

Herstellung von kaninem Interleukin-2 (cIL-2) nach stabiler Transfektion der mesenchymalen BHK-Zelllinie mit Hilfe des Tet-on-Expressionssystems zur Erzeugung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) für eine adoptive Tumorummuntherapie beim Hund

Sandra Sara Preis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. Eberhard Burkhardt

**Herstellung von kaninem Interleukin-2 (cIL-2) nach
stabiler Transfektion der mesenchymalen BHK-Zelllinie
mit Hilfe des Tet-on-Expressionssystems
zur Erzeugung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) für
eine adoptive Tumormimmuntherapie beim Hund**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von
Sandra Sara Preis
Tierärztin aus Zweibrücken

Giessen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. E. Burkhardt

Prof. Dr. J. Roth

Tag der Disputation: 12. November 2008

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ der Justus-Liebig-Universität Giessen und wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Ich erkläre:

Ich habe vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Tumorimmuntherapie	3
2.1.1	Adoptive Tumorimmuntherapie mit IL-2 und Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) beim Menschen	4
2.1.2	Adoptive Tumorimmuntherapie beim Hund	7
2.2	Interleukin-2 (IL-2)	9
2.2.1	Charakteristika des Gens und des Proteins	9
2.2.2	IL-2-Rezeptor	10
2.2.3	Wirkung von IL-2	11
2.3	Lymphozytenanreicherung	12
2.4	Stimulation von kaninen Lymphozyten	13
2.5	Proliferationstest mit Methylthiazol-Tetrazolium (MTT)	14
2.6	RT-PCR zur Amplifikation einer Copy-DNA (cDNA) von cIL-2	16
2.7	Tetrazyklinabhängige Expression von Genen	17
2.7.1	Das Tet-off-Expressionssystem	18
2.7.2	Das Tet-on-Expressionssystem	20
2.7.3	Verwendete Regulator- und Response-Plasmide	22
2.7.4	Empfängerzellen des Tet-on-Systems	23
2.8	IL-2-Bioassay	24
2.9	Rose Bengal Assay (RBA)	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Gewinnung der IL-2-Sequenz	27
3.1.1	Blutentnahme und Lymphozytenisolierung mittels einstufiger Percoll®- Dichtegradientenzentrifugation	27
3.1.2	Mitogen-Stimulation der Lymphozyten	28
3.1.3	Überprüfung der Stimulation mit der MTT-Proliferationsmessmethode	29
3.1.4	Gewinnung der mRNA	30
3.1.5	RT-PCR	31
3.1.5.1	DNase-Behandlung	31
3.1.5.2	Auswahl der Primer	32
3.1.5.3	Reverse Transkriptase-Reaktion	33
3.1.5.4	Konventionelle PCR	33
3.1.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.1.5.6	Sequenzierung des RT-PCR-Produktes	35
3.1.6	Klonierung des RT-PCR-Produktes	35
3.1.6.1	Nährmedien und Bakterienstamm	37
3.1.6.2	Klonierungsreaktion	37
3.1.6.3	Restriktionsenzymverdau	38
3.1.6.4	Reklonierung und Sequenzierung des Plasmids	39
3.2	Tet-on-Expression	39
3.2.1	Einbau von Restriktionsschnittstellen in das cIL-2-Gen	39
3.2.1.1	Primer und PCR-Bedingungen	39
3.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.1.3	Isolierung des DNA-Fragmentes	41
3.2.2	Amplifizierung des Reportergens Luciferase und der IRES.....	41
3.2.3	Klonierung und Analyse beider PCR-Fragmente	42
3.2.3.1	Ligation	42
3.2.3.2	Transformation der pGEM-T-Vektoren in <i>E. coli</i> K12 DH5 α	43
3.2.3.3	Mini-Präparation der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES aus Bakterienkulturen	44
3.2.3.4	Analytischer Verdau der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES	44
3.2.3.5	Retransformation ausgewählter pGEM-T-Klone	45
3.2.3.6	Midi-Präparation der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen und DNA-Konzentrationsbestimmung	45

3.2.4	Sequenzierung des pGEM-T-IL2-#1-Klons	46
3.2.4.1	Sequenzieransatz	47
3.2.4.2	Sequenziergel und Auswertung der Sequenz	47
3.2.5	Zusammenbau des Plasmides pTRUE-IL2-IRES	48
3.2.5.1	Restriktionsenzymverdau	49
3.2.5.2	Dephosphorylierung und Phenol-Chloroform-Extraktion des linearisierten Vektors pTRUE	51
3.2.5.3	Dreifachligation	51
3.2.6	Transiente Transfektion von pTRUE-IL-2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen und funktionelle Überprüfung des Reportergens Luciferase	53
3.2.6.1	Zellkulturarbeiten mit BHK-Tet-on-Zellen zur Vorbereitung der Transfektion	55
3.2.6.2	Transiente Transfektion mit Metafectene™	55
3.2.6.3	Luciferase-Assay zur Überprüfung des Reportergens	56
3.2.6.4	Luciferase-Assay am Luminometer	57
3.2.7	Stabile Transfektion von pTRUE-IL-2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen zur Erzeugung einer IL-2-produzierenden Zelllinie	57
3.2.7.1	Zellkulturarbeiten mit BHK-Tet-on-Zellen zur Vorbereitung der Transfektion	57
3.2.7.2	Linearisierung und Aufreinigung des Plasmids pTRUE-IL-2-IRES	58
3.2.7.3	Stabile Transfektion mit Metafectene™	58
3.2.7.4	Klonierung der transfizierten Zellen	59
3.2.7.5	Luciferase-Assay und Auswahl der Klon-Kolonien	60
3.2.7.6	Reklonierung	60
3.2.8	Kryokonservierung der gewonnenen Zell-Klone	60
3.3	RT-PCR zum Nachweis der cIL2-mRNA in den transfizierten BHK-Zellen	61
3.3.1	Vorbereitung und Induktion der transfizierten BHK-Zellen	61
3.3.2	RNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung	62
3.3.3	Ablauf der RT-PCR	63
3.3.3.1	DNase-Vorbehandlung	63
3.3.3.2	Denaturierung	64
3.3.3.3	cDNA-Synthese	64
3.3.3.4	PCR	65
3.3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	66
3.4	Einfluss der Überstände von nicht transfizierten BHK-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität von Effektorzellen	66
3.4.1	Testprinzip des RBA	66
3.4.1.1	Zielzelllinie CTAC	66
3.4.1.2	Gewinnung und Vorbereitung der NK-Effektorzellen	67
3.4.1.2.1	Effektorzellisolierung	67
3.4.1.2.2	Gewinnung der BHK-Testüberstände	67
3.4.1.2.3	Vorbehandlung für 12 Stunden	68
3.4.2	Durchführung des Rose Bengal Assays (RBA)	68
3.4.2.1	Vorbereitung der CTAC-Zielzellen	68
3.4.2.2	Testansatz	68
3.4.2.3	Rose Bengal Färbung	69
3.4.2.4	Berechnung der Zytotoxizität	70
3.5	Quantifizierung des sezernierten rekombinanten kaninen Interleukin-2 im Bioassay (MTT-Test)	70
3.5.1	IL-2-Bioassay mit CTLL-2-Zellen	70
3.5.1.1	CTLL-2-Zelllinie	70
3.5.1.2	Prinzip des Bioassays	72
3.5.1.2.1	BHK-Kulturüberstände	72
3.5.1.2.2	Ansatz des Bioassays	73
3.5.2	Verschiedene Versuchsansätze des Bioassays	74
3.5.2.1	Das Standard-Bioassay	74
3.5.2.2	Koinkubation von CTLL-2-Zellen und transfizierten BHK-Zellen in Transwell®-Einsätzen	74
3.5.2.3	Zusätzliche Bioassays	76
3.5.2.3.1	Zeitlicher Verlauf der rcIL-2-Produktion über 72 h	76

3.5.2.3.2	rcIL-2-Produktion in serumfreiem Kulturmedium	76
3.5.2.3.3	Induktion durch verschiedene Doxyzyklin-Konzentrationen	77
3.5.3	Berechnung der rcIL-2-Konzentration	77
4	Ergebnisse	80
4.1	Gewinnung der cDNA für cIL-2	80
4.1.1	Lymphozytenisolierung und Stimulation	80
4.1.2	Gewinnung der Total-RNA	81
4.1.3	RT-PCR zur Gewinnung der cDNA	82
4.1.4	Sequenzierung des RT-PCR-Produktes	83
4.1.5	Klonierung des RT-PCR-Produktes	85
4.1.6	Sequenzierung des klonierten RT-PCR-Fragmentes	85
4.2	Tet-on-Expression	88
4.2.1	Einbau von Restriktionsenzymstellen durch PCR in cIL-2	88
4.2.2	Analyse der cIL-2- und IRES-Luciferase-Fragmente	89
4.2.3	Sequenzierung des pGEM-T-IL2#1-Klons	91
4.2.4	Zusammenbau von pTRUE-IL2-IRES	93
4.2.5	Transiente Transfektion von pTRUE-IL2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen	98
4.2.6	Stabile Transfektion von pTRUE-IL2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen zur Erzeugung einer cIL-2-produzierenden Zelllinie	99
4.2.7	RT-PCR zum Nachweis der cIL-2-mRNA in den transfizierten BHK-Zellen	102
4.3	Einfluss der Überstände von nicht transfizierten BHK-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität (RBA)	104
4.4	Quantifizierung des sezernierten rekombinanten kaninen IL-2 im Bioassay (MTT-Test)	106
4.4.1	Einfluss unterschiedlich eingesetzter BHK-Zellkonzentrationen und Inkubationszeiten	108
4.4.2	Koinkubation von transfizierten BHK-Linien mit CTLL-2-Zellen in Transwell®-Einsätzen	111
4.4.3	Zeitlicher Verlauf der rcIL-2-Produktion über 72 h	112
4.4.4	rcIL-2-Produktion unter serumfreien Bedingungen	115
4.4.5	Induktion mit verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen	117
5	Diskussion	118
6	Zusammenfassung	129
7	Summary	132
8	Literaturverzeichnis	135
9	Anhang	149
9.1	Tabellen	149
9.2	Bezugsquellen für Chemikalien	181
9.3	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel	184
9.4	Lösungen und Puffer	186

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloblastische Leukämie
BHK	<i>Baby Hamster Kidney Cells</i> (fibroblastische Nierenzelllinie des Goldhamsters)
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaar
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Cluster der (Leukozyten-)Differenzierung)
cDNA	Copy-DNA, DNA-Kopie einer mRNA
cIL-2	Kanines Interleukin-2
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
Con A	Concanavalin A
CTAC	<i>Canine Thyroid Adenocarcinoma Cell Line</i> (Schilddrüsen-Adenokarzinom-Zelllinie vom Hund)
CTLL-2	<i>Cytotoxic T-Cell Lymphoma Cell Line</i> (Zytotoxische T-Zelllinie von der Maus)
Cys	Cystein
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
dest.	Destilliert
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
FasL	Fas-Ligand, Apoptose-auslösender Ligand aus der TNF-Familie
FKS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin, Selektionsantibiotikum
GAPDH	Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
hIL-2	Humanes Interleukin-2
hTNF	Humaner Tumor-Nekrose-Faktor
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-15	Interleukin-15
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i> (Interne Ribosomen-Ansatz-Stelle)
Jak	Janus-Kinasen, Tyrosin-Kinasen, aktivieren STAT-Proteine
kbp	Kilobasenpaare, entspricht 1000 bp
kDa	Kilodalton, atomare bzw. molekulare Maßeinheit
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LB	Luria-Bertani-Medium
LGL	<i>Large Granular Lymphocyte</i> (großer granulierter Lymphozyt)

Abkürzungsverzeichnis

MEME	Minimum Essential Medium Eagle's mit Earl's Salzen, Gewebekulturmedium
MTP	Mikrotiterplatte, 96-Loch-Platte
MTT	Methylthiazol-Tetrazolium
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i> (zusammenfassende Bezeichnung für aktivierende Rezeptoren und Korezeptoren zur Vermittlung zytotoxischer Funktionen von NK-Zellen)
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Offener Leserahmen)
PAC	Puromycin, Selektionsantibiotikum
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>Phosphate Buffered Salin</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pEF	Regulator-Plasmid im Tet-on-System (trägt den Promotor <i>Human Elongation Factor 1a</i>)
PHA	Phytohämagglutinin
Pro	Prolin
pTRUE	Response-Plasmid im Tet-on-System
RBA	Rose Bengal Assay
rcIL-2	Rekombinantes kanines Interleukin-2
rhIL-2	Rekombinantes humanes Interleukin-2
rIL-2	Rekombinantes Interleukin-2
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Gewebekulturmedium
RT	Raumtemperatur
<i>retR</i>	Reverser Tetrazyklinrepressor
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rtTA	Reverser tetrazyklinkontrollierter Transaktivator
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
Ser	Serin
SI	Stimulationsindex
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> (zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren)
TBE	Tris-gepufferte Borsäure-EDTA-Lösung
TCGF	<i>T-cell growth Factor</i> , heute Interleukin-2
TCR	T-Zell-Rezeptor
<i>tetO</i>	Tetrazyklinoperator
Tet-off	Tet-off-System, Induktion der Proteinproduktion durch das Entfernen von Tetrazyklin oder einem Analogon (z.B. Doxyzyklin)
Tet-on	Tet-on-System, Induktion der Proteinproduktion durch die Zugabe von Tetrazyklin oder einem Analogon (z.B. Doxyzyklin)
<i>tetR</i>	Tetrazyklinrepressor
T _H 1	T-Helferzellen, Subtyp 1
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor, Apoptose-auslösendes Zytokin

TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand</i> (Apoptose-auslösender Ligand aus der TNF-Familie)
TRE	<i>Tetracyclin-responsive Element</i> (auf Tetrazyklin reagierendes Element)
Trp	Tryptophan
tTA	Tetrazyklinkontrollierter Transaktivator
VP16	Virionprotein 16 des humanen Herpes simplex-Virus

1 EINLEITUNG

Die Tumorthherapie hat in der Tiermedizin in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Besonders der Hund spielt als Tumorpatient eine große Rolle – nicht nur aufgrund seines sozialen Ranges als „Bester Freund des Menschen“. Er stellt wegen seiner hohen Prävalenz von Spontanumoren sowie deren biologischem Wachstumsverhalten ein Modell für humane Tumortherapieansätze dar.

Neben den klassischen Tumortherapien wie der chirurgischen Exzision, Strahlen- oder Chemotherapie handelt es sich bei der Bio- oder Immuntherapie von Tumoren um einen relativ jungen Therapiezweig. Die Tumormimmuntherapie bedient sich der verschiedensten körpereigenen Abwehrmechanismen wie zum Beispiel tumorspezifischer Antikörper. Aber auch zwischen dem zellulären Immunsystem und Tumoren bestehen mannigfaltige spezifische Wechselwirkungen, die genutzt werden können. Besonders die Natürlichen Killerzellen (NK) spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Tumoren (Helfand et al., 1994; Britten et al., 1996). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht an einen vorausgegangenen primären Antigenkontakt mit Tumorzellen gebunden sind. Sie können neoplastische Zellen bereits beim ersten Kontakt spontan abtöten. Durch Stimulation mit Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2) werden NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen zu Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK), die sich durch eine höhere Proliferationstätigkeit und eine gesteigerte zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen auszeichnen.

Bei der adoptiven Immuntherapie spielt der Transfer von immunologischen Faktoren, die eine antitumorale Aktivität besitzen bzw. direkt oder indirekt antitumorale Effekte vermitteln (Rosenberg, 1991), die entscheidende Rolle. Zu diesen Faktoren zählen auch verschiedene Immunzellen wie die NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen oder LAK-Zellen.

Zur optimalen *in vitro*-Stimulation der NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen ist die Zugabe von IL-2 unerlässlich. Diese erfolgt unter Kulturbedingungen zu bestimmten Zeitpunkten, was große Schwankungen der IL-2-Konzentration im Zellkulturmedium zu Folge hat. Die Bedingungen zur Erzeugung von LAK *in vivo* sehen jedoch anders aus. T_H1-Zellen produzieren über einen entsprechenden Zeitraum kontinuierlich Interleukin-2, bewirken also eine relativ konstante Aufrechterhaltung der IL-2-Konzentration.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Zelllinie molekularbiologisch so zu verändern, dass sie permanent kanines Interleukin-2 (cIL-2) in den Zellkulturüberstand abgibt, um so eine relativ konstante IL-2-Konzentration im Kulturmedium zu erreichen und damit *in vivo*-Bedingungen

möglichst nahe zu kommen. Dazu wurde die mesenchymale Zelllinie BHK, die im nativen Zustand keinerlei zytokin-ähnliche Substanzen sezerniert, mit der cDNA-Sequenz für cIL-2 und dem Tet-on-Expressionssystem transfiziert. In diesem Expressionssystem können einklonierte Gene durch einen speziellen Schaltermechanismus „angeschaltet“, also exprimiert werden. Das Anschalten erfolgt durch die Zugabe von Doxyzyklin zum Zellkulturmedium.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit die Menge und die biologische Aktivität des so produzierten cIL-2 überprüft werden. Dazu wurde die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL-2 eingesetzt und deren Wachstums- und Proliferationsverhalten in den cIL-2-haltigen Überständen der transfizierten BHK-Zellen untersucht.

Der Einsatz der transfizierten BHK-Zelllinie soll in der *in vitro*-Stimulation von NK-Zellen aus Tumorpatienten erfolgen. Durch eine Koinkubation in einem Bioreaktor können beide Zellpopulationen getrennt voneinander kultiviert werden (Falkenberg et al., 1995). Eine semipermeable Membran mit einer entsprechenden Ausschlussgrenze ermöglicht jedoch den Übertritt von cIL-2 aus dem Produktionsabteil in das Kompartiment mit den zu stimulierenden NK-Zellen. Diese nun zu LAK stimulierten, autologen Zellen können dem Patienten im Zuge der adoptiven Tumorimmuntherapie wieder verabreicht werden, der somit nicht mit xenogenen Zellen oder Stoffen in Berührung kommt. Auch könnte auf diese Weise der Einfluss von blockierenden Faktoren der Tumorzellen oder von die Immunantwort herabregulierenden Regulatorzellen auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen umgangen werden, wie dies häufig bei *in vivo*-Immunreaktionen gegen Tumoren zu beobachten ist.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Tumorimmuntherapie

Während die Behandlung von Tumorerkrankungen durch chirurgische Exzession schon seit langem praktiziert wurde, führten verschiedene Entdeckungen erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts zur Entwicklung der Strahlentherapie (Binkley, 1929; Simmons, 1930) und der Chemotherapie (Goodman, 1946; Rhoads, 1946) bei inoperablen Tumoren.

Die Tumorimmuntherapie hingegen entwickelte sich erst seit den frühen Sechzigern des 20. Jahrhunderts, nachdem bahnbrechende neue Erkenntnisse über die Zusammenhänge und die beteiligten Zellpopulationen des Immunsystems gewonnen worden waren. Allerdings wurden die ersten Beobachtungen bezüglich des antitumoralen Potenzials körpereigener Funktionen von dem New Yorker Chirurgen William B. Coley bereits Ende des 19. Jahrhunderts gemacht. Er bemerkte, dass einige Patienten mit einer streptokokkeninduzierten Wundrose eine Regression ihrer Tumoren zeigten (Coley, 1893), und setzte gezielt eine „Toxinmischung“, einen Extrakt aus Streptococcus und Serratia, als begleitende Therapie z.B. bei Osteosarkom-Patienten ein, die zuvor chirurgisch behandelt wurden (Coley, 1907). Er machte jedoch antitumorale Effekte der Mikroorganismen selbst für die Tumorregression verantwortlich. Diese als „Coleys Toxin“ bekannt gewordene Bakterienmischung galt lange Zeit als einzige systemische Behandlungsmethode von Tumoren und stellte das erste Tumorimmuntherapeutikum dar (Davis et al., 2003).

Seit dieser Zeit hat die Immuntherapie von Tumoren deutlich an Bedeutung gewonnen. Meilensteine waren dabei die Entdeckung von Tumorantigenen bei Melanomen (Knuth et al., 1989) oder die Erforschung dendritischer Zellen und ihrer Rolle in der Immunantwort (Inaba et al., 1990).

Heute wird die Tumorimmuntherapie als adjuvante Therapie zur konventionellen Tumorbekämpfung oder auch als alleinige Therapie bei inoperablen Tumoren eingesetzt. Dabei werden häufig Tumorstoffe oder auch monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene von Tumoren sowie antigenspezifische und *ex vivo* vermehrte zytotoxische T-Zellen verwendet. Auch unspezifische Stimulantien der Immunantwort kommen zur Anwendung. Hierzu ist das Bacillus Calmette-Guerin zu zählen, das bei Harnblasentumoren erfolgreich eingesetzt wird (Lamm et al., 1991). Die Wirkung dieser

Therapie beruht auf der induzierten Zystitis und der damit verbundenen Aktivierung von Lymphozyten und Zytokinen (Bettex-Galland et al., 1991).

Weiterhin wurden verschiedene Zytokine auf ihre Anwendbarkeit bei Tumorerkrankungen erforscht. Als vielversprechend erwies sich beispielsweise Interferon- α (IFN- α) in der Therapie bestimmter Leukämie-Formen (Quesada et al., 1984). Die Applikation von Zytokinen erfolgt meist systemisch. Andere Verabreichungsformen finden sich in der Injektion von genetisch veränderten Virusvektoren, die das Gen des betreffenden Zytokins tragen und direkt in und um das Tumorgewebe injiziert werden können (Bubenik et al., 1992; Gastl et al., 1992). Bei der Verwendung von Viren als Genvektoren besteht jedoch die Gefahr, dass diese Viren nicht auf das Tumorgewebe beschränkt bleiben, sondern auch in anderen Organen auftreten können. So zeigte sich in verschiedenen Studien, dass diese Viren unter anderem in Ovarien und Hoden sowie in Sperma vorhanden sind (Boyce, 2001). Auch wenn weitere Untersuchungen ergaben, dass die Vektor-DNA in der Regel nicht auf die DNA germinativer Zellen übertragen wird (Arruda et al., 2001; Schuettrumpf et al., 2006), sind die Folgen nicht abzusehen. Die daraus resultierenden potentiellen Gefahren limitieren den Einsatz von Virusvektoren.

Die Aerosol-Therapie stellt eine weitere Möglichkeit der lokal begrenzten Applikation von Zytokinen dar. So konnte beispielsweise IL-2 in vernebelter Form als Liposomen erfolgreich sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin bei Bronchialkarzinomen und Lungenmetastasen von Mamma- und Nierenzellkarzinomen eingesetzt werden (Huland et al., 1992; Huland et al., 1994; Zhang und Liu, 1994; Khanna et al., 1996; Khanna et al., 1997).

2.1.1 Adoptive Tumorimmuntherapie mit IL-2 und Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) beim Menschen

Die adoptive Tumorimmuntherapie wird definiert als Transfer immunologisch aktiver Faktoren mit antitumoraler Aktivität, die direkte oder indirekte Vermittler antitumoraler Effekte sind, auf Tumorpatienten (Rosenberg, 1991).

Die erste adoptive Tumorimmuntherapie führten Rosenberg et al. 1985 mit *in vitro* stimulierten autologen Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) und IL-2 bei solchen Patienten mit metastasierenden Melanomen, Kolonkarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Bronchialzellkarzinomen mit Erfolg durch, bei denen alle anderen konventionellen Tumorthérapien versagt hatten (Rosenberg, 1985; Rosenberg et al., 1985).

Bei LAK handelt es sich um stimulierte Natürliche Killerzellen oder um aktivierte zytotoxische T-Zellen. Ihnen kommt als Teil des angeborenen Immunsystems bei der Abwehr von virusinfizierten Zellen sowie neoplastischen Zellen eine besondere Rolle zu, da sie spontan ohne vorausgegangenen Antigen-Kontakt diese Zellen lysieren können. Eine potentielle Zielzelle muss sich durch ihre körpereigene MHC-Signatur ausweisen, um so den Angriff der NK-Zellen abzuwehren ("Missing-self-Hypothese", Karre et al., 1986). Ein primärer Antigen-Kontakt, wie z.B. bei zytotoxischen T-Lymphozyten, ist für die Aktivität der NK-Zellen nicht nötig. Deren Stimulation geschieht durch IL-2, das von T_H1-Zellen produziert wird (Mosmann et al., 1986). LAK zeichnen sich lichtmikroskopisch durch einen größeren Durchmesser als normale Lymphozyten aus. Des Weiteren sind azurophile Granula im Zytoplasma typisch, die sich in der Einbuchtung des nierenförmigen Zellkerns finden. Daher werden diese Zellen auch Large Granular Lymphocytes (LGL) genannt. Sie machen etwa 5 % der im peripheren Blut vorkommenden Lymphozyten aus.

Der direkte Beweis der Bedeutung der LGL bei der Verhinderung von Metastasen wurde durch den adoptiven Transfer von LGL in NK-Zell-defiziente Mäuse erbracht. Diese bildeten nach der Gabe von LGL keine Metastasen aus, während sie ohne Rekonstitution mit LGL zahlreiche Tumormetastasen erkennen ließen (Brittenden et al., 1996).

Dass die spontane zytotoxische Aktivität von LGL und NK-Zellen bei Tumorpatienten herabgesetzt ist, zeigten zahlreiche Studien. Untersucht wurden u.a. Patienten mit Mammatumoren, Leukämien wie chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) oder chronischer myeloischer Leukämie (CML) sowie Karzinome unterschiedlicher Histogenese (Übersicht bei Funk, 2001).

Die Anzahl der isolierten NK-Zellen der Tumorpatienten war allerdings im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen in den meisten Studien nicht signifikant erniedrigt. Daher vermuteten einige Arbeitsgruppen, dass ein Defekt der NK-Zell-Funktion und damit eine verminderte Effektivität gegenüber Tumoren und deren Metastasen vorliegt, die die Entstehung von Tumoren begünstigt. Neueste Untersuchungen zeigten, dass Exosome, die von Tumorzellen abgegeben werden, einen negativen Einfluss auf die Perforin-Sekretion sowie den Zellzyklus von NK-Zellen und damit auf deren zytotoxische Aktivität und Proliferation haben (Jovic et al., 2001; Taylor und Gercel-Taylor, 2005; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2007). Costello et al. (2002) fanden eine fehlerhafte bzw. reduzierte Expression von Natural Cytotoxicity-Rezeptoren (NCR) auf NK-Zellen. Weiterhin konnten abweichende Rezeptorexpressionen auf Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei der akuten

lymphoblastischen Leukämie (ALL) wiesen Inukai et al. (2006) eine verminderte Expression des Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-Rezeptors und eine reduzierte Antwort auf Fas-Ligand (FasL) sowie eine zusätzliche Expression von funktionslosen TRAIL- und FasL-Rezeptoren im Falle der akuten myeloblastischen Leukämie (AML) nach.

Um die Aktivität und Proliferation von NK-Zellen *in vivo* anzuregen, wurden Therapiestudien mit rekombinantem IL-2 (rIL-2) durchgeführt. Der systemische Einsatz von rIL-2 hat sich dabei aufgrund der gravierenden Nebenwirkungen als ungünstig erwiesen. Vor allem die Verwendung von rIL-2 in hohen Dosen bewirkte bei Patienten ein akutes Nierenversagen mit Mikroalbuminämie, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und dadurch ausgedehnte Ödeme („Leakage Syndrome“) bis zum Schock mit Todesfolge sowie eine respiratorische Alkalose (Beldegrun et al., 1987; Textor et al., 1987; Christiansen et al., 1988; Kozeny et al., 1988; Margolin et al., 1989; Mercatello et al., 1991; von der Maase et al., 1991; Schechter und Nagler, 1992). Dies belegen auch Studien, in denen Patienten in systemischer Applikation eine Kombination aus rIL-2 und LAK erhielten (Rosenberg et al., 1985; Albertini et al., 1990; Palmer et al., 1992). Die systemischen Nebenwirkungen waren bei einer Kombinationstherapie von LAK und rIL-2 zum Teil sogar gravierender als bei der Kontrollgruppe, die nur rIL-2 erhielt (Palmer et al., 1992). Rosenberg et al. (1985) fand bei 10 von 25 Patienten, die eine solche Kombinationstherapie erhielten, eine partielle Tumorremission und in einem von 25 eine komplette Remission. In die Studie von Palmer (1992) wurden 327 Patienten aufgenommen. Hier konnte bei der Wirkung auf das Tumorstadium kein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie mit LAK und rIL-2 und der Therapie mit rIL-2 alleine gefunden werden. Dies stand jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen aus Tierversuchen an Mäusen, die den erfolgreichen Einsatz von LAK versprachen (Lafreniere und Rosenberg, 1985; Papa et al., 1986).

Um die systemischen Nebenwirkungen auf den Patienten zu vermeiden, ist daher die Therapie mit LAK ohne IL-2-Gabe zu bevorzugen. Die Anreicherung von LAKs und ihre *in vitro*-Stimulation und Vermehrung mit IL-2 sowie die anschließende Reapplikation zeigte hinsichtlich der Verträglichkeit keine gravierende Nebenwirkungen (Koehl et al., 2004).

2.1.2 Adoptive Tumorimmuntherapie beim Hund

Zur Tumorimmuntherapie beim Hund wurde IL-2 in verschiedenen Therapiestrategien angewendet. Quintin-Colonna et al. (1996) setzten IL-2 lokal ein. Sie injizierten Hunden mit metastasierenden Melanomen, die chirurgisch und mit anschließender lokaler Bestrahlung behandelt wurden, in die vorherige Tumorlokalisierung Vero-Zellen, die einen Expressionsvektor mit dem Gen für humanes IL-2 (hIL-2) trugen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der die Hunde nur chirurgisch mit anschließender Strahlentherapie behandelt wurden, zeigten die Tiere eine verlängerte mittlere Überlebenszeit sowie eine verringerte Rezidivrate. Rochlitz et al. (1998) injizierten ebenfalls Vero-IL-2-Zellen in nicht operable Tumoren. Ein Hund mit einem Weichteilsarkom zeigte daraufhin eine Reduktion von zwei entfernten, nicht behandelten Metastasen um 90 % und 50 %. Als Nebenwirkungen wurden vorübergehendes Fieber sowie leichter Juckreiz und Erytheme beobachtet.

Auch die Injektion von reinem IL-2 in den Tumor und das umliegende Gewebe zeigte Erfolg (Den Otter et al., 1999; Otter et al., 1999). Gravierende toxische Nebenwirkungen konnten bei dieser lokal begrenzten IL-2-Applikation nicht festgestellt werden.

Eine Kombinationstherapie mit humanem Tumor-Nekrose-Faktor (hTNF) und hIL-2, wobei hTNF intravenös und hIL-2 subkutan appliziert wurden, führten Moore et al. (1991) an 30 Hunden mit Tumoren unterschiedlicher Histogenese durch. Bei den auftretenden Nebenwirkungen handelte es sich hauptsächlich um Fieber, Erbrechen und Diarrhoe, was die Autoren aufgrund des Therapie-Aufbaus der TNF-Wirkung zuschrieben. In dieser Patienten-Gruppe wurde nämlich bei gleichbleibend geringen hIL-2-Dosen hTNF in ansteigender oder gleichbleibend hoher Konzentration oberhalb der maximal tolerierten Dosis verabreicht. Die IL-2-assoziierten Nebenwirkungen Erbrechen, Diarrhoe und leichte Apathie zeigten sich in geringerem Maße. Von 13 Hunden mit oralen Melanomen zeigten fünf eine Tumorregression. Bei einem dieser Hunde trat eine komplette Remission des Tumors auf, wobei dieser Hund auch nach drei Jahren kein Rezidiv aufwies. Ein weiterer Hund zeigte eine Verkleinerung des Primärtumors sowie einer Lymphknotenmetastase. 75 % der Hunde mit Plattenepithelkarzinomen sowie alle Hunde mit Mastzelltumoren wiesen in dieser Studie eine teilweise Regression der Neubildungen auf.

Dow et al. (1998) untersuchten die *in vivo*-Transfektion von Tumorzellen mit dem Gen für cIL-2. Dazu injizierten sie Vektoren, die das Gen des Staphylokokken-Enterotoxins B (SEB) und entweder das cIL-2-Gen oder eine für GM-CSF-kodierende DNA enthielten, als

Lipidkomplexe in den Tumor und das umliegende Gewebe sowie in einigen Fällen auch in den regionären Lymphknoten. Von den 26 behandelten Hunden mit malignen Melanomen zeigten 12 eine komplette oder partielle Remission der Tumoren. Nebenwirkungen waren kaum zu beobachten und beschränkten sich auf vereinzelt lokale Ödeme an der Injektionsstelle und eine vorübergehende Anorexie.

Weiterhin untersuchten Dow et al. (2005) die intravenöse Applikation von cIL-2-DNA-Liposom-Komplexen bei Hunden mit Lungenmetastasen von Osteosarkomen. Sie fanden unter anderem eine gesteigerte Aktivität der NK-Zellen sowie eine erhöhte cIL-2-Konzentration im Lungenparenchym. Drei von 20 Hunden zeigten eine Tumorregression. Bei allen behandelten Hunden war die mittlere Überlebenszeit deutlich verlängert.

Einen ähnlichen Therapie-Ansatz unternahmen Thamm et al. (2003). Sie konstruierten einen Expressionsvektor, der für das Staphylokokken-Enterotoxin A und für cIL-2 kodierte und injizierten diesen in das Tumorgewebe. Untersucht wurden 16 Hunde mit Weichteilsarkomen, von denen 3 eine komplette und einer eine teilweise Tumorremission zeigten.

Auch die Inhalationstherapie mit IL-2-Liposomen erwies sich als wirksam. Khanna et al. (1997) setzten ein Aerosol, das hIL-2-Liposomen in vernebelter Form enthielt, bei neun Hunden ein, von denen zwei unter primären Lungentumoren litten und sieben Lungenmetastasen anderer Tumore aufwiesen. Zwei Hunde mit Lungenmetastasen eines Osteosarkoms zeigten eine komplette Remission der Metastasen und wiesen ein bzw. zwei Jahre lang keine Rezidive auf. Das primäre Lungenkarzinom eines Hundes nahm über neun Monate nicht an Größe zu, zeigte jedoch auch keine Regression. Nebenwirkungen der Therapie beschränkten sich auf vorübergehenden Husten in drei Fällen unmittelbar nach der Inhalation.

Auch bei Hunden konnte eine erniedrigte spontane Zytotoxizität von NK-Zellen festgestellt werden. Untersuchungen zeigten, dass bei Hunden mit Mammakarzinomen die spontane zytotoxische Aktivität von isolierten, NK-Zellen-angereicherten Blutlymphozyten gegenüber der von Tumorpatienten mit anderen Tumoren und der einer gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert war (Funk et al., 2003; Funk et al., 2005).

Trotz dieser Ergebnisse liegen zur Zeit keine klinischen Studien über eine adoptive Tumorummuntherapie mit LAK beim Hund vor. Untersuchungen zeigten jedoch, dass *in vitro*-stimulierte LAK eine zytotoxische Aktivität gegenüber kaninen Tumorzellen aufweisen und deren Einsatz in der Tumorummuntherapie vielversprechend ist (Jardine et al., 1989; Mitchell et al., 1991; Gondolf, 1994; Mizuno et al., 1996).

2.2 Interleukin-2 (IL-2)

2.2.1 Charakteristika des Gens und des Proteins

Das zu den Zytokinen zählende Interleukin-2 (IL-2) wurde erstmals 1976 von Morgan et al. (1976) als T-Zell-Wachstumsfaktor (T-Cell Growth Factor, TCGF) beschrieben. Der Name Interleukin-2 wurde 1979 während des Zweiten Internationalen Lymphokin Workshops in Ermatingen, Schweiz eingeführt (Mizel und Farrar, 1979). 1983 gelang erstmals die Klonierung und Sequenzierung von humanem IL-2 (hIL-2) (Devos et al., 1983; Taniguchi et al., 1983). hIL-2 besteht aus 153 Aminosäuren, wobei die ersten 20 Aminosäuren eine Signalpeptidsequenz darstellen, die zur Reifung des Proteins abgespalten werden (Taniguchi et al., 1986). Das Molekulargewicht des Glykoproteins liegt bei 15,5 kDa (Gillis et al., 1982). In der Tertiärstruktur setzt sich hIL-2 aus fünf α -Helices (A, B', B, C, D) und zwei β -Faltblattstrukturen zusammen, wobei zwischen Cys⁵⁸ und Cys¹⁰⁵ eine Disulfidbrücke vorhanden ist (Bazan, 1992). Das Gen für hIL-2 befindet sich auf Chromosom 4q (Siegel et al., 1987).

Kanines Interleukin-2 (cIL-2) besitzt ein Molekulargewicht von 30 kDa (Daemen et al., 1984) und zeigt damit Homologien zu murinem IL-2 (Gillis und Watson, 1980). Die cDNA-Sequenz besteht aus 465 Basenpaaren (bp), die für ein Protein aus 155 Aminosäuren kodieren (Dunham et al., 1995). Das Gen des cIL-2 liegt auf Chromosom 19 (Yang et al., 1999). Die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 20 stellen eine hydrophobe Signalsequenz dar, die zur Reifung und Sekretion des Proteins abgespalten wird. Ähnlich dem hIL-2 besitzt cIL-2 eine Disulfidbrücke zwischen Cys⁷⁹ und Cys¹²⁷. Die Nukleotid-Sequenz der cDNA von cIL-2 zeigt eine Homologie von 92 % zu felinem, 88 % zu humanem, 88 % zu equinem, 82 % zu bovinem und 74 % zu murinem IL-2. Auf Proteinebene liegt eine Übereinstimmung von 90 % zu felinem, 86 % zu humanem, 84 % zu equinem, 76 % zu murinem und 75 % zu bovinem IL-2 vor.

IL-2 wird in erster Linie von T_H1-Zellen nach Stimulation produziert (Mosmann et al., 1986). Andere lymphatische Zelltypen sind jedoch auch in der Lage, geringe Mengen an IL-2 zu sezernieren, wie zytotoxische T-Zellen (Rosenberg et al., 1986) oder dendritische Zellen (Granucci et al., 2001). Die Stimulation der T_H1-Zellen zur IL-2-Sekretion kann durch Lektine wie Concanavalin A (Mosmann et al., 1986) induziert werden. Das von aktivierten

Makrophagen nach Antigenkontakt abgegebene IL-1 wirkt ebenfalls aktivierend auf die IL-2-Produktion durch T_H1-Zellen (Cantrell, 1984).

2.2.2 IL-2-Rezeptor

IL-2 bindet an einen heterotrimeren Rezeptor auf der Zelloberfläche, der sich aus den Untereinheiten IL-2R α (CD25, p55), IL-2R β (CD122, p70) und γ_c zusammensetzt (Voss, 1994). Die IL-2R β -Untereinheit weist in ihrem extrazellulären Abschnitt verschiedene Motive auf, die diese Rezeptoruntereinheit als Mitglied der Familie der Hämatoetin-Rezeptoren ausweisen. Dazu zählen vier konservierte Cystein-Reste sowie das WSXWS-Motiv, einem Element aus Trp-Ser-Pro-Trp-Ser. Diese β -Kette ist ebenfalls Bestandteil weiterer Zytokin-Rezeptoren, z.B. des IL-15-Rezeptors (Cornish et al., 2006). Die γ -Rezeptoruntereinheit wird von einer Vielzahl an Zytokin-Rezeptoren genutzt und daher auch als „Common γ chain“ γ_c bezeichnet (Voss, 1994). Auch sie trägt extrazytoplasmatisch die Merkmale der Hämatoetin-Rezeptor-Familie. Zusammen mit dem zytoplasmatischen Abschnitt von IL-2R β vermittelt sie die zytosolischen Signale, die unter anderem in der Aktivierung der Janus-Kinasen Jak-1 und Jak-3 sowie des Transkriptionsfaktors STAT5 liegen. IL-2R α ist besonders für den IL-2-Kontakt zuständig und besitzt nur eine kurze zytoplasmatische Domäne ohne zelluläre Signalfunktion.

IL-2R α und IL-2R β übernehmen die spezifische IL-2-Bindung des Rezeptorkomplexes, zeigen jedoch alleine jeweils eine schwache Affinität zu IL-2, während γ_c nicht in der Lage ist, IL-2 zu binden. Gabelförmige IL-2-Rezeptoren aus IL-2R β und γ_c mit einer mittleren IL-2-Affinität werden konstitutionell unter anderem auf ruhenden T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert (Nelson und Willerford, 1998). Die Bindung von IL-2 an diese Rezeptorform induziert die streng kontrollierte Proteinsynthese von IL-2R α über den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dies ermöglicht die Expression der α -Untereinheit auf der Zelloberfläche, wodurch sich der hoch affine IL-2-Rezeptorkomplex aus allen drei Untereinheiten formieren kann. Die Bindung an IL-2R α führt zu einer Konformationsänderung des IL-2-Moleküls, wodurch eine passendere Bindungsstelle für IL-2R β und somit eine höhere Bindungsaffinität geschaffen wird. In der Quartärstruktur von IL-2/IL-2R α /IL-2R β / γ_c zeigt IL-2R α keine direkte Verbindung zu IL-2R β / γ_c (Wang et al., 2005).

Den Kontakt zwischen IL-2 und IL-2R α stellt die Schleife zwischen den α -Helices A und B im IL-2-Molekül her (Sauve et al., 1991). An IL-2R β bindet IL-2 mit Teilen der α -Helices A und C (Kuo und Robb, 1986). Für den minimalen Kontakt zu γ_c sind Aminosäurereste der α -Helices A und D zuständig (Voss et al., 1993).

Die Bindung von IL-2 an seinen hoch affinen Rezeptor führt zur Internalisierung des Rezeptors und zur Ligandendegradation, erhöht aber gleichzeitig die Konzentration von IL-2R α auf der Zelloberfläche und damit auch die Dichte des kompletten Rezeptors aus allen drei Untereinheiten (Smith und Cantrell, 1985).

2.2.3 Wirkung von IL-2

Verschiedene Populationen immunologisch aktiver Zellen zeigen eine Reaktion auf IL-2. Dazu zählen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen. Die Wirkung von IL-2 auf Zielzellen hängt von der IL-2-Konzentration, der IL-2-Rezeptorenart und -dichte und der Dauer der IL-2-Wirkung ab (Cantrell, 1984). B-Zellen benötigen zunächst eine Aktivierung durch Bindung von Immunglobulinen oder Staphylokokken-Protein A, um den nicht konstitutionell exprimierten IL-2R auf der Zelloberfläche präsentieren zu können (Muraguchi et al., 1985). Die IL-2-vermittelten Effekte liegen daraufhin in einer B-Zell-Proliferation und Immunglobulinsekretion, wobei im frühen Stadium der IL-2-Wirkung IgM-Globuline produziert werden, später jedoch durch weitere IL-2-induzierte Zytokine von T-Zellen der Switch auf IgG gefördert wird.

Auch T-Lymphozyten benötigen eine Aktivierung durch Antigene über den T-Zell-Rezeptor (TCR), um eine Reaktion auf IL-2 zeigen zu können. Dieser Antigen-Kontakt bewirkt die IL-2R-Expression auf T-Zellen. Die Sekretion von Zytokinen und lytischen Molekülen wird durch TCR-Kontakt initialisiert und durch IL-2 aufrechterhalten und verstärkt (Cantrell und Smith, 1983). Auf antigenaktivierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen wirkt IL-2 mitogen, erhöht also die Zellteilungsrate und Proliferation (Cornish et al., 2006). Als Wachstumsfaktor erhöht IL-2 an aktivierten zytotoxischen T-Zellen die Zellgröße, Stoffwechselrate und Proteinsynthese. Dies geschieht durch die vermehrte Expression von Aminosäure-Rezeptor-Komplexen, was in einer erhöhten Aufnahme von Aminosäuren resultiert. Gleichzeitig werden auch verstärkt Transferrin-Transporter exprimiert, um den für Stoffwechselfvorgänge nötigen Kofaktor Eisen der Zelle ausreichend zur Verfügung zu stellen. Dadurch werden Proteinsynthese und Proteingehalt der Zellen gesteigert, was die Produktion von

Effektormolekülen erlaubt. Diese Vorgänge sind jedoch sehr energieaufwändig. So findet sich bei antigenaktivierten zytotoxischen T-Zellen nach einer IL-2-Inkubation von 6 bis 8 Tagen *in vitro* ein Rückgang in der Zellzahl aufgrund einer erhöhten Apoptoserate (Cornish et al., 2006).

NK-Zellen zeigen eine antigen-unabhängige Sensitivität gegenüber IL-2. Sie reagieren mit einer erhöhten Proliferationsrate und Synthese verschiedener Effektorproteine wie Perforin oder Granzyme, die den größten Teil der zytotoxischen Wirkung ausmachen. Weiterhin sezernieren sie nach IL-2-Kontakt ein bestimmtes Profil an Zytokinen, die in erster Linie alle eine Makrophagen-Monozyten-aktivierende Wirkung haben. Dazu zählen IFN- γ , TNF- α und GM-CSF. Der Kontakt mit IL-2 bewirkt zusätzlich eine veränderte Genexpression in NK-Zellen (Dybkaer et al., 2007). Dadurch werden beispielsweise weitere Zytokinrezeptoren, Chemokinrezeptoren und Todesrezeptor-Liganden (FasL und TRAIL) für die Apoptose-Einleitung sowie sekretorische Proteine verstärkt produziert. Auch die zunehmende Expression von spezifischen NK-Zell-aktivierenden Rezeptoren erhöht die Zytotoxizität von NK-Zellen. Weiterhin zeigten IL-2-stimulierte NK-Zellen eine verzögerte Expression proinflammatorischer Proteine wie chemotaktische Faktoren oder Adhäsions- bzw. Migrationsproteine.

2.3 Lymphozytenanreicherung

Für die Gewinnung der für kanines IL-2 kodierenden mRNA werden IL-2-produzierende Zellen z.B. aus Milz, Lymphknoten oder Blutlymphozyten benötigt. Die Anreicherung aus Vollblut führt hierbei zu einer hohen Zellausbeute bei relativ schneller und leichter Durchführung der Arbeitsschritte. Außerdem kann von einem individuellen Spender ohne nachteilige Wirkung mehrfach Blut gewonnen werden, während dies bei Milz- oder Lymphknotengewebe nicht ohne Weiteres möglich ist.

Zur Anreicherung von verschiedenen Fraktionen der peripheren Blutlymphozyten (PBL) macht man sich die unterschiedliche spezifische Dichte einzelner Leukozytenpopulationen zunutze. Die inzwischen am häufigsten angewendete Isolierungsmethode beruht auf der Zentrifugation verdünnter und mit Gerinnungshemmern versetzten Vollblutproben über einen einstufigen Dichtegradienten mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml (Boyum, 1968). Damit gelang erstmals die sehr reine Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Blut. In der Humanmedizin wird heute routinemäßig das Trennmedium Ficoll-Hypaque eingesetzt, womit

mononukleäre Zellen mit einer geringen spezifischen Dichte von Granulozyten und Erythrozyten, die eine höhere spezifische Dichte besitzen und somit unter dem Trennmedium sedimentieren, abgetrennt werden können. Auch bei den Haustieren wurde die Gradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque zur Lymphozytenisolierung eingesetzt, so auch beim Hund (Kay et al., 1973), beim Haushuhn (Burkhardt, 1975), beim Schwein (Yang et al., 1987), beim Schaf (Rai-el-Balhaa et al., 1985), beim Rind (Cook und Splitter, 1988) und beim Pferd (Chong et al., 1992).

Beim Hund wurde jedoch unter der Verwendung von Ficoll-Hypaque eine relativ starke Verunreinigung der Lymphozyten mit Granulozyten festgestellt (Daemen et al., 1984). Einige Arbeitsgruppen führten daraufhin weitere Schritte zur Aufreinigung der Lymphozyten durch, um phagozytierende bzw. anhaftende Zellen zu eliminieren (Übersicht bei Gondolf, 1994). Die Lymphozytenanreicherung über das Trennmedium Percoll[®] wurde von Gondolf (1994) beim Hund untersucht. Percoll[®] setzt sich aus Polyvinylpyrrolidon (PVP)-ummantelten kolloidalen Silikonkugeln zusammen, die einen Durchmesser von 15 – 30 nm besitzen. Durch seine extrem niedrige Osmolalität (< 20 mOsm/l) bietet Percoll[®] die Möglichkeit, Gradienten unterschiedlicher Dichte durch die Verdünnung der Stammlösung (spezifische Dichte 1,119 g/ml) mit Zellkulturmedium oder NaCl-PBS herzustellen, ohne den osmotischen Druck der Lösung stark zu verändern (Pertoft et al., 1979). Gondolf (1994) konnte den höchsten Lymphozytenanteil von 87 % bei einem Percoll[®]-Anteil von 57,5 % und damit bei einer Dichte von 1,072 g/ml erzielen.

Trotzdem zeigen Faktoren wie Alter (Greeley et al., 1996), Rasse und Geschlecht (Faldyna et al., 2001) sowie Gesundheits- und Ernährungszustand Einflüsse auf die Zusammensetzung der zellulären Bestandteile des peripheren Blutes von Hunden und damit auch auf die Isolierung von Lymphozyten.

2.4 Stimulation von kaninen Lymphozyten

IL-2 wird in erster Linie von T_H1-Lymphozyten nach deren Stimulation sezerniert (Mosmann et al., 1986). Diese Aktivierung kann polyklonal durch Mitogene erzielt werden, zu welchen neben bakteriellen auch pflanzliche Extrakte, die sogenannten Lektine, zählen. Bei Lektinen handelt es sich um Proteine, die an Kohlenhydratgruppen nicht-kovalent binden und diese chemisch modifizieren (Brown und Hunt, 1978). Als T-Zell-aktivierende Lektine sind Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) bekannt. Con A ist ein reines

Protein aus der Schwertbohne (*Concanavalia ensiformis*) und hat neben mitogenen auch erythrozyten- und leukozytenagglutinierende Eigenschaften (Lis und Sharon, 1973). Bei PHA handelt es sich um ein Glykoproteinextrakt der roten Stangenbohne (*Phaseolus vulgaris*), das aus den zwei Spezies Erythroagglutinin (PHA-E) und Leukoagglutinin (PHA-L) besteht (Yachnin und Svenson, 1972).

Zur Stimulation von kaninen Lymphozyten gibt es zahlreiche Untersuchungen bezüglich verwendeter Kulturmedien, Serumgehalt, Mitogenkonzentration sowie eingesetzter Zellzahl, Inkubationstemperatur und -dauer (Übersicht bei Wagner, 1998). Wagner (1998) untersuchte die optimalen Bedingungen für die Lymphozytenstimulation durch Con A und PHA. Für Con A ergab die Inkubation kaniner Lymphozyten in Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) mit 2 µg Con A/ml über 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bei einem Serumgehalt (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, FKS) von 1 % im Zellkulturmedium die höchste Stimulation. Die optimale Ausgangskonzentration an Lymphozyten lag bei 1,5 x 10⁶ Zellen/ml. Um eine optimale Stimulation kaniner Lymphozyten mit PHA zu erzielen, mussten 3 x 10⁶ Zellen/ml mit 8 µg PHA/ml in RPMI 1640 mit einem Serumzusatz von 1 % über 120 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Die weiteren Untersuchungen von Wagner zeigten anhand der ermittelten Stimulationsindizes, dass die Stimulation unter Con A-Einfluss effektiver war als die durch PHA.

2.5 Proliferationstest mit Methylthiazol-Tetrazolium (MTT)

Um die Nachteile des radioaktiven Standard-Proliferationstests (Einbau von radioaktivem ³H-Thymidin) zu umgehen, wurden Farbstofftests für die Messung der Lymphozyten-Proliferation entwickelt. Der kolorimetrische Methylthiazol-Tetrazolium (MTT)-Test wurde zur Überprüfung der Proliferation von Zellen etabliert (Mosmann, 1983) und basiert auf der gesteigerten mitochondrialen Aktivität stimulierter Zellen. Das Prinzip dieses Farbstofftests beruht auf der Spaltung des Tetrazoliumringes des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien (Slater et al., 1963). Durch diese Spaltung entstehen violette, wasserunlösliche Formazankristalle. Um deren Farbintensität spektrometrisch in einem ELISA-Reader messen zu können, müssen die Kristalle gelöst werden. Mosmann (1983) verwendete dazu im Originalprotokoll HCl-Isopropanol. Die Zugabe von Salzsäure zum Lösungsmittel wird notwendig, um die rote Farbe des meist im Zellkulturmedium

vorhandenen pH-Indikators in eine gelbe Farbe umzuwandeln, die mit der Absorptionswellenlänge von 570 nm nicht interferiert. Da Isopropanol jedoch die Präzipitation von im Kulturmedium vorhandener Proteine verursachte (Denizot und Lang, 1986), wurden z.B. serumfreie Medien und andere Lösungsmittel wie Ethanol oder Propanol verwendet (Denizot und Lang, 1986). Untersuchungen zu alternativen Lösungsmitteln wie Sodiumdodecylsulfat (SDS) mit Salzsäure (Tada et al., 1986) oder SDS mit N,N-Dimethylformamid (pH 4,7) (Hansen et al., 1989) zeigten jedoch, dass eine Inkubation der Mikrotiterplatten (MTP) im Brutschrank über Nacht nötig war, um die Kristalle komplett aufzulösen. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Twentyman und Luscomb (1987) als Lösungsmittel eingesetzt, was zu einer schnellen und vollständigen Lösung der Kristalle führte. Durch den Einsatz von DMSO-HCl in einem Mischungsverhältnis von 9 : 1 konnte sowohl eine rasche Kristallauflösung innerhalb von 10 – 15 Minuten als auch eine ausreichende Ansäuerung und damit Gelbfärbung des Zellkulturmediums erzielt werden (Wagner et al., 1999).

Mosmann (1983) konnte nachweisen, dass die Menge an gebildeten Formazankristallen proportional zur Zellzahl ist. Er zeigte auch, dass aktivierte Zellen mehr Formazan produzierten als ruhende. Die MTT-Methode bestimmt also im Gegensatz zu anderen Testverfahren, wie der ³H-Thymidin-Inkorporation (TdR), bei der radioaktiv markiertes Thymidin während der Zellproliferation in neu synthetisierte DNA eingebaut wird, die Zellzahl und -aktivität am Ende des Tests. Der MTT-Test stellt eine kostengünstige und schnelle Alternative zur Proliferationsüberprüfung dar, bei der in kurzer Zeit eine schnelle Probenzahl untersucht werden kann und die auf radioaktive Substanzen verzichtet.

Zum Einsatz kommt der MTT-Test bei der Überprüfung der Proliferation von Blutlymphozyten beim Menschen (Niks et al., 1990) und beim Hund (Taura et al., 1995). Mosmann (1983) etablierte ihn zur Quantifizierung der Proliferation von mitogenstimulierten Milzzellen der Maus. Weitere Einsatzgebiete sind die Bestimmung des IL-2-Gehaltes anhand der Proliferation von IL-2-abhängigen T-Zelllinien (Mosmann, 1983; Denizot und Lang, 1986; Sladowski et al., 1993) und NK-Zelllinien (Tada et al., 1986) sowie die Ermittlung der *in vitro*-Zytotoxizität von Tumorthapeutika (Twentyman und Luscombe, 1987) und von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) (Heo et al., 1990).

2.6 RT-PCR zur Amplifikation einer Copy-DNA (cDNA) von cIL-2

Um die Produktion von rekombinantem kaninem IL-2 (rcIL-2) zu erreichen, sollte die Gensequenz für cIL-2 als Copy-DNA (cDNA) aus den angereicherten und stimulierten Lymphozyten gewonnen werden. Dazu diente die RT-PCR-Technik. Bei diesem Verfahren wird zunächst zelluläre Messenger-RNA in einen DNA-Strang umgeschrieben (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Dies geschieht durch reverse Transkriptasen wie z.B. die des Avian-Myeloblastosis-Virus (AMV) oder des Molony-Murine-Leukemia-Virus. Als Primer werden meist unspezifische Oligonukleotid-Hexamere verwendet. In anschließenden PCR-Zyklen wird der DNA-Strang amplifiziert.

Die dadurch gewonnene Gen-Sequenz entspricht nicht der genomischen Sequenz des entsprechenden Proteins. Da eine mRNA als Matrize dient, fehlen die durch Spleiß-Vorgänge entfernten Introns. Somit ist die cDNA eines Gens jeweils um die Introns kürzer als das entsprechende genomische Gen.

Dunham (1995) synthetisierte eine cDNA für cIL-2 mit Oligonukleotid-Primern, die anhand konservierter 5'- und 3'-Regionen gewählt wurden. Die PCR bestand aus 30 Zyklen mit je 1 min bei 90 °C (Denaturierung), 1 min bei 50 °C (Anlagerung der Primer) und 1 min bei 72 °C (Elongation). Dadurch konnte eine cDNA mit einer Länge von 653 bp gewonnen werden (NCBI Accession No. D30710). Sie zeigte einen offenen Leserahmen von 465 bp, der von einem 31 bp langen nichtkodierenden Abschnitt am 5'-Ende und einem 157 bp langen nichtkodierenden Abschnitt am 3'-Ende flankiert wurde. Das dadurch kodierte Protein wies eine Länge von 155 Aminosäuren auf.

2.7 Tetracyclinabhängige Expression von Genen

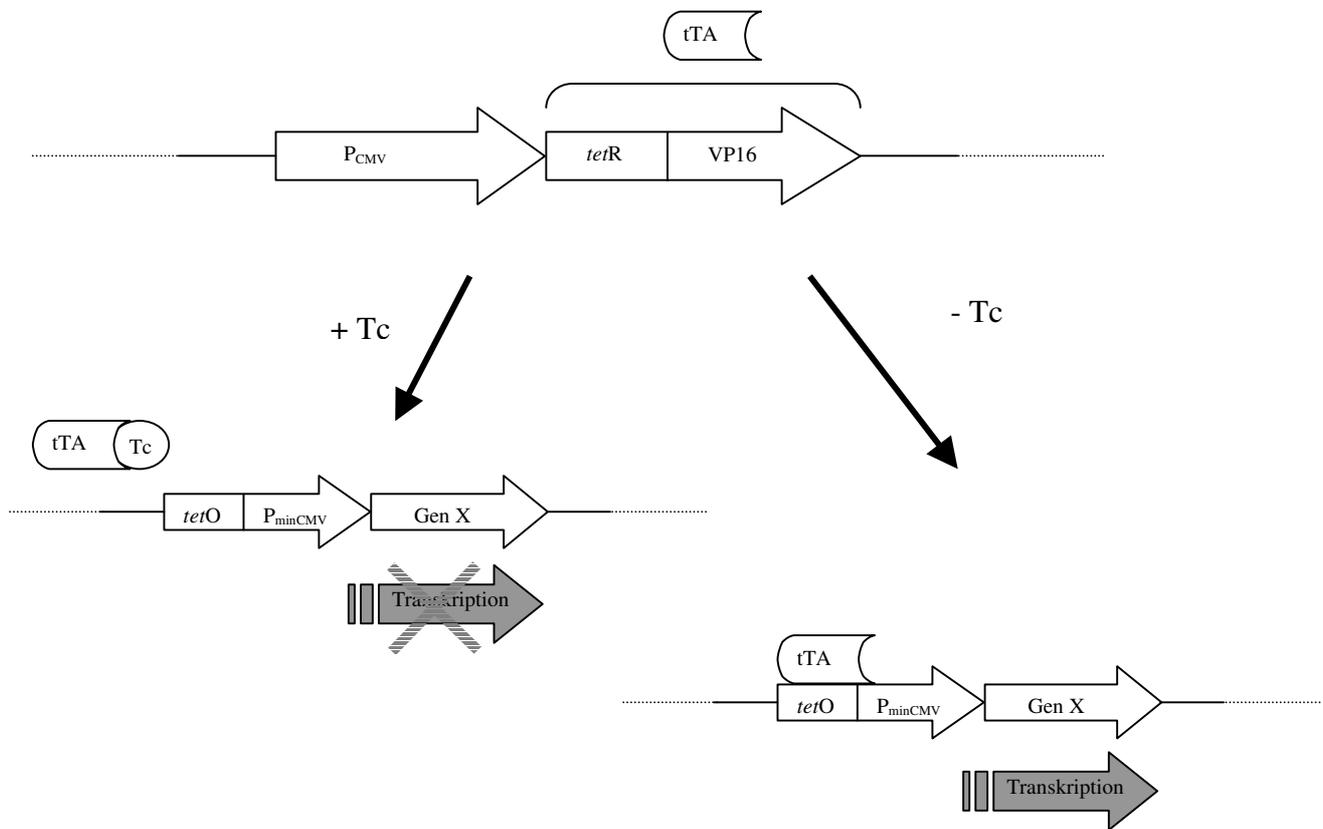
Die gezielte Expression von Genen kann mit sogenannten „On/Off“-Systemen *in vitro* und *in vivo* erreicht werden (Zabala et al., 2004). Die Kontrolle von Genaktivitäten, die durch verschiedene induzierbare eukaryotische Promotoren geregelt werden können, erfolgte lange Zeit durch verschiedene Verfahren wie Schwermetallionen, Hitzeschock oder Hormone (Gossen und Bujard, 1992). Der Nachteil dieser Induktoren liegt jedoch in den teils unerwünschten zusätzlichen Effekten auf Säugerzellen wie bei der Induktion durch Glukokortikoidhormone, sowie in der mitunter hohen basalen Expression des gewünschten Gens in den entsprechenden Systemen. Durch die Entwicklung eines tetracyclinabhängigen Gen-Expressionssystems (Tet-System) durch Gossen und Bujard (1992) konnten diese Nachteile überwunden und ein graduell induzierbares System zur Genexpression geschaffen werden. Die Vorteile von Tetracyclin als Induktor liegen unter anderem darin, dass Tetracycline lipidlöslich sind und so Lipidmembranen *per diffusionem* überwinden können und dass die benötigten Tetracyclinkonzentrationen nicht in zytotoxischen Bereichen liegen (Auflistung bei Zabala et al., 2004). Die Genregulation im Tet-System unterliegt also keinen pleiotropen Effekten oder unspezifischer Induktion.

Dieses System basiert auf den regulatorischen Elementen des Tetracyclin-Resistenz-Operons von *E. coli*. In diesem Operon wird die Transkription des resistenzvermittelnden Gens durch den Tetracyclinrepressor (*tetR*) negativ reguliert. Bei Anwesenheit von Tetracyclin dissoziiert *tetR* vom Operator, der innerhalb der Promotorregion des Operons gelegen ist, und ermöglicht so die Transkription. Die hohe Bindungsaffinität von *tetR* an Tetracyclin oder dessen Derivate und die folgende zügige Ablösung vom Operator ermöglichen eine sehr sensitive Steuerung der Expression der resistenzvermittelnden Proteine (Berens und Hillen, 2003).

2.7.1 Das Tet-off-Expressionssystem

Um in eukaryotischen Zellen den prokaryotischen Tetrazyklinrepressor (*tetR*) als Transaktivator nutzen zu können, wurde eine Fusion der Aminosäuren 1 – 207 des *tetR* mit den 127 Aminosäuren des C-terminalen Endes des Virionprotein 16 des humanen Herpes simplex-Virus (HSV-VP16) durchgeführt (Gossen und Bujard, 1992). Dieses Virionprotein ist essentiell für die Transkription früher viraler Proteine. Dadurch wurde der Transkriptionsrepressor in einen Transkriptionsaktivator umgeformt.

Minimale Promotoren, die mit dem Tetrazyklinoperator (*tetO*) fusioniert wurden, konnten nun von diesem Hybridtransaktivator stimuliert werden. Minimalen Promotoren, wie zum Beispiel $P_{CMV_{min}}$, fehlen Verstärkersequenzen, die sonst zu einer eher unkontrollierten Hintergrundexpression der gewünschten Genprodukte führen würden. Geringe Tetrazyklinkonzentrationen verhinderten die Bindung des tetrazyklinkontrollierten Transaktivators (tTA) an *tetO* und führten dadurch zur Stummschaltung der an *tetO* angeschlossenen Gene (siehe Schema 1). Die Menge der produzierten Proteine konnte um den Faktor 10^5 reguliert werden (Gossen und Bujard, 1992).



Schema 1 **Tet-off-System**

Die Zugabe von Tetracyklin bewirkt die Ablösung des Transaktivators und verhindert damit die Transkription des Gens X

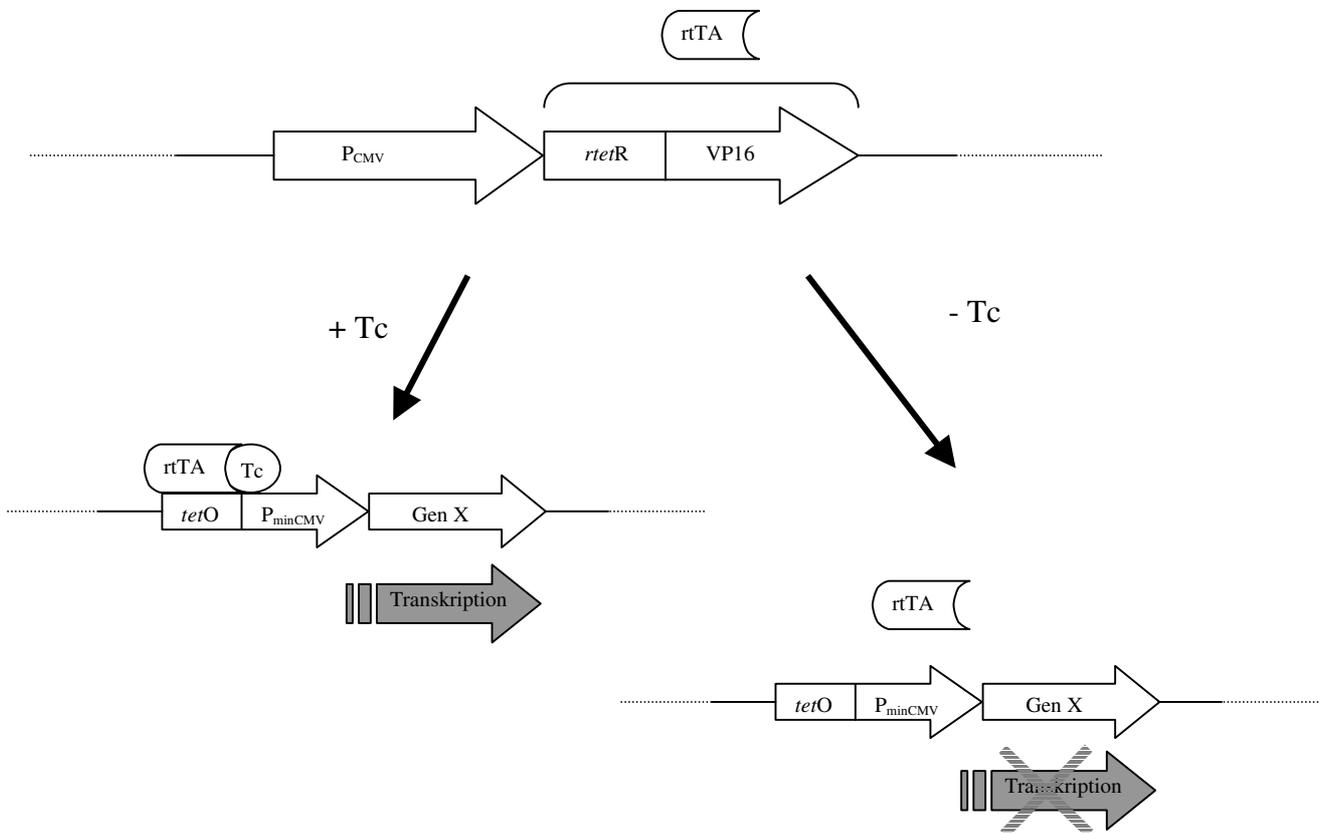
P_{CMV} : Promotor des Cytomegalievirus; *tetR*: Tetracyklinrepressor; *VP16*: Virionprotein 16 des humanen Herpes simplex-Virus; *tTA*: tetracyklinkontrollierter Transaktivator; *Tc*: Tetracyklin; *tetO*: Tetracyklinoperon; P_{minCMV} : minimaler Promotor des Cytomegalievirus

2.7.2 Das Tet-on-Expressionssystem

Der Nachteil des Tet-off-Systems liegt in der kontinuierlichen Tetrazyklingabe zur Stummschaltung des gewünschten Gens. Obwohl die nötigen Antibiotikumkonzentrationen gering sind und nicht im zytotoxischen Bereich liegen, ist für eine Reihe von Anwendungen dieses Expressionssystems eine permanente Tetrazyklingabe ungünstig, zum Beispiel bei Expressionsstudien *in vivo* an transgenen Mäusen oder der Gentherapie. Zusätzlich sind die kinetischen Eigenschaften eines Systems ungünstiger, wenn zunächst der Effektor abgelöst werden muss.

Daher entwickelten Gossen et al. (1995) einen modifizierten *tetR*. Durch Mutagenese wurde ein Austausch von vier Aminosäuren erzielt, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führte. Aufgrund dieser räumlichen Strukturveränderung konnte durch Zugabe von Tetrazyklin eine Bindung dieses reversen Tetrazyklinrepressors (*rtetR*) an das *tetO* erzielt und die Transkription nachgeschalteter Gene ausgelöst werden. Nun war die Anwesenheit des Tetrazyklins zur Proteinexpression nötig (siehe Schema 2).

Li et al. (2004) transfizierten stromale Knochenmarkszellen mit den Genen für IL-2 und IL-3 im Tet-on-System. Sie erreichten eine Zytokin-Produktion für IL-2 von 1300 ng/d/1 x 10⁶ Zellen und für IL-3 von 1100 ng/d/1 x 10⁶ Zellen.



Schema 2 **Tet-on-System**

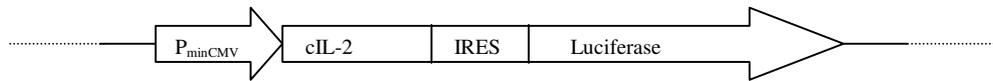
Tetracyclin bindet an den reversen Transaktivator und bewirkt damit die Transkription des Gens X

P_{CMV} : Promotor des Cytomegalievirus; *rtetR*: reverser Tetracyclinrepressor; VP16: Virionprotein 16 des humanen Herpes simplex-Virus; *rtTA*: reverser tetracyclinkontrollierter Transaktivator; Tc: Tetracyclin; *tetO*: Tetracyclinoperon; P_{minCMV} : minimaler Promotor des Cytomegalievirus

2.7.3 Verwendete Regulator- und Response-Plasmide

Ein Bestandteil des zur Produktion von rcIL-2 verwendeten Expressionssystems ist das Regulator-Plasmid pEF Tet-on. Dieses Plasmid codiert für den rtTA und trägt eine Resistenz gegen Neomycin. Es handelt sich dabei um ein im Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, der Justus-Liebig-Universität Giessen modifiziertes und von diesem freundlicherweise zur Verfügung gestellten Konstrukt (Rinck et al., 2001). In diesem Plasmid steht die Expression von rtTA unter der Kontrolle des humanen Elongationsfaktors 1 α (EF-1 α), einem starken Promotor. Zur Herstellung dieses Regulator-Plasmids wurde der offene Leserahmen (ORF) des rtTA mittels PCR aus dem Plasmid pTet-on (Clontech Laboratories Inc., USA) amplifiziert. Anschließend erfolgte der Einbau des ORF in den mit *Swa*I geschnittenen Vektor cdEF321swxneo (Harada et al., 1995). Das resultierende Plasmid pEF_{Tet-on}/NEO trägt so neben einer Neomycinresistenz auch den ORF für rtTA unter der Kontrolle von EF-1 α .

Als Response-Plasmid im Tet-on-System wird das Plasmid pTRUE genutzt, ein vom Institut für Virologie, Fachbereich 10, der Justus-Liebig-Universität modifizierten Vektor auf der Basis des Vektors pTRE (Clontech Laboratories Inc, USA). In dieses Response-Plasmid wird die durch RT-PCR gewonnene Sequenz für cIL-2 zusammen mit dem Reporter gen Luciferase inkloniert (siehe Schema 3). Das Reporter gen ermöglicht eine zügige Überprüfung der Klonierung und der Funktion des Tet-on-Systems. Zwischen beide Gensequenzen wurde der Abschnitt einer Internal Ribosomal Entry Site (IRES) eingebaut. Dadurch wird die Expression von zwei einzelnen voneinander unabhängigen Proteinen ermöglicht (Gallardo et al., 1997; Martinez-Salas, 1999). Die IRES bietet auf Ebene der mRNA eine weitere Ansatzstelle für Ribosomen, so dass beide Proteine parallel translatiert werden können.



Schema 3 Schematische Darstellung des Response-Plasmids pTRUE-cIL2 zur Expression von rcIL-2

P_{minCMV}: minimaler Promotor des Cytomegalievirus; cIL-2: Gensequenz für cIL-2; IRES: Internal Ribosomal Entry Site; Luciferase: Reporter gen

2.7.4 Empfängerzellen des Tet-on-Systems

Gossen und Bujard führten ihre Untersuchungen zum Tet-System zunächst hauptsächlich an HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zelllinie) durch (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Später kamen weitere Zelllinien wie HEK293 (Embryonale Nierenzellen) dazu. Li et al. (2004) nutzten die stromale Knochenmark-Zelllinie QXMSC1 zur Tet-on-Expression von Zytokinen. Prinzipiell lassen sich jedoch alle Säugerzellen mit diesem Expressionssystem transfizieren.

Für diese Arbeit wurden als Empfängerzellen des Tet-on-Systems und zur Produktion des rcIL-2 die Zelllinie BHK-21 gewählt. Dabei handelt es sich um fibroblastische Zellen der Niere des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*). Diese Zelllinie wurde bereits 1961 etabliert (Macpherson und Stoker, 1962; Macpherson, 1963) und wird hauptsächlich für Zytotoxizitätstests (ISO 10993-5:1999, International Organization for Standardization/ANSI, Genf, Schweiz) und als Empfängerlinie in Transfektionen zur Proteinexpression (Schnell et al., 1996; Deleersnyder et al., 1997; Hussain et al., 1997; Yang et al., 1997) genutzt.

Knezevic et al. (1995) verwendeten BHK-Zellen zur Expression von rekombinatem humanem Interleukin-2. Dazu nutzten sie das kommerziell erhältliche Expressionsplasmid pRC/RSV (Invitrogen, USA), das keine Induktion zur Proteinexpression benötigt, sondern eine permanente Transkription der einklonierten Gensequenzen ermöglicht. Das von ihnen verwendete 486 bp große Insert basierte auf einer cDNA eines synthetischen IL-2-Gens aus pPL-Lambda transfizierten HB101 *E. coli* (Knezevic et al., 1996). Ihnen gelang eine IL-2-Produktion von 5 – 10 ng/10⁶ Zellen in 24 h. Zudem zeigten sie, dass kommerziell erhältliches rekombinantes IL-2, das durch *E. coli* produziert wird und daher keine

Glykosylierung aufweist, besonders in hohen Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von IL-2-anhängigen CTLL-2-Zellen ausübt. Glykosiliertes IL-2 von eukaryotischen BHK-Zellen wies speziell bei längerer Kultivierung eine bessere Stimulation des Zellwachstums auf. Die Arbeitsgruppe führte weiterhin Untersuchungen zur Kultivierung der adhärennten BHK-Zellen auf Mikrocarriern durch (Knezevic et al., 1995). Dadurch lassen sich eigentlich adhärennte Zelllinien in Suspension kultivieren. Die Verwendung der PE-2 Macroporous Carrier von IAM (Wien, Österreich), die aus einer Mischung aus Polyethylen und Silikat bestehen, erbrachte bei einer Serumkonzentration im Kulturmedium von 2 % und 5 % die besten Ergebnisse bezüglich Wachstumsverhalten und Proteinproduktion der BHK-Zellen.

Zur Expression von rcIL-2 im Tet-on-System ist die Transfektion des Regulator- und des Response-Plasmids nötig. Eine BHK Tet-on-Zelllinie, die bereits das Regulator-Plasmid stabil in ihrem Genom integriert hat, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Tautz vom Institut für Virologie, Fachbereich 10, der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Verfügung gestellt.

Die Transfektion des Response-Plasmids pTRUE-IL2 wurde mit dem polykationischen Transfektionsreagenz Metafectene™ (Biontex) durchgeführt.

2.8 IL-2-Bioassay

Zur quantitativen IL-2-Bestimmung und zum Nachweis der biologischen Aktivität von IL-2 entwickelten Gillis et al. (1978) ein Bioassay. Die IL-2-Konzentrationen in Zellkulturüberständen wird dabei mit Hilfe der murinen zytotoxischen T-Zelllinie CTLL-2 ermittelt. Diese Zellen überleben und proliferieren nur in Anwesenheit von IL-2. Inzwischen wird dieses Bioassay routinemäßig zur Bestimmung der IL-2-Menge sowie der biologischen Aktivität eingesetzt. Eine Einheit (1U) entspricht dabei der Menge IL-2, die benötigt wird, um 50 % des maximalen Wachstums der CTLL-2-Zellen zu erreichen (Mosmann und Fong, 1989). Auch beim Hund wird diese Technik angewandt, da CTLL-2-Zellen sich ebenfalls sensitiv gegenüber kaninem IL-2 erwiesen haben (Cerruti-Sola et al., 1984; Krakowka et al., 1987; Helfand et al., 1992; Wagner, 1998).

Die IL-2-abhängige Proliferation der CTLL-2-Zellen wird anschließend durch den mitochondrialen Umbau von MTT (Mosmann, 1983) quantifiziert (siehe Kapitel 2.5).

2.9 Rose Bengal Assay (RBA)

Ein kolorimetrisches Verfahren zur Messung der Zytotoxizität ist der Rose Bengal Assay (RBA) (Gondolf, 1994). Dieses Verfahren basiert auf der indirekten Messung der durch Effektorzellen lysierten Zielzellen. Die Zytotoxizität der Effektorzellen führt zur Ablösung der adhären wachsenden Zielzellen, die dann zusammen mit den Effektorzellen aus dem Kulturgefäß herausgewaschen werden. Die verbliebenen adhären und nicht abgelösten Zielzellen werden anschließend mit dem Farbstoff Rose Bengal angefärbt. Der aufgenommene Farbstoff wird nach dem Lysieren der Zellen mittels Ethanol in den Überstand überführt und dessen optische Dichte (OD) in einem ELISA-Reader bestimmt. Dieser Wert wird dann in Verhältnis zu der optischen Dichte einer Kontrollkultur von Zielzellen ohne Zusatz von Effektorzellen gesetzt. Daraus wird der prozentuale Anteil der abgelösten Zielzellen bestimmt.

Gondolf et al. (1996) führten zur quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität einen Vergleich zwischen dem ⁵¹Chromium Release Assays (CRA), einem Standardtest zur Zytotoxizitätsmessung, und dem RBA durch. Beim CRA werden die Zielzellen zunächst mit radioaktiv markiertem Na-⁵¹Chromat inkubiert (Brunner et al., 1968). Dieses wird spontan von den Zellen aufgenommen und bindet an intrazelluläre Proteine. Durch Zugabe der Effektorzellen kommt es zur Zerstörung eines Teils der Zielzellen und zur Freisetzung des ⁵¹[Cr] in den Überstand. Die Radioaktivität des Überstandes wird dann in einem Szintillationszähler gemessen.

Der Vergleich zwischen CRA und RBA erbrachte bei gleicher Inkubationsdauer im RBA konstant um etwa 10 % höhere Werte als im CRA. Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, dass mit dem RBA nicht nur nekrotische, sondern auch apoptotische Zielzellen erfasst werden (Schmitz, 2000). Bei der Apoptose lösen sich zwar die Zielzellen von der Unterlage ab, ihre Zellmembran bleibt jedoch zunächst intakt. Somit kann mit Hilfe des RBA zusätzlich zur Nekrose auch die Apoptose der Zielzellen gemessen werden. Dagegen erfasst der CRA apoptotische Zellen nicht, da bei dieser Methode eine Membranschädigung der Zielzellen die Voraussetzung für die Freisetzung von ⁵¹Chrom in den Überstand ist.

Ursprünglich wurden im RBA die Waschschriffe, die nach der Zugabe des Farbstoffs Rose Bengal erfolgen mussten, von Hand durchgeführt (Gondolf, 1994). Hierbei wurde der Farbstoff häufig nicht vollständig entfernt, wodurch Schwankungen der optischen Dichte zwischen den Vertiefungen der 96-Loch-Flachbodenplatte zu beobachten waren und

inkonstante Messergebnisse erzielt wurden. Durch den Einsatz eines Microplate Washers konnte jedoch neben einer höheren Konstanz der Untersuchungsergebnisse auch eine teilweise Automatisierung des RBA ermöglicht werden (Schmitz, 2000).

Üblicherweise beträgt die Inkubationsdauer beim radioaktiven CRA, der zur Messung der Zytotoxizität von NK-Zellen des Menschen als Standardmethode verwendet wird, nur vier Stunden. Für den Hund wurde ermittelt, dass nach dieser kurzen Inkubationsdauer noch keine deutliche Zytotoxizität gegenüber den Zielzellen CTAC gemessen werden kann (Helfand et al., 1994). Gondolf et al. (1996) und Schmitz (2000) verwendeten eine Inkubationsdauer von 14 Stunden zur Messung der Zytotoxizität isolierter Blutleukozyten des Hundes, da zu diesem Zeitpunkt im RBA die höchsten Werte gemessen wurden.

3 MATERIAL UND METHODEN

Rezepte zu nicht speziell erläuterten Lösungen und Puffern sind in Kapitel 9.5, Seite 187 im Anhang aufgeführt.

3.1 Gewinnung der IL-2-Sequenz

3.1.1 Blutentnahme und Lymphozytenisolierung mittels einstufiger Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung von Lymphozyten wurde Blut eines weiblichen adulten reinrassigen Beagles aus der Blutspendergruppe der Klinik für Kleintiere, Abteilung Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Giessen verwendet. Die Hündin wurde mit kommerziellem Fertigfutter gefüttert und erhielt Wasser *ad libitum*. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme war die Hündin klinisch gesund und hatte in den vorausgegangenen drei Wochen kein Blut gespendet. Das Tier wurde regelmäßig gegen Hepatitis contagiosa canis, Leptospirose, Parvovirose, Staupe und Tollwut geimpft.

Der Hündin wurden mit Hilfe von 18 G Kanülen (Becton Dickinson, Heidelberg) 40 ml Blut aus der Vena jugularis in sterile 10 ml NH₄-Heparinröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Die Verarbeitung des Blutes erfolgte unmittelbar nach der Entnahme.

Mittels des Advia® 120 Hematology System (Bayer Diagnostics, München) wurden in der Klinik für Kleintiere, Abteilung Innere Medizin, ein rotes und ein weißes Blutbild der Probe erstellt sowie die absoluten Zellzahlen ermittelt.

Die Isolierung der Lymphozyten aus dem Heparinblut erfolgte über eine Gradientenlösung aus Percoll® (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) mit einer spezifischen Dichte von 1,072 g/ml.

Dazu wurden nach Angaben des Herstellers neun Teile Percoll® mit einem Teil steriler 1,5 M NaCl-Lösung zu einer Stammlösung mit einer spezifischen Dichte von 1,119 g/ml gemischt. Durch Verdünnung mit sterilem Gewebekulturmedium (RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH, Cölbe), dem 1 % Penicillin (10 000 U/ml) und 1 % Streptomycin (10 000 µg/ml, beides Biochrom KG, Berlin) zugegeben wurden und das im Folgenden als RPMI 1640

bezeichnet wird, wurde eine Gebrauchslösung mit einem Percoll[®]-Anteil von 57,5 % (entspricht einem spezifischen Gewicht von 1,072 g/ml) hergestellt.

Das Heparinblut wurde im Verhältnis 1:3 mit sterilem RPMI 1640-Medium verdünnt und in 5 ml-Portionen in sterilen konischen 15 ml-Glaszentrifugenröhrchen vorsichtig auf jeweils 3 ml der Percoll[®]-Gradientenlösung geschichtet. Alle Lösungen wurden bei Raumtemperatur verwendet. Die Zentrifugation der Röhrchen erfolgte bei 800 x g und 15 °C für 25 min (Hettich Rotanda/K Kühlzentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Nach dem Zentrifugieren waren die Lymphozyten sowie einige wenige Granulozyten und Monozyten als 1-2 mm breite, deutliche weiße trübe Bande erkennbar. Die Erythrozyten hatten sich als Zellpellet am Boden des Reagenzglases abgesetzt; der überwiegende Anteil der Granulozyten befand sich als weiße Wolke darüber. Die Zellbande wurde mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und zweimal mit RPMI 1640-Medium gewaschen (400 x g, 4 °C, 5 min). Danach wurde das Zellpellet in 3 ml RPMI 1640 + 1 % hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (FKS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe) resuspendiert.

3.1.2 Mitogen-Stimulation der Lymphozyten

200 µl der Lymphozytensuspension wurden zunächst mit 400 µl einer 0,36 %igen Trypanblaulösung (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) gemischt. Die Gesamtzellzahl und der Prozentsatz der lebenden, nicht angefärbten Zellen sowie der toten, diffus blau gefärbten Zellen wurden in einer Modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Differenzierung der isolierten Leukozyten wurde in 200 µl der Lymphozytensuspension im Advia[®] 120 Hematology System (Bayer Diagnostics, München) durchflußzytometrisch durchgeführt.

Die aus dem Heparinblut isolierten Zellen wurden auf eine Zellzahl von 15×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Zur Stimulation der Lymphozyten wurde das Mitogen Concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt. Das gefriergetrocknete Mitogen wurde durch Zugabe von 5 ml sterilem RPMI 1640-Medium suspendiert und so eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Diese wurde in 0,1 ml-Portionen in sterile 1 ml-Eppendorfgefäße abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Nach dem Auftauen der Stammlösung wurde das Mitogen durch Zugabe von 900 µl RPMI 1640-Medium auf die Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Durch Zugabe der

entsprechenden Menge dieser Con A-Verdünnung zu der Lymphozytensuspension wurde die zuvor als optimal ermittelte Mitogen-Konzentration von 2 µg/ml eingestellt (Wagner, 1998).

Um aus einer ausreichenden Menge stimulierter Lymphozyten später mRNA gewinnen zu können, wurden 5 ml der Lymphozytensuspension in einer sterilen 25 cm²-Gewebekulturflaschen (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus UB 6060 EK- CO₂, Heraeus, Hanau) in 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C für 72 h inkubiert. Als Medium diente steriles RPMI 1640 + 1 % FKS mit einem Zusatz von 100 µl der Con A-Gebrauchslösung.

Zur Ermittlung der Proliferationsrate der stimulierten Lymphozyten wurde parallel zu den Makrokulturen der Kulturflaschen zusätzlich ein Mikrokultursystem angelegt. Dazu wurden je 200 µl der Lymphozytensuspension pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte (MTP) (96-Loch-Flachbodenplatte, Falcon[®], Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Es wurden Sechsfach-Ansätze gleicher Kulturen durchgeführt. Als Gewebekulturmedium diente in allen Fällen wieder RPMI 1640 + 1 % FKS. Zu den mitogenhaltigen Kulturen wurden jeweils 4 µl der Gebrauchslösung von Con A mit einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Unstimulierte Kulturen erhielten lediglich RPMI 1640 + 1 % FKS ohne Mitogen. Die MTP wurde zusammen mit den 25 cm²-Gewebekulturflaschen 72 h lang bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.1.3 Überprüfung der Stimulation mit der MTT-Proliferationsmessmethode

Zur Bestimmung der Proliferation der stimulierten Zellkulturen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollkulturen ohne Mitogenzusatz wurde die kolorimetrische Methode des MTT-Tests durchgeführt. Die Stimulation wurde als Stimulationsindex nach folgender Formel berechnet: Stimulationsindex (SI) = Mittelwert der stimulierten Kulturen : Mittelwert der unstimulierten Kulturen.

Zur Proliferationsmessung wurde das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (Methylthiazol-Tetrazolium, MTT) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) eingesetzt, das von lebenden Zellen zu dunkelblauen bis violetten Formazan-Kristallen umgebaut wird (siehe Abbildungen 21 bis 24, Seite 106 und 107). Die Ermittlung der optischen Dichte (OD) wurde spektrophotometrisch in einem ELISA-Photometer (Titertek[®] Multiskan Plus, Flow Laboratories, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt. Die Auswertung der Daten über arithmetische Mittelwerte und SI

erfolgte unmittelbar nach der Messung mit Hilfe des Computerprogrammes EIA, Version 3.10 (Stefan Ufer und ICN Biomedicals GmbH, Eschwege). Als Referenzwellenlänge zur Korrektur des unspezifischen Hintergrundes wurde eine Wellenlänge von 630 nm gewählt.

Der MTT-Test wurde in Anlehnung an das Protokoll von Mosmann (1983) durchgeführt. Zur besseren Lösung der gebildeten Formazankristalle im Medium wurde jedoch statt Isopropanol-HCl Dimethylsulfoxid (DMSO)-HCl eingesetzt.

1. Herstellung der MTT-Gebrauchslösung durch Lösen von 5 mg MTT in 1 ml PBS
2. Inkubation von 20 µl MTT-Gebrauchslösung je Vertiefung für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂
3. Zentrifugation der MTP bei 1000 x g, 20 °C für 5 min. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes mittels einer Eppendorfpipette, um die auf den Platten befindlichen Formazankristalle nicht wieder aufzuwirbeln
4. Zugabe von 200 µl DMSO-Gebrauchslösung/Vertiefung (180 µl DMSO + 20 µl 1 N HCl) zum Lösen der Formazankristalle. Inkubation für 10 – 15 min bei Raumtemperatur
5. Ermittlung der OD der violetten Farblösung bei einer Wellenlänge von 570 nm

3.1.4 Gewinnung der mRNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den stimulierten Lymphozyten erfolgte in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi (1987) nach dem Prinzip der sauren Guanidin-Isothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion mit TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe).

Dazu wurden zunächst die Zellen aus den Kulturflaschen in ein konisch zulaufendes 15 ml-Glaszentrifugenröhrchen übertragen und bei 400 x g und 12 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml RPMI 1640 ohne FKS resuspendiert. Nach Überführen dieser Suspension in ein 2 ml-Eppendorfgefäß wurden die Zellen erneut pelletiert und nach folgenden Schritten weiter bearbeitet:

1. Lyse der Zellen durch Zugabe von 1 ml TRIzol[®], kontinuierliches Schwenken für 5 min und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 5 min
2. Phasentrennung durch Zugabe von 200 µl Chloroform (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), 15 s kräftig schütteln, anschließend 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Zentrifugieren bei 12 000 x g für 10 min, dadurch Auftrennung in eine RNA-haltige obere wässrige Phase und eine DNA-haltige untere Phenol-Chloroform-Phase

4. Überführen der wässrigen Phase in ein frisches 2 ml-Eppendorfgefäß, Verwerfen der Phenol-Chloroform-Phase
5. Zugabe von 500 µl 100%igem Isopropanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) und Präzipitation der RNA für 10 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei -40 °C
6. Zentrifugation bei 12 000 x g für 10 min
7. nach Absaugen des Überstandes Waschen des RNA-Pellets mit 1 ml 75 %igem Ethanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), sorgfältig mischen und bei 7 500 x g für 15 min zentrifugieren
8. Verwerfen des Ethanol-Überstandes und Trocknen des RNA-Pellets bei geöffnetem Eppendorfgefäß
9. Resuspendieren des RNA-Pellets in 50 µl RNase-freiem Wasser

Alle Arbeitsschritte wurden zum Schutz vor RNasen mit ungepuderten Latexhandschuhen durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde anschließend im Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator (Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg) photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und daraufhin eine Konzentration von 100 ng RNA/µl mit RNase-freiem Wasser eingestellt.

3.1.5 RT-PCR

Alle Schritte wurden, soweit nicht anders erwähnt, im Eisbad durchgeführt.

3.1.5.1 DNase-Behandlung

Aufgrund der zu erwartenden DNA-Kontamination musste der RT-PCR eine DNase-Behandlung (RNase-free DNase-Set, Qiagen, Hilden) vorausgehen. Diese sowie die RT-Reaktion und die PCR wurden in 0,5 ml-fassenden RNase-freien und autoklavierten PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Für diese Reaktion wurde zunächst ein DNase-Mastermix (Tabelle 1) von 3,29 µl pro Ansatz hergestellt und mit jeweils 6,5 µl RNA-Verdünnung gemischt.

Tabelle 1 Zusammensetzung des DNase-Mastermix

MnCl₂ (10 mM)	1 µl
10X PCR-Puffer (KCl, Tris-HCl)	1 µl
DNase I (10 U/µl)	1 µl
RNase-Inhibitor (35 U/µl)	0,29 µl

Dieser Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von jeweils 9,79 µl wurde im PCR-Thermocycler (Multicycler PTC 200, Biozym, Hessisch Oldendorf) zunächst für 10 min bei 37 °C (Aktivitätsoptimum der DNase) und anschließend für 5 min bei 75 °C (Denaturierung der DNase) inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße auf 4 °C abgekühlt.

Die DNase-Behandlung der RNA erfolgte unmittelbar vor der Durchführung der RT-PCR, in die 1,5 µl der so behandelten RNA eingesetzt wurden.

3.1.5.2 Auswahl der Primer

Im Rahmen einer RT-PCR wurde eine cDNA für kanines IL-2 (cIL-2) synthetisiert. Die Primer dazu wurden nach der von Dunham et al. (1995) veröffentlichten Sequenz für cIL-2 (NCBI Accession No. D30710) synthetisiert (siehe Tabelle 2).

Neben den Primern für das cIL-2 wurden auch Primer eingesetzt, die Abschnitte der Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifizieren (Grone et al., 1999). Dies diente zur Überprüfung der Nukleinsäure-Integrität, des korrekten Ablaufs der einzelnen Arbeitsschritte sowie als Positivkontrolle („House Keeping Gen“).

Tabelle 2 Sequenz und Position der Primer sowie erwartete Länge des Amplikons

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Position	Richtung	erwartete Länge des Amplikons
GAPDH s	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC		vorwärts	229 bp
GAPDH as	GGC CAT CCA CAG TCT TCT		rückwärts	
cIL-2 s	TGA TGA GTG CAT TGG AG	1 – 17	vorwärts	653 bp
cIL-2 as	GAT TCT TTT TGT AAG CCC	636 - 653	rückwärts	

3.1.5.3 Reverse Transkriptase-Reaktion

Für die RT-Reaktion und die anschließende konventionelle PCR wurde das GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) verwendet. Beide Schritte wurden in einem mit beheizbarem Deckel ausgestatteten PCR-Thermocycler Multicycler PTC 200 durchgeführt. Die reverse Transkription der mRNA zu DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Random Priming“.

Die Zusammensetzung des Mastermixes mit einem Endvolumen von 8,5 µl ergibt sich aus Tabelle 3.

Tabelle 3 Zusammensetzung des RT-Mastermixes

MgCl₂ (25mM)	2 µl
10X PCR-Puffer (KCl, Tris-HCl)	1 µl
dGTP (10 mM)	1 µl
dTTP (10 mM)	1 µl
dATP (10 mM)	1 µl
dCTP (10 mM)	1 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl
murine reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,5 µl
„Random Hexamers“ (50 µM)	0,5 µl

Zu diesem Mastermix wurden 1,5 µl der DNase-behandelten RNA zugegeben, wodurch sich für den Reaktionsansatz ein Volumen von 10 µl ergab. Dieser RT-Ansatz wurde zunächst für 8 min bei 21 °C (Temperaturadaptation der Oligonukleotid-Hexamere), danach für 15 min bei 42 °C (Binden der Hexamere an die RNA, Elongation durch die murine reverse Transkriptase), anschließend für 5 min bei 96 °C (Inaktivierung der reversen Transkriptase, Lösen von RNA-DNA-Heteroduplexen) und zum Abschluß für mindestens 5 min bei 4 °C (Abkühlen des Reaktionsansatzes) inkubiert.

3.1.5.4 Konventionelle PCR

Für diesen Schritt wurde ein 50 µl-Ansatz bestehend aus 39 µl Mastermix (Tabelle 4), 10 µl RT-Produkt und 1 µl Primergemisch (je 0,5 µl des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers, Konzentration der Primerstammlösung je 20 pmol/µl) hergestellt.

Tabelle 4 Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

MgCl₂ (25 mM)	2 µl
10X PCR-Puffer (KCl, Tris-HCl)	4 µl
Ampli Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
depc-Aqua bidest.	32,75 µl

Nach einer anfänglichen Inkubation der PCR-Ansätze für 5 min bei 94 °C (Denaturierung der DNA-RNA-Heteroduplexe) folgten 30 Zyklen der folgenden Schritte:

- 1 min bei 94 °C (Denaturierung)
- 1 min bei 50 °C (Primeranlagerung)
- 1 min bei 72 °C (Elongation der angelagerten Primer durch die Taq-Polymerase)

Zum Abschluss wurde eine weitere Elongationsphase von 1 min bei 75 °C angeschlossen. Die Reaktionsansätze wurden daraufhin auf 4 °C abgekühlt.

3.1.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auswertung und Dokumentation der RT-PCR erfolgte durch die Elektrophorese der DNA-Amplifikate in einem horizontalen, 1 %igen Agarose-Gel. Dazu wurde zunächst 1 g Agarose (Agarose 1000, Invitrogen, Karlsruhe) durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig in 100 ml TBE-Puffer aufgelöst und mit 1 µl Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) versetzt. Das Gel wurde blasenfrei gegossen und nach Erstarren verwendet. 15 µl des PCR-Produktes wurden mit 3 µl Probenpuffer (Typ II Sample Loading Buffer 6X, ABgene, Hamburg) gemischt und in die Taschen des Gels einpipettiert. Um die Größe der PCR-Amplifikate bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein 100 bp-Größenmarker (Superladder-Low 100bp Ladder, ABgene, Hamburg) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 6 V/cm und einer Stromstärke von 500 mA für 42 min (Microcomputer Electrophoresis Power Supply, Consort, Belgien). Zur Visualisierung mittels Durchlicht wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (UV-Transilluminator 312 nm, Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet. Anschließend wurde das Agarose-Gel fotografiert, wozu das Instant Camera System Polaroid MP4 mit 667 Schwarz-Weiß-(ISO3000/36°)-Instantfilm-Kassetten (Photo Bessier, Wiesbaden) verwendet wurde. Die Belichtungszeit betrug bei Blende 5,6 1 Sekunde.

3.1.5.6 Sequenzierung des RT-PCR-Produktes

Die Überprüfung der Sequenz stellte sich als essentiell heraus, da potentielle Lesefehler der Polymerase zu einer falschen Basenfolge und folglich zu einem fehlerhaften cIL-2-Protein führen könnten. Das PCR-Fragment wurde zur Überprüfung der korrekten Basenfolge sequenziert. Dies erfolgte bei SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) mit einem Aliquot des PCR-Ansatzes sowie den beiden unter 3.1.5.2 beschriebenen Primern für cIL-2.

3.1.6 Klonierung des RT-PCR-Produktes

Das sequenzierte PCR-Produkt wurde in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor (Abbildung 1) von Invitrogen (Karlsruhe) einkloniert. Für diese Arbeiten wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Das Prinzip dieser Klonierung beruht darauf, dass die Taq-Polymerase Adenin-Überhänge an die 3'-Enden des PCR-Produktes anfügt. Der pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor besitzt überhängende Thymidin-Reste an der Klonierungstelle, so dass eine Ligation von PCR-Fragment und Vektor unabhängig von Restriktionsschnittstellen durchgeführt werden kann.

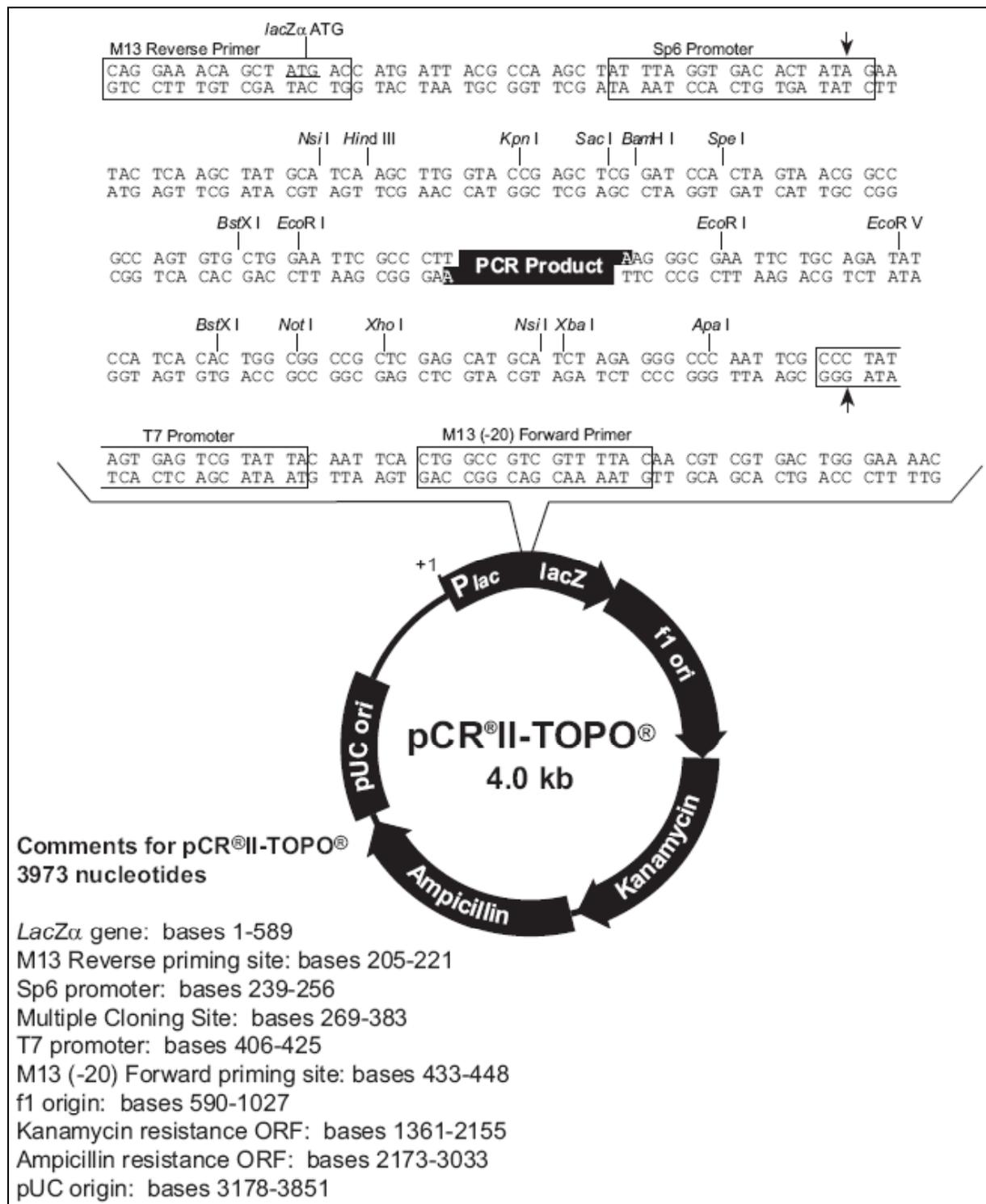


Abbildung 1 Schematische Darstellung des pCR®II-TOPO®-Vektors mit Vergrößerung der Multiple Cloning Site (aus dem Benutzerhandbuch „TOPO TA Cloning®, Five-minute cloning of *Taq* polymerase-amplified PCR products“ Version R, April 2004, Invitrogen, Carlsbad, USA)

3.1.6.1 Nährmedien und Bakterienstamm

Die Herstellung der Agar-Nährböden und Flüssigkulturmedien sowie die Konservierung der Bakterienkulturen erfolgte nach Angaben der Hersteller bzw. nach Standardprotokollen (Sambrook und Russel, 2001). Den Agar-Nährböden und Kulturmedien wurden 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) zugesetzt.

Für die Klonierung wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5αTM (Invitrogen, Karlsruhe), der sich aus dem Sicherheitsstamm K12 ableitet, verwendet. Der Sicherheitsstamm K12 kann weder den menschlichen Darm besiedeln noch außerhalb des Labors überleben.

DH5αTM-Genotyp: F⁻ φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻,m_k⁺)
phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA

3.1.6.2 Klonierungsreaktion

Die Durchführung der Klonierung erfolgte mit den Reagenzien des TOPO TA Cloning[®] Kits nach dem Hersteller-Protokoll, wonach zunächst ein Reaktionsansatz (Tabelle 5) angemischt wurde.

Tabelle 5 Reaktionsansatz zur TOPO TA-Klonierung

PCR-Produkt	1,5 µl
Salzlösung	1 µl
Steriles Wasser	2,5 µl
pCR[®] II-TOPO[®]-Vektor	1 µl

Daran schlossen sich folgende Arbeitsschritte an:

1. Inkubation des Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur für 5 min
2. Abkühlung auf Eis
3. Auftauen von 100 µl der *E. coli*-Suspension auf Eis und Zugabe von 2 µl des Reaktionsansatzes
4. Inkubation für 30 min auf Eis
5. Hitze-Behandlung der Bakterien für 30 s bei 42 °C
6. Abkühlung des Ansatzes auf Eis
7. Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium
8. Schüttelinkubation für 1 h bei 37 °C
9. Ausplattieren des Ansatzes auf einer Agar-Platte und Inkubation bei 37 °C über Nacht

Am folgenden Tag wurde eine eindeutig weiße (Zeichen für erfolgreiche Transfektion des Plasmids) Bakterienkolonie mit einem autoklavierten Zahnstocher gepickt und damit ein Flüssigkulturansatz von 50 ml LB-Medium angeimpft. Dieser wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem NucleoBond® PC100 Plasmid-DNA Purification-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde die Messung der optischen Dichte (OD) der Plasmid-Lösung im Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator (Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg) durchgeführt und daraus die Menge an Plasmid-DNA berechnet.

3.1.6.3 Restriktionsenzymverdau

Zur Kontrolle der Klonierungsreaktion wurde der Vektor mit dem einklonierten PCR-Produkt in einem Restriktionsenzymverdau geschnitten. Dazu wurde das Restriktionsenzym *EcoRI* gewählt, für welches zwei Schnittstellen flankierend zur Multiple Cloning Site (Abbildung 1), jedoch keine weiteren im Vektor vorhanden sind. Dadurch entsteht ein Vektor-Fragment von 4 kbp Größe und ein etwa 0,65 kbp großes Fragment des PCR-Inserts.

Für den Verdau wurde folgender Ansatz hergestellt:

- 1,5 µl Plasmid-DNA
- 2 µl Puffer O+ (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- 1,5 µl *EcoRI* (10 U/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- 15 µl H₂O

Dieses Gemisch wurde für 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Fragmente mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (2 % Agarose 1000, Invitrogen, Karlsruhe).

3.1.6.4 Reklonierung und Sequenzierung des Plasmids

Um eine ausreichende Plasmid-Menge zur Sequenzierung zu erhalten, wurde das Plasmid in *E. coli*-Bakterien vermehrt. Dazu wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher einige Bakterien aus der Flüssigkultur (siehe 3.1.6.2) in 50 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Präparation aus 6 ml dieser Bakterienkultur mit Hilfe des NucleoBond® PC100 Plasmid-DNA Purification-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers. Die Menge isolierter Plasmid-DNA wurde im Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator (Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg) ermittelt. Die Sequenzierung des einklonierten PCR-Produktes erfolgte mit einem Aliquot von 15 µl, (entspricht 4,5 µg Plasmid-DNA) bei SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen).

3.2 Tet-on-Expression

Das Tet-on-Expressionssystem ermöglicht die Expression einklonierter Gene in Abhängigkeit von Tetrazyklin bzw. seiner Derivate wie etwa Doxyzyklin (Gossen und Bujard, 1992).

Das System beruht auf der Transfektion zweier verschiedener Plasmidvektoren in die Zielzelle, wovon einer für den reversen Tetrazyklinaktivator (rtTA) kodiert (Regulator-Plasmid), während das zweite Plasmid (Response-Plasmid) die zu exprimierenden Gene, in diesem Fall das Gen für cIL-2 sowie das Reportergen Luciferase, unmittelbar stromabwärts des Tetrazyklin-responsive Elements (TRE) enthält.

Nach der stabilen Transfektion beider Vektoren in die Zielzellen kann die Expression der Zielsequenzen durch Zugabe von Doxyzyklin angeschaltet werden.

3.2.1 Einbau von Restriktionsschnittstellen in das cIL-2-Gen

3.2.1.1 Primer und PCR-Bedingungen

Die Sequenz des cIL-2 sowie die Internal Ribosomal Entry Site (IRES) und das Reportergen Luziferase wurden im Rahmen einer Dreifachligation in das Plasmid pTRUE eingefügt. Dazu wurden mit Hilfe von speziell designten Primern (Tabelle 6) in einer PCR Schnittstellen für

die Restriktionsenzyme *KpnI* und *MluI* in die Sequenz des cIL-2 eingebaut, wobei ein Fragment mit einer Länge von 479 bp erwartet wird.

Tabelle 6 Sequenz und Position der Primer im cIL-2-Gen (NCBI Accession No. D30710) sowie Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme

Primer	Basensequenz 5' – 3'	Position	Richtung
KpnIL2	<u>GGT ACC</u> ATG TAC AAA ATG CAA CTC TTG	26 - 52	vorwärts
MluIL2rev	<u>ACG CGT</u> CAA GTC AGT GTT GAG AAG ATG CTT TGA CAA AAG G	465 - 504	rückwärts

Der PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Tabelle 7 PCR-Ansatz zum Einbau von Restriktionsschnittstellen

Taq-Polymerase (5 U/µl, Biotherm, NatuTec, Frankfurt)	0,5 µl
dNTPs (10mM) (Roche, Mannheim)	1 µl
Primer (for + rev, je 10 pmol/µl)	je 2 µl
Plasmid pCR[®] II-IL2 (50 ng/µl)	1 µl
Biotherm-Puffer 10X	5 µl
dd H₂O	38,5 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Cycler TC-312, Techne, Staffordshire, England) nach folgendem Schema durchgeführt (Dunham, 1995):

- 2 min bei 94 °C (initiale Denaturierung)
- 30 Zyklen mit jeweils
 - 30 s bei 94 °C (Denaturierung)
 - 30 s bei 50 °C (Annealing)
 - 1 min bei 72 °C (Verlängerung)
- 5 min bei 72 °C (Verlängerung)
- Abkühlung auf 4 °C

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auswertung der PCR erfolgte durch Gelelektrophorese. Dazu wurde 0,8 % (w/v) Agarose (ultraPURE™, Invitrogen, Karlsruhe) in TAE-Puffer gelöst. Zur Herstellung des TAE-Puffers diente modifiziertes TAE-Puffer-Konzentrat (50X Modified TAE Buffer, Millipore, Billerica, USA), das mit Wasser auf die einfache Konzentration verdünnt und mit 100 µg/l Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) versetzt wurde. Nach dem Aufkochen

wurde die Agaroselösung bis zur Verwendung bei 60 °C im Wasserbad aufbewahrt. Die DNA-Probe wurde vor dem Auftragen auf das Gel im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer gemischt (0,1 % (w/v) Orange-G, Fluka, Schweiz; 30 % Glycerin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Parallel zu den Proben wurde die 1 kbp-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Gel-Apparaturen (Werkstatt des Mehrzweckinstitutes, Giessen) bei einem Elektrodenabstand von 15 cm durch Anlegen einer elektrischen Gleichspannung von 120 V für etwa 25 min. Die Fluoreszenz der Proben wurde im UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet und computergestützt mittels des Systems GelPrint 2000i (MWG, Ebersberg) durch Thermoausdruck dokumentiert.

3.2.1.3 Isolierung des DNA-Fragmentes

Zur Isolierung des gewonnenen PCR-Fragmentes wurde ein präparatives Gel hergestellt. Dessen Unterschied zu dem unter 3.2.1.2 beschriebenen Gel bestand in der Größe der Taschen, in die der PCR-Ansatz einpipettiert wird. Diese waren groß genug, um einen kompletten PCR-Ansatz von etwa 50 µl zu fassen. Zur Schonung der DNA und zur Vermeidung von Strangbrüchen wurde dieses Gel im UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet. Das gesuchte Fragment von 479 bp wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung aus dem Gelstückchen isoliert. Dies erfolgte durch Säulen des DNA-Agarosegel-Extraktion-Kits UltrafreeDA[®] (Millipore, Billerica, USA) nach Angaben des Herstellers. Nach einer Zentrifugationsphase von 10 min bei 3 500 x g, bei der die festen Gelbestandteile in der Säule zurückgehalten wurden, befand sich die extrahierte DNA im Filtrat und konnte direkt weiterverwendet werden.

3.2.2 Amplifizierung des Reportergens Luciferase und der IRES

Das Plasmid pCITE-Luci, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Tautz am Institut für Virologie, Fachbereich 10 der Justus-Liebig-Universität Giessen vorhanden war und zur Verfügung gestellt wurde, enthielt die Sequenz für die IRES gefolgt von dem Reportergen Luciferase. Dieses zusammen ca. 2,5 kbp große Fragment wurde mit Hilfe der Primer T3 und BVTk7 (Primer des Instituts für Virologie, Fachbereich 10, Justus-Liebig-Universität

Giessen) in einer PCR aus dem Plasmid amplifiziert. Das PCR-Gemisch setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 8 PCR-Ansatz zu Amplifikation von IRES-Luciferase

Taq-Polymerase (5 U/μl) (Biotherm, NatuTec, Frankfurt)	0,5 μl
dNTPs (10mM) (Roche, Mannheim)	1 μl
Primer T3 (57 pmol/μl)	0,35 μl
Primer BVTk7 (10 pmol/μl)	2 μl
Plasmid pCITE-Luci (85 ng/μl)	0,6 μl
Biotherm-Puffer 10X (NatuTec, Frankfurt)	5 μl
ddH₂O	40,5 μl

Die PCR sowie die Gelelektrophorese und deren Auswertung erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie unter 3.2.1.1 und 3.2.1.2 beschrieben.

Auch dieses Fragment wurde aus einem präparativen Gel wie unter 3.2.1.3 beschrieben isoliert und stand so direkt zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

3.2.3 Klonierung und Analyse beider PCR-Fragmente

Zur Überprüfung der Sequenzen der amplifizierten Fragmente von cIL-2 (siehe 3.2.1) und dem IRES-Luciferase-Komplex (siehe 3.2.2) wurden diese PCR-Produkte in den pGEM-T-Vektor von Promega (Madison, USA) einkloniert. Dieser Vektor ermöglicht das Einklonieren von PCR-Produkten mit Adenin-Überhängen (siehe auch 3.1.6) und vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin.

3.2.3.1 Ligation

Sowohl das cIL-2-Fragment als auch das IRES-Luciferase-Fragment wurden in den pGEM-T-Vektor durch Ligation eingebaut. Dazu diente die T4-DNA-Ligase, die unter ATP-Verbrauch die kovalente Verknüpfung der 3'-OH- mit der 5'-PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNA durch Bildung einer Phosphodiesterbindung katalysiert.

Die beiden Ligationsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 9 Ligationsansatz zur Einklonierung in den Vektor pGEM-T

Rapid Ligation Buffer 2X	5 μ l	Promega, Madison, USA
pGEM-T-Vektor-DNA (50 ng/μl)	1 μ l	
Insert-DNA	3 μ l	entweder cIL2-Fragment oder IRES-Luci-Fragment
T4-DNA-Ligase (350 U/μl)	1 μ l	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Die Reagenzien wurden sorgfältig gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.2.3.2 Transformation der pGEM-T-Vektoren in *E. coli* K12 DH5 α

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* K12 DH5 α Bakterien erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 10 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. 1 ml der Bakteriensuspension diente am nächsten Morgen zum Beimpfen von 100 ml LB⁺⁺-Medium (20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl in LB-Medium). Die Inkubation unter Schütteln bei 37 °C erfolgte solange, bis die optische Dichte OD₆₀₀ einen Wert von 0,4 bis 0,55 erreichte. Die Bakteriensuspension wurde unter gelegentlichem Schwenken etwa 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3.000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 30 ml kaltem TfbI (30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, auf pH 5,8 mit Essigsäure, sterilfiltriert, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe oder Merck KGaA, Darmstadt) resuspendiert und 10 min aus Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurde das Pellet in 4 ml TfbII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, auf pH 6,5 mit KOH, sterilfiltriert, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe oder Merck KGaA, Darmstadt) gelöst. Bei -70 °C wurde die Suspension der Bakterien in 50 μ l-Aliquots gelagert.

Zur Transformation wurden je 50 μ l dieser transformationskompetenten *E. coli* K12 DH5 α Bakterien nach ihrem Auftauen auf Eis zu einem der Ligationsansätze aus 3.2.3.1 gegeben. Nach einer 20minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Danach wurden die Zellen für 2 min wieder auf Eis abgekühlt, mit 200 μ l LB-Medium versetzt und für 20 – 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 10 μ l einer 4 %igen (w/v) X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactopyranosid; Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) zur β -Galaktosidase-Blau-Weiß-Selektion wurden die Ansätze auf zwei Ampicillin-haltigen (50 mg/l) LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3.3 Mini-Präparation der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES aus Bakterienkulturen

Die Präparation der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab (Mini-Präparation) zu analytischen Zwecken erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim und Doly, 1979) und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNA. Von jeder der beiden LB-Agar-Platten wurden je 6 Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in je 3 ml eines Ampicillin-haltigen (100 mg/l) LB-Mediums übertragen. Diese Flüssigkulturen inkubierten unter Schütteln bei 37 °C über Nacht. Von jeder der Flüssigkulturen wurden 1,5 ml bei 16 000 x g für 20 s abzentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in je 200 µl eiskaltem Puffer 1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe; 10 mM EDTA, Merck KGaA, Darmstadt; 100 mg/l RNase A, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) resuspendiert und die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 200 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe; 1 % (w/v) SDS, ICN, Eschwege) und ein weiteres Schütteln für 5 min bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 200 µl Puffer 3 (2,8 M Kaliumacetat pH 5,1, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) und gründlichem Mischen folgte eine erneute Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 min bei 4 °C. Die wässrige Phase wurde danach abpipettiert und in 500 µl Isopropanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) aufgenommen, wodurch die Plasmid-DNA gefällt wurde. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 16 000 x g und 4 °C für 20 min an. Die Pellets wurden nach dem Waschen mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol (Fluka, Buchs, Schweiz) auf einem Heizblock bei etwa 45 °C getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

3.2.3.4 Analytischer Verdau der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES

Sowohl die sechs isolierten pGEM-T-IL2-Klone als auch die sechs Klone von pGEM-T-IRES wurden mit Restriktionsendonukleasen verdaut, um den korrekten Einbau der Inserts zu überprüfen. Für den Verdau von pGEM-T-IL2 wurden die Enzyme *KpnI* und *MluI* (beide NEB GmbH, Frankfurt) verwendet, wonach ein Fragment von etwa 473 bp (cIL-2-Insert) und ein ca. 3 kbp-großes Fragment (Vektor) erwartet wurde. Danach wurde pGEM-T-IRES mit *MluI* und *PstI* (beide NEB GmbH, Frankfurt) verdaut, was zu einem Fragment von etwa 2,5 kbp (IRES-Luciferase-Konstrukt) und ebenfalls zu einem Vektorrest von 3 kbp führte.

Die Restriktionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 10 Ansätze für Restriktionsverdau der Plasmide

	pGEM-T-IL2	pGEM-T-IRES
DNA (siehe 3.2.3.3)	2 µl	2 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	0,5 µl	-
<i>MluI</i> (10 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
<i>PstI</i> (20 U/µl)	-	0,5 µl
Reaktionspuffer	1 µl (OFA, TaKaRa, Frankreich)	1 µl (Buffer 3, NEB GmbH, Frankfurt)
BSA (10 µg/µl)	0,5 µl	-
ddH₂O	5,5 µl	6 µl

Die Ansätze wurden gründlich gemischt und für etwa 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese und Durchleuchtung (siehe 3.2.1.2).

3.2.3.5 Retransformation ausgewählter pGEM-T-Klone

Anhand der Ergebnisse der Gelelektrophorese wurden die Klone pGEM-T-IL2-#1 und pGEM-T-IRES-#2 zur weiteren Verarbeitung ausgewählt. Diese wurden zunächst retransformiert, um so eine größere Menge an Plasmid-DNA zu gewinnen. Die Retransformation fand mit Hilfe des *E. coli*-Stammes K12 HB101 nach dem gleichen Schema wie unter 3.2.3.2 beschrieben statt, allerdings genügten hierfür 1 µl Plasmid-Lösung (aus Mini-Präparation, siehe 3.2.3.3) und 10 µl *E. coli*-Suspension. Diese retransformierten Bakterien wurden auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag jeweils 50 ml eines Ampicillin-haltigen LB-Mediums beimpft.

3.2.3.6 Midi-Präparation der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen und DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im größeren Maßstab zum Zwecke der weiteren Verwendung wurde das NucleoBond[®] PC100-Kit mit Anionen-Austauscher-Säulen und mitgelieferten Puffern (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das so gewonnene Plasmid-DNA-Pellet wurde in 210 µl ddH₂O aufgelöst.

Um den DNA-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde die UV-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglas-Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren, im Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator (Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg) gemessen.

Die Analyse der retransformierten Plasmide erfolgte durch erneuten Restriktionsenzymverdau wie in 3.2.3.4 beschrieben, wofür jedoch 200 ng Plasmid-DNA aus der Midi-Präparation eingesetzt wurden.

3.2.4 Sequenzierung des pGEM-T-IL2-#1-Klons

Da das inklonierte Fragment von cIL-2 zur späteren Transkription und Translation in ein biologisch aktives Protein vorgesehen waren, musste durch eine erneute Sequenzierung die korrekte Basensequenz überprüft werden.

Auf die Überprüfung der Sequenz des IRES-Luciferase-Konstruktes wurde zunächst verzichtet. Sie erfolgte später anhand des Nachweises der funktionellen Aktivität dieser Abschnitte.

Die Ermittlung von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Dabei wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt in vier einzelnen PCR-Reaktionen amplifiziert. Jede dieser Reaktionen enthält neben einem Primer, der DNA-Polymerase, Puffer, Wasser und allen vier dNTPs auch jeweils in einem bestimmten Verhältnis eine Sorte der 2',3'-Dideoxynanaloga (ddCTP, ddATP, ddTTP, ddGTP). Nach dem Einbau eines dieser Analogons durch die DNA-Polymerase bricht die Kettenverlängerung ab, da aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Gruppe keine weitere Phosphodiesterbindung mehr hergestellt werden kann. So werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge produziert, da die Kettenabbrüche statistisch verteilt erfolgen. In dem ersten der vier Reaktionsansätze befinden sich alle Fragmente, die mit einem C enden, in dem zweiten alle mit einem A am Schluss, in dem dritten alle mit einem T und in dem vierten alle mit einem G. Der Nachweis der entstandenen Fragmente, deren Größenunterschied nur ein Nucleotid beträgt, erfolgt durch die Auftrennung der vier Proben in vier nebeneinander liegenden Spuren eines hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgels. Da der zur Reaktion verwendete Primer an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, können die Fragmente durch die Anregung über einen Laser und die Detektion des emittierten Lichtes sichtbar gemacht und so die Sequenz mit der entsprechenden Software ausgelesen werden.

3.2.4.1 Sequenzieransatz

Die Sequenzier-PCR erfolgte in einer Vorwärts- und einer Rückwärtsreaktion, um das inklonierte cIL-2-Fragment von beiden Seiten sequenzieren zu können. Dazu wurden Primer für M13 verwendet, einem Abschnitt des *lacZ*-Gens, das in vielen Vektoren die Multiple Cloning Site (MCS) enthält.

Es kamen etwa 200 ng DNA (aus der Midi-Präparation, siehe 3.2.3.6) je kbp Plasmidlänge zum Einsatz. Weiterhin wurden jeweils 2 pMol des passenden fluoreszierenden IRD-800-gekoppelten Primers (IRD-800, MWG-Biotech, Ebersberg) zugegeben und der Ansatz mit ddH₂O auf 25 µl aufgefüllt.

Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 11 Primer-DNA-Ansätze für pGEM-T-IL2-#1

Primer (je 2 pmol/µl)	1 µl („M13“)	1 µl („M13rev“)
DNA (siehe 3.2.3.5)	3,3 µl	3,3 µl
ddH₂O	20,7 µl	20,7 µl

Die 25 µl-Ansätze wurden zu je 6 µl auf vier PCR-Gefäße (1 µl Pipettierverlust) aufgeteilt. In je ein PCR-Gefäß wurden 2 µl G-, A-, T- oder C-Mix aus dem „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit with 7-Deaza-dGTPTM“ (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) pipettiert und nach dem Mischen im Thermocycler (Cycler TC-312, Techne, Staffordshire, England) inkubiert. Die PCR lief in 30 Zyklen mit je 30 s bei 95 °C, 30 s bei 50 °C und 45 s bei 72 °C und einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 70 °C ab. Den Reaktionsansätzen wurden anschließend 4 µl Stop-Lösung (20 mM EDTA pH 8,0, Merck KGaA, Darmstadt und 300 mg/l Bromphenolblau, BioRad Laboratories GmbH, München in deionisiertem Formamid, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) zugegeben, wonach diese erneut für 2 min bei 40 °C sowie für 2 min bei 70 °C inkubiert wurden.

3.2.4.2 Sequenziergel und Auswertung der Sequenz

Die Probenauftrennung und die Detektion der Sequenz erfolgte mit dem LI-COR 4000 LTM DNA-Sequencer (Li-Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg). Dazu wurden 0,2 mm dicke Polyacrylamidgele verwendet. Nach Reinigung, Entfettung und Zusammenbau der Glasplatten wurde die Polyacrylamidlösung durch einen 0,45 µm-Filter mittels einer Spritze

zwischen die Platten gegossen. Die Polyacrylamidlösung setzte sich aus 32 ml Sequagel[®] XR (National Diagnostics, Atlanta, USA), 8 ml Sequagel[®]-Puffer (National Diagnostics, Atlanta, USA), 2 ml 10X LongRun-Puffer (162 g Tris, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe; 27,5 g Borsäure, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe; 9,3 g EDTA-Na, Merck KGaA, Darmstadt mit ddH₂O auf 1 l), 15 ml H₂O, 8 g Harnstoff (Merck KGaA, Darmstadt), 400 µl 10 %igem APS (Ammoniumpersulfat, Invitrogen, Karlsruhe) und 20 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) zusammen. Nachdem die Gelsubstanz für mindestens eine Stunde auspolymerisierte, wurden die Platten erneut von außen gereinigt und zwischen die Elektroden des Sequenzers gespannt. Als Elektrophoresepuffer diente das 10X LongRun-Konzentrat in einer Verdünnung von 1:10. Zunächst wurde ein Vorlauf von 30 min durchgeführt (2000 V, 37 mA, 50 W, 45 °C). Danach wurde ein 48er-Haifischzahn-Kamm eingesteckt und jeweils 1 µl der entsprechenden Probe pro Vertiefung einpipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf.

Durch die Funktionen „Autogain“ und „Autofocus“ des Software-Programmes „DataCollection“ wurde eine korrekte Einstellung der Optik des Lasers und des Scanners sowie eine optimale Signal-Verstärkung sichergestellt. Das virtuelle Bild des Gels konnte schon während des Laufes betrachtet und später mittels zugehöriger Software „ImageAnalysis“ automatisch oder manuell ausgewertet werden.

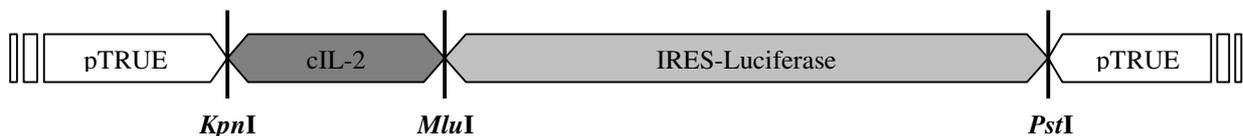
Die Sequenzdateien wurden zusammen mit den zur Auswertung benötigten Sequenzen über eine FTP-Verbindung auf einen Server des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg übertragen. Hier stand das GCG-Programm-Paket (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) im HUSAR-System (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) zur Analyse der Daten zur Verfügung. Zum Vergleich der erhaltenen mit den bereits bekannten Sequenzen wurde das Programm „gap“ verwendet. Die Ergebnisse wurden manuell überprüft, gespeichert und mittels Ausdruck dokumentiert.

3.2.5 Zusammenbau des Plasmides pTRUE-IL2-IRES

Zur Expression von Proteinen durch eukaryotische Zellen mit Hilfe des Tet-on-Systems ist die Transfektion zweier Plasmide erforderlich: Das erste Plasmid (Regulator-Plasmid) kodiert für den rtTA (reverser tetrazyklinabhängiger Transaktivator), an den Tetra- oder Doxyzyklin binden kann. Das zweite Plasmid (Response-Plasmid) trägt die Erkennungssequenz für den

rtTA-Doxyzyklin-Komplex (Tetrazyklin Responsive Element bzw. Tetrazyklinoperator), gefolgt von einem Promotor und der Gensequenz des gewünschten Proteins, hier cIL2 sowie das IRES-Luciferase-Konstrukt.

Als Response-Plasmid wurde hier das Plasmid pTRUE verwendet, ein am Institut für Virologie, Fachbereich 10 der Justus-Liebig-Universität Giessen, modifizierter pTRE-Vektor (Clontech Laboratories Inc., USA). Durch eine Dreifachligation (siehe Schema 4) von pTRUE, der Gensequenz für cIL-2 und des IRES-Luciferase-Konstruktes wurde das Response-Plasmid pTRUE-IL2-IRES hergestellt.

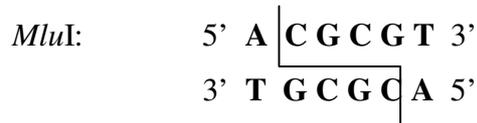
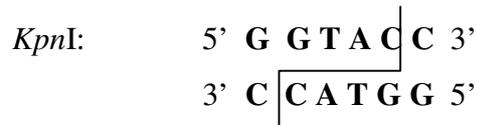


Schema 4 Klonierungsstrategie für pTRUE-IL2-IRES und hierbei verwendete Restriktionsenzyme

3.2.5.1 Restriktionsenzymverdau

Um die drei Abschnitte im Rahmen einer Dreifach-Ligation verbinden zu können, musste zunächst ein Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgen, um die gewünschten Fragmente aus den pGEM-T-Plasmiden auszuschneiden. Dazu wurden Restriktionsenzyme gewählt, die auf beiden Seiten der DNA-Fragmente kompatible 5'- oder 3'-Überhänge übrig ließen („sticky ends“). Auf diese Weise konnte die intramolekulare Religation der Vektor-DNA reduziert und der Einbau der Fragmente in der gewünschten Orientierung sichergestellt werden.

Hier wurden die Enzyme *KpnI*, *MluI* und *PstI* ausgewählt, die die folgenden Erkennungssequenzen und Schnittstellen charakterisieren:



Die Verdauansätze bestanden aus folgenden Komponenten:

Tabelle 12 Ansätze zum Restriktionsverdau

	pTRUE	pGEMT-IL2-#1	pGEMT-IRES-#2
DNA (3 µg)	21,5 µl	6,2 µl	3,2 µl
KpnI (10 U/µl)	2,0 µl	2,5 µl	-
MluI (10 U/µl)	-	2,5 µl	1,5 µl
PstI (20 U/µl)	1,5 µl	-	0,5 µl
ScaI (10 U/µl)	-	-	1,5 µl
Puffer	7,0 µl (Buffer 1, NEB GmbH, Frankfurt)	5 µl (OFA, TaKaRa, Frankreich)	10 µl (TaKaRa H, TaKaRa, Frankreich)
BSA (10 µg/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H₂O	37,5 µl	33,3 µl	82,8 µl

Diese Ansätze wurden gründlich gemischt und für 15 min bei optimaler Temperatur inkubiert. Das Plasmid pGEMT-IRES-#2 wurde zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *ScaI* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) geschnitten, um die Größe des verbleibenden Vektorrests weiter zu reduzieren. Dadurch war das Ausschneiden des IRES-Luciferase-Fragments aus dem nachfolgenden präparativen Agarose-Gel leichter, da der ungeschnittene Vektor mit etwa 3 kbp und das Fragment mit etwa 2,5 kbp relativ dicht beieinander lagen.

Die drei zu kombinierenden Fragmente wurden mit Hilfe eines präparativen Gels (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3) isoliert, wozu jeweils 50 µl der Verdauung auf dieses Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

3.2.5.2 Dephosphorylierung und Phenol-Chloroform-Extraktion des linearisierten Vektors pTRUE

Das geschnittene Vektor-Plasmid pTRUE wurde vor der Dreifachligation dephosphoryliert, um eine intramolekulare Ligation der Moleküle ohne den Einbau der Inserts zu verhindern. Hierzu wurden nach der Präparation aus dem Agarosegel 10 % (v/v) Dephosphorylierungspuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 1 U Alkalische Phosphatase (CIP, calf intestine phosphatase, 1 U/µl, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 5 min inkubiert.

Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Dazu wurde das Volumen des Ansatzes zunächst mit H₂O auf 100 µl eingestellt. Nach der Zugabe von 100 µl gesättigtem Phenol (Roti-Phenol, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, gesättigt mit 10 mM Tris/HCl, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe; 1 mM EDTA, pH 8,0, Merck KGaA, Darmstadt; 0,1 % (w/v) Hydroxycholin, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), gründlichem Vermischen und einer Zentrifugation bei 16 000 x g für 5 min wurde die wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, mit 150 µl Chloroform (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) versetzt und erneut zentrifugiert (16 000 x g, 5 min). Die DNA wurde durch Zugabe von 250 µl eiskaltem Ethanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) und 10 µl 4 M Lithiumchlorid (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) zur wässrigen Phase für 20 min bei -25 °C gefällt und anschließend bei 4 °C und 16 000 x g für 15 min zentrifugiert. Nach dem Waschen in 200 µl 70 % (v/v) Ethanol und erneuter Zentrifugation (16 000 x g, 5 min) wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 30 µl H₂O resuspendiert.

3.2.5.3 Dreifachligation

Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor und die beiden Inserts wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (350 U/µl, TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) zusammengefügt. Dieses Enzym katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3'-OH- mit der

5'-PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNA durch die Bildung einer Phosphodiesterverbindung unter ATP-Verbrauch.

Dazu wurden 2 µl des Vektors, 4 µl des IRES-Fragmentes und 2,5 µl des IL-2-Fragmentes mit 1 µl 10X Ligase-Puffer (TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) und 0,5 µl T4-DNA-Ligase vermischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zu dieser Ligation wurde parallel eine Religationskontrolle angesetzt, die aus den gleichen Komponenten wie der Ligationsansatz bestand. Anstelle der Fragment-DNA (cIL-2 und IRES) wurde jedoch ddH₂O zugegeben. Diese Kontrolle diente zur Abschätzung der Effizienz des Fragment-Einbaus im Vergleich zur intramolekularen Religation des Vektors.

Die gesamten Ansätze der Dreifach-Ligation und der Religationskontrolle wurden in den *E. coli*-Stamm K12 HB101 nach dem gleichen Schema wie unter 3.2.3.5 beschrieben transformiert. Daran schlossen sich die unter 3.2.3.3 beschriebenen Schritte der Plasmid-Mini-Präparation von 6 gepickten Kolonien an. Für den folgenden analytischen Verdau (siehe Tabelle 13) wurden die Restriktionsenzyme *MluI* und *PstI* eingesetzt, wonach zwei Fragmente von etwa 2,5 kbp und 3,5 kbp Größe erwartet wurden.

Tabelle 13 Mastermix für den analytischen Verdau 6 verschiedener Plasmid-Mini-Präparationen von pTRUE-IL-2-IRES

<i>MluI</i> (10 U/µl)	2 µl
<i>PstI</i> (20 U/µl)	2 µl
Puffer (NEB 3, NEB GmbH, Frankfurt)	6 µl
H₂O	44 µl

Dieser Mastermix wurde auf 6 Eppendorf-Gefäße verteilt und mit jeweils 1 µl der Plasmid-DNA versetzt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Auswertung auf einem Agarosegel wie oben beschrieben (siehe 3.2.1.2).

Anhand dieses Ergebnisses wurde ein pTRUE-IL-2-IRES-Klon ausgewählt, mit dem eine Retransformation und eine Plasmid-Midi-Präparation wie unter 3.2.3.5 und 3.2.3.6 erklärt durchgeführt wurden. Durch einen erneuten analytischen Verdau wurde die Übereinstimmung des Plasmids der Mini- und der Midi-Präparation nachgewiesen.

3.2.6 Transiente Transfektion von pTRUE-IL-2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen und funktionelle Überprüfung des Reportergens Luciferase

Unter einer transienten Transfektion eines Plasmides versteht man die Inkorporation von Plasmid-DNA in Empfängerzellen, ohne dass ein Einbau dieses Plasmids in das Empfängerzellgenom erfolgt. Dadurch besteht zwar zum einen die Gefahr, dass das Plasmid im Laufe der Zellteilungen verloren geht, andererseits werden jedoch durch den zelleigenen Transkriptions- und Translationsapparat die in dem Plasmid enthaltenen Gene abgelesen und entsprechende Proteine produziert.

Als Empfängerzellen diente eine BHK-Tet-on-Zelllinie (Baby Hamster Kidney Zellen), der bereits das Plasmid pEF-Tet-on stabil transfiziert wurde und die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Tautz (Institut für Virologie, Fachbereich 10 der Justus-Liebig-Universität Giessen) zur Verfügung gestellt wurde.

BHK-Zellen sind fibroblastische Zellen aus der Niere des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*). Sie sind adhärent wachsende Zellen mit der für mesenchymale Zellen typischen spindelförmigen Morphologie und der Bildung von mehrkernigen Riesenzellen. Immunhistologisch läßt sich das mesenchymalen Marker-Antigen Vimentin nachweisen, wogegen das epitheliale Marker-Antigen Zytokeratin nicht nachgewiesen werden kann (siehe Abbildungen 2 - 4).

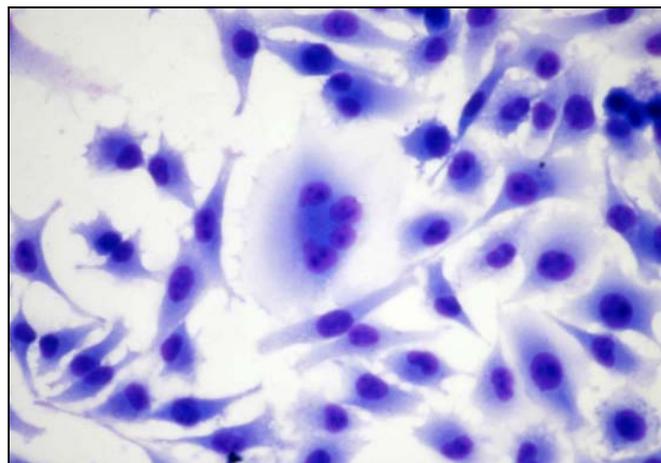


Abbildung 2 **BHK-Zellen, Objektträgerkultur, May-Grünwald-Giemsa, 40 x**
Typische spindelförmige oder ovale Gestalt fibroblastischer Zellen, im Zentrum der Abbildung mehrkernige Riesenzelle

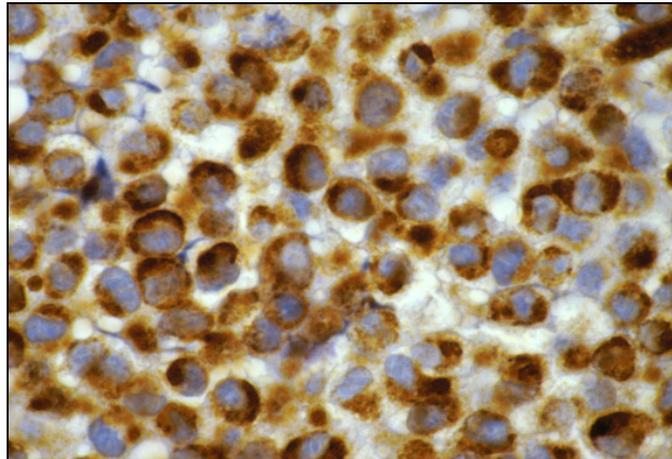


Abbildung 3

BHK-Zellen, Paraffinschnitt eines Zellpellets, Immunhistologischer Nachweis von Vimentin, Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode, 100 x

Diffuse braune Reaktion des Zytoplasmas infolge Bindung des spezifischen Antiserums an das für mesenchymale Zellen charakteristische Zytoskelett-Protein Vimentin.

Zellen direkt nach dem Ernten aus der Kulturflasche fixiert, daher abgerundet und nicht mehr spindelförmig wie im Monolayer der Abb. 2

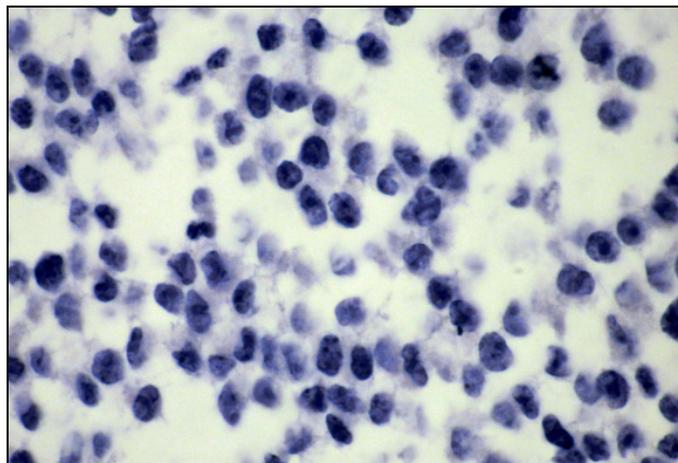


Abbildung 4

BHK-Zellen, Paraffinschnitt eines Zellpellets, Inkubation mit spezifischem anti-Zytokeratin-Antiserum, Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode, 100 x

Keine Bindung des spezifischen Antiserums für diesen Marker epithelialer Zellen

3.2.6.1 Zellkulturarbeiten mit BHK-Tet-on-Zellen zur Vorbereitung der Transfektion

Die Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank (Holten Laminar Air Flow, Safe 2000, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) statt. Die BHK-Tet-on-Zellen wurden in Zellkulturschalen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) mit einem Durchmesser von 10 cm bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Steri-Cult 200, Forma Scientific Inc., Marietta, USA) inkubiert. Als Zellkulturmedium diente BFA-34 (4,5 g/l DMEM-Pulver, Invitrogen, Karlsruhe; 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxantin, 0,1 µg/l Biotin, 44 mM NaHCO₃), dem 10 % fetales Kälberserum (FKS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin (beides Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) zugesetzt wurde. Zur Selektion auf Zellen, die stabil das Plasmid pEF-Tet-on im Genom enthalten, wurden dem Kulturmedium das Antibiotikum Neomycin (G418-Sulfat, Calbiochem, Darmstadt), dessen Resistenz auf dem Plasmid vermittelt wird, im Verhältnis 1:400 zugesetzt.

Das Passagieren der Zellen erfolgte je nach Dichte des Monolayers in einem Abstand von drei bis vier Tagen. Dazu wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit 5 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, auf pH 7,4 mit HCl) gespült. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml Trypsin (2,5 g/l Trypsin, 16 mg/l Phenolrot, 3,3 mM EDTA in PBS) bedeckt und für etwa 3 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch Resuspension in 10 ml Zellkulturmedium wurden die Zellen abgelöst und vereinzelt. $\frac{1}{30}$ dieser Suspension wurde in eine neue Schale mit 10 ml Zellkulturmedium gegeben und wieder unter den oben genannten Bedingungen inkubiert.

3.2.6.2 Transiente Transfektion mit Metafectene™

Bei Metafectene™ (Biontex Laboratories GmbH, Martinsried) handelt es sich um ein polykationisches Transfektionsreagenz, das in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Die zu transfizierende DNA bildet laut Herstellerangabe damit einen Komplex, der per Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. In der Zelle wird durch „Endosome Buffering“ und „Repulsive Membrane Acidolysis“ die gekoppelte DNA freigesetzt (Remy et al., 1995).

Die BHK-Tet-on-Zellen wurden am Vortag wie unter 3.2.6.1 beschrieben abtrypsiniert und 200 µl der Zellsuspension in 2 ml Kulturmedium (entspricht 1:10) in einer 6-Well-Platte

(Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Dadurch wurde für die Transfektion eine Dichte des Monolayers von etwa 90 % erreicht.

Vor der Transfektion wurden zunächst die Plasmid-DNA (siehe 3.2.5.3) und die Metafectene™-Stammlösung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gevortext. In sterilen Eppendorf-Gefäßen wurden mit serum- und antibiotikafreiem Zellkulturmedium folgende Lösungen angemischt:

- Lösung A1: 50 µl Kulturmedium + 1,5 µg Plasmid-DNA
- Lösung A2: 50 µl Kulturmedium
- Lösung B: 5 µl Metafectene™ + 100 µl Kulturmedium

Die Transfektion erfolgte in folgenden Schritten:

1. Jeweils 50 µl der Lösung B zu den Lösungen A1 und A2 (Negativkontrolle) geben und vorsichtig mischen
2. Zur Bildung des DNA/Lipid-Komplexes 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Beide Ansätze zu den Zellen geben und vorsichtig mischen
4. Inkubation für 3 h im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂
5. Absaugen des DNA/Lipid-Komplex-haltigen Kulturmediums und Ersetzen durch serum- und antibiotikahaltiges Kulturmedium
6. Zugabe von Doxzyklin (Alexis Biochemicals, Grünberg) (Konzentration 2 mg/ml) im Verhältnis 1:400

3.2.6.3 Luciferase-Assay zur Überprüfung des Reportergens

Die Expression des Reportergens Luciferase wurde mit Hilfe des Kits „Luciferase Assay System®“ (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Das Enzym Luciferase katalysiert mit Hilfe des Kosubstrats ATP•Mg²⁺ die Oxidation des Substratmoleküls Luciferin zu Oxyluciferin. Die chemische Energie dieser Oxidation wird durch Elektronenübergänge als Lichtimpuls emittiert. Diese Lichtimpulse werden als dimensionslose Werte angegeben. Das Luciferase Assay System® nutzt zusätzlich Koenzym A (CoA) für eine verbesserte Kinetik dieser Enzymreaktion.

Die Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben. 24 h nach Transfektion und Induktion wurde die Zellen zunächst lysiert. Dazu wurde der mitgelieferte 5X Lysis Puffer mit H₂O im Verhältnis 1:4 gemischt. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgesaugt und der Monolayer einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 400 µl 1X Lysis Puffer pro Well einer 6-Well-Platte zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen danach abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis zwischengelagert. Nachdem das Gemisch für 10 – 15 s gevortext wurde, schloss sich eine Zentrifugation für 15 s bei 12 000 x g und Raumtemperatur an. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Messung der Luciferaseaktivität auf Eis gelagert.

3.2.6.4 Luciferase-Assay am Luminometer

Das Luciferase-Substrat wurde bei -70 °C gelagert und kurz vor dem Assay aufgetaut. Die Messung erfolgte im Luminometer „L Max Microplate Luminometer“ von Molecular Devices (Sunnyvale, USA) und wurde mit dem Programm „Soft Max Pro“ ausgewertet.

Es wurden jeweils 100 µl des unter 3.2.6.3 gewonnenen Überstandes in ein Well einer undurchsichtigen MTP einpipettiert. Die vom Luminometer automatisch bei der Messung zugegebene Substratmenge lag bei 100 µl je Well.

3.2.7 Stabile Transfektion von pTRUE-IL-2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen zur Erzeugung einer IL-2-produzierenden Zelllinie

Die stabile Transfektion erfolgte mit dem linearisierten Plasmid pTRUE-IL-2-IRES. Durch die Linearisierung kann das Plasmid dauerhaft in das Genom der Wirtszellen integriert werden, wodurch die eingebauten Gensequenzen bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden können. Als Empfängerzellen diente wieder die BHK-Tet-on-Zelllinie (siehe 3.2.6).

3.2.7.1 Zellkulturarbeiten mit BHK-Tet-on-Zellen zur Vorbereitung der Transfektion

Die Zellen wurden wie unter 3.2.6.1 beschrieben behandelt und zur Transfektion vorbereitet.

3.2.7.2 Linearisierung und Aufreinigung des Plasmids pTRUE-IL-2-IRES

Die Linearisierung erfolgte mit dem Restriktionsenzym *FspI* (NEB GmbH, Frankfurt). Der Ansatz des Verdauens setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 14 Ansatz des Restriktionsverdauens zur Linearisierung von pTRUE-IL-2-IRES

Plasmid-DNA (1,2 µg/ml)	4,2 µl
<i>FspI</i> (5 U/µl)	1 µl
Puffer (NEB 4, NEB GmbH, Frankfurt)	6 µl
H₂O dd	48,8 µl

Nach der Inkubationszeit bei der für das Enzym optimalen Reaktionstemperatur von 37 °C wurde der Erfolg der Linearisierung mittels eines Agarosegels (siehe 3.2.1.2) überprüft. Erwartet wird eine Bande in der Größe von 6 kbp.

Das linearisierte Plasmid wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 3.2.5.2) aufgereinigt und die Konzentration der Plasmid-DNA im Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator (Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg) gemessen.

3.2.7.3 Stabile Transfektion mit Metafectene™

Die Transfektion von pTRUE-IL-2-IRES erfolgte wiederum mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™ (Biontex Laboratories GmbH, Martinsried).

Zusätzlich wurde das Plasmid pCEF-PAC, das mit dem Restriktionsenzym *HindIII* (NEB GmbH, Frankfurt) linearisiert und ebenfalls in einer Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 3.2.5.2) aufgereinigt wurde, stabil in die Zielzellen transfiziert. Dieses Plasmid trägt das PAC-Resistenzgen (Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin), wodurch nach der Transfektion eine antibiotikumgestützte Selektion erfolgreich transfizierter Zellen erfolgen kann.

Die BHK-Tet-on-Zellen wurden nach den unter 3.2.6.2 beschriebenen Schritten vorbereitet und in einer 6-Well-Platte ausgesät.

Nachdem die zur Transfektion benötigten Lösungen vorbereitet wurden (siehe 3.2.6.2), wurden Lösungen mit folgender Zusammensetzung mit serum- und antibiotikafreiem Kulturmedium in sterilen Eppendorf-Gefäßen angemischt:

- Lösung A: 2,5 µg pTRUE-IL-2-IRES $\Delta FspI$ + 0,2 µg pCEF-PAC $\Delta HindIII$ + 100 µl Kulturmedium
- Lösung B: 10 µl Metafectene™ + 100 µl Kulturmedium

Die Transfektion erfolgte wie unter 3.2.6.2 beschrieben, wobei jedoch der letzte Schritt, die Zugabe von Doxzyklin, entfiel.

3.2.7.4 Klonierung der transfizierten Zellen

Um erfolgreich transfizierte Zellen zu vereinzeln, wurde 48 h nach der Transfektion das Kulturmedium abgenommen und der Zellmonolayer mit PBS gewaschen. Nachdem mit 0,5 ml Trypsin die Zellen abgelöst wurden, erfolgte die Aufnahme der Zellen in 10 ml serum- und antibiotikahaltigem Zellkulturmedium (siehe 3.2.6.1), dem zusätzlich die Selektionsantibiotika G418 (50 mg/ml, Calbiochem, Darmstadt) und PAC (2 mg/ml, Alexis Biochemicals, Grünberg) jeweils in einer Konzentration von 1:400 zugesetzt wurden (Selektionskulturmedium). Von dieser Suspension wurden je $1/1000$, $1/500$, $1/200$ und $1/100$ in einer neuen Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser in 10 ml Selektionsmedium inkubiert.

Nach einer Wachstumsphase von etwa drei Wochen konnten einzelne Kolonien aus den Schalen isoliert werden. Dazu wurde zunächst die kolonientragende Zellkulturschale mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml PBS auf die Platte gegeben und diese zum Picken der Kolonien leicht schräg gehalten, sodass etwa die Hälfte der Platte und damit auch die sich in diesem Bereich befindenden Kolonien von der Flüssigkeit bedeckt waren, die zu isolierende Kolonie sich jedoch in der oberen, flüssigkeitsfreien Hälfte befand. In einer abgeschnittenen und sterilisierten Pipettenspitze wurde etwas Trypsin aufgenommen und auf die zu pickende Zellkolonie aufgesetzt. Die Zellen dieser Kolonie konnten nach etwa 60 s durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aufgenommen werden, wobei die Pipettenspitze nach Möglichkeit nicht vom Schalenboden abgehoben werden sollte. Die Zellen wurden anschließend in eine Vertiefung einer 48-Well-Platte (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) überführt, in die bereits 800 µl Selektionsmedium vorgelegt worden waren. Auf diese Weise wurden insgesamt 12 Kolonien isoliert.

Nachdem sich in den Vertiefungen Zell-Monolayer gebildet hatten, wurden diese abtrypsiniert und die Zellen zunächst in eine 6-Well-Platte und später in eine Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm überführt.

3.2.7.5 Luciferase-Assay und Auswahl der Klon-Kolonien

Die 12 Klone wurden anschließend im Luciferase-Assay auf die Expression des Luciferase-Reportergens getestet.

Dazu wurden die Zellen zunächst abtrypsiniert und in eine 6-Well-Platte in einer Verdünnung von 1:10 ausgesät, wobei für jede Klon-Linie zwei Wells angeimpft wurden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde ein Ansatz pro Klon durch die Zugabe von 5 µl Doxozyklin induziert. Nach weiteren 24 h wurde ein Luciferase-Assay wie unter 3.2.6.3 durchgeführt und die Aktivität der Luciferase im Luminometer gemessen (siehe 3.2.6.4).

Anschließend wurde für jeden der 12 Klone der Stimulationsindex (SI) nach folgender Formel ermittelt:

$$SI = \frac{\text{Luciferase-Aktivität}_{\text{uninduziert}}}{\text{Luciferase-Aktivität}_{\text{induziert}}}$$

3.2.7.6 Reklonierung

Anhand der ermittelten Werte wurden drei der 12 Klone (A1, A5, A8) rekloniert. Dabei handelte es sich um den Klon mit dem höchsten SI (A1), den Klon mit der höchsten Luciferase-Aktivität im induzierten Zustand (A5) und den Klon mit der niedrigsten Luciferase-Aktivität im uninduzierten Zustand (A8). Für die weitere Kultivierung sollten so homogenere Zellpopulationen der ausgewählten Klone gewonnen werden. Die Reklonierung wurde nach den unter 3.2.7.4 genannten Schritten durchgeführt. Für die weiteren Untersuchungen wurde der Schwerpunkt auf A5 und insgesamt 9 Reklone (A5.1, A5.2, A5.3, A5.4, A5.5, A5.6, A5.7, A5.8 und A5.9) dieser Linie gelegt, die zum Teil später noch hergestellt wurden.

3.2.8 Kryokonservierung der gewonnenen Zell-Klone

Zur dauerhaften Lagerung wurden von jeder der 12 Klon-Linien sowie von allen Reklonen mehrere Kryokulturen in flüssigem Stickstoff angelegt, die bei Bedarf aufgetaut wurden.

Dazu wurden zunächst die Zellen in einer 10 cm-Kulturschale kultiviert, bis sich eine Konfluenz des Monolayers von 90 – 100 % gebildet hatte. Nach dem Ablösen mit Trypsin

wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 400 x g für 5 min und RT an. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und das Zellpellet in 1,8 ml FKS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) vorsichtig resuspendiert. In je 2 Kryoröhrchen (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) pro Zelllinie wurden 100 µl DMSO (Serva, Heidelberg) vorgelegt und 900 µl der entsprechenden Zellsuspension dazu gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Kryoröhrchen in eine mit Isopropanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) gefüllte Kryobox (Nalgene Labware, Hereford, England) gestellt und bei -70 °C tiefgefroren. Dadurch wurden die Zellen schonend um 1 °C pro Minute auf -70 °C abgekühlt. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff dauerhaft asserviert.

3.3 RT-PCR zum Nachweis der cIL2-mRNA in den transfizierten BHK-Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob die transfizierten Zellen überhaupt in der Lage waren, rcIL-2 zu produzieren. Dazu wurde eine RT-PCR durchgeführt, mit der nachgewiesen werden sollte, dass die Zellen mRNA besitzen, die für das rcIL-2-Protein kodiert. Um jedoch auszuschließen, dass in den PCR-Schritten nicht doch DNA amplifiziert wurde, musste zunächst eine DNase-Behandlung vorgenommen werden. Dadurch wurde eventuell vorhandene DNA aus dem RNA-Isolat enzymatisch abgebaut und eliminiert.

Die nachfolgende PCR erfolgte mit den Primern, die für das cIL-2-Insert spezifisch sind (siehe 3.2.1.1, Tabelle 6).

Zur Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz angefertigt, bei dem kein vorgeschalteter RT-Schritt erfolgte. Dadurch war auch keine cDNA im Ansatz zu erwarten, die im nachfolgenden PCR-Schritt hätte amplifiziert werden können.

3.3.1 Vorbereitung und Induktion der transfizierten BHK-Zellen

Zwei transfizierte Klone der BHK-Zellen wurden wie unter 3.2.7.5 beschrieben in eine 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 h mit 5 µl Doxyzyklin induziert. Bei diesen beiden Klonen handelte es sich zum einen um eine Linie mit einem hohen absoluten Luciferase-Wert (A5) und zum anderen um eine Linie mit hohem Stimulationsindex (A1).

Als Negativ-Kontrolle diente eine Kultur nativer, nicht transfizierter BHK-Zellen (BHK).

Die Isolate der drei Kulturen wurden während der folgenden Arbeitsschritte gleichartig behandelt.

3.3.2 RNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung

Die Isolierung der RNA aus den BHK-Zellen erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Jede ausgesäte Kultur der 6-Well-Platte wurde gleichartig behandelt.

Zunächst wurde der Zellmonolayer mit 2 ml PBS gewaschen. Zu 594 µl des RLT-Puffers wurden 6 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) zugegeben und diese 600 µl Puffergemisch auf den Zellrasen verteilt. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert und das Lysat anschließend auf eine QIAshredder[®]-Säule (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben, die in ein 2-ml-Reaktionsgefäß platziert wurde. Nach einer Zentrifugation bei 13 000 x g für 2 min wurden dem Durchfluss 600 µl 70 %iges Ethanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) zugegeben und durch Pipettieren gründlich vermischt. Daraufhin wurde die Probe in zwei Portionen zu 700 µl und 500 µl auf eine RNeasy[®]-Säule (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben und jeweils bei 10 000 x g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach der Zugabe von 700 µl RW1-Puffer wurde die Säule bei 10 000 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Anschließend wurden 500 µl des RPE-Puffers (Konzentrat vorher mit dem vierfachen Volumen Ethanol abs., Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, mischen) aufpipettiert und die Säule erneut bei 10 000 x g für 15 s gewaschen. Der dritte Waschschrift erfolgte erneut mit 500 µl RPE und einer Zentrifugation bei 13 000 x g für 2 min. Die Säule wurde nun in ein frisches steriles, RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der an die Säulenmembran gebundenen RNA wurden 30 µl RNase-freies ddH₂O zugegeben und die Säule für 60 s bei 10 000 x g zentrifugiert. Da möglichst viel RNA gewonnen werden sollte, wurde der letzte Schritt wiederholt.

Um den RNA-Gehalt der Lösungen zu bestimmen, wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg) gemessen.

3.3.3 Ablauf der RT-PCR

Eine RT-PCR ermöglicht den Nachweis bestimmter RNA-Abschnitte. Da sich RNA nicht direkt durch Einsatz der PCR amplifizieren lässt, muss diese vorab in eine cDNA umgeschrieben werden. Dies wird durch die reverse Transkription mit einer reversen Transkriptase erreicht. Um jedoch zu gewährleisten, dass durch die PCR keine DNA amplifiziert wird, die sich in dem RNA-Isolat befinden kann, erfolgte zunächst eine DNase-Vorbehandlung

3.3.3.1 DNase-Vorbehandlung

Zu den drei RNA-Isolaten wurden jeweils 2,5 µl RNase-freie DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) sowie 6 µl NEB 1-Puffer (NEB GmbH, Frankfurt) und RNase-freies ddH₂O ad 60 µl zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert. Um Reste des Enzyms und der Puffersalze zu entfernen, erfolgte anschließend eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Aufreinigung der RNA.

Dazu wurde zunächst das Volumen des Ansatzes mit RNase-freiem ddH₂O auf 100 µl eingestellt. Nach der Zugabe von 100 µl Roti-Phenol[®]-Chloroform-Gemisch (1:1; Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) und gutem Durchmischen erfolgte eine Zentrifugation bei 11 000 x g für 5 min. Die obere Phase wurde danach in ein frisches steriles Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl absolutem Ethanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) und 10 µl 5 M Natriumacetat vermischt. Für mindestens 30 min wurde die RNA bei -20 °C gefällt. Danach wurde sie bei 4 °C und 11 000 x g für 15 min abzentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 200 µl 70% Ethanol (v/v) (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) resuspendiert. Dieses wurde nach einer weiteren Zentrifugation bei 11 000 x g und 4 °C für 5 min wieder entfernt und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Die RNA wurde anschließend in 30 µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert und erneut der RNA-Gehalt der Lösung bestimmt (siehe 3.3.2).

3.3.3.2 Denaturierung

Während der Denaturierung erfolgte die Bindung des Reverse-Primers an die RNA. Der Denaturierungsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 14 Ansätze zur Denaturierung

	BHK	#1	#5
1 µg Gesamtzell-RNA	1,6 µl	1,1 µl	1,1 µl
20 pmol MluIL2rev (siehe 3.2.1.1)	2 µl	2 µl	2 µl
DEPC-ddH₂O	6,4 µl	6,9 µl	6,9 µl

Diese Mischungen wurde für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

3.3.3.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde folgender Reagenzien-Mix hergestellt:

Tabelle 15 Mastermix zur cDNA-Synthese

RNase-Inhibitor (20 U/µl, Rnasin[®], Promega, Madison, USA)	1,5 µl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	6 µl
DTT (Dithiothreitol, Serva, Heidelberg)	3 µl
First Strand Buffer 10X (125 mM Tris pH 8,3; 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂)	12 µl
DEPC-ddH₂O	4,5 µl

Von diesem Ansatz wurden je 9 µl sowie je 1 µl reverser Transkriptase (SuperScript II RT, 200 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe) zu den Denaturierungsansätzen zugegeben und gemischt. Danach erfolgte die reverse Transkription für 40 min bei 42 °C mit anschließender Denaturierung bei 94 °C für 5 min und erneuter Abkühlung auf 4 °C.

3.3.3.4 PCR

Zur Amplifizierung der cDNA in der PCR wurde ein Mastermix nach Tabelle 16 angemischt.

Tabelle 16 Mastermix zur PCR

Taq-Polymerase (5 U/μl, Biotherm, NatuTec GmbH, Frankfurt)	1,5 μl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	6 μl
20 pmol KpnII2 (Forward-Primer, siehe 3.2.1.1)	6 μl
Biotherm-Puffer 10X (NatuTec GmbH, Frankfurt)	30 μl
DEPC-ddH₂O	196,5 μl

Zu den drei PCR-Reaktionsgefäßen mit der synthetisierten cDNA wurden je 80 μl dieses Mastermixes zugegeben.

Parallel dazu wurde eine Kontroll-PCR des RNA-Isolates (siehe 3.3.3.1) durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob nach der DNase-Behandlung noch Reste von DNA in den drei RNA-Isolaten vorhanden waren.

Tabelle 17 Ansätze zur Kontroll-PCR

	BHK	#1	#5
1 μg RNA	1,6 μl	1,1 μl	1,1 μl
Taq-Polymerase (5 U/μl, Biotherm, NatuTec GmbH, Frankfurt)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
Biotherm-Puffer 10X (NatuTec GmbH, Frankfurt)	5 μl	5 μl	5 μl
20 pmol MluII2rev (siehe 3.2.1.1)	2 μl	2 μl	2 μl
20 pmol KpnII2 (siehe 3.2.1.1)	2 μl	2 μl	2 μl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	1 μl	1 μl	1 μl
DEPC-ddH₂O	37,9 μl	38,4 μl	38,4 μl

Die anschließende PCR mit allen sechs Ansätzen wurde in einem Thermocycler (Cycler TC-312, Techne, Staffordshire, England) in folgenden Schritten durchgeführt:

- 2 min bei 94 °C (initiale Denaturierung)
- 30 Zyklen mit jeweils
 - 30 s bei 94 °C (Denaturierung)
 - 30 s bei 50 °C (Annealing)
 - 1 min bei 72 °C (Elongation)
- 5 min bei 72 °C (Elongation)
- Abkühlung auf 4 °C

3.3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese der PCR-Produkte erfolgte deren Überprüfung und Auswertung. Die durchgeführten Schritte entsprachen dem bereits unter 3.2.1.2 ausgeführten Arbeitsgang.

3.4 Einfluss der Überstände von nicht transfizierten BHK-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität von Effektorzellen

Da BHK-Zellen als IL-2-Produzenten genutzt werden sollten, musste auch ein möglicher Einfluss im nicht transfizierten Zustand auf die Zytotoxizität von Effektorzellen überprüft und ausgeschlossen werden. Die Aktivitätssteigerung von zytotoxischen Effektorzellen sollte in der späteren Anwendung lediglich durch das sezernierte rcIL-2 hervorgerufen werden. Jegliche stimulierende oder inhibierende Einflüsse durch andere Faktoren der BHK-Zellen mussten deshalb zunächst ausgeschlossen werden. Dazu wurde der Effekt von BHK-Überständen auf Effektorzellen überprüft, die aus Hundeblood isoliert wurden. Deren spontane Zytotoxizität wurde durch ein Rose Bengal Assay (RBA) ermittelt.

3.4.1 Testprinzip des RBA

Der RBA basiert auf der Ablösung lysierter Zielzellen durch aktive NK-Zellen und der kolorimetrischen Quantifizierung der auf dem Plattenboden verbliebenen lebenden Zellen (Gondolf, 1994; Gondolf et al., 1996). Daher kommt also eine adhärenz Zielzelllinie, in diesem Fall CTAC-Zellen, zum Einsatz.

3.4.1.1 Zielzelllinie CTAC

Bei der gegenüber kaninen NK-Zellen sensitiven Zelllinie CTAC handelt es sich um kanine Schilddrüsenadenokarzinom-Zellen. Sie wurden in sterilen 25 cm²-Gewebekulturflaschen (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus UB 6060 EK- CO₂, Heraeus, Hanau) bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium diente steriles Minimum Essential Medium Eagle's mit Earl's Salzen (MEME) (ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) mit einem Zusatz von 10 % FKS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 1 % Penicillin (10 000 U/ml) und 1 % Streptomycin (10 000 µg/ml, beides Biochrom KG, Berlin)

(MEME/FKS). Die Zellen wurden etwa alle 3 bis 4 Tage mit frischem Medium versorgt und einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde der Zellrasen zunächst mit MEME zur Entfernung von Serumresten gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) und die Inkubation im Brutschrank für etwa 5 min. Danach wurden die nun einzeln vorliegenden Zellen in 5 ml MEME/FKS aufgenommen und bei 4 °C für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml MEME/FKS resuspendiert und zur Zytotoxizitätsprüfung im RBA eingesetzt.

3.4.1.2 Gewinnung und Vorbereitung der NK-Effektorzellen

3.4.1.2.1 Effektorzellisolierung

Die Isolierung der NK-Zellen aus Hundeblood erfolgte nach dem unter 3.1.1 angegebenen Protokoll. Hierbei muss jedoch betont werden, dass durch das Isolierungsverfahren der Lymphozyten nur eine Anreicherung der NK-Zellen, jedoch keine reine NK-Zell-Fraktion erreicht werden kann (Gondolf, 1994). Nach der Einstellung der Zellkonzentration auf 1×10^7 Zellen/ml wurden die Zellen auf zwei Portionen aufgeteilt und in verschiedenen Ansätzen den BHK-Überständen ausgesetzt.

3.4.1.2.2 Gewinnung der BHK-Testüberstände

Als zu testender Überstand diente Kulturmedium einer 72 h alten BHK-Kultur. Nach dem Passagieren wurden etwa 2×10^6 BHK-Zellen in einer 25 cm²-Gewebekulturflasche ausgesät, wobei steriles RPMI 1640 mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin als Kulturmedium diente (siehe 3.1.1). Die Zellen wurden mit dem Gewebekulturmikroskop täglich auf ihr Wachstum hin kontrolliert. Nachdem sich eine Konfluenz von etwa 80 % eingestellt hatte, wurde das Medium abgesaugt und vollständig durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurde das nun von den BHK-Zellen konditionierte Medium abpipettiert und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, um eventuell vorhandene tote Zellen zu entfernen. Zusätzlich wurde der Überstand noch über einen Spritzenfilter mit einer Maschenweite von 0,45 µm (Rotilabo[®], Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) filtriert.

3.4.1.2.3 Vorbehandlung für 12 Stunden

In einem der Ansätze wurden die Effektorzellen für 12 h den Überständen von BHK-Zellen ausgesetzt. Dazu wurden die gewonnenen Effektorzellen (siehe 3.4.1.2.1) erneut aufgeteilt und eine Hälfte für 12 h in den Testüberständen (siehe 3.4.1.2.2) im Brutschrank bei 37 °C und in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Die zweite Hälfte der Effektorzellen diente als Kontrolle und wurde über den gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen in nicht vorbehandeltem sterilem RPMI/FKS kultiviert.

3.4.2 Durchführung des Rose Bengal Assays (RBA)

3.4.2.1 Vorbereitung der CTAC-Zielzellen

Die CTAC-Zielzellen wurden zunächst wie unter 3.4.1.1 beschrieben vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 µl in je eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachboden-Platte (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) eingesät und für acht Stunden im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen am Plattenboden anhaften konnten. Danach wurden die Effektorzellen zugegeben.

3.4.2.2 Testansatz

Von der auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellten Effektorzellsuspension wurden je 100 µl zu den Zielzellen pipettiert. Als Negativkontrolle dienten Zielzellkulturen, denen keine Effektorzellen zugegeben wurde. Diese Ansätze erfolgten zum einen in sterilem RPMI/FKS. Zusätzlich wurde der gleiche Testansatz in von BHK-Zellen für 24 h konditioniertem RPMI/FKS (siehe 3.4.1.2.2) durchgeführt. Dazu wurde vor der Zugabe der Effektorzellen das Kulturmedium der CTAC-Zellen abgesaugt und durch 100 µl des vorbereiteten BHK-Kulturüberstandes (siehe 3.4.1.2.2) ersetzt.

Weiterhin wurden die unter 3.4.1.2.3 vorbehandelten Effektorzellen eingesetzt. Nach ihrer 12stündigen Inkubation wurden sie zunächst mit RPMI/FKS gewaschen und anschließend wieder in der gleichen Menge frischem RPMI/FKS resuspendiert. Auf eine Zellzählung und

die Einstellung auf 1×10^7 Zellen/ml wurde verzichtete, da die absolute Zellzahl bereits bei lediglich etwa $0,5 \times 10^7$ Zellen lag und keine weiteren Zellverluste stattfinden sollten.

Je nach Effektorzellzahl erfolgten die unterschiedlichen Ansätze im Vierfach-, Fünffach-, Sechsfach oder Neunfachansatz.

3.4.2.3 Rose Bengal Färbung

Nach 14stündiger Inkubation der Mikrotiterplatten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden Medium, Effektorzellen und abgelöste Zielzellen mit einer Mehrkanalpipette nach fünfmaligem vorsichtigen Mischen abpipettiert, wobei darauf geachtet wurde, den Boden nicht zu berühren. Anschließend erfolgte die Färbung der noch auf dem Plattenboden haftenden Zielzellen durch die Zugabe von 100 µl Rose Bengal-Lösung (0,25 % w/v in NaCl-PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) je Vertiefung und die Inkubation für 3 min bei RT. Danach wurde der Überstand mit gelöstem Farbstoff abgeschüttet und die MTP dreimal im Microtiterwasher (Titertek[®] Microplate Washer S8/S12, Flow Laboratories, Schweiz) mit dem Waschprogramm „Super“ gewaschen (Schmitz, 2000), um den noch vorhandenen freien Farbstoff zu entfernen. Bei diesem Programm wurde jede MTP-Vertiefung dreimal mit 650 µl NaCl-PBS gespült und noch vorhandene Flüssigkeit anschließend von Hand ausgeklopft. Durch die Zugabe von 200 µl Ethanol-PBS (50 % v/v) pro Well wurde der Farbstoff aus den noch vorhandenen Zielzellen herausgelöst und nach 5 min die optische Dichte dieser Lösung im ELISA-Photometer (Titertek[®] Multiskan Plus, Flow Laboratories, Schweiz) spektrometrisch ermittelt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm. Die Daten wurden unmittelbar nach der Messung mit Hilfe des Computerprogrammes EIA, Version 3.10 (Stefan Ufer und ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) ausgewertet. Eine Vertiefung mit Ethanol-PBS ohne Farbstoff und ohne Zellen diente als Leerwert.

3.4.2.4 Berechnung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität ergab sich aus der Differenz der optischen Dichten (OD) der Testansätze mit und der Kontrollansätze ohne Effektorzellen. Berechnet wurde sie nach folgender Formel:

$$\text{Zytotoxische Aktivität [\%]} = 100 - \left(\frac{OD_{\text{Test - Ansatz}}}{OD_{\text{Kontroll - Ansatz}}} \cdot 100 \right)$$

3.5 Quantifizierung des sezernierten rekombinanten kaninen Interleukin-2 im Bioassay (MTT-Test)

3.5.1 IL-2-Bioassay mit CTLL-2-Zellen

3.5.1.1 CTLL-2-Zelllinie

Zum Nachweis von biologisch aktivem rcIL-2 in den Überständen transfizierter und induzierter BHK-Zellen diente die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL-2, eine murine T-Zelllinie. Es handelt sich dem Ursprungszelltyp entsprechend um Suspension-Zellen, die kein adhärens Wachstum zeigen (siehe Abbildungen 5 und 6).

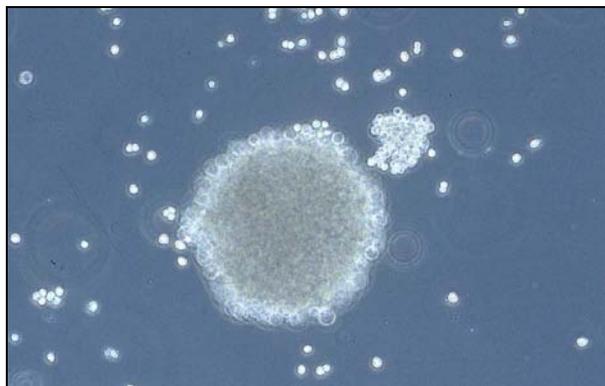


Abbildung 5 **CTLL-2-Zellen, Suspensionskultur, Gewebekulturmikroskop, 10 x** große und kleinere Kolonien sowie Einzelzellen zu erkennen

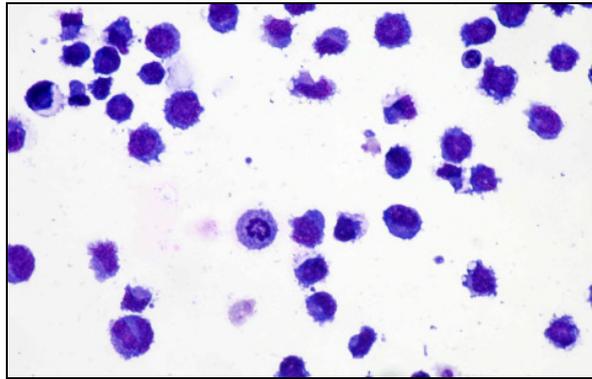


Abbildung 6 **CTLL-2-Zellen, Zytozentrifugenpräparat, May-Grünwald-Giemsa, 40 x**
Runde lymphatische Zellen mit mehr oder weniger deutlich erkennbarem Zytoplasmahof

Die Expression des T-Zell-Marker-Antigens CD3 kann immunhistologisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Da es sich bei dieser Zelllinie um lymphatische Tumorzellen handelt, ist das CD3-Antigen nicht nur auf der Oberfläche exprimiert, wie dies bei ausdifferenzierten, reifen T-Zellen zu beobachten ist. Wegen der stärkeren Proliferation und der dadurch bedingten mangelhaften Ausdifferenzierung ist bei CTLL-2-Zellen das CD3-Antigen auch noch deutlich im Zytoplasma nachweisbar.

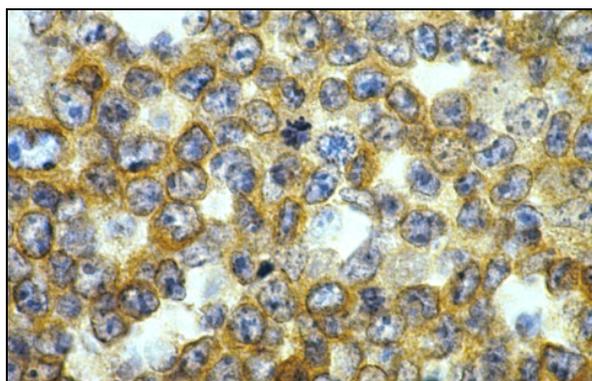


Abbildung 7 **CTLL-2-Zellen, Paraffinschnitt eines Zellpellets, Immunhistologischer Nachweis des CD3-Antigens, Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode, 100 x**
Diffuse braune Reaktion des Zytoplasmas der wenig differenzierten Tumor-T-Zellen infolge Bindung des spezifischen Antiserums an das für T-Zellen charakteristische Antigen CD3

Die CTLL-2-Zellen wurden als Suspensionskultur in sterilen Gewebekulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus UB 6060 EK- CO₂, Heraeus, Hanau) bei 37 °C und in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium diente steriles RPMI 1640-Kulturmedium (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), dem 1 % Penicillin (10 000 U/ml) und 1 % Streptomycin (10 000 µg/ml, beides Biochrom KG, Berlin) sowie 10 % FKS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) zugegeben wurden, im Folgenden als RPMI/FKS bezeichnet. Dem Zellkulturmedium wurde je nach gewünschter Proliferationsgeschwindigkeit der CTLL-2-Zellen 50 – 100 IU rhIL-2/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt. Dies entspricht einer IL-2-Konzentration von 25 – 50 ng/ml. Die Zellvermehrung wurde regelmäßig mit Hilfe des Gewebekulturmikroskopes kontrolliert und die Kulturen jeweils im Abstand von drei bis vier Tagen aufgeteilt. Dabei wurde die Zellkonzentration auf etwa 1 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt.

3.5.1.2 Prinzip des Bioassays

3.5.1.2.1 BHK-Kulturüberstände

Die auf ihre rcIL-2-Produktion zu testenden BHK-Zellen wurden in sterilen 25 cm²-Gewebekulturflaschen (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus UB 6060 EK- CO₂, Heraeus, Hanau) bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium diente steriles RPMI/FKS (siehe 3.5.1.1). Die Zellen wurden etwa alle 3 bis 4 Tage mit frischem Medium versorgt und einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde der Zellrasen zunächst mit Zellkulturmedium ohne FKS zur Entfernung von Serumresten gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) und die Inkubation im Brutschrank für etwa 5 min. Danach wurden die nun als Einzelzellen vorliegenden Zellen in 5 ml RPMI/FKS aufgenommen und bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden sie je nach Testansatz (siehe 3.5.2.1) in verschiedenen Zellkonzentrationen in einer 6-Well-Platte (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät, wobei das Volumen des Zellkulturmediums 2 ml betrug. Nach einer ersten Wachstumsphase im Brutschrank von etwa 24 h erfolgte die Induktion der rcIL-2-Produktion in den Zellen durch die Zugabe von Doxyzyklin (Alexis Biochemicals, Grünberg) zum Kulturmedium. Die Doxyzyklin-Stammlösung wurde durch Lösen von 2 mg Doxyzyklin in 1 ml 96 %igem Ethanol (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)

hergestellt. Zur Induktion wurden 5 µl dieser Doxyzyklin-Stammlösung zugegeben, wodurch sich je Well eine Konzentration von 5 µg/ml einstellte. Die Dauer der Sekretion von rcIL-2 in das Kulturmedium richtete sich nach dem Versuchsansatz (siehe 3.5.2).

Vor der Verwendung im Bioassay wurden die Überstände zunächst bei 15000 x g für 5 min zentrifugiert, um möglicherweise darin enthaltene Zellen und Zelltrümmer abgestorbener Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Überstände zusätzlich über einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Rotilabo[®], Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) filtriert.

Die Überstände wurden entweder sofort in ein Bioassay eingesetzt oder bei -20 °C für maximal 2 Wochen gelagert. Unmittelbar vor ihrer Verwendung im Bioassay wurden die Überstände je nach Bedarf mit frischem RPMI/FKS im Verhältnis 1:1 gemischt. Dies war nötig, da in einigen Versuchsansätzen die Testüberstände bereits für bis zu 72 h als Zellkulturmedium der transfizierten BHK-Zellen dienten und dementsprechend verbraucht waren. Da die CTLL-2-Zellen während des Bioassays allerdings weitere 72 h in diesen Testmedien wachsen sollten, wurde eine Ergänzung mit frischem Medium notwendig.

3.5.1.2.2 Ansatz des Bioassay

Als Standard wurde rhIL-2 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt. Ausgehend von 50 ng/ml wurden neun verschiedene Standardstufen in einer Zweierverdünnungsreihe durch Verdünnung mit RPMI/FKS hergestellt, wodurch sich die Konzentrationen von 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,6 ng/ml, 0,8 ng/ml, 0,4 ng/ml und 0,2 ng/ml ergaben. Zusätzlich wurde ein Standardansatz ohne rhIL-2 angefertigt.

Die Zellkulturüberstände wurden wie unter 3.5.1.2.1 beschrieben gewonnen. Als Negativkontrolle dienten Überstände nativer, also plasmidfreier BHK-Zellen.

Die Durchführung des Bioassays gliederte sich wie folgt:

1. Zweimaliges Waschen der CTLL-2-Zellen mit RPMI/FKS bei 400 x g, 20 °C für 5 min zur Entfernung von IL-2-Resten.
2. Einstellen der Zellkonzentration auf 1×10^5 Zellen/ml.
3. Pipettieren von 100 µl dieser Suspension pro Probenansatz in je ein steriles Eppendorfgefäß.
4. Zentrifugation bei 500 x g, 20 °C für 3 min und Absaugen des Überstandes.

5. Resuspension der Zellen in je 100 µl des jeweiligen Probenansatzes und Einsäen in je eine Vertiefung einer MTP. Die Zellkulturüberstände, Negativkontrollen und Standards wurden in jeweils drei bzw. fünf gleichen Ansätzen eingesetzt. Daneben wurde ein Leerwert, bestehend aus Zellkulturmedium ohne Zellen, in eine Vertiefung der MTP einpipettiert.
6. Inkubation der MTP für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂.
7. Bestimmung der Zellproliferation mittels MTT-Tests. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.1.3 beschrieben, jedoch wurden pro Vertiefung nur 10 µl MTT-Gebrauchslösung sowie 100 µl DMSO-Gebrauchslösung eingesetzt.
8. Zweifache Messung der MTP im Photometer.

3.5.2 Verschiedene Versuchsansätze des Bioassays

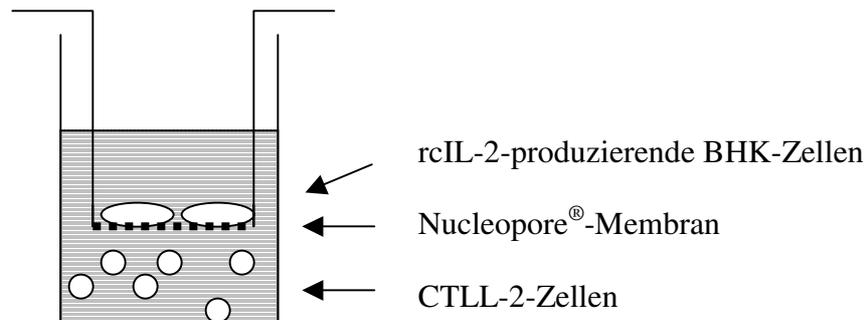
3.5.2.1 Das Standard-Bioassay

Diese Ansätze dienen zum Nachweis der rcIL-2-Produktion der plasmidtragenden BHK-Klone unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Durchführung entsprach dem unter 4.1.2 erwähnten Versuchsablauf, wobei die eingesäte Zellzahl bei $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml, $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml oder $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml lag und die Dauer der rcIL-2-Sekretion in der Regel 24 oder 72 h entsprach. Die überprüften BHK-Klone waren Klon A5 sowie die Reklone A5.1, A5.2, A5.3, A5.4, A5.5, A5.6, A5.7, A5.8 und A5.9.

3.5.2.2 Koinkubation von CTLL-2-Zellen und transfizierten BHK-Zellen in Transwell®-Einsätzen

Zellen der Klone A5, A5.3 und A5.4 wurden zusammen mit CTLL-2-Zellen koinkubiert. Dazu wurden 6,5 mm Transwell®-Einsätze (Costar, Cambridge, USA) verwendet (siehe Schema 5), die eine Nucleopore®-Polykarbonat-Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm besitzen. So konnten in Wells einer 24-Well-Platte die rcIL-2-produzierenden BHK-Zellen mit CTLL-2-Zellen inkubiert werden, wobei nur lösliche Substanzen, aber keine Zellen die Membran passieren und somit die verschiedenen Zelltypen keinen Kontakt miteinander aufnehmen konnten. Das produzierte rcIL-2 konnte jedoch die Membran durchdringen. So wurden die CTLL-2-Zellen durch das sezernierte rcIL-2 direkt zur Proliferation angeregt; ein

Behandeln der Testüberstände (siehe 3.5.1.2.1) vor dem Einsatz in ein Bioassay entfiel dadurch.



Schema 5 Schematische Darstellung eines Transwell[®]-Einsatzes mit permeabler Nucleopore[®]-Membran in einer Vertiefung einer 24-Well-Platte und den inkubierten rcIL-2-produzierenden BHK-Zellen und CTLL-2-Zellen

Für diese Versuchsanordnung wurden die CTLL-2-Zellen zweimal mit RPMI/FKS gewaschen und auf eine Dichte von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. 600 μ l dieser Zellsuspension wurde in die Vertiefungen der 24-Well-Platte gegeben. Die rcIL-2-produzierenden BHK wurden abtrypsiniert und auf eine Zellzahl von 3×10^4 Zellen/ml eingestellt. Nachdem die Transwell[®]-Einsätze vorsichtig mit Hilfe einer sterilen Pinzette in die Vertiefungen mit CTLL-2-Zellen eingehängt worden waren, wurden 100 μ l der BHK-Zell-Suspension in die Einsätze pipettiert. Für jeden der drei BHK-Klone wurde ein durch Doxzyklin induzierter und ein nichtinduzierter Ansatz hergestellt. Anschließend wurde die 24-Well-Platte für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Gleichzeitig wurde die rhIL-2-Standard-Verdünnung hergestellt und darin CTLL-2-Zellen ebenfalls für 72 h inkubiert (siehe 3.5.1.2.2).

Die Transwell[®]-Einsätze wurden nach der Inkubationszeit vorsichtig mit einer Pinzette herausgehoben. Die auf dem Boden der Kulturflasche liegenden CTLL-2-Zellen wurden vorsichtig auf und ab pipettiert, auf 100 μ l-Portionen aufgeteilt und in einen MTT-Test zusammen mit der rhIL-2-Standard-Verdünnungsreihe eingesetzt (siehe 3.5.1.2.2).

3.5.2.3 Zusätzliche Bioassays

3.5.2.3.1 Zeitlicher Verlauf der rcIL-2-Produktion über 72 h

Die BHK-Klone A5, A5.1 und A5.2 wurden weiterhin in einem Versuch zum 72-h-Verlauf der rcIL-2-Produktion eingesetzt. Dafür wurden je Klonlinie Zellen in 3 Wells einer 6-Well-Platte unter den unter 3.5.1.2.1 aufgeführten Bedingungen ausgesät und induziert. Die eingesetzte Zellzahl lag bei $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Von jedem Klon wurde nach einer Induktionsdauer von 24, 48 und 72 h das Medium abpipettiert, für das Bioassay wie unter 3.5.1.2.1 beschrieben vorbereitet und in einem abschließenden Bioassay (siehe 3.5.1.2.2) auf den Gehalt an rcIL-2 überprüft. Damit konnte der Verlauf der rcIL-2-Produktion über 72 h verfolgt werden.

3.5.2.3.2 rcIL-2-Produktion in serumfreiem Kulturmedium

Weiterhin erfolgte die Untersuchung der rcIL-2-Produktion unter serumfreien Bedingungen. Zellen des Klons A5 wurden dazu in 6 Wells einer 6-Well-Platte inkubiert. Jedes Well erhielt die in Tabelle 18 dargestellten Zellkulturmedien. Die eingesetzte Zellzahl lag bei 1×10^5 Zellen je Well. Die Untersuchungsdauer von Phase 1 und Phase 2 umfasste jeweils 24 h.

Tabelle 18 Zellkulturmedien je Ansatz

Ansatz/Well	Phase 1	Phase 2
1	RPMI/FKS + 5 µl Doxyzyklin	RPMI
2	RPMI/FKS	RPMI + 5 µl Doxyzyklin
3	RPMI/FKS	RPMI
4	RPMI/FKS + 5 µl Doxyzyklin	RPMI/FKS
5	RPMI/FKS	RPMI/FKS + 5 µl Doxyzyklin
6	RPMI/FKS	RPMI/FKS

Die Ansätze in Well 1, 2 und 3 erhielten also in der zweiten Phase serumfreies Medium, wobei die rcIL-2-Produktion dieser Ansätze einmal während der serumhaltigen Phase (Well 1) und einmal während der serumfreien Phase (Well 2) induziert wurde. Die Ansätze 4 und 5 stellten die zugehörigen Positivkontrollen unter serumhaltigen Bedingungen, die Ansätze 3 und 6 die jeweiligen Negativkontrollen ohne Induktion durch Doxyzyklin dar. Die aus dieser Anordnung gewonnen Zellkultur-Überstände wurden wie unter 3.5.1.2.1 beschrieben gewonnen, behandelt und im Bioassay überprüft.

3.5.2.3.3 Induktion durch verschiedene Doxyzyklin-Konzentrationen

Die Stärke der Induktion durch Doxyzyklin wurde in einer weiteren Versuchsanordnung mit des transfizierten BHK-Klons A5.4 untersucht. Die Zellen wurden wie unter 3.5.1.2.1 beschrieben in 6 verschiedenen Wells einer 6-Well-Platte ausgesät und inkubiert. Die Menge des zugegeben Doxyzyklin lag jedoch bei 0 µl, 0,5 µl, 1 µl, 2,5 µl, 5 µl und 10 µl, so dass Doxyzyklin-Konzentrationen von 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml vorlagen. Nach 48 h wurden die Überstände unter 3.5.1.2.1 beschrieben gewonnen und in einem Bioassay eingesetzt.

3.5.3 Berechnung der rcIL-2-Konzentration

Um die produzierten rcIL-2-Mengen berechnen zu können, wurde eine nicht-lineare Regression der OD-Werte aus der photometrischen Auswertung der Standard-Verdünnung durchgeführt. Um Ausreißer zu eliminieren, erfolgte bei Fünffach-Ansätzen zunächst ein Streichen der höchsten und tiefsten Messwerte einer Verdünnungsstufe (Winsorisieren). Dieser Schritt entfiel bei Dreifach- oder Doppel-Ansätzen. Um den Einfluss der Eigenfarbe des Kulturmediums auszuschließen, wurde nun der Blankwert abgezogen und anschließend der Mittelwert der ODs für jede Konzentrationsstufe außer 0 ng/ml ermittelt. Falls eine 96-Well-Platte zweimal gemessen wurde, wurde weiterhin auch der Mittelwert je Konzentrationsstufe aus beiden Messungen ermittelt. Die nicht-lineare Regression dieser Standardkurven erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Verwendung des Statistikprogrammes BMDP3R (BMDP Statistical Software, Inc., Cork, Ireland).

Da es sich bei der Kurve der Standard-Verdünnung um eine logistische Funktion handelt, lautet die Gleichung zur Berechnung von y-Werten bei gegebenen x-Werten

$$y = \frac{e^{a+b \cdot x}}{1 + e^{a+b \cdot x}} = \frac{E}{1 + e^{-(a+b \cdot x)}}$$

E, a und b sind für jede Standard-Verdünnung spezifische Parameter (siehe unten). Durch Umformung dieser Formel kann die rcIL-2-Konzentration in den getesteten BHK-Überständen durch die Formel

$$\log[\text{IL-2-Konzentration}] = -\frac{\ln\left(\frac{E}{[OD]} - 1\right) + a}{b}$$

berechnet werden.

E, a und b werden durch das für die nicht-lineare Regression verwendete Statistikprogramm durch folgende Umrechnungen ausgedrückt und berechnet:

$$E = \frac{1}{p^3};$$

$$a = \ln(p^3) - \ln(p^1);$$

$$b = -p^2$$

Wurde zur Ermittlung der rcIL-2-Konzentration die Standardverdünnungsreihe E verwendet (siehe Anhang, Tabelle 12), erfolgte dies jedoch über folgende Formel:

$$[\text{IL-2-Konzentration}] = \left(\frac{1}{p^1 \cdot [OD]} - \frac{p^3}{p^1} \right)^{\frac{\ln(10)}{p^2}}$$

Diese Gleichung ergibt sich durch Umformung der oben genannten Formel. Da die nicht-lineare Regression der Standardverdünnungsreihe E für p³ einen negativen Wert ergab und der *Logarithmus naturalis* für negative Werte nicht definiert ist, wurde der Umweg über diese Umformung nötig.

Von den Fünffach-Ansätzen der zu testenden BHK-Überstände wurde zunächst der Leerwert abgezogen und dieser Wert für die OD in die obige Formel eingesetzt, wodurch der rcIL-2-Gehalt ermittelt werden konnte. Falls es sich um verdünnte Überstände handelte (siehe 3.5.1.2.1), wurde die ermittelte Menge mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Die

Werte aus den Doppelmessungen wurden gemittelt. Die Ergebnisse von induzierten und nicht-induzierten BHK-Zellen wurden durch einen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Statistikprogramm BMDP3D) auf ihre Signifikanz überprüft.

Die statistische Auswertung des Versuchs zur Überprüfung der rcIL-2-Produktion unter serumfreien Bedingungen wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit dem Statistikprogramm BMDP7D durchgeführt.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur rcIL-2-Induktion durch verschiedene Doxyzyklin-Konzentrationen wurden zunächst einer Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D unterzogen. Aufgrund des hier ermittelten nicht linearen Zusammenhangs, der eine lineare Regression nicht ermöglichte, erfolgte ein Gruppenvergleich durch eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D.

Die Signifikanzen wurden wie folgt benannt:

$p \leq 0,001$	hoch signifikant
$0,001 < p \leq 0,01$	signifikant
$0,01 < p \leq 0,05$	schwach signifikant
$p > 0,05$	nicht signifikant

4 ERGEBNISSE

4.1 Gewinnung der cDNA für cIL-2

4.1.1 Lymphozytenisolierung und Stimulation

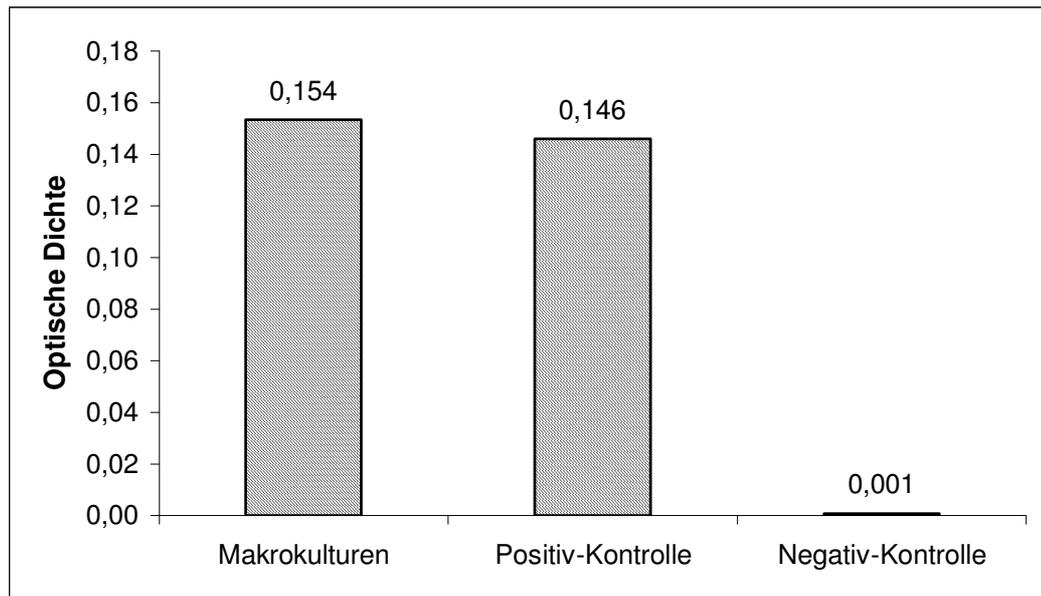
Die Auswertung des Differentialblutbildes der Heparinblutprobe der Hündin im Advia[®] 120 Hematology System (Bayer Diagnostics, München) ergab einen absoluten Gehalt an Leukozyten von $7,69 \times 10^9$ Zellen/l. Davon waren 66,0 % neutrophile Granulozyten, 23,1 % Lymphozyten, 7,8 % Monozyten, 2,6 % eosinophile Granulozyten und 0,6 % basophile Granulozyten.

Nach der Zentrifugation über einen 57,5 %igen Percoll[®]-Gradienten wurde das Isolat mit den angereicherten Lymphozyten ebenfalls im Advia[®] 120 Hematology System (Bayer Diagnostics, München) gemessen. Dabei ergab sich eine absolute Zahl an Leukozyten von $4,51 \times 10^9$ Zellen/l, wovon 92,5 % Lymphozyten waren. Weiterhin enthielt das Isolat 0,6 % neutrophile Granulozyten, 1,7 % Monozyten, 4,7 % eosinophile Granulozyten und 0,6 % basophile Granulozyten.

Die parallel dazu durchgeführte Zellzählung in einer Modifizierten Neubauer Zählkammer mit Trypanblau-gefärbten Zellen ergab eine Zellzahl von $4,1 \times 10^9$ Zellen/l und einen Anteil von etwa 98 % lebender Zellen.

Nachdem die Lymphozyten wie unter 3.1.2 beschrieben mit Con A stimuliert worden waren, ergab die MTT-Proliferationsmessung der stimulierten Lymphozytenmakrokulturen aus der 25 cm²-Kulturflaschen eine durchschnittliche optische Dichte (OD) von 0,154 (siehe Grafik 1). Die Positiv-Kontrollen der Mikrokulturen wiesen eine durchschnittliche optische Dichte von 0,146 und die Negativkontrollen eine von 0,001 auf.

Daraus ergab sich für die Makrokulturen ein Stimulationsindex (SI) von 154 und für die Mikrokulturansätze ein SI von 146.



Grafik 1 Mittelwerte der optischen Dichte von Con A-stimulierten Lymphozytenmakrokulturen und der Kontroll-Mikrokulturen (MTT)

4.1.2 Gewinnung der Total-RNA

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA mit der sauren Guanidin-Isothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion mit TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) ergab die Messung im Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator (Pharmacia-Biotech) eine Konzentration von 219,7 ng RNA/ml.

4.1.3 RT-PCR zur Gewinnung der cDNA

Nach der DNase-Behandlung wurde die gewonnene und auf 100 ng RNA/ml eingestellte RNA in der RT-PCR eingesetzt. Anschließend erfolgte die Auswertung und Dokumentation mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese, wobei jeweils 15 μ l des PCR-Produktes aufgetragen wurden. Abbildung 8 zeigt, dass eine Bande bei etwa 650 bp liegt (Bahn 2 und 3). Dies entspricht der erwarteten Größe von 653 bp der amplifizierten Sequenz von cIL-2. In Bahn 2 und 3 befindet sich der gleiche Versuchsansatz, wobei lediglich die Primerkonzentration variiert wurde. In Bahn 2 lag sie bei 10 pmol, in Bahn 3 bei 20 pmol. In Bahn 1 und 6 wurde der 100 bp-Größenmarker aufgetragen. Das „House Keeping Gene“ GAPDH, das zur Überprüfung des korrekten Ablaufs der RT-PCR und zur Kontrolle der Nukleinsäure-Integrität in den gleichen Arbeitsschritten mit amplifiziert wurde, befindet sich in Bahn 4. Bahn 5 stellt die Negativ-Kontrolle dar, hier wurde keine Nukleinsäure in die RT-PCR eingesetzt.

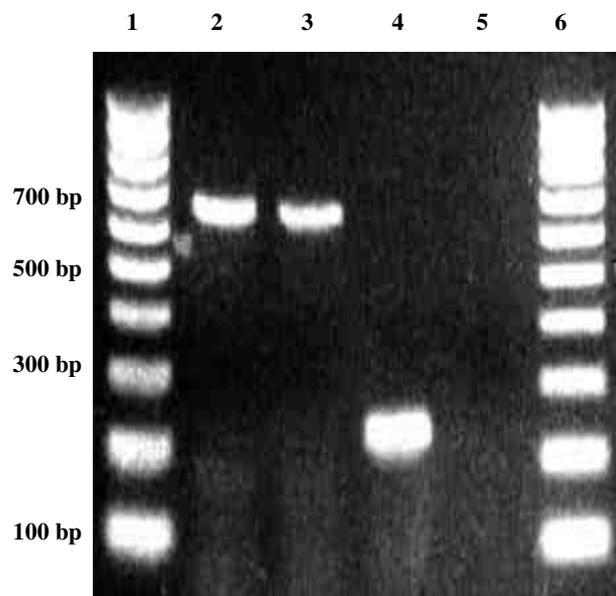


Abbildung 8 Agarosegel nach der RT-PCR zur Amplifizierung der cDNA von cIL-2
Bahn 1 und Bahn 6: 100 bp-Größenmarker,
Bahn 2 und 3: cIL-2 cDNA,
Bahn 4: GAPDH,
Bahn 5: Negativkontrolle

4.1.4 Sequenzierung des RT-PCR-Produktes

Die Sequenzierung des Produktes aus der RT-PCR wurde bei SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) durchgeführt. Die Auswertung der ermittelten Sequenz erfolgte mit den Programmen „Chromas 2.3“ (Technelysium Pty Ltd), „ClustalW“ (EMBL-EBI, Cambridge, Großbritannien) und „GeneDoc 2.6.003“ (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, 1997).

Der Vergleich der von SeqLab ermittelten Sequenz des PCR-Produktes mit der cIL-2-Sequenz, die Dunham et al. (1995) veröffentlichten, zeigt eine hundertprozentige Übereinstimmung beider Sequenzen (Abbildung 9). In der von diesen Autoren angegebenen Sequenz befindet sich zwischen Position 32 und 91 ein Signalpeptid mit dem Startcodon ATG an Position 32, 33 und 34. Im Anschluss daran folgt die 405 Basen lange, für cIL-2 codierende Region, die mit dem Stopcodon TGA an Position 497 – 499 endet. Essentiell für das weitere Vorgehen war die absolute Übereinstimmung der Sequenz des amplifizierten PCR-Produktes mit der vorgegebenen Sequenz, um die Translation eines fehlerfreien und funktionstüchtigen Proteins zu gewährleisten.

```

*           20           *           40           *           60
D30710.1 : ACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAAAAATGCAACTCTTGTCTTGCAT : 60
cIL-2PCR : -----CAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAAAAATGCAACTCTTGTCTTGCAT : 52

*           80           *           100          *           120
D30710.1 : CGCACTGACGCTTGTACTTGTTCGCAAACAGTGCACCTATTACTTCAAGCTCTACAAAGGA : 120
cIL-2PCR : CGCACTGACGCTTGTACTTGTTCGCAAACAGTGCACCTATTACTTCAAGCTCTACAAAGGA : 112

*           140          *           160          *           180
D30710.1 : AACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTTACAGTTGCTTTTGAATGGAGTTAA : 180
cIL-2PCR : AACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTTACAGTTGCTTTTGAATGGAGTTAA : 172

*           200          *           220          *           240
D30710.1 : TAATTATGAGAACCCCAACTCTCCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACACGCCCAAGAA : 240
cIL-2PCR : TAATTATGAGAACCCCAACTCTCCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACACGCCCAAGAA : 232

*           260          *           280          *           300
D30710.1 : GGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGAAGAAGCTCAAAAACCTGGAGGAAGT : 300
cIL-2PCR : GGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGAAGAAGCTCAAAAACCTGGAGGAAGT : 292

*           320          *           340          *           360
D30710.1 : GCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGACAGACACCAAGGAATTAATCAGCAA : 360
cIL-2PCR : GCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGACAGACACCAAGGAATTAATCAGCAA : 352

*           380          *           400          *           420
D30710.1 : TATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGAAACAAGTTACAACCTGTGAATATGA : 420
cIL-2PCR : TATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGAAACAAGTTACAACCTGTGAATATGA : 412

*           440          *           460          *           480
D30710.1 : TGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAAATGGATTACCTTTTGTCAAAGCAT : 480
cIL-2PCR : TGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAAATGGATTACCTTTTGTCAAAGCAT : 472

*           500          *           520          *           540
D30710.1 : CTTCTCAACACTGACTTGAATAATTAAGTGCCTATTTAAAAATGTATCAGGCTATTTATTTA : 540
cIL-2PCR : CTTCTCAACACTGACTTGA----- : 491

*           560          *           580          *           600
D30710.1 : AATATTTAAAATTTATATTTATTTTTTGATGTACGTTTTGCTACCTTTTGTAAATTATTAT : 600
cIL-2PCR : ----- : -

*           620          *           640          *           660
D30710.1 : TCTTATACTTCATATGATAAATATGGATCTTTTAAAGATTCTTTTTGTAAGCCC----- : 653
cIL-2PCR : ----- : -

```

Abbildung 9 Vergleich der Sequenz des PCR-Produktes (cIL-2PCR) mit der von Dunham (1995) ermittelten Sequenz (D30710.1)
hellgrau: Start- und Stopcodon; mittelgrau: codierende Sequenz für das Signalpeptid; schwarz: codierende Sequenz für cIL-2

4.1.5 Klonierung des RT-PCR-Produktes

Die erfolgreiche Klonierung des Produktes aus der RT-PCR in den pCR[®] II-TOPO[®]-Vektor von Invitrogen (Carlsbad, USA) wurde ebenfalls mit einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Zunächst wurde nach der Klonierungsreaktion die Plasmidmenge ermittelt, die aus den transformierten *E. coli* durch das NucleoBond[®] PC100 Plasmid-DNA Purification-Kit (Macherey-Nagel) isoliert wurde. Diese Messung ergab einen Gehalt von 359 ng Plasmid-DNA/ml.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde der Vektor in einem Enzymverdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* in zwei Teile geschnitten. Es ergaben sich zwei Fragmente von 4 kbp und etwa 650 bp Größe, wie sie bei erfolgreicher Klonierung zu erwarten waren (nicht dargestellt).

Vor der Sequenzierung erfolgte eine Reklonierung des Vektors in *E. coli*. Durch die Isolierung des Plasmids mit dem NucleoBond[®] PC100 Plasmid-DNA Purification-Kit (Macherey-Nagel) konnte eine Menge von 593 ng Plasmid-DNA/ml gewonnen werden.

4.1.6 Sequenzierung des klonierten RT-PCR-Fragmentes

Die erneute Sequenzierung des in den Vektor einklonierten cIL-2-Fragmentes wurde bei SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) durchgeführt. Da sich flankierend zu der Multiple Cloning Site, in der das PCR-Produkt als Insert eingebaut wurde, ein Sp6- und ein T7-Promotor befinden (Abbildung 1, Seite 36), konnten Primer für diese beiden Sequenzen zur Sequenzierung des einklonierten Fragmentes genutzt werden. Auch hier erfolgte die Auswertung der von SeqLab übermittelten Sequenz mit den Programmen „Chromas 2.3“ (Technelysium Pty Ltd), „ClustalW“ (EMBL-EBI, Cambridge, Großbritannien) und „GeneDoc 2.6.003“ (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, 1997). Die Sequenz des Inserts zeigte wiederum keine Abweichung zur Original-Sequenz von Dunham et al. (1995) (Abbildung 10a und 10b).

```

D30710      : -----*      20      *      40      *      60      : -
cIL-2Klon   : AACAAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACT : 60

D30710      : -----*      80      *      100     *      120     : -
cIL-2Klon   : ATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCC : 120

D30710      : -----*      140     *      160     *      180     : 36
cIL-2Klon   : GCCAGTGTGCTGGAAATTCGCCCTTACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTA : 180
                ACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTA

D30710      : -----*      200     *      220     *      240     : 96
cIL-2Klon   : CAAAATGCAACTCTTGTCTTGCATCGCACTGACGCTTGTACTTGTGCGAAACAGTGCACC : 240
                CAAAATGCAACTCTTGTCTTGCATCGCACTGACGCTTGTACTTGTGCGAAACAGTGCACC

D30710      : -----*      260     *      280     *      300     : 156
cIL-2Klon   : TATTACTTCAAGCTCTACAAAGGAAACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTT : 300
                TATTACTTCAAGCTCTACAAAGGAAACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTT

D30710      : -----*      320     *      340     *      360     : 216
cIL-2Klon   : ACAGTTGCTTTTGAATGGAGTTAATAATTATGAGAACCCCAACTCTCCAGGATGCTCAC : 360
                ACAGTTGCTTTTGAATGGAGTTAATAATTATGAGAACCCCAACTCTCCAGGATGCTCAC

D30710      : -----*      380     *      400     *      420     : 276
cIL-2Klon   : ATTTAAGTTTTACACGCCCAAGAAGGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGA : 420
                ATTTAAGTTTTACACGCCCAAGAAGGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGA

D30710      : -----*      440     *      460     *      480     : 336
cIL-2Klon   : AGAACTCAAAAACCTGGAGGAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGAC : 480
                AGAACTCAAAAACCTGGAGGAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGAC

D30710      : -----*      500     *      520     *      540     : 396
cIL-2Klon   : AGACACCAAGGAATTAATCAGCAATATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGA : 540
                AGACACCAAGGAATTAATCAGCAATATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGA

```

Abbildung 10a

Vergleich der Sequenz des einklonierten PCR-Produktes (cIL-2Klon) mit der von Dunham et al. (1995) ermittelten Sequenz (D30710)
 mittelgrau: codierende Sequenz für das Signalpeptid
 schwarz: codierende Sequenz für cIL-2
 1 – 144: Teil des Vektors
 47 – 64: Sp6-Promotor
 133 – 138: *EcoRI*-Erkennungssequenz

```

*           560           *           580           *           600
D30710      : AACAAGTTACAACCTGTGAATATGATGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAA : 456
cIL-2Klon   : AACAAGTTACAACCTGTGAATATGATGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAA : 600
              AACAAGTTACAACCTGTGAATATGATGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAA

*           620           *           640           *           660
D30710      : ATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCTTCTCAACACTGACTTGATAATTAAGTGCCTATTT : 516
cIL-2Klon   : ATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCTTCTCAACACTGACTTGATAATTAAGTGCCTATTT : 660
              ATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCTTCTCAACACTGACTTGATAATTAAGTGCCTATTT

*           680           *           700           *           720
D30710      : AAAATGTATCAGGCTATTTATTTAAATATTTAAATTTATATTTATTTTTTGGATGTACGT : 576
cIL-2Klon   : AAAATGTATCAGGCTATTTATTTAAATATTTAAATTTATATTTATTTTTTGGATGTACGT : 720
              AAAATGTATCAGGCTATTTATTTAAATATTTAAATTTATATTTATTTTTTGGATGTACGT

*           740           *           760           *           780
D30710      : TTTGCTACCTTTTGTAAATTATTATTCTTATACTTCATATGATAAAATATGGATCTTTTAAG : 636
cIL-2Klon   : TTTGCTACCTTTTGTAAATTATTATTCTTATACTTCATATGATAAAATATGGATCTTTTAAG : 780
              TTTGCTACCTTTTGTAAATTATTATTCTTATACTTCATATGATAAAATATGGATCTTTTAAG

*           800           *           820           *           840
D30710      : ATTCTTTTTGTAAGCCC----- : 653
cIL-2Klon   : ATTCTTTTTGTAAGCCCAAGGGCGAATTCGTCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCG : 840
              ATTCTTTTTGTAAGCCC

*           860           *           880           *           900
D30710      : ----- : -
cIL-2Klon   : AGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCG : 900

*           920           *           940           *           960
D30710      : ----- : -
cIL-2Klon   : TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACG : 960

D30710      : ----- : -
cIL-2Klon   : CACAT : 965

```

Abbildung 10b

Fortsetzung des Vergleichs der Sequenz des einklonierten PCR-Produktes (cIL-2Klon) mit der von Dunham (1995) ermittelten Sequenz (D30710)

schwarz: codierende Sequenz für cIL-2

798 – 965: Teil des Vektors

804 – 809: *EcoRI*-Erkennungssequenz

867 – 886: T7-Promotor

4.2 Tet-on-Expression

4.2.1 Einbau von Restriktionsenzymchnittstellen durch PCR in cIL-2

Mit Hilfe von Primern wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *MluI* flankierend zu der für cIL-2-kodierenden Region eingebaut. Die Position für *KpnI* befindet sich zwischen den Basen 26 und 52 (siehe Sequenz D30710.1, Abbildung 9, Seite 84), die Position für *MluI* zwischen den Basen 465 und 504. Durch eine Agarosegelelektrophorese wurde das dadurch amplifizierte 479 bp große DNA-Fragment sichtbar gemacht (Abbildung 11, Bahn 3).

Weiterhin wurde mit Hilfe institutsspezifischer Primer aus dem von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Tautz zur Verfügung gestellten Plasmid pCITE-Luci die Sequenz des IRES-Luciferase-Konstruktes in einer PCR vervielfältigt. Auf Abbildung 11 ist in Bahn 2 das Ergebnis dieser PCR mit einer Bande bei der erwarteten Größe von 2,5 kbp zu erkennen.

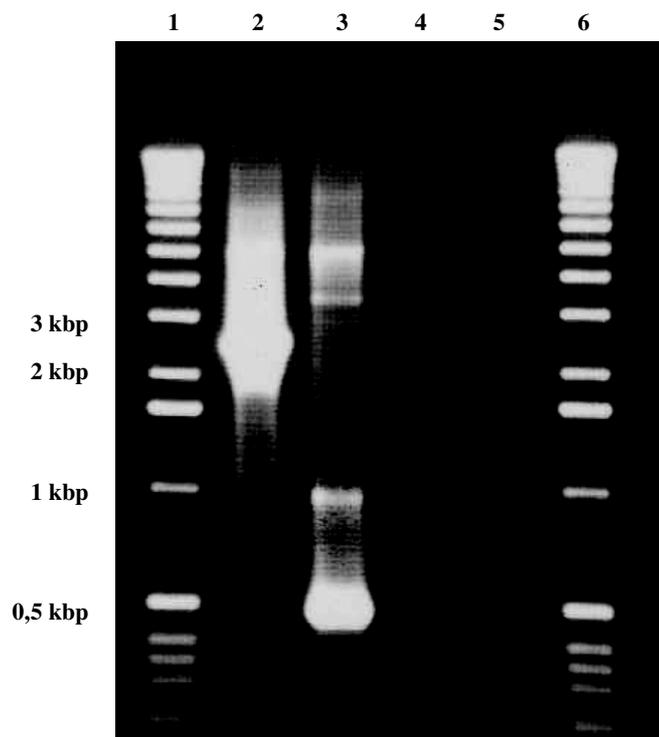


Abbildung 11 Agarosegelbild nach Einbau der Restriktionsenzym-Schnittstellen in cIL-2 und nach Amplifikation des IRES-Luciferase-Fragmentes
Bahn 1 und 6: 1-kbp-Größenmarker
Bahn 2: IRES-Luciferase-Fragment (2,5 kbp)
Bahn 3: cIL-2 (0,5 kbp)
Bahn 4 und 5: Negativkontrollen

4.2.2 Analyse der cIL-2- und IRES-Luciferase-Fragmente

Nachdem die 0,5 kbp- und die 2,5 kbp-große Bande aus einem anschließend hergestellten präparativen Gel ausgeschnitten, isoliert und in den Vektor pGEM-T (Promega, Madison, USA) kloniert worden waren, wurden nach der Transfektion der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES in *E. coli*-Bakterien je Plasmid sechs Kolonien isoliert und weiter untersucht. Dazu erfolgte ein analytischer Verdau mit Restriktionsenzymen, um den korrekten Einbau der PCR-Amplifikate in den Vektor zu überprüfen. pGEM-T-IL2 wurde mit *KpnI* und *MluI*, pGEM-T-IRES mit *MluI* und *PstI* geschnitten.

Abbildung 12 stellt das Ergebnis des Enzymverdaus dar. In den Bahnen 2 bis 7 wurde pGEM-T-IL2, in den Bahnen 9 bis 14 pGEM-T-IRES nach dem Enzymverdau aufgetragen. Nach dem Verdau von pGEM-T-IL2 wurden ein 473 bp großes Insert und der ca. 3 kbp große Vektor erwartet. Die in den Bahnen 2, 4 und 6 dargestellten Plasmide zeigen diese beiden Banden. Für die weiteren Arbeiten wurde die Kolonie aus Bahn 2 (pGEM-T-IL2-#1) gewählt.

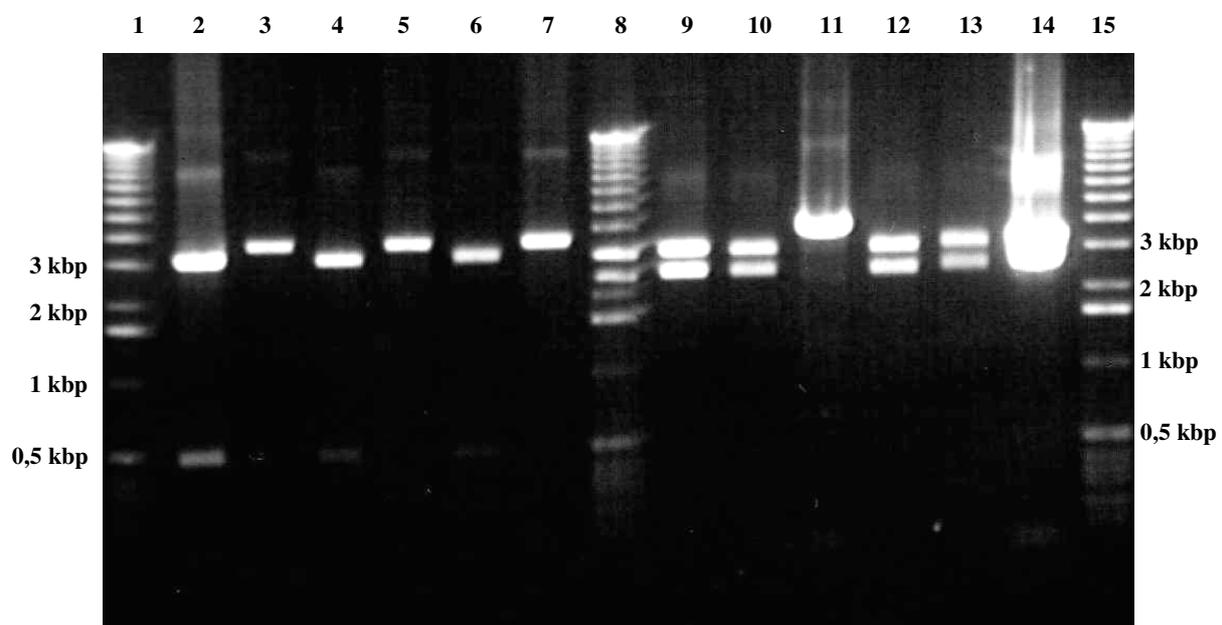


Abbildung 12 Agarosegelbild nach Restriktionsenzymverdau der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES
Bahn 1, 8 und 15: 1-kbp-Größenmarker
Bahn 2 bis 7: pGEM-T-IL2 $\Delta KpnI \Delta MluI$ (0,5 kbp und 3 kbp)
Bahn 9 bis 14: pGEM-T-IRES $\Delta MluI \Delta PstI$ (2,5 kbp und 3 kbp)

Der Restriktionsenzymverdau von pGEMT-T-IRES führte zu einem etwa 2,5 kbp großen Fragment (Insert) sowie ebenfalls zu dem ca. 3 kbp großen Vektor. Bahn 9, 10, 12 und 13 zeigen korrekt ligierte Plasmide, von denen jenes aus Bahn 2 (pGEM-T-IRES-#2) für die weiteren Vorgänge gewählt wurde.

Um für die weiteren Arbeiten eine größere Menge an Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben, wurde eine Retransformation der Plasmide in *E. coli* und eine anschließende Plasmid-Präparation im Midi-Maßstab durchgeführt. Die Bestimmung der dadurch gewonnen DNA-Menge ergaben 220 ng/ μ l (pGEM-T-IL2#1) und 1,57 μ g/ μ l (pGEM-T-IRES#2). Die Analyse der so retransformierten Plasmide erfolgte wiederum durch einen Restriktionsenzymverdau mit den bereits erwähnten Restriktionsenzymen *KpnI* und *MluI* sowie *MluI* und *PstI*. Die Größen der erwarteten Banden lagen erneut bei 0,5 kbp und 3 kbp im Falle von pGEM-T-IL2 und bei 2,5 kbp und 3 kbp für pGEM-T-IRES. Wie auf Abbildung 13 dargestellt, zeigten die Plasmide das erwartete Bandenmuster.

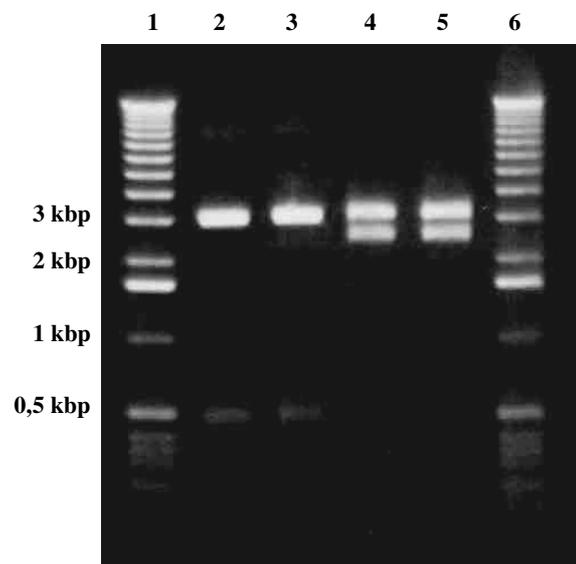


Abbildung 13 Agarosegelbild nach zweitem Restriktionsenzymverdau der Plasmide pGEM-T-IL2 und pGEM-T-IRES nach Midi-Präparation
 Bahn 1 und 6: 1-kbp-Größenmarker
 Bahn 2 und 3: pGEM-T-IL2 $\Delta KpnI$ $\Delta MluI$ (0,5 kbp und 3 kbp)
 Bahn 4 und 5: pGEM-T-IRES $\Delta MluI$ $\Delta PstI$ (2,5 kbp und 3 kbp)

4.2.3 Sequenzierung des pGEM-T-IL2#1-Klons

Die korrekte Sequenz des amplifizierten cIL-2-Gens wurde in einer erneuten Sequenzierung überprüft. Diese erfolgte am Institut für Virologie des Fachbereichs 10. Mit dem GCG-Programm-Paket (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) im HUSAR-System (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) sowie „ClustalW“ (EMBL-EBI, Cambridge, Großbritannien) und „GeneDoc 2.6.003“ (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, 1997) wurde die ermittelte Sequenz ausgewertet und dargestellt (Abbildung 14).

Die amplifizierte cIL-2-Sequenz stimmte zu 100 % mit der Original-Sequenz von Dunham et al. (1995) überein.

Aufgrund der Wahl der Primer und ihrer Positionen wurden die flankierenden nicht codierenden Region entfernt, die die publizierte Sequenz Dunhams aufwies. Es handelt sich dabei um 31 Basen am 5'-Ende vor der Sequenz des Signalpeptids und um 154 Basen am 3'-Ende. Da es sich dabei um nicht codierende Abschnitte handelt, kommt ihnen für die Expression des Proteins keine Bedeutung zu.

```

*          20          *          40          *          60
pGEM-T-IL2 : AGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTGGTACCATGTACAAAA : 60
D30710      : -----ACTACTCAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAAAA : 41
              CT C   C G   C   A   TG   AC ATGTACAAAA

*          80          *          100         *          120
pGEM-T-IL2 : TGCAACTCTTGTCTTTCATCGCACTGACGCTTGTACTTGTTCGCAAACAGTGCACCTATTA : 120
D30710      : TGCAACTCTTGTCTTTCATCGCACTGACGCTTGTACTTGTTCGCAAACAGTGCACCTATTA : 101
              TGCAACTCTTGTCTTTCATCGCACTGACGCTTGTACTTGTTCGCAAACAGTGCACCTATTA

*          140         *          160         *          180
pGEM-T-IL2 : CTTCAAGCTCTACAAAGGAAACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTTACAGT : 180
D30710      : CTTCAAGCTCTACAAAGGAAACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTTACAGT : 161
              CTTCAAGCTCTACAAAGGAAACAGAGCAACAGATGGAGCAATTACTGCTGGATTTACAGT

*          200         *          220         *          240
pGEM-T-IL2 : TGCTTTTGAATGGAGTTAATAATTATGAGAACCCCCAACTCTCCAGGATGCTCACATTTA : 240
D30710      : TGCTTTTGAATGGAGTTAATAATTATGAGAACCCCCAACTCTCCAGGATGCTCACATTTA : 221
              TGCTTTTGAATGGAGTTAATAATTATGAGAACCCCCAACTCTCCAGGATGCTCACATTTA

*          260         *          280         *          300
pGEM-T-IL2 : AGTTTTACACGCCCAAGAAGGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGAAGAAC : 300
D30710      : AGTTTTACACGCCCAAGAAGGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGAAGAAC : 281
              AGTTTTACACGCCCAAGAAGGCCACAGAATTTACACACCTTCAATGTCTAGCAGAAGAAC

*          320         *          340         *          360
pGEM-T-IL2 : TCAAAAACCTGGAGGAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGACAGACA : 360
D30710      : TCAAAAACCTGGAGGAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGACAGACA : 341
              TCAAAAACCTGGAGGAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGCAAAAACGTTCACTTGACAGACA

*          380         *          400         *          420
pGEM-T-IL2 : CCAAGGAATTAATCAGCAATATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGAAACAA : 420
D30710      : CCAAGGAATTAATCAGCAATATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGAAACAA : 401
              CCAAGGAATTAATCAGCAATATGAATGTAACACTTCTGAAACTAAAGGGATCTGAAACAA

*          440         *          460         *          480
pGEM-T-IL2 : GTTACAACCTGTGAATATGATGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAAATGGA : 480
D30710      : GTTACAACCTGTGAATATGATGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAAATGGA : 461
              GTTACAACCTGTGAATATGATGACGAGACAGCAACCATTACAGAATTTCTGAACAAATGGA

*          500         *          520         *          540
pGEM-T-IL2 : TTACCTTTTGTCAAAGCATCTTCTCAACACTGACTTGACGCGTAATCCCGCGGCCATGGC : 540
D30710      : TTACCTTTTGTCAAAGCATCTTCTCAACACTGACTTGAATAATTAAGTGCCTATTTAAAAT : 521
              TTACCTTTTGTCAAAGCATCTTCTCAACACTGACTTGA   TAA   C   A

*          560         *          580         *          600
pGEM-T-IL2 : GGCCGGGAGCATGCG-----ACGTCGGGCCCA-ATTGCGCCTATAGTGA--GTCGTAT : 590
D30710      : GTATCAGGCTATTTATTTAAATATTTAAAAATTTATATTTATTTTTTGTATGACGTTTTGC : 581
              G   G   AT           A   T           A ATT   T T   TG   GT   T

*          620         *          640         *          660
pGEM-T-IL2 : TACAATTCAC----- : 600
D30710      : TACCTTTTGTAAATTATTATTCTTATACTTCATATGATAAATATGGATCTTTTAAGATTCT : 641
              TAC   TT

```

Abbildung 14 Vergleich der Sequenz des in den pGEM-T-Vektor einklonierten cIL-2 mit der von Dunham et al. (1995) ermittelten Sequenz (D30710)
schwarz: codierende Sequenz für cIL-2; mittelgrau: codierende Sequenz für das Signalpeptid; hellgrau: Primerpositionen (Primer KpnIL2 von 26 bis 52; Primer MluIL2rev von 465 bis 504)

4.2.4 Zusammenbau von pTRUE-IL2-IRES

Um das vollständige Response-Plasmid in einer Dreifachligation zusammenbauen zu können, mussten zuerst die einzelnen Komponenten in Restriktionsemzymverdauen geschnitten und anschließend aus präparativen Gelen isoliert werden. Zunächst wurde das Plasmid pGEM-T-IL2#1 mit den Enzymen *KpnI* und *MluI* geschnitten. Abbildung 15 zeigt das präparative Gel, aus dem die so entstandene 0,5 kbp große Bande des cIL-2 ausgeschnitten wurde.

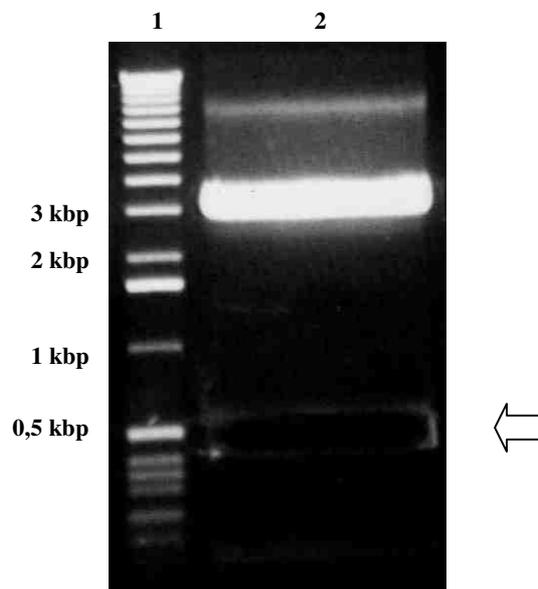


Abbildung 15 Präparatives Gel von pGEM-T-IL2#1 $\Delta KpnI/MluI$, Bande bei 0,5 kbp ausgeschnitten (Pfeil)
Bahn 1: 1 kbp-Größenmarker
Bahn 2: pGEM-T-IL2#1 $\Delta KpnI \Delta MluI$

Der Vektor pTRUE wurde mit den Enzymen *KpnI* und *PstI* verdaut, was zu einer 3 kbp großen Vektor-Bande führte (Abbildung 16). pGEM-T-IRES#2 wurde mit *MluI*, *PstI* und *ScaI* geschnitten. Neben der 2,5 kbp großen Bande des IRES-Luciferase-Fragmentes bildeten sich so zwei weitere Bruchstücke des Plasmids von 1,9 kbp und 1,1 kbp Größe (Abbildung 16). Dies erleichterte das Ausschneiden der 2,5 kbp großen Bande.

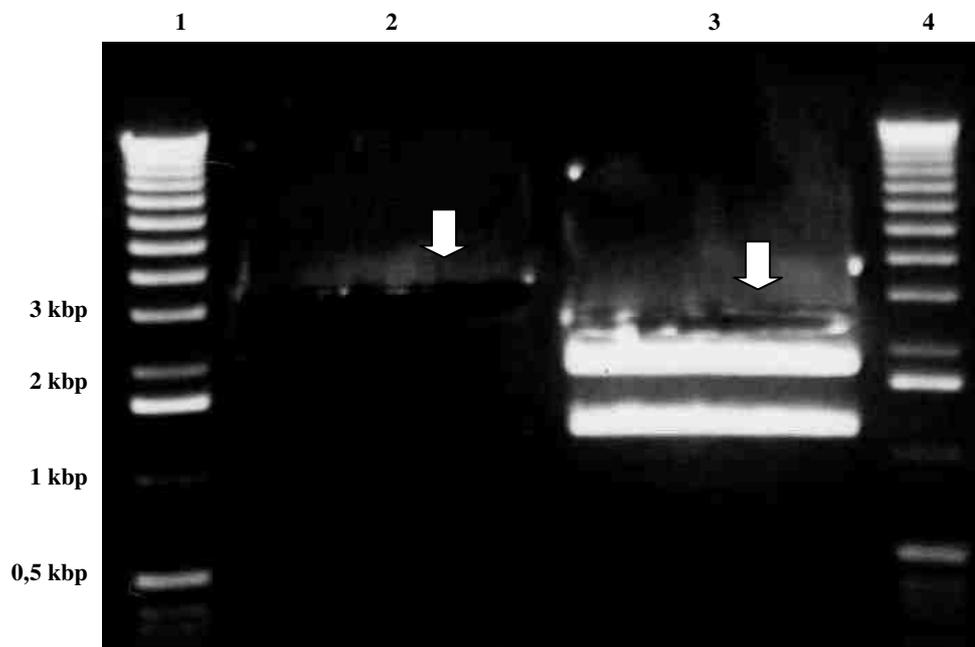


Abbildung 16 Präparatives Gel von pGEM-T-IRES#2 $\Delta MluI/PstI/ScaI$ und pTRUE $\Delta KpnI/PstI$, in Bahn 2 Bande bei 3 kbp ausgeschnitten, in Bahn 3 Bande bei 2,5 kbp ausgeschnitten (Pfeile)
Bahn 1 und 4: 1 kbp-Größenmarker
Bahn 2: pTRUE $\Delta KpnI/PstI$
Bahn 3: pGEM-T-IRES#2 $\Delta MluI/PstI/ScaI$

Vor der Ligation der drei Elemente wurde der Vektor pTRUE dephosphoryliert, um die intramolekulare Ligation der Vektorenden ohne Einbau des Inserts zu verhindern, und anschließend in einer Phenol-Chloroform-Extraktion wieder aufgereinigt.

Um die Effizienz des Einbaus der Fragmente in den Vektor im Vergleich zur intramolekularen Vektorrückligation abschätzen zu können, wurde parallel zur Dreifachligation eine Religationskontrolle angesetzt, bei welcher statt der einzubauenden Fragment H_2O bidest. zugegeben wurde. Nach der Transformation dieser Ansätze in *E. coli* zeigte sich auf der Platte mit dem Dreifachligationsansatz ein sehr viel deutlicheres Koloniewachstum als auf der Platte mit den Religationsansätzen. Daraus konnte auf eine relativ hohe Effizienz beim Einbau der Fragmente in den Vektor geschlossen werden.

Nach dem Picken von 6 Kolonien und deren Plasmid-Midi-Präparation schloss sich ein analytischer Verdau mit *MluI* und *PstI* an, um die korrekte Ligation des Plasmids zu überprüfen. Im Falle eines korrekten Einbaus wurden in der Agarosegelelektrophorese je eine Bande von 2,5 kbp (IRES-Luciferase-Konstrukt) und eine von 3,5 kbp (pTRUE-Vektor + cIL-2) Größe erwartet. Auf Abbildung 17 ist zu erkennen, dass von 6 isolierten Kolonien 5 ein ordnungsgemäß zusammengesetztes Plasmid aufwiesen. In Plasmid aus Bahn 4 wurde kein Insert einkloniert.

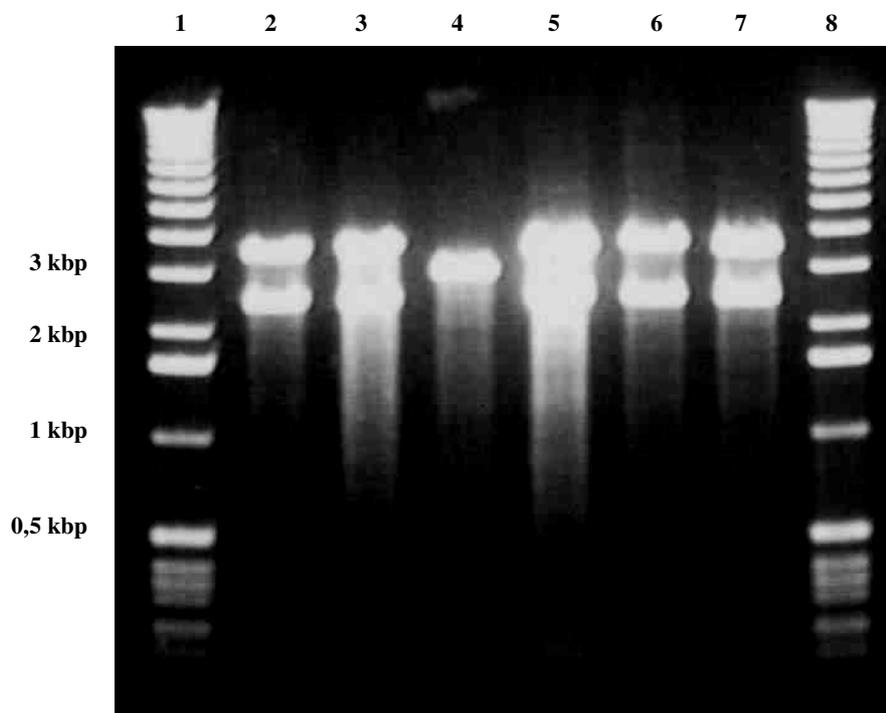


Abbildung 17 Agarosegel nach dem analytischen Verdau von 6 Kolonien pTRUE-IL2-IRES mit *MluI* und *PstI*
Bahn 1 und 7: 1 kbp-Größenmarker
Bahn 2 bis 6: pTRUE-IL2-IRES Δ *MluI/PstI*

Zur weiteren Verwendung wurde das Plasmid aus Bahn 2 gewählt. Mit diesem erfolgte eine Retransformation und eine Plasmid-Midi-Präparation, die eine DNA-Menge von 1,2 µg/µl ergab.

Die Übereinstimmung des Plasmid pTRUE-IL2-IRES aus Mini- und Midi-Präparation wurde durch einen erneuten analytischen Verdau mit *MluI* und *PstI* überprüft (Abbildung 18), wobei die erwarteten Banden denen von Abbildung 17 entsprachen. Das Bandenmuster stimmte in beiden Fällen überein.

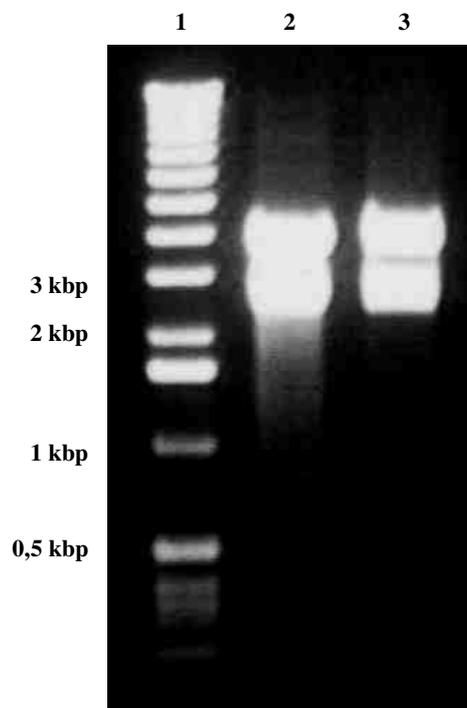


Abbildung 18 Agarosegel nach dem analytischen Verdau von pTRUE-IL2-IRES aus Mini- und Midi-Präparation mit *MluI* und *PstI*

Bahn 1: 1 kbp-Größenmarker

Bahn 2: pTRUE-IL2-IRES Δ *MluI/PstI* aus Mini-Präparation

Bahn 3: pTRUE-IL2-IRES Δ *MluI/PstI* aus Midi-Präparation

4.2.5 Transiente Transfektion von pTRUE-IL2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen

Die transiente Transfektion des Plasmids pTRUE-IL2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen diente zur Überprüfung der Funktion des Reportergens Luciferase. Dazu wurde das nicht linearisierte Plasmid mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™ (Biontex Laboratories GmbH, Martinsried) in BHK-Zellen transfiziert und die Aktivität der Luciferase nach dem Anschalten des Tet-on-Systems ermittelt.

Die ermittelte Aktivität nach Induktion mit Doxyzyklin lag bei dem dimensionslosen Wert 338830 im Vergleich zu 268 bei der Negativ-Kontrolle, war also um etwa das Tausendfache höher. Daraus konnte geschlossen werden, dass das inklonierte und im Vorfeld nicht durch Sequenzierung überprüfte IRES-Luciferase-Fragment zur Transkription eines funktionierenden Enzyms führt.

4.2.6 Stabile Transfektion von pTRUE-IL2-IRES in BHK-Tet-on-Zellen zur Erzeugung einer cIL-2-produzierenden Zelllinie

Hierzu wurde zunächst das Plasmid pTRUE-IL2-IRES mit dem Restriktionsenzym *FspI* linearisiert, um den stabilen Einbau in das Zellgenom zu ermöglichen. *FspI* schneidet den Vektor etwa auf Höhe der Base 1840. In diesem Bereich befindet sich kein essentieller Genabschnitt.

Die Überprüfung erfolgte wiederum mit einem Agarosegel, wobei die erwartete Bande eine Größe von etwa 6 kbp hatte (Abbildung 19).

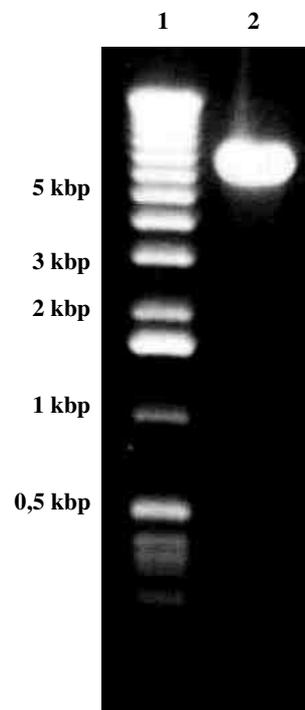


Abbildung 19 Agarosegel nach der Linearisierung von pTRUE-IL2-IRES mit *FspI*
Bahn 1: 1 kbp-Größenmarker
Bahn 2: pTRUE-IL2-IRES $\Delta FspI$

Die nach der Phenol-Chloroform-Aufreinigung gemessene Plasmid-DNA-Menge lag bei 165 ng/ μ l.

Nachdem das linearisierte Plasmid mit Metafectene™ in die BHK-Tet-on-Zelllinie transfiziert und erfolgreich transfizierte Zellen im Selektionsmedium kloniert wurden, wurden insgesamt 12 Klone isoliert und nach der Induktion mit Doxyzyklin auf ihre Expression des Reportergens Luciferase untersucht. Die Ergebnisse dieser Messung sind in den Tabellen 19a und 19b zusammengestellt.

Tabelle 19a Messwerte des Luciferase-Assays der transfizierten BHK-Klone A1 – A6

Klon	A1	A2	A3	A4	A5	A6
induziert	53 051	521 350	442 300	365 810	604 230	26 184
nicht induziert	1 133	40 364	47 709	42 981	41 345	943
Stimulationsindex	46,8	12,9	9,3	8,5	14,6	27,8

Tabelle 19b Messwerte des Luciferase-Assays der transfizierten BHK-Klone A7 – A12

Klon	A7	A8	A9	A10	A11	A12
induziert	45 691	3 763	30 048	11 753	27 105	251 300
nicht induziert	1 241	119	3 273	4 508	41 632	23 529
Stimulationsindex	36,8	31,6	9,2	2,6		10,7

Nach diesem ersten Screening wurden drei Klone A1, A5 und A8 ausgewählt. Dabei handelte es sich um den Klon mit dem höchsten Stimulationsindex (A1), um den Klon mit der absolut höchsten Luciferase-Aktivität im induzierten Zustand (A5) und um den Klon mit der geringsten Luciferase-Aktivität im uninduzierten Zustand (A8). Diese Klone wurden erneut in einem Luciferase-Assay auf Luciferase-Aktivität hin überprüft. Als Negativ-Kontrolle diente die nicht mit dem Plasmid pTRUE-IL2-IRES transfizierte BHK-Tet-on-Zelllinie. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20 Messwerte des Luciferase-Assays der transfizierten BHK-Klone A1, A5 und A8 sowie der Negativkontrolle BHK Tet-on

Klon	A1	A5	A8	BHK Tet-on
induziert	36 715	1 147 100	8 739	119
nicht induziert	1 196	60 027	292	
Stimulationsindex	30,7	19,1	29,9	

Von den Klonen A1, A5 und A8 wurde weiterhin eine Reklonierung durchgeführt. Je Klon erfolgte eine Isolierung von zwei Reklonen, die wiederum in einem Luciferase-Assay auf die Anwesenheit des Reportergens überprüft wurden (Tabelle 21).

Tabelle 21 Messwerte des Luciferase-Assays der Reklone

Klon	A1.1	A1.2	A5.1	A5.2	A8.1	A8.2
induziert	58 429	16 725	904 040	761 350	5 919	29
nicht induziert	1 374	485	67 341	50 356	356	24
Stimulationsindex	42,5	34,5	13,4	15,1	16,6	1,2

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei Reklon A8.2 möglicherweise um eine nicht transfizierte BHK-Zelle handelte, die isoliert wurde. Für weitere Arbeiten wurde der Schwerpunkt auf Klon A5 und seine Reklone gelegt, da dieser Klon die absolut höchste Expression des Reportergens aufwies. Allerdings zeigte dieser Klon auch bereits eine hohe Basisexpression im nicht angeschalteten Zustand.

4.2.7 RT-PCR zum Nachweis der cIL-2-mRNA in den transfizierten BHK-Zellen

Mit der RT-PCR sollte überprüft werden, ob die transfizierten Zellen in der Lage sind, die mRNA für cIL-2 zu produzieren. Dafür wurden die für das cIL-2-Fragment spezifischen Primer eingesetzt (Tabelle 6, Kapitel 3.2.1.1).

Getestet wurden die Klone A1 und A5 nach der Induktion des Tet-on-Systems mit Doxyzyklin nach 24 h. Aus diesen sowie aus den nativen, nicht transfizierten BHK-Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, wobei zunächst folgende RNA-Mengen gewonnen wurden:

▪ BHK (nativ)	612 ng/μl
▪ Klon A1	1184 ng/μl
▪ Klon A5	876 ng/μl

Um eventuell vorhandene DNA aus dem RNA-Isolat zu entfernen, wurde im Anschluss eine DNase-Behandlung durchgeführt. Nach einer erneuten Phenol-Chloroform-Aufreinigung erfolgte eine weitere Bestimmung der RNA-Menge mit folgenden Werten:

▪ BHK (nativ)	616 ng/μl
▪ Klon A1	892 ng/μl
▪ Klon A5	936 ng/μl

Diese RNA-Isolate wurden daraufhin in der RT-PCR eingesetzt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Isolate in einer PCR ohne RT-Schritt eingesetzt. Sollten sich in diesen Ansätzen Banden bei 0,5 kbp zeigen, wäre DNA amplifiziert worden und die DNase-Behandlung nicht effizient gewesen.

Das Ergebnis der RT-PCR wurde in einer Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht (Abbildung 20), wobei eine Bande mit der cDNA für cIL-2 bei etwa 0,5 kbp erwartet wurde. Diese Bande trat wie erwartet bei den mit Doxyzyklin induzierten Ansätzen von Klon A1 (Bahn 4) und Klon A5 (Bahn 6) auf, wobei die cIL-2-Bande von Klon A5 deutlich stärker ist.

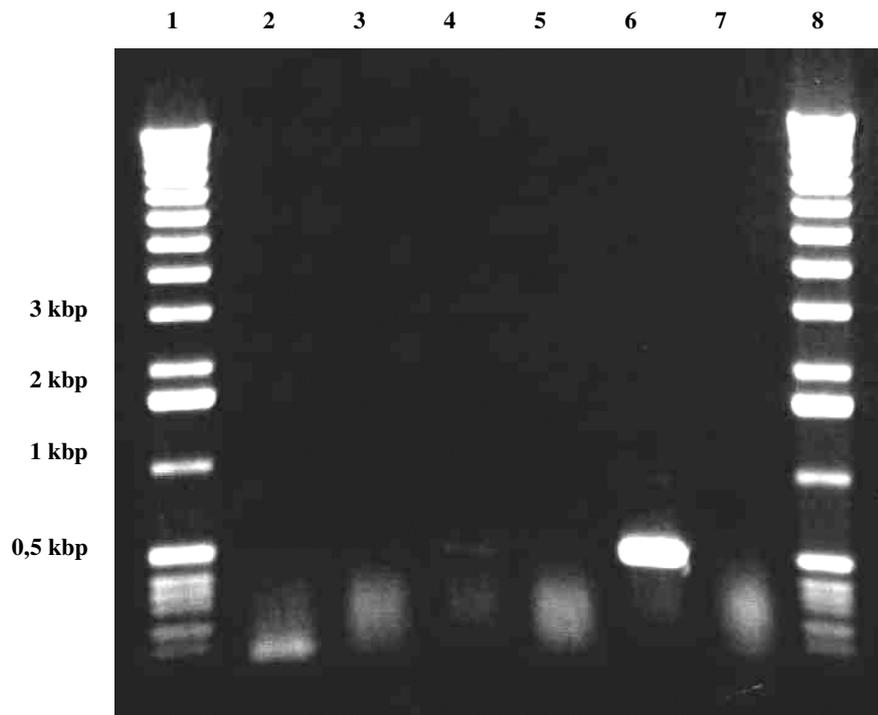


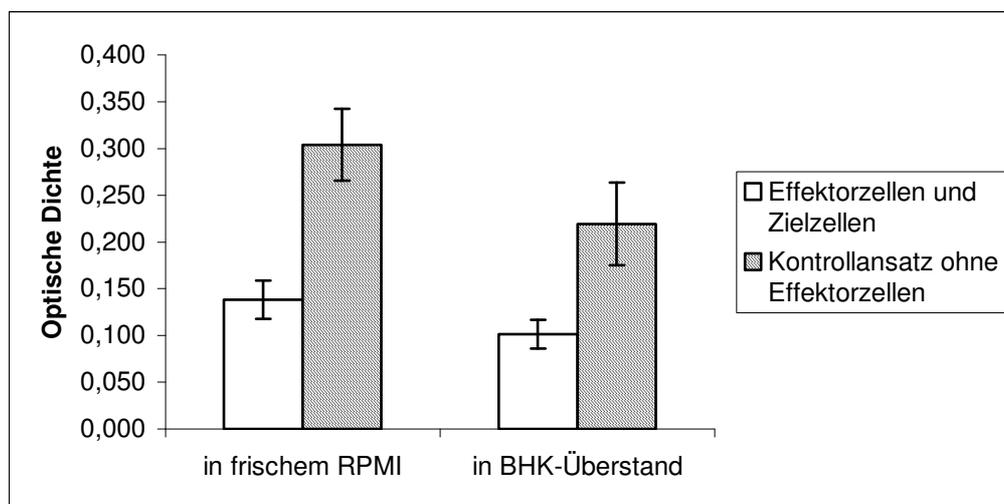
Abbildung 20 Agarosegel nach der RT-PCR für cIL-2
Bahn 1 und 8: 1 kbp-Größenmarker
Bahn 2: RT-PCR BHK
Bahn 3: PCR BHK
Bahn 4: RT-PCR Klon A1
Bahn 5: PCR Klon A1
Bahn 6: RT-PCR Klon A5
Bahn 7: PCR Klon A5

4.3 Einfluss der Überstände von nicht transfizierten BHK-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität (RBA)

Da BHK-Zellen als IL-2-Produzenten genutzt werden sollten, musste ein möglicher Einfluss im nicht transfizierten Zustand auf die Zytotoxizität von Effektorzellen überprüft und ausgeschlossen werden. Die zytotoxischen Eigenschaften dieser Zellen in der späteren Anwendung sollten lediglich durch das sezernierte rIL-2 beeinflusst werden. Jegliche stimulierende oder inhibierende Einflüsse durch andere Faktoren der BHK-Zellen mussten deshalb zuvor ausgeschlossen werden.

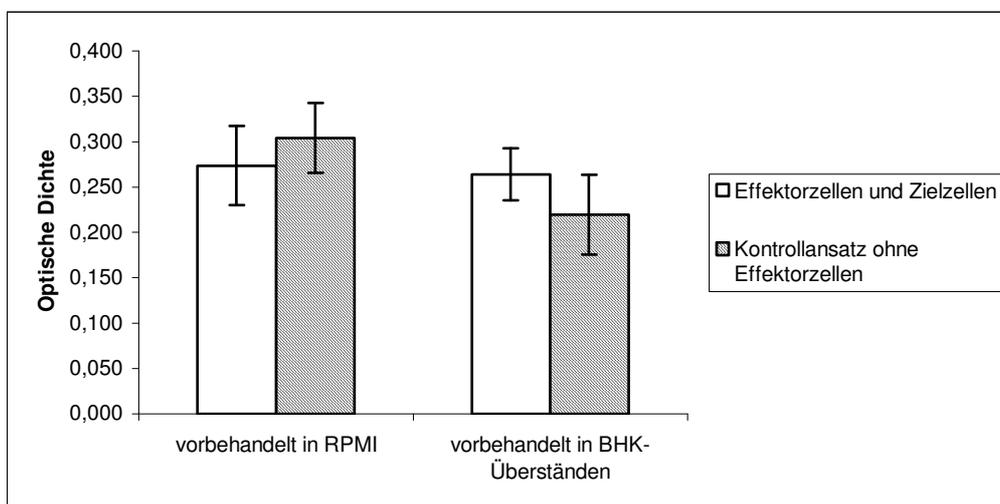
Dies wurde in einem kolorimetrischen Zytotoxizitätstest, dem Rose Bengal-Assay (RBA) überprüft. Dabei wurden Effektorzellen, die zuvor aus Hundeblood angereichert worden waren, den BHK-Überständen ausgesetzt und anschließend ihre Zytotoxizität gegenüber CTAC-Zellen überprüft. Als Kontrolle dienten Effektorzellen, die in frischem RPMI/FKS-Medium ohne den Einfluß von BHK-Kulturüberständen mit CTAC-Zellen inkubiert wurden. Hierbei wiesen die nur in Medium inkubierten Effektorzellen im RBA eine spontane Zytotoxizität von 55 % (Grafik 2, Tabelle 22) auf (mittlere optische Dichte des Testansatzes 0,138, n = 5; mittlere optische Dichte des Kontrollansatzes 0,304, n = 9).

Vergleichend dazu wurden in einem weiteren Testansatz Effektor- und Zielzellen zusammen im Überstand von BHK-Zellen inkubiert. Nach der Inkubation war hier eine praktisch gleich hohe spontane Zytotoxizität von 54 % (Grafik 2, Tabelle 23) nachweisbar (mittlere optische Dichte des Testansatzes 0,101, n = 4; mittlere optische Dichte des Kontrollansatzes 0,219, n = 9).



Grafik 2 Einfluss von nativen BHK-Überständen und frischem RPMI auf die spontane Zytotoxizität von Effektorzellen gegen CTAC im RBA

Weiterhin wurden die Effektorzellen zunächst für 12 Stunden entweder in BHK-Kulturüberständen oder in sterilem RPMI/FKS vorinkubiert, um den Einfluß des BHK-Kulturüberstandes auf die Zytotoxizität der Effektorzellen zu ermitteln. Danach zeigten die Effektorzellen aus der Vorinkubation in RPMI/FKS eine spontane Zytotoxizität von 10 % (mittlere optische Dichte des Testansatzes 0,274, n = 5; mittlere optische Dichte des Kontrollansatzes 0,304, n = 9), während bei den Effektorzellen, die 12 h in BHK-Überständen vorinkubiert wurden, keine spontane Zytotoxizität nachweisbar war (mittlere optische Dichte des Testansatzes 0,264, n = 6; mittlere optische Dichte des Kontrollansatzes 0,219, n = 9) (Grafik 3, Tabelle 24).



Grafik 3 Einfluss der Vorbehandlung von Effektorzellen in unterschiedlichen Medien auf die spontane Zytotoxizität der Effektorzellen

4.4 Quantifizierung des sezernierten rekombinanten kaninen IL-2 im Bioassay (MTT-Test)

Die Quantifizierung der Proliferation der CTLL-2-Zellen erfolgte über die optische Messung der Formazankristallbildung. Diese war auch mikroskopisch gut nachweisbar.

Wenn keine Proliferation der CTLL-2-Zellen erfolgte, so war auch keine Formazankristallbildung in den CTLL-2-Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 21).

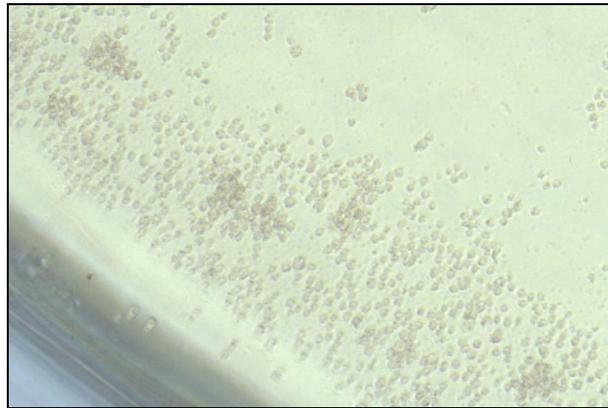


Abbildung 21 **CTLL-2-Zellen im MTT-Test**, keine Formazankristallbildung, alle CTLL-2-Zellen ungefärbt, Gewebekulturmikroskop, 10 x

Je mehr rcIL-2 in den zu untersuchenden BHK-Überständen vorhanden war, umso stärker war die Proliferation der CTLL-2-Zellen und somit auch deren Gehalt an produzierten Formazankristallen (siehe Abbildungen 22 – 24).

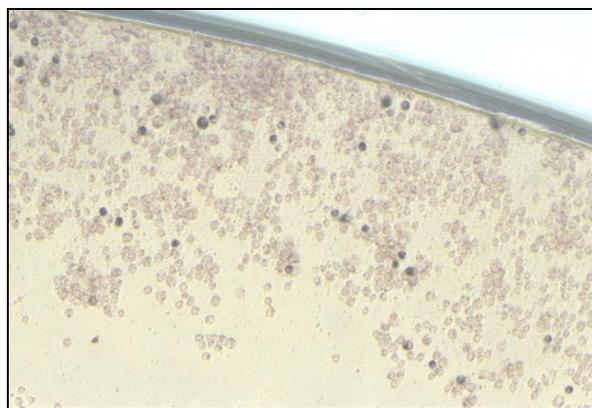


Abbildung 22 **CTLL-2-Zellen im MTT-Test**, schwache Formazankristallbildung, erkennbar am blaugrau gefärbten Zytoplasma einzelner CTLL-2-Zellen, Gewebekulturmikroskop, 10 x

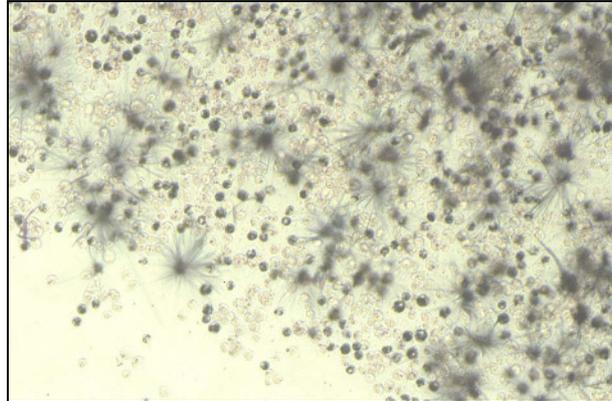


Abbildung 23

CTLL-2-Zellen im MTT-Test, mittlere Formazankristallbildung, erkennbar an zahlreichen blaugrau gefärbten CTLL-2-Zellen und nadelartig angeordneten Formazankristallen, Gewebekulturmikroskop, 10 x

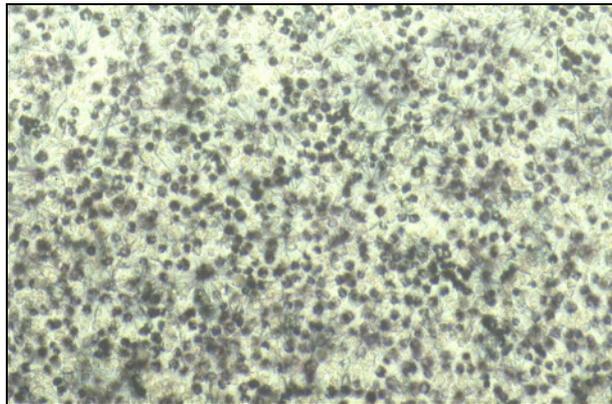


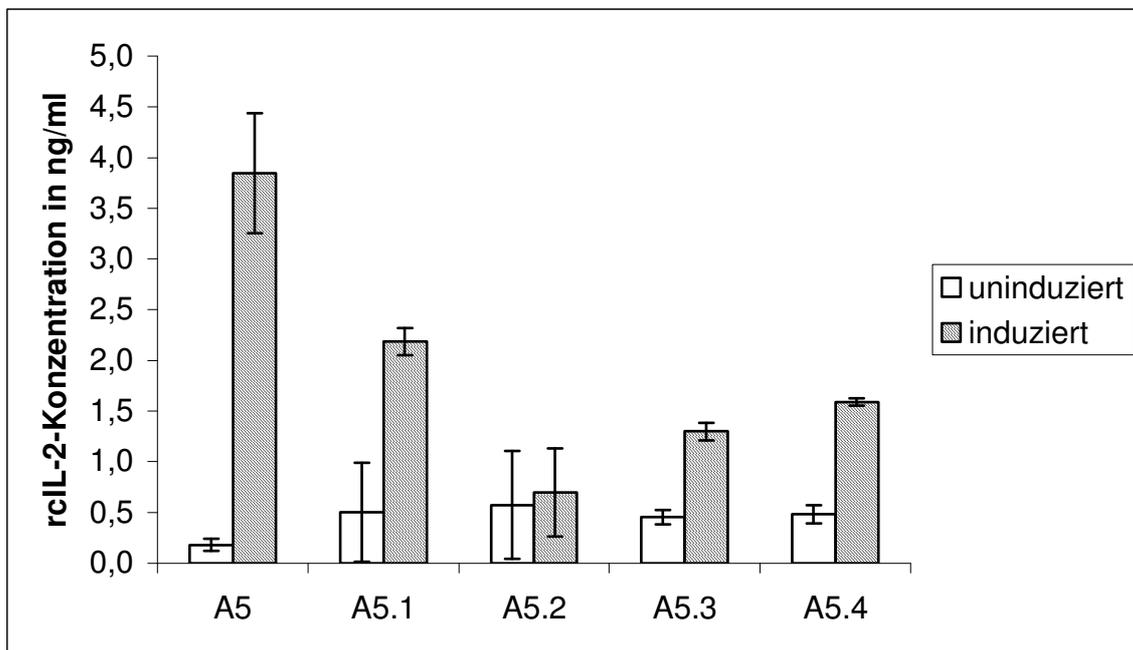
Abbildung 24

CTLL-2-Zellen im MTT-Test, starke Formazankristallbildung, hier nahezu alle CTLL-2-Zellen blaugrau angefärbt, Gewebekulturmikroskop, 10 x

4.4.1 Einfluss unterschiedlich eingesetzter BHK-Zellkonzentrationen und Inkubationszeiten

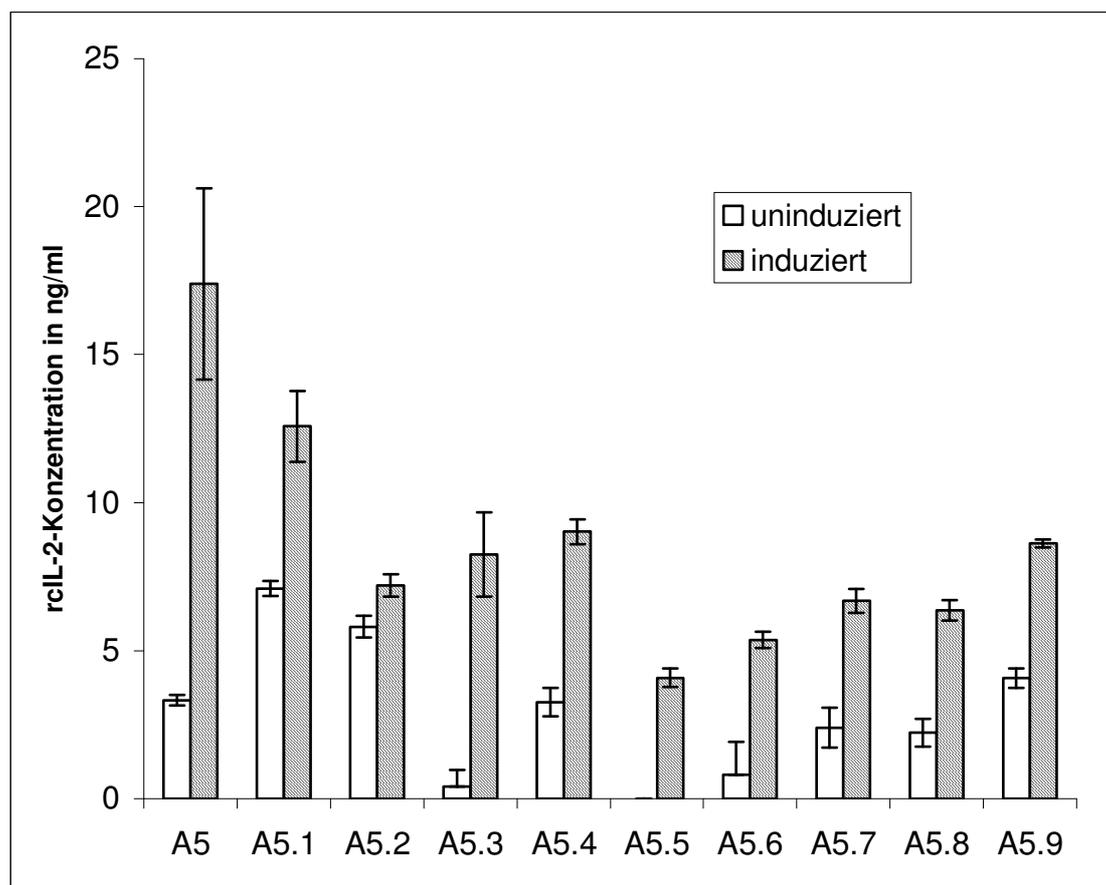
Die verschiedenen BHK-Klone wurden in verschiedenen Screening-Untersuchungen auf die von ihnen produzierte Menge an rcIL-2 nach der Induktion mit Doxyzyklin überprüft.

Wurde eine Zellkonzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingesetzt und die rcIL-2-Produktion für 24 h durch Doxyzyklin induziert, zeigten die transfizierten BHK-Klone A5, A5.1, A5.2, A5.3 und A5.4 eine Produktion von 3,85 ng, 2,19 ng, 0,70 ng, 1,30 ng und 1,59 ng rcIL-2/ml (Grafik 4, Tabelle 25). Diese Zellklone wiesen eine basale uninduzierte rcIL-2-Produktion von 0,18 ng, 0,50 ng, 0,57 ng, 0,45 ng und 0,48 ng rcIL-2/ml auf. Der Unterschied zwischen den induziert und uninduziert produzierten rcIL-2-Konzentrationen war bis auf BHK-Klon A5.2 in allen Fällen statistisch signifikant (jeweils $p = 0,008$). Letzterer wies hingegen eine nicht signifikante Induktion der rcIL-2-Produktion auf ($p = 0,915$).



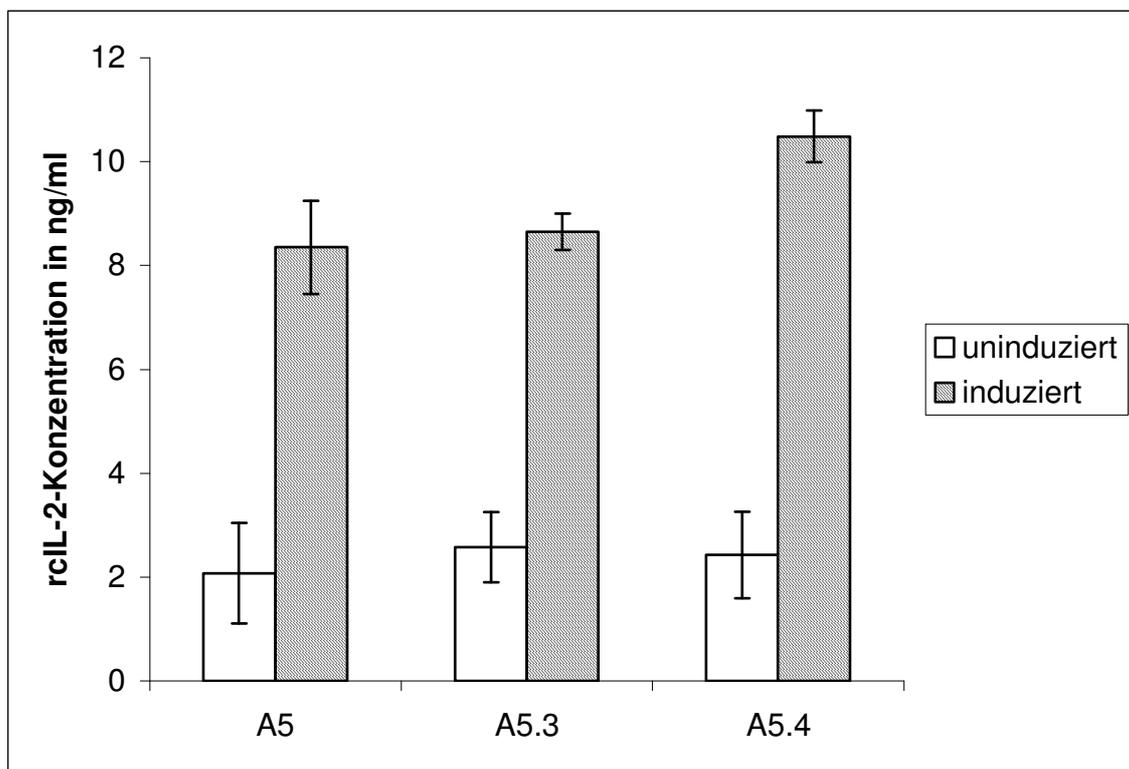
Grafik 4 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen verschiedener BHK-Klone ($1,3 \times 10^5$ Zellen/ml, Produktionsdauer 24 h)

Die BHK-Klone A5, A5.1, A5.2, A5.3, A5.4, A5.5, A5.6, A5.7, A5.8 und A5.9 wurden in einer Konzentration von $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und die rcIL-2-Produktion für 72 h eingeschaltet. Dabei zeigte Klon A5 mit 17,39 ng rcIL-2/ml die höchste rcIL-2-Produktion (Grafik 5, Tabelle 26). Die anderen reklonierten BHK-Klone produzierten nach Doxyzyklin-Induktion 12,57 ng, 7,21 ng, 8,25 ng, 9,02 ng, 4,09 ng, 5,36 ng, 6,68 ng, 6,36 ng sowie 8,62 ng rcIL-2/ml. Auch hier zeigten alle BHK-Klone bis auf A5.5 eine basale uninduzierte Sekretion von rcIL-2 (3,33 ng, 7,09 ng, 5,81 ng, 0,41 ng, 3,26 ng, 0,00 ng, 0,81 ng, 2,40 ng, 2,23 ng und 4,01 ng rcIL-2/ml). Unter diesen Kulturbedingungen wiesen alle BHK-Klone einen signifikanten Unterschied zwischen induzierter und uninduzierter rcIL-2-Produktion auf ($p = 0,008$).



Grafik 5 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen verschiedener BHK-Klone ($0,75 \times 10^5$ Zellen/ml, Produktionsdauer 72 h)

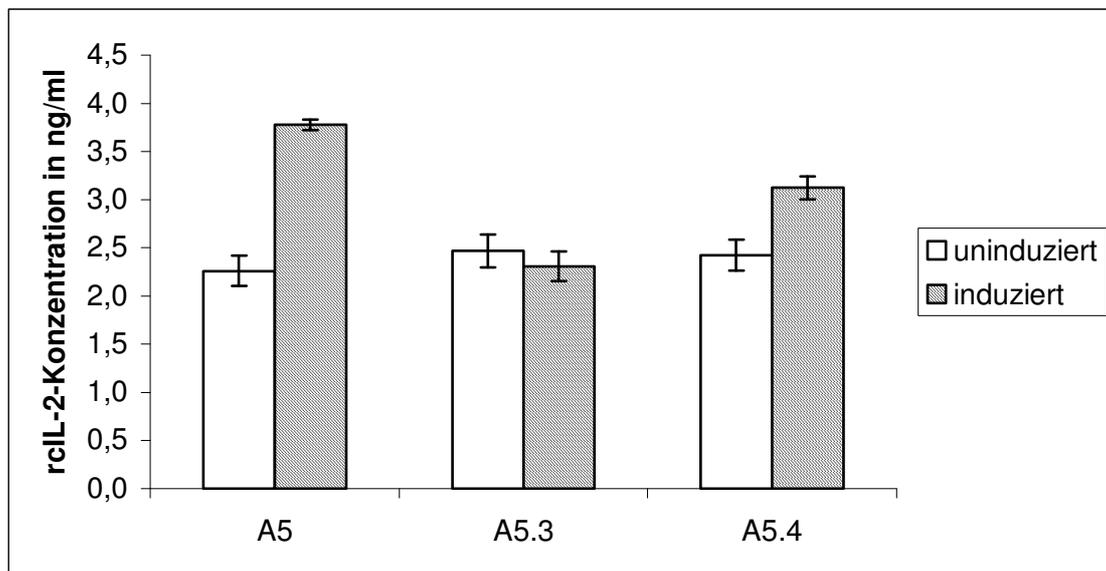
Wurden die BHK-Klone A5, A5.3 und A5.4 in einer Konzentration von $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml, d.h. fast um das Doppelte der vorherigen Konzentration, ausgesät und für 72 h die rcIL-2-Produktion durch Doxyzyklin-Zugabe angeschaltet, ergab sich eine produzierte rcIL-2-Menge von 8,35 ng, 8,65 ng und 10,49 ng rcIL-2/ml (Grafik 6, Tabelle 27). Die im uninduzierten Zustand basal produzierten rcIL-2-Konzentrationen lagen bei 2,01 ng, 2,58 ng sowie 2,43 ng rcIL-2/ml. Auch hier bestand eine Signifikanz zwischen induziert und uninduziert sezernierten rcIL-2-Mengen ($p = 0,008$).



Grafik 5 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen verschiedener BHK-Klone ($1,3 \times 10^5$ Zellen/ml, Produktionsdauer 72 h)

4.4.2 Koinkubation von transfizierten BHK-Klonen mit CTLL-2-Zellen in Transwell®-Einsätzen

Bei der Koinkubation der BHK-Klone A5, A5.3 und A5.4 mit CTLL-2-Zellen wiesen die Klone A5 und A5.4 einen signifikanten Unterschied zwischen uninduziert und induziert sezernierten rcIL-2-Menge auf ($p = 0,008$). Dabei lagen die induziert erzielten Mengen bei 3,78 ng und 3,12 ng rcIL-2/ml, wohingegen die basal abgegebene rcIL-2-Mengen 2,26 ng und 2,42 ng/ml betragen (Grafik 6, Tabelle 28). BHK-Zellklon A5.3 zeigte in dieser Versuchsanordnung keine signifikante Induzierbarkeit der rcIL-2-Produktion ($p = 0,173$). Die uninduzierte rcIL-2-Sekretion lag mit 2,47 ng/ml sogar noch leicht über der induzierten Ansätze, die 2,31 ng rcIL-2/ml betrug.

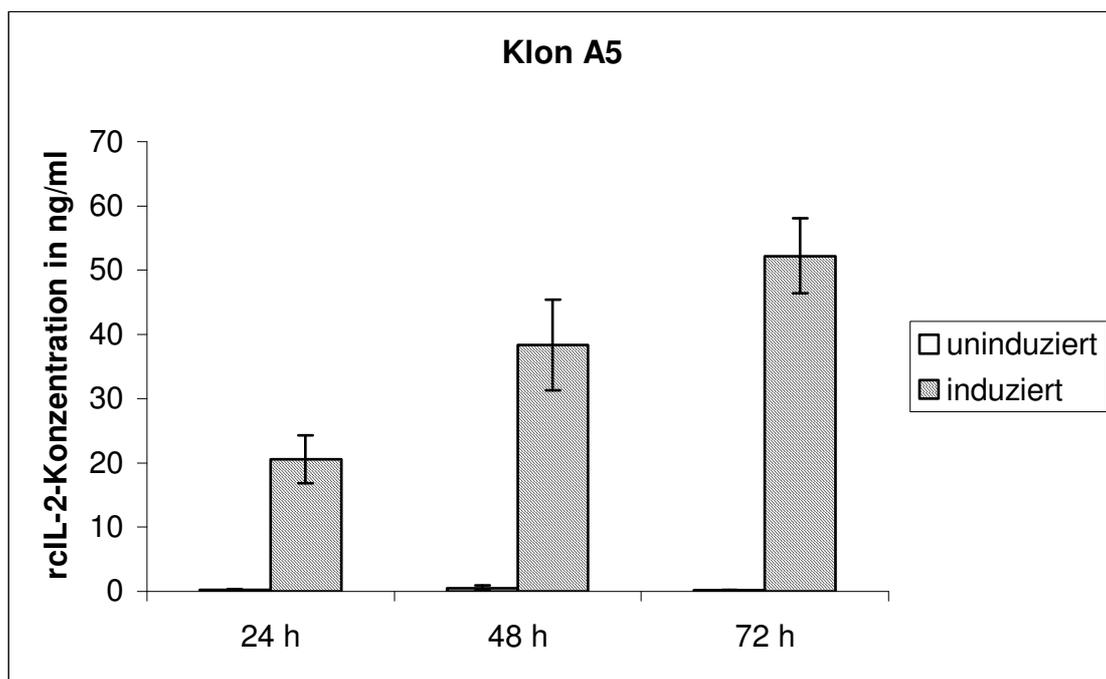


Grafik 6 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen der BHK-Klone A5, A5.3 und A5.4 im Laufe der Koinkubation mit CTLL-2-Zellen Transwell®-Einsätzen (Produktionsdauer 72 h)

4.4.3 Zeitlicher Verlauf der rcIL-2-Produktion über 72 h

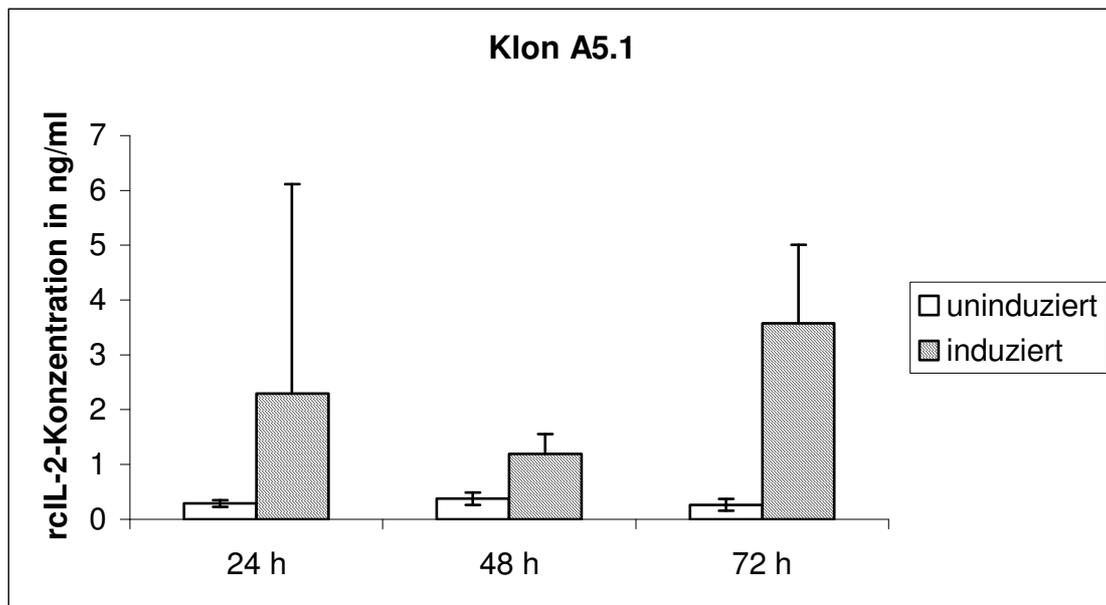
Weiterhin wurde der Verlauf der rcIL-2-Produktion durch die BHK-Klone A5, A5.1 und A5.2 über 72 h untersucht.

Der Klon A5 zeigte dabei einen kontinuierlichen Anstieg der sezernierten rcIL-2-Menge (Grafik 7, Tabelle 29). Diese stieg von 20,54 ng rcIL-2/ml nach 24 h auf 38,37 ng rcIL-2/ml. Nach 72 h betrug die produzierte Menge rcIL-2 52,23 ng/ml. Die in dieser Zeit produzierte basale rcIL-2-Konzentration lag zwischen 0,18 ng und 0,51 ng/ml. Die Induktion der rcIL-2-Sekretion war zu allen drei Zeitpunkten signifikant ($p = 0,008$).



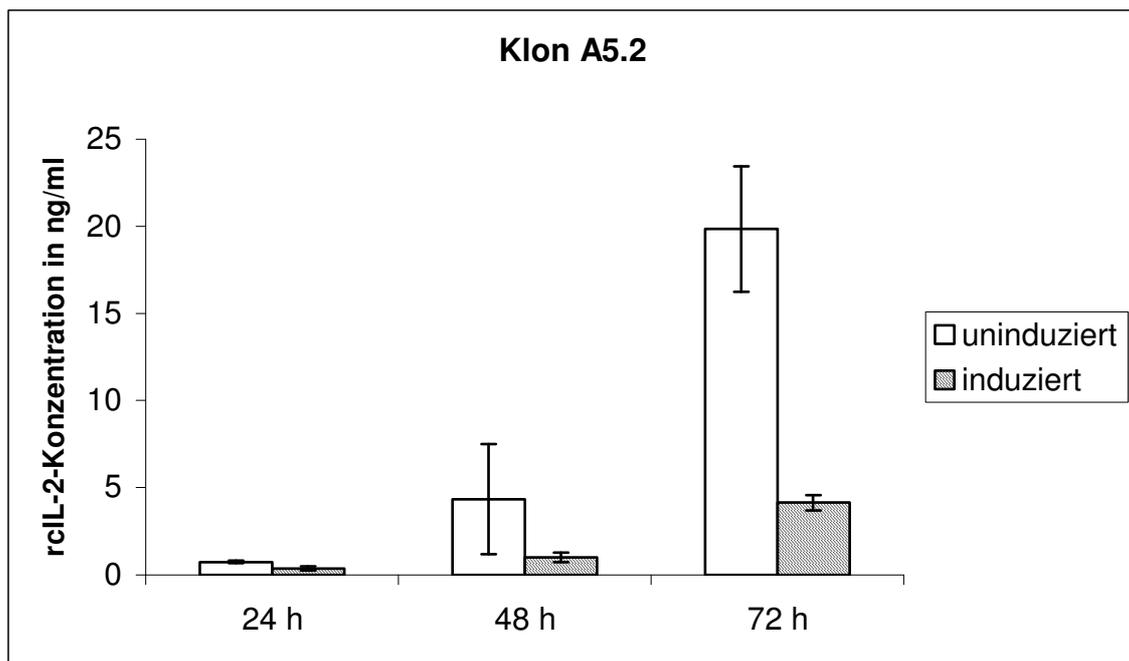
Grafik 7 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen des BHK-Klons A5 nach 24 h, 48 h und 72 h, eingesetzte Zellkonzentration $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml

Die Verlaufsstudie des BHK-Klons A5.1 über 72 h ergab nach 72 h eine maximale rcIL-2-Menge von 3,58 ng/ml (Grafik 8, Tabelle 30). Nach 48 h war mit 1,19 ng rcIL-2/ml eine geringere Konzentration messbar als nach 24 h. Hier lag der Wert bei 2,29 ng rcIL-2/ml. Wieder zeigte sich in allen drei Fällen eine Signifikanz zu den uninduziert sezernierten rcIL-2-Mengen ($p = 0,008$).



Grafik 8 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen des BHK-Klons A5.1 nach 24 h, 48 h und 72 h, eingesetzte Zellkonzentration $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml

In dieser Verlaufsstudie des transfizierten Klon A5.2 fiel hingegen auf, dass die uninduzierten Ansätze eine deutlich höhere rcIL-2-Menge sezernierten als die mit Doxyzyklin induzierten (Grafik 9, Tabelle 31). Die uninduziert produzierten rcIL-2-Konzentrationen lagen nach 24, 48 und 72 h bei 0,74 ng, 4,35 ng und 19,94 ng rcIL-2/ml. Dagegen wiesen die Überstände der induzierten Ansätze einen deutlich schwächeren Anstieg der rcIL-2-Mengen von lediglich 0,36 ng, 1,01 ng und 4,14 ng/ml auf. Sowohl die induzierten als auch die nicht induzierten Ansätze führten aber zu einem kontinuierlichen Anstieg des rcIL-2-Gehaltes, wobei der Unterschied im rcIL-2-Gehalt nach 24 h und 72 h zwischen den beiden Ansätzen signifikant ($p = 0,008$) war. Nach 48 h war lediglich ein nur schwach signifikanter Unterschied zu beobachten ($p = 0,016$).

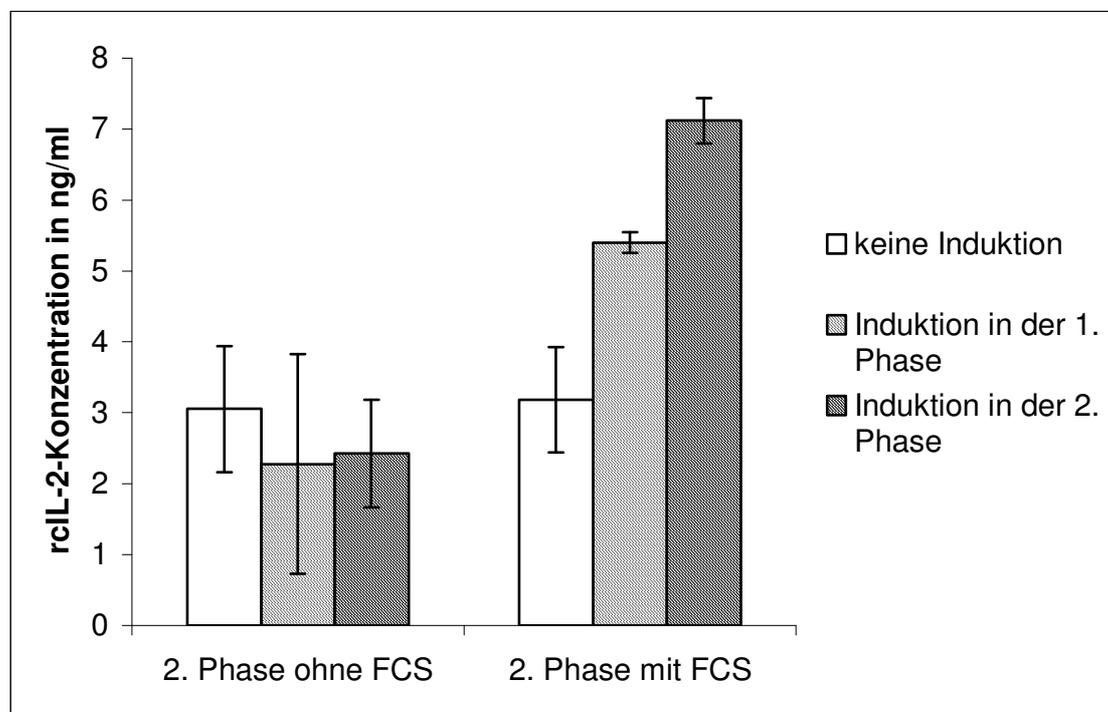


Grafik 9 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen des BHK-Klon A5.2 nach 24 h, 48 h und 72 h, eingesetzte Zellkonzentration $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml

4.4.4 rcIL-2-Produktion unter serumfreien Bedingungen

Die Produktion von rcIL-2 unter serumfreien Bedingungen wurde mit dem BHK-Klon A5 in einem zweiphasigen Versuchsaufbau verfolgt. In der ersten Phase erhielten alle Ansätze für 24 h serumhaltiges Kulturmedium, um ein Anwachsen und Proliferieren der Zellen zu gewährleisten. In der zweiten Phase, die ebenfalls 24 h dauerte, wurden die Ansätze in zwei Gruppen aufgeteilt, wovon eine weiterhin als Kontrolle mit serumhaltigem Medium versorgt wurde, die zweite hingegen serumfreies Medium bekam. Je Gruppe wurde ein Ansatz in der ersten Phase induziert, ein Ansatz in der zweiten Phase, während ein dritter Ansatz nicht induziert wurde.

Die drei Gruppen, die in der zweiten Versuchsphase serumfreies Kulturmedium erhalten hatten, produzierten immer eine geringere Menge an rcIL-2, unabhängig vom Zeitpunkt der Induktion (Grafik 10, Tabelle 32). Die rcIL-2-Konzentration lag im Falle einer Inkubation mit serumfreiem Kulturmedium uninduziert bei 3,03 ng/ml. Eine Induktion der Produktion in der ersten Versuchsphase ergab einen rcIL-2-Gehalt von 2,28 ng/ml. Wurde die rcIL-2-Sekretion in der zweiten Phase angeschaltet, lag die produzierte Menge bei 2,42 ng/ml.



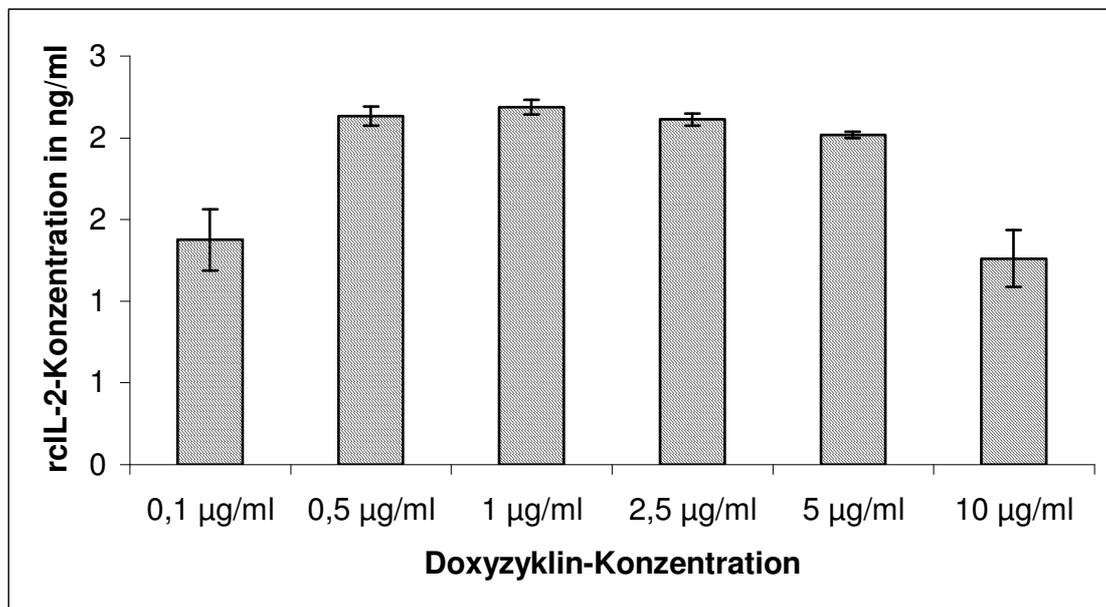
Grafik 10 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen des BHK-Klons A5, 1. Phase der Inkubation (24 h) für alle Ansätze in serumhaltigem Medium, Induktion mit jeweils 5 μg Doxyzyklin/ml

Erhielten die BHK-Zellen in der zweiten Versuchsphase serumhaltiges Kulturmedium, konnte in allen drei Ansätzen eine höhere rcIL-2-Produktion nachgewiesen werden. Die entsprechenden Mengen lagen bei 3,18 ng, 5,40 ng und 7,12 ng rcIL-2/ml. Hier zeigte sich die höchste rcIL-2-Menge bei einer Induktion in Phase 2, nachdem die Zellen in der ersten Phase kein Doxyzyklin zur Induktion erhalten hatten. Der Einfluss des Serums in Versuchsphase 2 war hoch signifikant ($p < 0,0001$), ebenso der Effekt von Doxyzyklin ($p = 0,001$). Auch die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren ergab einen hoch signifikanten Zusammenhang ($p < 0,0001$), d. h. die rcIL-2-Induktion durch Doxyzyklin wirkte je nach Vorhandensein von Serum im Kulturmedium unterschiedlich.

4.4.5 Induktion mit verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen

Der Einfluss unterschiedlicher Doxyzyklin-Konzentrationen auf die produzierte rcIL-2-Menge wurde mit Klon A5.4 untersucht.

Die höchste rcIL-2-Menge von 2,19 ng/ml konnte mit einer Doxyzyklin-Konzentration von 1 µg/ml erreicht werden (Grafik 11, Tabelle 33). Doxyzyklin-Gaben von 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 5 µg/ml gaben aber annähernd gleich hohe rcIL-2-Mengen von 2,13 ng, 2,11 ng und 2,02 ng/ml, das entsprachen 97,3 %, 96,4 % sowie 92,2 % der Höchstmenge. Bei den Konzentrationen von 0,1 µg Doxyzyklin/ml als niedrigste sowie 10 µg Doxyzyklin/ml als höchster eingesetzter Konzentration lagen die rcIL-2-Mengen bei 1,38 ng/ml und 1,26 ng/ml, was nur 63,0 % und 57,5 % der rcIL-2-Höchstmenge entsprach. Der globale Unterschied zwischen den Gruppen war mit $p < 0,0001$ hoch signifikant.



Grafik 11 Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 5$) der produzierten rcIL-2-Konzentrationen des BHK-Klons A5.4 nach Induktion mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die mesenchymale Zelllinie BHK mit dem Tet-on-Expressionssystem zu transfizieren, in welches zunächst das Gen für kanines Interleukin-2 (cIL-2) einkloniert wurde. Durch Induktion des Tet-on-Expressionssystems sollte die Sekretion von cIL-2 gestartet und biologisch aktives cIL-2 in den Zellkultur-Überstand abgeben werden.

Dazu musste zunächst die DNA-Sequenz für cIL-2 gewonnen werden. Dies geschah aus IL-2-produzierenden kaninen Lymphozyten. Hierfür wurde auf Blutlymphozyten des Hundes aus folgenden Gründen zurückgegriffen. Erstens ist ihre Gewinnung durch Venenpunktion wesentlich einfacher und ohne erhebliche invasive Maßnahmen durchzuführen im Vergleich zur Gewinnung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen wie Lymphknoten oder Milz. Zweitens gab es in unserer Arbeitsgruppe bereits große Erfahrung mit der Isolierung von Hundeblymphozyten und mit ihrer optimalen Mitogenstimulation (Gondolf, 1994; Gondolf et al., 1996; Wagner, 1998).

Die **Isolierung von Lymphozyten** aus Vollblut erfolgt meist durch Zentrifugation über verschiedene Dichtegradienten. So wird für die Anreicherung humaner Lymphozyten Ficoll-Hypaque[®] verwendet, was sich jedoch für die Isolierung von Hunde-Lymphozyten als weniger geeignet erwiesen hat. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (Gondolf, 1994) zeigten, dass die Isolierung über eine Percoll[®]-Gradientenlösung wesentlich bessere Ergebnisse liefert. So konnte die höchste Reinheit an Lymphozyten bei einer Zentrifugation mit einem Percoll[®]-Anteil von 57,5 % und einer Dichte von 1,072 g/ml erzielt werden. Im Vergleich zu einem 58,5 %igen Percoll[®]-Gradienten, mit welchem insgesamt $11,5 \times 10^6$ Zellen/ml gewonnen wurden, konnten zwar nur insgesamt $9,9 \times 10^6$ Zellen/ml isoliert werden, der Anteil an Lymphozyten war bei diesem 57,5 %igen Percoll[®]-Gradienten jedoch mit 76,55 % um etwa 15 % höher, denn bei der Verwendung dieses 57,5 %igen Percoll[®]-Gradienten war eine geringere Verunreinigungen mit Granulozyten und Monozyten vorhanden. Die Ergebnisse von Gondolf (1994) zeigten in dieser Gradientenstufe einen Anteil an neutrophilen Granulozyten von lediglich 5,4 %, während eosinophile Granulozyten mit 1,4 % und Monozyten mit 6,2 % im Isolat vorhanden waren. Diese Zellpopulationen können sich negativ auf die Stimulation von Lymphozyten auswirken, unter anderem aufgrund ihrer starken Abgabe an sauren Stoffwechselprodukten, die zur schnellen Ansäuerung des

Zellkulturmediums führen, sowie der kurzen Lebensdauer von Granulozyten unter Kulturbedingungen und der damit verbunden Freisetzung von Enzymen und toxischen Zerfallsprodukten (Kristensen et al., 1982).

Die hier durchgeführte Lymphozytenisolierung ergab eine absolute Zellzahl von $4,51 \times 10^6$ Zellen/ml mit einem hohen Anteil an Lymphozyten von 92,5 %. Neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten waren nur zu 0,6 %, 4,7 % beziehungsweise 1,7 % vorhanden. Damit lag die Zahl der isolierten Zellen zwar unter den von Gondolf (1994) angegebenen Werten, die Reinheit der Lymphozyten war jedoch deutlich höher. Dies kann darin begründet liegen, dass zwischen einzelnen Spenderhunden zum Teil deutliche Unterschiede in Bezug auf Zellausbeute und Lymphozytenreinheit auftraten. Ein weiterer Grund für die im Vergleich zu Gondolf (1994) erzielten unterschiedlichen Ergebnisse der Percoll[®]-Lymphozytenisolierung könnte sich durch die verschiedenen Zellzählmethoden ergeben haben. Während bei Gondolf (1994) das Differentialblutbild durch manuelles Auszählen von 200 Leukozyten eines May-Grünwald-Giemsa gefärbten Heparinblutausstriches erfolgte, konnte in der vorliegenden Arbeit das automatische Advia[®] 120 Hematology System (Bayer Diagnostics, München) der Klinik für Kleintiere, Abteilung Innere Medizin genutzt und das Differentialblutbild mittels Durchflußzytometrie bestimmt werden.

Die optimalen Parameter zur **Stimulation** der isolierten Lymphozyten durch das Lektin Concanavalin A (Con A) in einer Konzentration von 2 µg/ml über einen Zeitraum von 48 h bei einer Ausgangszellkonzentration von 15×10^5 Zellen/ml und die Messung der Stimulation mit dem MTT-Proliferationstest unter Bestimmung des Stimulationsindex (SI) aus der Optischen Dichte (OD) von unstimulierten und stimulierten Kulturen wurde von Wagner (1998) übernommen. Einerseits wurde ein Makrokulturansatz eingesetzt, um eine ausreichende Lymphozytenzahl zur mRNA-Isolierung zu erhalten. Ergänzend wurde ein Mikrokulturansatz verwendet, um die Proliferation stimulierter und nicht stimulierter Lymphozyten kontrollieren und miteinander vergleichen zu können. Der SI lag bei 154 für Makrokulturen und bei 146 für die Mikrokulturkontrollansätze. Damit war eine hohe Übereinstimmung beider Ansaätze und eine sehr deutliche Stimulation der isolierten Lymphozyten erkennbar. Der SI lag in diesem Ansatz sogar um das Zwanzigfache über dem von Wagner (1998) ermittelten SI von 7,75.

Um eine **cdNA für cIL-2** zu erzeugen, wurde mit der aus der stimulierten Makrokultur isolierten mRNA eine **RT-PCR** nach den Angaben von Dunham et al. (1995) durchgeführt. Zunächst wurde der Erfolg dieser RT-PCR auf einem Agarose-Gel überprüft. Die dabei ersichtliche Bande entsprach der erwarteten und von Dunham et al. (1995) angegebenen Größe von etwa 650 bp. Diese Tatsache sowie die korrekte Bande des ebenfalls in der RT-PCR amplifizierten House Keeping-Gens GAPDH wiesen auf einen korrekten Ablauf der RT-PCR hin. Die daraufhin durchgeführte **Sequenzierung** des RT-PCR-Produktes zeigte eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der von Dunham et al. (1995) ermittelten Sequenz. Auch die nach der Einklonierung des RT-PCR-Produktes in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor erneut durchgeführte Sequenzierung ergab keine Abweichung von der Original-Sequenz. Damit war die Voraussetzung für die erfolgreiche Produktion eines korrekten und biologisch aktiven cIL-2-Proteins nach Transfektion in eine Zelllinie gegeben.

Für die **Tet-on-Expression** musste ein Response-Plasmid mit der cIL-2-Sequenz sowie einem IRES-Luciferase-Konstrukt hergestellt werden. Dies geschah durch eine Dreifach-Ligation von cIL-2-Fragment, IRES-Luciferase-Konstrukt und dem Vektor pTRUE (Schema 4, Seite 47). Dazu wurden in einer PCR mit speziellen Primern Schnittstellen in die cIL-2-Sequenz eingebaut, die außerhalb der kodierenden Bereiche lagen. Das IRES-Luciferase-Konstrukt konnte ebenfalls in einer PCR aus dem Vektor pCITE-Luci amplifiziert werden. Beide PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-T inkloniert, um sie durch Transformation in *E. coli*-Bakterien in ausreichender Menge vermehren zu können. Jeder Schritt wurde durch eine Agarosegelelektrophorese und, falls angebracht, einen vorgeschalteten Restriktionsenzymverdau kontrolliert. Nach der pGEM-T-Klonierung wurden je Plasmid 6 Kolonien auf den korrekten Einbau der Inserts in den Vektor überprüft, um eine Kolonie mit korrekt eingebautem Fragment auswählen zu können. Einige der Kolonien wiesen kein inkloniertes Insert auf, da eine Religation des Vektors mit sich selbst möglich ist.

Da das cIL-2-Insert vor der Klonierung in einer PCR vervielfältigt wurde, musste auch hier wieder die cIL-2-Sequenz überprüft werden, um so Schreibfehler der DNA-Polymerase ausschließen zu können. Wiederum ergab sich hierbei eine komplette Übereinstimmung zur Original-Sequenz. In den flankierenden nicht-kodierenden Bereichen zeigten sich zwar Differenzen, diese waren jedoch auf Vektor- oder Primersequenzen zurückzuführen und damit für die entscheidende, kodierende Sequenz bedeutungslos.

Auf die Sequenzierung des IRES-Luciferase-Konstruktes wurde verzichtet, da später in der transienten Transfektion eine funktionelle Überprüfung des Enzyms stattfand. Eventuell vorhandene stille Mutationen, also an zweiter oder dritter Stelle eines Codons, die keinen Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz und damit auf die Funktion der Proteine haben, wurden hierbei in Kauf genommen.

Zur Dreifachligation von cIL-2, IRES-Luciferase und pTRUE-Vektor wurden diese Komponenten mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Klonierungsstrategie sah vor, dass an ihren Enden sogenannte „Sticky Ends“ entstanden. Diese einsträngigen DNA-Überhänge mit einer Länge von je 4 Basen finden wegen ihrer zueinander komplementären Sequenzen während der Ligation zueinander. Da zu jedem Überhang eines Fragmentes der Überhang eines anderen Fragmentes komplementär ist, sollte sich in der Ligation die gewünschte Reihenfolge ergeben. Überprüft wurde auch dieses wieder durch eine Agarosegelelektrophorese nach einem analytischen Restriktionsenzymverdau. Von sechs überprüften pTRUE-IL-2-Plasmiden zeigten fünf einen korrekten Einbau der Inserts in den Vektor.

Eines dieser Plasmide wurde ausgewählt, um in einer **transienten Transfektion** in BHK-Tet-on-Zellen getestet zu werden. Vor der stabilen Transfektion in diese Zellen musste die Funktionalität des Response-Plasmids im Tet-on-System sichergestellt werden. Dazu diente das Screening auf das Reportergen Luciferase in einem induzierten und einem nicht induzierten Ansatz der transient transfizierten Empfängerzellen. Die Messung im Luciferase-Assay ergab hier, dass durch die Induktion des Tet-on-Systems eine Steigerung der Expression von Luciferase um das etwa Tausendfache erreicht wurde. Dieser Faktor liegt zwar unter dem von Gossen und Bujard (1992) angegebenen Wert, die in ihren Untersuchungen die Expression von Proteinen um den Faktor 10^5 steigern konnten, zeigt aber dennoch eine deutliche Induzierbarkeit der Proteinexpression. Daher konnte die Konstruktion des Response-Plasmids pTRUE-IL-2 als erfolgreich angesehen werden.

Die **stabile Transfektion** des Plasmids pTRUE-IL-2 erfolgte mit einem linearisierten Plasmid. Linearisierte DNA wird in das Genom der Wirtszellen integriert und so auf Tochterzellen bei der Zellteilung weitergeben. Allerdings lässt sich nicht vorhersagen, wie viele Kopien des Plasmids aufgenommen und an welchen Stellen im Genom sie eingebaut werden. So ist es möglich, dass die transfizierte DNA in der Nähe von starken Promotoren oder anderen aktiven Stellen integriert wird, was eine erhöhte basale Produktion der inklonierten Protein-Sequenzen zur Folge hat. Um dies einschätzen zu können, erfolgte eine

weitere Überprüfung der Enzymaktivität der Luciferase in induzierten und nicht induzierten Ansätzen je Klon im Rahmen eines Luciferase-Assays. Die zwölf aus der stabilen Transfektion isolierten und überprüften Klone wiesen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Luciferase-Expression auf. Die Klone A1, A6, A7 und A8 zeigten einen hohen Stimulationsindex zwischen 27,8 und 46,8, während der SI der Klone A2, A3, A4, A5, A9, A10 und A12 lediglich bei 2,6 bis 14,6 lag. Die höchste Menge an Luciferase produzierte im induzierten Zustand mit 604 230 der Klon A5. Die geringste Menge erreichte der induzierte Ansatz von Klon A8 mit nur 3 763. Die Schwankungen des produzierten Reportergens sind zum Einen auf die unterschiedliche Anzahl der integrierten pTRUE-IL-2-Kopien in das Genom der Wirtszellen zurückzuführen. Zum Anderen können diese Unterschiede auch auf eine unterschiedliche Zelldichte in den zu testenden Ansätzen zurückzuführen sein. Auch wenn die Ausgangszelldichte in allen Ansätzen gleich war, ist es möglich, dass nicht in jedem Ansatz die gleiche Anzahl an Zellen inkubiert wurde. Die Zellen wurden zum Aussäen suspendiert, so dass gleichgroße Aliquots dieser Suspension nicht zwangsläufig die gleiche Menge an Zellen aufwiesen. Zusätzlich können über den Inkubationszeitraum Unterschiede in der Wachstumsrate der Zellen aufgetreten sein. Eine besondere Rolle nimmt Klon A11 ein. Hier lag die Luciferase-Aktivität im induzierten Zustand mit 27 105 unter der des nicht induzierten Ansatzes, die 41 632 betrug. Dieser Klon verhielt sich also nach dem Tet-off-System (Gossen et al., 1995). Der Unterschied zwischen dem Tet-off- und dem Tet-on-System liegt in einem Austausch von vier Aminosäuren im Tetrazyklinrepressor (*tetR*), was zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit einem veränderten Bindungsverhalten am Tetrazyklinoperator (*tetO*) führt (Gossen et al., 1995). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass im Zuge der Transfektion solch eine gravierende Mutation an der „richtigen Stelle“ und damit eine Veränderung der Aminosäureabfolge in Klon A11 entstanden ist. Die Ursache für dieses Ergebnis ist somit unklar.

Ein zweites Luciferase-Assay mit den Klonen A1, A5 und A8 ergab ähnliche Werte wie die des vorausgegangenen Assays. Der SI von Klon A1 und A8 lag jedoch etwas unter den zuvor gemessenen Werten. Klon A1 produzierte im induzierten Zustand weniger Luciferase, was wiederum mit einer Schwankung in der Zellzahl zu erklären ist. Dies ist wahrscheinlich auch die Ursache dafür, dass Klon A8 hier eine größere Menge Luciferase exprimierte. Klon A5 zeigte bei diesem zweiten Screening sowohl im induzierten als auch im nicht induzierten Zustand eine höhere Luciferase-Produktion. Auch der SI war höher. Als Negativ-Kontrolle wurde die Luciferase-Expression in BHK-Zellen untersucht, die das Luciferase-Gen nicht

beinhalteten. Mit 119 lag dieser Wert weit unter der basalen Luciferase-Expression von transfizierten, jedoch nicht induzierten BHK-Tet-on-pTRUE-IL-2-Zellen.

Die **Reklone** von A1 und A5 verhielten sich wie ihre Ausgangszellklone. Der SI von A1.1 und A1.2 lag mit 42,5 und 34,5 im Bereich des SI von A1. Die Reklone von A5 zeigten wie die Ursprungszelllinie eine sehr hohe induzierte Luciferase-Menge bei einem mittleren SI. Dies deutete darauf hin, dass die Ausgangsklone A1 und A5 bereits relativ homogene Zellpopulationen hinsichtlich der Anzahl der ins Genom integrierten Plasmid-Kopien und der Proteinexpression darstellten, so dass Tochterpopulationen, die auf einer einzigen Zelle dieser Ausgangspopulationen beruhten, ein ähnliches Expressionsmuster zeigten und daher keine großen Unterschiede zu den Ursprungsklonen aufwiesen.

Der SI von Reklon A8.1 war lediglich etwa halb so groß wie der SI von A8. Hier wurde offenbar eine Zelle zum Ausgangspunkt der Reklon-Linie, die möglicherweise weniger pTRUE-IL-2-Kopien enthielt als der Durchschnitt der heterogenen A8-Population. Weiterhin wies A8.2 sowohl im induzierten als auch im nicht induzierten Zustand eine so geringe Menge an Luciferase auf, dass diese Werte noch unter denen der Negativ-Kontrolle lagen. Es handelte sich hierbei um eine Zellpopulation, die entweder auf eine nicht transfizierte BHK-Zelle zurückzuführen ist oder in der ein Defekt im Tet-on-System aufgetreten ist. Da die Transfektionen von Regulator- und Response-Plasmid durch die Übertragung von Antibiotika-Resistenzen kontrolliert und die entsprechend erfolgreich transfizierten Zellen durch Antibiotika-Zusätze zum Zellkulturmedium selektiert werden, ist dieses Ereignis zwar ungewöhnlich, jedoch nicht auszuschließen. Es ist durchaus möglich, dass die Antibiotika-Resistenzen bei der Zellteilung weiter gegeben werden, jedoch essentielle Teile des Tet-on-Systems durch Mutation verloren gehen können, so dass Antibiotika-resistente Zellen kultiviert werden, die kein funktionierendes Tet-on-System mehr in sich tragen.

Die weiteren Untersuchungen des produzierten cIL-2 wurde mit dem Klon A5 und seinen Reklonen durchgeführt, da das Luciferase-Screening dieser Klone die höchste Proteinproduktion ergab.

Eine Grundvoraussetzung zur Synthese eines Proteins ist die dafür kodierende **mRNA**. Ob die transfizierten BHK-Zellen in der Lage sind, nach Induktion des Tet-on-Systems mit Doxyzyklin die mRNA für cIL-2 zu produzieren, wurde in einer RT-PCR überprüft. Hierfür war es wichtig, nach der Isolierung der mRNA aus induzierten Zellen eine DNase-Behandlung durchzuführen, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, da die DNA-

Sequenz für cIL-2 in den Zellen vorhanden ist und diese nicht amplifiziert werden soll. Als Negativkontrolle diente ein mRNA-Extrakt aus nativen, nicht transfizierten BHK-Zellen. In dieser RT-PCR konnte in Zellen von induzierten A1- und A5-Klonen die mRNA für cIL-2 nachgewiesen werden. In der Agarosegelelektrophorese zeigte sich jedoch bei dem Klon A1 eine sehr schwache Bande. Obwohl die RT-PCR nicht als ein quantitatives Verfahren angesehen werden darf, kann daraus geschlossen werden, dass der Klon A1 weniger cIL-2-mRNA als der Klon A5 enthielt.

Damit die Zelllinie BHK als cIL-2-Produzent eingesetzt werden konnte, musste ausgeschlossen werden, dass sie selbst **Effekte auf Zellen mit spontaner zytotoxischer Aktivität** ausübt, also Faktoren mit stimulierender oder blockierender Wirkung auf Effektorzellen in das Kulturmedium abgibt. Die später koinkubierten Effektorzellen sollen lediglich über das produzierte cIL-2 stimuliert werden. Um dies zu überprüfen, wurden Effektorzellen den Überständen von nativen, nicht transfizierten BHK-Zellen ausgesetzt und daraufhin ihre Zytotoxizität in einem Rose Bengal Assay (RBA) überprüft.

In einem der beiden durchgeführten Versuche wurden frisch isolierte Effektorzellen und Zielzellen in den BHK-Überständen inkubiert. Als Kontrolle wurde frisches Zellkulturmedium statt BHK-Überstand verwendet. Die Zytotoxizität in den Testüberständen lag mit 54 % praktisch genauso hoch wie die der Kontrollansätze mit 55 %.

In dem zweiten Versuchsansatz wurden frisch isolierte Effektorzellen zunächst für 12 h in Kulturüberständen nativer BHK-Zellen inkubiert. Sie ließen danach keine Zytotoxizität erkennen. Im Kontrollansatz aus Zellen, die für 12 h in regulärem Zellkulturmedium inkubiert worden waren, lag die Zytotoxizität auch nur bei 10 %. In beiden Fällen ist also ein deutlicher Rückgang der zytotoxischen Aktivität zu erkennen gewesen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine Deaktivierung oder gar auf ein Absterben der Effektorzellen in der dem RBA vorgeschalteten Inkubation von 12 h Dauer zurückzuführen. Eine Zellzählung oder eine Lebend-Tot-Differenzierung konnte am Ende dieser Vorinkubation aufgrund der sehr geringen Zellzahlen nicht durchgeführt werden, da dies einen weiteren Verlust an Effektorzellen bedeutet hätte und somit das optimale Verhältnis von Effektor- und Zielzellen von 100 : 1 noch weniger hätte erreicht werden können. Der Rückgang der Effektorzellzahlen wurde besonders deutlich, nachdem sie 12 h in dem bereits von BHK-Zellen verbrauchten Medium inkubiert wurden, da dieses deutlich nährstoffärmer war und durch Stoffwechselprodukte bereits einen niedrigeren pH-Wert aufwies. Da jedoch im ersten

Versuchsansatz kein gravierender Unterschied zwischen den Zytotoxizitäten ermittelt werden konnte, ist davon auszugehen, dass BHK-Zellen keine Faktoren produzieren, die sich stimulierend auf die NK-Zell-Aktivität auswirken.

Die **biologische Aktivität** des sezernierten cIL-2, also die Fähigkeit der Stimulation IL-2-abhängiger Zellen, wurde in einem Bioassay durch die Bestimmung der Proliferation der IL-2-abhängigen Zelllinie CTLL-2 überprüft. Eine Abschätzung der Menge an sezerniertem cIL-2 musste ebenfalls mit diesem Bioassay durchgeführt werden, da ein entsprechendes ELISA-System für kanines IL-2 bis heute nicht zur Verfügung steht.

Die Überprüfung der biologischen Aktivität des von den transfizierten BHK-Zellen nach Doxyzyklin-Induktion sezernierten cIL-2 erfolgte unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Bei einer eingesetzten Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml und einer Produktionszeit von 24 h lag die höchste Konzentration an sezerniertem cIL-2 bei 3,85 ng/ml (Klon A5). Insgesamt war zu beobachten, dass bei dieser Ausgangszellkonzentration das Kulturmedium ein starkes Absinken des pH-Wertes aufwies. Dies beeinträchtigte nachfolgende Bioassays mit CTLL-2-Zellen. Daher wurden geringere Zellzahlen verwendet und die Produktionszeit von cIL-2 verlängert. So ergab der Einsatz von $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml über eine Produktionszeit von 72 h eine höhere Konzentration an cIL-2 in den Kulturüberständen. Hier lag die höchste Konzentration bei 17,39 ng cIL-2/ml (Klon A5). Bei einer Zellkonzentration von $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml und einer Produktionszeit von ebenfalls 72 h wurden maximal 10,49 ng cIL-2/ml sezerniert (Klon A5.4).

Die getesteten BHK-Klone zeigten bis auf Klon A5.2 alle eine signifikante Induzierbarkeit der cIL-2-Produktion durch Doxyzyklin. Dies lässt auf ein funktionierendes Tet-on-Expressionssystem in den BHK-Zellen schließen. Viele der Klone wiesen eine basale cIL-2-Produktion auf, was sich mit möglichen Einflüssen von zelleigenen Promotoren erklären lässt, in deren Nähe Anteile des Tet-on-Systems integriert wurden. Auch die Anzahl der stabil in das Genom integrierten pTRUE-IL-2-Kopien hat einen Einfluss auf die Menge des produzierten cIL-2. Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlich hohen cIL-2-Produktion der einzelnen BHK-Klone wieder.

In den Versuchen zeigte lediglich Klon A5.2 keine Signifikanz zwischen induziert und nicht induziert produzierter cIL-2-Konzentration. Die produzierte cIL-2-Menge der induzierten Ansätze lag nur geringfügig über der der nicht induzierten. Die Ursache könnte in einer Mutation des Tetrazyklinoperons im Response-Plasmid liegen, so dass der Doxyzyklin-

gekoppelte reverse tetrazyklkontrollierte Transaktivator nicht an dieses Element binden konnte, um damit eine Doxyzyklin-induzierte cIL-2-Produktion anzuschalten.

Bei der **Koinkubation** in Transwell[®]-Einsätzen wurde die cIL-2-produzierenden BHK-Zellen mit den IL2-sensitiven CTLL-2-Zellen gleichzeitig inkubiert. Hier konnten die cIL-2-Effekte direkt gemessen werden. So zeigte sich insgesamt eine geringere Differenz zwischen basaler und induzierter cIL-2-Produktion. Die basale cIL-2-Produktion nicht-induzierter Klone wirkte sich hier deutlicher auf die CTLL-2-Proliferation aus. Aufgrund der geringen Größe der Einsätze konnte mit 1×10^3 Zellen nur eine relativ geringe Anzahl an Klon-Zellen eingesetzt werden. Daher lagen die hier im Zeitraum von 72 h produzierten Konzentrationen an cIL-2 unter den in anderen Versuchen erzielten Konzentrationen. Im Gegensatz zu anderen Versuchen wies der Klon A5.3 bei der Koinkubation keine Induzierbarkeit der cIL-2-Produktion auf. Hingegen lag sogar die cIL-2-Konzentration des nicht induzierten A5.3-Ansatzes etwas über der des induzierten Ansatzes. Auch hier ist möglicherweise eine ungleichmäßige Zellsuspension beim Versuchsansatz und eine dadurch zu geringe eingesetzte Zellzahl zu berücksichtigen.

Weiterhin wurde der **Verlauf der cIL-2-Produktion über 72 h** untersucht. Dazu wurden von drei BHK-Klonen nach 24 h, 48 h und 72 h Überstände auf den cIL-2-Gehalt im Bioassay mit Hilfe von CTLL-2-Zellen gemessen. Klon A5 zeigte über diesen Zeitraum einen kontinuierlichen Anstieg der cIL-2-Produktion von 20,54 ng/ml über 38,37 ng/ml bis 52,23 ng/ml. Dies ist auch gleichzeitig die höchste cIL-2-Konzentration aller BHK-Klone. Die uninduziert produzierte Konzentration von cIL-2 lag zu jedem Zeitpunkt unter 1 ng/ml. Für diesen Ansatz wurde mit $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml eine recht hohe Zellkonzentration eingesetzt, was die große Menge an produziertem cIL-2 erklärt.

Der Klon A5.1 wies nach 48 h eine geringere Menge an cIL-2 auf als nach 24 h. Dies ist eventuell auf eine ungleichmäßige Suspension der Zellen bei der Einstellung der Zellkonzentration zu Beginn des Versuchs zurückzuführen, so dass in dem 48 h-Ansatz weniger Zellen anwachsen als in den anderen Ansätzen. Die nach 72 h höchste cIL-2-Konzentration lag mit 3,58 ng/ml deutlich unter der von Klon A5 produzierten Konzentration.

Klon A5.2 ließ über den Zeitraum von 72 h einen Anstieg der cIL-2-Produktion in den nicht induzierten Ansätzen erkennen, der signifikant bzw. schwach signifikant über der Konzentration in den induzierten Ansätzen lag. Die Hemmung der cIL-2-Produktion durch Zugabe und die Förderung der Produktion durch das Fehlen von Doxyzyklin entspricht dem Verhalten im Tet-off-Expressionssystem (Gossen et al., 1995). Ein ähnlicher Effekt wurde

auch bei dem Luciferase-Assay von Klon A11 beobachtet. Der Unterschied zwischen dem Tet-off- und dem Tet-on-System liegt in einem Austausch von vier Aminosäuren im Tetrazyklinrepressor (*tetR*), was zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit einem veränderten Bindungsverhalten am Tetrazyklinoperator (*tetO*) führt (Gossen et al., 1995). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass im Zuge der Kultivierung des Klons und seiner regelmäßigen Passagierung solch eine gravierende Mutation an der „richtigen Stelle“ und damit eine Veränderung der Aminosäureabfolge im *tetR* entstanden ist. Die Ursache für dieses Ergebnis ist somit unklar.

Untersuchungen zur cIL-2-Produktion des Klons A5 unter **serumfreien Kulturbedingungen** zeigten, dass ohne Serumzusatz keine effektive cIL-2-Produktion stattfand. Die serumfreien Ansätze produzierten hoch signifikant weniger cIL-2 als die serumhaltigen. Der Serumzusatz des Mediums enthält offensichtlich erforderliche Bestandteile wie etwa Aminosäuren, die zur Produktion von cIL-2 essentiell sind. Eine serumfreie Produktion von cIL-2 wäre zum Nachweis des cIL-2-Proteins beispielsweise im Western Blot wünschenswert. Erste orientierende Versuche haben nämlich gezeigt, dass cIL-2 an Serumalbumin bindet und so mit Hilfe dieses Nachweisverfahrens nicht sichtbar gemacht werden kann (Daten hier nicht gezeigt).

Eine graduelle Induzierbarkeit durch unterschiedliche Doxyzyklin-Konzentrationen (Gossen und Bujard, 1992) konnte nicht festgestellt werden. Während Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml nur eine schwache Induktion der cIL-2-Produktion hervorriefen, zeigten Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml und 5 µg/ml eine fast gleich starke Induktion der BHK-Zellen, was sich grafisch in Form einer Dosis-Wirkungskurve darstellte (Grafik 11).

Die von Gossen und Bujard (1992) erzielte hohe Induzierbarkeit des Tet-on-Systems konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden. Sie berichteten von einer um das Hunderttausendfache erhöhten Produktion der im Tet-on-System exprimierten Luciferase in humanen HeLa-Zellen. Li et al. (2004) erreichten in einer Knochenmarkszelllinie der Maus eine Produktion von murinem IL-2 von 1300 ng/d/1 x 10⁶ Zellen. Auch diese hohe Konzentration konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Möglicherweise verfügen BHK-Zellen bezüglich der cIL-2-Produktion über einen weniger effektiven Syntheseapparat als Knochenmarkszellen. Eine andere Zelllinie mit

integriertem Tet-on-System stand für die vorliegende Arbeit jedoch leider nicht zur Verfügung.

Insgesamt traten je nach BHK-Klon und Kulturbedingungen relativ deutliche Schwankungen in der produzierten Menge an cIL-2 auf. Mögliche Gründe könnten in unterschiedlichen Zellzahlen in der Ausgangszellsuspension oder in einem unterschiedlichen Wachstums- und Stoffwechselverhalten der einzelnen Klone liegen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier erzeugten Zelllinien in der Lage sind cIL-2 zu produzieren. Mit ihrer Hilfe können in weiteren Studien LAK *in vitro* produziert werden. Der Vorteil dieser transfizierten Zellen liegt in der kontinuierlichen Sekretion von cIL-2. Unter bisherigen Kulturbedingungen musste IL-2 zu bestimmten Zeitpunkten den Medien zugegeben werden, um isolierte NK-Zellen zu LAK zu stimulieren. Dies hatte starke Schwankungen der IL-2-Konzentration im Zellkulturmedium zur Folge, die nicht den Verhältnissen *in vivo* entsprechen. Eine Koinkubation von angereicherten NK-Zellen aus Tumorpatienten mit den hier transfizierten BHK-Zellen ermöglicht aufgrund der kontinuierlichen cIL-2-Produktion eine kontinuierliche Stimulation und damit eine kontinuierlicher Erzeugung von LAK. In weiteren Arbeiten sollen die Kulturbedingungen einer solchen Koinkubation in einem Bioreaktor untersucht werden (Falkenberg et al., 1995). Darin werden die cIL-2-produzierenden BHK-Zellen und NK-Zellen getrennt durch eine semipermeable Membran koinkubiert. Das cIL-2 kann jedoch aufgrund der Porengröße dieser Membran in das andere Kompartiment der NK-Zellen übertreten und hier die Stimulation zu LAK ermöglichen. Diese *in vitro* erzeugten LAK können dann in einer adoptiven Tumormimmuntherapie beim Hund eingesetzt werden.

Weiterhin könnte das so erzeugte cIL-2 über eine lokale Infusion kontinuierlich in Tumorgewebe oder nach chirurgischer Entfernung zur Verhinderung von Tumorrezidiven am Exzisionsort appliziert werden. Auch wäre der Einsatz des cIL-2-Plasmids im Rahmen einer Gentherapie bei Tumorpatienten denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Literaturteil gibt zunächst eine kurze Übersicht über die Möglichkeiten der Immuntherapie und der adoptiven Immuntherapie von Tumoren beim Menschen und beim Hund, wobei insbesondere auf eine Anwendung von Interleukin-2 (IL-2) und den Einsatz von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) eingegangen wird. Ziel dieser Arbeit war es nämlich, die mesenchymale Zelllinie BHK mit molekularbiologischen Methoden (Tet-on-System) so zu verändern, dass sie in der Lage ist, biologisch aktives IL-2 vom Hund (cIL-2) kontinuierlich zu produzieren. Dieses soll dann für eine adoptive Tumorummuntherapie beim Hund für die klinische Anwendung zur Verfügung gestellt werden.
2. Dazu wurde zunächst eine cDNA für cIL-2 aus mit Percoll[®] isolierten, Con A-stimulierten Hundeblymphozyten in einer RT-PCR gemäß der Publikation von Dunham et al. (1995) amplifiziert. Die Sequenzierung der gewonnenen cDNA ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Dunham et al., 1995).
3. Die Expression des cIL-2-Proteins sollte in BHK-Zellen durch das Tet-on-Expressionssystem gesteuert werden. Dazu musste die cIL-2-cDNA zusammen mit dem Reporter-gen Luciferase in das Response-Plasmid pTRUE eingebaut werden. Dies gelang, indem zunächst Schnittstellen für Restriktionsenzyme flankierend zum kodierenden Bereich in die cIL-2-cDNA eingebaut und durch Restriktionsenzymverdau Überhänge mit sogenannten „Sticky Ends“ produziert wurden. Die erneute Sequenzierung der cIL-2-Sequenz ergab wiederum eine totale Übereinstimmung zur von Dunham et al. (1995) publizierten Sequenz. Nachdem das Response-Plasmid pTRUE und das Luciferase-Gen ebenfalls mit Restriktionsenzymen geschnitten und so mit „Sticky Ends“ versehen worden waren, erfolgte der Zusammenbau dieser Elemente in einer Dreifachligation zu dem Response-Plasmid pTRUE-IL-2.

4. Anschließend wurde eine transiente Transfektion des Response-Plasmids pTRUE-IL-2 in BHK-Tet-on-Zellen durchgeführt und die Aktivität des Reportergens überprüft. Hierbei konnte nach der Induktion des Tet-on-Systems mit Doxzyklin eine um etwa das Tausendfache gesteigerte Aktivität der Luciferase gemessen werden.
5. Nach der stabilen Transfektion von pTRUE-IL-2 in BHK-Tet-on-Zellen wurden 12 Klone auf die Expression von Luciferase untersucht. 11 davon zeigten eine Induzierbarkeit mit Stimulationsindizes von 2,6 bis 46,8. Bei einer Klon-Linie (A11) wurde ein inverses Verhalten festgestellt. Sie wies induziert eine geringere Luciferase-Expression auf als im nicht induzierten Versuchsansatz. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt allerdings unklar. Weitere Luciferase-Assays auch von reklonierten BHK-Linien bestätigten die Induzierbarkeit des Tet-on-Systems nach der stabilen Transfektion. Die Existenz der mRNA für cIL-2 in den transfizierten BHK-Klonen wurde anschließend in einer RT-PCR nachgewiesen.
6. Weiterhin wurde überprüft, ob nicht-transfizierte, native BHK-Zellen eventuell Faktoren abgeben, die die Aktivität von Effektorzellen mit spontaner zytotoxischer Aktivität stimulieren oder blockieren. Dazu wurden Lymphozyten unter Anreicherung von NK-Zellen aus Hundeblood über einen 57,5 %igen Percoll[®]-Gradienten isoliert, in den Überständen von nativen BHK-Zellen inkubiert und ihre zytotoxische Aktivität in einem kolorimetrischen Farbstofftest, dem Rose Bengal Assay (RBA), gemessen. Durch die Behandlung mit diesen Überständen war keine Veränderung der zytotoxischen Aktivität nachweisbar.
7. Für den Nachweis der biologischen Aktivität des von den transfizierten BHK-Zellen sezernierten cIL-2 wurden Bioassays mit der IL-2-sensitiven Zelllinie CTLL-2 durchgeführt. Bei allen untersuchten BHK-Klonen war eine Produktion von biologisch aktivem cIL-2 nachweisbar. Die Menge des im induzierten Zustand sezernierten cIL-2 ließ sich jedoch schwer bestimmen, da die cIL-2-Produktion je nach Kulturbedingungen (Inkubationsdauer, Zellkonzentration der eingesetzten Klone) stark schwankte. Bei allen Klonen war eine basale cIL-2-Sekretion im nicht induzierten Zustand nachweisbar.

Unter serumfreien Bedingungen ließ sich die Produktion von cIL-2 durch die Zugabe von Doxyzyklin nicht induzieren. Unterschiedliche induzierende Doxyzyklin-Konzentrationen von 0,5 bis 5 µg/ml ergaben cIL-2-Konzentrationen, die den Verlauf einer Dosis-Wirkungskurve mit einem Optimum bei 1 µg/ml aufweisen. Mit der niedrigsten (0,1 µg/ml) und höchsten (10 µg/ml) untersuchten Doxyzyklin-Konzentration konnte hingegen jeweils eine nur schwache Induktion der cIL-2-Produktion erzielt werden.

8. Diese cIL-2 produzierenden BHK-Klone sollen im Rahmen der klinischen Anwendung für die *in vitro*-Stimulation von LAK-Zellen durch Koinkubation mit angereicherten NK-Zellen von Tumorpatienten in einem kommerziell erhältlichen Bioreaktorsystem eingesetzt werden, welches ursprünglich für die einfache Herstellung monoklonaler Antikörper konstruiert worden war. In einem solchen System können beide Zellarten durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt inkubiert werden. cIL-2 kann die Membran durchdringen und so eine kontinuierliche Stimulation zu LAK hervorrufen, während ein direkter Zell-Zell-Kontakt verhindert wird. Die IL-2-Gabe in Intervallen und die damit verbundene stark schwankende IL-2-Konzentration im Kulturmedium wie bei den bisherigen Kultursystemen wird dadurch vermieden. Die auf diese Weise erzeugten LAK sollen in einer adoptiven Tumormimmuntherapie beim Hund eingesetzt werden.

7 SUMMARY

1. The literature section gives a short overview on the possibilities of immunotherapy and adoptive immunotherapy of human and canine tumor-bearing patients with special emphasis on the application of interleukin-2 (IL-2) and lymphokine-activated killer cells (LAK).

It was the aim of this study to modify mesenchymal BHK cells by molecular biological means (tet-on expression system) so that these cells produce continuously biological active canine IL-2 (cIL-2). This cIL-2 will be provided for clinical application in an adoptive immunotherapy in tumor-bearing dogs.

2. For this purpose a cDNA for cIL-2 was amplified on basis of isolated and Con A-stimulated lymphocytes of a dog according to the publication of Dunham et al. (1995) who had published primers and conditions of an RT-PCR for cIL-2. The cDNA generated under these conditions revealed total conformity with the sequence described by Dunham et al. (1995).
3. The expression of the cIL-2-protein by BHK cells should be controlled by the Tet-on-expression system. So the cIL-2 cDNA and the reporter gene luciferase had to be integrated to the response plasmid pTRUE. This was achieved by creating cutting sites for restriction enzymes in the non-coding regions adjacent to the cIL-2 gene. Digestion with these restriction enzymes created sticky ends. Another verification of the cDNA sequence was performed which showed again complete conformity with the sequence published by Dunham et al. (1995). The response plasmid pTRUE and the reporter gene were also digested by restriction enzymes which created sticky ends. Then the three elements were ligated to form the response plasmid pTRUE-IL-2.
4. The response plasmid pTRUE-IL-2 was transiently transfected to BHK Tet-on cells which already contain the regulator plasmid pEF-Tet-on permanently integrated to their genome. The expression of the luciferase was tested in a luciferase assay. The induction of the tet-on system by doxycyclin showed an approximately thousand fold increase of the luciferase activity.

-
5. After the stable transfection of pTRUE-IL-2 to BHK Tet-on cells 12 clones were tested on their expression of luciferase. Out of these 11 clones revealed inducibility with stimulation indexes ranging from 2,6 to 46,8. One clone (A11) showed a reverse behaviour. In this clone luciferase expression after induction was lower than without induction. The underlying mechanism remains unclear. Additional luciferase assays of recloned BHK lines proofed the inducibility of the Tet-on system after stable transfection. Prior to the testing of the biological activity of the secreted cIL-2 the mRNA of cIL-2 was detected in transfected BHK cells by RT-PCR.
 6. Further a possible release of factors from native BHK cells influencing the activity of effector cells by stimulating or blocking their cytotoxic activity was also examined. For this lymphocytes enriched in NK cells were isolated from canine blood with a 57,5 % Percoll[®] gradient and exposed to the supernatants of native BHK cells. Afterwards their cytotoxic activity was measured by a colorimetric test, the Rose Bengal Assay (RBA). By treating with these supernatants no change in the cytotoxic activity could be demonstrated.
 7. To proof the biological activity of the secreted cIL-2 by transfected BHK cells bioassays with the IL-2-sensitive cell line CTLL-2 were performed. All tested BHK clones revealed production of biological active cIL-2. The total amount of secreted cIL-2 after induction was difficult to determine because of the variations in the cIL-2 production depending on culture conditions (incubation period, cell concentration). All clones under study showed a basal secretion of cIL-2 in not induced conditions. Without supplemented serum in the cell culture medium the cIL-2 could not be induced by doxycycline. Several doxycycline concentrations from 0,5 µg/ml to 5 µg/ml revealed cIL-2 concentrations exhibiting a dose-effect relationship with an optimum of 1 µg/ml. With the lowest (0,1 µg/ml) and the highest (10 µg/ml) tested doxycycline concentrations only a weak induction of cIL-2 production was achieved.

8. These created cIL-2 producing BHK clones are to be used in clinical applications for the stimulation of LAK cells *in vitro* by coincubation with enriched NK cells of tumor-bearing dogs in a commercially available bioreactor system which was originally designed for simple production of monoclonal antibodies. In this system both cell types can be coincubated separated by a semipermeable membrane. cIL-2 can pass the membrane and can generate a continuous stimulation of LAK without direct cell-to-cell-contact. This avoids an intermitting supplementation of IL-2 to the cell culture medium and thus variable IL-2 concentrations in the medium like in hitherto culture systems. LAK produced by this method are to be used in an adoptive tumor immunotherapy in dogs.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Albertini, M.R., Sosman, J.A., Hank, J.A., Moore, K.H., Borchert, A., Schell, K., Kohler, P.C., Bechhofer, R., Storer, B., Sondel, P.M.**, 1990, The influence of autologous lymphokine-activated killer cell infusions on the toxicity and antitumor effect of repetitive cycles of interleukin-2. *Cancer* 66, 2457-2464.
- Arruda, V.R., Fields, P.A., Milner, R., Wainwright, L., De Miguel, M.P., Donovan, P.J., Herzog, R.W., Nichols, T.C., Biegel, J.A., Razavi, M., Dake, M., Huff, D., Flake, A.W., Couto, L., Kay, M.A., High, K.A.**, 2001, Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther* 4, 586-592.
- Baltimore, D.**, 1970, RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Bazan, J.F.**, 1992, Unraveling the structure of IL-2. *Science* 257, 410-413.
- Beldegrun, A., Webb, D.E., Austin, H.A., 3rd, Steinberg, S.M., White, D.E., Linehan, W.M., Rosenberg, S.A.**, 1987, Effects of interleukin-2 on renal function in patients receiving immunotherapy for advanced cancer. *Ann Intern Med* 106, 817-822.
- Berens, C., Hillen, W.**, 2003, Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 270, 3109-3121.
- Bettex-Galland, M., Studer, U.E., Walz, A., Dewald, B., Baggiolini, M.**, 1991, Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 detection in human urine during acute bladder inflammation caused by transurethral resection of superficial cancer and bacillus Calmette-Guerin administration. *Eur Urol* 19, 171-175.
- Binkley, G.E.**, 1929, Radiation in the Treatment of Rectal Cancer. *Ann Surg* 90, 1000-1014.
- Birnboim, H.C., Doly, J.**, 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Boyce, N.**, 2001, Trial halted after gene shows up in semen. *Nature* 414, 677.
- Boyum, A.**, 1968, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77-89.

- Brittenden, J., Heys, S.D., Ross, J., Eremin, O.,** 1996, Natural killer cells and cancer. *Cancer* 77, 1226-1243.
- Brown, J.C., Hunt, R.C.,** 1978, Lectins. *Int Rev Cytol* 52, 277-349.
- Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., Chapuis, B.,** 1968, Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14, 181-196.
- Bubenik, J., Lotzova, E., Indrova, M., Simova, J., Jandlova, T., Bubenikova, D.,** 1992, Use of IL-2 gene transfer in local immunotherapy of cancer. *Cancer Lett* 62, 257-262.
- Burkhardt, E.,** 1975. Isolierung sowie licht- und elektronenmikroskopische Charakterisierung mononukleärer Blutleukozyten des Haushuhnes. *Vet. Med. Diss.* Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Cantrell, D.A., Smith, K.A.,** 1983, Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med* 158, 1895-1911.
- Cantrell, D.A., Smith, K.A.,** 1984, The interleukin-2 T-cell system: A new cell growth model. *Science* 224, 1312-1316.
- Cerruti-Sola, S., Kristensen, F., Vandevelde, M., de Weck, A.L.,** 1984, Interleukin 1- and 2-like activities in the dog. *Vet Immunol Immunopathol* 6, 261-271.
- Chomczynski, P., Sacchi, N.,** 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chong, Y.C., Duffus, W.P.H., Hannant, D.,** 1992, Natural killer cells in horses and specific-pathogen-free foals infected with equine herpesvirus. *Vet Immunol Immunopathol* 33, 103-113.
- Christiansen, N.P., Skubitz, K.M., Nath, K., Ochoa, A., Kennedy, B.J.,** 1988, Nephrotoxicity of continuous intravenous infusion of recombinant interleukin-2. *Am J Med* 84, 1072-1075.
- Coley, W.B.,** 1893, The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 105, 487-511.
- Coley, W.B.,** 1907, Sarcoma of the Long Bones: The Diagnosis, Treatment and Prognosis, with a Report of Sixty-Nine Cases. *Ann Surg* 45, 321-368.

-
- Cook, C.G., Splitter, G.A.**, 1988, Lytic function of bovine lymphokine-activated killer cells from a normal and a malignant catarrhal fever virus-infected animal. *Vet Immunol Immunopathol* 23, 103-112.
- Cornish, G.H., Sinclair, L.V., Cantrell, D.A.**, 2006, Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* 108, 600-608.
- Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Reviron, D., Gastaut, J.A., Pende, D., Olive, D., Moretta, A.**, 2002, Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3661-3667.
- Daemen, A.J., Buurman, W.A., vd Linden, C.J., Groenewegen, G., Kootstra, G.**, 1984, Canine IL-2: characterization and optimal conditions for production. *Vet Immunol Immunopathol* 5, 247-258.
- Davis, I.D., Jefford, M., Parente, P., Cebon, J.**, 2003, Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 73, 3-29.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y.S., Rice, C.M., Dubuisson, J.**, 1997, Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 71, 697-704.
- Den Otter, W., Balemans, L., Battermann, J.J., Bernsen, M.R., Cadee, J.A., Dobrowolski, Z., Everse, L.A., Fiszler-Maliszewska, L., Gavhumende, R., De Groot, J.W., De Groot, K., Hennink, W.E., Hill, F.W., Jurgenliemp-Schulz, I., Klein, W.R., Koten, J.W., Maas, R.A., Steerenberg, P., Stewart, R., Zembala, M.**, 1999, Local low-dose IL-2 therapy. *Hepatogastroenterology* 46 Suppl 1, 1280-1286.
- Denizot, F., Lang, R.**, 1986, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-277.
- Devos, R., Plaetinck, G., Cheroutre, H., Simons, G., Degrave, W., Tavernier, J., Remaut, E., Fiers, W.**, 1983, Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 11, 4307-4323.
- Dow, S., Elmslie, R., Kurzman, I., MacEwen, G., Pericle, F., Liggitt, D.**, 2005, Phase I study of liposome-DNA complexes encoding the interleukin-2 gene in dogs with osteosarcoma lung metastases. *Hum Gene Ther* 16, 937-946.

-
- Dow, S.W., Elmslie, R.E., Willson, A.P., Roche, L., Gorman, C., Potter, T.A.,** 1998, In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J Clin Invest* 101, 2406-2414.
- Dunham, S.P., Argyle, D.J., Onions, D.E.,** 1995, The isolation and sequence of canine interleukin-2. *DNA Seq* 5, 177-180.
- Dybkaer, K., Iqbal, J., Zhou, G., Geng, H., Xiao, L., Schmitz, A., d'Amore, F., Chan, W.C.,** 2007, Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways. *BMC Genomics* 8, 230.
- Faldyna, M., Leva, L., Knotigova, P., Toman, M.,** 2001, Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol* 82, 23-37.
- Falkenberg, F.W., Weichert, H., Krane, M., Bartels, I., Palme, M., Nagels, H.O., Fiebig, H.,** 1995, In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter. *J Immunol Methods* 179, 13-29.
- Funk, J.,** 2001. Quantitative Untersuchungen zur Zytotoxizität und Mitogenstimulation isolierter Blutleukozyten von Hunden mit unterschiedlichen Tumoren. *Vet. Med. Diss.* Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Funk, J., Schmitz, G., Bach, U., Failing, K., Burkhardt, E.,** 2003, Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. *Res Vet Sci* 74, 129-135.
- Funk, J., Schmitz, G., Failing, K., Burkhardt, E.,** 2005, Natural killer (NK) and lymphokine-activated killer (LAK) cell functions from healthy dogs and 29 dogs with a variety of spontaneous neoplasms. *Cancer Immunol Immunother* 54, 87-92.
- Gallardo, H.F., Tan, C., Sadelain, M.,** 1997, The internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus enables reliable coexpression of two transgenes in human primary T lymphocytes. *Gene Ther* 4, 1115-1119.
- Gastl, G., Finstad, C.L., Guarini, A., Bosl, G., Gilboa, E., Bander, N.H., Gansbacher, B.,** 1992, Retroviral vector-mediated lymphokine gene transfer into human renal cancer cells. *Cancer Res* 52, 6229-6236.
- Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W., Smith, K.A.,** 1978, T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 120, 2027-2032.

-
- Gillis, S., Mochizuki, D.Y., Conlon, P.J., Hefeneider, S.H., Ramthun, C.A., Gillis, A.E., Frank, M.B., Henney, C.S., Watson, J.D.**, 1982, Molecular characterization of interleukin 2. *Immunol Rev* 63, 167-209.
- Gillis, S., Watson, J.**, 1980, Functional activity and biochemical characterization of IL-2 produced by murine tumor cell lines. *Behring Inst. Mitt.* 67, 48-57.
- Gondolf, C.**, 1994. Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natural Killer (NK)- und Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)-Zellen aus dem peripheren Blut des Hundes. *Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen.*
- Gondolf, C., Burkhardt, E., Failing, K., Stitz, L.**, 1996, A new colorimetric method for measuring cell-mediated cytotoxicity in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 55, 11-22.
- Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., Dameshek, W., Goodman, J.J., Gilman, A., McLennan, M.T.**, 1946, Nitrogen mustard therapy: use of methylbis(B-chloroethyl)aminohydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc* 132, 126-132.
- Gossen, M., Bujard, H.**, 1992, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H.**, 1995, Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., Ricciardi-Castagnoli, P.**, 2001, Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2, 882-888.
- Greeley, E.H., Kealy, R.D., Ballam, J.M., Lawler, D.F., Segre, M.**, 1996, The influence of age on the canine immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 55, 1-10.
- Grone, A., Fonfara, S., Markus, S., Baumgartner, W.**, 1999, RT-PCR amplification of various canine cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes. *Zentralbl Veterinarmed B* 46, 301-310.
- Hanahan, D.**, 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K.**, 1989, Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119, 203-210.
- Harada, T., Kim, D.W., Sagawa, K., Suzuki, T., Takahashi, K., Saito, I., Matsuura, Y., Miyamura, T.**, 1995, Characterization of an established human hepatoma cell line constitutively expressing non-structural proteins of hepatitis C virus by transfection of viral cDNA. *J Gen Virol* 76 (Pt 5), 1215-1221.
- Helfand, S.C., Modiano, J.F., Nowell, P.C.**, 1992, Immunophysiological studies of interleukin-2 and canine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 33, 1-16.
- Helfand, S.C., Soergel, S.A., Modiano, J.F., Hank, J.A., Sondel, P.M.**, 1994, Induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in canine lymphocytes with low dose human recombinant interleukin-2 in vitro. *Cancer Biother* 9, 237-244.
- Heo, D.S., Park, J.G., Hata, K., Day, R., Herberman, R.B., Whiteside, T.L.**, 1990, Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Res* 50, 3681-3690.
- Huland, E., Heinzer, H., Huland, H.**, 1994, Inhaled interleukin-2 in combination with low-dose systemic interleukin-2 and interferon alpha in patients with pulmonary metastatic renal-cell carcinoma: effectiveness and toxicity of mainly local treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 120, 221-228.
- Huland, E., Huland, H., Heinzer, H.**, 1992, Interleukin-2 by inhalation: local therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 147, 344-348.
- Hussain, M.A., Lee, J., Miller, C.P., Habener, J.F.**, 1997, POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element. *Mol Cell Biol* 17, 7186-7194.
- Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T., Witmer-Pack, M., Steinman, R.M.**, 1990, Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* 6, 197-206.
- Inukai, T., Zhang, X., Goto, M., Hirose, K., Uno, K., Akahane, K., Nemoto, A., Goi, K., Sato, H., Takahashi, K., Honna, H., Kagami, K., Nakamoto, K., Yagita, H., Okumura, K., Koyama-Okazaki, T., Nakazawa, S., Sugita, K.**, 2006, Resistance of infant leukemia with MLL rearrangement to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a possible mechanism for poor sensitivity to antitumor immunity. *Leukemia* 20, 2119-2129.

-
- Jardine, J.H., Jackson, H.J., Lotzova, E., Savary, C.A., Small, S.M.**, 1989, Tumoricidal effect of interleukin-2-activated killer cells in canines. *Vet Immunol Immunopathol* 21, 153-160.
- Jovic, V., Konjevic, G., Radulovic, S., Jelic, S., Spuzic, I.**, 2001, Impaired perforin-dependent NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma. *Tumori* 87, 324-329.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R.**, 1986, Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kay, R.G., Sharpin, R.K., Brown, K.J., Voegtli, U.**, 1973, A method for the isolation of lymphocytes from dog blood. *Transplantation* 16, 250-252.
- Khanna, C., Anderson, P.M., Hasz, D.E., Katsanis, E., Neville, M., Klausner, J.S.**, 1997, Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer* 79, 1409-1421.
- Khanna, C., Hasz, D.E., Klausner, J.S., Anderson, P.M.**, 1996, Aerosol delivery of interleukin 2 liposomes is nontoxic and biologically effective: canine studies. *Clin Cancer Res* 2, 721-734.
- Knezevic, M., Hohenwarter, O., Grabherr, R., Blüml, G., Predl, R., Rükner, F., Schmatz, C., Filipic, B., Raspor, P., Katinger, H.**, 1995, Expression of recombinant human Interleukin-2 in Baby Hamster Kidney Cells and Cultivation on different Carriers, In: Beuvery, E.C., Griffiths, J.B., Zeijlemaker, W.P. (Hrsg.) *Animal Cell Technology: Developments towards the 21th Century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 771-775.
- Knezevic, M., Voraueer-Uhl, K., Hohenwarter, O., Steindl, F., Grabherr, R., Raspor, P.**, 1996, Human interleukin-2 (IL-2) expressed by transfected mammalian cells. *Pflugers Arch* 431, R227-228.
- Knuth, A., Wolfel, T., Klehmann, E., Boon, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H.**, 1989, Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2804-2808.
- Koehl, U., Sorensen, J., Esser, R., Zimmermann, S., Gruttner, H.P., Tonn, T., Seidl, C., Seifried, E., Klingebiel, T., Schwabe, D.**, 2004, IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 33, 261-266.

- Kozeny, G.A., Nicolas, J.D., Creekmore, S., Sticklin, L., Hano, J.E., Fisher, R.I., 1988,** Effects of interleukin-2 immunotherapy on renal function. *J Clin Oncol* 6, 1170-1176.
- Krakowka, S., Ringler, S.S., Lewis, M., Olsen, R.G., Axthelm, M.K., 1987,** Immunosuppression by canine distemper virus: modulation of in vitro immunoglobulin synthesis, interleukin release and prostaglandin E2 production. *Vet Immunol Immunopathol* 15, 181-201.
- Kristensen, F., Kristensen, B., Lazary, S., 1982,** The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet Immunol Immunopathol* 3, 203-277.
- Kuo, L.M., Robb, R.J., 1986,** Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. I. Localization of a receptor binding site on IL 2. *J Immunol* 137, 1538-1543.
- Lafreniere, R., Rosenberg, S.A., 1985,** Adoptive immunotherapy of murine hepatic metastases with lymphokine activated killer (LAK) cells and recombinant interleukin 2 (RIL 2) can mediate the regression of both immunogenic and nonimmunogenic sarcomas and an adenocarcinoma. *J Immunol* 135, 4273-4280.
- Lamm, D.L., Blumenstein, B.A., Crawford, E.D., Montie, J.E., Scardino, P., Grossman, H.B., Stanistic, T.H., Smith, J.A., Jr., Sullivan, J., Sarosdy, M.F., et al., 1991,** A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 325, 1205-1209.
- Li, A.L., Jiang, J.Y., Ma, J.B., Wang, G.M., Hao, J., Gao, X., Xie, S.S., 2004,** Bone marrow stromal cell line co-transfected with IL-2 and IL-3 genes can accelerate restoration of T-cell immunity in allo-BMT mice. *Chin Med J (Engl)* 117, 1223-1227.
- Lis, H., Sharon, N., 1973,** The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annu Rev Biochem* 42, 541-574.
- Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R.P., Grizzle, W.E., Zhang, H.G., 2006,** Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 176, 1375-1385.
- Macpherson, I., 1963,** Characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus. *J Natl Cancer Inst* 30, 795-815.
- Macpherson, I., Stoker, M., 1962,** Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16, 147-151.

-
- Margolin, K.A., Rayner, A.A., Hawkins, M.J., Atkins, M.B., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G.R., Doroshow, J.H., Jaffe, H.S., Roper, M., et al.**, 1989, Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy of solid tumors: analysis of toxicity and management guidelines. *J Clin Oncol* 7, 486-498.
- Martinez-Salas, E.**, 1999, Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 10, 458-464.
- Mercatello, A., Hadj-Aissa, A., Negrier, S., Allaouchiche, B., Coronel, B., Tognet, E., Bret, M., Favrot, M., Pozet, N., Moskovtchenko, J.F., et al.**, 1991, Acute renal failure with preserved renal plasma flow induced by cancer immunotherapy. *Kidney Int* 40, 309-314.
- Mitchell, D.H., Withrow, S.J., Johnston, M.R., Kruse, C.A.**, 1991, Cytotoxicity against autologous, allogeneic, and xenogeneic tumor targets by human recombinant interleukin-2-activated lymphocytes from healthy dogs and dogs with lung tumors. *Am J Vet Res* 52, 1132-1136.
- Mizel, S.B., Farrar, J.J.**, 1979, Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors. *Cell Immunol* 48, 433-436.
- Mizuno, S., Fujinaga, T., Kurosawa, T.**, 1996, Changes in lymphokine-activated killer activity in peripheral blood lymphocytes from canine transmissible venereal sarcoma models. *Exp Anim* 45, 289-292.
- Moore, A.S., Theilen, G.H., Newell, A.D., Madewell, B.R., Rudolf, A.R.**, 1991, Preclinical study of sequential tumor necrosis factor and interleukin 2 in the treatment of spontaneous canine neoplasms. *Cancer Res* 51, 233-238.
- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R.**, 1976, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.**, 1986, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., Fong, T.A.**, 1989, Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods* 116, 151-158.

- Muraguchi, A., Kehrl, J.H., Longo, D.L., Volkman, D.J., Smith, K.A., Fauci, A.S.,** 1985, Interleukin 2 receptors on human B cells. Implications for the role of interleukin 2 in human B cell function. *J Exp Med* 161, 181-197.
- Nelson, B.H., Willerford, D.M.,** 1998, Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70, 1-81.
- Niks, M., Otto, M., Busova, B., Stefanovic, J.,** 1990, Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *J Immunol Methods* 126, 263-271.
- Otter, W.D., Cadee, J., Gavhumende, R., De Groot, C.J., Hennink, W.E., Stewart, R.,** 1999, Effective cancer therapy with a single injection of interleukin-2 at the site of the tumour. *Cancer Immunol Immunother* 48, 419-420.
- Palmer, P.A., Vinke, J., Evers, P., Pourreau, C., Oskam, R., Roest, G., Vlems, F., Becker, L., Loriaux, E., Franks, C.R.,** 1992, Continuous infusion of recombinant interleukin-2 with or without autologous lymphokine activated killer cells for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 28A, 1038-1044.
- Papa, M.Z., Mule, J.J., Rosenberg, S.A.,** 1986, Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo: successful immunotherapy of established pulmonary metastases from weakly immunogenic and nonimmunogenic murine tumors of three distinct histological types. *Cancer Res* 46, 4973-4978.
- Pertoft, H., Hirtenstein, M., Kagedal, L.,** 1979, Cell separations in a new density medium, Percoll^R, In: Reid, E. (Hrsg.) *Cell populations, methodological surveys (B)* Biochemistry. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, S. 67-80.
- Quesada, J.R., Reuben, J., Manning, J.T., Hersh, E.M., Gutterman, J.U.,** 1984, Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 310, 15-18.
- Quintin-Colonna, F., Devauchelle, P., Fradelizi, D., Mourot, B., Faure, T., Kourilsky, P., Roth, C., Mehtali, M.,** 1996, Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 3, 1104-1112.
- Rai-el-Balhaa, G., Pellerin, J.L., Bodin, G., Abdullah, A., Hiron, H.,** 1985, Lymphoblastic transformation assay of sheep peripheral blood lymphocytes: a new rapid and easy-to-read technique. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 8, 311-318.

-
- Remy, J.S., Kichler, A., Mordvinov, V., Schuber, F., Behr, J.P.**, 1995, Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1744-1748.
- Rhoads, C.P.**, 1946, Nitrogen mustards in treatment of neoplastic disease. *J Am Med Assoc* 131, 656.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H.J., Tautz, N.**, 2001, A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol* 75, 9470-9482.
- Rochlitz, C.F., Jantscheff, P., Bongartz, G., Dietrich, P.Y., Quiquerez, A.L., Schatz, C., Mehtali, M., Courtney, M., Tartour, E., Dorval, T., Fridman, W.H., Herrmann, R.**, 1998, Gene therapy with cytokine-transfected xenogeneic cells in metastatic tumors. *Adv Exp Med Biol* 451, 531-537.
- Rosenberg, A.S., Mizuochi, T., Singer, A.**, 1986, Analysis of T-cell subsets in rejection of Kb mutant skin allografts differing at class I MHC. *Nature* 322, 829-831.
- Rosenberg, S.**, 1985, Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 75, 595-603.
- Rosenberg, S.A.**, 1991, Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res* 51, 5074s-5079s.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., et al.**, 1985, Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313, 1485-1492.
- Sambrook, J., Russel, D.**, 2001, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd Edition. Cold Spring Laboratory Press, S. 2-234.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.**, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sauve, K., Nachman, M., Spence, C., Bailon, P., Campbell, E., Tsien, W.H., Kondas, J.A., Hakimi, J., Ju, G.**, 1991, Localization in human interleukin 2 of the binding site to the alpha chain (p55) of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4636-4640.

-
- Schechter, D., Nagler, A.**, 1992, Recombinant interleukin-2 and recombinant interferon alpha immunotherapy cardiovascular toxicity. *Am Heart J* 123, 1736-1739.
- Schmitz, G.**, 2000. Qualitative und quantitative Untersuchungen der zytotoxischen Aktivität aus Hundeblood isolierter Leukozyten gegenüber verschiedener kaniner Tumorzelllinien. *Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen.*
- Schnell, M.J., Buonocore, L., Whitt, M.A., Rose, J.K.**, 1996, The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *J Virol* 70, 2318-2323.
- Schuettrumpf, J., Liu, J.H., Couto, L.B., Addya, K., Leonard, D.G., Zhen, Z., Sommer, J., Arruda, V.R.**, 2006, Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther* 13, 1064-1073.
- Siegel, J.P., Sharon, M., Smith, P.L., Leonard, W.J.**, 1987, The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 238, 75-78.
- Simmons, C.C.**, 1930, Cancer of the Buccal Mucosa: The Results of Treatment by Operation and Radiation. *Ann Surg* 92, 681-693.
- Sladowski, D., Steer, S.J., Clothier, R.H., Balls, M.**, 1993, An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 157, 203-207.
- Slater, T.F., Sawyer, B., Strauli, U.**, 1963, Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta* 77, 383-393.
- Smith, K.A., Cantrell, D.A.**, 1985, Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 864-868.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K.**, 1986, An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93, 157-165.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Hatakeyama, M., Kashima, N., Fuse, A., Hamuro, J., Nishi-Takaoka, C., Yamada, G.**, 1986, Molecular analysis of the interleukin-2 system. *Immunol Rev* 92, 121-133.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., Hamuro, J.**, 1983, Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302, 305-310.

-
- Taura, Y., Ishi, K., Nagami, M., Mikasa, N., Nakaichi, M., Nakama, S.,** 1995, Changes in lymphoproliferation and DTH responses after vaccination immediately before surgery in puppies. *J Vet Med Sci* 57, 899-904.
- Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C.,** 2005, Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* 92, 305-311.
- Temin, H.M., Mizutani, S.,** 1970, RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Textor, S.C., Margolin, K., Blayney, D., Carlson, J., Doroshow, J.,** 1987, Renal, volume, and hormonal changes during therapeutic administration of recombinant interleukin-2 in man. *Am J Med* 83, 1055-1061.
- Thamm, D.H., Kurzman, I.D., Macewen, E.G., Feinmehl, R., Towell, T.L., Longhofer, S.L., Johnson, C.M., Geoly, F.J., Stinchcomb, D.T.,** 2003, Intralesional lipid-complexed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors. *Cancer Immunol Immunother* 52, 473-480.
- Twentyman, P.R., Luscombe, M.,** 1987, A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 56, 279-285.
- von der Maase, H., Geertsens, P., Thatcher, N., Jasmin, C., Mercatello, A., Fossa, S.D., Symann, M., Stoter, G., Nagel, G., Israel, L., et al.,** 1991, Recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma--a European multicentre phase II study. *Eur J Cancer* 27, 1583-1589.
- Voss, S.D., Leary, T.P., Sondel, P.M., Robb, R.J.,** 1993, Identification of a direct interaction between interleukin 2 and the p64 interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2428-2432.
- Voss, S.D., Robb, R.J.,** 1994, Receptors for Interleukin-2 (IL-2), In: Nicola, N.A. (Hrsg.) *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*. Oxford University Press Inc., Oxford, S. 31-37.
- Wagner, U.,** 1998. Ermittlung optimaler Parameter für die in vitro-Stimulation von Hundeblymphozyten mit Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) zur Gewinnung von kaninem Interleukin 2 (IL-2) aus Zellkulturüberständen. *Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen*.

- Wagner, U., Burkhardt, E., Failing, K.**, 1999, Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol* 70, 151-159.
- Wang, X., Rickert, M., Garcia, K.C.**, 2005, Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science* 310, 1159-1163.
- Yachnin, S., Svenson, R.H.**, 1972, The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology* 22, 871-883.
- Yang, F., O'Brien, P.C., Milne, B.S., Graphodatsky, A.S., Solanky, N., Trifonov, V., Rens, W., Sargan, D., Ferguson-Smith, M.A.**, 1999, A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 62, 189-202.
- Yang, T.T., Sinai, P., Kitts, P.A., Kain, S.R.**, 1997, Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechniques* 23, 1110-1114.
- Yang, W.C., Schultz, R.D., Spano, J.S.**, 1987, Isolation and characterization of porcine natural killer (NK) cells. *Vet Immunol Immunopathol* 14, 345-356.
- Zabala, M., Wang, L., Hernandez-Alcoceba, R., Hillen, W., Qian, C., Prieto, J., Kramer, M.G.**, 2004, Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. *Cancer Res* 64, 2799-2804.
- Zhang, H.G., Kim, H., Liu, C., Yu, S., Wang, J., Grizzle, W.E., Kimberly, R.P., Barnes, S.**, 2007, Curcumin reverses breast tumor exosomes mediated immune suppression of NK cell tumor cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1116-1123.
- Zhang, Y.H., Liu, X.Y.**, 1994, Inhibition of lung metastases of mouse mammary tumor by aerosolized interleukin-2 in bacillus Calmette-Guerin primed mice. *Proc Am Assoc Cancer Res* 35, 519.

9 ANHANG

9.1 Tabellen

Tabelle 22: Spontane zytotoxische Aktivität von unbehandelten Effektorzellen bei Inkubation in **RPMI/FKS**

Effektorzellen + Zielzellen [OD]	Kontrollansatz ohne Effektorzellen [OD]	Errechnete Zytotoxizität [%]
0,156	0,261	
0,142	0,347	
0,136	0,303	
0,153	0,253	
0,105	0,297	
	0,302	
	0,376	
	0,308	
	0,288	
$\bar{x} = 0,138$ $s = 0,020$	$\bar{x} = 0,304$ $s = 0,038$	55

Tabelle 23: Spontane Zytotoxizität von unbehandelten Effektorzellen bei Inkubation in **BHK-Überständen**

Effektorzellen + Zielzellen [OD]	Kontrollansatz ohne Effektorzellen [OD]	Errechnete Zytotoxizität [%]
0,085	0,241	
0,094	0,188	
0,106	0,210	
0,120	0,305	
	0,236	
	0,181	
	0,243	
	0,215	
	0,154	
$\bar{x} = 0,101$ $s = 0,015$	$\bar{x} = 0,219$ $s = 0,044$	54

Tabelle 24: Spontane Zytotoxizität von vorbehandelten Effektorzellen

Effektorzellen in RPMI/FKS vorbehandelt + Zielzellen [OD]	Effektorzellen in BHK- Überständen vorbehandelt + Zielzellen [OD]
0,210	0,243
0,250	0,260
0,283	0,270
0,313	0,227
0,312	0,274
	0,310
$\bar{x} = 0,274$ $s = 0,044$	$\bar{x} = 0,264$ $s = 0,029$
Errechnete Zytotoxizität 10 %	Errechnete Zytotoxizität 0 %

Tabelle 25: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen verschiedener BHK-Linien in ng/ml; eingesetzte Zellkonzentration: $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml, Dauer der rcIL-2-Produktion: 24 h
Originalmesswerte siehe Tabelle 42

BHK-Linie		A5 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe A, Tabelle 34)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	0,180	0,059
	rcIL-2-Konzentration	0,181	0,131	0,181	0,131	0,276		
induziert	OD	0,062	0,056	0,050	0,055	0,040	3,847	0,594
	rcIL-2-Konzentration	4,554	4,077	3,661	3,990	2,951		
BHK-Linie		A5.1 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe B, Tabelle 35)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,004	0,000	0,001	0,001	0,000	0,504	0,487
	rcIL-2-Konzentration	1,103	0,000	0,707	0,707	0,000		
induziert	OD	0,029	0,039	0,034	0,027	0,026	2,186	0,135
	rcIL-2-Konzentration	2,139	2,382	2,265	2,086	2,058		
BHK-Linie		A5.2 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe B, Tabelle 35)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,004	0,002	-0,001	0,002	0,000	0,574	0,532
	rcIL-2-Konzentration	1,103	0,883	0,000	0,883	0,000		
induziert	OD	0,005	0,002	0,001	0,001	0,000	0,697	0,436
	rcIL-2-Konzentration	1,186	0,883	0,707	0,707	0,000		
BHK-Linie		A5.3 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe C, Tabelle 36)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,004	0,002	0,003	0,002	0,002	0,454	0,069
	rcIL-2-Konzentration	0,559	0,407	0,490	0,407	0,407		
induziert	OD	0,027	0,020	0,024	0,021	0,021	1,299	0,088
	rcIL-2-Konzentration	1,433	1,219	1,343	1,251	1,251		
BHK-Linie		A5.4 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe C, Tabelle 36)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,005	0,003	0,002	0,003	0,002	0,483	0,087
	rcIL-2-Konzentration	0,620	0,490	0,407	0,490	0,407		
induziert	OD	0,031	0,033	0,031	0,034	0,033	1,589	0,038
	rcIL-2-Konzentration	1,549	1,606	1,549	1,634	1,606		

Tabelle 26a: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen verschiedener BHK-Linien in ng/ml; eingesetzte Zellkonzentration: $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml, Dauer der rcIL-2-Produktion: 72 h
Originalmesswerte siehe Tabelle 43a-d

BHK-Linie		A5 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004		
	rcIL-2-Konzentration	3,402	3,402	3,402	3,402	3,016	3,325	0,173
induziert	OD	0,147	0,140	0,150	0,148	0,074		
	rcIL-2-Konzentration	18,888	18,004	19,326	19,062	11,683	17,393	3,230
BHK-Linie		A5.1 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,025	0,028	0,024	0,028	0,024		
	rcIL-2-Konzentration	7,021	7,319	6,869	7,394	6,862	7,093	0,250
induziert	OD	0,104	0,074	0,093	0,080	0,072		
	rcIL-2-Konzentration	14,302	11,640	13,296	12,158	11,468	12,573	1,202
BHK-Linie		A5.2 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,019	0,017	0,015	0,012	0,017		
	rcIL-2-Konzentration	6,222	5,940	5,711	5,237	5,945	5,811	0,368
induziert	OD	0,028	0,031	0,026	0,027	0,022		
	rcIL-2-Konzentration	7,335	7,664	7,165	7,272	6,621	7,211	0,379
BHK-Linie		A5.3 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	-0,002	-0,002	0,001	0,000	0,001		
	rcIL-2-Konzentration	0,000	0,000	1,015	0,000	1,015	0,406	0,556
induziert	OD	0,037	0,045	0,046	0,043	0,016		
	rcIL-2-Konzentration	8,290	9,070	9,209	8,880	5,797	8,249	1,415
BHK-Linie		A5.4 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,005	0,004	0,003	0,006	0,003		
	rcIL-2-Konzentration	3,714	3,250	2,729	3,756	2,854	3,261	0,474
induziert	OD	0,051	0,046	0,042	0,044	0,039		
	rcIL-2-Konzentration	9,624	9,210	8,784	8,961	8,493	9,015	0,430

Tabelle 26b: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen verschiedener BHK-Linien in ng/ml; eingesetzte Zellkonzentration: $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml, Dauer der rcIL-2-Produktion: 72 h
Originalmesswerte siehe Tabelle 43a-d

BHK-Linie		A5.5 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	-0,002	-0,002	0,000	-0,001	-0,001		
	rcIL-2-Konzentration	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
induziert	OD	0,005	0,007	0,007	0,008	0,006		
	rcIL-2-Konzentration	3,579	4,246	4,246	4,358	4,001	4,086	0,312
BHK-Linie		A5.6 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	-0,001	-0,001	-0,001	0,001	0,001		
	rcIL-2-Konzentration	0,000	0,000	0,000	2,030	2,030	0,812	1,112
induziert	OD	0,012	0,012	0,012	0,014	0,016		
	rcIL-2-Konzentration	5,233	5,149	5,149	5,480	5,797	5,362	0,279
BHK-Linie		A5.7 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,002	0,002	0,004	0,001		
	rcIL-2-Konzentration	2,551	2,636	2,333	3,138	1,318	2,395	0,671
induziert	OD	0,020	0,021	0,026	0,026	0,019		
	rcIL-2-Konzentration	6,426	6,557	7,105	7,107	6,222	6,684	0,404
BHK-Linie		A5.8 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002		
	rcIL-2-Konzentration	2,551	2,729	2,333	2,001	1,536	2,300	0,474
induziert	OD	0,023	0,018	0,023	0,018	0,018		
	rcIL-2-Konzentration	6,738	6,083	6,746	6,156	6,083	6,361	0,349
BHK-Linie		A5.9 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,007	0,007	0,008	0,008	0,005		
	rcIL-2-Konzentration	4,053	4,101	4,358	4,340	3,537	4,078	0,332
induziert	OD	0,039	0,040	0,042	0,041	0,038		
	rcIL-2-Konzentration	8,542	8,590	8,784	8,736	8,442	8,619	0,141

Tabelle 27: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen verschiedener BHK-Linien in ng/ml; eingesetzte Zellkonzentration: $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml, Dauer der rcIL-2-Produktion: 72 h
Originalmesswerte siehe Tabelle 44

BHK-Linie		A5 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,003	0,001	0,001	0,003	0,002	2,075	0,971
	rcIL-2-Konzentration	2,854	1,015	1,015	2,854	2,636		
induziert	OD	0,040	0,042	0,042	0,042	0,023	8,348	0,900
	rcIL-2-Konzentration	8,590	8,785	8,784	8,833	6,746		
BHK-Linie		A5.3 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,001	0,003	0,004	0,003	2,576	0,675
	rcIL-2-Konzentration	2,333	1,536	2,729	3,250	3,031		
induziert	OD	0,040	0,040	0,042	0,044	0,035	8,645	0,349
	rcIL-2-Konzentration	8,640	8,639	8,833	9,023	8,090		
BHK-Linie		A5.4 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe D, Tabelle 37)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,001	0,003	0,003	0,003	2,426	0,834
	rcIL-2-Konzentration	2,333	1,015	2,854	3,072	2,854		
induziert	OD	0,063	0,059	0,062	0,067	0,052	10,485	0,496
	rcIL-2-Konzentration	10,688	10,338	10,645	11,036	9,715		

Tabelle 28: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen 3 verschiedener BHK-Linien nach Koinkubation mit CTLL-2-Zellen in Transwell®-Einsätzen
eingesetzte Zellkonzentration: 3×10^4 Zellen/ml, Dauer der rcIL-2-Produktion: 72h
Originalmesswerte siehe Tabelle 45

BHK-Linie		A5 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe F, Tabelle 39)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,027	0,021	0,042	0,029	0,031		
	rcIL-2-Konzentration	2,208	2,064	2,495	2,242	2,295	2,261	0,157
induziert	OD	0,124	0,128	0,130	0,127	0,121		
	rcIL-2-Konzentration	3,744	3,809	3,834	3,793	3,696	3,775	0,055
BHK-Linie		A5.3 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe F, Tabelle 39)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,050	0,045	0,029	0,047	0,033		
	rcIL-2-Konzentration	2,631	2,548	2,242	2,590	2,336	2,469	0,171
induziert	OD	0,036	0,028	0,022	0,040	0,036		
	rcIL-2-Konzentration	2,385	2,231	2,076	2,469	2,385	2,309	0,156
BHK-Linie		A5.4 (rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe F, Tabelle 39)					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,033	0,042	0,046	0,026	0,044		
	rcIL-2-Konzentration	2,336	2,495	2,564	2,186	2,539	2,424	0,160
induziert	OD	0,070	0,091	0,078	0,086	0,086		
	rcIL-2-Konzentration	2,947	3,254	3,063	3,178	3,171	3,123	0,120

Tabelle 29: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen der BHK-Linie **A5** nach 24, 48 und 72 h
eingesetzte Zellkonzentration: **$1,5 \times 10^5$ Zellen/ml**
Originalmesswerte siehe Tabelle 46

		24 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,003	0,003	0,004	0,003	0,002	0,282	0,078
	rcIL-2-Konzentration	0,313	0,304	0,378	0,239	0,174		
induziert	OD	0,057	0,062	0,073	0,074	0,082	20,543	3,732
	rcIL-2-Konzentration	15,847	17,648	21,887	22,255	25,076		
		48 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,004	0,003	0,008	0,004	0,004	0,509	0,374
	rcIL-2-Konzentration	0,378	0,239	1,170	0,378	0,378		
induziert	OD	0,086	0,128	0,127	0,128	0,112	38,369	7,016
	rcIL-2-Konzentration	26,786	43,013	42,430	43,013	36,603		
		72 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,183	0,094
	rcIL-2-Konzentration	0,120	0,067	0,186	0,304	0,239		
induziert	OD	0,126	0,163	0,161	0,157	0,154	52,229	5,866
	rcIL-2-Konzentration	42,041	56,557	55,596	54,055	52,896		

rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünungsreihe E, Tabelle 38

Tabelle 30: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen der BHK-Linie **A5.1** nach 24, 48 und 72 h
eingesetzte Zellkonzentration: **$1,5 \times 10^5$ Zellen/ml**
Originalmesswerte siehe Tabelle 47

		24 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003	0,287	0,065
	rcIL-2-Konzentration	0,260	0,239	0,394	0,239	0,304		
induziert	OD	0,005	0,005	0,034	0,005	0,005	2,287	3,830
	rcIL-2-Konzentration	0,614	0,533	9,137	0,533	0,614		
		48 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,003	0,003	0,004	0,004	0,005	0,374	0,114
	rcIL-2-Konzentration	0,313	0,239	0,378	0,394	0,547		
induziert	OD	0,010	0,007	0,010	0,006	0,009	1,191	0,366
	rcIL-2-Konzentration	1,480	0,882	1,488	0,713	1,390		
		72 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,002	0,002	0,003	0,004	0,003	0,258	0,107
	rcIL-2-Konzentration	0,120	0,174	0,313	0,378	0,304		
induziert	OD	0,022	0,025	0,014	0,017	0,012	3,576	1,433
	rcIL-2-Konzentration	4,607	5,464	2,505	3,259	2,046		

rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe E, Tabelle 38

Tabelle 31: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen der BHK-Linie **A5.2** nach 24, 48 und 72 h
eingesetzte Zellkonzentration: **$1,5 \times 10^5$ Zellen/ml**
Originalmesswerte siehe Tabelle 48

		24 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,006	0,007	0,006	0,006	0,006	0,738	0,081
	rcIL-2-Konzentration	0,702	0,882	0,702	0,702	0,702		
induziert	OD	0,003	0,002	0,005	0,003	0,003	0,360	0,114
	rcIL-2-Konzentration	0,395	0,226	0,533	0,307	0,341		
		48 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,019	0,009	0,014	0,038	0,024	4,349	3,150
	rcIL-2-Konzentration	3,650	1,280	2,386	9,395	5,034		
induziert	OD	0,008	0,009	0,007	0,005	0,008	1,010	0,286
	rcIL-2-Konzentration	1,188	1,297	0,892	0,574	1,100		
		72 h					\bar{x}	s
uninduziert	OD	0,057	0,083	0,062	0,069	0,068	19,842	3,603
	rcIL-2-Konzentration	15,847	25,479	17,829	20,211	19,845		
induziert	OD	0,019	0,022	0,020	0,022	0,019	4,141	0,449
	rcIL-2-Konzentration	3,785	4,605	4,055	4,607	3,650		

rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünungsreihe E, Tabelle 38

Tabelle 32: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen zur Überprüfung der rcIL-2-Produktion unter serumfreien Bedingungen mit der BHK-Zelllinie A5
Originalmesswerte siehe Tabelle 49

Medium Phase 1	Medium Phase 2							\bar{x}	s
RPMI/FKS	RPMI	OD	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002		
		rcIL-2-Konzentration	2,104	2,104	3,424	3,981	3,651	3,053	0,888
RPMI/FKS + Doxyzyklin	RPMI	OD	0,002	0,001	0,000	0,003	0,002		
		rcIL-2-Konzentration	2,104	1,877	0,000	3,981	3,424	2,277	1,549
RPMI/FKS	RPMI + Doxyzyklin	OD	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002		
		rcIL-2-Konzentration	2,104	2,284	1,877	2,104	3,753	2,424	0,757
RPMI/FKS	RPMI/FKS	OD	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002		
		rcIL-2-Konzentration	1,877	3,424	3,424	3,753	3,424	3,180	0,743
RPMI/FKS + Doxyzyklin	RPMI/FKS	OD	0,007	0,008	0,008	0,007	0,007		
		rcIL-2-Konzentration	5,373	5,604	5,493	5,262	5,262	5,399	0,149
RPMI/FKS	RPMI/FKS + Doxyzyklin	OD	0,015	0,017	0,020	0,019	0,015		
		rcIL-2-Konzentration	6,766	7,143	7,497	7,359	6,835	7,120	0,319

rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünungsreihe G, Tabelle 40

Tabelle 33: Optische Dichten im MTT-Test und daraus berechnete produzierte rcIL-2-Mengen zur Überprüfung des verschiedener Doxzyklin-Konzentrationen auf die rcIL-2-Produktion der BHK-Zelllinie **A5.4**
Originalmesswerte siehe Tabelle 50

Doxzyklin-konzentration							\bar{x}	s
		0,1 µg/ml	OD	0,005	0,002	0,003	0,004	0,008
	rcIL-2-Konzentration	1,438	1,151	1,289	1,350	1,653	1,376	0,187
0,5 µg/ml	OD	0,021	0,024	0,019	0,021	0,019		
	rcIL-2-Konzentration	2,148	2,219	2,072	2,134	2,087	2,132	0,058
1,0 µg/ml	OD	0,021	0,025	0,022	0,024	0,022		
	rcIL-2-Konzentration	2,134	2,246	2,176	2,218	2,163	2,187	0,045
2,5 µg/ml	OD	0,022	0,018	0,020	0,020	0,020		
	rcIL-2-Konzentration	2,162	2,057	2,104	2,119	2,119	2,112	0,038
5,0 µg/ml	OD	0,017	0,018	0,017	0,017	0,016		
	rcIL-2-Konzentration	2,026	2,042	2,023	2,009	1,992	2,018	0,019
10,0 µg/ml	OD	0,005	0,003	0,001	0,004	0,003		
	rcIL-2-Konzentration	1,472	1,242	0,999	1,350	1,242	1,261	0,175

rcIL-2-Konzentration berechnet mit Standardverdünnungsreihe H, Tabelle 41

Tabelle 34: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe A zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen E_A , a_A und b_A

	OD			\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	0,007	0,011	0,008	0,009	0,006
0,4 ng/ml	0,011	0,016	0,011	0,013	0,010
0,8 ng/ml	0,014	0,019	0,013	0,015	0,012
1,6 ng/ml	0,026	0,024	0,029	0,026	0,023
3,13 ng/ml	0,045	0,048	0,053	0,049	0,046
6,25 ng/ml	0,087	0,072	0,106	0,088	0,085
12,5 ng/ml	0,104	0,111	0,141	0,119	0,116
25 ng/ml	0,228	0,231	0,218	0,226	0,223
50 ng/ml	0,196	0,231	0,251	0,226	0,223

E_A	0,277469
a_A	-3,115482
b_A	2,839958

Tabelle 35: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe **B** zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen **E_B**, **a_B** und **b_B**

	OD		\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	0,008	0,005	0,007	0,004
0,4 ng/ml	0,011	0,004	0,008	0,005
0,8 ng/ml	0,015	0,014	0,015	0,012
1,6 ng/ml	0,027	0,024	0,026	0,023
3,13 ng/ml	0,094	0,058	0,076	0,073
6,25 ng/ml	* ¹	* ¹	* ¹	* ¹
12,5 ng/ml	0,267	0,287	0,277	0,274
25 ng/ml	0,308	0,237	0,273	0,270
50 ng/ml	0,261	0,277	0,269	0,266

*¹ Messwerte nicht in nicht-lineare Regression mit einbezogen, da unplausible Werte

E _B	0,272983
a _B	-4,517160
b _B	7,230056

Tabelle 36: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe C zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen E_C , a_C und b_C

	OD					\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	0,004	0,005	<i>0,005</i>	0,004	<i>0,004</i>	0,004	0,001
0,4 ng/ml	0,008	0,008	0,008	<i>0,008</i>	<i>0,007</i>	0,008	0,005
0,8 ng/ml	0,011	0,012	0,011	<i>0,009</i>	<i>0,012</i>	0,011	0,008
1,6 ng/ml	<i>0,024</i>	0,033	0,040	<i>0,049</i>	0,031	0,035	0,032
3,13 ng/ml	<i>0,089</i>	<i>0,083</i>	0,083	0,086	0,084	0,084	0,081
6,25 ng/ml	0,133	0,131	<i>0,122</i>	0,124	<i>0,137</i>	0,129	0,126
12,5 ng/ml	0,127	0,138	0,133	<i>0,118</i>	<i>0,158</i>	0,133	0,130
25 ng/ml	0,143	0,138	<i>0,146</i>	0,138	<i>0,119</i>	0,140	0,137
50 ng/ml	<i>0,178</i>	0,147	0,174	0,137	<i>0,097</i>	0,153	0,150

kursiv: höchster und tiefster Wert im Rahmen des Winsorisiereus gestrichen

E_C	0,142027
a_C	-2,248974
b_C	5,122483

Tabelle 37: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe **D** zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen **E_D**, **a_D** und **b_D**

	OD					\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	0,005	0,007	<i>0,004</i>	0,005	<i>0,008</i>	0,005	* ¹
0,4 ng/ml	0,005	0,005	<i>0,005</i>	0,006	<i>0,007</i>	0,005	* ¹
0,8 ng/ml	<i>0,008</i>	<i>0,009</i>	0,009	0,008	0,008	0,008	* ¹
1,6 ng/ml	0,012	0,012	0,013	<i>0,012</i>	<i>0,021</i>	0,012	* ¹
3,13 ng/ml	0,019	0,019	<i>0,020</i>	0,019	<i>0,018</i>	0,019	* ¹
6,25 ng/ml	<i>0,057</i>	0,083	<i>0,089</i>	0,078	0,086	0,082	* ¹
12,5 ng/ml	* ²						
25 ng/ml	0,230	0,234	0,227	<i>0,238</i>	<i>0,207</i>	0,230	* ¹
50 ng/ml	0,220	<i>0,255</i>	0,229	0,239	<i>0,199</i>	0,229	* ¹

kursiv: höchster und tiefster Wert im Rahmen des Winsorisiereus gestrichen

*¹ Messwerte stellen bereits blankbereinigte Mittelwerte aus 2 Messungen dar.

*² Messwerte nicht in nicht-lineare Regression mit einbezogen, da unplausible Werte

E _D	0,235075
a _D	-5,496048
b _D	6,155274

Tabelle 38: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe **E** zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen **E_E**, **a_E** und **b_E**

	OD			\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	0,004	0,005	0,005	0,004	* ¹
0,4 ng/ml	0,007	0,008	0,009	0,008	* ¹
0,8 ng/ml	0,012	0,007	0,010	0,010	* ¹
1,6 ng/ml	0,020	0,015	0,019	0,018	* ¹
3,13 ng/ml	0,030	0,033	0,033	0,032	* ¹
6,25 ng/ml	0,048	0,051	0,048	0,049	* ¹
12,5 ng/ml	0,064	0,075	0,069	0,069	* ¹
25 ng/ml	0,141	0,168	0,151	0,153	* ¹
50 ng/ml	0,285	0,270	0,288	0,281	* ¹

*¹ Messwerte stellen bereits blankbereinigte Mittelwerte aus 2 Messungen dar.

p1	85,864461
p2	-1,664575
p3	-1,530299

Dabei gilt: $E = \frac{1}{p3}$; $a = \ln(p3) - \ln(p1)$; $b = -p2$.

Tabelle 39: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe **F** zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen **E_F**, **a_F** und **b_F**

	OD					\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	* ¹						
0,4 ng/ml	* ¹						
0,8 ng/ml	<i>0,007</i>	0,009	<i>0,012</i>	0,009	0,007	0,008	* ²
1,6 ng/ml	0,021	<i>0,023</i>	<i>0,018</i>	0,018	0,021	0,020	* ²
3,13 ng/ml	<i>0,095</i>	0,079	0,076	0,082	<i>0,072</i>	0,079	* ²
6,25 ng/ml	<i>0,231</i>	0,210	<i>0,196</i>	0,212	0,215	0,212	* ²
12,5 ng/ml	0,227	0,225	<i>0,247</i>	0,225	<i>0,224</i>	0,226	* ²
25 ng/ml	* ³						
50 ng/ml	<i>0,247</i>	0,226	0,235	0,212	<i>0,172</i>	0,224	* ²

kursiv: höchster und tiefster Wert im Rahmen des Winsorisiereus gestrichen

*¹ nicht durchgeführt

*² Messwerte stellen bereits blankbereinigte Mittelwerte aus 2 Messungen dar.

*³ Messwerte nicht in nicht-lineare Regression mit einbezogen, da unplausible Werte

E _F	0,227534
a _F	-5,288459
b _F	9,538830

Tabelle 40: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe **G** zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen **E_G**, **a_G** und **b_G**

	OD					\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	0,004	0,004	<i>0,003</i>	<i>0,006</i>	0,004	0,004	* ²
0,4 ng/ml	<i>0,002</i>	0,003	0,003	<i>0,004</i>	0,003	0,003	* ²
0,8 ng/ml	<i>0,003</i>	0,006	0,005	<i>0,007</i>	0,006	0,006	* ²
1,6 ng/ml	<i>0,007</i>	0,006	0,006	0,006	<i>0,005</i>	0,006	* ²
3,13 ng/ml	0,013	0,015	0,015	<i>0,016</i>	<i>0,011</i>	0,014	* ²
6,25 ng/ml	0,054	0,057	0,059	<i>0,062</i>	<i>0,052</i>	0,057	* ²
12,5 ng/ml	0,081	0,079	<i>0,084</i>	0,081	<i>0,066</i>	0,080	* ²
25 ng/ml	0,082	<i>0,074</i>	<i>0,094</i>	0,089	0,076	0,082	* ²
50 ng/ml	* ¹						

kursiv: höchster und tiefster Wert im Rahmen des Winsorisierens gestrichen

*¹ Messwerte nicht in nicht-lineare Regression mit einbezogen, da unplausible Werte

*² Messwerte stellen bereits blankbereinigte Mittelwerte aus 2 Messungen dar.

E _G	0,079556
a _G	-5,961589
b _G	8,426513

Tabelle 41: Optische Dichten im MTT-Test der rhIL-2-Standardverdünnungsreihe **F** zur Berechnung der produzierten rcIL-2-Menge, Mittelwerte, um den Blank-Wert bereinigte Mittelwerte sowie die nach nicht-linearer Regression erhaltenen Variablen **E_H**, **a_H** und **b_H**

	OD					\bar{x}	\bar{x} bereinigt
0,2 ng/ml	* ¹						
0,4 ng/ml	* ¹						
0,8 ng/ml	<i>0,005</i>	0,004	0,004	<i>0,002</i>	0,005	0,004	* ²
1,6 ng/ml	0,010	0,011	<i>0,014</i>	0,010	<i>0,006</i>	0,010	* ²
3,13 ng/ml	<i>0,065</i>	0,062	0,064	0,062	<i>0,059</i>	0,062	* ²
6,25 ng/ml	<i>0,140</i>	0,132	0,128	<i>0,119</i>	0,125	0,128	* ²
12,5 ng/ml	<i>0,140</i>	0,140	0,136	0,138	<i>0,129</i>	0,138	* ²
25 ng/ml	0,129	0,130	0,129	<i>0,142</i>	<i>0,124</i>	0,129	* ²
50 ng/ml	0,126	0,135	0,132	<i>0,136</i>	<i>0,098</i>	0,131	* ²

kursiv: höchster und tiefster Wert im Rahmen des Winsorisiereus gestrichen

*¹ nicht durchgeführt

*² Messwerte stellen bereits blankbereinigte Mittelwerte aus 2 Messungen dar.

E _H	0,133132
a _H	-4,877888
b _H	9,643550

Tabelle 42: Messwerte zu Tabelle 25

BHK-Linie		A5					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	
	OD 2. Messung	0,005	0,004	0,005	0,004	0,006	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	
induziert	OD 1. Messung	0,065	0,067	0,055	0,056	0,041	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,062	0,064	0,049	0,053	0,038	
	OD 2. Messung	0,065	0,050	0,051	0,059	0,045	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,062	0,047	0,048	0,056	0,042	
BHK-Linie		A5.1					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,007	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,000	0,001	0,001	0,000	
induziert	OD 1. Messung	0,032	0,042	0,037	0,030	0,029	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,029	0,039	0,034	0,027	0,026	
BHK-Linie		A5.2					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,007	0,005	0,002	0,005	0,003	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,002	-0,001	0,002	0,000	
induziert	OD 1. Messung	0,008	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,002	0,001	0,001	0,000	
BHK-Linie		A5.3					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,007	0,005	0,006	0,005	0,005	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,002	0,003	0,002	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,030	0,023	0,027	0,024	0,024	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,025	0,020	0,024	0,021	0,021	
BHK-Linie		A5.4					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,008	0,006	0,005	0,006	0,005	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,003	0,002	0,003	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,034	0,036	0,034	0,037	0,036	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,031	0,033	0,031	0,034	0,033	

Tabelle 43a: Messwerte zu Tabelle 26

BHK-Linie		A5					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,005	0,005	0,005	0,005	0,006	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,005	0,005	0,005	0,006	
	OD 2. Messung	0,006	0,006	0,006	0,006	0,004	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	
induziert	OD 1. Messung	0,152	0,140	0,148	0,150	0,075	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,152	0,140	0,148	0,150	0,075	
	OD 2. Messung	0,144	0,142	0,155	0,149	0,076	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,141	0,139	0,152	0,146	0,073	
BHK-Linie		A5.1					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,020	0,023	0,023	0,028	0,021	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,020	0,023	0,023	0,028	0,021	
	OD 2. Messung	0,033	0,035	0,027	0,031	0,029	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,030	0,032	0,024	0,028	0,026	
induziert	OD 1. Messung	0,112	0,074	0,097	0,081	0,071	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,112	0,074	0,097	0,081	0,071	
	OD 2. Messung	0,098	0,076	0,091	0,081	0,076	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,095	0,073	0,088	0,078	0,073	
BHK-Linie		A5.2					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,020	0,018	0,017	0,012	0,017	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,020	0,018	0,017	0,012	0,017	
	OD 2. Messung	0,020	0,018	0,016	0,015	0,019	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,017	0,015	0,013	0,012	0,016	
induziert	OD 1. Messung	0,029	0,028	0,025	0,024	0,021	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,029	0,028	0,025	0,024	0,021	
	OD 2. Messung	0,029	0,036	0,030	0,033	0,025	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,026	0,033	0,027	0,030	0,022	

Tabelle 43b: Messwerte zu Tabelle 26

BHK-Linie		A5.3					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,001	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,000	
	OD 2. Messung	0,003	0,003	0,005	0,004	0,005	0,004
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	-0,001	-0,001	0,001	0,000	0,001	
induziert	OD 1. Messung	0,042	0,047	0,051	0,047	0,018	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,039	0,044	0,048	0,044	0,015	
	OD 2. Messung	0,038	0,049	0,048	0,045	0,020	0,004
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,034	0,045	0,044	0,041	0,018	
BHK-Linie		A5.4					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,006	0,003	0,001	0,010	0,003	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,006	0,003	0,001	0,010	0,003	
	OD 2. Messung	0,007	0,007	0,007	0,005	0,005	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,051	0,047	0,043	0,050	0,039	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,051	0,047	0,043	0,050	0,039	
	OD 2. Messung	0,053	0,048	0,043	0,040	0,041	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,050	0,045	0,040	0,037	0,038	
BHK-Linie		A5.5					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,002	0,001	0,003	0,003	0,002	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	-0,001	-0,002	0,000	0,000	-0,001	
	OD 2. Messung	0,001	0,002	0,004	0,003	0,004	0,004
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	-0,003	-0,002	0,000	-0,001	0,000	
induziert	OD 1. Messung	0,008	0,010	0,010	0,011	0,009	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,007	0,007	0,008	0,006	
	OD 2. Messung	0,008	0,011	0,011	0,011	0,010	0,004
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,007	0,007	0,007	0,006	

Tabelle 43c: Messwerte zu Tabelle 26

BHK-Linie		A5.6					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,003	0,002	0,002	0,004	0,004	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,000	-0,001	-0,001	0,001	0,001	
	OD 2. Messung	0,003	0,004	0,004	0,005	0,004	0,004
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	
induziert	OD 1. Messung	0,016	0,015	0,014	0,018	0,019	0,003
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,013	0,012	0,011	0,014	0,015	
	OD 2. Messung	0,015	0,015	0,016	0,016	0,019	0,004
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,011	0,011	0,012	0,012	0,015	
BHK-Linie		A5.7					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,003	0,002	0,002	0,007	0,002	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,002	0,002	0,007	0,002	
	OD 2. Messung	0,004	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,001	0,002	0,001	0,002	0,000	
induziert	OD 1. Messung	0,019	0,021	0,027	0,026	0,020	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,019	0,021	0,027	0,026	0,020	
	OD 2. Messung	0,024	0,024	0,027	0,028	0,020	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,021	0,021	0,024	0,025	0,017	
BHK-Linie		A5.8					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,003	0,004	0,002	0,006	0,003	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,004	0,002	0,006	0,003	
	OD 2. Messung	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	
induziert	OD 1. Messung	0,025	0,019	0,023	0,019	0,019	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,025	0,019	0,023	0,019	0,019	
	OD 2. Messung	0,023	0,019	0,025	0,020	0,019	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,020	0,016	0,023	0,017	0,016	

Tabelle 43d: Messwerte zu Tabelle 26

BHK-Linie		A5.9					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,009	0,008	0,008	0,009	0,006	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,009	0,008	0,008	0,009	0,006	
	OD 2. Messung	0,007	0,008	0,010	0,009	0,006	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,005	0,007	0,006	0,003	
induziert	OD 1. Messung	0,040	0,041	0,043	0,042	0,040	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,040	0,041	0,043	0,042	0,040	
	OD 2. Messung	0,041	0,041	0,043	0,043	0,039	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,038	0,038	0,040	0,040	0,036	

Tabelle 44: Messwerte zu Tabelle 27

BHK-Linie		A5					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,003	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,001	0,001	0,002	0,001	
	OD 2. Messung	0,003	0,001	0,001	0,004	0,003	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,000	0,000	0,003	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,041	0,041	0,040	0,042	0,022	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,041	0,041	0,040	0,042	0,022	
	OD 2. Messung	0,039	0,043	0,044	0,043	0,024	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,038	0,042	0,043	0,043	0,025	
BHK-Linie		A5.3					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,002	0,003	0,004	0,004	0,004	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,003	0,004	0,004	0,004	
	OD 2. Messung	0,002	0,000	0,002	0,004	0,003	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,001	-0,001	0,001	0,003	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,040	0,041	0,041	0,043	0,034	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,040	0,041	0,041	0,043	0,034	
	OD 2. Messung	0,041	0,040	0,044	0,046	0,036	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,040	0,041	0,043	0,045	0,035	
BHK-Linie		A5.4					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,002	0,001	0,003	0,003	0,002	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,001	0,003	0,003	0,002	
	OD 2. Messung	0,002	0,001	0,003	0,004	0,004	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,001	0,000	0,001	0,003	0,003	
induziert	OD 1. Messung	0,064	0,059	0,061	0,068	0,051	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,064	0,059	0,061	0,068	0,051	
	OD 2. Messung	0,062	0,059	0,064	0,066	0,053	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,061	0,058	0,063	0,065	0,052	

Tabelle 45: Messwerte zu Tabelle 28

BHK-Linie		A5					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,025	0,020	0,043	0,029	0,032	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,025	0,020	0,043	0,029	0,032	
	OD 2. Messung	0,029	0,022	0,040	0,028	0,030	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,028	0,021	0,039	0,027	0,029	
induziert	OD 1. Messung	0,123	0,125	0,127	0,130	0,123	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,123	0,125	0,127	0,130	0,123	
	OD 2. Messung	0,125	0,131	0,132	0,124	0,119	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,124	0,130	0,131	0,123	0,118	
BHK-Linie		A5.3					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,047	0,045	0,027	0,049	0,033	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,047	0,045	0,027	0,049	0,033	
	OD 2. Messung	0,052	0,044	0,030	0,045	0,033	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,051	0,043	0,029	0,044	0,032	
induziert	OD 1. Messung	0,036	0,027	0,020	0,040	0,035	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,036	0,027	0,020	0,040	0,035	
	OD 2. Messung	0,035	0,029	0,023	0,040	0,036	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,034	0,028	0,022	0,039	0,035	
BHK-Linie		A5.4					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,033	0,041	0,048	0,026	0,043	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,033	0,041	0,048	0,026	0,043	
	OD 2. Messung	0,033	0,042	0,043	0,026	0,045	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,032	0,041	0,042	0,025	0,044	
induziert	OD 1. Messung	0,073	0,121	0,073	0,083	0,083	0,000
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,073	0,121	0,073	0,083	0,083	
	OD 2. Messung	0,067	0,061	0,083	0,089	0,088	0,001
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,066	0,060	0,082	0,088	0,087	

Tabelle 46: Messwerte zu Tabelle 29

		24 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	
	OD 2. Messung	0,004	0,004	0,003	0,003	0,002	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,004	0,003	0,003	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,056	0,061	0,077	0,074	0,081	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,055	0,060	0,076	0,073	0,080	
	OD 2. Messung	0,057	0,062	0,069	0,074	0,082	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,057	0,062	0,069	0,074	0,082	
		48 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,003	0,002	0,008	0,003	0,003	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,001	0,007	0,002	0,002	
	OD 2. Messung	0,004	0,003	0,008	0,004	0,004	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,003	0,008	0,004	0,004	
induziert	OD 1. Messung	0,089	0,133	0,133	0,132	0,111	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,088	0,132	0,132	0,131	0,110	
	OD 2. Messung	0,083	0,123	0,120	0,124	0,112	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,083	0,123	0,120	0,124	0,112	
		72 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,001	0,001	0,003	0,003	0,003	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	
	OD 2. Messung	0,002	0,001	0,001	0,003	0,002	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,001	0,001	0,003	0,002	
induziert	OD 1. Messung	0,128	0,160	0,163	0,161	0,160	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,127	0,159	0,162	0,160	0,159	
	OD 2. Messung	0,123	0,166	0,158	0,152	0,147	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,123	0,166	0,158	0,152	0,147	

Tabelle 47: Messwerte zu Tabelle 30

		24 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,001	0,002	0,005	0,002	0,003	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,000	0,001	0,004	0,001	0,002	
	OD 2. Messung	0,004	0,003	0,002	0,003	0,003	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,003	0,002	0,003	0,003	
induziert	OD 1. Messung	0,005	0,004	0,008	0,004	0,005	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,003	0,007	0,003	0,004	
	OD 2. Messung	0,005	0,005	0,060	0,005	0,005	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,005	0,060	0,005	0,005	
		48 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,002	0,002	0,003	0,002	0,003	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	
	OD 2. Messung	0,004	0,003	0,004	0,005	0,006	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,003	0,004	0,005	0,006	
induziert	OD 1. Messung	0,009	0,007	0,011	0,004	0,007	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,008	0,006	0,010	0,003	0,006	
	OD 2. Messung	0,010	0,006	0,008	0,007	0,011	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,010	0,006	0,008	0,007	0,011	
		72 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,001	0,002	0,004	0,003	0,003	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,000	0,001	0,003	0,002	0,002	
	OD 2. Messung	0,002	0,002	0,002	0,004	0,003	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,002	0,002	0,002	0,004	0,003	
induziert	OD 1. Messung	0,023	0,024	0,014	0,016	0,010	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,022	0,023	0,013	0,015	0,009	
	OD 2. Messung	0,021	0,026	0,014	0,018	0,014	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,021	0,026	0,014	0,018	0,014	

Tabelle 48: Messwerte zu Tabelle 31

		24 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,005	0,006	0,006	0,005	0,006	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,005	0,005	0,004	0,005	
	OD 2. Messung	0,006	0,007	0,005	0,006	0,005	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,006	0,007	0,005	0,006	0,005	
induziert	OD 1. Messung	0,000	-0,001	0,004	0,000	0,001	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	-0,001	-0,002	0,003	-0,001	0,000	
	OD 2. Messung	0,006	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,006	0,004	0,005	0,005	0,005	
		48 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,018	0,007	0,013	0,030	0,025	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,017	0,006	0,012	0,029	0,024	
	OD 2. Messung	0,019	0,010	0,014	0,045	0,022	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,019	0,010	0,014	0,045	0,022	
induziert	OD 1. Messung	0,006	0,006	0,005	0,002	0,005	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,005	0,004	0,001	0,004	
	OD 2. Messung	0,010	0,011	0,008	0,007	0,010	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,010	0,011	0,008	0,007	0,010	
		72 h					Leerwert
uninduziert	OD 1. Messung	0,056	0,092	0,061	0,068	0,070	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,055	0,091	0,060	0,067	0,069	
	OD 2. Messung	0,057	0,073	0,063	0,069	0,065	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,057	0,073	0,063	0,069	0,065	
induziert	OD 1. Messung	0,020	0,022	0,021	0,023	0,018	0,001
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,019	0,021	0,020	0,022	0,017	
	OD 2. Messung	0,018	0,022	0,019	0,021	0,019	0,000
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,018	0,022	0,019	0,021	0,019	

Tabelle 49: Messwerte zu Tabelle 32

Medium Phase 1	Medium Phase 2							Leerwert
RPMI/FKS	RPMI	OD 1. Messung	0,003	0,003	0,002	0,003	0,001	0,000
		OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,003	0,002	0,003	0,001	
		OD 2. Messung	0,002	0,002	0,003	0,004	0,005	0,002
		OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,000	0,000	0,001	0,002	0,003	
RPMI/FKS + Doxyzyklin	RPMI	OD 1. Messung	0,003	0,002	0,000	0,003	0,002	0,000
		OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,002	0,000	0,003	0,002	
		OD 2. Messung	0,001	0,001	0,002	0,004	0,003	0,002
		OD 2. Messung leerwertbereinigt	-0,001	-0,001	0,000	0,002	0,001	
RPMI/FKS	RPMI + Doxyzyklin	OD 1. Messung	0,003	0,004	0,002	0,003	0,002	0,000
		OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,003	0,004	0,002	0,003	0,002	
		OD 2. Messung	0,001	0,001	0,002	0,002	0,004	0,002
		OD 2. Messung leerwertbereinigt	-0,001	-0,001	0,000	0,000	0,002	
RPMI/FKS	RPMI/FKS	OD 1. Messung	0,000	0,002	0,002	0,002	0,001	0,000
		OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,000	0,002	0,002	0,002	0,001	
		OD 2. Messung	0,001	0,001	0,002	0,004	0,003	0,002
		OD 2. Messung leerwertbereinigt	-0,001	-0,001	0,000	0,002	0,001	
RPMI/FKS + Doxyzyklin	RPMI/FKS	OD 1. Messung	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	0,000
		OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	
		OD 2. Messung	0,008	0,010	0,009	0,008	0,008	0,002
		OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,006	0,008	0,007	0,006	0,006	
RPMI/FKS	RPMI/FKS + Doxyzyklin	OD 1. Messung	0,014	0,017	0,021	0,018	0,017	0,000
		OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,014	0,017	0,021	0,018	0,017	
		OD 2. Messung	0,017	0,019	0,020	0,021	0,015	0,002
		OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,015	0,017	0,018	0,019	0,013	

Tabelle 50: Messwerte zu Tabelle 33

Doxyzyklin- konzentration							Leerwert
0,1 µg/ml	OD 1. Messung	0,007	0,005	0,006	0,006	0,012	0,002
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,005	0,003	0,004	0,004	0,010	
	OD 2. Messung	0,007	0,004	0,005	0,006	0,009	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,001	0,002	0,003	0,006	
0,5 µg/ml	OD 1. Messung	0,023	0,025	0,022	0,022	0,019	0,002
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,021	0,023	0,020	0,020	0,017	
	OD 2. Messung	0,024	0,027	0,020	0,024	0,024	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,021	0,024	0,017	0,021	0,021	
1,0 µg/ml	OD 1. Messung	0,023	0,027	0,022	0,024	0,023	0,002
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,021	0,025	0,020	0,022	0,021	
	OD 2. Messung	0,023	0,027	0,027	0,028	0,025	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,020	0,024	0,024	0,025	0,022	
2,5 µg/ml	OD 1. Messung	0,025	0,021	0,022	0,023	0,023	0,002
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,023	0,019	0,020	0,021	0,021	
	OD 2. Messung	0,023	0,020	0,022	0,022	0,022	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,020	0,017	0,019	0,019	0,019	
5,0 µg/ml	OD 1. Messung	0,019	0,019	0,017	0,018	0,018	0,002
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,017	0,017	0,015	0,016	0,016	
	OD 2. Messung	0,020	0,021	0,022	0,020	0,019	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,017	0,018	0,019	0,017	0,016	
10,0 µg/ml	OD 1. Messung	0,008	0,005	0,003	0,006	0,004	0,002
	OD 1. Messung leerwertbereinigt	0,006	0,003	0,001	0,004	0,002	
	OD 2. Messung	0,007	0,005	0,004	0,006	0,006	0,003
	OD 2. Messung leerwertbereinigt	0,004	0,002	0,001	0,003	0,003	

9.2 Bezugsquellen für Chemikalien

ABgene, Hamburg

Superladder-Low 100bp Ladder, SSL-100S
Typ II Sample Loading Buffer 6X, AB-0584

Alexis Biochemicals, Grünberg

Doxyzyklin, LKT-D5898
PAC, Puromycin, ALX-380-028

Amersham Biosciences GmbH, Freiburg

Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit with 7-Deaza-dGTPTM, 78500

Applied Biosystems GmbH, Darmstadt

GeneAmp RNA PCR Core Kit, N8080143

Biochrom KG, Berlin

Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml bzw. 10 000 µg/ml), A 2212

Biontex Laboratories GmbH, Martinsried

Metafectene, T020

BioRad Laboratories GmbH, München

Bromphenolblau, 1610404

Biozym, Hessisch Oldendorf

Small DNA Agarose

Calbiochem, Darmstadt

G418-Sulfat, 345812

Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

Agar-Agar, 2266
Ampicillin, K029
Borsäure, 6943
Chloroform, 6340
Ethanol, 5054
Ethidiumbromid, 7870
Formamid, P040
Hydroxycholin, 3406
Isopropanol, CP41
Kaliumacetat, T874
Lithiumchlorid, P007
NaOH, 9356
Roti-Phenol, 0038
Roti-Phenol[®]-Chloroform-Isoamylalkohol, A156
Tris, A411
Tris-HCl, 9090
Trypanblau, 23850
X-Gal, CN22

Fluka, Buchs, Schweiz

Ethanol, 41322
Orange-G, 75380

ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA

Minimum Essential Medium Eagle's mit Earl's Salzen, 12103
Trypsin-EDTA, 1689149

Invitrogen, Karlsruhe

Agarose 1000, 10975-035
Agarose ultraPURE[®], 15510
DMEM-Pulver, 52100
1 kb-DNA-Leiter, 15615
SuperScript II RT, 18064
TOPO TA Cloning[®]-Kit, K 4600
TRIzol[®] Reagenz, 15596

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

NucleoBond[®] PC100 Plasmid-DNA Purification-Kit, 740753

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

EcoRI, ER0271
Puffer O+ 10X, BO5
ScaI, ER0431

Merck KGaA, Darmstadt

EDTA, 324503
Harnstoff, 108488

Millipore, Billerica, USA

50X Modified TAE Buffer, LSKMTAE50
UltrafreeDA[®], 42600

National Diagnostics, Atlanta, USA

Sequagel[®] XR, EC-842

NatuTec GmbH, Frankfurt

Biotherm TaqPolymerase, GC-002

NEB GmbH, Frankfurt

BSA, B9001
Buffer 1, B7001
Buffer 3, B7003
Buffer 4, B7004
FspI, R0135
HindIII, R0104
KpnI, R0142
MluI, R0198
PstI, R0140

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Fetales Kälberserum (FKS), A 15-042
RPMI 1640

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

Percoll, steril, 17-0891-01

Promega, Madison, USA

Luciferase Assay System, E1500
pGEM-T-Vektor-System, A3600
Rapid Ligation Buffer 2X, C6711
RNasin RNase-Inhibitor, N211

Qiagen GmbH, Hilden

RNase-free DNase-Set, 7254
RNeasy[®] Mini Kit, 7410
QIAshredder[®]-Säule, 7965

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Alkalische Phosphatase (CIP) 713023
DNase I, RNase-frei, 4716728
dNTPs, 1969064
Interleukin-2 human, rekombinant, 1147528
RNase A, 109142

Serva, Heidelberg

DMSO, 20385
DTT (Dithiothreitol), 39759

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ampicillin, A9393
Concanavalin A (Con A), C5275
Glycerin, G2289
 β -Mercaptoethanol, M3148
MTT, Thiazolylblau, M2128
Penicillin-Streptomycin, P4333
Rose Bengal, R3877
TEMED, T9281
Trypsin, T1426

TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

T4-DNA-Ligase, 2011

9.3 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Bayer Diagnostics, München

Advia[®] 120 Hematology System

Biometra

Spannungsquellen (Agarosegelelektrophorese)

Biozym, Hessisch Oldendorf

PCR-Thermocycler Multicycler PTC 200
Pipettenspitzen

Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

2 ml-Kryoröhrchen
Rotilabo[®]-Spritzenfilter 0,45 µm, P667
Rotiprotect[®] Latex-Handschuhe
Rotiprotect[®] Nitril-Handschuhe

Consort, Belgien

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

Costar, Cambridge, USA

Transwell[®]-Einsätze, 6,5 mm

Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

Gewebekulturflaschen 25 cm², 3103-025

Eppendorf AG, Hamburg

Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)

Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

18 G Kanülen
6-Loch-Flachbodenplatte
48-Loch-Flachbodenplatte
96-Loch-Flachbodenplatte
Zellkulturschalen Ø 10 cm
15 ml-Zentrifugenröhrchen (Plastik)

Flow Laboratories, Schweiz

Titertek[®] Microplate Washer S8/S12
Titertek[®] Multiskan Plus (ELISA-Photometer)

Forma Scientific Inc., Marietta, USA

Brutschrank Steri-Cult 200

Gilson International, Bad Camberg

Pipetten

Heraeus, Hanau

Biofuge fresco Tischzentrifuge
Biofuge Pico Tischzentrifuge
Biofuge primo Tischzentrifuge
CO₂-Brutschrank UB 6060 EK- CO₂

Hettich, Tuttlingen

Hettich Rotanda/K Kühlzentrifuge 3512

ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

Computerprogramm EIA, Version 3.10

Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Sterilwerkbank Holten Laminar Air Flow, Safe 2000

Li-Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg

LI-COR 4000 L™ DNA-Sequencer

Molecular Devices, Sunnyvale, USA

L Max Microplate Luminometer

MWG, Ebersberg

GelPrint 2000i

Nalgene Labware, Hereford, England

Freezing Container „Mr. Frosty“

Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg

Photometer Gene Quant II DNA/RNA Calculator

Sarstedt, NümbrechtNH₄-Heparinröhrchen**Techne, Staffordshire, England**

Thermocycler Cycler TC-312

Werkstatt des MZI, JLU Giessen

Elektrophoresekammern

Absaugeinrichtung

9.4 Lösungen und Puffer

Ethanol-PBS 50 % (v/v)

Ethanol und NaCl-PBS zu gleichen Teilen mischen

Ethidiumbromid

0,2 g Ethidiumbromid (MW 394,3)
ad 20 ml H₂O bidest.
gut schütteln, im Kühlschrank lichtgeschützt lagern

LB-Agar

10 g Tryptone
5 g Hefenextrakt
10 g NaCl
15 g Agar
950 ml H₂O bidest.
pH mit NaOH auf 7,0 einstellen
ad 1000 ml H₂O bidest.
autoklavieren und abkühlen lassen
100 µg/ml Ampicillin hinzufügen und in sterile Petrischalen gießen
im Kühlschrank aufbewahren

LB-Medium

10,0 g Tryptone
5,0 g Hefenextrakt
10,0 g NaCl
950 ml H₂O bidest.
pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen
ad 1000 ml H₂O bidest.
autoklavieren, im Kühlschrank aufbewahren

NaCl-Lösung, 1,5 M

87,66 g NaCl
ad 1000 ml H₂O dest.

NaCl-PBS, pH 7,4

1,42 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,2 g KH₂PO₄
8,0 g NaCl
0,2 g KCl
ad 1000 ml H₂O dest.
pH mit 1 N HCl einstellen

Phosphate-buffered Saline (PBS), pH7,4

21,76 g NaCl krist.
3,592 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O p.a.
0,544 g KH₂PO₄ p.a.
420 ml H₂O dest.

Rose Bengal Gebrauchslösung 0,25 %

0,25 g Rose Bengal
ad 100 ml NaCl-PBS
mischen, im Kühlschrank aufbewahren

10X Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE)

108,0 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (0,9 M)
55,0 g Borsäure (0,9 M)
40 ml EDTA (pH 8,0)
ad 1000 ml H₂O dest., autoklavieren

Trypanblaulösung 0,36 %

360 mg Trypanblau

ad 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung, filtrieren

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Mein ganz besonderer Dank gilt *Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt* für seine jederzeit gewährte Unterstützung, seine guten Ideen und seine Geduld.

Weiterhin bedanke ich mich bei

Prof. Dr. Manfred Reinacher für die freundliche Aufnahme an seinem Institut.

Prof. Dr. Norbert Tautz, der mir die Möglichkeit gab, das Tet-on-System zu nutzen, und seiner Arbeitsgruppe, *Dr. Alexandra Müller*, *Dr. Tobias Lackner* und *Sylvaine Jacobi*, für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung meiner Plasmide.

Dr. Werner Hecht für die Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten.

Prof. Dr. Reto Neiger und seinen Mitarbeitern an der Klinik für Kleintiere, Abteilung Innere Medizin, für die Überlassung der Blutspendehunde und der Unterstützung bei der Blutentnahme und Auswertung der Lymphozytenanreicherung.

Dr. Klaus Failing und seinen Mitarbeitern für die Hilfe bei der Auswertung meiner Daten.

dem Graduiertenkolleg 455, Prof. Dr. Ernst Petzinger, Prof. Dr. Rolf Bauerfeind und Frau Jana Heber für die finanzielle Förderung und die Enthüllung molekularbiologischer Geheimnisse.

Dr. Robert Kreutzer und *Dr. Susanne Borst*, die mich bei meinen ersten Schritten auf meinem langen Weg an die Hand genommen haben. Dank auch an meine Vorgänger in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhardt für die Grundlagen dieser Arbeit und an *Vladimir Kocoski* für seine Hilfe und die nette Zusammenarbeit.

allen Mitarbeitern und Doktoranden am Institut für Veterinär-Pathologie, mit denen ich in den letzten Jahren zusammenarbeiten durfte, für die schöne, unvergessliche Zeit.

Bianca, Jens, Christl, Nina, Inka, Denis, Estelle, Manfred und allen anderen ausserhalb des Instituts dafür, dass Ihr mich auf andere Gedanken gebracht und immer an mich geglaubt habt.

und *meinen Eltern*, ohne die ich es nicht geschafft hätte.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5346-X



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 3 4 6 8 ©