250µl auf RT erwärmtes SOC-Broth wurden zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C geschüttelt. Der Bakterienansatz wurde in 20ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und ca. 18 Stunden bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in 1l auf 37°C erwärmtes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und weiter unter Schütteln bei 37°C kultiviert.

Die Dichte der Bakterienkultur wurde durch photometrische Messung der OD 600 bestimmt. Nach Erreichen einer OD 600 von 0,5-0,6 wurde die Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Nach weiteren 4 Stunden unter den o.g. Bedingungen wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet. Bakterienpellets von je 100ml Kultur wurden bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert.

4.30 Denaturierende Aufreinigung

4.30.1 Material

Ni-NTA- Spin Collum Kit

Puffer B

13,8g NaH_2PO_4

1,2g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

480,5g Harnstoff (NH_2CONH_2), ad 1l Aqua dest., pH 8,0 mit $NaOH$ einstellen.

Puffer C

13,8g NaH_2PO_4

1,2g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

480,5g Harnstoff (NH_2CONH_2), ad 1l Aqua dest., pH 6,3 mit HCl einstellen

Puffer E

13,8g NaH_2PO_4

1,2g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

480,5g Harnstoff (NH_2CONH_2), ad 1l Aqua dest., pH 4,5 mit *HCL* einstellen

4.30.2 Durchführung

Nach Herstellervorschrift. Die gewonnenen Eluate wurden mittels SDS-Acylamid-Gelelektrophorese analysiert.

4.31 p40 Aufreinigung aus SL-3 Überstand

4.31.1 Material

Anti-Flag® M2 Affinity Gel Freezer-Safe¹⁹

TBS

6,05g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

8,76g $NaCl^2$, ad 1l Aqua bidest, pH 7,4 mit *HCl* einstellen.

Elutionspuffer, 2,1g Zitronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), ad 100ml Aqua bidest., pH 3,0 mit NaOH einstellen

2M Tris-Cl, pH 9,0, 4,2g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹, ad 100ml Aqua bidest, pH 9,0 mit *HCl* einstellen.

10% Natriumazid, 10g Natriumazid (NaN_3)⁹, ad 100ml PBS

Aufbewahrungslösung

5ml Glycerol²

5ml TBS

40µl 10% Natriumazid⁹, s.4.33.1

pH-Papier⁷

4.31.2 Durchführung

Vor dem ersten Gebrauch des Anti-Flag® M2 Affinity Gels musste die Matrix zuerst von zu lockeren α -Flag-Antikörpern befreit werden. Dazu wurden 200µl der Beads zunächst zweimal in einem 15ml Falcon in TBS gewaschen und jeweils 5 min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgenommen. Anschließend wurde die Matrix zweimal in 15ml des Elutionspuffers suspendiert, zentrifugiert und der Überstand wie zuvor abgenommen.

Daraufhin wurde erneut zweimal mit TBS gewaschen und somit das Gel re-äquilibriert. Die so behandelte Matrix stand nun für die Aufreinigung zur Verfügung. 100ml des gesammelten induzierten Zellkulturüberstandes wurden über Nacht bei 4°C mit der Matrix rotiert. Die Kügelchen wurden

dann zusammen mit dem Überstand auf eine kleine Kunststoff-Säule gegeben und mit ca. 120ml Waschpuffer gewaschen.

Im Photometer wurde der Proteingehalt des durchgeflossenen Waschpuffers kontrolliert. Sobald der Proteingehalt nicht mehr messbar war, wurde insgesamt 6 mal mit 1ml Elutionspuffer in ein Eppendorfcup eluiert, in welchem 150µl der 2M Tris-Cl, pH 9,0 vorgelegt waren.

Die Säule wurde anschließend sofort wieder mit Waschpuffer neutralisiert, dann unter Aufbewahrungslösung bei 4°C gelagert. Die pH-Werte der Eluate wurden mit pH-Papier überprüft und gegebenenfalls mit der 2M Tris-Cl pH 9,0 neutralisiert. Die Lagerung der Eluate bis zur Dialyse erfolgte bei 4°C.

4.32 Dialyse

Zur Verwendung in der Zellkultur oder zur Immunisierung muss Protein umgepuffert werden, da die Elutionspuffer Zellen zerstören oder heftige Entzündungen nach Immunisierungen auslösen können.

4.32.1 Material

PBS, s.4.2.1

Dialyseschlauch VISKING, 14 kDa cut off¹⁹

Dialyserahmen Slide-A-Lyzer CassetteTM, 10 kDa cut off¹³

4.32.2 Durchführung

Die zu dialysierenden Eluate wurden in einen Dialyseschlauch bzw.-rahmen mit einer geeigneten Porengröße gegeben. Diese wiederum wurden in 5l PBS über Nacht bei 4°C langsam gerührt. Die Eluate wurden vorsichtig entnommen und der Proteingehalt photometrisch bestimmt.

4.33 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient dazu, um das gewünschte Protein aus Zellkulturüberstand herauszureinigen und in möglichst hoher Konzentration vorliegen zu haben.

4.33.1 Material

Anti-FLAG M2® Agarose Affinity Gel¹⁹

0,5 M Trislösung pH 7,4

6,05 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

ad 60ml Aqua bidest., pH 7,4 mit HCl einstellen, auf 100ml mit Aqua bidest. auffüllen, bei RT lagern.

10 % Natriumazid

10 g Natriumazid (NaN_3)⁹
ad 100ml PBS, bei RT lagern.

2 x Lysestammlösung

10ml 0,5 M Trislösung pH 7,4
3ml 5 M NaCl-Lösung
1ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)^{4.21.1}
1ml 10% Natriumazid
ad 50ml Aqua bidest., bei 4°C aufbewahren.

10 % Triton-X-100

5 g Triton-X-100¹⁹
ad 50ml Aqua bidest., bei 4°C lagern.

Waschpuffer

500µl 2x Lysestammlösung
100µl 10 % Triton-X-100
400µl Aqua bidest.
kurz vor Gebrauch ansetzen.

6 x Probenpuffer

7ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 6,84.^{34.1}
3ml Glycerol²
1 g SDS³
1,2 mg Bromphenolblau¹⁹
ad 10ml Aqua bidest., in 1ml Aliquots bei -20°C lagern.

1x SDS Probenpuffer

100µl 6 x Probenpuffer
500µl Aqua bidest.
bei -20°C aufbewahren.

4.33.2 Durchführung

35ml des induzierten Zellkulturüberstandes wurden in einem 50ml Falcon mit 100µl des Anti-FLAG M2® Agarose Affinity Gels über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurde der Falcon bei 20.000g kurz zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Anti-FLAG M2® Agarose Affinity Gel wurde in 1ml Waschpuffer aufgenommen und in ein 1,5ml Eppendorf-Cup überführt. Nach kurzer Zentrifugation bei 11.000g wurde der Überstand

4.34. SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) 51

wiederum abgenommen. Dieser Waschschrift wurde noch zwei mal wiederholt.

Danach wurde das Anti-FLAG M2® Agarose Affinity Gel in 100µl 1x SDS-Puffer aufgenommen und für 5 min auf 99°C erhitzt, um das gebundene Protein wieder von der Agarose zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

4.34 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

4.34.1 Material

10x Elektrophorese-Puffer

30,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

144 g Glycin²

10 g SDS⁴

ad 1000ml Aqua dest., pH auf 8,3 einstellen, bei 4°C aufbewahren.

Die Stammlösung wird zur Elektrophorese 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Ammoniumpersulfatlösung (APS) 10%ig

0,1 g Ammoniumpersulfat⁴

ad 1ml Aqua bidest, bei -20°C aufbewahren.

4xTris-Cl Puffer pH 8,8

91 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

2 g SDS (Sodiumdodecylsulfat)⁴

ad 500ml Aqua dest, mit 1M HCl auf pH 8,8 einstellen(1M HCl)

4x Tris-Cl Puffer pH 6,8

12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

0,8 g SDS (Sodiumdodecylsulfat)⁴

ad 200ml Aqua dest, mit 1M HCl auf pH 6,8 einstellen(1M HCl)

3%iges Sammelgel

6,1ml Aqua bidest.

2,5ml 4 x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8

1,3ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid-Lösung⁴

50µl 10 % APS

10µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)²

in der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort gießen.

10%iges Trenngel

4,2ml Aqua bidest.

2,5ml 4 x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

3,3ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid-Lösung⁴

50µl 10 % APS

15µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)²

in der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort gießen.

Isobutanol⁹

β-Mercaptoethanol⁴

Für Coomassie-gefärbte Gele:

Protein Ladder, 10-200kDa⁸

Für Westernblots:

Prestained Protein Ladder, 10-180kDa⁸

ECL Protein M.W. Marker¹

NEB Marker¹¹

4.34.2 Durchführung

Das 10%ige Trenngel wurde in eine BioRad mini Protean II Gießkammer eingefüllt und mit 200µl Isobutanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min bei RT wurde das Isobutanol durch Auswaschen mit Aqua dest. entfernt, das 3%ige Sammelgel eingefüllt und ein 10er Probenstichkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1 x Elektrophoresepuffer überschichtet.

Es wurden in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und der Fraktionierung 2 - 20µl der Proteinproben mit entsprechender Menge an 6x SDS-Puffer (Endkonzentration 1x) und gegebenenfalls (für reduzierende Bedingungen) mit 2 % β-Mercaptoethanol versetzt und 5 min. bei 95°C gekocht. Die Proben wurden in die Geltaschen eingefüllt. Als Marker wurden die Prestained Protein Ladder und der biotinylierte ECL Protein M.W. bzw. der NEB Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Anschließend wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proben entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder durch Blotten auf Nitrozellulose überführt.

4.35 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung können Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid Gelen sichtbar gemacht werden.

4.35.1 Material

Coomassie-Färbelösung

450ml Ethanol⁹

100ml Essigsäure 96%⁹

2,5 g Coomassie-Brilliant-Blau R-250¹⁸

ad 1000ml Aqua bidest.. Die Färbelösung ist wiederverwendbar.

Entfärbelösung

250ml Ethanol⁹

100ml Essigsäure 96%⁹

ad 1000ml Aqua bidest.. Die Entfärbelösung wurde nach Gebrauch zur Wiederverwendung mit Aktivkohle entfärbt.

4.35.2 Durchführung

Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophoresekammer wurde es für 15 min in Coomassie-Färbelösung eingelegt. Anschließend wurde die Färbelösung gegen Entfärbelösung ausgetauscht. Diese wurde nach 10 min nochmals gewechselt und das Gel über Nacht entfärbt.

4.36 Westernblot

Der Westernblot dient zur Verifikation, daß ein mittels SDS-Page detektiertes Protein nicht nur das richtige Molekulargewicht aufweist, sondern dass es sich tatsächlich um das gesuchte Protein handelt. Dabei wird geprüft, ob ein für das gesuchte Protein spezifischer Antikörper in der Lage ist, an das Protein auf dem Gel zu binden. Dazu müssen die Proteine aus dem SDS-Elektrophoresegel auf eine Nitrozellulose- Membran transferiert werden. Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte im Semi-dry-Elektroblotter.

4.36.1 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose

4.36.1.1 Material

Anodenpuffer I, 300 mM, pH 10,4

36,33 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

200ml Methanol⁹

ad 1000ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Anodenpuffer II, 25 mM, pH 10,4

3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

200ml Methanol⁹ ad 1000ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Kathodenpuffer, pH 9,4

3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan⁹

200ml Methanol⁹

5,25 g ϵ -Aminocaprinsäure¹⁹

ad 1000ml Aqua bidest., bei RT lagern.

5 % Magermilchpulverlösung

5 g Blotting Grade Blocker non-fat dry milk⁴

ad 100ml PBS-T, s. 4.11.1, vor Gebrauch herstellen.

Nitrozellulosemembran BA83 Porengröße 0,2 μm ¹⁷

Filterpapier Nr. 3²²

4.36.1.2 Durchführung

Der Blot zwischen den Plattenelektroden wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf die mit Aqua bidest. benetzte Platte wurden 4 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier gelegt, es folgten 2 Lagen in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier, die durch Aqua bidest. befeuchtete Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und 4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier; alles auf die Größe des Gels (7x8,5 cm) zugeschnitten. Die obere Elektrodenplatte wurde aufgesetzt und 75 min. lang eine konstante Stromstärke von 0,8 mA/cm² Nitrozellulose (45 mA/Gel) angelegt. Nach Beendigung des Blotens wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulverlösung blockiert.

4.36.2 Detektion der Proteine

Die Proteine wurden entweder direkt über ihr Flag-Epitop mit einem α -Flag-POD Antikörper detektiert oder über den Umweg eines polyklonalen Antiserums (Kaninchen) und eines sekundären α -Kaninchen-POD Antikörpers. Die an den Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP oder POD) bewirkt nach Zugabe eines Chemolumineszenz-Substrates die Oxidation von Luminol, wodurch Lichtsignale entstehen, welche dann mit Hilfe eines Röntgenfilmes ausgewertet werden können. Der Weg über den zweiten Antikörper führt zu einem zusätzlichen Verstärkungseffekt.

4.36.2.1 Material

PBS-T, s. 4.11.1

Antikörper

α -ChIL12p40 Serum (Kaninchen), s. 4.91:10000 in PBS-T verdünnen

α -Rabbit-Ig-POD¹⁹ 1:20 000 in PBS-T verdünnen

SA-HRP²⁰ 1:10.000 in PBS-T verdünnen

Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody-POD Conjugate¹⁹ 1:10 000 in PBS-T verdünnen

Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate¹³

Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)¹

Die in Magermilch blockierte Membran wurde zuerst 15 min, dann fünf mal fünf Minuten in PBS-T gewaschen. Anschließend wurde 1 h mit dem primären Antikörper in der oben angegebenen Verdünnung inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen mit PBS-T (1 x 15 min. und 5 x 5 min.) entfernt. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (α -Rabbit-Ig-HRP) für 1 h inkubiert und wie oben gewaschen. Bei direkt an HRP-gekoppelten primären Antikörpern ist ein sekundärer Antikörper nicht notwendig. Zuletzt wurde die Membran 5 min. mit Chemolumineszenz-Substrat inkubiert und entwickelt.

Kapitel 5

Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit lagen drei ChIL-12p40-Konstrukte vor. Zum einen ChIL-12p40 im Vektor pCRT7 zur prokaryotischen Expression mit einem N-terminalen 6x-His-Epitop, im Vektor pcDNA3.1 zur eukaryotischen Expression ohne Epitop und im Vektor pcDNA6 zur eukaryotischen Expression mit N-terminalem Flag-Epitop. Um die Funktion von ChIL-12 genauer zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit ChIL-12p40 und ChIL-12p35 rekombinant hergestellt und funktionell charakterisiert werden.

5.1 Analyse der Sequenz des ChIL-12p40

Um einen Überblick über die Struktur des Gens und des von ihm codierten Proteins zu bekommen, wurde es zunächst mit Hilfe der EST-Datenbanken analysiert und mit den für IL-12p40 kodierenden Sequenzen anderer Spezies verglichen. Nachdem später das gesamte Hühnergenom sequenziert wurde, konnte das Gen auch im Genom lokalisiert werden.

Das ChIL-12p40 Gen liegt auf Chromosom 13 des Hühnergenoms, ein Bereich, dem bisher keine synthenische Region zugeordnet werden konnte. Es weist eine aus fünf Exons und vier Introns bestehende Struktur auf, (Abb. 5.1). Die einzelnen Exons haben Längen von 358bp, 118bp, 194bp, 146bp und 117bp. Die Länge der Introns beträgt 955bp, 1006bp, 732bp und 1272bp. Das heißt, die Länge der genomische Sequenz von ChIL-12p40 beträgt 4898bp. Dagegen ist die genomische Sequenz für IL-12p40 beim Menschen mit etwa 20 000kb viel länger [57]. Das IL-12p40 Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 5q31-q33.

Die kodierende Region des ChIL-12p40 hat eine Länge von 945bp. Am Anfang der Sequenz für ChIL-12p40 wird ein 21 Aminosäuren langes Signalpeptid codiert. Das reife ChIL-12p40 besteht aus 294 Aminosäuren. Sein berechnetes Molekulargewicht beträgt 33878 Da und der isoelektrische Punkt liegt bei pH 7,59. Acht der neun Cysteine finden sind auch beim Säuger (Abb. 5.2).

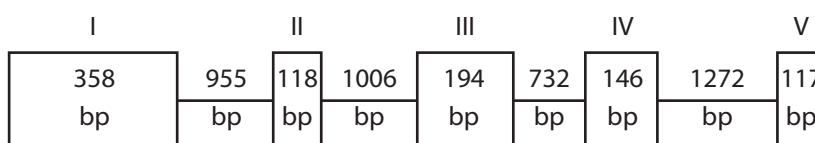


Abbildung 5.1: Genomische Organisation des ChIL-12p40 auf Chromosom 13. Exons sind durch Kästen, Introns durch Linien dargestellt.

	Mensch	Maus	Rind	Schaf	Schwein	Pferd	Hund	Katze
Huhn	42,2	39,7	41,0	41,9	41,9	42,5	41,0	43,5

Tabelle 5.1: Identische Aminosäure in % zwischen ChIL-12p40 und IL-12p40 verschiedener Säuger

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des ChIL-12p40 mit den Sequenzen für IL-12p40 verschiedener Säuger, zeigt sich die engste Verwandtschaft zur Katze, die allerdings lediglich 43,5% beträgt (Tab. 5.1).

Wenn man dagegen im Vergleich den Prozentsatz der identischen Aminosäuren der Säuger untereinander betrachtet, zeigt sich, dass dort eine viel engere Verwandtschaft vorliegt. So findet man die geringste Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen Schwein und Maus mit 84,8% und die höchste zwischen Rind und Schaf mit 96,3%.

5.2 Expression von ChIL-12p40 im prokaryotischen System

Das zur Expression im bakteriellen System benötigte Konstrukt ChIL-12p40 im Vektor pCRT7, im Folgenden ChIL-12p40pCRT7-His, war vor Beginn dieser Arbeit von N. Ortiz-Brüchle bereits hergestellt worden. Der pCRT7-Vektor beginnt mit einem T7-Promotor, gefolgt von einem 6x-His-Epitop zur Aufreinigung des Proteins über Nickelagarose und dem XpressTM-Epitop, einem weiteren Detektionsepitop. Die Klonierungsstelle ist an beiden Seiten mit einem T-Überhang versehen, in welchen das mit A-Überhängen versehene PCR-Produkt problemlos kloniert werden kann. Es folgt die T7-Stopp-Region. Sie sorgt dafür, dass die Transkription an dieser Stelle beendet wird (Abb. 5.3).

Um rekombinantes IL-12p40 mit dem 6x-His-Epitop prokaryotischen Ursprungs herzustellen, wurden *E. coli* (BL21 DE3) mit dem vorliegende Plasmid ChIL-12p40pCRT7-His transformiert.

Die Expression von rekombinanten Proteinen in prokaryotischen Systemen hat den Vorteil, dass relativ große Proteinmengen in kurzer Zeit hergestellt werden können. Allerdings muss das gewünschte Protein dann aus dem bakteriellen Gesamtprotein aufgereinigt werden. Zu diesem Zweck wird

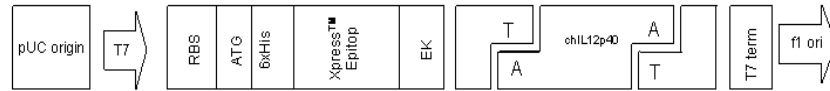


Abbildung 5.3: Struktur des zur Transformation verwendeten Plasmides. Das zuvor mittels PCR amplifizierte und mit einem A-Überhang versehene ChIL-12p40-Gen wurde in den pCRT7-Vektor kloniert.

den die nicht gebundenen Bestandteile entfernt und das gewünschte Protein kann mittels pH-Wert-Absenkung eluiert werden.

Nach der Wachstumsphase wurde das erzeugte IL-12p40 unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt, was sich als sehr effizient herausstellte. Bei der Analyse der Eluate zeigte sich eine deutliche, saubere Bande bei 40 kDa im Coomassie-gefärbten SDS- Acrylamid Elektrophoresegele (Abb. 5.4).

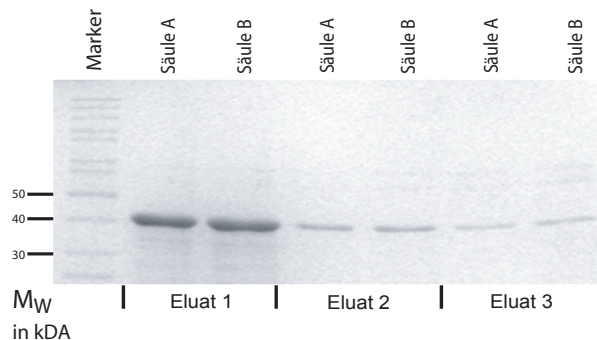


Abbildung 5.4: Ein Bakterienpellet von 100 ml induzierter Kultur wurde lysiert und über zwei Säulen aufgereinigt. Die Abbildung zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gele auf welchem die Eluate beider Säulen analysiert wurden. Bei 40 kDa ist jeweils eine deutliche Bande zu sehen, das Gele zeigt außerdem, dass nur geringe Verunreinigungen im Eluat enthalten sind.

Um die biologische Wirksamkeit des Zytokins studieren zu können, sollte eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen durchgeführt werden. Trotz Verwendung verschiedener Protokolle war es nicht möglich, eine nachweisbare Menge aufgereinigten ChIL-12p40s zu isolieren. Es waren zwar im Bakterienlysat die entsprechenden Banden noch vorhanden, allerdings erwies sich die Aufreinigung als sehr ineffizient. In den Eluaten war kaum eine Bande zu sehen. Bei der anschließend durchgeführten Dialyse kam es zu weiteren Verlusten, so dass in der umgepufferten Probe kein Protein mehr nachweisbar war (Abb. 5.5). Das als Kontrolle verwendete ChBAFF in PCRT7 lies sich problemlos auch unter nativen Bedingungen aufreinigen.

5.3. HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS GEGEN

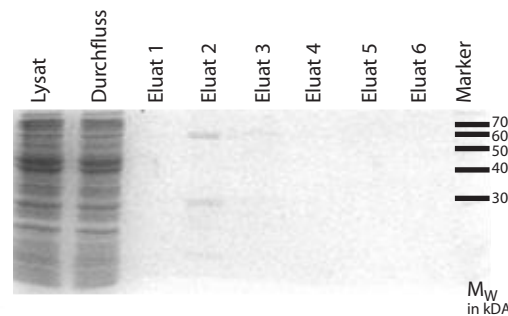


Abbildung 5.5: Aufreinigung von ChIL-12p40 unter nativen Bedingungen: Sowohl im Lysat als auch in Durchfluss sind Banden im Bereich von 40 kDa zu sehen, die als IL-12p40 interpretiert wurden. Im Eluat 2 sind noch geringe Verunreinigungen zu sehen, aber keine ChIL-12p40 Bande.

5.3 Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums gegen ChIL-12p40

Mit dem nun zur Verfügung stehenden, unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Protein konnte ein polyklonales Antiserum hergestellt werden. Um ein gutes Reagenz zur Detektion von ChIL-12p40 zu erhalten, wurde ein Kaninchen mit denaturierend aufgereinigtem rekombinantem ChIL-12p40 immunisiert.

Zur Immunisierung wurde aus ChIL-12p40 und Freundschem kompletten Adjuvans eine Emulsion hergestellt und diese dem Kaninchen i.m. injiziert. Im Abstand von vier Wochen folgten zwei weitere Injektionen mit ChIL-12p40 in Freundschem inkompletten Adjuvans, als Boost. Die Spezifität und die Sensitivität des Immunsersums wurden im Westernblot getestet.

Zunächst wurde zur Kontrolle der Spezifität ein Westernblot angefertigt, bei welchem auf das Gel aufgereinigtes ChIL-12p40 aus prokaryotischer Expression unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen wurde. Eine Laufspur wurde mit vor der Immunisierung gewonnenem Präimmunsersum gefärbt, die andere mit Immunsersum. Zur Detektion wurde ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziege- α -Kaninchen Antikörper eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Immunsersum spezifisch ChIL-12p40 erkennt, im Gegensatz zum Präimmunsersum (Abb. 5.6).

Zur genaueren Charakterisierung des polyklonalen Antiserums wurde auf einem SDS-Elektrophorese-Gel aufgereinigtes ChIL-12p40 aus prokaryotischer Produktion unter reduzierenden Bedingungen in abnehmenden Konzentrationen aufgetragen und im Westernblot analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit dem polyklonalen Antiserum ChIL-12p40 bis zur Menge von etwa 7,5ng im Westernblot detektiert werden kann (Abb. 5.7).

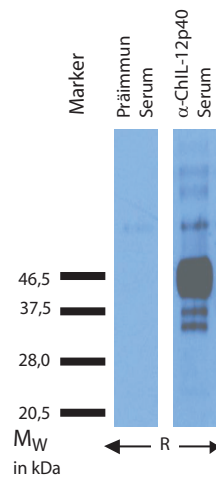


Abbildung 5.6: Vergleichender Westernblot Präimmunsereum/Immunsereum. Auf der mit Präimmunsereum gefärbten Laufspur zeigt sich keinerlei Bande. Hingegen ist eine deutliche Bande bei ca. 40 kDa auf der mit α ChIL-12p40 Serum analysierten Laufspur zu sehen. Daneben sind noch weitere schwächere Banden zu sehen.

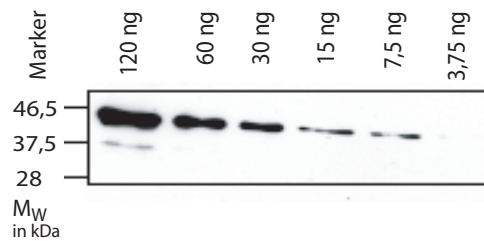


Abbildung 5.7: Beim hier dargestellten Westernblot wurden ChIL-12p40 in abnehmenden Mengen aufgetragen, um die minimal detektierbare Menge herauszufinden. Diese lag hier bei ca. 7,5 ng. Wie auch in Abb. 5.6 ist eine klare Bande bei ca. 40kDa zu sehen, bei der größten aufgetragenen Proteinmenge ist auch hier eine schwächere Bande im Bereich von 37kDa zu sehen, die aber mit abnehmender Gesamtproteinmenge verschwindet.

5.4 Expression von ChIL-12p40 in eukaryotischen Systemen

Mit Hilfe des unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten ChIL-12p40 konnte zwar ein polyklonales Antiserum hergestellt werden, allerdings fehlte für funktionelle Analysen immer noch unter nativen Bedingungen gereinigtes Protein. Nachdem es nicht möglich war, dieses in prokaryotischen Systemen zu gewinnen wurden andere Expressionssysteme verwendet.

5.4.1 ChIL-12p40-pcDNA6-Flag: Expression in 293T-Zellen

Wie das Konstrukt ChIL-12p40pCRT7-His war vor Beginn auch das Konstrukt ChIL-12p40-pcDNA6-Flag von N. Ortiz-Brüchle hergestellt worden. Es handelt sich dabei um ChIL-12p40, das in den, von Prof. T. Göbel modifizierten Vektor pcDNA6 kloniert wurde. Der Vektor besitzt einen starken Promotor, den CMV-Promotor (Cytomegalie-Virus Promotor). Anschließend findet sich ein T7-Promotor, das MHC-Signalpeptid und das Flag-Epitop. Die Klonierungsstelle ist durch eine EcoRI-Schnittstelle gekennzeichnet. Das zur Klonierung verwendete PCR-Produkt wurde mit Hilfe von Primern synthetisiert, die die komplementären Basen zu der EcoRI-Schnittstelle an das Protein-Gen ansynthetisieren (Abb. 5.8).

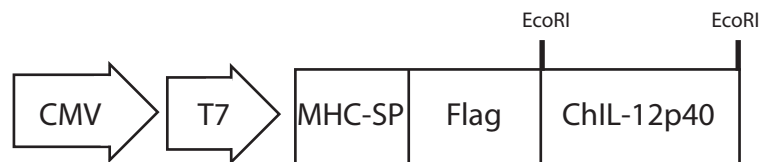


Abbildung 5.8: ChIL-12p40-pcDNA6-Flag. Struktur des Vektors mit EcoRI Schnittstelle

Zur Aufreinigung bzw. zur Detektion des synthetisierten Proteins dient hierbei das an das Protein gekoppelte Flag-Epitop, welches von kommerziell erhältlichen α -Flag-Antikörpern erkannt wird. Mit diesem Konstrukt wurden 293-T Zellen, welche zuvor in einer sterilen 6-Loch Platte ausgesät wurden, transfiziert. Als Positivkontrolle wurde eine weitere Kavität mit ChBAFF-pCR3-Flag und eine Kavität mit pEGFP transfiziert. ChBAFF ist ein anderes Hühnerzytokin, welches mit diesem Expressionssystem in unserem Labor schon erfolgreich exprimiert wurde, pEGFP ist ein Plasmid, das für ein unter UV-Licht grün fluoreszierendes Protein codiert. Es dient der Überprüfung der Transfektionstechnik, die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop ist schnell und einfach.

48h nach der Transfektion wurde die mit pEGFP-transfizierte Kavität unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Es war eine deutliche grüne Fluoreszenz in fast allen Zellen zu sehen. Daraufhin wurde der Zellkulturüberstand von den anderen Kavitäten abgenommen und im α -Flag-ELISA analysiert.

Bei diesem ELISA wurde eine Nunc MaxiSorp Platte mit $1\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Flag Antikörper beschichtet und anschließend blockiert. Dann wurde mit je $100\mu\text{l}$ der Überstände inkubiert, hierbei diente PBS-T, siehe 4.11.1 als Negativkontrolle. Im nächsten Schritt wurde mit dem polyklonalen Antiserum ge-

gen ChBAFF, was von Frau Dr. S. Kothlow freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, bzw. mit dem polyklonalen Antiserum gegen ChIL-12p40 in einer Verdünnung von 1:500 eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Detektion wurde ein α -Kaninchen-POD Antikörper verwendet und der Elisa mit TMB, siehe 4.11.1, entwickelt (Abb. 5.9).

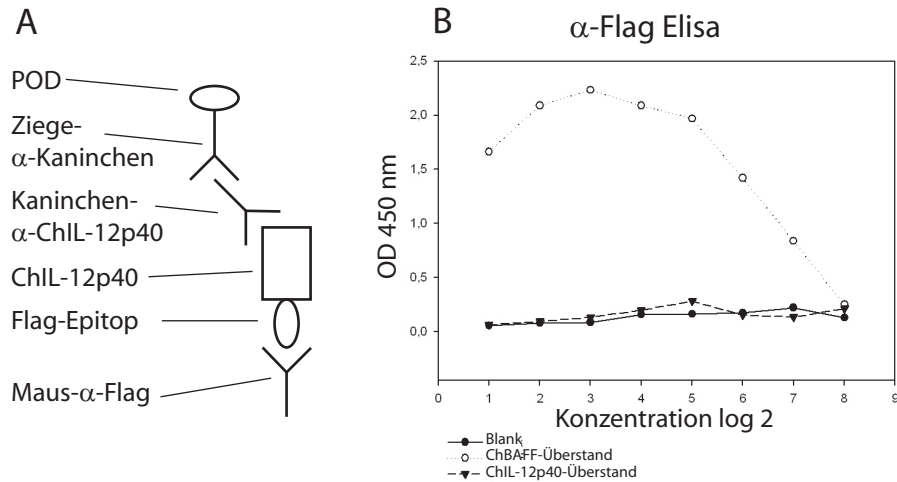


Abbildung 5.9: A: Aufbau des α -Flag-ELISAs. B: ELISA zur Überprüfung der Transfektion von 293T-Zellen mit ChIL-12p40 pcDNA6-Flag bzw. ChBAFFpCR3-Flag.

Es konnte zwar eine deutliche ChBAFF-Flag Produktion nachgewiesen werden, die Werte des getesteten ChIL-12p40-Flag Überstandes unterscheiden sich nicht von denen des Leerwertes.

5.4.2 ChIL-12p40-pCR3-HASP-Flag: Expression in 293T-Zellen

Nachdem im ELISA kein ChIL-12p40 nachweisbar war, wurde das Gen in einen anderen Vektor, den pCR3-HASP-Flag umkloniert. Dieser Vektor wurde freundlicher Weise von Prof. P. Schneider zur Verfügung gestellt. Der Vektor besitzt einen CMV-Promotor, gefolgt von einem HA-Signalpeptid. Daran schließt sich das Flag-Epitop an, auf welches die Klonierungsstelle folgt.

Für die Umklonierung wurde das ChIL-12p40 Gen mit den Primern 564/584, die die Enzymschnittstellen EcoRI bzw. PstI enthalten mittels PCR vervielfältigt und das PCR-Produkt in den pcDNA3.1 Vektor zwischenkloniert.

Anschließend wurde mit Plasmid aus der Zwischenklonierung ein partieller Doppelverdau mit EcoRI und PstI durchgeführt und das gewünschte Teilstück (ChIL-12p40 mit den passenden Enzymschnittstellen) ausgeschnitten. Es war notwendig, einen partiellen Doppelverdau durchzuführen, da das ChIL-12p40-Gen auch interne Schnittstellen für PstI besitzt. Die anderen

5.4. EXPRESSION VON CHIL-12P40 IN EUKARYOTISCHEN SYSTEMEN⁶⁵

Fragmente waren von ihrer Länge her eindeutig von ChIL-12p40 zu unterscheiden. Ebenso wurde der Vektor mit EcoRI und PstI verdaut und eine Ligation durchgeführt, durch die das ChIL-12p40 Gen an den Enzymschnittstellen in den Vektor eingebaut wurde (Abb. 5.10).

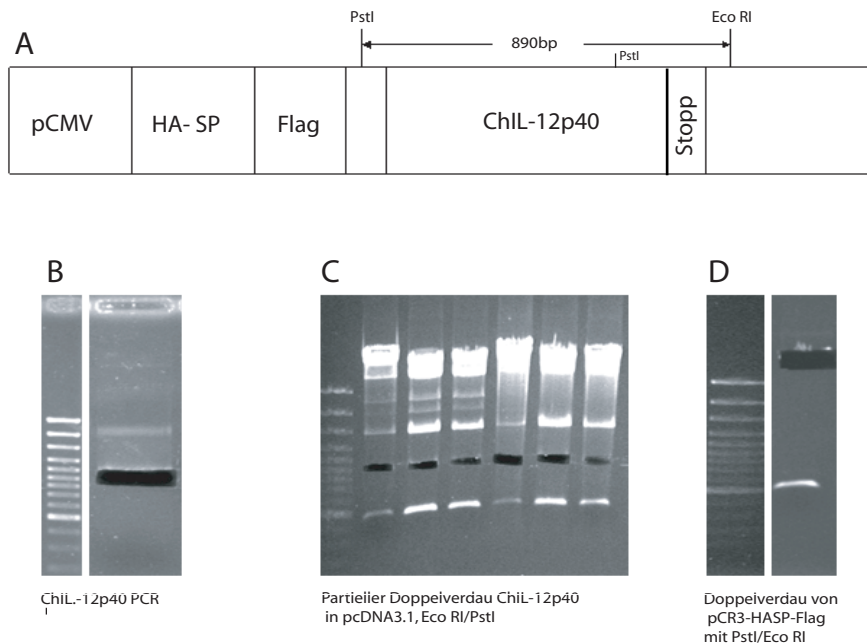


Abbildung 5.10: A: Struktur des Konstrukts ChIL-12p40-pCR3-HASP-Flag mit Promotor, Signalpeptid, Flag-Epitop und dem ChIL-12p40 Gen. Die markierten Enzymschnittstellen zeigen die Ligationsstelle an. B: Gel aus welchem das verwendete PCR-Produkt ausgeschnitten wurde. C: partieller Doppelverdau des Plasmids aus der Zwischenklonierung. D: Doppelverdau des Vektors.

Es wurden 293-T Zellen in einer sterilen 6-Loch Platte ausgesät. Nach ihrer Adhäsion wurden die Kavitäten mit

ChBAFF-pCR3-HASP-Flag (Kontrolle)

ChIL-12p40pcDNA3.1 ohne Epitop

ChIL-12p40pcDNA6-Flag

ChIL-12p40pCR3-HASP-Flag

pEGFP (Kontrolle)

transfiziert.

Dabei dienen auch hier wie in Abschnitt 5.4.1 ChBAFF und pEGFP als Kontrollen. Auch mit dem Plasmid ChIL-12p40pcDNA6-Flag wurden noch einmal Zellen transfiziert, um eventuelle Fehler bei der ersten Transfektion ausschließen zu können.

Nach 48h wurde auch hier die mit pEGFP transfizierte Kavität unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Etwa 80% der Zellen fluoreszierten grün.

Zur Kontrolle wurde der α -Flag-ELISA (siehe 4.11) durchgeführt. Diesmal diente der Überstand aus der Transfektion mit ChIL-12p40pcDNA3.1 ohne Epitop als Negativkontrolle, da das Protein ohne Epitop nicht detektiert werden kann (Abb. 5.11).

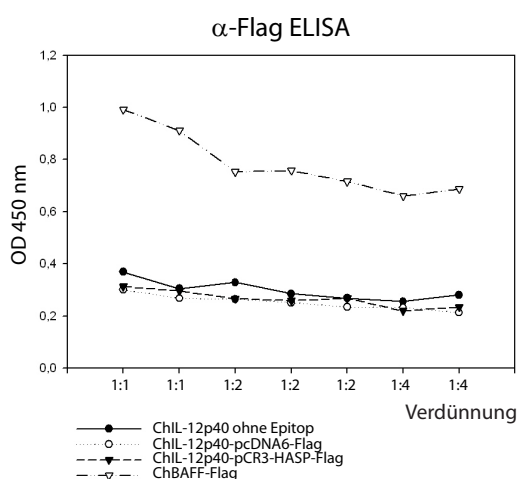


Abbildung 5.11: Auswertung des α -Flag-ELISAs zur Kontrolle der Expression der Proteine nach Transfektion von 293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden.

Beim Überstand aus der Transfektion mit ChBAFF-pCR3-HASP-Flag (1:1-Verdünnung) kann eine Extinktion beobachtet werden, die bis zu viermal höher ist als der Hintergrund. Dagegen unterscheidet sich die Extinktion von ChIL-12p40pcDNA6-Flag und ChIL-12p40pCR3-HASP-Flag kaum von der der Negativkontrolle.

Daraus wurde gefolgert, dass die Expression von ChIL-12p40 in 293-T Zellen nicht erfolgreich war.

5.4.3 ChIL-12p40pMTV5-Flag: Expression in Schneider-SL-3-Zellen

Nachdem die Expression in den 293T nicht erfolgreich zu sein schien, aber trotzdem nicht denaturiertes IL-12p40 benötigt wurde, wurde auf ein weiteres Expressionssystem zurückgegriffen. Es handelt sich hier um ein Insektenzellsystem. Doch zur Transfektion musste zunächst ein für dieses System passendes Plasmid hergestellt werden.

Dazu wurde das ChIL-12p40 Gen mit dem MHC-Signalpeptid mittels Herculase-PCR (Matrize war das Plasmid ChIL-12p40pcDNA6-Flag, Primer 306/564) amplifiziert und das Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten,

5.4. EXPRESSION VON CHIL-12P40 IN EUKARYOTISCHEN SYSTEMEN⁶⁷

aufgereinigt und anschließend in den Vektor pMT V5 kloniert.

Dieser Vektor beginnt mit einem Metallothionin-Promotor. Es folgt die Klonierungsstelle mit den T-Überhängen. Nach dem eingefügten PCR-Produkt, das außer dem ChIL-12p40 Gen sowohl ein MHC-Signalpeptid als auch ein Flag-Epitop enthält, kommt das V5-Epitop, ein 6xHistidin-Epitop und dann das Stopp-Codon (Abb. 5.12A).

Nach Vermehrung in *E.coli* (TOP 10) wurde das Plasmid präpariert und zur Kontrolle der richtigen Orientierung des PCR-Produkts im Vektor sowohl mit EcoRV als auch mit BstXI verdaut (Abb. 5.12B).

Nach Überprüfung der Orientierung des PCR-Produkts durch den Verdau wurde das Plasmid durch die Firma GATC, Konstanz sequenziert und die Richtigkeit der Sequenz bestätigt.

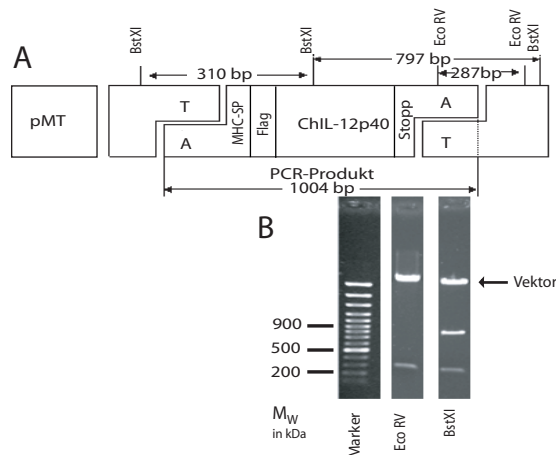


Abbildung 5.12: A: Struktur des ChIL-12p40pMTV5-Flag mit seinem Promotor und dem Stopp-Codon. Zusätzlich sind alle relevanten Enzymschnittstellen dargestellt. Die Struktur des klonierten PCR-Produkts zeigt das Signalpeptid, das Flag-Epitop und das ChIL-12p40 Gen. B: Restriktionsenzymverdauung. Zeigen, dass die Fragmente die berechnete Größe besitzen, was die richtige Orientierung des PCR-Produkts im Vektor bestätigt.

Bei den Schneider-SL3 Zellen handelt es sich um semiadhärent wachsende Insektenzellen. Es sind Zellen, die bei Raumtemperatur wachsen. Sie eignen sich auch hervorragend zur Massenproduktion in „Roller-Bottles“. Hierbei handelt es sich um Flaschen, die mit ca. einem Liter Medium befüllt werden können und permanent langsam rotiert werden. Durch das sie ständig umspülende Medium wachsen die Zellen in diesem System relativ schnell. Wenn die gewünschte Zelldichte im Medium erreicht ist, wird die Proteinexpression durch Zugabe von $CuSO_4$ (Endkonzentration 1mM) induziert.

Nach der Transfektion (4.8) wurden die Überstände der Klone aus der 96-Loch-Platte zunächst mittels Dot-Blot (4.10) getestet. Die positiv getes-

teten Klone wurden weitergezogen und ihre Überstände im α -Flag-ELISA überprüft. Der Klon mit dem besten Ergebnis wurde weiter vermehrt und für die Proteinproduktion verwendet.

5.5 Detektion von eukaryotisch hergestelltem ChIL-12p40

Um sowohl herauszufinden, wie gut das Antiserum in SL-3-System produziertes rekombinantes ChIL-12p40 erkennt als auch das Molekulargewicht des im SL-3-System produzierten ChIL-12p40 zu bestimmen, wurde das Zytokin aus den Überständen der transformierten Schneider-SL3 Zellen über das Flag-Epitop immunpräzipitiert.

Zur Immunpräzipitation wurde ein an Agarosebeads gekoppelter α -Flag Antikörper verwendet. Das Immunpräzipitat wurde im Westernblot analysiert.

Es wurde vergleichend mit einem α -Flag-POD Antikörper und mit α -ChIL-12p40 Serum/ α -Kaninchen-POD Antikörper detektiert. Als Negativkontrolle wurde auch hier wieder das Präimmunsrum verwendet (Abb. 5.13).

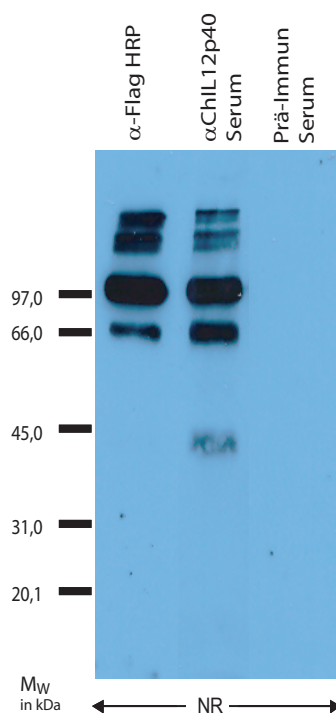


Abbildung 5.13: Westernblot. Zeigt auf den ersten beiden Laufspuren jeweils eine deutliche Bande bei ca. 97kDa, aber auch eine schwächere Bande bei 66kDa und im Bereich deutlich höherer Molekulargewichte. Auf der zweiten Laufspur ist eine undeutliche Bande im Bereich von 45kDa zu sehen.

Hierbei zeigte sich, dass ChIL12p40 als Homodimer von den transfizierten Zellen produziert wird (deutliche Banden bei 97kDa) und dass es ein etwas höheres Molekulargewicht als erwartet aufweist. Um dies zu verifizieren wurde erneut ein Westernblot angefertigt, vergleichend unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. Hierbei wurde das ChIL-12p40 nur über das Flag-Epitop detektiert (Abb. 5.14).

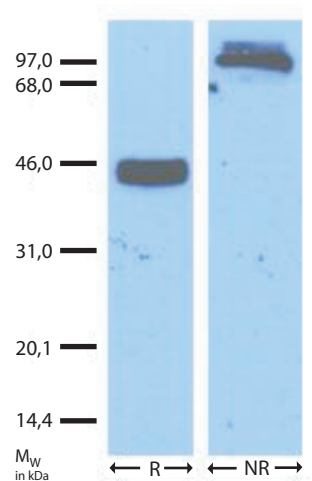


Abbildung 5.14: Westernblot. Detektion von im SL-3 Zell- System hergestellten ChIL-12p40. Auf der linken Laufspur wurde das ChIL-12p40 unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen, auf der rechten unter nichtreduzierenden. Unter reduzierenden Bedingungen liegt die detektierte Bande bei ca. 45kDa, unter nichtreduzierenden Bedingungen auch hier bei ca. 97kDa.

5.6 Analyse der Sequenz von ChIL-12p35

Zu Beginn dieser Arbeit lag die Sequenz für das ChIL-12p35 noch nicht vor. Erst nach der Veröffentlichung der Sequenz des gesamten Hühnergenoms konnte das Gen für ChIL-12p35 identifiziert und lokalisiert werden. Das Gen für ChIL-12p35 liegt auf Chromosom 9. Der Locus ist synthenisch mit Chromosom 3 von Maus und Mensch. Es besteht aus fünf Exons und vier Introns, die Exons sind 189bp, 108bp, 42bp, 105bp und 164bp lang, die Introns 805bp, 102bp, 87bp und 195bp lang. Die genomische Sequenz für IL-12p35 ist also 1797bp lang (Abb.5.15), die genomische Sequenz für IL-12p35 beim Menschen ist mit etwa 6kb wiederum deutlich länger [57]. Die genaue Lokalisation des IL-12p35-Gens beim Menschen ist 3p12-q13.2. Die kodierende Region des IL-12p35 ist 615bp lang.

Das Signalpeptid für ChIL-12p35 ist 36 Aminosäuren lang. Das reife IL-12p35 besteht aus 169 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 18385 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,15. Von seinen

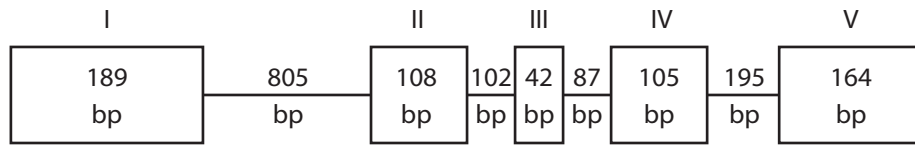


Abbildung 5.15: Genomische Organisation des ChIL-12p35 auf Chromosom 9. Exons sind durch Kästen, Introns durch Linien dargestellt.

sieben Cysteinen sind 5 konserviert. Die Cysteine dienen der Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins. Zwischen Aminosäure 66 und 67 des reifen ChIL-12p35 findet sich, im Vergleich mit allen anderen analysierten Spezies, eine Deletion von 15 Aminosäuren, nach Aminosäure 100 eine Deletion von 6 Aminosäuren und nach Aminosäure 101 eine weitere Deletion von 7 Aminosäuren (Abb. 5.16).

Es zeigte sich, dass die zwischen Huhn und Säugern identischen Aminosäuren prozentual extrem niedrig sind (Tab. 5.2). Der höchste Prozentsatz identischer Aminosäuren wurde zwischen Huhn und Pferd bzw. Maus mit jeweils 31,2% gefunden. Die geringste Verwandtschaft besteht zum Schaf mit lediglich 26,8%. Innerhalb der Säugerspezies betragen die identischen Aminosäuren zwischen 54,9% und 96,4%.

	Mensch	Maus	Rind	Schaf	Schwein	Pferd	Hund	Katze
Huhn	29,3	31,2	27,3	26,8	29,8	31,2	28,8	29,8

Tabelle 5.2: Identische Aminosäure in % zwischen ChIL-12p35 und IL-12p35 verschiedener Säuger

5.7 Klonierung von IL-12p35

Vor der Veröffentlichung des Hühnergenoms wurde mit 20 verschiedenen Primerpaaren, die auf die hochkonservierten Regionen des IL-12p35 von Schaf und Mensch zugeschnitten waren, versucht, das Gen zu amplifizieren. Bei einigen der Kombinationen konnten auch DNA-Stücke amplifiziert werden, die annähernd die erwartete Länge hatten. Diese wurden kloniert, und die Plasmide sequenziert. Allerdings stellte sich heraus, dass die klonierten DNA-Stücke keinerlei Homologie zu IL-12p35 aufwiesen.

Auch nach Veröffentlichung des Hühnergenoms konnte das ChIL-12p35-Gen, trotz den auf die korrekte Sequenz abgestimmten Primern, mit seinem Signalpeptid nicht amplifiziert werden. Es wurden wieder Genstücke mit annähernd der erwarteten Größe vervielfältigt, jedoch stellte sich bei der Sequenzierung heraus, dass es sich um ribosomale Gene handelte.

Da keine Daten vorlagen, in welchen Zellen ChIL-12p35 exprimiert wird,

chenden Primern und cDNA von HD 11-Zellen als Matrize amplifiziert. Dies gelang mit den Primern Nr.617 und Nr.642, das PCR-Produkt wurde in den Vektor pcDNA3.1 kloniert, in *E. coli* vervielfältigt und das präparierte Plasmid nach einem Kontrollverdau von der Firma GATC, Konstanz sequenziert. Es stellte sich im Vergleich mit der Datenbank heraus, dass die Sequenz korrekt war.

5.8 Herstellung des Plasmids zur Expression von Flexi-ChIL-12-Flag

Die Expression von ChIL-12p40 als Einzelprotein hatte sowohl im pro- als auch im eukaryotischen Expressionssystem erhebliche Probleme bereitet. Da IL-12 normalerweise als Heterodimer exprimiert wird, sollten beide Ketten in einem flexiblen Molekül exprimiert werden.

Um die beiden unabhängig voneinander klonierten Gene aneinander zu koppeln, wurde die Technik der „Linking-PCR“ verwendet. Hierbei wurden in der PCR zur Amplifizierung der einzelnen Gene Primer verwendet, die an den DNA-Strang einen zusätzlichen komplementären Überhang synthetisieren.

Gibt man nun die beiden PCR-Produkte zusammen, lagern sich die komplementären Überhänge aneinander, so dass nun in einer weiteren PCR mit den Primern, die an die beiden Enden des Gesamtprodukts binden, die zusammengelagerten Gene mit den komplementären Überhängen (dem sogenannten „Linker“) in der Mitte am Stück amplifiziert werden können.

Der „Linker“ hat zusätzlich die Funktion, bei der Expression für die Aminosäuren (GGGGS)₃ zu codieren, die es den beiden Proteinketten möglich macht, sich als flexible Proteinkette zusammen zu lagern. Glycin und Serin sind kleine neutrale Aminosäuren, die eine sehr flexible Schleife bilden.

Nach erfolgreicher Klonierung von IL-12p35 wurde zur Herstellung des Plasmids zur Expression von Flexi-ChIL-12-Flag im nächsten Schritt mit dem Antisense-Primer Nr.617 aus der ersten PCR und dem Linking-Sense-Primer Nr.662 p35 amplifiziert, das Plasmid ChIL-12p35pcDNA3.1 diente als Matrize. ChIL-12p40 wurde aus dem Plasmid ChIL-12p40pCR3-HASP-Flag mit Signalpeptid und Flag-Epitop durch den Sense-Primer Nr.664 und den Antisense-Linking-Primer Nr.663 amplifiziert. Beide Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt, das aufgereinigte Produkt diente der Linking-PCR als Matrize.

Die Linking-PCR wurde mit den beiden äußeren Primern Nr.664 und Nr.617 durchgeführt. Durch die komplementären Überhänge, die durch die Linking-Primer erzeugt wurden, lagerten sich die beiden Gene für ChIL-12p40 und ChIL-12p35 aneinander.

Das PCR-Produkt hatte die erwartete Länge von 1536 Basenpaaren und wurde in pcDNA3.1 kloniert. Nach Vervielfältigung in *E. coli* wurde das Plasmid FlagIL-12pcDNA3.1 mit dem Enzym BamHI verdaut. Nachdem die Frag-

5.8. HERSTELLUNG DES PLASMIDS ZUR EXPRESSION VON FLEXI-CHIL-12-FLAG73

mente des Verdau die vorhergesagte Länge hatten, wurde das Plasmid von der Firma GATC, Konstanz sequenziert (Abb.5.17).

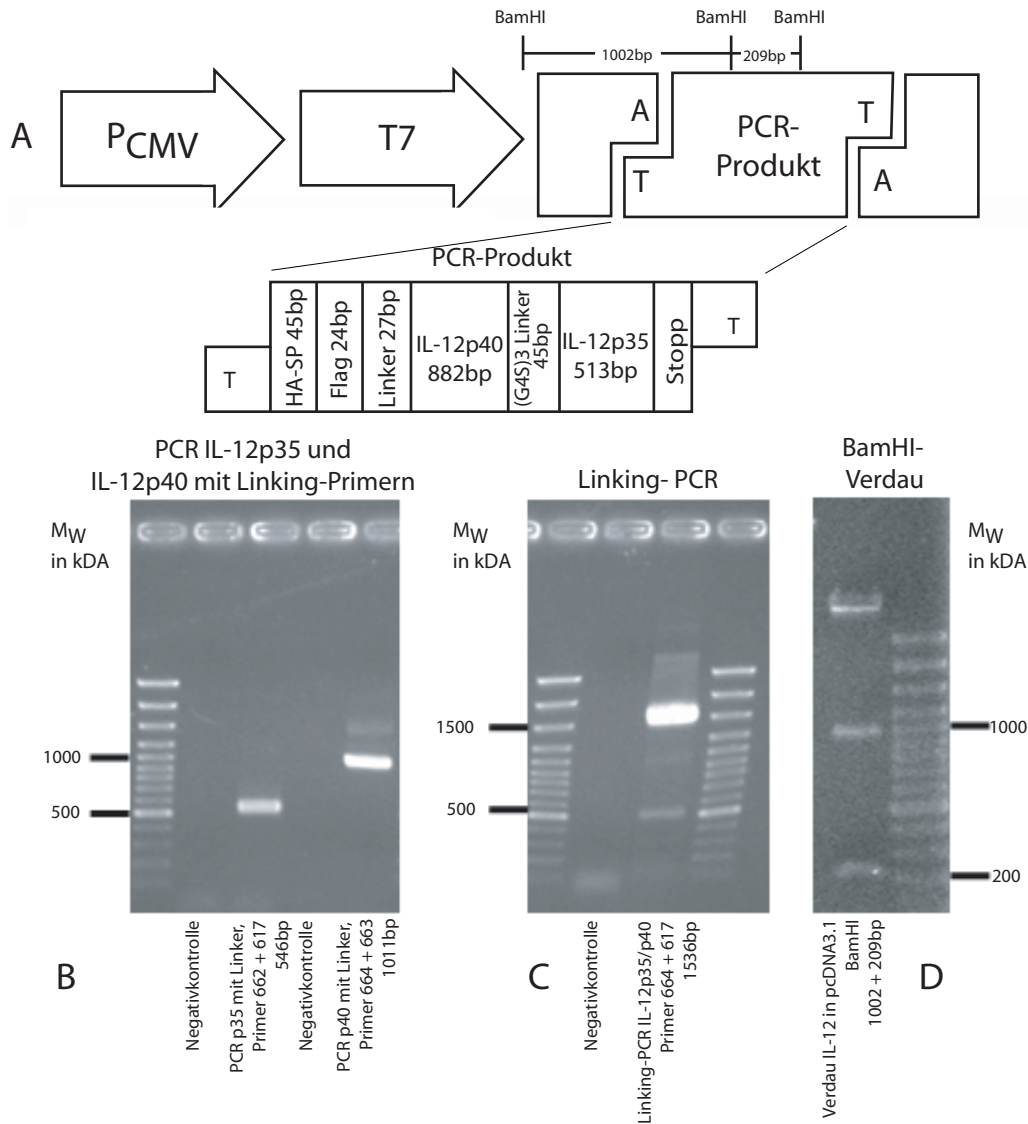


Abbildung 5.17: A: Aufbau des Plasmides mit Promotor, T/A Klonierungsstelle, PCR-Produkt (mit seinem Aufbau) und dem Stoppcodon. B: Gel der PCRs mit den Linking-Primern zur Synthesisierung der komplementären Überhänge. C. Linking-PCR, bei der die Genstücke aneinander gesetzt wurden. D: BamHI-Verdau, das Plasmid wurde in Fragmente der berechneten Größe geschnitten.

Die klonierte Sequenz des Flexi-ChIL-12 beinhaltet ein Hämagglutinin A-Signalpeptid(HA-SP), ein Flag-Epitop, ein Verbindungsstück und die Sequenzen für ChIL-12p40 und ChIL-12p35 und eine Stopp-Kodon. Zwischen den beiden Ketten des ChIL-12 befindet die Sequenz des Linkers (Abb. 5.17).

5.9 Expression von Flexi-ChIL-12-Flag im eukaryotischen System

Das errechnete Protein aus der Expression des FlagIL-12pcDNA3.1 Plasmides hat eine molekulare Masse von 55 kDa, sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 6,03. Hierbei sind potentielle Glycosylierungen nicht mit einberechnet. Eine Genkarte des Plasmides ist in Abb. 5.18 dargestellt.

Zur Expression wurden 293-T Zellen mit FlagIL-12pcDNA3.1 transfiziert.

Dazu wurden 293-T Zellen in einer sterilen Petrischale mit 10 cm Durchmesser ausgesät und transfiziert. Zur Kontrolle wurden auch Zellen in einer Kavität einer 24-Lochplatte ausgesät und mit pEGFP transfiziert. Nach 48 Stunden war unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche Grünfluoreszenz in den Kontrollzellen zu sehen.

Der Überstand aus der mit FlagIL-12pcDNA3.1 transfizierten Petrischale wurde abgenommen, abzentrifugiert und der zellfreie Überstand bei 4°C gelagert. Im nächsten Schritt wurde der Zellkulturüberstand im Western-Blot unter reduzierenden Bedingungen analysiert (Abb. 5.19).

Mit Hilfe des α Flag-POD Antikörpers konnte eine Bande mit einer Größe von ca. 66kDa auf der Laufspur des aufgetrennten Zellkulturüberstandes identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um FlexiChIL-12p40.

Mit Hilfe des α ChIL-12p40 Serum/ α -Kaninchen-POD System konnte diese Bande nicht nachgewiesen werden. Auch die Negativkontrolle mit dem Präimmenserum war negativ, hingegen konnte ChIL-12p40Flag aus SL-3 Zellen mit diesem System nachgewiesen werden.

5.10 Biologische Aktivität von ChIL-12p40 auf Milzleukozyten

Um die biologische Aktivität von ChIL-12p40 zu studieren wurde dialysierter Überstand aus dem SL-3-Zell-Expressionssystem in log₂-Verdünnung zu Milzleukozyten gegeben. Nach 72h wurden die Überstände abgenommen und auf IFN γ untersucht. Hierzu wurden die Überstände auf HD-11 Zellen gegeben, die unter IFN γ -Stimulation hin Stickstoffmonoxyd (NO) produzieren. Interessanterweise stimuliert IL-12p40 alleine, dosisabhängig, die Produktion von IFN γ . Dies konnte auf den Milzleukozyten von sechs Hühnern, jeweils im Doppelansatz, nachgewiesen werden (Abb. 5.20).

Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Extinktion (die von der produzierten Menge an NO abhängig ist), in Abhängigkeit von der Menge des zugegebenen ChIL-12p40-transfizierten SL-3 Überstands.

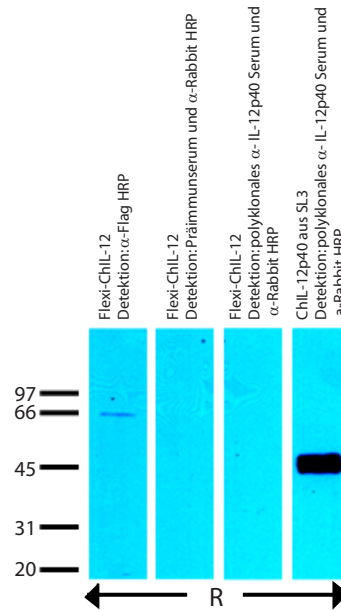


Abbildung 5.19: Westernblot: Flexi-ChIL-12-Flag zum einen über sein Flag-Epitop, zum anderen mit dem α ChIL-12p40 Serum und einem α -Kaninchen-POD Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle für das Detektionssystem α ChIL-12p40 Serum/ α -Kaninchen-POD diente ein Immunpräzipitat aus induziertem SL-3 Überstand, als Negativkontrolle für dieses System das Präimmunsereum/ α -Kaninchen-POD auf Flexi-IL12-p40-Flag.

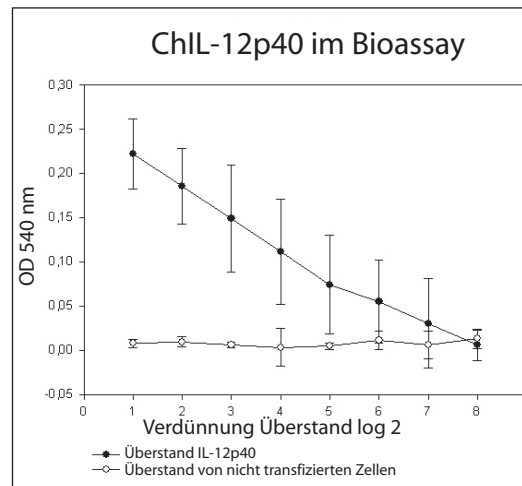


Abbildung 5.20: Gemessene Extinktion bei 540nm in Abhängigkeit von der Konzentration des ChIL-12p40-transfizierten SL-3 Überstands. Negativkontrolle: Überstand nicht transfizierter SL-3 in den selben Konzentrationen. Mittelwerte und Standardabweichung.

5.11 Expression von ChIL-12p40-Transkripten in verschiedenen Zell-Linien

Um eine Übersicht zu bekommen, wie IL-12p40 bei Hühnern exprimiert wird, wurde eine Reihe verschiedener Zell-Linien und Zelltypen analysiert. Hier-

5.11. EXPRESSION VON CHIL-12P40-TRANSKRIPTEN IN VERSCHIEDENEN ZELL-LINIEN 77

für wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA gewonnen und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde für eine Übersicht über das Expressionsmuster eine PCR mit ChIL-12p40 spezifischen Primern durchgeführt.

Um zumindest eine semiquantitative Aussage zu erhalten wurde die PCR mit 28, 32 und 35 Zyklen durchgeführt. Als Kontrolle für die Qualität der präparierten cDNA wurde eine β -Aktin PCR mit 35 Zyklen durchgeführt (Abb. 5.21). In den primären Zellen der Organe war keine ChIL-12p40 Expression nachzuweisen. Stimuliert man dagegen Milzleukozyten mit IL-2 ist eine Produktion nachweisbar.

In der Makrophagen-Zell-Linie HD 11 ist eine starke Expression zu beobachten und auch in der von Prof. T. W. Göbel etablierten NK-Zell ähnlichen Zell-Linie T16G5. Ebenfalls positive Ergebnisse wurden bei den B-Zell-Linien RP9 und 2D8 gefunden. Auch in der REV-transfizierte Darmzell-Linie JJ1G9 und den Fibroblastenlinien OU2 und CEC 32 konnten ChIL-12p40-Transkripte nachgewiesen werden, wobei CEC 32 eine Wachtel-Zell-Linie und keine Hühner-Zell-Linie ist.

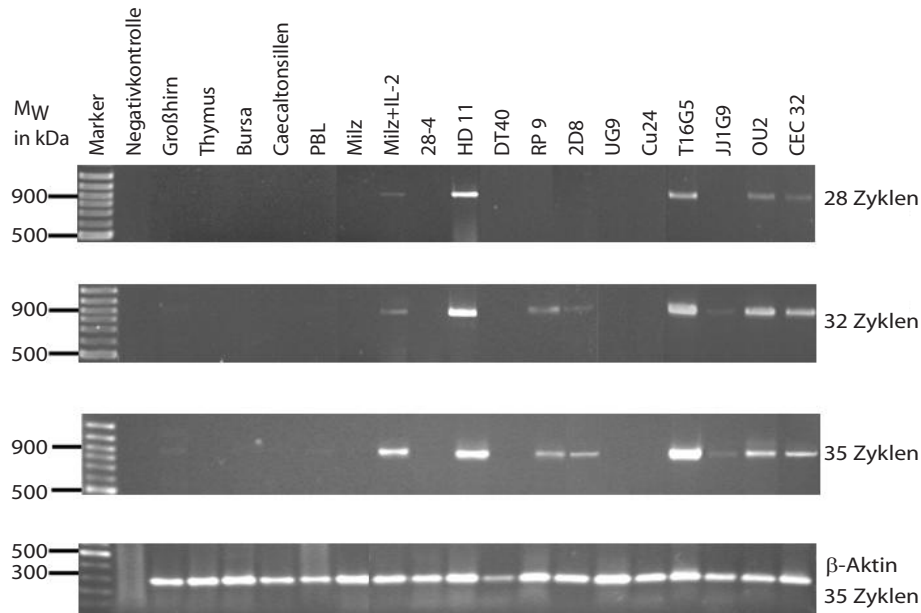


Abbildung 5.21: Expression von ChIL-12p40-Transkripten in verschiedenen primären Zellen und Zell-Linien

5.12 Steuerung der Synthese von ChIL-12p40, IL-18 und IFN γ durch Toll-like Rezeptoren

Um zu sehen, welche Toll-like Rezeptoren nach ihrer Aktivierung beim Huhn die Gene für IL-12p40, IL-18 und IFN γ hochregulieren, wurden Milzmakrophagen mit diversen Liganden für die Toll-like Rezeptoren stimuliert.

Nach sechs Stunden Stimulation wurde eine RNA-Präparation durchgeführt. Anschließend an die RT-PCR wurde zunächst eine β -Aktin PCR zur Überprüfung der gewonnenen cDNA, dann eine PCR mit 35 Zyklen und den spezifischen Primern für ChIL-12p40, IL-18 und IFN γ durchgeführt. Im selben Versuch wurden die Makrophagen auch mit IFN γ stimuliert.

5.12.1 Detektion von IFN γ im Überstand der stimulierten Makrophagen

Zur Kontrolle, ob die Stimuli eine Auswirkung auf die Makrophagen hatten, wurden die Zellkulturüberstände mittels eines NO-Assays (siehe 4.17) auf produziertes IFN γ untersucht.

Die Überstände wurden auf HD 11 Zellen gegeben und 24 Stunden bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden je 50 μ l Zellkulturüberstand abgenommen und mit Griess-Reagenz analysiert. Eine Quantifizierung erfolgte über die OD540 im Plattenphotometer.

Die am deutlichsten erhöhte Extinktion wurde im Vergleich zu den unstimulierten Makrophagen nach Stimulation mit LPS gemessen. Sie liegt ca. siebenfach über dem Basalwert. Dagegen konnte auf Poly I:C Stimulation hin kein IFN γ nachgewiesen werden, obwohl ein Transkript in der PCR nachgewiesen werden konnte (Tab. 5.3 und Abb.5.22).

Stimulans	NO-Konzentration (μ mol/ml)
Medium	8,64
IFN γ	34,23
Pam3Cys	nicht nachweisbar
Poly I:C	nicht nachweisbar
LPS	56,84
Imiquimod	11,20
Bakterielle DNA	27,93

Tabelle 5.3: Extinktionswerte der Makrophagenüberstände im NO-Test nach Stimulation mit den genannten TLR-Liganden bzw. IFN γ

5.12.2 Nachweis der Transkripte von IL-12p40, IL-18 und IFN γ

Die Expression der Zytokintranskripte von IL-12p40, IL-18 und IFN γ wurde mittels PCR analysiert. Es zeigte sich, dass IL-12p40 nur nach Stimulation des TLR4 mittels LPS hochreguliert wurde.

Ein gänzlich anderes Bild ergab sich beim Expressionsmuster von IL-18. IL-18 wurde durch Stimulation von TLR 2 (Pam3Cys), TLR 3 (Poly I:C), TLR 4 (LPS) TLR 7(Imiquimod) und durch Stimulation mit IFN γ induziert. Allerdings konnte es auch in den nicht stimulierten Makrophagen nachgewiesen werden, nicht jedoch nach Stimulation des TLR 9 mit bakterieller DNA, (Abb. 5.22).

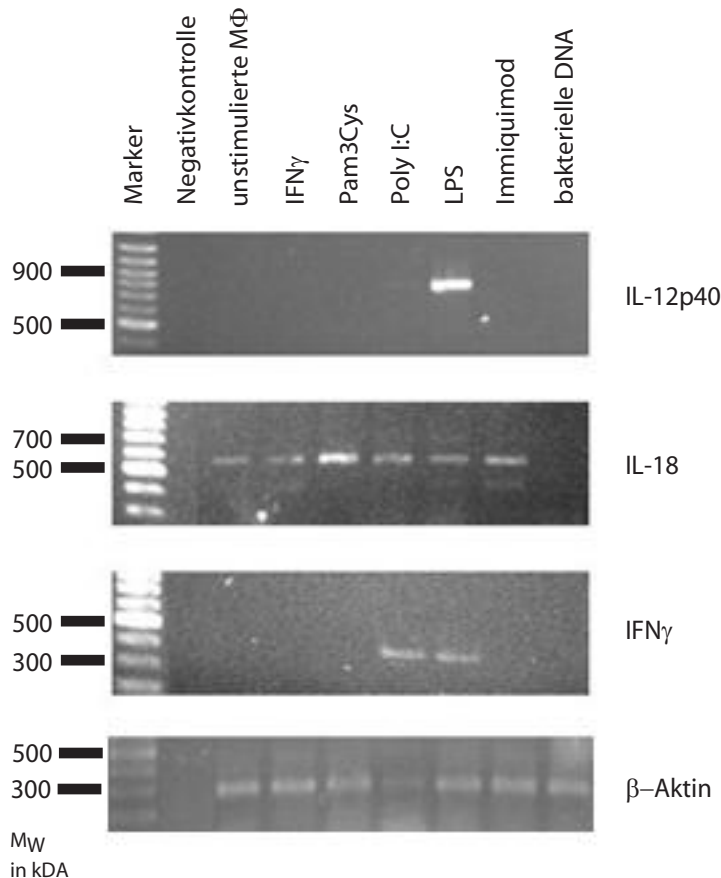


Abbildung 5.22: Nachweis der Transkripte verschiedener Zytokine(IL12-p40, IL-18 und IFN γ) mittels PCR in der cDNA von primären peripheren Blutmakrophagen, nach 6h Stimulation mit diversen Stimulantien.

Kapitel 6

Diskussion

In den letzten Jahren wurden Genomprojekte konsequent verfolgt und entsprechende Datenbanken aufgebaut. Gerade beim Huhn wurden sowohl EST-Datenbanken als auch das Hühnergenomprojekt sehr früh in Angriff genommen [1, 86]. So enthält der dbEST, release 101504, vom 15. Oktober 2004 für den Menschen 5 992 459 Einträge, für das Huhn, mit den meisten Einträgen eines landwirtschaftlichen Nutztiers, 527 686. Das Hühnergenomprojekt, bei dem das gesamte Genom des Haushuhns durchsequenziert wurde, wurde am 1. März 2004 in einem ersten Ansatz veröffentlicht. Es besteht aus $1,1 \cdot 10^9$ bp, es wurde in 6,6-facher Abdeckung sequenziert.

Durch die phylogenetisch große Distanz sind die Sequenzhomologien zwischen Säugern und Vögeln bei vielen Genen sehr gering. Daher rühren auch die großen Schwierigkeiten, die immer wieder beim Versuch der Identifizierung eines Säugerhomologs beim Geflügel auftreten. Mit Hilfe der Datenbanken und dem nun komplett sequenzierten Hühnergenom können in Zukunft homologe Gene schneller identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hühner-IL-12 Gene mit Hilfe der Datenbanken zu isolieren und zu charakterisieren.

6.1 Klonierung und Sequenzanalyse von ChIL-12

Betrachtet man das ChIL-12p40 im Vergleich mit den Daten der EST-Datenbank, stellt man fest, dass die Aminosäuresequenz des Hühner-IL-12p40 mit dem IL-12p40 der Säuger zwar Identitäten zeigt, welche jedoch mit maximal 43,5% (ChIL-12p40 im Vergleich mit IL-12p40 des Pferdes) eher gering sind. Trotzdem konnte das Gen eindeutig als Homolog des IL-12p40 der Säuger identifiziert werden.

Trotz der erwähnten phylogenetischen Distanz zwischen Huhn und Säugern gibt es, im Gegensatz zu IL-12, auch sehr hochkonservierte Zytokine. ChBAFF hat beispielsweise eine Aminosäureidentität von 76% mit humanem BAFF [72]. Andererseits gibt es aber auch Hühnerzytokine, deren Se-

quenz sehr unterschiedlich zur entsprechenden Sequenz der Säugetiere ist. Beispielsweise existiert zwischen Hühner IL-2 und bovinem IL-2 eine Aminosäureidentität von lediglich 24% [82].

In der Aminosäuresequenz des ChIL-12p40 zeigt sich, dass acht der neun enthaltenen Cysteine konserviert sind. Die Cysteine sind maßgeblich an der Ausbildung der Tertiärstruktur, die für das Erkennen durch den Rezeptor verantwortlich ist, beteiligt.

Durch seine heterodimere Struktur stellt IL-12 ein sehr spezielles Zytokin dar. Als es zuerst von Kobayashi et al. [40] beschrieben wurde, war diese Struktur einzigartig unter den Zytokinen. Mittlerweile sind IL-23 [62] und IL-27 [66] als heterodimere Zytokine entdeckt worden. Sie sind Mitglieder der IL-12-Familie. Da bei vielen Säugern das Zytokin nur in der heterodimeren Form biologisch aktiv ist [32], sollte auch beim Huhn die zweite Kette identifiziert und kloniert werden.

Zunächst wurde das Gen für ChIL-12p35 in den EST-Datenbanken gesucht, konnte allerdings dort nicht identifiziert werden. Nachdem zu diesem Zeitpunkt die Sequenz des Hühnergenoms noch nicht veröffentlicht war, wurde versucht, das Gen mit Hilfe von, auf die vermeintlich hochkonservierten Regionen der Gene verschiedener Spezies zugeschnittenen, degenerierten Primern, mittels PCR zu amplifizieren. Allerdings konnten damit zunächst keinerlei Erfolge erzielt werden.

Es stellte sich also die Frage, ob eine ChIL-12p35-Kette überhaupt existiert, da sie auch in keiner Datenbank gefunden wurde. Allerdings ist der Beweis für die Nichtexistenz eines Gens sehr schwierig. Zudem wäre es sehr erstaunlich gewesen, wenn sich die Struktur des IL-12 beim Huhn so gravierend von der der Säugerspezies unterschieden hätte.

Weiterhin wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass ChIL-12p35 sehr restriktiv exprimiert wird. Beim Menschen zum Beispiel wird das Zytokin letztendlich über die restriktiv exprimierte p35-Kette reguliert [10].

Ein Grund für die Erfolglosigkeit der Bemühungen könnte sein, dass die mRNA von ChIL-12p35 sehr instabil ist und sofort nach der Translation wieder abgebaut wird.

Denkbar wäre auch gewesen, dass die mRNA für ChIL-12p35 in einer Sekundärstruktur vorliegt, die eine cDNA-Synthese verhindert.

Erst nach Abschluß des Hühnergenom-Projektes konnte die Sequenz von ChIL-12p35 identifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass trotz der Vielzahl der Einträge in den EST-Datenbanken, viele Gene, unter anderem ChIL-12p35, noch nicht repräsentiert sind.

Allerdings stellte sich die Amplifizierung von ChIL-12p35, auch nachdem die Sequenz identifiziert war, immer noch als sehr schwierig dar. Es wurden wiederum diverse Versuche unternommen, mit auf die Sequenz des ChIL-12p35 Gens mit Signalpeptid zugeschnittenen Primern das Gen zu vervielfältigen. Dass auch dies nicht gelang, spricht dafür, dass das Gen nur sehr schwach exprimiert wird oder dass es tatsächlich eine Sekundärstruktur be-

6.2. EXPRESSION VON CHIL-12P40 IM PROKARYOTISCHEN SYSTEM UND GENERIERUNG EINE

sitzt, die es sehr schwierig macht, das Gen in cDNA umzuschreiben.

Die Amplifizierung gelang schließlich mit sehr viel Aufwand nach zahlreichen Versuchen mit unterschiedlichen Primerpaaren. Erfolg stellte sich bei der Verwendung von Primern für ChIL-12p35 ohne Signalpeptid auf der cDNA einer Makrophagen-Linie.

ChIL-12p35 weist mit IL-12p35 der Maus 31,2% identische Aminosäuren auf. Mit allen anderen Säugern ist die Homologie noch geringer. Bei der p35-Kette sind fünf der sieben Cysteine konserviert. Auch hier konnte das Gen trotz der geringen Sequenzhomologie eindeutig als korrespondierend zum IL-12p35 der Säuger identifiziert werden.

Durch die geringe Homologie lässt sich auch erklären, warum alle Versuche mit den degenerierten Primern scheiterten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die IL-12p35- und IL-12p40-Gene erst mit Hilfe von EST-Datenbanken und Hühnergenomprojekt identifiziert und kloniert werden konnten. Nur mit Hilfe der Hühnergenom-Projektes und modernen molekularbiologischen Methoden gelang es, die p35-Kette von ChIL-12 zu identifizieren und zu klonieren.

6.2 Expression von ChIL-12p40 im prokaryotischen System und Generierung eines polyklonalen α -ChIL-12p40-Serums

Die rekombinante Herstellung der bereits bekannten ChIL-12p40 Kette war der erste Schritt der vorliegenden Arbeit.

Zur Expression wurde zunächst ein prokaryotisches System gewählt. Die Expression in Bakterien hat den Vorteil, dass große Mengen des gewünschten Proteins in kurzer Zeit hergestellt werden können, allerdings auch den Nachteil, dass bei Prokaryoten keine Glykosilierungen erfolgen, was sich entscheidend auf die Sekundärstruktur des Proteins auswirken kann. Außerdem kann auch die Halbwertszeit des Zytokins verändert und dadurch die biologische Funktion beeinträchtigt sein.

Ein weiterer Nachteil ist auch, dass die Kontamination der Proteinpräparation mit LPS aus den Bakterien nie ganz ausgeschlossen werden kann und somit alle Funktionsanalysen des Zytokins daraufhin in Frage gestellt werden müssen.

Während dieser Arbeit wurden verschiedene prokaryotische Expressionssysteme getestet, wobei nur das am besten funktionierende vorgestellt wurde.

Allen gemeinsam war, dass sich ChIL-12p40 unter denaturierenden Bedingungen völlig problemlos aufreinigen ließ, jedoch, auch bei unter Verwendung verschiedener Aufreinigungssysteme, unter nativen Bedingungen die Ausbeute an aufgereinigtem Protein sehr gering war. Vermutlich bestand die Ursache des Problems darin, dass unter denaturierenden Bedingungen die Tertiärstruktur des Proteins zerstört wird, diese jedoch unter nativen

erhalten bleibt. Wahrscheinlich wird durch die Tertiärstruktur das Histidin-Epitop am Ende der Proteinkette in einer Tasche des Proteins gelagert, so dass es nicht mehr zur Bindung an die Nickel-Agarose fähig ist.

Unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigtes Protein verliert oft seine biologische Aktivität, schließlich werden dabei die für die Ausbildung der Tertiärstruktur verantwortlichen Disulfidbrücken zerstört. Die Tatsache, dass die meisten Cysteine im Sequenzvergleich der Spezies konserviert sind, deutet darauf hin, dass in diesem Fall die Disulfidbrücken essentiell für die biologische Aktivität sind.

Mit dem unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten ChIL-12p40 aus dem prokaryotischen Expressionssystem konnte aber ein Kaninchen immunisiert werden, um ein gegen ChIL-12p40 gerichtetes polyklonales Antiserum zu generieren.

Ein polyklonales Antiserum hat den Vorteil, dass es sich mit verhältnismässig wenig Aufwand gewinnen lässt. Zur Immunisierung kann unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigtes Protein aus einem prokaryotischen Expressionssystem verwendet werden. Nach ein oder zwei Boosts steht ein sensitives Antiserum zur Verfügung.

Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die verschiedenen, im Serum enthaltenen Antikörper auch verschiedene Epitope des Antigens erkannt werden. So wird normalerweise von einem polyklonalen Antiserum, welches unter Verwendung von unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigtem Protein hergestellt wurde, das gleiche Protein auch nach einer Aufreinigung unter nativen Bedingungen erkannt. Trotzdem kann es natürlich passieren, dass Protein aus einem anderen Expressionssystem nicht erkannt wird.

Der Nachteil eines polyklonalen Antiserums liegt darin, dass nicht nur Antikörper gegen das bei der Immunisierung verwendete Protein im Serum enthalten sind, sondern auch Immunglobuline gegen alle möglichen anderen Antigene, mit denen das Kaninchen in Berührung kam bzw. mit denen das zur Immunisierung verwendete Protein verunreinigt war.

Daher ist es immer notwendig, vor der Immunisierung eine Blutprobe zu nehmen und Serum zu gewinnen, welches als Präimmunserum aufbewahrt und als Negativkontrolle für die Detektion verwendet wird. So können eventuell auftretende unspezifische Reaktionen des Antiserums im Vergleich mit dem Präimmunserum identifiziert werden.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Antiserum wurden kaum unspezifische Reaktionen beobachtet, allerdings durchaus Reaktionen mit anderen, nicht ChIL-12p40 Proteinen aus dem bakteriellen Expressionssystem (s. Abb. 5.6). Die schwächeren Banden bei ca. 35kDa und die Bande bei deutlich höherem Molekulargewicht sind damit zu erklären, dass mit ChIL-12p40 aus prokaryotischer Expression immunisiert wurde und das selbe Protein auch im Westernblot verwendet wurde, wobei eine geringfügige Kontamination mit Fremdproteinen nie ausgeschlossen werden kann.

Die Sensitivität des α -ChIL-12p40-Serum ist sehr hoch. Es können Pro-

6.3. EUKARYOTISCHE EXPRESSION VON CHIL-12P40, KONSTRUKTION UND EUKARYOTISCHE

teinmengen bis zu etwa 7,5ng problemlos im Westernblot detektiert werden (Abb. 5.7), so dass es möglich ist, das Serum in einer Verdünnung von 1:10.000 als primären Antikörper einzusetzen.

Somit war ein erstes sensitives Reagenz zur Detektion des Zytokins gewonnen.

6.3 Eukaryotische Expression von ChIL-12p40, Konstruktion und eukaryotische Expression von Flexi-ChIL-12

Dennoch war es notwendig, unter nativen Bedingungen einsetzbares ChIL-12p40 für die Funktionsanalysen zu gewinnen. Daher wurde versucht, auf eukaryotische Systeme auszuweichen. Diese haben auch den Vorteil, dass eine Glykosylierung im Expressionssystem stattfindet und eine biologische Aktivität des rekombinant hergestellten Zytokins eher erwartet werden kann. Zudem ist keine LPS-Kontamination zu befürchten.

Im ersten Ansatz wurde versucht, ChIL-12p40 mit einem Flag-Epitop (im Folgenden "ChIL-12p40-Flag") in 293T-Zellen zu exprimieren. Das Flag-Epitop dient sowohl zur Detektion des Proteins mittels kommerziell erhältlicher Antikörper als auch zur Aufreinigung über α -Flag-Beads. Hierbei werden α -Flag-Antikörper an kleine Agarosekügelchen gekoppelt, mit deren Hilfe das Protein präzipitiert werden kann.

Der Versuch, ChIL-12p40-Flag in 293-T Zellen mit Hilfe des Plasmids ChIL-12p40pcDNA6-Flag zu exprimieren, zeigte im zur Kontrolle der Expression durchgeführten α -Flag-ELISA (4.11) keine andere Reaktion als die Negativkontrolle, bei der Zellen mit dem Plasmid ChIL-12p40pcDNA3.1 transfiziert wurden. Hierbei kann ChIL-12p40 im Elisa nicht detektiert werden, da das Zytokin in diesem Expressionssystem kein Flag-Epitop besitzt. Dagegen zeigte die Positivkontrolle ChBAFF-Flag in pCR3 ein deutlich positives Ergebnis.

Es wurde gefolgert, dass die Expression von ChIL-12p40 mit Hilfe des Plasmids ChIL-12p40pcDNA6-Flag in 293-T Zellen nicht erfolgreich war.

Um eventuelle Probleme, die durch das Signalpeptid oder andere Bestandteile des Vektors verursacht worden sein könnten, auszuschließen, wurde ChIL-12p40 in den Vektor pCR3, der sich für die Expression von ChBAFF-Flag in 293-T-Zellen bewährt hatte, umklontiert. Allerdings führte dies wiederum nicht zum gewünschten Ergebnis. Auch hier zeigte der Kontroll-ELISA keine Reaktion, die sich von der Negativkontrolle signifikant unterschied. So wurde auch hier gefolgert, dass die Expression nicht erfolgreich war.

Allerdings wurde dabei nicht berücksichtigt, dass die Voraussetzung eines aussagekräftigen ELISAs ist, dass das, mit Hilfe von prokaryotischem ChIL-12p40 hergestellte und zur Detektion eingesetzte, Antiserum auch das eukaryotisch exprimierte Protein binden muss. Prinzipiell ist dies bei einem

polyklonales Antiserum auch zu erwarten, es sollte sich allerdings herausstellen, dass später auch das in 293T-Zellen exprimierte Flexi-ChIL-12-Flag nicht erkannt wurde.

Es wurde also ein weiteres Expressionssystem getestet. Das System der Schneider-SL-3-Insektenzellen wurde gewählt, weil hier die Möglichkeit gegeben ist, relativ große Mengen Protein in schnell wachsenden Zellen zu exprimieren. Das verwendete Plasmid enthält die Sequenz für ein N-terminales Flag-Epitop.

Die ersten Überstände aus der Transfektion wurden in einem Dot-Blot analysiert, bei dem das produzierte Zytokin mit Hilfe des α -ChIL-12p40 Serums und eines α -Kaninchen-POD-Antikörpers detektiert wurde. Der Nachweis war schwach positiv, hingegen gelang der Versuch nicht, das Protein direkt mit dem α Flag-POD-Antikörper zu detektieren. Die Ursache hierfür war vermutlich der fehlende Verstärkereffekt.

Somit war klar, dass das Antiserum ChIL-12p40 aus dem Insektenzellsystem erkennt und die Expression funktioniert.

Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass das ChIL-12p40 nicht zwingend aufgereinigt werden muss, um seine biologische Aktivität in Zellsystemen zu untersuchen. Es ist ausreichend, den Überstand gegen PBS zu dialysieren um das $CuSO_4$, das zur Induktion der Zellen zugegeben wurde, aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen. Dann kann der Überstand direkt eingesetzt werden. Der Nachteil an diesem System ist, dass $CuSO_4$ eine reduzierende Wirkung hat und Disulfidbrücken eventuell zerstören kann.

Für die Bestimmung des Molekulargewichts im Westernblot unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen konnte das ChIL-12p40 über sein Flag-Epitop präzipitiert und konzentriert werden. Auch in diesen Versuchen bestätigte sich, dass sowohl das Antiserum als auch der α -Flag-Antikörper das Zytokin bestens detektierten. Wie auch bei Westernblotanalysen des prokaryotisch exprimierten ChIL-12p40 stellte sich heraus, dass die transfizierte Zellen relativ wenig monomeres p40 produzieren sondern vorrangig p40 Homodimere (Abb. 5.13). Im Vergleich dazu produzieren mit humanem IL-12p40 transfizierten COS-Zellen ein etwa 30% dimerisiertes Protein [44].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, funktionelles ChIL-12 zu klonieren und zu exprimieren. Da das ChIL-12p35 nur ohne sein Signalpeptid amplifiziert werden konnte, war es nicht möglich, das hergestellte Plasmid zur Expression zu verwenden. Es wurde die Entscheidung getroffen, kein synthetisches Signalpeptid an die IL-12p35-Sequenz anzuhängen, sondern, da IL-12 normalerweise als Heterodimer exprimiert wird, ein sogenanntes Flexi-Konstrukt herzustellen, welches es ermöglicht, beide Zytokinketten in einem flexiblen Molekül zu exprimieren. Hierbei wurde das IL12-p35 über ein Verbindungsstück, den Linker, in ein ChIL-12p40 Konstrukt eingefügt, so dass das vorhandene Signalpeptid des IL-12p40-Konstrukts bei der Expression das Signal für das gesamte Protein stellte. Der Linker codiert für eine

6.3. EUKARYOTISCHE EXPRESSION VON CHIL-12P40, KONSTRUKTION UND EUKARYOTISCHE

zusätzliche Peptidsequenz, die aus drei Wiederholungen der Aminosäuresequenz (GGGGS) besteht. Diese Sequenz bildet ein neutrales, sehr flexibles Peptid, welches es den beiden Proteinketten ChIL-12p40 und ChIL-12p35 möglich macht, sich in ähnlicher Weise aneinanderzulagern, wie sie es bei einer voneinander unabhängigen Expression getan hätten.

In der Annahme, dass das Flexi-ChIL-12-Flag stabiler sei als das ChIL-12p40, wurde ein neuer Expressionsversuch im 293T-System unternommen.

Weitere Gründe für die Wahl dieses Systems waren, dass die Zellkulturüberstände direkt (sogar ohne Dialyse, da kein Induktionsmittel zugesetzt werden muss) im Bioassay verwendet werden können und die Vermutung, dass die Glykosylierung, die bei Säugerzellen stattfindet, zur biologischen Aktivität auf Hühnerzellen führen. Zudem ist die Expression in Insektenzellen zu Beginn sehr zeitaufwändig, bei der Expression in 293T-Zellen können die Überstände bereits 48h nach der Transfektion analysiert werden.

Die erste Analyse des gewonnenen Überstands erfolgte im Westernblot. Hier wurde vergleichend mit dem α -ChIL-12p40-Antiserum/ α -Kaninchen-POD-Antikörper und dem α -Flag-POD-Antikörper detektiert. Für das α -ChIL-12p40-Antiserum/ α -Kaninchen-POD-Antikörper System wurde das Immunpräzipitat des ChIL-12p40 aus dem Insektenzell-System (Abb. 5.19) als Positivkontrolle verwendet.

Es zeigte sich auf der mit α -Flag-POD-Antikörper detektierten Laufspur eine Bande bei ca. 66 kDa. Dies ist zwar größer, als das errechnete Molekulargewicht von 55 kDa, kann aber durchaus durch Glykosylierungen erklärt werden.

Mit dem α -ChIL-12p40-Antiserum/ α -Kaninchen-POD-Antikörper System konnte keine Flexi-ChIL-12-Flag Proteinbande detektiert werden, aber eine sehr deutliche Bande auf der Spur mit dem Immunpräzipitat aus den SL-3 Zellen. Somit besteht die begründete Vermutung, dass das mit Hilfe von prokaryotischen ChIL-12p40 hergestellte Antiserum das von 293T-Zellen produzierte Flexi-ChIL-12-Flag nicht erkennt.

Von daher sollte auch die Expression von ChIL-12p40Flag im 293T-System noch einmal überprüft werden und die Überstände eventuell präzipitiert und im Westernblot mit dem α -Flag-POD-Antikörper detektiert werden.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass zwar ChIL-12p40 aus dem SL-3 Insektenzellsystem erkannt wird, nicht aber das aus den humanen 293T-Zellen, wäre die unterschiedliche Glycosylierung, da diese zu einer unterschiedlichen Proteinfaltung führen kann. Es könnte sein, dass die durch das Immunsystem des immunisierten Kaninchens erkannten Epitope durch die humane Glycosylierung maskiert werden, sie hingegen nach der Glycosylierung durch die SL-3 Zellen immer noch zugänglich sind.

Am Beispiel der IL-12 Expression wird also deutlich, dass für die unterschiedlichen Anforderungen verschiedene Expressionssysteme verwendet werden müssen und nicht jedes Expressionssystem für jedes Protein geeignet

ist. Auch in Zukunft wird die Entwicklung der spezifischen Reagentien sehr zeitaufwändig sein.

6.4 Analyse der mRNA-Expression von ChIL-12p40

In keinem der untersuchten primären Geweben Großhirn, Thymus, Bursa, Caecaltonsillen, PBL und Milz, konnte eine IL-12p40-Expression nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zytokinkette beim Huhn, wie bei Säugern [89], nicht in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird, sondern nur in den Zellen, in denen auch biologisch aktives Heterodimer produziert wird.

Dagegen sind IL-12p40-Transkripte in diversen Zell-Linien nachweisbar. Die PCR zeigte positive Ergebnisse für HD-11 Zellen (eine Makrophagen-Zell-Linie), B-Zell-Linien (RP9 und 2D8), die REV-transfizierte Darm-Leukozytenlinie JJ1G9, die NK-Zell-ähnliche Linie T16G5 und die beiden Fibroblastenlinien OU2 und CEC32. Bei den positiven Zell-Linien handelt es sich bis auf die Fibroblasten ausschließlich um Immunzellen. Die Expression von IL-12 in einer Fibroblastenlinie ist sehr ungewöhnlich. Die schwache IL-12p40-Bande im Großhirn kann durch Blutverunreinigungen erklärt werden.

Ein weiterer Ansatz war, herauszufinden, auf welche Stimuli hin Zellen ChIL-12p40 exprimieren. So konnte in den mit IL-2 stimulierten Milzzellen eine deutliche ChIL-12p40-Produktion nachgewiesen werden. Weiterhin war von Interesse, welche Toll-like Rezeptoren nach Kontakt mit ihrem Liganden zur Expression von ChIL-12p40, IL-18 und $\text{IFN}\gamma$ führen. Zu diesem Zweck wurden periphere Blutmakrophagen mit den TLR-Liganden stimuliert. Hierbei ergab sich folgendes Bild:

Das eindeutigste Ergebnis konnte durch Stimulation mit LPS, dem Liganden des TLR4, erreicht werden. Hier wurden sowohl Transkripte von IL-18, als auch von IL-12p40 und $\text{IFN}\gamma$ nachgewiesen. Außerdem zeigte der Kulturüberstand, der im NO-Assay auf $\text{IFN}\gamma$ getestet wurde, eine deutliche positive Reaktion.

Weit schwieriger zu interpretieren war das Ergebnis der Stimulation mit Poly I:C, dem Liganden des TLR 3. In der PCR konnten zwar Transkripte von $\text{IFN}\gamma$, und IL-18 nachgewiesen werden, der im NO-Assay getestete Kulturüberstand war jedoch negativ auf $\text{IFN}\gamma$. Dies kann dadurch begründet werden, daß die Überstände schon nach sechs Stunden geerntet wurden. Durch diese relativ kurze Stimulationsdauer kann eventuell die Biosynthese noch nicht weit genug gediehen sein, um nachweisbare Mengen des Zytokins zu produzieren. Andererseits konnte auf Stimuli mit anderen Liganden hin $\text{IFN}\gamma$ nach der selben Zeit im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die alternative Erklärung hierfür wäre, dass durch die Aktivierung des TLR 3 IL-18 produziert wurde, und dieses als $\text{IFN}\gamma$ -induzierender Faktor sekundär die Transkription des $\text{IFN}\gamma$ -Gens induziert hat. Das würde erklären, warum

die angelaufene Biosynthese nach der gleichen Zeit noch nicht zu nachweisbaren Mengen im Überstand geführt hat. Ob der Nachweis von $\text{IFN}\gamma$ in den anderen Kulturen überhaupt aussagekräftig ist, ist fraglich.

Da IL-18 beim Huhn [73] wie beim Säuger [56] in vielen Zellen konstitutiv exprimiert und wird als inaktiver Vorläufer in vielen Zellen auf Vorrat gelagert wird, ist es nicht erstaunlich, dass die cDNA in allen, außer der mit bakterieller DNA stimulierten Kulturen nachweisbar war.

Da aber nicht in allen Kulturen $\text{IFN}\gamma$ oder seine Transkripte nachweisbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass IL-18 zwar synthetisiert, aber auf den entsprechenden Stimulus hin nicht freigesetzt wird.

Weit schwieriger zu erklären ist der gelungene Nachweis von $\text{IFN}\gamma$ im Zellkulturüberstand, aber ein Fehlen der Transkripte in der PCR. Dass die mRNA so schnell (innerhalb von sechs Stunden nach Stimulation) schon wieder abgebaut sein soll, ist nicht plausibel. Eventuell sollte in Betracht gezogen werden, dass der Nachweis durch PCR nicht sensibel genug ist.

Auch dass nach Stimulation mit bakterieller DNA keines der Zytokintranskripte mehr nachweisbar war, ist nicht zu erklären da der TLR 9 in der Literatur als IL-12 induzierend beschrieben wird [5] .

6.5 Biologische Aktivität von ChIL-12p40

Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit wurde durch W.Degen [25] eine Arbeit über ChIL-12 veröffentlicht. In dieser Arbeit wird diskutiert, dass ChIL-12 nur eine biologische Aktivität aufweist, wenn es als Heterodimer vorliegt. Dies kann durch die im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Daten nicht bestätigt werden.

Mit dem Überstand von mit ChIL-12p40pMTV5-Flag transfizierten und induzierten SL-3 Zellen konnte im Bioassay eine deutliche $\text{IFN}\gamma$ Produktion hervorgerufen werden. Als Negativkontrolle diente hierbei Überstand von nicht transfizierten SL-3 Zellen, die genau wie die transfizierten Zellen induziert wurden. Mit der Negativkontrolle konnte keine $\text{IFN}\gamma$ Produktion erreicht werden, es ist von daher auszuschließen, dass dieses Ergebnis durch Bestandteile der Stoffwechselprodukte der Zellen oder durch Medien oder Medienzusätze zustande kam.

Bei Mäusen wird IL-12p40-Homodimer physiologischerweise produziert, bindet an den $\text{IL-12R}\beta 1$ und hemmt somit kompetitiv das IL-12-Heterodimer [90]. Beim Menschen binden sowohl humanes als auch murines IL-12p40 Homodimer mit einer deutlich niedrigeren Affinität als IL-12 Heterodimer an den $\text{IL-12R}\beta 1$. Es konnte allerdings nie eine p40 Homodimer-Produktion bei nichttransfizierten humanen Zellen beobachtet werden, auch nicht in Situationen, in denen viel IL-12p40 Monomer produziert wurde. Beim Menschen ist IL-12p40 Homodimer also kein natürlicher Antagonist zu IL-12 Heterodimer [17].

Von daher muss die Rolle der IL-12p40 Kette bzw. des IL-12p40 Homodimers noch genau untersucht werden. Es ist durchaus möglich, dass p40-Monomer oder p40-Homodimer beim Huhn nicht kompetitiv als Rezeptorblocker, sondern als induzierender Ligand wirken.

Da sich die Klonierung des ChIL-12p35 so schwierig gestaltete, war eine Untersuchung der biologischen Wirksamkeit des eukaryotisch exprimierten Flexi-ChIL-12-Flag leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Eine genaue Untersuchung der Wirkung des Flexi-ChIL-12 auf Milzleukozyten im Vergleich zur Wirkung von ChIL-12p40 wird sicher nähere Erkenntnisse über die Mechanismen der Rezeptor-Ligand-Interaktion beim Huhn geben. In Assays, in welchen ChIL-12p40 und Flexi-ChIL-12 gemeinsam eingesetzt werden, wird sich zeigen, ob die p40-Kette bzw. das p40-Homodimer eine inhibitorische oder kostimulatorische Wirkung hat.

6.6 Ausblick

Nachdem es gelungen ist, Flexi-ChIL12-Flag zu exprimieren, es aber leider auf Grund der Zeit nicht mehr möglich war, für diese Arbeit eine Analyse der biologischen Wirksamkeit zu erstellen, bieten sich in der Zukunft gute Möglichkeiten, die $\text{IFN}\gamma$ induzierende Wirkung des Zytokins näher zu studieren.

Es sind mittlerweile auch viele Reagentien zur Untersuchung des T_H1 Systems beim Huhn vorhanden, so dass die Interaktion der Zytokine und die Auswirkungen auf das Immunsystem *in vitro* und *in vivo* untersucht werden können.

Hierbei ist besonders das Zusammenspiel der T_H1 Zytokine IL-12, IL-18 und $\text{IFN}\gamma$ interessant, die alle schon kloniert, exprimiert und zumindest zum Teil charakterisiert sind [73, 25, 26]. Bei der Untersuchung der $\text{IFN}\gamma$ -induzierenden Wirkung von IL-18 beim Säuger wurde festgestellt, dass die Induktion IL-12 abhängig ist [60]. Bei der Untersuchung des Hühner IL-18 stellte sich ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Makrophagen in der Kultur und der Synthese von $\text{IFN}\gamma$, auf Stimulation mit IL-18 hin, dar. Es wurde vermutet, dass die Makrophagen auf IL-18-Stimulation hin IL-12 produzieren und die beiden Interleukine gemeinsam $\text{IFN}\gamma$ induzieren [30]. Dieser Zusammenhang kann nun, nachdem die nötigen Reagentien zur Verfügung stehen, näher untersucht werden.

Die anderen Zytokine der IL-12 Familie werden voraussichtlich das Bild des T_H1 -Systems beim Huhn abrunden, wenn sie identifiziert und kloniert werden.

Für die Entwicklung neuer Impfstoffe gegen intrazelluläre Pathogene, wie beispielsweise Salmonellen oder Kokzidien, sollte auf jeden Fall die Aktivität des IL-12 als Adjuvans und seine Auswirkungen auf die Immunmodulation zur Ausprägung einer T_H1 -Antwort näher untersucht werden.

Kapitel 7

Zusammenfassung

IL-12, ein heterodimeres Zytokin bestehend aus IL-12p40 und IL-12p35, wird hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems als Antwort auf intrazelluläre Pathogene gebildet und induziert eine T_H1 vermittelte Immunreaktion.

Hühner IL-12p40 wurde in einer EST-Datenbank identifiziert und vollständig kloniert. Der Vergleich des Hühner IL-12p40 Gens mit verschiedenen Säugerhomologen ergab Aminosäureidentitäten von 39,7% bis 43,5%. In der Hühnergenomsequenz wurde das IL-12p40 Gen auf Chromosom 13 lokalisiert, es ist 4898bp lang und besteht aus fünf Exons und vier Introns. Der korrespondierende offene Leserahmen besteht aus 945bp und kodiert für ein 315 Aminosäuren langes Protein.

ChIL-12p40 wurde sowohl in prokaryotischen als auch in einem eukaryotischen System exprimiert und unter denaturierenden bzw. nativen Bedingungen aufgereinigt.

Mit Hilfe des aus *E. coli* gewonnen ChIL-12p40 wurde ein polyklonales Kaninchen- α -ChIL-12p40 Antiserum entwickelt, das sowohl ChIL-12p40 aus prokaryotischem Expressionssystem als auch aus dem eukaryotischen Schneider SL-3-System erkennt und im Westernblot ChIL-12p40-Mengen bis zu 7,5ng detektiert.

Die Klonierung der Hühner IL-12p35 Kette mit Hilfe von PCR mit Oligonukleotiden, spezifisch für hochkonservierte Regionen in Säugerhomologen, war nicht erfolgreich. Erst nach der Veröffentlichung der Hühnergenomsequenz konnte das Hühner IL-12p35 Gen auf Chromosom 9 identifiziert werden. Die genomische Sequenz ist 1797bp lang und besteht aus fünf Exons und vier Introns. Die kodierende Region ist 615bp lang und kodiert für ein 205 Aminosäuren langes Protein, das 26,8% bis 31,2% Identität zum Säuger aufweist.

Die Gene für Hühner IL-12p40 und IL-12p35 wurden durch einen Linker hintereinander kloniert und als IL-12p40/p35 „Flexi-IL-12“ exprimiert. Zur Analyse der Expression von IL-12p40 wurde RT-PCR auf cDNA Proben

durchgeführt, die von verschiedenen Zelllinien, Geweben sowie stimulierten und unstimulierten Zellen stammten. IL-12p40 Signale wurden in HD-11-, RP9-, 2D8-, T16G5-, JJ1G9-, OU2-, CEC32-Zellen und mit IL-2 stimulierten Milzleukozyten detektiert. Zur weiteren Kontrolle wurde auch IFN γ und IL-18 per PCR nachgewiesen.

In einem *in vitro* Zellsystem wurde nachgewiesen, dass das rekombinant hergestellte Hühner IL-12p40 konzentrationsabhängig Milzzellen zur Sekretion von IFN γ stimuliert.

Kapitel 8

Summary

Cloning, expression and functional analysis of Chicken-Interleukin-12

IL-12, a heterodimeric cytokine composed of IL-12p40 and IL-12p35, is mainly produced by cells of the innate immune system in response to intracellular pathogens. It induces a T_H1 -mediated immune reaction.

Chicken IL-12p40 was identified in an EST-Database and a clone was isolated full length.

Comparison of the chicken IL-12p40 with the homologue in mammals showed amino acid identities of 39,7% to 43,5%. In the chicken genome sequence the IL-12p40 gene was localised on chromosome 13 with a length of 4898bp. It consists of five exons and four introns. The corresponding open reading frame is 945bp long and encodes a protein of 315 amino acids.

Recombinant ChIL-12p40 was expressed as well in prokaryotic as in the eukaryotic systems and cleaned up as well under native and denaturing conditions.

Using the ChIL-12p40 expressed in *E. coli*, a polyclonal rabbit- α -ChIL-12p40-antiserum was raised which recognizes ChIL-12p40 expressed in the prokaryotic system as well as in the eukaryotic Schneider SL-3 system. It detects ChIL-12p40 in Westernblots up to 7,5ng.

Cloning of ChIL-12p35, using oligos specific for the mammalian homologues, was not successful. Only after publication of the chicken genome sequence IL-12p25 was identified on chromosome 9. The genomic sequence is 1797bp long and consists of five exons and four introns. The coding region is 615bp long and encodes for a protein of 305 amino acids. The percentage of identical amino acids, compared to the mammalian homologues, ranges between 26,8% and 31,2%. The genes for ChIL-12p40 and ChIL-12p35 were cloned in a single molecule using a linker and expressed as IL-12p40/IL-12p35 flexi. To analyse the expression of ChIL-12p40, PCR was performed on cDNAs deriving from several cell-lines, tissues, stimulated and not stimulated cells. IL-12p40 signals were detected in HD-11-, RP9-, 2D8-, T16G5-, JJ1G9-,

OU2-, CEC32-cells and in IL-2 stimulated splenocytes. For further control, IFN γ and IL-18 were detected via PCR.

ChIL-12p40 was able by its own to induce the IFN γ production by splenocytes.

Literaturverzeichnis

- [1] I. Abdrakhmanov, D. Lodygin, P. Geroth, H. Arakawa, A. Law, J. Plachy, B. Korn, and J. M. Buerstedde. A large database of chicken bursal ESTs as a resource for the analysis of vertebrate gene function. *Genome Research*, 10, 2000.
- [2] L.C. Afonso, T.M. Scharton, L.Q. Vieira, Wysocka M., Trinchieri G., and Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*, 5144(263), January 1994.
- [3] S. Aggarwal, N. Ghilardi, M. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney. Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, 278, January 2003.
- [4] I. Airoidi, G. Gri, J.D. Marshall, A. Corcione, P. Facchetti, R. Guglielmino, G. Trinchieri, and V. Pistoia. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *Journal of Immunology*, 12(165), December 2000.
- [5] S. Akira. Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 15, 2003.
- [6] Shizuo Akira and Kiyoshi Takeda. Toll-like Receptor Signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4, July 2004.
- [7] L. Alexopoulou et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *NATURE*, 413(18), October 2001.
- [8] M. Aste-Amezaga, X. Ma, A. Sartori, and G. Trinchieri. Molecular Mechanisms of the Induction of IL-12 and Its Inhibition by IL-10. *Journal of Immunology*, 160, 1998.
- [9] C.M. Bacon et al. Interleukin 12 induces tyrosin phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, November 1995.

- [10] B. Becher, B.G. Durell, and R.J. Noelle. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 2002.
- [11] M.P. Belvin and K.V. Anderson. A conserved signaling pathway: The *Drosophila* Toll-Dorsal Pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12, 1996.
- [12] M. Buettner et al. Detection, cDNA cloning and sequencing of canine Interleukin 12. *Cytokine*, 10(4), April 1998.
- [13] Bundesgesetzblatt Jahrgang 2001. Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-Verordnung). Technical report, Bundesrepublik Deutschland, 2001. Teil I Nr. 16.
- [14] M.M. Camargo et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *Journal of Immunology*, 159, December 1997.
- [15] M.M. Camargo et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *Journal of Immunology*, 158, June 1997.
- [16] E. Cario and D.K. Podolsky. Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infection and Immunity*, 68(12), December 2000.
- [17] G. Carra, F. Gerosa, and G. Trinchieri. Biosynthesis and Posttranslational Regulation of Human IL-12. *Journal of Immunology*, 164, 2000.
- [18] J. T. Chang, B. M. Segal, K. Nakanishi, H. Okamura, and E. M. Shevach. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN- γ production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor β 2-subunit. *European Journal of Immunology*, 30(4), April 2000.
- [19] A.O. Chua, V.L. Wilkinson, D.H. Presky, and U. Gubler. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *Journal of Immunology*, 155, November 1995.
- [20] E.M. Cooper et al. Mice Lacking Bioactive IL-12 Can Generate Protective, Antigen-Specific Cellular Responses to Mycobacterial Infection Only if the IL-12 p40 Subunit Is Present. *Journal of Immunology*, 168, February 2002.

- [21] D.J. CUA et al. Interleukin-23 rather than Interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, February 2003.
- [22] A. D'Andrea, M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Human Lymphocyte Interferon γ -Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory Factor/IL-12 Synthesis in Accessory Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 178, September 1993.
- [23] A. D'Andrea, X. Ma, M. Aste-Amezaga, C. Paganin, and G. Trinchieri. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral-blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor-necrosis factor- production. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 1995.
- [24] A. D'Andrea et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*, 176, November 1992.
- [25] W. G. J. Degen et al. Identification and Molecular Cloning of Functional Chicken IL-12. *Journal of Immunology*, 172, April 2004.
- [26] M.R. Digby and J.W. Lowenthal. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *Journal of Interferone and Cytokine Research*, 15(11), November 1995.
- [27] R. T. Gazzinelli et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*, 153, 1994.
- [28] R. T. Gazzinelli et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . *Journal of Immunology*, 157, 1996.
- [29] A.T. Gewirtz, T.A. Navas, S. Lyons, P.J. Godowski, and J.L. Madara. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *Journal of Immunology*, 167, August 2001.
- [30] T.W. Goebel, K. Schneider, B. Schaerer, I. Mejri, F. Puehler, S. Weigend, P. Staeheli, and B. Kaspers. IL-18 Stimulates the Proliferation and IFN- γ Release of CD4⁺ T Cells in the Chicken: Conservation of a Th1-Like System in a Nonmammalian Species. *Journal of Immunology*, 171, August 2003.

- [31] U. Grohmann, M.L. Belladonna, R. Bianchi, C. Orabona, E Ayroldi, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity*, 3(9), September 1998.
- [32] F.P. Heinzel, D.S. Schoenhaut, R.M. Rerko, L.E. Rosser, and L. E. Gately. Recombinant Interleukin 12 Cures Mice Infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine*, 17, May 1993.
- [33] H. Hemmi, T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. Small anti-viral compounds activate immune cells *via* the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2), February 2002.
- [34] M. Hirschfeld et al. Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages. *Infection and Immunity*, 69(3), March 2001.
- [35] C.A. Jr. Janeway and R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 2002.
- [36] J.A. Janeway and P. Travers. *Immunologie*. Spektrum, 2002.
- [37] D. Jankovic, M.C. Kullberg, S. Hieny, P. Caspar, C. M. Collazo, and A. Sher. In the Absence of IL-12, CD4+ T Cell Responses to Intracellular Pathogens Fail to Default to a Th2 Pattern and Are Host Protective in an IL-10-/- Setting. *Journal of Experimental Medicine*, 16(3), March 2002.
- [38] T. Kaisho and S. Akira. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1589(1), February 2002.
- [39] M. H. Kaplan, T. Sun, Y. L. and Hoey, and M. J. Grusby. Impaired IL-12 responses and enhanced development of TH2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382, 1996.
- [40] M. Kobayashi et al. Identification and purification of Natural Killer Cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 170(3), September 1989.
- [41] M. Kubin, M. Kamoun, and G. Trinchieri. Interleukin 12 Synergizes with B7/CD28 Interaction in Inducing Efficient Proliferation and Cytokine Production of Human T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 180, July 1994.
- [42] A.G. Lamont and L. Adorini. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *TRENDS Immunology Today*, 17(5), May 1996.

- [43] G. Le Gros, S.Z. Ben-Sasson, R. Seder, F.D. Finkelman, and W.E. Paul. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells. *Journal of Experimental Medicine*, 172, September 1990.
- [44] P. Ling, K.M. Gately, U. Gubler, A.S. Stern, P. Lin, K. Hollfelder, C. Su, E.Y. Pan, and J. Hakimi. Human IL-12 p40 Homodimer Binds to the 11-12 Receptor but Does Not Mediate Biologic Activity. *Journal of Immunology*, 154, January 1995.
- [45] X. Ma, J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. The Interleukin 12p40 Gene Promoter Is Primed by Interferon γ in Monocytic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 183, January 1996.
- [46] R. Manetti et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *Journal of Experimental Medicine*, 177(4), April 1993.
- [47] R. Manetti et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *Journal of Experimental Medicine*, 179, April 1994.
- [48] S. Maruo et al. IL-12 produced by antigen-presenting cells induces IL-2-independent proliferation of T helper cell clones. *Journal of Immunology*, 156, March 1996.
- [49] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and J. A. Jr. Janeway. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 1997.
- [50] T.R. Mosmann and R.L. Coffman. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, 7, April 1989.
- [51] A.C. Mullen et al. Role of T-bet in Commitment of TH1 Cells Before IL-12-Dependent Selection. *Science*, 292(5523), June 2001.
- [52] E.E. Murphy, G. Terres, S.E. Macatonia, C.S. Hsieh, J. Mattson, L. Lanier, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. Murphy, and A. O'Garra. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon γ production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *Journal of Experimental Medicine*, 180, July 1994.
- [53] M. Muzio and A. Mantovani. Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *Journal of Endotoxin Research*, 7(4), 2001.

- [54] M. Muzio et al. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *Journal of Immunology*, 164, June 2000.
- [55] M. Nakahira et al. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- γ gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN- γ promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *Journal of Immunology*, 168, March 2002.
- [56] K. Nakanishi, T. Yoshimoto, H. Tsutsui, and H. Okamura. Interleukin-18 regulates both T_H1 and T_H2 responses. *Annual Review of Immunology*, 19, April 2001.
- [57] Nicos A. Nicola. *Guidebook to Cytokines and Their receptors*. Oxford University Press, 1994.
- [58] L. Nicolson et al. Cloning and sequencing of horse interleukin-12 and interleukin-18 cDNAs. *Immunogenetics*, 50(1-2), October 1999.
- [59] T. Ohteki, T. Fukao, K. Suzue, C. Maki, M. Ito, M. Nakamura, and S. Koyasu. Interleukin 12-dependent Interferon γ Production by CD8 α^+ Lymphoid Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 189(12), June 1999.
- [60] H. Okamura, H. Ttsi, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, and K. Hattori et. al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*, 88(378), 1995.
- [61] F. Okano, M. Satoh, and K. Yamada. Cloning and Expression of the cDNA for Canine Interleukin-12. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 17(11), November 1997.
- [62] B. Oppmann et al. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity*, 13(5), November 2000.
- [63] A. Ozinsky et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *PNAS*, 97(25), December 2000.
- [64] C. Parham et al. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *Journal of Immunology*, 168, June 2002.
- [65] B. Perussia, S.H. Chan, A. D'Andrea, K. Tsuji, D. Santoli, M. Pospisil, D. Young, S.F. Wolf, and G. Trinchieri. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of

- TCR- $\alpha\beta^+$, TCR- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes, and NK cells. *Journal of Immunology*, 149, December 1992.
- [66] S. Pflanz et al. IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4⁺ T Cells. *Immunity*, 16, June 2002.
- [67] D.H. Presky, H. Yang, L.J. Minetti, A.O. Chua, N. Nabavi, C.Y. Wu, M.K. Gately, and U. Gubler. IA functional interleukin 12 receptor complex is composed of two α -type cytokine receptor subunits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, November 1996.
- [68] L. Rogge, L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D.H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia. Selective Expression of an Interleukin-12 Receptor Component by Human T Helper 1 Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 185(5), March 1997.
- [69] T. M. Scharton-Kersten et al. In the absence of endogenous IFN- γ , mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *Journal of Immunology*, 157, November 1996.
- [70] V.E.C.J. Schijns, C.M.H. Wierda, T.W. Vahlenkamp, and M.C. Horzinek. Molecular cloning of cat interleukin-12. *Immunogenetics*, 45, April 1997.
- [71] P. Schmid et al. Interleukin-12 p35 encoding gene of cattle and sheep harbours a polymeric T stretch in intron 4. *Animal genetics*, 31(4), August 2000.
- [72] K. Schneider, S. Kothlow, P. Schneider, A. Tardivel, T. Goebel, and P. Kaspers, B. Staeheli. Chicken BAFF—a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. *International Immunology*, 16(1), January 2004.
- [73] K. Schneider, F. Puehler, D. Baeuerle, S. Elvers, P. Staeheli, B. Kaspers, and K.C. Weining. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 20, 2000.
- [74] D.S. Schoenhaut et al. Cloning and detection of murine IL-12. *Journal of Immunology*, 148(11), June 1992.
- [75] R.A. Seder, B.L. Kelsall, and D. Jankovic. Commentary: Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease. *Journal of Immunology*, 157, October 1996.
- [76] S. Sivori et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(27), July 2004.

- [77] A. Snijders, C. M. U. Hilkens, T. C. T. M. van der Pouw Kraan, M. Engel, L.A. Aarden, and M. Kapsenberg. Regulation of Bioactive IL-12 Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes Is Determined by the Expression of the p35 Subunit. *Journal of Immunology*, 156, February 1996.
- [78] C. R. Sousa et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin-12 by dendritic cells and their redistribution to T-cell areas. *Journal of Experimental Medicine*, 186, 1997.
- [79] Statistisches Bundesamt. Eierzeugung. Technical report, Statistisches Bundesamt Deutschland, 2003. Aktualisiert am 21. Juli 2004, verfügbar unter <http://www.destatis.de/basis/d/forst/forsttab18.php>.
- [80] Statistisches Bundesamt. Geflügelfleischerzeugung. Technical report, Statistisches Bundesamt Deutschland, 2003. Aktualisiert am 21. Juli 2004, verfügbar unter <http://www.destatis.de/basis/d/forst/forsttab19.php>.
- [81] A.S. Stern et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, September 1990.
- [82] R.S. Sundick and C. Gill-Dixon. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *Journal of Immunology*, 159(2), July 1997.
- [83] S.J. Swinburne, G.R. Russ, and R. Krishnan. Ovine Interleukin 12 has biological activity on ovine and human activated peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, 12(10), October 2000.
- [84] S. J. Szabo, A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. Regulation of the interleukin (IL)-12R 2-subunit expression in developing T helper 1 (TH1) and TH2 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 185(5), March 1997.
- [85] W. E. Thierfelder et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 382, 1996.
- [86] L. Tirunagaru, V. G. and Sofer, J. Cui, and J. Burnside. An expressed sequence tag database of T-cell-enriched activated chicken splenocytes: sequence analysis of 5251 clones. *Genomics*, 66, 2000.
- [87] G. Trinchieri, S. Pflanz, and R.A. Kastelein. The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Response. *Immunity*, 19, November 2003.

- [88] Giorgio Trinchieri. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Advances in Immunology*, 70, 1998.
- [89] Giorgio Trinchieri. Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3, February 2003.
- [90] X. Wang et al. Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits. *European Journal of Immunology*, 29, 1999.
- [91] A.K. Wesa and A. Galy. IL-1 β induces dendritic cells to produce IL-12. *International Immunology*, 13(8), 2001.
- [92] D.S. Zarlenga et al. Enzymatic amplification and molecular cloning of cDNA encoding the small and large subunits of bovine interleukin 12. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1270(2-3), April 1995.

Anhang A

Materialquellen

Verwendete Chemikalien und Reagenzien. Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend folgender Tabelle im Kapitel 4 „Material und Methoden“, integriert.

1. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
2. AppliChem, Darmstadt
3. Biochrom, Berlin
4. Bio-Rad, München
5. Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, Kalifornien, USA
6. Invitrogen, Karlsruhe
7. Macherey-Nagel, Düren
8. MBI Fermentas, St. Leon-Rot
9. Merck, Darmstadt
10. MWG, Ebersberg
11. New England Biolabs, Frankfurt/Main
12. Packard, Dreieich
13. Pierce, Rockford Illinois, USA
14. Qiagen, Hilden
15. Ratiopharm, Ulm
16. Roche Diagnostics, Mannheim
17. Schleicher und Schuell, Dassel

18. Serva, Heidelberg
19. Sigma, Deisenhofen
20. Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
21. Stratagene, Amsterdam, NL
22. Whatman, Maidstone, GB
23. Biontex, München

Anhang B

Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Brutschrank	CO2-Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Elektroblotter	Multiphor II, Biochrom 2103 Power Supply	LKB Pharmacia
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Gel Dokumentation	Gel Doc 2000 Software: Quantity One 4.1.1	BioRad, München
Mikroskop	Leica DMR	Leica, Bensheim
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz-Küvette	Sigma, Deisenhofen
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac 300	BioRad, München
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH, Hechingen
SDS-Gel-Gießkammer	BioRad mini Protean II	BioRad, München
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermocycler	Biometra, TRIO Heated Lid	Biotron, Göttingen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei den Damen und Herren der DFG, durch deren Förderung diese Arbeit erst ermöglicht wurde. Bei Herrn Prof. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herzlichen Dank auch an Dr. Josef Cihak für das gute Arbeitsklima im gemeinsamen Büro.

Bei Ursula Holter, Melanie Lorenz, Ramona Schmitt, Ingrid Riehl, Beatrice Schaerer und Bärbel Amman bedanke ich mich für die technische Unterstützung und die Hilfe bei verschiedenen Aufgaben.

Danke an Nadina Ortiz-Brüchle für die geleistete Vorarbeit.

Dr. Sonja Kothlow, Grammatia Dalamani, Albert Raith, Thomas Schmalzl, Iris Morgenroth, Stefan Härtle, Yvonne Gräf, Dr. Ike Breyer und Reinhard Klaas- danke für die vielen aufmunternden Worte, unzählige Liter Kaffee und einige geschnorrte Zigaretten. Ohne Euch wäre es nicht gewesen, was es war!

Bei Herrn Thomas Häfner bedanke ich mich fürs Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Dr. Harald Störrle möchte ich mich für den 24-Stunden Service bei allen Problemen im Umgang mit L^AT_EX bedanken- Du hast mich überzeugt!

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Hannelore Bürkle, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen meines Studiums beigetragen hat.

Ein großes Danke auch an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und immer ein offenes Ohr für Sorgen, Probleme und Träume haben.