Antivirale Cytokine in der frühen Phase der Woodchuck Hepatitis Virus Infektion

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität GH Essen

vorgelegt von

Beate Lohrengel

aus Bochum

Dezember 1999

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung:

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Michael Roggendorf für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Betreuung und ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dr. Arne Botta, Herrn Dr. Felix Siegel, Frau Dr. Katharina Haupt, Herrn Dr. Kay Rispeter, Herrn Dipl. Biol. Olliver Schildgen und Frau Sabine Lohrengel für viele fachliche Diskussionen, für praktische Hilfen, für die kritische Durchsicht des Manuskripts und vor allem für die freundschaftliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Virologischen Instituts -insbesondere Frau Dr. Melanie Fiedler, Herrn Prof. Dr. Viazov, Herrn Dr. Massanori Isogawa, Herrn Dr. Stefan Roß, Frau Thekla Kemper und Herrn Martin Kampmann- für die freundschaftliche Atmosphäre, viele hilfreiche Diskussionen und praktische Hilfen.

1 I Einleitung 9
1.1 Die Hepadnaviren 9
1.1.1 Morphologie 10
1.1.2 Genomorganisation 11
1.1.3 Replikation 12
1.1.4 Transkription 15
1.1.5 Virale Strukturproteine 16
1.1.5.1 Die Hüllproteine 16
1.1.5.2 Das Core Protein/e-Antigen 17
1.1.5.3 Die Polymerase 17
1.1.5.4 Das X-Genprodukt 17
1.2 Die Infektion mit HBV 18
1.2.1 Pathogenese 18
1.2.1.1 Akute Infektion 18
1.2.1.2 Chronische Infektion 18
1.3 Das Woodchuck Hepatitis Virus 19
1.3.1 Das Tiermodell 19
1.3.2 Natürliche und experimentelle WHV-Infektion 19
1.4 Cytokine als Mediatoren des Immunsystems 21
1.4.1 Cytokine allgemein 21
1.4.1.1 Cytokinfamilien 21
1.4.1.2 Kontrolle der Cytokinsynthese 23
1.4.1.3 T-Lymphozyten und Cytokine 26
1.4.2 Cytokine als antivirale Agentien 27
1.4.2.1 Das transgene Maus Modell 28
1.4.3 Struktur einzelner Cytokine 29
1.4.3.1 TNF-α 29
1.4.3.2 IFN-γ und sein Rezeptor IFN-γR 30
1.4.3.3 IFN-α und IFN-β 30
1.4.3.4 IL-6 31
1.4.3.5 IL-15 31
2 Aufgabenstellung 32
2.1 Klonierung von Woodchuck cDNAs: TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-15, IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8 32
2.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine 33
2.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen 33
2.4 *In vivo* Neutralisation von TNF-α und IFN-γ 34
3 Material und Methoden 35
3.1 Material 35
3.1.1 Chemikalien und Enzyme 35
3.1.2 Kit-Systeme 36
3.1.3 Chromatographie 37
3.1.3.1 Reagenzien 37
3.1.3.2 Säulen 37
3.1.3.3 Papier 37
3.1.4 Plastikwaren 37
3.1.5 Geräte 37
3.1.6 Lösungen 38
3.1.7 Nährmedien 38
3.1.8 Biologische Materialien 39
3.1.8.1 Woodchuck Seren 39
3.1.8.2 Bakterien 39
3.1.8.3 Eukaryontische Zellen 39
3.1.8.4 Vektoren 40
3.2 Methoden 41
3.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren 41
3.2.1.1 Plasmidisolierung 41
3.2.1.2 Extraktion von RNA aus Gewebe oder Zellen 41
3.2.1.3 Restriktion von DNA 41
3.2.1.4 Reverse Transkription 41

3.2.1.5 Polymerase Ketten Reaktion 41
3.2.1.6 Klonierung von DNA 44
3.2.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien 45
3.2.1.8 Agarose Gelelektrophorese 45
3.2.1.9 Extraktion von DNA aus Agarose Gelen 45
3.2.1.10 DNA Sequenzierung 45
3.2.1.11 Radioaktive Markierung von DNA 45
3.2.1.12 DNA-DNA-Hybridisierungen 45
3.2.1.13 *In vitro* Transkription 46
3.2.1.14 RNAse Protection Assay 46
3.2.2 Arbeiten mit Proteinen 46
3.2.2.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese 46
3.2.2.2 Nachweis von Proteinen 47
3.2.2.3 Expression von Proteinen in *E. coli* 48
3.2.2.4 Proteinreinigung 48
3.2.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen 50
3.2.3.1 Passage und Kultivierung von Zellen 50
3.2.3.2 Transfektion 50
3.2.3.3 Bioassays 51
4 Ergebnisse 52
4.1 Klonierung von Woodchuck Cytokinen, Oberflächenproteinen und Rezeptoren 52
4.1.1 Amplifikation und Sequenzvergleich der vollständigen offenen Leserahmen der Woodchuck Cytokine TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-15 52
4.1.1.1 TNF-α: Amplifikation und Sequenzvergleich 53
4.1.1.2 IFN-γ: Amplifikation und Sequenzvergleich 55
4.1.1.3 IL-6: Amplifikation und Sequenzvergleich 57
4.1.1.4 IL-15: Amplifikation und Sequenzvergleich 59
4.1.2 Amplifikation von Teilsequenzen: IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8 61
4.1.2.1 Klonierung der extrazellulären Region des IFN-γ Rezeptors 61
4.1.2.2 Klonierung einer Teilsequenz von β-Aktin 63
Klonierung einer Teilsequenz von CD8 63
4.1.3 Subklonierungen 64
Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine 65
4.2.1 Expression in Säugerzellen 65
4.2.1.1 TNF-α 65
4.2.1.2 IFN-γ 66
4.2.1.3 IL-15 68
4.2.2 Expression von Woodchuck TNF-α und IFN-γ im großen Maßstab 69
4.2.2.1 TNF-α: Expression und Reinigung 69
4.2.2.2 IFN-γ: Expression und Reinigung 74
4.2.3 Generierung von Antiseren 78
4.2.3.1 TNF-α 78
4.2.3.2 IFN-γ 81
4.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen 84
4.3.1 Bioassays 84
4.3.2 RNAse Protection Assay 84
4.4 *In vivo* Neutralisation von TNF-α und IFN-γ 88
5 Diskussion 90
Die Bedeutung der Cytokine für die Viruselimierung 90
5.1 Klonierung und Sequenzierung von Woodchuck Cytokinen 93
5.1.1 TNF-α: Sequenzvergleich 94
5.1.2 IFN-γ: Sequenzvergleich 94
5.1.3 IL-6: Sequenzvergleich 95
5.1.4 IL-15: Sequenzvergleich 95
5.1.5 Amplifikation von Teilsequenzen: IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8 96
5.1.5.1 Amplifikation des IFN-γ Rezeptors 96
5.1.5.2 Amplifikation von β-Aktin 96
5.1.5.3 Amplifikation von CD8 97
5.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine 98
5.2.1 Expression in Säugerzellen 98
5.2.1.1 TNF-α: Expression und Funktionalität 98
5.2.1.2 IFN-γ: Expression und Funktionalität 98
5.2.1.3 IL-15: Expression und Funktionalität 99
5.2.1.4 IL-6: Expression und Funktionalität 100
5.2.2 Expression von Woodchuck TNF-α und IFN-γ im großen Maßstab 100

5.2.2.1 TNF-α: Expression und Reinigung 100
5.2.2.2 IFN-γ: Expression und Reinigung 101
5.2.3 Generierung von Antiseren 102
5.2.4 Antiseren gegen TNF-α 103
5.2.5 Antiseren gegen IFN-γ 103
5.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen 105
5.3.1 Bioassays 105
5.3.1.1 TNF-α und TNF-β 105
5.3.1.2 IFN-γ und die Typ I Interferone 105
5.3.1.3 IL-15 und IL-2 106
5.3.2 RNAse Protection Assay 107
5.4 In vivo Neutralisation von IFN-γ und TNF-α 109
6 Zusammenfassung 111
6.1 Klonierung von Woodchuck cDNAs: TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-15, IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8 111
6.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine 111
6.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen 112
6.4 In vivo Neutralisation von IFN-γ und TNF-α 112
7 VII Literaturverzeichnis 113
8 Anhang 127
Sequenzen 127

Abkürzungen

A

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin Aminotransferase
Anti-HBc	Antikörper gegen HBcAg
Anti-HBe	Antikörper gegen HBeAg
Anti-HD	Antikörpe gegen das HDAg
Anti-HBs	Antikörper gegen HBsAg
Anti-WHc	Antikörper gegen WHcAg
Anti-WHe	Antikörper gegen WHeAg
Anti-WHs	Antikörper gegen WHsAg
Amp	Ampicillin
ASHV	Artic Squirrel Hepatitis Virus

B

BHK	"baby hamster kidney", Nierenzellen des Hamsters
bp	Basenpaare

C

C	Core, Kapsid
C	Cytosin
cccDNA	covalently closed circular DNA
CSF	hämatopoetische koloniestimulierende Faktoren
CTL	"cytotoxic T lymphocyte", zytotoxische T-Lymphozyte, CD8+ T-Zelle
C-terminal	Carboxy-(terminal)

D

DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DNA	"deoxyribonucleicacid", Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DR1/DR2	"direct repeat"

E

E.	*Escherichia*
EIA	"enzyme immuno assay"
ELISA	"enzyme linked immuno sorbent assay"
EMCV	Enzephalomyokarditis Virus
EtOH	Ethanol

F

FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälberserum

G

g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanin
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus

H

h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	"hepatitis B core antigen", Core-/Kern-/Nukleokapsidprotein des HBV
HBeAg	"hepatitis B e antigen", e-Antigen des HBV
HBsAg	"hepatitis B surface antigen", Hüllprotein des HBV
HCC	"hepatocellular carcinoma", Hepatozelluläres Karzinom
HDAg	Hepatits D Antigen
HDV	Hepatitis D Virus
HLA	"human leucocyte antigen", menschliches Leukozyten-Antigen

I

IL	Interleukine
INF	Interferon
INF-γR	Interferon-γ-Rezeptor

K

kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
KZ	Kupfferzellen

L

LCMV	Lymphozyten Choriomeningitis Virus
LT	Lymphotoxin

M

M	Mutante
MHC	"major histocompatibility complex", Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mRNA	"messenger RNA", Boten-RNA
MW	Molekulargewicht

N

nt	Nukleotid(e)
N-terminal	Amino-terminal
NK	natürliche Killerzellen

O

OD	Optische Dichte

ORF	"open reading frame", offener Leserahmen

P

PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase Ketten-Reaktion
p.i.	"post infection", nach Infektion
Pol	Polymerase

R

RNA	"ribonucleicacid", Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription

S

S	"surface", Hüllprotein
s.	siehe

T

Tab.	Tabelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor

W

WHcAg	"woodchuck hepatitis e antigen" e-Antigen des WHV
WHSAg	"woodchuck hepatitis surface antigen", Hüllprotein des WHV
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV	Woolly Monkey Hepatits B Virus

Allgemein übliche Abkürzungen und gebräuchliche Maßeinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

1 I Einleitung

Teil I: Das Woodchuck Hepatitis Virus und sein Wirt als Model für die Hepatitis B Infektion des Menschen

1.1 Die Hepadnaviren

Die Familie der Hepadnaviridae umfaßt eine Gruppe kleiner, Hepatitis assoziierter Viren, die durch eine zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA gekennzeichnet sind. Die Virionen bilden sphärische Partikel aus, in denen ein Nukleocapsid von einer lipidhaltigen Hülle umschlossen ist. Im Innern des Capsid befindet sich das virale Genom, das an eine DNA-Polymerase gebunden ist.[1,2] Kennzeichnend für alle bisher bekannten Hepadnaviren ist neben dem Hepatotropismus ihre Wirtsspezifität. Die Hepadnaviren verursachen in ihrem Wirt sowohl akut-selbstlimitierende als auch chronische Infektionen. In Abhängigkeit vom jeweiligen Wirtsorganismus kommt es in 0,1 bis 90% der Fälle zu einer persistierenden Infektion.[1] Neben dem humanpathogenen Hepatitis B Virus (HBV) sind weitere für Säuger bzw. Vögel pathogene Viren dieser Familie isoliert und charakterisiert worden:

Genus	natürlicher Wirt	Literatur
Hepatitis B Virus (HBV)	**Mensch (Homo sapiens)**	**[3]**
Woolly Monkey Hepatitis B Virus (WMHBV)	**Neuweltaffen (Woolly Monkey; Lagothrix lagothricha)**	**[4]**
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	**amerikanisches Waldmurmeltier (Woodchuck, Marmota monax)**	**[5]**
Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	**Erdhörnchen (*Spermophilus beecheyi*)**	**[6]**
Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	**Arktische Erdhörnchen (Spermophilus parryi kennicotti)**	**[7]**
Duck Hepatitis Virus (DHBV)	**Pekingente (*Anas domesticus*)**	**[8]**
Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	**Graureiher (*Adrea cinera*)**	**[9]**

Tab. 1 Hepadnaviren und ihre Wirte.

Die Existenz weiterer Hepadnaviren sind bei Präriehunden[5], Schlangen und Känguruhs [10] und bei Tree Squirrels [11] beschrieben worden. In der Familie der Hepadnaviren besteht innerhalb der Gruppe der Säuger-Hepatitisviren als auch innerhalb der Gruppe der aviären Hepatitisviren ein größerer Verwandtschaftsgrad als zwischen den beiden Gruppen.[1,2]

1.1.1 Morphologie

Die vollständigen Virionen der Hepadnaviren bilden sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 42 (HBV), 45 (DHBV, WHV) und 47 nm (GSHV) aus. Dabei wird ein Kernpartikel (Capsid, Core, C) von einer Hülle umschlossen (Abb. 1). Diese Hülle setzt sich

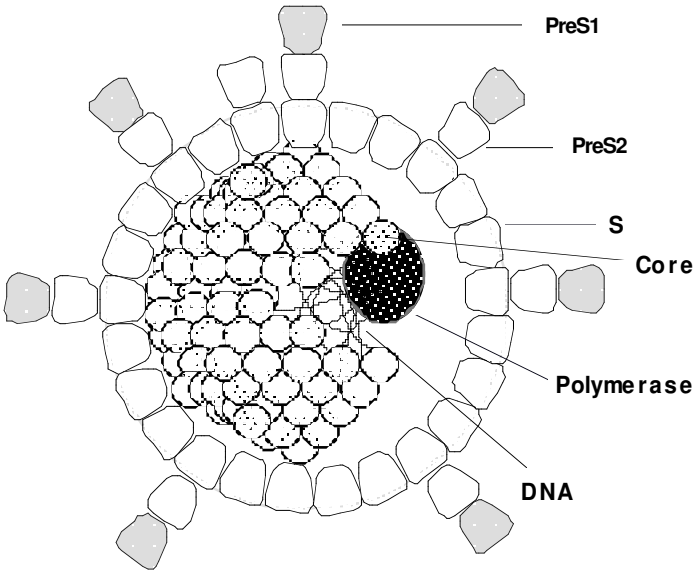


Abb. 1: Schematische Darstellung des WHV-Partikels.
Das Virion besteht aus einer lipidhaltigen Hülle (Surface, S), die aus dem preS1, preS2 und dem S-Protein aufgebaut ist. Die Hülle umschließt das Capsid, das aus dem Nukleo-Protein besteht. Im Innern des Capsid befindet sich die partiell doppelsträngige DNA und die virale DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase.

aus Lipiden der Wirtszelle und den drei viral codierten Proteinen, preS1 (langes S-Protein, L), preS2 (mittleres S-Protein, M) und Surface (S) zusammen. Das Capsid hat einen Durchmesser von 27 (HBV, WHV, DHBV) bzw. 30 nm (GSHV) und ist aus einem einzigen polymerisierten unglykosylierten Protein aufgebaut. Im Innern liegt die virale DNA sowie eine DNA Polymerase/Reverse Transkriptase [12]. Neben den vollständigen Virionen (Dane-Partikel) werden auch eine große Anzahl unvollständiger Viruspartikel in das Serum abgegeben.[3] Diese subviralen Partikel werden bei der Virusreplikation im Vergleich zu den Dane-Partikeln im 10^4 - 10^6-fachen Überschuß gebildet und liegen im Serum in sphärischer (16-25 nm Durchmesser) oder tubulärer (100 nm Länge) Form vor.[13] Neben dem S-Protein enthalten die subviralen Partikel nur geringe Mengen preS2-Protein und keine virale DNA.

1.1.2 Genomorganisation

Das Genom der Hepadnaviren besteht aus einer partiell doppelsträngigen, zirkulären DNA, mit einer Länge von 3,0 kb (DHBV), 3,2 kb (HBV) bzw. 3,3 kb (WHV, GSHV). Der DNA Minusstrang hat eine konstante Länge und ist am 5'-Ende kovalent mit einem Protein verbunden. Dieses Protein wird vom 5'-Bereich des Polymerase Gens codiert und dient als Primer für die reverse Transkription.[13] Im Gegensatz zum Minusstrang ist die Länge des 3'-Endes des DNA Plusstrangs variabel und umfaßt zwischen 50 und 100% des DNA Minusstrang.[10,15] Am 5'-Ende des DNA Plusstrangs ist ein Oligoribonukleotid

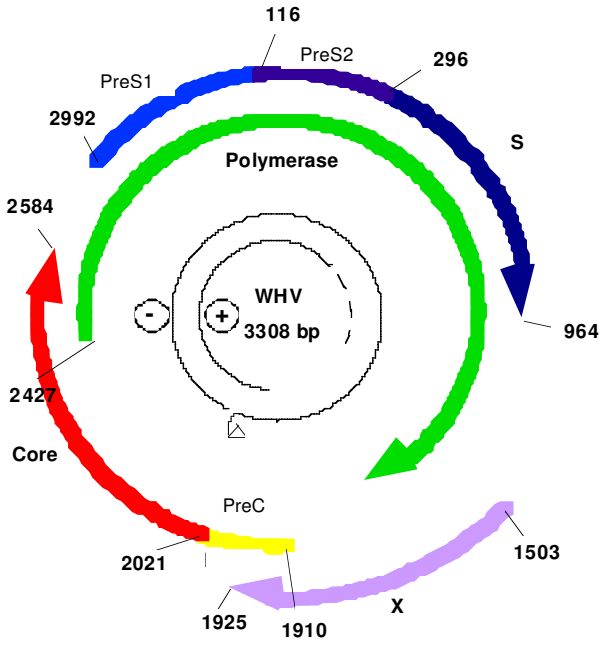


Abb. 2: Struktur und Organisation des WHV-Genoms (modifiziert nach 567 et al., 1989) Die Pfeile symbolisieren die vier offenen Leserahmen des WHV. Im Innern liegt die partiell doppelsträngige DNA mit dem kovalent gebunden Protein und Oligoribonukleotide des DNA Minus- bzw. Plusstrangs.

gebunden, welches als Primer für die Replikation dient.[16-18] Die Zirkularisierung der DNA wird durch eine Überlappung der 5'-Enden beider DNA-Stränge über 200 Nukleotide gewährleistet, ohne daß eine kovalente Bindung erfolgt.[15] Das 5'-Ende beider Stränge wird von zwei kurzen, 11 Nukleotiden langen *direct repeat* (DR1,DR2) Motiven umrahmt. Das 5'-Ende des Minusstrangs liegt im DR1, während das 5'-Ende des Plusstrangs mit dem DR2 beginnt.[16-19] Die *direct repeats* dienen als Startstelle für die Virusreplikation. Das sehr kleine Genom der Hepadnaviren ist auf eine kompakte Organisation der Gene angewiesen.[20] Es verfügt daher über ausgedehnte überlappende offene Leserahmen (ORFs), die das gesamte Genom umspannen. Etwa 50% der Nukleotide gehören zu mehr als einem Leserahmen. Durch die Nutzung unterschiedlicher Startcodons und ungespleißter Transkripte wird die

Codierungskapazität des Genoms effektiv ausgenutzt.[1] Auf dem DNA Minusstrang der Säuger Hepadnaviren liegen vier offene Leserahmen, die für sieben Genprodukte codieren.[1,15,21-23]

1) Die Core/preCore (C/preC) Region besitzt zur Translation des Coreproteins und des e-Antigens zwei im gleichen ORF liegende Startcodons.[14,24] Im WHV-Genom besitzt das C-Gen ein zusätzliches Startcodon.[21]

2) Der ORF des Surface/preS (S/preS) Gens codiert mit drei Startcodons für die drei viralen Hüllproteine preS1, preS2 und S.[25-27]

3) Das Polymerase (P) Gen hat einen Anteil von nahezu 75% am Gesamtgenom und überlappt mit den übrigen drei Leserahmen. Von dem P ORF werden die Polymerase/Reverse Transkriptase, die RNAse H und das DNA-bindende Protein translatiert.[28]

4) Der kleinste ORF, die X-Region codiert ausschließlich für das X-Protein.[21]

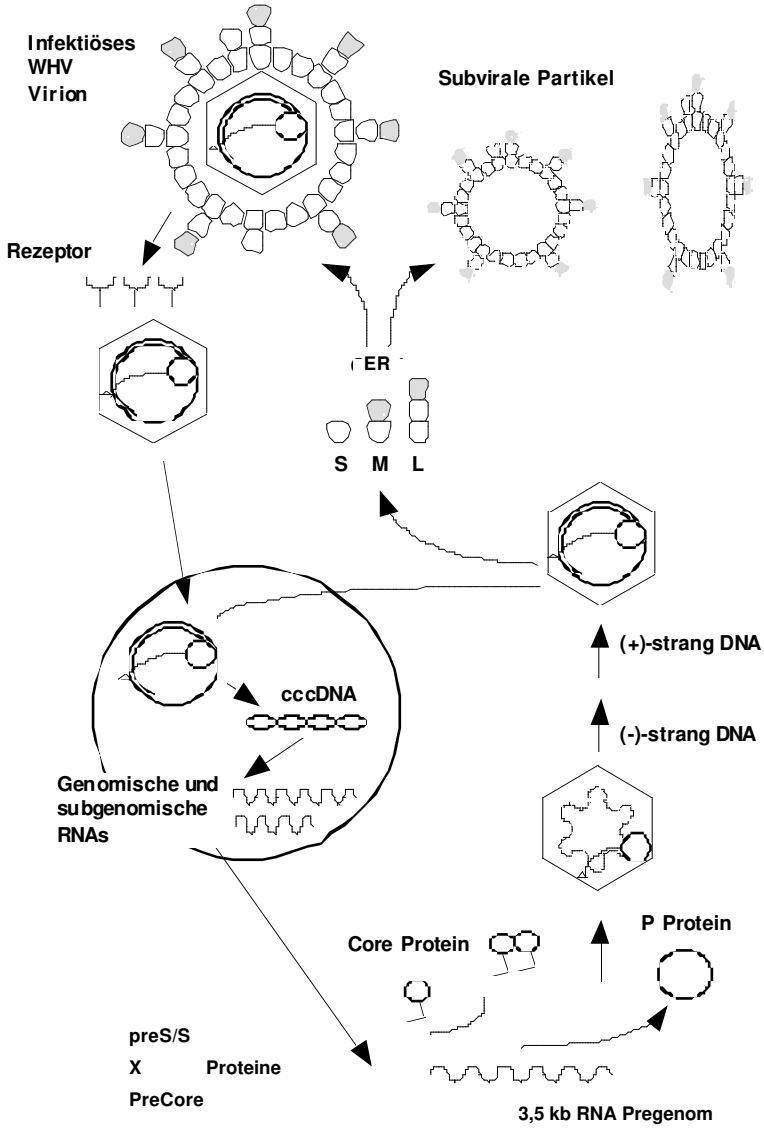
Im Gegensatz zu den Säuger-Hepadnaviren besteht das Genom der aviären Hepadnaviren aus drei ORFs, da die ORFs der C- und X-Region fusioniert vorliegen.[29] Die Homologie in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz zwischen Säuger- und Vogel-Hepadnaviren ist daher geringer als innerhalb beider Gruppen (s. Tab.2)

Genus	Genus	Homologie (Nukleotidsequenz)	Homologie (Aminosäuresequenz)	Literatur
HBV	**WHV**	**70%**	**70%**	**[21]**
HBV	**GSHV**	**55%**	**43%**	**[30]**
HBV	**DHBV**	**40%**		**[31]**
WHV	**GSHV**	**> 80%**	**80%**	**[15]**

Tab. 2 Homologie in % zwischen den verschiedenen Hepadnaviren.

1.1.3 Replikation

Die Virusreplikation findet in erster Linie in Leberzellen, aber auch in Blutlymphozyten und in lymphoiden Zellen der Milz und der Lymphknoten des Wirts statt.[33] WHV-DNA konnte außerdem im Knochenmark und im Thymus nachgewiesen werden.[34] Der einzigartige Replikationsmechanismus wurde erstmalig für das DHBV beschrieben [35] und später für das HBV.[20,36,37] Durch die Verwendung eines RNA Intermediates erinnert die Replikation der Hepadnaviren an die Replikation von Retroviren.[32]



Das infektiöse Virion bindet über eine preS1 Domäne an einen unbekannten Rezeptor (Abb. 3).[38,39] Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle verliert das Virion die Hülle und das Kapsid mit dem partiell doppelsträngigen DNA Genom gelangt in den Zellkern. Virale DNA-Polymerasen vervollständigen den DNA Plusstrang und zelluläre

Abb. 3 Schematische Abbildung des Lebenszyklus von WHV (modifiziert nach Nassal et al. [32]) Das Virion bindet über eine preS1-Domäne an einen unbekannten Rezeptor. Das Capsid gelangt in den Zellkern und das partiell doppelsträngige Genom wird zur cccDNA umgewandelt. Die cccDNA dient als Matrize für die subgenomischen und genomischen RNAs, die im Cytoplasma translatiert werden. Core- und Polymeraseprotein bilden mit dem Pregenom neue Capside. Die RNA wird revers transkribiert und die fertigen Capside werden entweder erneut zum Zellkern transportiert oder werden durch Interaktion mit dem S-Protein aus der Zelle exportiert. S: S-Protein, M: preS2-protein, L: preS1-Protein.

Ligasen überführen die *relaxed* zirkuläre Form der DNA in eine kovalente, zirkuläre, geschlossene Form (covalently closed circular DNA, cccDNA). [18,35] Der DNA Minus-strang der cccDNA dient als Matrize für die Transkription von ge-nomischen und sub-genomischen RNAs die im Cytoplasma translatiert werden.[35] Die ge-nomischen RNAs dienen zum einen als Transkripte für die Synthese des Core-Proteins und des Polymeraseproteins und stellen zum anderen das RNA Pregenom dar. Die subgenomischen RNAs dienen als mRNAs für die Expression des preS1-, preS2- und S-Proteins. Die pregenomische RNA, die im Zellkern transkribiert wurde, wird zusammen mit der DNA-Polymerase/Reversen Transkriptase und dem DNA-bindenden Protein, das als Primer für die Minusstrang Synthese notwendig ist, in die Kernpartikel verpackt.[14,17,18] Ein kurzer Abschnitt im 5'-Bereich der pregenomischen RNA dient als Signal für die Verpackung.[40] Während der DNA Minusstrang durch reverse Transkription der pregenomischen RNAs synthetisiert wird, wird diese pregenomische RNA vom 3'-Ende durch RNAse-H Aktivität abgebaut. Für die Synthese des DNA-Plusstrangs lagert sich ein 20 bp langes Oligoribonucleotid des 5'-Endes der pregenomischen RNA als Primer am DR2.[16-18] Corepartikel, die komplette oder partielle Plusstrang DNA enthalten, werden entweder zum Kern zurück transportiert oder an der Membran des endoplasmatischen Retikulums in virale Hüllproteine verpackt und als vollständige Virionen aus der Zelle geschleust.[15] In persistent infizierten Zellen liegt eine große Anzahl an Intermediaten der Virus-DNA-Synthese vor (>10000/Zelle). Alle Intermediate der Replikation sind mit dem Proteinprimer zur Minusstrang Synthese kovalent verbunden.[14,41]

1.1.4 Transkription

Die viralen Transkripte entstehen in mit Hepadnaviren-infizierten Hepatozyten durch Transkription an den cccDNA-Genomen. Da die meisten RNA-Moleküle ungespleißt sind, sind die kleineren Transkripte vollständig in den größeren polycistronischen Transkripten enthalten. In akut infizierten Hepatozyten findet man zwei polyadenylierte Haupttranskripte, die zum Minusstrang komplementär sind (s. Abb. 4). Die genomische RNA umfaßt mit einer Länge von 3,5 kb (HBV, GSHV, DHBV) bzw. 3,7 kb (WHV) das gesamte Genom.[18,42-47] Die RNA ist durch einmaliges Überlesen der Polyadenylierungsstelle terminal redundant und dient zur Translation des Core-proteins und der DNA-Polymerase.[18] Die genomische RNA ist zugleich das virale Pregenom und Matrize für die Virusreplikation durch die Reverse Transkriptase.[15] Die subgenomische RNA dient mit

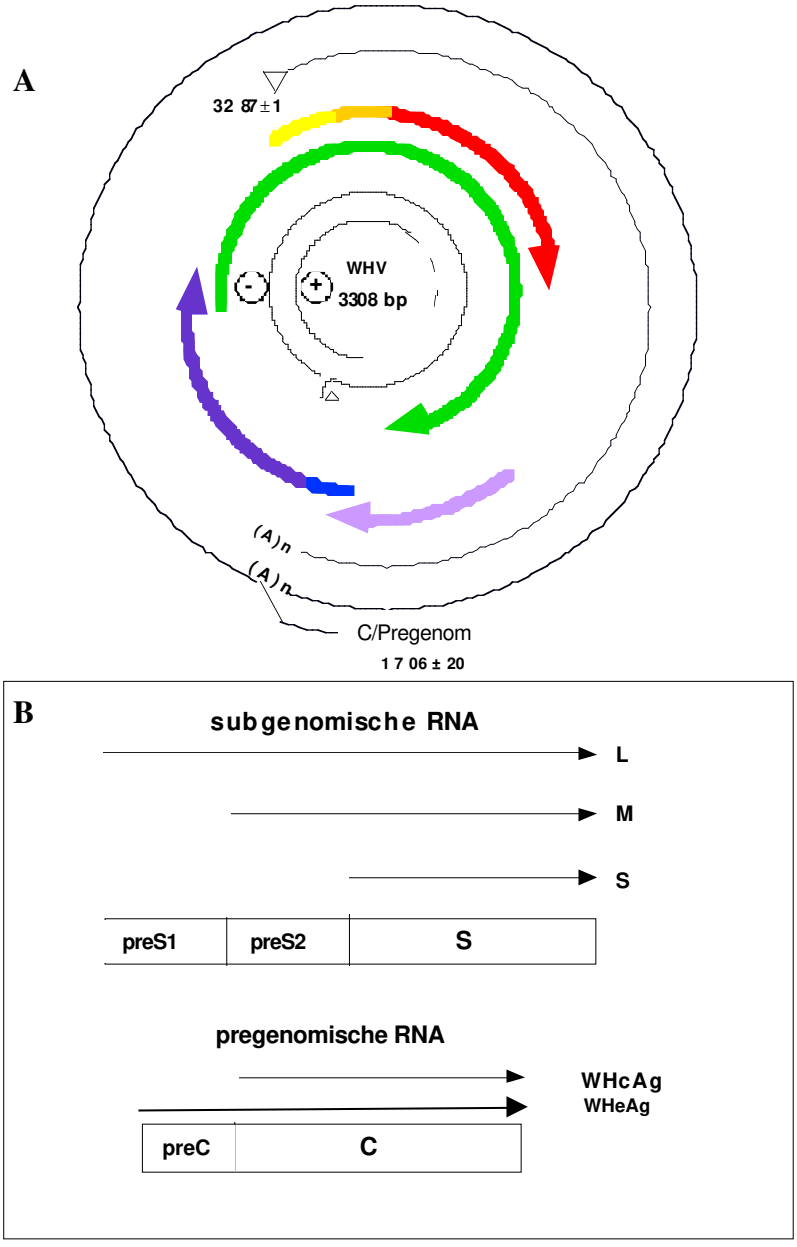


Abb. 4 Transkription des WHV-Genoms (modifiziert nach Schödel *et al.* [1]). A. Die auf dem DNA-Minusstrang lokalisierten offenen Leserahmen sind durch Pfeile symbolisiert. Außen sind die beiden Haupttranskripte mit ihren unterschiedlichen 5'-Enden und die gemeinsame Polyadenylierungsstelle dargestellt. In Teil B der Abbildung sind die einzelnen Transkripte für das Hüllprotein [preS1 (L), preS2 (M) und S] und das Coreprotein (WHcAg) aufgeführt.

einer Länge von 2,1 kb (HBV, WHV, DHBV) bzw. 2,3 kb (GSHV) zur Expression der viralen Hüllproteine preS2/S und S.[1,48] Beide Haupttranskripte besitzen unterschiedliche 5'-Enden aber eine gemeinsame Polyadenylierungsstelle, die am 5'-Ende des C-Gens lokalisiert ist. Neben den genomischen und subgenomischen RNAs werden zwei weitere weniger häufige Transkripte gefunden, die mit einer Länge von 2,4 kb und 0,9 kb für das preS1 Protein bzw. das X-Protein codieren. Außer diesen ungespleißten Transkripten sind in Leber und Tumorgewebe chronisch HBV-infizierter Patienten mRNAs in geringen Mengen identifiziert worden, die durch Spleißvorgänge entstanden sind. Man vermutet, daß Spleißprodukte aus verschiedenen Domänen der Polymerase fusioniert werden und funktionell aktive Polymerase Proteine translatiert werden.[49-51] Im DHBV konnten gespleißte Transkripte nachgewiesen werden, die für das Hüllprotein codieren.[52]

1.1.5 Virale Strukturproteine

1.1.5.1 Die Hüllproteine

Alle Hüllproteine besitzen die gleiche C-terminale S Domäne und unterscheiden sich in Ausdehnung der N-terminalen Domäne.[25,53,54] Jedes Protein kann in glykosylierter (gp) und in nicht glykosylierter (p) Form auftreten. Von der preS1/S mRNA wird das große S Protein (preS1, L) synthetisiert (Abb. 4). Dieses Protein enthält das gesamte preS/S-Polypeptid mit einer Länge von 389-400 Aminosäuren.[55,56] Das preS1-Protein wird hauptsächlich in Dane-Partikeln gefunden und ist nur in kleinen Mengen in subviralen Partikeln nachzuweisen.[25] Das preS1-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Virionbildung (*assembly*) und ist an der Bindung des Virus an den Hepatozyten-Rezeptor beteiligt.[57] Es reguliert die Sekretion der Virionen und HBsAg Partikel und die Produktion der cccDNA.[58,59] Das Molekulargewicht des preS1 beträgt in nicht glykosylierter Form 39 (HBV) bzw. 45 kDa (WHV, GSHV) und in glykosylierter Form 42 (HBV) bzw. 47 kDa (WHV, GSHV).[25,60-62] Das mittlere S Protein (preS2, M) und das Haupt-S Protein (S) werden von der preS2/S mRNA translatiert und bestehen aus 281 bzw. 226 Aminosäuren. Das S Protein ist mit einem Molekulargewicht von 23 kDa (p23) und 27 kDa (gp 27) hauptsächlich am Aufbau der Hülle der subviralen Partikel und der Virionen beteiligt.[53] Das preS2-Protein hat bei HBV, WHV und GSHV ein Molekulargewicht von 33 kDa (p33) bzw. 36 kDa

(gp36).[25,60-62] Es konnte gezeigt werden, daß das preS2-Protein des HBV an polymerisiertes, humanes Serumalbumin bindet.[66]

1.1.5.2 Das Core Protein/e-Antigen

Im ORF des C-Gens befinden sich zwei Startcodons, von denen je nach Startpunkt der Transkription das e-Antigen bzw. das Coreprotein translatiert werden.[13,24] Beginnt die Transkription zwischen den Startcodons, so wird das 21-22 kDa große Strukturprotein des Capsids translatiert .[67,68] Beim HBV besteht das Coreprotein aus 185 Aminosäuren, während es bei WHV und GSHV 188 Aminosäuren umfaßt. Liegt der Startpunkt der mRNA an der 5'-Position des ersten Startcodons, so wird ein preC/C-Polypeptid exprimiert, dessen Signalsequenz das Protein in das endoplasmatische Retikulum steuert.[69,70] Nach Abspaltung des Signalpeptids wird das prozessierte Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa über den Golgi-Apparat aus der Zelle sezerniert [24,69-71] und ist anschließend als e-Antigen (HBeAg) im Serum nachweisbar. Dort liegt es entweder in freier Form vor oder ist an Immunglobuline bzw. an andere Proteine oder Lipide assoziiert. [72]

1.1.5.3 Die Polymerase

Der ORF des P-Gens codiert ein 90 kDa Protein, das bis zu 845 Aminosäuren umfassen kann.[28,73,74] Es konnten für die Polymerase des HBV vier funktionelle Domänen charakterisiert werden: die Reverse Transkriptase-Domäne, die sowohl die Funktion einer Reversen Transkriptase als auch einer DNA Polymerase besitzt [28,73]; die RNAse H Domäne, die für die Degradierung der pregenomischen RNA verantwortlich ist [75,76]; eine Spacer-Region, deren Funktion unbekannt ist [77] und das Terminale Protein, welches als Primer für die Reverse Transkription fungiert.[78,79]

1.1.5.4 Das X-Genprodukt

Das Produkt des HBX-Gens ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 17 kDa, das nur geringe Homologien (48% auf der Aminosäureebene) zum X-Gen des WHV aufweist.[21] Die biologische Funktion des X Proteins während des viralen Lebenszyklus und während der Pathogenese sind bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. Die Expression des HBxAg in transfizierten Zellen führte zu einer gesteigerten Expression verschiedener viraler

Gene und einer verstärkten HBV-Replikation.[80] Einige zelluläre Gene wie auch zelluläre Onkogene konnten durch die HBxAg-Expression aktiviert werden.[81-83] Aus diesem Grunde wird vermutet, daß über eine Aktivierung von zellulären Onkogenen und eine Deregulation der zellulären Genexpression ein Zusammenhang zwischen dem HBxAg und der Entstehung von HCC bestehen könnte. Durch Transfektion von Hepatomazellen konnte nachgewiesen werden, daß ein intaktes X-Gen für die HBV-Replikation nicht notwendig ist [44,84] und darüberhinaus enthalten die aviären Hepadnaviren kein X-Gen.[1] Das HBxAg ist jedoch für die WHV-Infektion in Woodchucks essentiell, da die *in vivo* Infektion mit einem WHV-Genom, dem das X-Gen fehlte, nicht möglich war.[85,86]

1.2 Die Infektion mit HBV

HBV wird hauptsächlich parenteral über Blut- und Blutprodukte übertragen. Das Virus konnte außerdem in unterschiedlichen Körpersekreten und Körperauscheidungen wie Speichel, Samenflüssigkeit [87] und Menstruationsblut [88] gefunden werden.

1.2.1 Pathogenese

Die HBV-Infektion verursacht im Menschen eine Hepatitis. Es werden akut-selbstlimitierende und chronisch persistierende Krankheitsverläufe mit milden bis schweren Leberaffektionen beobachtet, die zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führen können.

1.2.1.1 Akute Infektion

In 50% der Fälle verläuft eine HBV-Erstinfektion subklinisch, d.h. ohne auffällige und typische Krankheitserscheinungen.[22] Das klinische Spektrum der akuten HBV-Infektion variiert von asymptomatischem (50%) bis fulminantem Verlauf. Bei ungefähr 90% aller adult infizierten Patienten kommt es zu einem selbst-limitierenden Verlauf und zu einer vollständigen Eliminierung des Virus.[89]

1.2.1.2 Chronische Infektion

Von einer chronischen Infektion spricht man wenn Patienten länger als 20 Wochen einen positive HbsAg Titer aufweisen. Ungefähr 10% aller infizierten Erwachsenen und mehr als

90% aller perinatal infizierten Kinder erkranken chronisch an Hepatitis [90]. In vielen Fällen verläuft die chronische HBV-Infektion asymptomatisch, trotzdem erkrankt eine signifikante Anzahl an Patienten an Zirrhose. Epidemiologische, virologische und experimentelle Untersuchungen lassen darauf schließen, daß es einen direkten Zusammenhang zwischen einer chronischen HBV-Infektion und der Entwicklung von Hepatozellulärem Karzinom (HCC) gibt. [91,92].

1.3 Das Woodchuck Hepatitis Virus

1.3.1 Das Tiermodell

Das Wirtsspektrum der einzelnen Hepadnaviren ist sehr eng.[1,22] Gebräuchliche Labortiere wie Mäuse und Ratten sind nicht mit Hepadnaviren infizierbar. In einigen Experimenten konnte das HBV auf Schimpansen und andere höhere Primaten übertragen werden. Die virale Infektion manifestierte sich bei diesen Spezies jedoch im Vergleich zum Menschen in abgeschwächter Form [93,94] und es konnten keine HBV-assoziierten Leberzellkarzinome entdeckt werden.[95,96] Da permissive Zellkultursysteme für das HBV fehlen [22,23] ist man für die Erforschung der pathogenen Eigenschaften des HBV auf die Erforschung der HBV-verwandten Hepadnaviren WHV, GSHV und DHBV angewiesen.

Das Tiermodell des WHV-infizierten Woodchucks erweist sich aus mehreren Gründen für die Erforschung der HBV-Infektion als besonders geeignet.[34,97-101]. Aufgrund der großen Übereinstimmung bezüglich der Morphologie, des genomischen Aufbaus, der Genprodukte und der Replikationsmechanismen entspricht die Pathologie einer WHV-Infektion im Woodchuck weitgehend der Pathologie einer HBV-Infektion im Menschen. Übereinstimmend zur HBV-Infektion unterscheidet man eine akute und chronische WHV-Infektion. Analog zur chronischen HBV-Infektion entwickeln sich in chronisch WHV-infizierten Woodchucks Leberkarzinome, obgleich beim Woodchuck keine Leberzirrhosen beobachtet werden.[97,102]

1.3.2 Natürliche und experimentelle WHV-Infektion

In den mittelatlantischen Staaten der USA ist das WHV endemisch in der Woodchuck-population verbreitet.[108-110] Beim Europäischen Alpenmurmeltier (*Marmota marmota*)

wurde bisher kein Hepatitis Virus isoliert und das WHV ist auf diese Spezies nicht übertragbar.[111] Die Übertragung des WHV erfolgt wie bei der Hepatitis B Infektion durch Blut und andere Körperflüssigkeiten [112]. Die Inkubationszeit beträgt bei der natürlichen Infektion beim adulten Tier etwa 2 Monate und beim juvenilen Tier etwa 4 Monate.[100,113] Bei experimentellen Infektionen beträgt die Inkubationszeit etwa 6 Wochen.[114] Die Virämie dauert vier bis sechs Wochen in der akuten Phase.[115] Der erste Marker einer akuten WHV-Infektion ist das WHsAg, das auch während einer chronischen Infektion nachweisbar ist.[110] Gegen Ende der Virämiephase treten in den meisten Fällen die gegen das WHsAg gerichteten Antikörper (anti-WHs) auf. Etwas früher treten nachweisbare Antikörper gegen das Core-protein (anti-WHc) auf, die Marker für die Replikation des Virus darstellen. Sie persistieren lebenslang und dienen auch als Durchseuchungsmarker. Eine artifizielle Infektion am ersten Lebenstag der Tiere führt in 50-100% der Fälle zu einem chronischen Verlauf der Infektion. Mit zunehmenden Alter der Woodchucks zum Infektionszeitpunkt nimmt die Zahl der chronischen Träger ab. Bei der akuten Hepatitis werden im histologischen Leberschnitt punktuelle zelluläre Infiltrationen mit gelegentlichen Zellnekrosen beobachtet [102], während bei der chronischen aktiven Hepatitis (CAH) lymphozytäre Infiltrate und Zellnekrosen über die ganze Leber verteilt vorliegen.[116] Leberzirrhosen, wie sie bei der HBV-Infektion beim Menschen beobachtet werden, treten beim Woodchuck nicht auf. Natürlich WHV-infizierte Woodchucks entwickeln in 80% der Fälle ein hepatozelluläres Karzinom. Experimentell WHV-infizierte Tiere weisen nach 17 bis 36 Monaten in nahezu allen Fällen ein HCC auf.

Teil II: Antivirale Cytokine

1.4 Cytokine als Mediatoren des Immunsystems

Das zelluläre System muß schnell und effektiv auf jeden Angriff von Antigenen überall im Körper reagieren, so daß ein Kommunikationsnetzwerk benötigt wird. Ein derart organisiertes Netzwerk funktioniert durch die Existenz einer Vielzahl an zellmembrangebundenen und löslichen Mediatoren. Cytokine stellen die bestcharakterisierte Gruppe innerhalb dieser Moleküle dar.

1.4.1 Cytokine allgemein

Der Begriff „Cytokine“ definiert eine Gruppe von nicht-enzymatischen Proteinhormonen, die eine Reihe verschiedener Effekte auslösen. Ihre Wirkungen sind von den entsprechenden Zielzellpopulationen abhängig. Man kann die Cytokine aufgrund ihrer Struktur in Untergruppen einteilen, darunter die Interleukine IL-1 bis IL-18 (ausgenommen das Chemokin IL-8), die Interferone (IFN-α, IFN-β und IFN-γ), die hämatopoetischen koloniestimulierenden Faktoren [Granulocyten CSF (G-CSF), Macrophagen CSF (M-CSF) und Granulocyten-Macrophagen CSF (GM-CSF)] und die Tumor Necrose Faktoren (TNF). Das typische Cytokin ist ein glykosyliertes monomeres Peptid bestehend aus etwa 150 Aminosäuren.[117] Es gibt aber Ausnahmen: Das Homotrimer TNF-α kommt in einer löslichen und einer membrangebundenen Form vor, das Homotrimer Lymphotoxin-α (LT-α), das auch TNF-β genannt wird, ist ein löslicher Faktor, und zusätzlich gibt es ein membrangebundenes Heterotrimer aus LT-α und LT-β. IFN-γ, IL-15 und M-CSF liegen als Homodimere und IL-12 als Heterodimer vor.

1.4.1.1 Cytokinfamilien

Die Cytokine gehören trotz ähnlicher biologischer Funktion nicht zu einer einzelnen Gensuperfamilie. Die primären Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sind auffallend unterschiedlich und ihre Gene sind über das gesamte Genom verteilt. Trotzdem gibt es einige Gemeinsamkeiten. Cytokine, die Genfamilien zugeordnet werden konnte, sind in Tabelle 3 dargestellt.

Cytokin	Chromosom h m	Rezeptoren
IL-1α, IL-1β, IL-1ra	**2 2**	**IL-1RI, IL-1RII**
IFN-α, IFN-β	**9 4**	**IFN-αR(2 Ketten werden geteilt)**
TNF-α, LT-α, LT-β	**6 17**	**TNFRI, TNFRII (TNF-α, LT-α_3, LT-$\alpha_2\beta_1$,); LT-βR (LT-$\alpha_1\beta_2$)**
IL-4, IL-13	**5 11**	**2 Ketten werden geteilt (IL-4Rα und IL-13Rα)**
IL-3, IL-5, GM-CSF	**5 11**	**1 Kette wird geteilt (β_c)**
IL-9, IL-12 p40	**5 11**	**verschiedene**

Tab. 3 Cytokingenfamilien und ihre Rezeptoren.

IL-1α, IL-1β und der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) sind auf Aminosäureebene zu 25% homolog, interagieren mit dem gleichen Rezeptor und werden von eng verknüpften Genen codiert.[118] Die 13 funktionellen Mitglieder der humanen IFN-α Genfamilie und die IFN-β Gene liegen nah beieinander und codieren verwandte Proteine, die Typ I Interferone, die einen gemeinsamen Rezeptor binden. Beim Menschen enthält dieses Cluster ein weiteres Gen, das für ein funktionelles Typ I Interferon IFN-ω codiert, und eine Anzahl an IFN-α und IFN-ω Pseudogenen.[119] IFN-γ gehört dagegen nicht zu dieser Familie; die gemeinsame Nomenklatur ist historisch begründet und beruht auf seiner antiviralen Aktivität.

Die drei Mitglieder der TNF Familie weisen eine Sequenzhomologie von 25-35% auf. Sie werden in der Klasse III Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) codiert. TNF-α und LT-α binden dieselben Rezeptoren.[120,121] Ein weiterer Typ der Cytokingenfamilie wird vom Hämatopoetingencluster repräsentiert, das auf dem humanen Chromosom 5q23-35 und auf dem murinen Chromosom 11 liegt. Außer IL-4 und IL-13, die homolog sind und an dieselben Rezeptorkomponenten binden, sind die Mitglieder dieser Genfamilie weder nah verwandt noch teilen sie Rezeptoren.[122-124]

Auf Proteinebene konnte eine andere Art der Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Cytokinen durch die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur und durch rechnergestützte Modellierung (*molecular modelling*) aufgedeckt werden. So konnte gezeigt bzw. vorausgesagt werden, daß einige Cytokine, die ansonsten keinerlei Homologien aufweisen, eine ähnliche

Konformation als Bündel aus vier antiparallelen α-Helices ausbilden.[125] Zu diesen Cytokinen gehören IL-2 bis IL-7, IL-9 bis IL-11, IL-12p35, IL-13, IL-15, IFN-α/β/γ und die drei CSF. Die gemeinsame dreidimensionale Struktur dieser Cytokine bestätigt die Entdeckung, daß sich viele Cytokinrezeptoren in ihrer Primärstruktur viel ähnlicher sind, als die Cytokine selbst. Durch *molecular modelling* der Struktur von IL-18 konnte gezeigt werden, daß IL-18 in die IL-1 Familie einzuordnen ist.[126] Außerdem wurde so festgestellt, daß die TNF Familie einer größeren Gruppe von Proteinen angehört, die außerdem CD27L, CD30L, CD40L, FasL, TRAIL und TRANCE umfaßt. Die entsprechenden Rezeptoren sind mit TNFRI und II verwandt.[121,127]

1.4.1.2 Kontrolle der Cytokinsynthese

Verschiedenartige Immunogene induzieren die Synthese von verschiedenen Cytokinen, die dann unterschiedliche Effektormechanismen auslösen. In vielen Situationen legt diese selektive Cytokinantwort das Ergebnis der Interaktion zwischen Wirt und Fremdstoff (z.B. infektiöses Material, Tumor, Transplantat) fest. Eine Reihe von Mechanismen wurden aufgedeckt, die dazu führen, daß cytokinproduzierende Zellen auf äußere Reize mit der Synthese der richtigen Cytokine am richtigen Ort und für die korrekte Dauer reagieren.

Einer dieser Mechanismen ist die Zellspezialisierung. Fast jede Zelle kann Cytokine produzieren, aber die meisten Zelltypen exprimieren nur eine spezielle Auswahl an Cytokinen. Während manche Cytokine von vielen Zellen exprimiert werden (z.B. IL-1, IL-6, IFN-α/β und TNF-α), scheinen andere nur von wenigen Leukozyten wie T-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen produziert zu werden (z.B. IL-2 bis IL-5). Diese Spezialisierung trägt zur spezifischen Lokalisation der Cytokinsynthese bei, was die Exposition von potentiellen Zielzellen limitiert.

Innerhalb einer Zellinie kann die Cytokinsynthese auf mehreren Ebenen kontrolliert werden (Abb. 5). Eine wichtige Rolle spielt das induzierende Signal, das je nach Zelltyp, Differenzierungs- oder Aktivierungszustand variieren kann. In den meisten Fällen wird die Cytokinsynthese durch Signale angeregt, die als körperfremd erkannt werden, wie z. B. Antigene oder Peptid-MHC-Komplexe, Antigen-Antikörper-Komplexe, Superantigene (z.B. bakterielle Enterotoxine) und durch andere Bestandteile von Microorganismen (z.B. LPS) oder Viren (doppelsträngige RNA). Die Cytokinsynthese kann aber auch durch körpereigene

Signale induziert oder moduliert werden. Zu diesen Signalen zählen z.B. Liganden für costimulatorische T-Zellrezeptoren oder andere Cytokine. Cytokinkaskaden, bei denen ein Cytokin die eigene Synthese oder die eines anderen Cytokins induziert, stellen einen wichtigen Mechanismus zur Amplifizierung und Diversion der ursprünglichen Antwort dar. Auch innerhalb der Zelle kann die Cytokinsynthese auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden.

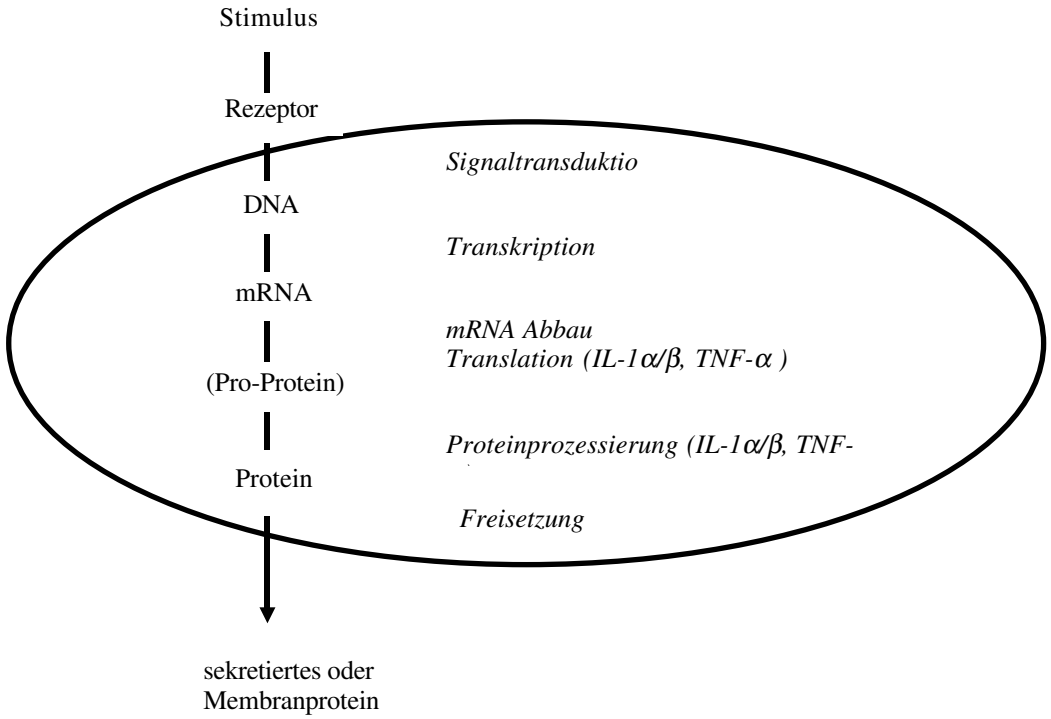


Abb. 5 Die verschiedenen Regulationsebenen der Cytokinsynthese. Die Abbildung zeigt die Schritte der Cytokinsynthese und die zugehörigen Regulationsebenen. Die Synthese beginnt mit der Interaktion zwischen Stimulus und Rezeptor und endet mit der Freisetzung oder Display auf der Zelloberfläche des aktiven Cytokins.

Hauptsächlich wird die Transkriptionsrate und der mRNA Abbau kontrolliert. Die mRNA Menge korreliert daher mit der Proteinproduktion. Einige cytokinspezifische regulatorische Sequenzen und Transkriptionfaktoren wurden bereits identifiziert.[128-132] Die mRNA-Halbwertzeit wird von mindestens zwei Klassen von destabilisierenden Sequenzen, die in der 3´-nichttranslatierten Region einiger Cytokine gefunden wurden, limitiert.[133-135] Obwohl die Halbwertzeit von manchen Cytokin mRNA-Spezies durch bestimmte Signale, wie die Komplexierung von CD28 auf T-Zellen, verlängert [136] oder wie z.B. durch Thalidomid im

Fall von TNF-α verkürzt [137]werden kann, werden die meisten innerhalb von Minuten oder Stunden abgebaut. Die Dauer der Cytokinproduktion hängt daher hauptsächlich von der Permanenz des Stimulus ab.

Die meisten Cytokine sind mit einer konventionellen Signalsequenz ausgestattet, was zur Translokation in den Golgi-Apparat und zur schnellen Sekretion führt. Trotzdem gibt es einige translationale und post-translationale Ebenen auf denen die Produktion und Freisetzung von manchen Cytokinen reguliert wird.

1) Die Synthese von IL-1β und TNF-α wird translational von Elementen ihrer 3´-nichttranslatierten Region reguliert.[138] Eine Stimulation kann also zu einer Erhöhung des mRNA-Levels und der Translationsrate führen. Pyridinyl-Imidazol Verbindungen, die als cytokinsuprimierend und entzündungshemmend bekannt sind, agieren auf dieser Kontrollebene.[139]

2) IL-1α, IL-1β, IL-18 und TNF-α werden als Prohormone synthetisiert. IL-1α und TNF-α sind in dieser Form biologisch aktiv, wogegen die Aktivität von IL-1β und IL-18 von der Prozessierung durch ICE (IL-1β converting enzyme) und anderen weniger spezifischen Enzymen abhängt.[118,127,140]

3) Einige Cytokine werden als biologisch aktive membrangebundene Proteine exprimiert. Pro-TNF-α ist in der Zellmembran verankert. Die Anzahl der Moleküle ist dabei streng reguliert. Durch Zellaktivierung wird die prozessierte Form durch Metalloproteasen freigesetzt.[141] Pro-TNF-α könnte die physiologische Form von TNF-α darstellen, während das lösliche Protein nur in Extremsituation sezerniert wird.[142] Macrophagen-CSF existiert ebenfalls in einer membrangebundenen und einer löslichen Form, die von alternativen Transkripten codiert werden.[143]

4) Manche Cytokine werden in den sekretorischen Granula von Eosinophilen und Mastzellen gespeichert, um dann bei Bedarf freigesetzt zu werden.[144,145]

5) T-Zellen sind in der Lage Cytokine nur an den Kontaktstellen zur antigenpräsentierenden Zelle zu sezernieren.[146,147] Dadurch wird die Cytokinaktivität an der Zielzellmembran konzentriert und Nebeneffekte minimiert.

Unterschiede in der Cytokinexpression wurden auch bei verschiedenen Individuen oder unterschiedlichen Versuchstierstämmen festgestellt.[148,149] Ursächlich sind wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen, aber es wurden vor allem Variationen in den entsprechenden

Genen selbst entdeckt. Polymorphismen wurden in codierenden Regionen (z.B. IL-2, TNF-α), in Promotoren (IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-4, IL-10, TNF-α), Introns (IL-1α, IL-1ra, TNF-α, LT-α) und 3`-flankierenden Regionen (IL-6, TNF-α) gefunden. Einige dieser Polymorphismen konnten mit veränderten Cytokinleveln oder –aktivitäten und mit abweichenden Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen infektiösen Agentien, Autoimmunkrankheiten oder Allergien in Verbindung gebracht werden.[150-152]

1.4.1.3 T-Lymphozyten und Cytokine

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei fast allen immunologischen Vorgängen. Bei einer Stimulation *in vivo* oder *in vitro* durch Alloantigene oder Mitogene werden viele verschiedene Cytokine exprimiert. Wenn T-Zellen aber unter bestimmten Bedingungen in Kultur gehalten werden, kann eine Spezialisierung beobachtet werden.[153,154] Zu den am besten charakterisierten T-Zellpopulationen gehören Typ 1 und Typ Zellen:

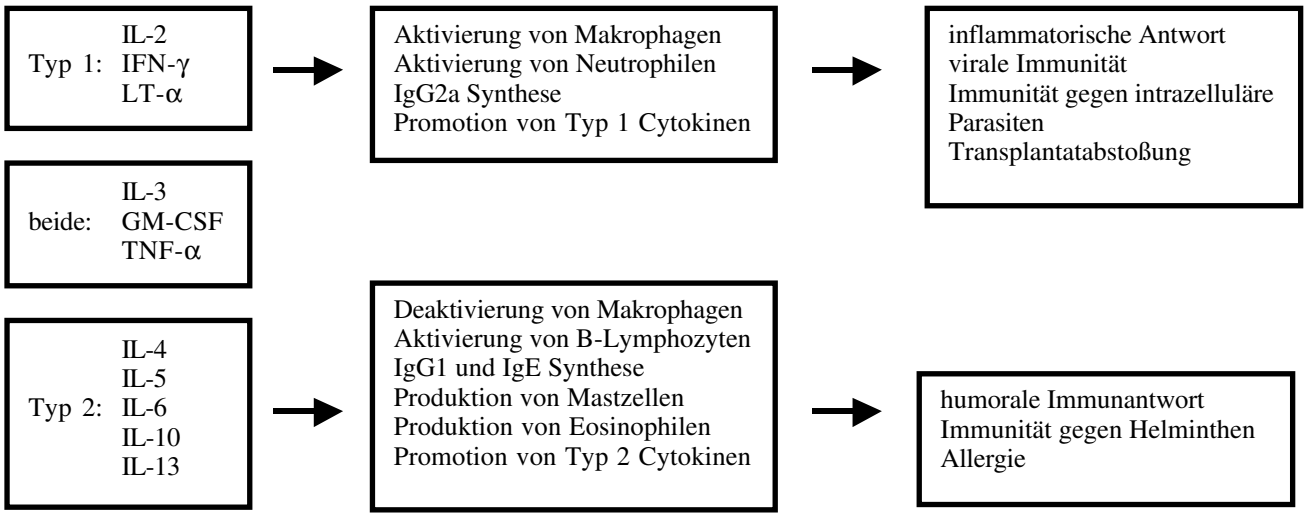


Abb. 6 Cytokinprofile der Typ 1 und Typ 2 Zellen. Die Abbildung zeigt die Expression, die Verteilung sowie die immunologische Wirkung der von Typ 1 und Typ T-Zellen produzierten Cytokine. Die Cytokine IL-3, GM-CSF und TNF-α werden von beiden T-Zellpopulationen ausgeschüttet.

1.4.2 Cytokine als antivirale Agentien

Die Cytokinantwort, die benötigt wird, um angemessene Abwehrmechanismen zu unterstützen, wurde intensiv bei bakteriellen und parasitären Infektionen untersucht. Bei experimentellen Infektionen dieser Art wurden die oben beschriebenen Typ1 und Typ2 Cytokinprofile beobachtet.

Virale Infektionen werden jedoch durch andere Mechanismen kontrolliert. Im Vergleich zu bakteriellen und parasitären Infektionen spielen hier andere Zellen eine zentrale Rolle und die Cytokine haben bei viralen Infektionen eine andere Funktion. Zusätzlich zur Kontrolle der humoralen Antikörperantwort werden durch die Cytokine bei einer viralen Infektion Bedingungen geschaffen, die die Aktivierung von frühauftretenden natürlichen Killerzellen (NK) und späten $CD8^+$ cytotoxischen T Lymphozyten (CTL) stimulieren. Außerdem werden Cytokine wie IFN-α/β während der Antwort auf virale Infektionen sehr früh produziert.

Schließlich sind die Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen bei viralen Infektion deutlich von denen bei anderen Infektionen zu unterscheiden, da Viren zellintern replizieren und virale Proteine im Cytoplasma exprimiert werden. Die Stimulation der Immunantwort gegen Viren könnte also zunächst in einem Klasse 1 Antigenpräsentationskontext stattfinden und dann später, wenn virale Partikel von Nachbarzellen aufgenommen werden, in einem Klasse 2 Kontext verlaufen. Obwohl beide Wege eine Rolle spielen, kann bei vielen viralen Infektionen eine stärkere $CD8^+$ als $CD4^+$ T-Zellexpansion beobachtet werden. Deshalb unterscheiden sich die Konditionen, die für eine protektive Immunantwort gegen virale Infektionen benötigt werden, von den Typ 1 und Typ 2 Antworten, die mit bakteriellen oder parasitären Infektionen assoziiert sind.

In der Regel wird für die Ausheilung von viralen Infektionen ein Mechanismus vorgeschlagen, der hauptsächlich durch antigenspezifische T-Zellen vermittelt wird und mit der Zerstörung der infizierten Zellen endet.[159] Diese Hypothese wird durch Hinweise unterstützt, die bei der Untersuchung von Influenza Typ A und Lymphozyten Choriomeningitis Virus (LCMV) Infektionen gewonnen wurden. Z.B wird bei Mäusen, die simultan mit zwei Influenzasubtypen infiziert wurden, durch einen adoptiven Transfer eines CTL Klons, der für lediglich einen Subtyp spezifisch ist, nur die Replikation dieses einen Subtyps und nicht die Replikation des anderen kontrolliert.[160] Ein anderes Experiment zeigt, daß LCMV in Perforin Knockoutmäusen nicht eliminiert wird, obwohl die Anzahl der $CD8^+$ T-Zellen und der natürlichen Killerzellen vergleichbar mit denen von LCMV-infizierten Wildtypmäusen ist,

in denen das Virus eliminiert wird.[161,162] Im Gegensatz dazu konnten in letzter Zeit einige nichtcytopathische cytokinabhängige Prozesse, die zu einer Eliminierung der Virusinfektion führen, beobachtet werden. In diesen Studien ist es allerdings sehr schwierig, zwischen den immunstimulierenden Effekten und dem direkten antiviralen Potential der Cytokine zu unterscheiden.[159]

1.4.2.1 Das transgene Maus Modell

Im Modell der HBV-transgenen Maus konnte gezeigt werden, daß CTLs die HBV Genexpression und Replikation inhibieren können, ohne dabei die infizierten Hepatozyten zu zerstören. Die transgenen Mäuse exprimieren das HBV in der Leber etwa in gleichem Maße, wie chronisch infizierte Patienten; es gibt allerdings keine cytopathologischen Anzeichen einer Infektion.[163] Wird jedoch ein adoptiver Transfer von $CD8^+$, HBsAg spezifischen CTL Klonen durchgeführt, entwickeln die Mäuse eine destruktive Entzündung der Leber, die der akuten Infektion mit HBV entspricht.[164,165] Durch einen erneuten Transfer der CTL Klone innerhalb von 3-4 Wochen wird jedoch keine weitere Entzündung ausgelöst.[166] Es wurde gezeigt, daß die CTLs zusätzlich zur Zerstörung einiger Hepatozyten, die Expression und Replikation von HBV in allen Zellen reduzieren.[159] Von diesem Effekt sind die viralen RNAs, ihre Translationsprodukte und die DNA-Replikationsintermediate betroffen.[167]
Diese nichtcytopatische antivirale Wirkung der CTLs kann durch Applikation von Antikörpern gegen IFN-γ und TNF-α neutralisiert werden. Cytokine scheinen für den antiviralen Effekt verantwortlich zu sein(Abb. 7).[159]
Die Behandlung der Mäuse mit rekombinanten TNF-α führt zu einer Inhibition der HBV Expression und Replikation.[168] Das Potential von IL-2, die Menge der HBV mRNAs in der Leber zu senken, wird ebenfalls durch TNF-α über einen posttranskriptionalen Mechanismus, der zu einem beschleunigten Abbau der HBV mRNA führt, vermittelt.[169,170]

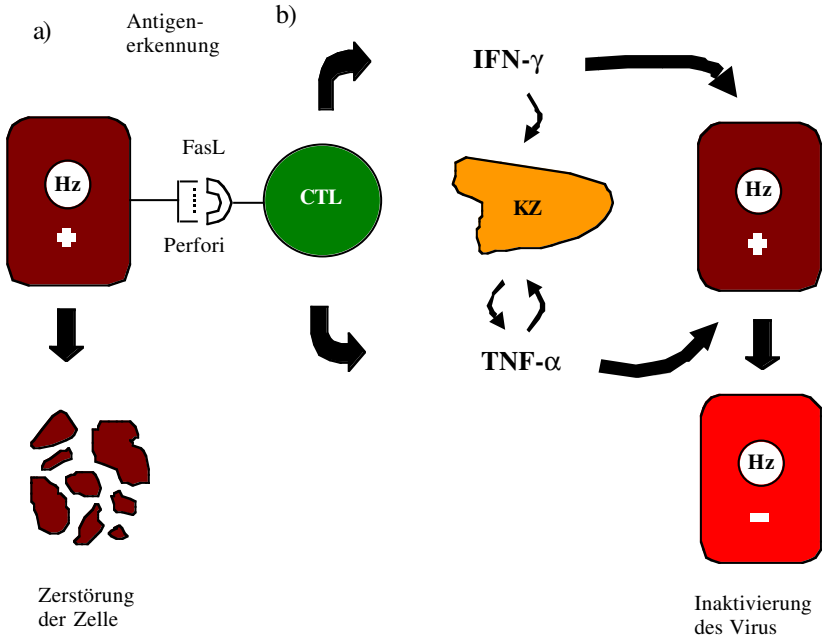


Abb. 7 Mechanismus für die Eliminierung des HBV aus den Hepatozyten. a) Nach Antigenaktivierung übermitteln die CTLs ein apoptotisches Signal an die Hepatozyten (Hz), das durch den Fas Liganden (FasL) und Perforin übertragen wird und zum Tod der Zielzelle führt.
b) CTLs sekretieren IFN-γ und TNF-α, was zur Eliminierung des Virus aus der Zelle führt. TNF-α kann auch von Kupfferzellen (KZ) produziert werden, wenn diese durch IFN-γ stimuliert werden.[159]

1.4.3 Struktur einzelner Cytokine

1.4.3.1 TNF-α

Reifes humanes TNF-α ist ein 157 Aminosäuren langes Polypeptid (Maus, Ratte und Kaninchen sind je eine Aminosäure kürzer).[171] Unter denaturierenden Bedingungen hat es ein Molekulargewicht von ungefähr 17 kDa.[172] Humanes TNF-α ist im Gegensatz zu murinem nicht glykolisiert.[171] TNF-α ist als Trimer aktiv.[173,174] Es existiert in einer löslichen als auch einer membrangebundenen Form. TNF-α besitzt keine typische Signalsequenz. Es wird als ein Vorläufermolekül synthetisiert, dessen C-terminales Ende dem 17 kDa Faktor entspricht. Die N-terminale Sequenz des Vorläufermoleküls enthält sowohl hydrophile als auch hydrophobe Domänen, was das Vorkommen von TNF-α als

Membranmolekül erklärt. Das reife Molekül entsteht aus diesem Vorläufer durch proteolytischen Verdau.[175-177] TNF-α bindet an zwei Rezeptoren, TNFR-I und TNFR-II, die auf den Oberflächen fast aller Zellen exprimiert werden. Beide Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine, die 55 kDa (TNFR-I) bzw. 75 kDa (TNFR-II) schwer sind.[178-180]

1.4.3.2 IFN-γ und sein Rezeptor IFN-γR

Humanes IFN-γ besteht aus 143 Aminosäuren und ist ein 20 oder 25 kDa schweres Glykoprotein, das nur wenig homolog zu den Typ I Interferonen ist.[181-184] Die 25 kDa Spezies ist an beiden potentiellen N-Glykolisierungsstellen, Asn 25 und 97, die 20 kDa Spezies nur an Asn 97 glykolisiert.[184,185] In beiden Fällen ist die Glykolisierung nicht essentiell für die biologische Aktivität.[186] Humanes IFN-γ ist ein Dimer, bei dem der C-Terminus des einen Moleküls mit dem N-Terminus eines weiteren Monomers verbunden ist (*head to tail*).[188,189]

Der IFN-γ Rezeptor ist ein 90 kDa Glykoprotein, das speziesspezifisch IFN-γ bindet.[190-193] Die IFN-γR cDNA codiert für ein 17 Aminosäuren langes Signalpeptid, eine 228 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, eine 21 Aminosäuren lange Transmembranregion und eine 223 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne.[190]

Es gibt Hinweise, daß mindestens eine weitere Rezeptorkomponente (IFN-γ Rβ Kette) für die Signaltransduktion nach der Bindung von IFN-γ notwendig ist.[194-197] Die Bindung von IFN-γ an den Rezeptor führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung der Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2. Der IFN-γ Rezeptor und STAT91 werden phosphoryliert. Phosphoryliertes STAT91 dimerisiert und tritt, wahrscheinlich zusammen mit einem anderen Protein, in den Zellkern ein, wo der Komplex dann bestimmte Regionen (z.B. GAS, *gamma interferon activation site*, oder ISRE, *interferon-stimulated responsive element*) von Promotoren der IFN-γ empfindlichen Gene bindet.[198-201]

1.4.3.3 IFN-α und IFN-β

Humane α-Interferone enthalten 165-172 Aminosäuren und weisen eine Homologie von 60 % auf.[211] Innerhalb der α-Interferone werden die aus 165-166 Aminosäuren bestehenden α_1-

Interferone von den α_2-Interferonen unterschieden, die 172 Aminosäuren enthalten und auch als IFN-ω bezeichnet werden. Der Klasse IFN-β wird ein einziges Protein zugeordnet, das aus 166 Aminosäuren besteht.[212,213] IFN-β weist eine Homologie von 30% mit den α-Interferonen auf.[214] Die Typ I Interferone binden einen gemeinsamen Rezeptor.

1.4.3.4 IL-6

Die humane cDNA für IL-6 codiert für ein Protein mit einer Länge von 212 Aminosäuren mit zwei potentiellen N-Glycosylierungsstellen. Die Abtrennung des hydrophoben N-terminalen 28 Aminosäuren langen Signalpeptids ergibt ein reifes Protein mit 4 Cysteinresten und einem Molekulargewicht von 21 kDa. IL-6 agiert als Monomer.[202-205]

1.4.3.5 IL-15

Die cDNA für humanes und Maus IL-15 codiert für ein 162 Aminosäuren langes Vorläuferprotein, das eine 48 Aminosäuren lange Signalsequenz enthält. Das reife Protein besteht demnach aus 114 Aminosäuren.[206,207] Obwohl die Struktur von IL-15 bisher nicht ermittelt wurde, nimmt man aufgrund seiner biologischen Eigenschaften an, daß IL-15 wie IL-2 zur *4-helix bundle family* gehört. IL-15 und IL-2 sind sich in ihren biologischen Eigenschaften sehr ähnlich, obwohl keine Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene festgestellt wurden.[208] Das liegt zum Teil daran, daß IL-2 und IL-15 zwei Rezeptoruntereinheiten, IL-2β und IL-2γ teilen. Das heißt, das diese Untereinheiten auch Bestandteil des IL-15 Rezeptors IL-15R sind.[208-210] IL-15 aller bisher bekannten Spezies unterstützt das Wachstum der murinen IL-2 abhängigen CTLL-2 Zellinie.

.

2 Aufgabenstellung

Die Hepatitis B Virusinfektion gehört zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Nach Schätzungen der WHO gibt es derzeit weltweit mehr als 350 Millionen Menschen, die mit diesem Virus chronisch infiziert sind. Chronisch HBV infizierte Patienten besitzen aufgrund der anhaltenden inflammatorischen Reaktion des Organismus ein deutlich höheres Risiko an Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom zu erkranken.[244,245]

Eine effiziente virusspezifische, zelluläre Immunantwort bei der HBV-Infektion des Menschen ist eng mit der Ausheilung der Infektion assoziiert. Der zellulären Immunantwort mit HBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTLs) als Effektorzellen wird eine zentrale Rolle bei der Viruseliminierung zugeschrieben. Cytokine, die durch aktivierte CTLs produziert werden, könnten durch die Inhibition der viralen Genexpression und Replikation entscheidend zur Eliminierung beitragen. Die postulierten Mechanismen der Viruseliminierung durch Cytokine sollen im Woodchuck-Modell experimentell überprüft werden, da eine direkte Verifizierung dieser Hypothesen im Menschen nicht möglich ist und andere Modelle, wie das Modell der HBV transgenen Maus wesentliche Unterschiede zur HBV Infektion des Menschen aufweisen.

Ziel dieser Arbeit war es durch Klonierung, Expression und Charakterisierung von Woodchuck Cytokinen die Grundlagen für die Untersuchung der Hepadnavirusinfektion in einem natürlichen Infektionsmodell zu schaffen.

2.1 Klonierung von Woodchuck cDNAs: TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-15, IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Woodchuck Cytokine TNF-α und IFN-γ so kloniert werden, daß sie in großem Maßstab exprimiert und gereinigt werden können, damit sie für die Generation von Antikörpern und für *in vivo* Versuche eingesetzt werden können. Zusätzlich werden die Klone als Sonden für den mRNA Nachweis aus Woodchuckgewebe benötigt.

Die extrazelluläre Region des Woodchuck IFN-γ Rezeptors sollte vollständig kloniert werden, damit dieser Klon für die Expression des löslichen Rezeptors im großen Maßstab genutzt werden kann. Das exprimierte und gereinigte Protein soll zukünftig für die Neutralisation von Woodchuck IFN-γ *in vivo* genutzt werden. Desweiteren sollten Teile der Leserahmen des

Haushaltgens β–Aktin und des Oberflächenrezeptor CD8 kloniert werden. Diese Fragmente werden als Sonden für den Nachweis der entsprechenden mRNA aus Woodchuckgewebe benötigt.

2.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine

Die Funktionalität der vollständig klonierten Cytokine soll durch Expression in Säugerzellen und Nachweis der biologischen Aktivität in entsprechenden Bioassays überprüft werden. Die Cytokine TNF-α und IFN-γ sollen in großem Maßstab funktionell exprimiert und gereinigt werden.

Mit den gereinigten Woodchuckproteinen TNF-α und IFN-γ sollen für die Generierung von Antiseren Kaninchen immunisiert werden. Die Antiseren sollen TNF-α bzw. IFN-γ im Immnunoblot erkennen, damit sie für die Etablierung weitere Methoden genutzt werden können. Zusätzlich sollen sie die biologische Aktivität von Woodchuck TNF-α und IFN-γ inhibieren, damit sie für *in vivo* Neutralisationsversuche eingesetzt werden können.

2.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen

Für die Cytokine TNF-α, IFN-γ, IL-15 und IL-6 sollen Bioassays aus zwei Gründen etabliert werden. Erstens soll durch diese Teste die Identität und Funktionalität der in dieser Arbeit klonierten Woodchuck Cytokine betätigt werden. Zweitens sollen die Bioassays so konzipiert sein, daß sie für den Nachweis der Cytokine aus Woodchuckserum geeignet sind.

Für den Nachweis von Woodchuck Cytokinen und T-Zellmarkern auf mRNA Ebene sollte ein RNAse Protection Assay etabliert werden. Dieser Assay wird benötigt, um Veränderungen des Cytokinprofils während der akuten WHV Infektion und während der Behandlung von chronisch infizierten Tieren zu beobachten. Zusätzlich soll durch den RNAse Protection Assay die Infitration der Leber durch CTLs über den Nachweis der mRNA von CD3, CD4 und CD8 während einer Infektion gezeigt werden.

2.4 *In vivo* Neutralisation von TNF-α und IFN-γ

Um die Bedeutung der Cytokine TNF-α und IFN-γ bei der Infektion mit WHV besser zu verstehen, sollen Woodchucks während einer Infektion mit aufgereinigten Antikörpern gegen diese Cytokine behandelt werden. Es soll beobachtet werden, ob die Neutralisation von TNF-α und IFN-γ die Replikation von WHV beeinflußt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Amersham (Braunschweig)	Nylon- und Nitrocellulosemembranen, Radiochemikalien, Restriktionsenzyme
JT Baker B.V. (Deventer, Holland)	Essigsäure, Ethanol, Methanol
Bayer (Leverkusen)	Penicillin
Biomol (Hamburg)	Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG)
BioRad (München)	Acrylamid-Stammlösung (30%), prestained Kaleidoskop Protein Molekulargewichts-standard
Boehringer (Mannheim)	Alkalische Phosphatase (CIP), DNA Molecular Weight Marker VIII, Expand High Fidelity PCR System, AMV Reverse Transkriptase, Expand Reverse Transcriptase, dNTPs, rNTPs, Restriktionsenzyme, RNase Inhibitor, T4 DNA Ligase, Tetrazyklin Hydrochlorid
Braun Melsungen AG (Melsungen)	Aqua ad injectabilia
Cytogen (Berlin)	Zellkulturmedien, fötales Kälberserum
DIFCO (Detroit, USA)	Agar Agar, Bactotrypton, Hefeextrakt
Eurogentec (Seraing, Belgien)	Agarose
Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)
Gibco-BRL (Neu-Isenburg)	λ DNA/HindIII Fragments, MMLV Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase, RNasin
Kodak (Rochester, USA)	Röntgenfilme x Omat S
Merck (Darmstadt)	Borsäure, Natriumhydroxid (NaOH), Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)

Merck-Succhard (Hohenbrunn)	Glycerin, Glycin, Natriumdodecylsulfat (SDS), Saccharose
New England BioLabs (Schwalbach)	Restriktionsenzyme
Novagen (Calbiochem, Bad Soden)	PCR Marker 50-2000 bp, Perfect DNA Marker 0.1-12 kb
Pharmacia (Freiburg)	Protein-A-Sepharose
Promega (Mannheim)	Taq DNA Polymerase
Serva (Heidelberg)	Streptomycin
Sigma (München)	Actinomycin D, Agarose, Ampicillin, Ammoniumpersulfat (APS), 1,2-Benzoldiamin Dihydrochlorid (OPD), Bromphenolblau, Dithiothreitol (DTT), Ethidiumbromid, Gentamycin, Isopropanol, Lipopolysaccharid (LPS), β-Mercaptoethanol, Mineralöl, Orange G, Phytohämagglutinin (PHA), (3,3´,4,4´-Tetraaminobiphenyl) Tetrahydrochlorid Tabletten (DABT), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Stratagene	QuickHyb® Hybridisierungslösung
USB (Uppsala, Schweden)	Restriktionsenzyme

3.1.2 Kit-Systeme

Amersham (Braunschweig)	Random primer labeling Kit rediprime
Invitrogen (Leek, Holland)	Original TA Cloning Kit, TOPO TA Cloning Kit
Pierce	ImmunoPure® IgG Purification Kit
Pharmingen	RiboQuant™ Ribonuclease Protektion Assay Kit
Qiagen (Hilden)	Plasmid Mini Kit, Plasmid Midi Kit, QIAquick Gel Extraktions Kit, QIAquick PCR Purification Kit, RNeasy Mini Kit, RNeasy Midi Kit

3.1.3 Chromatographie

3.1.3.1 Reagenzien

Amersham Pharmacia (Freiburg)	Gel filtration low molecular weight calibration kit
Qiagen (Hilden)	Ni-NTA Superflow (Agarose)
Sigma (München)	Imidazol, Harnstoff

3.1.3.2 Säulen

Pharmacia (Freiburg)	Superdex 75 HR 10/30, 10/10 und 5/10 HR (high resolution) Leersäulen, MicroSpin™ Sephacryl S-200 HR Säulen

3.1.3.3 Papier

Whatman (Maidstone, England)	Chromatographie Papier 3MMChr

3.1.4 Plastikwaren

BioRad (München)	Semi Micro Küvetten
Eppendorf (Hamburg)	Eppendorfgefäße, Pipettierspitzen
Greiner Labortechnik (Frickendorf)	Cellstar PP-Röhrchen 15 ml und 50 ml, Gewebekulturflaschen, Petrischalen für die Gewebekultur, Mikrotiterplatten (96-well), Makroplatten (6-well)
NUNC (Wiesbaden)	Petrischalen, MaxiSorb ELISA Platten
Sigma (München)	Petrischalen für die Gewebekultur

3.1.5 Geräte

Elektrophoresesystem/DNA	Mupid-21, Eurogentec (Seraing, Belgien)
Elektrophoresesystem/Protein	Mini Protean Cell, BioRad (München)
FPLC	BioRad
PCR Cycler	Thermocycler 60, Bachofer (Reutlingen) Trio-Thermoblock, Biometra (Göttingen) Mastercycler Gradient, Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter	pH DIGI 520, WTW (Weilheim)

Photometer	Pharmacia LKB UltrospecIII (Freiburg)
Rundschüttler	KS 501 D, Oehmen Labor- und Klinikbedarf (Essen)
	GFL Typ 3020, Oehmen Labortechnik (Essen)
Scintillationszähler	Tri-Carb 4000 Serie, Top Count NXT™, Packard (Dreieich)
Spannungsquelle	Power Pack P25, Biometra (Göttingen)
Ultrafiltrationsrührzelle	Modell 8050, Membran PM10, Amicon (Witten)
Ultraschallgerät	Labsonic®U, B. Braun Biotech International
UV-Schirm	FLX-20M, MWG Biotech (Ebersberg)
Vakuumblotter	Model 785, BioRad (München)
Vakuumtrockner	Model 583 Gel Dryer, BioRad (München)
Waagen	R 160 P, Sartorius (Göttingen), PE 628, Bosch, Göntgen, (Bot-Kirchhellen)
Zentrifugen	Eppendorfzentrifuge 5415C
	Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B; Rotoren GS3
	und SA600
Zellharvester	Micro96 Harvester, Skatron Instruments, Zinsser Analytik

3.1.6 Lösungen

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
DNA Probenpuffer	25% (w/v) Orange G, 40% (w/v) Saccharose
PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4; 0,24 g KH_2PO_4 in 1000 ml H_2O; pH 7,4
Protein-Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 20 µg/ml Bromphenol-Blau, pH 6,8
Renaturierungslösung	0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4
SDS Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,4
TBE	100 mM Tris; 100 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,3
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl
TBS-Tween	20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.05% Tween 20

3.1.7 Nährmedien

LB Flüssigmedium	5 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt in 1000 ml H_2O
LB Agar	5 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 15 g Agar Agar in

	1000 ml H_2O
SM Flüssigmedium	5 g NaCl, 25 g Bacto-Trypton, 15 g Hefeextrakt in 1000 ml H_2O

3.1.8 Biologische Materialien

3.1.8.1 Woodchuck Seren

Alle am Institut für Virologie (Universitätsklinikum Essen) gehaltenen Woodchucks (*Marmota monax*, nordamerikanisches Waldmurmeltier) wurden als Jährlinge von der North Eastern Wildlife (Ithaka, USA) bezogen. Tiere mit chronischer WHV-Infektion wurden im Staat Delaware (USA) gefangen.
Die Tiere wurden als WHV-negative Woodchucks definiert, wenn im Serum keine Marker einer bestehenden oder abgelaufenden WHV-Infektion nachzuweisen waren. Bei ihnen waren WHV-DNA, WHV-Hüllproteine (WHsAg), Antikörper gegen WHV-Hüllprotein (Anti-WHs) und Antikörper gegen WHV-Kernprotein (Anti-WHc) nicht nachweisbar. In den Seren chronisch infizierter Woodchucks (chronische WHV Carrier) waren dagegen WHV-DNA, WHsAg und Anti-WHc, jedoch kein Anti-WHs nachweisbar.

3.1.8.2 Bakterien

E. coli (K12) XL-1 Blue	Genotyp: *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*1, *hsd*R17 (Rk^-, mk^+), *sup*E44, *rel*A1, _ $^-$, *lac*$^-$, [F´, *pro*AB, *lac*Iq Z_, M15,
Tn10	(tet^r)] (Stratagene).
E. coli INVαF‘	Genotyp: *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi* 1, *hsd*R17 (Rk^-,
mk^+),	*sup*E44, *rel*A1, ϕ80*lac*ZΔM15Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169λ-,F‘; Rezipientenstamm für die Klonierung von PCR-Produkten im pCR^{TM}II-Vektor (TA-Cloning Kit, Invitrogen Corp., San Diego, USA).

3.1.8.3 Eukaryontische Zellen

12/6	permanente Leberzellinie aus einer WHV-infizierten Woodchuckleber
BHK	Baby Hamster Kidney Zellinie
L929	Murine Fibrosarcoma Zellinie

3.1.8.4 Vektoren

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pCDNA3	5,4 kb, CMV Promotor, T7 Promotor, MCS, Amp^r, Neo^r	Invitrogen
pCR®2.1	3,9 kb, TA-Cloning, T7 Promotor, MCS, Amp^r, Kan^r, blue/white screening	Invitrogen
pCR®II-TOPO	3,9 kb, TOPO-Cloning site, SP6 Promotor, T7 Promotor, MCS, Amp^r, Kan^r, blue/white screening	Invitrogen
pGEM-4Z	2,7 kb, SP6 Promotor, T7 Promotor, MCS, Amp^r, blue/white screening	Promega
pQE-30/31/32	3,4 kb, T5 Promotor, 2 Lac Operon Sequenzen, RBSII, MCS, Amp^r, 5´6xHis Affinitäts Tag	Qiagen
pREP4	Lac Repressor, Kan^r	Qiagen

Tab. 4: Verwendete Vektoren

3.2

3.3 Methoden

3.3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Routinetechniken wie zum Beispiel die Ethanolfällungen von DNA, Phenol/Chloroform Extraktionen und Konzentrationsbestimmungen wurden nach veröffentlichten Standardprotokollen durchgeführt.[215]

3.3.1.1 Plasmidisolierung

Plasmid DNA zur Sequenzierung wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit gereinigt. Plasmid DNA für andere molekularbiologische Arbeiten wie Klonierungen und *in vitro* Transkriptionen wurde mit dem Qiagen Plasmid Midi oder Qiagen Plasmid Mini Kit gereinigt.

3.3.1.2 Extraktion von RNA aus Gewebe oder Zellen

Das Gewebe wurde bei -187° C (N_2, l) mit Mörser und Pistill zerkleinert und noch gefroren in der entsprechenden Menge Lysepuffer des Qiagen RNEasy Mini bzw. Midi Kits aufgenommen. Gewebe und Zellen wurden mit Lysepuffer mit Hilfe der Qiagen Qiashredder homogenisiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

3.3.1.3 Restriktion von DNA

Für Restriktionen wurden die Reaktionsbedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. In der Regel wurde 1 U des Restriktionsenzyms für den endonukleolytischen Verdau von 1 µg DNA eingesetzt.

3.3.1.4 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurden verschiedene Enzyme eingesetzt. AMV Reverse Transkriptase (Boehringer Mannheim), Expand Reverse Transkriptase (Boehringer Mannheim) und MMLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL). Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Empfehlungen der Hersteller.

3.3.1.5 Polymerase Ketten Reaktion

Die PCR wurde meist mit der Taq Polymerase von Promega durchgeführt. Der folgende Standardansatz wurde benutzt. Bei den Standardbedingungen wurde teilweise die Annealing Temperatur verändert, um eine Amplifikation zu ermöglichen bzw. die Spezifität der PCR zu verbessern. Für die Klonierung der Cytokine oder Oberflächenproteine aus mRNA wurde meist das Titan System von Boehringer benutzt, bei dem die reverse Transkription und die PCR direkt hintereinander im gleichen Microgefäß durchgeführt wird.

Tabelle 5 PCR Ansätze

Reagenzien	PCR 50/1	PCR 50/5	PCR 25/1	PCR 25/5
H_2O	25,7 µl	21,7 µl	12,2 µl	8,2 µl
10 x Puffer	5 µl	5 µl	2,5 µl	2,5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	4 µl	4 µl	2 µl	2 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl	4 µl	2 µl	2 µl
Primer (10 µM)	je 5 µl	je 5 µl	je 2,5 µl	je 2,5 µl
Polymerase	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl
Template	1 µl	5 µl	1 µl	5 µl

Tabelle 6 Titan Ansatz

Reagenzien	RT-PCR 20
H_2O	3,5 µl
5 x Puffer	4 µl
dNTPs (2,5 mM)	2 µl
Primer (10 µM)	je 2 µl
Enzymmix	0,5 µl
RNA	5 µl

Tabelle 7 Reaktionsbedingungen

Zyklusschritt	PCR	RT-PCR
reverse Transkription	-	1h 50° C
initiale Denaturierung	2’ 94° C	2’ 94° C
Denaturierng	1’ 92° C	1’ 94° C
Annealing	1’30’’ 50° C	1’30’’ 50° C
Elongation	5’ 68° C	5’ 72° C
Delay	10’ 68° C	7’ 72° C
Zyklenzahl	30	35

3.3.1.5.1 Primer und Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der Woodchuck Cytokine, Oberflächen- und Haushaltsgene

Plasmid		Primer	Name	T/°C
TNFpCR2.1	RT-PCR	5´-GGGACTAGCCAGGAGGGAGA-3´[216]	TNF-p1*	47
		5´-GGGACTAGCCAGGAGGGAGA-3´[216]	TNF-p2*	
	nested PCR	5´-AGAAAAGACACCATGAGCACAGAAA-3´[216]	TNF-p3*	50
		5´-ACCCATTCCCTTCACAGAGCAATGA-3´[216]	TNF-p4*	
TNFpQE30	PCR	5´-GGCC**GGATCC**TCAGATCATCT-3´	pqeTNF-B	55
		5´-CTGC**AAGCTT**TCACAGAGCGA-3´	pqeTNF-H	
TNFpGEM	PCR	5´-G**GAATTC**TGCCTGTGCCTCAGCCTC-3´	rpaTNF-E	55
		5´-G**AAGCTT**TAGACAAGGTATAGTCCG-3´	rpaTNF-H	
IFN1pCR2.1*	RT-PCR	5´-GAAACGATGAAATATACAAG-3´[217]	IFN-p10*	45
		5´-AAAATTCAAATAGTGCTGGCAG-3´[218]	IFN-p2*	
	nested PCR	5´-GAAACGATGAAATATACAAG-3´[217]	IFN-p10*	50
		5´-CACCTTTAGGAAGTCCTGCAG-3´	IFN-p9*	
IFN2pCR2.1*	RT-PCR	5´-TTTCTACCTCAGACTCTTTGAA-3[218]´	IFN-p1*	48
		5´-AGTTTTAAATATTAATAAATAG-3´[218]	IFN-p3*	
IFNpCR2.1	SOE-PCR	5´-ATGAAATATACAAGTTATAT-3´	soeIFN-S1	50
		5´-AAATAGTGTCTGGCAGGAGGACTGTT-3´	soeIFN-AS1	
IFNpQE30	PCR	5´-GAC**GGATCC**TGTTACTCCCAGGACAC-3´	pqeIFN-B	55
		5´-GGC**AAGCTT**TTATTTGGATGCTCTCCG-3´	pqeIFN-H	
IFNpGEM	PCR	5´-G**GAATTC**CAAGAACATCCAAAGGAG-3´	rpaIFN-E	55
		5´-G**AAGCTT**GCTGGCAGGAGGACTGTT-3´	rpaIFN-H	
IL6pCR2.1*	RT-PCR	5´-TCGAGCCCACCAGGAACGAAAG-3´[219]	IL6-p1*	45
		5´-AAATTAAAAATAATTAAAATAGTGT-3´[219]	IL6-p2*	
	nested PCR	5´-CAACTCCATCTGCCCTTCAGGA-3´[219]	IL6-p3*	48
		5´-GCCAGTTCTTCGTAGAGAACAACAT-3´[219]	IL6-p4*	
IL15pCR2.1*	RT-PCR	5´-TGGATGGATGGCTGCTGGAA-3´[220]	IL15-p1*	45
		5´-AAGAGTTCATCTGATCCAAG-3´[220]	IL15-p2*	
	nested PCR	5´-GGCTGGCATTCATGTCTTCATT-3´[220]	IL15-p5*	50
		5´-TCAGGACGTGTTGATGAACATTTGGACAAT-3´	IL15-p6*	
IL15pGEM	PCR	5´-G**GAATTC**CATTACCATAGCAGGCTC-3´	rpaIL15-E	55
		5´-G**AAGCTT**TTTTCAATTTTTTGCAAA-3´	rpaIL15-H	
IFNRpCRTO	RT-PCR	5´-CCGTCGGTAGCAGCATGGCTCTCCT-3´[241]	IFNR-p1	48
		5´-CAAGGACTTAGGTAACATTATGCTTTT-3´[241]	IFNR-p6	
β-ActpCR2.1	RT-PCR	5´-ACCAACTGGGACGACATGGA-3´[221]	Act-p1	45

		5´-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3´[221]	Act-p2	
β-ActpGEM	PCR	5´-GT**GAATTC**GGAGCCTCGGTCAGCAGCAC-3´	rpaACT-E	55
		5´-GT**AAGCTT**GCTTACCAACTGGGACGACA-3´		
CD8pCR2.1	RT-PCR	5´-TGGACTTCGCCTGTGATATC-3´[222]	CD8-S1	45
		5´-TGGCCGGGGACATTTGCA-3´[222]	CD8-AS1	
	semi-nested	5´-TGGACTTCGCCTGTGATATC-3´[222]	CD8-S1	50
		5´-GGACATTTGCAAACACGTCTTC-3´[222]	CD8-AS4	
CD8pGEM	PCR	5´-GT**GAATTC**TGGACTTCGCCTGTGATATC-3´	rpaCD8-E	55
		5´-GT**AAGCTT**GGACATTTGCAAACACGTCTTC-3´	rpaCD8-H	
CD3pGEM	PCR	5´-G**GAATTC**CTGAAGAATTTTTCAGAA-3´	rpaCD3-E	55
		5´-G**AAGCTT**GGGAACAGGTGGTGGCCT-3´	rpaCD3-H	
CD4pGEM	PCR	5´-G**GAATTC**CACAGTCTATAAGAAAGC-3´	rpaCD4-E	55
		5´-G**AAGCTT**TCCTTTGTCAAGAGTCAC-3´	rpaCD4-H	

Tab. 8 Liste der Oligonukleotide, die für Klonierungen benutzt wurden. In der letzten Spalte sind die *Annealing* Temperaturen angegeben. Fettgedruckte Sequenzen markieren eingefügte Restriktionsschnittstellen. Die mit Sternchen versehenen Primer wurden von Dr. M. Lu entworfen.

3.3.1.5.2 SOE-PCR

Zwei überlappende cDNA Fragmente können über eine SOE (sequence overlap extension)-PCR verbunden werden. Dazu werden die Fragmente nach der Amplifizierung mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und vereinigt. Ein zweiter Amplifikationschritt erfolgt mit dem *sense* Primer des 5´-Fragments und dem *antisense* Primer des 3´-Fragments.[223]

3.3.1.6 Klonierung von DNA

PCR Amplifikate wurden entsprechend den Vorschriften des Herstellers in die Vektoren pCR2.1 oder pCRII-TOPO kloniert. Sofern die PCR in der gelelektrophoretischen Analyse unspezifische Nebenprodukte zeigte, wurde das spezifische PCR Produkt mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktions Kits gereinigt. Danach wurde es nach Angaben des Herstellers in den entsprechenden Vektor ligiert und das Plasmid in *E. coli* transformiert. Spezifische PCR Produkte wurden 1/20 mit H_2O verdünnt und direkt in den Vektor kloniert. Umklonierungen von DNA Fragmenten erfolgten nach endonukleolytischem Verdau und gelelektrophoretischer Reinigung durch Ligation mit T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim). Die Transformation erfolgte entweder in *E. coli* One Shot INVαF' Competent Cells (Invitrogen) oder in *E. coli* XL1-blue.

3.3.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien

E. coli Zellen wurden durch Behandlung mit $CaCl_2$ für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetent gemacht.[224,225] LB Medium wurde mit einer Kolonie *E. coli* angeimpft und in einer Übernachtkultur angezogen. Am Morgen wurden 100 ml LB Medium 5%ig mit der Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD_{590} von etwa 0,5 geschüttelt. Pro Ansatz wurde 1 ml der Zellsuspension abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem $CaCl_2$ resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 150 µl eiskaltem $CaCl_2$ resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C eingefroren.

3.3.1.8 Agarose Gelelektrophorese

Die Ansätze wurden mit etwa 1/5 Volumen DNA Probenpuffer gemischt und in 1%igen Flachbett-Agarosegelen aufgetragen. Für besonders kurze DNA Fragmente wurde die Agarose Konzentration erhöht, für lange Fragmente gesenkt, um eine günstigere Proportionalität der DNA Fragmente im Gel zu erzielen. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE benutzt. Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, wurde den Gelen oder dem Probenpuffer Ethidiumbromid zugefügt. Die Visualisierung erfolgte im UV-Durchlicht.

3.3.1.9 Extraktion von DNA aus Agarose Gelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA Fragmente aus dem Agarose Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktions Kits extrahiert.

3.3.1.10 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) oder am Klinikum Essen vom Sequenzierdienst durchgeführt.

3.3.1.11 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *redi*prime DNA Labelling System über den Einbau von [α-^{32}P]dCTP. Überschüssige radioaktive Nukleotide wurden durch Gelchromatographie auf MicroSpin Sephacryl S-200 HR Säule abgetrennt, die erhaltene Sonde denaturiert (5 min) 95°C und abgekühlt zur Hybridisierung eingesetzt. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Sonde wurde aus Aliquots von 1 µl in Szintillationszähler ermittelt.

3.3.1.12 DNA-DNA-Hybridisierungen

Für den Nachweis von WHV-DNA durch DNA-Spotblot wurde eine Hybond N-Membran in das Filtrationsgerät Minifold II (Schleicher & Schuell) eingespannt. 5 µl Serum wurden in 200 µl TE-Puffer verdünnt und auf die Membran aufgetragen. Durch ein 5 minütiges Vakuum einer Wasserstrahlpumpe wurde das Serum in die Membran gezogen. Die an die Membran gebundenen Nukleinsäuren wurden anschließend für 10 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCL, pH 12,0). Die Membranen wurden nach der Denaturierung neutralisiert (1 M Tris, 2 M NaCl, pH5,5) und mit 2x SSPE gewaschen. Die Fixierung der DNA an die Membran (UV-Cross-Link) erfolgte

durch UV-Bestrahlung (1,5 J/cm^2) in Fluoro-Link FLX (MWG-Biotech). Die Membran wurden in einer Glasröhre mit dem Vorhybridisierungspuffer QuikHyb Hybridization Solution (Stratagene) für 30 min bei 68°C inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten radioaktiv markierten Sonde zum Vorhybridisierungspuffer erfolgte die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen bei 68°C über Nacht. Überschüssige Radioaktivität konnte durch zweimaliges Waschen der in 2x SSC, 0,1% SDS Membran (10 min, RT) und einmaliges Waschen in 0,1x SSC, 0,1% SDS (30 min, 60°C) entfernt werden. Die Autoradiographie wurde mit dem Röntgenfilm X Omat S (Kodak) über eine Expositionszeit von 1 bis 3 Tagen durchgeführt.

3.3.1.13 *In vitro* Transkription

In vitro Transkriptionen von Plasmiden oder PCR Produkten wurden mit Hilfe der T7 RNA Polymerase (Gibco BRL) durchgeführt. Bei Plasmiden war der notwendige T7 Promotor vektorcodiert. Das Plasmid wurde am 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz linearisiert und gelelektrophoretisch gereinigt. Der Transkriptionsansatz wurde nach Herstellerangaben 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die transkribierte RNA gelelektrophoretisch überprüft.

Transkriptionsansatz: 6 µl Puffer
3µl DTT (100 mM)
4 µl rNTPs (4 mM)
1 µl RNasin
1 µl T7 RNA Polymerase
15 µl DNA + H_2O (etwa 0,5 µg DNA)

3.3.1.14 RNAse Protection Assay

Der RNAse Protection Assay wurde mit dem RiboQuant™ Ribonuclease Protektion Assay Kit von Pharmingen entsprechend den Angaben des Herstellers mit den folgenden Änderungen durchgeführt. Die Phenol-Chloroform Extraktion der Proben und der hybridisierten Fragmente wird durch Größenexclusionschromatographie (MicroSpin™ Sephacryl S-200 HR Säulen) ersetzt. [227]

3.3.2 Arbeiten mit Proteinen

3.3.2.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen erfolgte in Tris-Glycin Gelen (modifiziert nach Laemmli).[226] Vor dem Aufragen der Proteinproben in die Geltaschen wurde den Ansätzen Protein-Probenpuffer zugegeben und dieselben für 5 min in einem Wasserbad gekocht. Die Elektrophorese wurde mit SDS-Laufpuffer bei 100-150 V mit dem Mini Protean System (BioRad) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine 20 min lang mit Coomassie Farbstoff gefärbt und durch eine 45 minütige Inkubation in Entfärbe-Lösung im Gel fixiert. Anschließend wurden die Gele auf Whatman Papier in einem Vakuumtrockner getrocknet.

Coomassie-Lösung: 0,1% Lösung PhastGel Blue R (Pharmacia)
Entfärbungslösung: 30% (v/v) Methanol
7,5% (v/v) Essigsäure

Tabelle 9. Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels (50 ml Ansätze)

Lösungen oder Reagenzien	Trenngel (15%)	Trenngel (17%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid Stammlösung (30%)	25 ml	28,3 ml	8,3 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	12,5 ml	12,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	-	12,5 ml
Glycerin	6 ml	6 ml	-
H_2O	5,5 ml	2,2 ml	28 ml
10%ige SDS-Lösung (w/v)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Für ein Gel wurden 5 ml der Lösung für das Trenngel mit 50 und 4 µl TEMED bzw. 3 ml der Lösung für das Sammelgel mit 300 µl Ammoniumpersulfat und 4 µl TEMED versetzt. Aufgrund des Glyceringehaltes können Trenngel und Sammelgel direkt aufeinander gegossen werden.

3.3.2.2 Nachweis von Proteinen

3.3.2.2.1 Westernblot

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen wurde mit der Mini Trans Blot Cell mit Transferpuffer (SDS Laufpuffer (s.o.) ohne SDS) bei konstant 100 V für 45 min unter Eiskühlung durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurden freie Protein-Bindestellen der Nitrozellulosemembran durch einstündige Inkubation mit 3% BSA in TBS blockiert. Die Membran wurde dann entweder mit Ni-NTA-AP-Konjugat (1:500 in TBS), Anti-His Antikörper (1:1000 in TBS) oder anderen Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 3 Waschschritte mit TBS-Tween und eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Peroxidase gekoppelten Antikörper (verdünnt nach Angaben des Herstellers in TBS). Bei Benutzung des Ni-NTA-AP-Konjugats entfällt der sekundäre Antikörper. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween wurde die Membrane mit dem Peroxidase Substrat DAB bis zur gewünschten Färbung inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit H_20 gestoppt und die Membran getrocknet.

3.3.2.2.2 Dot blot

Proteinproben wurden verdünnt und direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft. Danach erfolgt eine Inkubation mit 3% BSA oder 3% Magermilchpulver. Die restliche Behandlung wurde wie für die Westernblots beschrieben durchgeführt.

3.3.2.2.3 ELISA

Für den Nachweis der α-TNF-α und α IFN-γ Kaninchenantikörper wurden MaxiSorb ELISA Platten mit 1µg des entsprechenden rekombinanten Proteins beschichtet. Die Woodchuck-seren wurden in verschiedenen Verdünnungen 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 6 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Seren durch einen HRP-

gekoppelten α-Kaninchenantikörper gemäß den Angaben des Herstellers ersetzt. Die Detektion erfolgte mit DABT, wie vom Hersteller empfohlen.

3.3.2.3 Expression von Proteinen in *E. coli*

3.3.2.3.1 Analytischer Maßstab

Mit rekombinanten Plasmiden transformierte Der *E. coli* Stamm M15[pREP4] wurde mit den Expressionsplasmiden TNFpQE30 und IFNpQE30 transformiert. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 5 ml bei 37 °C bis zu einer $O.D_{600}$ von 0,9 (TNF-α) bzw. 1,3 (IFN-γ) angezogen. Nach Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurden die Zellen weitere 6 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde vor der Induktion eine Negativprobe (1 ml) entnommen. 1 ml der Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zentrifugation (1200 x g, 30 s, 20 °C) sedimentiert und in 0,2 ml H_2O resuspendiert. Die so gewonnenen Rohextrakte wurden nach Zugabe von _ Volumen 3 x SDS-Probenpuffer 5 min gekocht und Aliquots zur Analyse auf Polyacrylamidgele geladen. Zusätzlich wurde eine Westernblotanalyse mit Ni-HRP-Konjugat durchgeführt.

3.3.2.3.2 Präparativer Maßstab

1 l LB wurde mit 100 ml Übernachtkultur von transformierten *E. coli* Zellen beimpft. Die Inkubations- und Induktionsbedingungen entsprachen denen des analytischen Maßstabs (s.o.). Die Bakterien wurden in 50 ml PBS aufgenommen und durch Behandlung mit 1mg/ml Lysozym (15 min, 4 °C) und anschließender Ultraschallbehandlung (2 min, high, Intervall 0,5) aufgeschlossen. DNA und RNA wurden durch Zugabe von DNAse 1 (5 µg/ml) und RNAse H (10 µg/ml) bei 37 °C für 15 min verdaut. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (12500 rpm, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Sowohl Überstand als auch Pellet wurden durch Western-Blot Analyse (Ni-Konjugat) auf das rekombinante Protein untersucht.

3.3.2.4 Proteinreinigung

3.3.2.4.1 TNF-α

Rekombinantes TNF-α befand sich im unlöslichen Pellet und konnte durch Extraktion mit 50 ml 0,25% Tween; 0,1 mM EGTA; 10 mM Imidazol in Lösung gebracht werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und filtriert (Sterilfilter, 45 nm). Die weitere Reinigung erfolgte nach dem folgenden FPLC-Programm. Für die Chromatographie wurde die HR 10/10 Säule, gepackt mit Ni-Superflow, benutzt.

	Start (ml)	Schritt	Puffer
1	260.0	Fraktionssammler: 2 ml Fraktionen; beenden bei 310.0 ml	
2	0.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 3,00 ml/min für 10 ml	A: 10 mM Imidazol in PBS
3	10.0	Halten bis Knopfdruck	
4	10.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei	A: Probe

		1,00 ml/min für 50 ml	
5	60.0	Isokrater Fluß mit 0% Puffer A, 100% Puffer B bei 2,50 ml/min für 100 ml	B: 10 mM Imidazol in PBS
6	160.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 2,50 ml/min für 100 ml	A: 20 mM Imidazol in PBS
7	260.0	Halten bis Knopfdruck	
8	260.0	Linearer Gradient mit 0% -100% Puffer B bei 1,00 ml/min für 40 ml	A: 20 mM Imidazol in PBS B: 500 mM Imidazol in PBS
9	300.0	Isokrater Fluß mit 0% Puffer A, 100% Puffer B bei 1,00 ml/min für 10 ml	B: 500 mM Imidazol in PBS
10	310.0	Programmende	

Fraktionen mit erhöhter O.D. wurden im SDS-PAGE überprüft. Positive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht bei 4° C dialysiert. Ein zweiter FPLC Schritt wurde nach dem oben stehenden Protokoll mit der HR 5/10 Säule, gepackt mit Ni-Superdex, durchgeführt. Die Fraktionen wurden wieder im SDS-PAGE kontrolliert, positive Fraktionen vereinigt und in einer Amicon Rührzelle unter Zugabe von PBS entsalzt und anschließend konzentriert. Die Konzentration wurde in einem Bradford-Assay bestimmt.

3.3.2.4.2 IFN-γ

Rekombinantes IFN-γ befand sich im Pellet und konnte mit 8M Harnstoff; 10 mM Imidazol in PBS in Lösung gebracht werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und filtriert (Sterilfilter, 45 nm). Die weitere Reinigung erfolgte nach dem folgenden FPLC-Programm. Für die Chromatographie wurde die HR 10/10 Säule, gepackt mit Ni-Superflow, benutzt.

	Start (ml)	**Schritt**	**Puffer**
1	260.0	Fraktionssammler: 2 ml Fraktionen; beenden bei 300.0 ml	
2	0.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,50 ml/min für 30 ml	A: 10 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
3	30.0	Halten bis Knopfdruck	
4	30.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,00 ml/min für 50 ml	A: Probe
5	80.0	Isokrater Fluß mit 0% Puffer A, 100% Puffer B bei 1,50 ml/min für 100 ml	B: 10 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
6	180.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,50 ml/min für 100 ml	A: 20 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
7	280.0	Halten bis Knopfdruck	
8	260.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,00 ml/min für 40 ml	A: 500 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
9	300.0	Programmende	

Fraktionen mit erhöhter O.D. wurden im SDS-PAGE überprüft. Positive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht bei 4° C dialysiert. Ein zweiter FPLC Schritt wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Bei diesem Schritt wurde die HR 5/10 Säule, gepackt mit Ni-Superflow, benutzt.

	Start (ml)	Schritt	Puffer
1	260.0	Fraktionssammler: 2 ml Fraktionen; beenden bei 310.0 ml	
2	0.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,50 ml/min für 30 ml	A: 10 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
3	30.0	Halten bis Knopfdruck	
4	30.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,00 ml/min für 30 ml	A: Probe
5	60.0	Isokrater Fluß mit 0% Puffer A, 100% Puffer B bei 1,50 ml/min für 100 ml	B: 10 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
6	160.0	Isokrater Fluß mit 100% Puffer A, 0% Puffer B bei 1,50 ml/min für 100 ml	A: 20 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
7	260.0	Halten bis Knopfdruck	
8	260.0	Linearer Gradient mit 0% - 100% Puffer B bei 1,00 ml/min für 40 ml	A: 20 mM Imidazol in PBS B: 500 mM Imidazol in PBS
9	300.0	Isokrater Fluß mit 0% Puffer A, 100% Puffer B bei 1,00 ml/min für 10 ml	B: 500 mM Imidazol, 8M Harnstoff in PBS
10	310.0	Programmende	

Die Fraktionen wurden wieder durch SDS-PAGE kontrolliert, positive Fraktionen vereinigt und in einer Amicon Rührzelle unter Zugabe von PBS entsalzt und anschließend konzentriert. Die Konzentration wurde in einem Bradford-Assay bestimmt.

3.3.2.4.3 Isolierung von IgG

Die Isolierung der IgG gegen Woodchuck TNF-α und IFN-γ erfolgte mit dem ImmunoPure® IgG Purification Kit der Firma Pierce entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE überprüft und die Konzentration in einem Bradford-Assay bestimmt.

3.3.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

3.3.3.1 Passage und Kultivierung von Zellen

Zellrasen, die zu 100% konfluent waren, wurden nach Abgießen des alten Mediums 2 x mit PBS pH 7,2 gewaschen. Trypsin/EDTA Lsg. wurde zugegeben, so daß der Zellrasen gerade bedeckt war. Nach 3 - 5 min Inkubation bei 37 °C hatten sich die Zellen von der Plastikunterlage gelöst. Medium mit 10% FCS wurde zugegeben und die Zellen in neue Kulturgefäße ausgesät. Der Verdünnungsfaktor betrug je nach Bedarf 1:2, 1:5 oder 1:10. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Medium mit 2% FCS. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C.

3.3.3.2 Transfektion

4 µg Plasmid DNA wurden mit 10 µl Lipofektamin in 200 µl Optimem bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Die Zellen in 6-well Mikrotiterplatten, die zu 60% konfluent waren, wurden zweimal mit je 1 ml Optimem gewaschen und mit dem DNA/Lipofektamin Komplex in 1 ml Optimem bedeckt. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C, 5% CO_2 wurde das

Transfektionsmedium durch 2 ml Kulturmedium mit 10% FCS ersetzt. Nach 48 h wurde der Überstand abgenommen und bei -20° C aufbewahrt.

3.3.3.3 Bioassays

3.3.3.3.1 TNF-α

L929 werden in einer Konzentration von $2x10^4$ Zellen/well in 96 Loch Mikrotiterplatten ausgesäht und bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wird das Vollmedium durch 100 µl RPMI ersetzt. Die Proben werden in Reihe aufgetragen und seriell 1:2 verdünnt 100 µl Actinomycin D Lösung (2 µg/ml) werden pro well zugesetzt. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 18 h wird der Test durch Färbung mit 0,5% Kristallviolett in 30% v/v Ethanol ausgewertet. Die Bestimmung der Konzentration geschieht durch Vergleich mit dem murinen Standard, der in Konzentrationen von 32 U/ml bis 0,25 U/ml aufgetragen wird.

3.3.3.3.2 IFN-γ

12/6 Zellen werden so in eine 96 Loch Mikrotiterplatte ausgesäht, daß sie am nächsten Tag (Tag 1) zu 90-100% dicht sind. Die Inkubation wird bei 37 °C und 5% CO_2 durchgeführt. An Tag 2 wird das Kulturmedium durch 100 µl Häm´s 12 ersetzt. 100 µl der zu testenden Substanz bzw. Serum werden in Reihe A aufgetragen und seriell 1:2 verdünnt. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Insgesamt 4 Spuren bleiben für Zell- und Viruskontrolle ohne Behandlung. An Tag 3 wird das Testmedium durch 100 µl Virussuspension ersetzt. Der Virustiter ist so eingestellt, daß 100% der Zellen ohne Behandlung sterben. Die Auswertung erfolgt an Tag 4 durch Färbung mit 0,5% Kristallviolett in 30% v/v Ethanol. 1 Unit entspricht der Konzentration bei der 50% der Zellen geschützt sind.

3.3.3.3.3 IL-15

CTLL Zellen werden nach dreimaligem Waschen mit PBS auf eine Konzentration von $2x10^5$ Zellen/ml in Testmedium (Vollmedium ohne IL-2) eingestellt. In eine 96 Loch Mikrotiterplatte werden 50 µl Testmedium vorgelegt und in Spalte 1 werden je 50 µl Probe aufgetragen und seriell 1:2 über 12 Reihen verdünnt. 50 µl der Zellsuspension werden zugegeben und die Zellen werden 18 h bei 37 ° 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wird ^{3}H-Thymidin (1 µCi/well) zugegeben und die Zellen 4 h inkubiert. Die Zellen werden geerntet und das eingebaute Thymidin wird im Top-Counter gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung von Woodchuck Cytokinen, Oberflächenproteinen und Rezeptoren

4.1.1 Amplifikation und Sequenzvergleich der vollständigen offenen Leserahmen der Woodchuck Cytokine TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-15

Die Amplifikation der cDNA der Woodchuck Cytokine erfolgte aus PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten. Für jedes Cytokin wurden mehrere Sätze an Primern konstruiert. Als Vorlage dienten bekannte Sequenzen anderer Spezies, die in der GenBank vorliegen. Die geeigneten Primer und die richtigen Transkriptions- und Amplifikationsbedingungen mußten dann für jedes einzelne Cytokin ermittelt werden. Die Klonierung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben in den pCR2.1 Vektor. Nach der Klonierung wurden die Klone mit den Primern der jeweils letzten PCR identifiziert. Nach der Sequenzierung wurde die Anzahl der identischen Aminosäuren der einzelnen Sequenzen berechnet. Für eine genauere Analyse wurde überprüft, ob Aminosäuren, die im Menschen und in der Maus wichtig für die biologische Funktion sind, auch in der Woodchuck Sequenz konserviert sind.

4.1.1.1 TNF-α: Amplifikation und Sequenzvergleich

Für die Amplifikation von Woodchuck TNF-α konnten Primer benutzt werden, die von der murinen TNF-α Sequenz abgeleitet wurden. Die RT-PCR erfolgte mit den Primern TNF-p1 und TNF-p2. Durch die Amplifikation mit den Primern TNF-p3 und TNF-p4 entstand ein 725 bp langes Fragment. Der offene Leserahmen von Woodchuck TNF-α umspannt eine

```
   1  AGAAAAGACA CC<b>ATG</b>AGCAC AGAAAGCATG ATCCGGGACG TGGAGCTGGC
  51  CGAGGAGGCA CTCCCCAAGG AGGCATGGGG GCCCCAGGGC TCCAGCCGGT
 101  GCCTGTGCCT CAGCCTCTTC TCCTTCCTGC TTGTGGCAGG AGCCACTACG
 151  CTCTTCTGCC TGCTGCACTT TGGAGTGATC GGCCCCCAGA GGGAAGAGTT
 201  CCTGAATAAC CTCCCTCTCA GCCCCCAGGC CCAGATGCTC ACACTCAGAT
 251  CATCTTCTCA AAACATGAAT ACAAGCCTGT GAGCCCATGT TGTAGCAAAA
 301  AATGAAGACA AGGAGCAGCT GGTGTGGCTA AGTCGTCGTG CCAATGCCCT
 351  CCTGGCCAAT GGCATGGAGC TGATAGACAA CCAGCTGGTG GTGCCTGCAA
 401  ACGGACTATA CCTTGTCTAC TCCCAGGTCC TCTTCAAGGG CCAAGGCTGC
 451  CCCTCCTACG TGCTCCTCAC CCACACTGTC AGCCGCTTTG CTGTCTCTTA
 501  TCAGGACAAG GTCAACCTCC TCTCTGCCAT CAAGAGCCCT TGCCCAAAGG
 551  AGAGCCTGGA GGGGGCTGAG TTCAAGCCCT GGTATGAACC CATCTATCTA
 601  GGAGGGGTCT TCGAGCTGCA GAAGGGTGAT CGACTCAGTG CTGAGGTCAA
 651  CCTGCCCAGC TATCTCGACT TTGCTGAGTC CGGGCAGGTC TACTTTGGGG
 701  TCATTGCTCT G<b>TGA</b>AGGGAA TGGGT
```

Abb. 8 725 bp der Woodchuck TNF-α Sequenz. Der ORF besteht aus 699 bp. Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Region von 699 bp (Abb.8).

TNFpCR2.1 wurde sequenziert und die Sequenz wurde mit den Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte, Rind und Kaninchen auf Aminosäureebene verglichen. Durch den Vergleich ergab sich, daß das putative reife Woodchuckprotein 156 Aminosäuren lang ist. Die putative Signalsequenz besteht aus 77 Aminosäuren. Zwei Cysteinreste, C69 und C101, sind in allen überprüften Spezies erhalten. [228] Ebenfalls im Woodchuck konserviert sind die Reste L29, R32, A143 und S145, die bekanntermaßen im humanen oder murinen Protein wichtig für die biologische Funktion sind (s. Diskussion 1.1).[229]

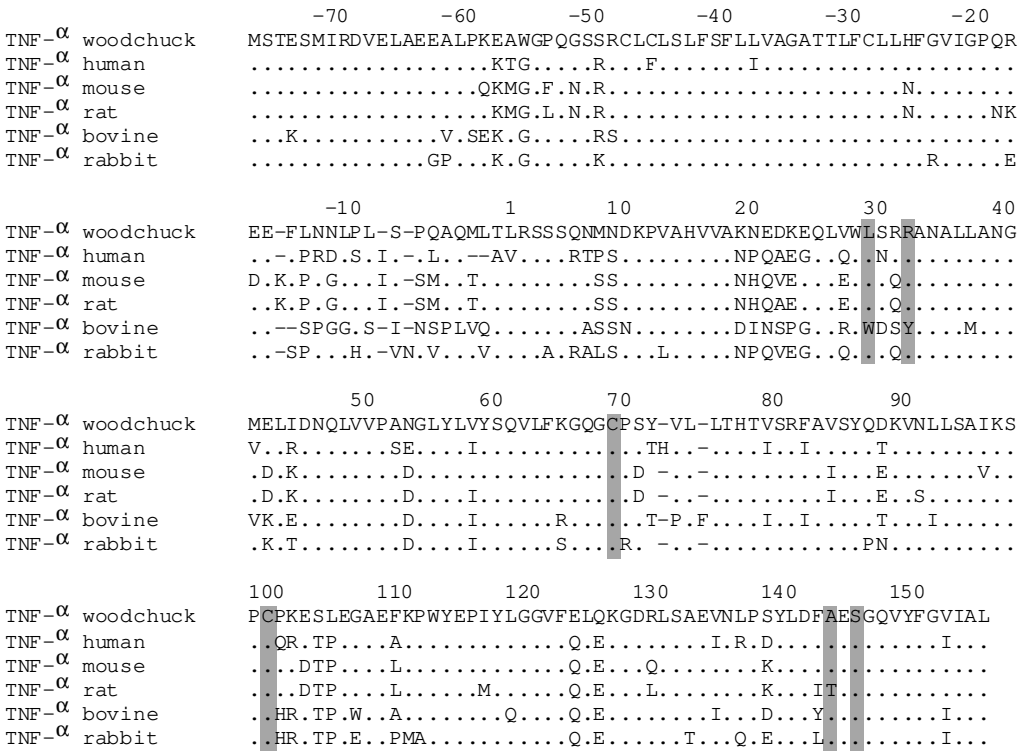


Abb. 9 Sequenzvergleich von Woodchuck TNF-α mit TNF-α anderer Spezies auf Aminosäureebene.[216,230-233] Aminosäuren, die für die Funktion von TNF-α wichtig sind, wurden grau unterlegt.

Die Woodchuck TNF-α Sequenz weist eine hohen Homologiegrad von 73%-84% zu den TNF-α Sequenzen anderer Spezies auf.

	Woodchuck	Mensch	Maus	Ratte	Rind	Kaninchen
Woodchuck	**100 %**					
Mensch	**80 %**	100 %				
Maus	**84 %**	80 %	100 %			
Ratte	**82 %**	79 %	94 %	100 %		
Rind	**73 %**	80 %	75 %	74 %	100 %	
Kaninchen	**79 %**	80 %	78 %	78 %	76 %	100 %

Tab. 10 Anzahl der Identitäten bei TNF-α Proteinen unterschiedlicher Spezies. Die selbstermittelten Woodchuck Werte sind durch Fettdruck markiert.

4.1.1.2 IFN-γ: Amplifikation und Sequenzvergleich

Die Amplifikation von Woodchuck IFN-γ wurde mit humanen und murinen Primern durchgeführt. IFN-γ mußte in zwei überlappenden Fragmenten kloniert werden, da die Amplifizierung des vollständigen offenen Leserahmens in einer einfachen PCR-Reaktion nicht möglich war. Das 3´-Ende (IFN-γ2) konnte zuerst amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Die reverse Transkription erfolgte mit dem Primer IFN-p3, die PCR mit den Primern IFN-p1 und IFN-p3; eine *Nested* PCR war nicht erforderlich. Nach der Sequenzierung wurde der woodchuckspezifische Primer IFN-p9 generiert, der als *Antisense*-Primer für die *Nested* PCR des 5´-Endes benutzt wurde. Die beiden überlappenden Fragmente wurden durch eine SOE-PCR zusammengefügt. Durch die Amplifikation mit den Primern IFN-p11 und IFN-p12 entstand ein 560 bp langes Fragment. Der offene Leserahmen von Woodchuck IFN-γ umfaßt 498 bp (Abb.10). Der Klon wurde sequenziert und die Sequenz mit den entsprechenden Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte und Rind auf Aminosäureebene verglichen.

```
   1  ATGAAATATA CAAGTTATAT CTTGGCTTTT CAGCTCTGCA TCATTTTGGG
  51  TTCTTCTAGC TGTTACTCCC AGGACACAGT TAATAAGGAA ATAGAAGATT
 101  TAAAAGGATA TTTCAATGCA AGTAATTCAA ATGTATCAGA TGGCGGGTCT
 151  CTCTTCTTGG ATATTTTGGA TAAATGGAAA GAGGAGAGTG ACAAAAAAGT
 201  AATCCAGAGC CAAGTTGTCT CTTTCTACTT CAAACTCTTT GAACACTTAA
 251  AAGACAACAA GAACATCCAA AGGAGCATGG ACACCATCAA GGGGGATCTT
 301  TTTGCTAAGT TCTTCAACAG CAGTACCAAT AAGCTGCAGG ACTTCCTAAA
 351  GGTGTCTCAA GTTCAGGTAA ATGACCTGAA GATCCAGCGT AAAGCAGTGA
 401  GTGAACTCAA GAAAGTGATG AATGATCTGT TACCACACTC TACCCTAAGG
 451  AAGCGAAAAA GGAGTCAGTC TTCGATTCGG GGTCGGAGAG CATCCAAATA
 501  ACAGTCCTCC TGCCAGCACT ATTTGAATTT TTAAATTGAA ATCTATTTAT
 551  TAATATTTAA
```

Abb. 10 560 bp der Woodchuck IFN-γ cDNA. Der ORF besteht aus 498 bp. Das Start- und Stopcodon ist durch Fettdruck markiert.

Durch den Sequenzvergleich wurde eine Länge von 143 Aminosäuren für das reife Woodchuckprotein ermittelt. Die Signalsequenz besteht dementsprechend aus 23 Aminosäuren.

```
                    -20       -10         1        10        20        30
IFN-γ woodchuck     MKYTSYILAFQLCIILGSSSCYSQDTVNKEIEDLKGYFNASNSNVSDGGSLFLDILDKWK
IFN-γ human          ..............V...LG..C..PYV..A.N..K....GH.D.A.N.T...G..KN..
IFN-γ mouse          .NA.HC...L..-FLMAV.G..CHG..IESL.S.NN...S.GID.-EEK......WRN.Q
IFN-γ rat            .SA.RRV.VL...-LMAL.G..C.G.LIESL.S..N...S.SMDAME.K..L...WRN.Q
IFN-γ bovine         ......F..LL..GL..F.GS.G.GQFFR...N..E.....SPD.AK..P..SE..KN..

                    40        50        60        70        80        90
IFN-γ woodchuck     EESDKKVIQSQVVSFYFKLFEHLKDNKNIQRSMDTIKGDLFAKFFNSSTNKLQDFLKVSQ
IFN-γ human          ....R.IM...I........KNF..DQS..K.VE...E.MNV.....NKK.RD..E.LTN
IFN-γ mouse          KDG.M.IL...II...LR...V....QA.SNNISV.ESH.ITT..SN.KA.KDA.MSIAK
IFN-γ rat            KDGNT.ILE..II...LR...V....QA.SNNISV.ESH.ITN..SN.KA.KDA.MSIAK
IFN-γ bovine         D.....I....I.........N....QV......I..Q.M.Q..L.G.SE..E..K.LI.

                    100       110       120       130       140
IFN-γ woodchuck     VQVNDLKIQRKAVSELKKVMNDLLPHSTLRKRKRSQSSIRGRRASK
IFN-γ human          YS.T..NV....IH..IQ..AE.S.AAKTG......MLF......Q
IFN-γ mouse          FE..NPQV..Q.FN..IR.VHQ...E.S.......---------RC
IFN-γ rat            FE..NPQ..H...N..IR.IHQ.S.E.S.......---------RC
IFN-γ bovine         IP.D..Q.....IN..I......S.K.N.........NLF......T
```

Abb. 11 Sequenzvergleich von Woodchuck IFN-γ mit IFN-γ anderer Spezies auf Aminosäureebene.[217,218,234,235] Aminosäuren, die für die Funktion von IFN-γ wichtig sind, wurden grau unterlegt.

Am C-Terminus liegen neun Aminosäuren, die in den Nagersequenzen fehlen, aber in der humanen und der bovinen Sequenz gut konserviert sind. Ebenfalls am C-Terminus befindet sich eine polykationische Region, die in allen verglichenen Spezies enthalten ist.

Die Berechnung der Homologien zwischen Woodchuck IFN-γ und den entsprechenden Sequenzen der anderen Spezies, ergab Zahlenwerte von 43% bis 65%. Auffallend ist, daß die Homologie zwischen Woodchuck und Mensch bzw. Rind höher ist, als zwischen Woodchuck und Maus bzw. Ratte.

	Woodchuck	Mensch	Maus	Ratte	Rind
Woodchuck	**100 %**				
Mensch	**60 %**	100 %			
Maus	**43 %**	41 %	100 %		
Ratte	**42 %**	39 %	84 %	100 %	
Rind	**65 %**	61 %	44 %	45 %	100 %

Tab. 11 Anzahl der Identitäten bei IFN-γ Proteinen unterschiedlicher Spezies. Die selbstermittelten Woodchuck Werte sind durch Fettdruck markiert.

4.1.1.3 IL-6: Amplifikation und Sequenzvergleich

Der komplette offene Leserahmen von Woodchuck IL-6 konnte mit Primern amplifiziert werden, die von der IL-6 Sequenz der Ratte abgeleitet wurden. Die reverse Transkription wurde mit dem Primer IL6-p2 durchgeführt. Das durch die Amplifikation mit den Primern IL6-p3 und IL6-p4 entstandene Fragment ist 756 bp lang. Der offene Leserahmen umfaßt 621 bp (Abb. 12).

```
     1  CAACTCCATC TGCCCTTCAG GAACAGCCAT GAAGTTCTTC TCAATTGCCT
    51  CCTTGGGGCT GCTCCTAGTG GTGGCTACTG CCTTCCCCGC CTCAGAACTT
   101  CAGAGAGAAG ATGGAGAGAA TAGTGTTACT CGAAATAAAC CAACACGTGC
   151  CTCTTCTGGA AAAACTCGCA GACAGATTTC CTACCTCATC AAGGAAGTCT
   201  TCGAAATGAG AAAAGAGCTG TGCAAGAATG ATGAGACCTG TATTAAGAGC
   251  CATGTGGCAG TGTCCGAAAA CAATCTGAAC CTTCCAAAGA TGACTGAAAA
   301  AGATGGATGC TTCCAAACTG GATACAATCG GGACGACTGC CTTGTGCGAA
   351  TCACCTCTGG GCTTCTGGAG TTTCAGGTCT ACCTGAGGTA CATCCGGAAC
   401  AAGTTTCAGG AAGGCAATAA CAGGGACAGA GCTGAACATG TGCAGTCCAG
   451  TTCCAAAGCC CTGATTGAGA TCCTGAAACA AGAGGTGAAG GATCCCAATA
   501  AAATAGTCTT CCCTAGCCCA ACTGCAAATA TCAACCTATT GGCAAAACTG
   551  GAGTCACAGA ATGATTGGCA GAAGGTCATG ACCATGCAAC TCATCTTGAG
   601  CAACTTTGAG GATTTCCTGC AGTTCACCCT GAGAGCTGTT CGGAAAGCAT
   651  AGTGGGCATC TAAGCTTATT GGTTCATGGG CATTGCTTCC TATGGTCAGA
   701  AAACATGTCC TGTCCACTGG GTACCTACCT TATGTTGTTC TCTACGAAGA
   751  ACTGGC
```

Abb. 12 765 bp der Woodchuck IL-6 cDNA. Der ORF besteht aus 621 bp. Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Die erhaltene Sequenz von Woodchuck IL-6 wurde mit IL-6 von Mensch, Maus, Ratte und Rind verglichen. Das Woodchuck IL-6 Vorläuferprotein umspannt eine Region von 207 Aminosäuren. Der N-Terminus des Vorläuferproteins weist typische Eigenschaften einer Signalsequenz auf. Die Sequenz beginnt mit einem positiv geladenen Aminosäurerest K2, gefolgt von einigen hydrophoben Aminosäureresten F3FSIASLGLLLVV15. Dann folgt eine kurze polarere Region, A16TA18. Durch einen Vergleich mit den Signalpeptiden der anderen IL-6 Spezies konnte die Position der Schnittstelle für die Signalpeptidase nicht genau lokalisiert werden.

Abb. 13 Sequenzvergleich von Woodchuck IL-6 mit IL-6 anderer Spezies auf Aminosäureebene.[219,236-237] Aminosäuren, die für die Funktion von IL-6 wichtig sind, wurden grau unterlegt.

Für Woodchuck IL-6 wurden im Vergleich mit IL-6 anderer Spezies Homologien auf Aminosäureebene im Bereich von 44% bis 49% berechnet. Dieser niedrige Homologiegrad wird z.B. auch beim Vergleich der humanen mit der murinen Sequenz beobachtet.

	Woodchuck	Mensch	Maus	Ratte	Rind
Woodchuck	**100 %**				
Mensch	**49 %**	100 %			
Maus	**46 %**	42 %	100 %		
Ratte	**48 %**	41 %	85 %	100 %	
Rind	**44 %**	53 %	43 %	41 %	100 %

Tab. 12 Anzahl der Identitäten bei IL-6 Proteinen unterschiedlicher Spezies. Die selbstermittelten Woodchuck Werte sind durch Fettdruck markiert.

4.1.1.4 IL-15: Amplifikation und Sequenzvergleich

Für die Amplifikation von Woodchuck IL-15 konnten Primer benutzt werden, die von der murinen IL-15 Sequenz abgeleitet wurden. Die RT-PCR erfolgte mit den Primern IL15-p2 und IL15-p1. Der offene Leserahmen von Woodchuck IL-15 umspannt eine Region von 480 bp. Durch die Amplifikation mit den Primern IL15-p5 und IL15-p6 entstand ein 609 bp langes Fragment (Abb. 14), das in den pCR2.1 Vektor kloniert wurde.

```
   1  TGGATGGATG GCTGCTGGAA ACCCATTACC ATAGCAGGCT CTTCTTCAAT
  51  ACCTGAGGAC TTACTCTGGC ATTGAGTAAT GAGAATTTCG AAACCACATT
 101  TGAGAATCAC TTCCATCCAG TGCTATGTGT GTTTACTTCT AAATAGTCAT
 151  TTTTTAACTG AGGCTGGCAT TCATGTCTTC ATTTTGGGCT GTATTAGTGC
 201  AGGTCTTCCT AAAACAGAGG CTAACTGGGA AGATGTAAGA AAGGATTTGC
 251  AAAAAATTGA AAATCTTATT CAATCTTTAC ATATGGATGC TACTTTATAT
 301  ACAGAGAGTG ATGTCCATCC CCCTTGCAAA GTAACAGCGA TGAACTGCTT
 351  CCTCCTGGAG CTAGAAGTCA TTTCACATGA GTCCAGAGAT GGAGACATAG
 401  AGGAAACAGT AAAAAACCTG ATCCTCCTAG CAAACAGTAG TTTATCTTCT
 451  AATGGGAATA CAACAGAATC TGGATGCAAA GAATGTGAAG AACTGGAGGA
 501  AAAAAATATT ACAGAATTTT TGGAGAGTTT TAAACATATT GTACAAATGT
 551  TCATCAACTG ACCCTTGATT GCAATTGATC CACTTCAGTG TTTCTGTTAT
 601  TAAGGTAC  il15
```

Abb. 14 Der ORF von Woodchuck IL-15 besteht aus 480 bp. Das Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck markiert.

Woodchuck IL-15 wurde auf Aminosäureebene mit den IL-15 Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte und Rind verglichen. Das Woodchuck IL-15 Vorläuferprotein ist 160 Aminosäuren lang. Der Vergleich mit der humanen Sequenz ergab ein 48 Aminosäuren langes Signalpeptid und ein reifes Protein, das aus 112 Aminosäuren besteht. Vier Cysteinreste, C35, C42, C85 und C88, sind in allen verglichenen Spezies erhalten.

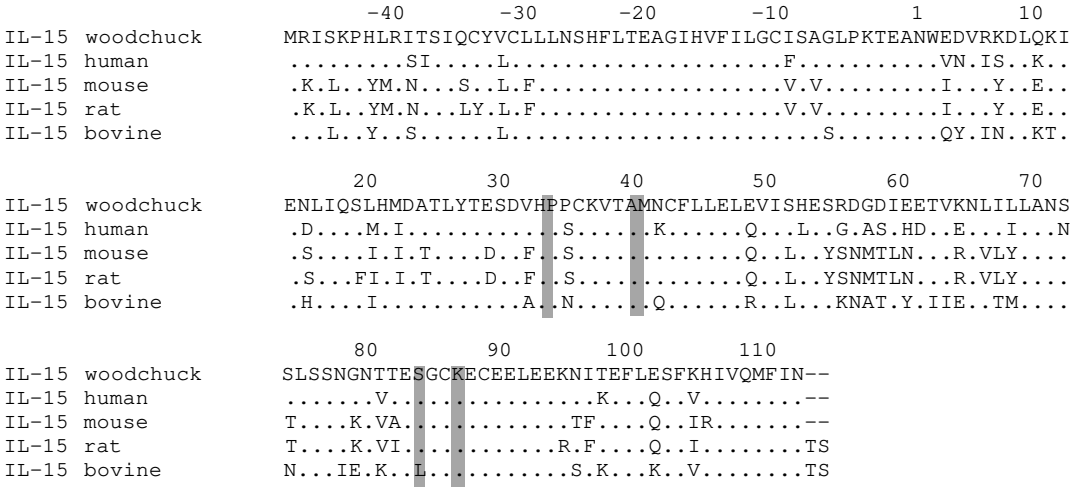


Abb. 15 Sequenzvergleich von Woodchuck IL-15 mit IL-15 anderer Spezies auf Aminosäureebene.[220,238-240] Aminosäuren, die für die Funktion von IL-15 wichtig sind, wurden grau unterlegt.

Die Anzahl der Identitäten wurde für das Woodchuck Protein berechnet. Woodchuck IL-15 ist zu 73%-83% identisch mit den IL-15 Sequenzen der anderen Spezies.

	Woodchuck	Mensch	Maus	Ratte	Rind
Woodchuck	**100 %**				
Mensch	**83 %**	100 %			
Maus	**74 %**	73 %	100 %		
Ratte	**73 %**	71 %	95 %	100 %	
Rind	**76 %**	78 %	71 %	71 %	100 %

Tab. 13 Anzahl der Identitäten bei IL-15 Proteinen unterschiedlicher Spezies. Die selbstermittelten Woodchuck Werte sind durch Fettdruck markiert.

4.1.2 Amplifikation von Teilsequenzen: IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8

4.1.2.1 Klonierung der extrazellulären Region des IFN-γ Rezeptors

Für die Amplifikation der extrazellulären Region des Woodchuck IFN-γ Rezeptors (IFN-γR) konnten Primer benutzt werden, die von der humanen IFN-γR Sequenz abgeleitet wurden. Die RT-PCR erfolgte mit den Primern IFNR-p1 und IFNR-p6. Eine *Nested* PCR war nicht erforderlich. Ein 866 bp langes Fragment konnte in den pCRII-TOPO Vektor kloniert werden.

```
  1  CCGTCGGTAG CAGC ATG GCT CTCCTCGTCT TCCTGATCCT TATGGTGCAG
 51  GCCGGGAGCA GGGCTGAGAT GAACGTCGCG GACCCAGAGC AGTCCTCGGT
101  GCCTACACCA ACTAATATTA CAATTACAAC CTATAATATG AACCCTATTC
151  TGCATTGGGA GTACCAGATC ATACCGCAGA CCCCTGTTTT CACAGTACAG
201  GTGAAAAACT ACAGGAAGGA ACAATGGACT GATGCTTGCA CTAATATCTC
251  TCATCATTAC TGTGAACTTT CTGAACAAGT TTATGATTTA TCTGAATCTT
301  TCTGGGCCAG AGTTAAAGCT AGGATTGGAC AAAAAGAATC TGTCTATGCA
351  GAGTCAAAAG AAATTATTTT ATGCATACAC GGAAAGATTG GACCACCTAC
401  ACTAGATGTC AGAAGGAAGG AAGACCAAAT CATTATTGAC ATATTTCACC
451  CTTTAATTAT TATGGGAAAA GAGGAGGTGA CTTTATATGA TGATGAAAAT
501  CCTTGTTACC CATTTAAGTA CATTGTACAT ATGAAAATTA ACAGAAGTGA
551  GATGGCAGAT ATAAAATTTG AACCAAAGGA AGATGATTGT AATGAGTCGC
601  TGTGCCAGTT GAGAATTCCT GTGTCTTCAC TGAATTCTGA GTACTGCTTT
651  TCAGCAGGAG ACTCAAACAC GTGGGGATTT ACAATGGAAG CGTCCAAAGA
701  AGTTTGTATA ACTATTTCCA ATGACAACAT AAAGGAT TTT GTTTGGATTC
751  CAGTTATTGC TGTGTTCACA GTCTTTCTAG TATTTATCAT ACTATGTGTA
801  TGTGCATGTT GTCATATTAA GAAGAATCCA TTTAAGAAAA AAAGCATAAT
851  GTTACCTAAG TCCTTG  ifnr
```

Abb. 16 852 bp des ORFs von Woodchuck IFN-γR. Das Startcodon und das letzte Triplett der extrazellulären Region wurden durch Fettdruck markiert.

(Abb. 16)

IFNRpCRTO wurde sequenziert und die Sequenz wurde mit den Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte auf Aminosäureebene verglichen. Durch den Vergleich ergab sich ein 17 Aminosäuren langes Signalpeptid. Die extrazelluläre Region endet bei F245 der Woodchuck Sequenz und umspannt somit 228 Aminosäuren.

```
                                -10         1       10        20        30
IFN-γR woodchuck    MA---------LLVFLILMVQAGSRAEMNVADPEQSSVPTPTNITITTYNMNPILHWEYQ
IFN-γR human         ..---------..FL.P.VM.GV.....GT..LGP........V..ES......VY....
IFN-γR mouse         .GPQAAAGRMI...V.M.SAKV..G.LTSTE...PP...V...VL.KS..L..VVC....
IFN-γR rat           ------------------------------------------------------------

                         60        70          80        90       100       110
IFN-γR woodchuck    IIPQTPVFTVQVKNYRKEQ--WTDACTNISHHYCELSEQVYDLSESFWARVKARIGQKES
IFN-γR human         .M..V.....E....GVKNSE.I...I.......NI.DH.G.P.N.L.V.....V.....
IFN-γR mouse         NMS...I......V.-SGS--...S.....D.C.NIY..IMYPDV.A......KV.....
IFN-γR rat           ------------------------------------------------------------

                          120       130       140       150         160
IFN-γR woodchuck    VYAESKEIILCIHGKIGPPTLDVRRK-EDQIIIDIFHPLIIM-GKEEV-TLYDDENPCYP
IFN-γR human         A..K.E.FAV.RD......K..I.KE-.K..M......SVFVN.D.QE-VD..P.TT..I
IFN-γR mouse         D..R...FLM.LK..V...G.EI...K.E.LSVLV...EVVV-NG.SQG.MFG.GST..T
IFN-γR rat           --------.M.RK..V...G..IG..-...L.VH....KVNV-SQ.---.MFG.G.T..T

                   170       180       190       200       210       220
IFN-γR woodchuck    FKYIVHMKINRS-EMADIKFEPKEDDCNESLCQLRIPVSSLNSEYCFSA-GDSNTWGFTM
IFN-γR human         RV.N.YVRM.G.-.IQYKILTQ.....D.IQ...A........Q..V..E.VLHV..V.T
IFN-γR mouse         .D.T.YVEH...G.ILHT.HTVEKEE...T..E.N.S..T.D.R..I.VD.I.SF.QVRT
IFN-γR rat           .D.T.FV.HY..G.ILHTEHSVLKE..S.T..E.N.S..T...N..V.VV.K.SF.QVNT

                     230       240       250       260         270       280
IFN-γR woodchuck    EASKEVCITISNDNIKDFVWIPVIAVFTVFLVFIILCVCA--CCHIKK-NPFKKKSIMLP
IFN-γR human         .K........F.SS..GSL....V.ALLL...--LSL.FI--.FY...I..L.E...I..
IFN-γR mouse         .K..D...PPFH.DR..SI..L.V.PL...T.V.--L.F.--YWYT..-.S..R......
IFN-γR rat           .T..D...PFLH.DREESI.MLLV.----P.L.LTIV.P.LV..Y...-....R..----


IFN-γR woodchuck    KSL
IFN-γR human        ...
IFN-γR mouse        ...
IFN-γR rat          ---
```

Abb. 17 Sequenzvergleich von Woodchuck IFN-γR mit IFN-γR anderer Spezies auf Aminosäureebene.[241-243]

Die Homologie der IFN-γR Proteine wurde nur für Woodchuck, Mensch und Maus berechnet, da der N-Terminus der Ratte nicht bekannt ist. Es wurde nur der für das Woodchuckprotein bekannte Bereich verglichen.

	Woodchuck	Mensch	Maus
Woodchuck	**100 %**		
Mensch	**60 %**	100 %	
Maus	**51 %**	51 %	100 %

Tab. 14 Anzahl der Identitäten bei der extrazellulären Region von IFN-γR Proteinen unterschiedlicher Spezies. Die selbstermittelten Woodchuck Werte sind durch Fettdruck markiert.

4.1.2.2 Klonierung einer Teilsequenz von β-Aktin

Für die Amplifikation einer Teilsequenz von Woodchuck β-Aktin konnten Primer benutzt werden, die von der humanen β-Aktin Sequenz abgeleitet wurden. Die RT-PCR erfolgte mit den Primern Act-p1 und Act-p2 führte zur Amplifikation eines 379 bp langen Fragments. Eine *Nested PCR* war nicht notwendig.

```
  1  ACCAACTGGG ACGACATGAG AAGATTTGGC ACCACACCTT CTACAATGAG
 51  CTGCGTGTGG CTCCTGAGGA GCACCCTGTG CTGCTGACCG AGGCTCCCCT
101  GAACCCTAAG GCCAACCGTG AGAAGATGAC CCAGATCATG TTTGAGACCT
151  TCAACACCCC AGCCATGTAT GTGGCCATCC AGGCTGTGCT GTCCCTGTAT
201  GCCTCTGGCC GTACCACTGG CATTGTGATG GACTCCGGTG ATGGGGTCAC
251  CCACACAGTG CCCATCTATG AGGGGTATGC CCTTCCCCAC GCCATCCTGC
301  GTCCGGACCT GGCTGGCCGG GACCTGACAG ACTACCTCAT GAAGATCCTG
351  ACTAAGCGTG GCTACAGCTT CACCACCAC
```

Abb. 18 379 bp des ORFs von Woodchuck β-Aktin. Start- bzw. Stopcodon sind in diesem Fragment nicht enthalten.

4.1.2.3 Klonierung einer Teilsequenz von CD8

Für die Amplifikation einer Teilsequenz von Woodchuck CD8 konnten Primer benutzt werden, die von der Woodchuck CD8 Sequenz abgeleitet wurden. Die RT-PCR erfolgte mit den Primern CD8-S1 und CD8-AS1. Eine *Semi-nested* PCR mit den Primern CD8-S1 und CD8-AS4 führte zu einer Amplifikation eines 124 bp langen Fragments (Abb. 19).

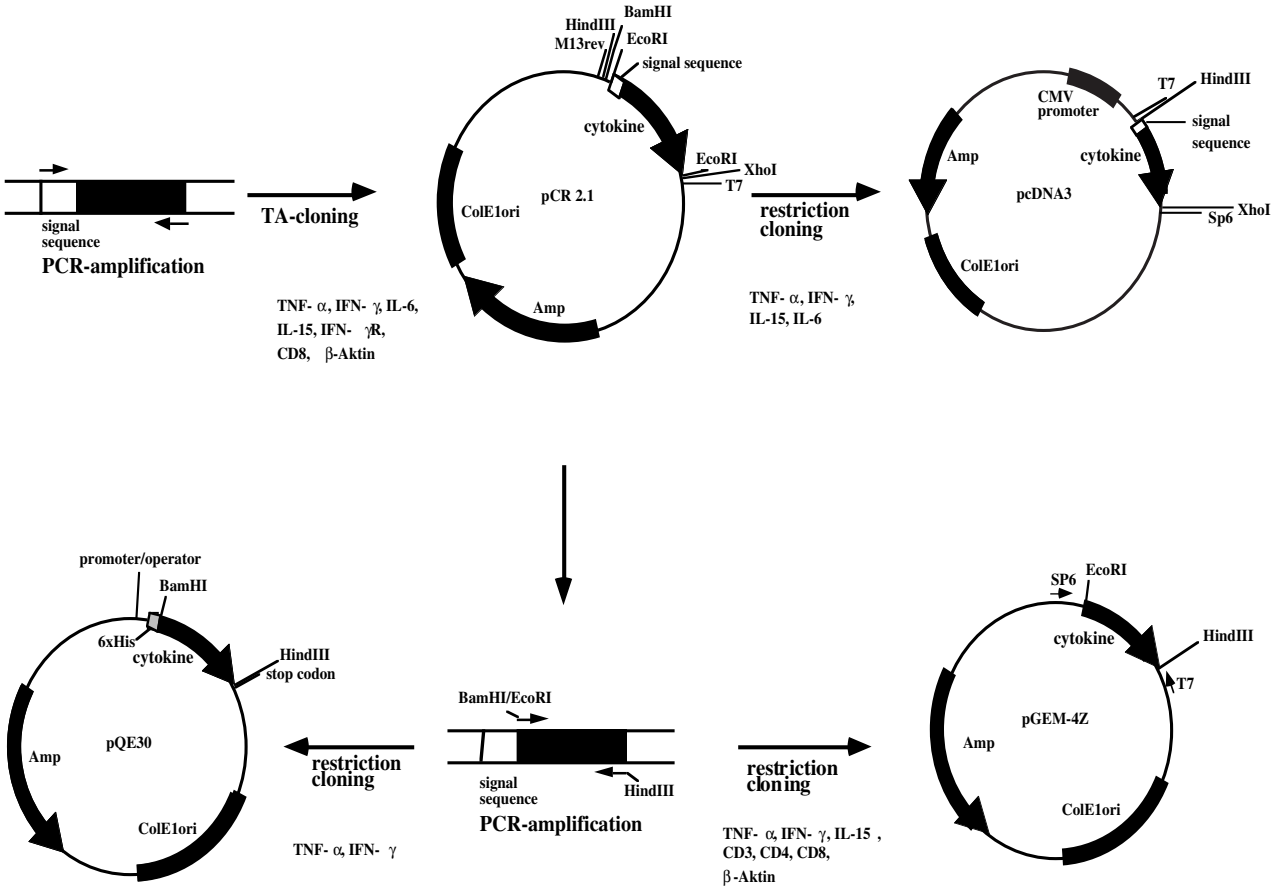
```
  1  TGGACTTCGC CTGTGATATC TACATCTGGG CGCCCTTGGC TGGGACCTGC
 51  GCGGTCCTTC TGTTGTCACT GGTCATCACC GTCATCTGTC ACCACCGGAA
101  ACGAAGGCGT GTTTGCAAAT GTCC  cd8
```

Abb. 19 124 bp des ORFs von Woodchuck CD8. Start- bzw. Stopcodon sind in diesem Fragment nicht enthalten.

Die erhaltene Sequenz entspricht zu 100% auf Nukleotidebene dem von C. Seeger veröffentlichtem Woodchuck CD8 Klon; ist allerdings aufgrund der Primerwahl am 3´-Ende um 7 Nukleotide verkürzt.

4.1.3 Subklonierungen

Die durch RT-PCR Amplifikation erhaltenen cDNA Fragmente wurden für unterschiedliche Zwecke in verschiedene Vektoren subkloniert (Abb. 20). TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-15 wurden zunächst in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 Vektor subkloniert. Die Umklonierung erfolgte durch Restriktion mit den Endonukleasen und durch Ligation in den mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor. Diese Konstrukte wurden für die Transfektion von Säugerzellen, wie BHK und Woodchuck Hepatomazellen benutzt, um dann die Transfektionsüberstände auf die entsprechenden Proteine zu untersuchen. TNF-α und IFN-γ wurden zusätzlich in den bakteriellen Expressionsvektor pQE subkloniert, wobei durch eine PCR die Signalsequenzen entfernt wurden, damit die Proteine gleich in der reifen Form von den *E. coli* exprimiert werden. Gleichzeitig wurden für die gerichtete Ligation in den Vektor benötigten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII insertiert. Das PCR-Produkt wurde zunächst durch *TA-cloning* in pCR2.1 kloniert. Die Umklonierung erfolgte gerichtet durch Restriktion von pQE30 und des Inserts mit BamHI und HindIII und anschließende Ligation. Der Vektor pQE30 enthält eine Nukleinsäuresequenz, die an das zu exprimierende Protein ein His-Tag anhängt. Diese aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinen bestehende Sequenz erleichtert durch ihre hohe Affinität zu Ni^{2+} Ionen den Nachweis und die Aufreinigung der Proteine. Für den *RNAse Protection Assay* wurden Fragmente von TNF-α, IFN-γ, IL-15, CD3, CD4, CD8 und β-Aktin in den pGEM4Z Vektor subkloniert (s. 4.4). Diese Klonierung erfolgte unter Benutzung der Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII entsprechend der Klonierung in pQE30. Die MCS wird vom SP6 und T7 RNA Polymerase Promotor flankiert. Durch *in vitro* Transkription vom T7 Promotor aus werden *antisense* Transkripte, die für den *RNAse Protection Assay* benötigt werden, geschrieben.



4.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine

4.2.1 Expression in Säugerzellen

4.2.1.1 TNF-α

Im Plasmid TNFpcDNA3 steht Woodchuck TNF-α unter der Kontrolle des CMV Promotors. Zwei Klone wurden in BHK Zellen transfiziert und die Transfektionsüberstande im L929 Cytotoxizitätstest (s. auch) getestet.

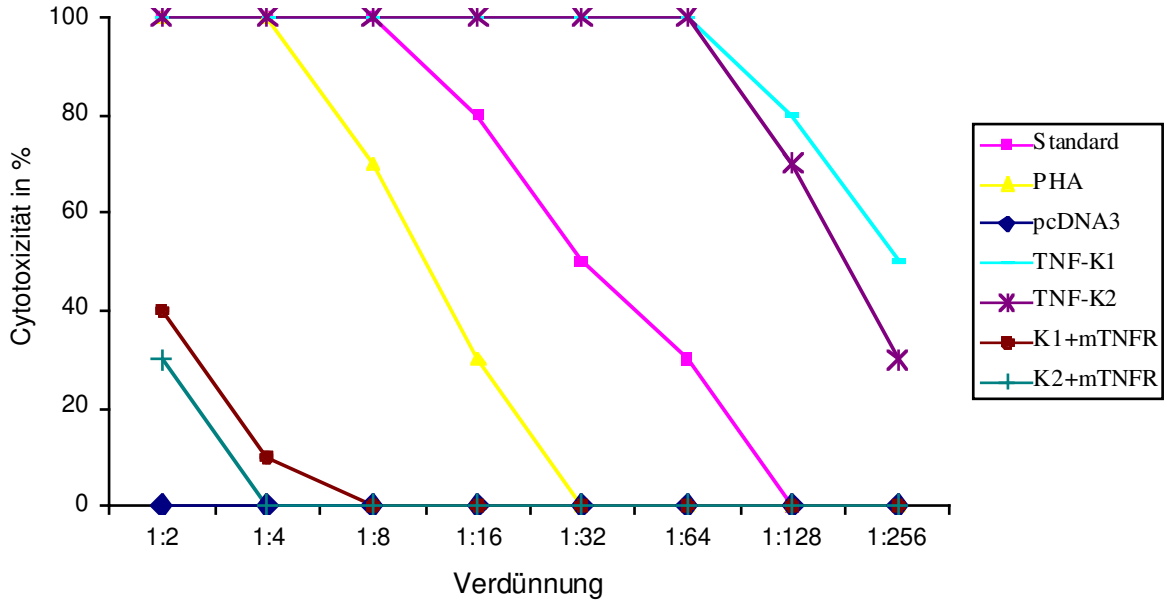


Abb. 21 TNF-α Bioassay. Die Transfektionsüberstände zweier Woodchuck TNF-α Klone (TNF-K1 und TNF-K2) wurden im Cytotoxizitätstest gemessen. Bei der als PHA bezeichneten Probe wurde der Überstand von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten eingesetzt. Als Standard wurde murines TNF-α (32 U/ml) benutzt. pcDNA3 steht für den Transfektionsüberstand der Kontrolltransfektion mit leerem pcDNA3 Vektor. TNF-K1 und TNF-K2 wurden zusätzlich mit konstanten Mengen an löslichem murinem TNF-α Rezeptor I (2 µg/ml) neutralisiert.

Die Transfektionsüberstände beider TNF-α Klone sind cytotoxisch für L929 Zellen. Die Cytotoxizität von Woodchuck TNF-α kann durch Neutralisation mit murinem TNF-α Rezeptor I aufgehoben werden. Für die weiteren Versuche wurde der Klon TNF-K1 benutzt.

4.2.1.2 IFN-γ

Im Plasmid IFNpcDNA3 steht Woodchuck IFN-γ unter der Kontrolle des CMV Promotors. IFNpcDNA3 wurde in 12/6 Zellen transfiziert und der Transfektionsüberstand im IFN-γ Bioassay (s) gemessen.

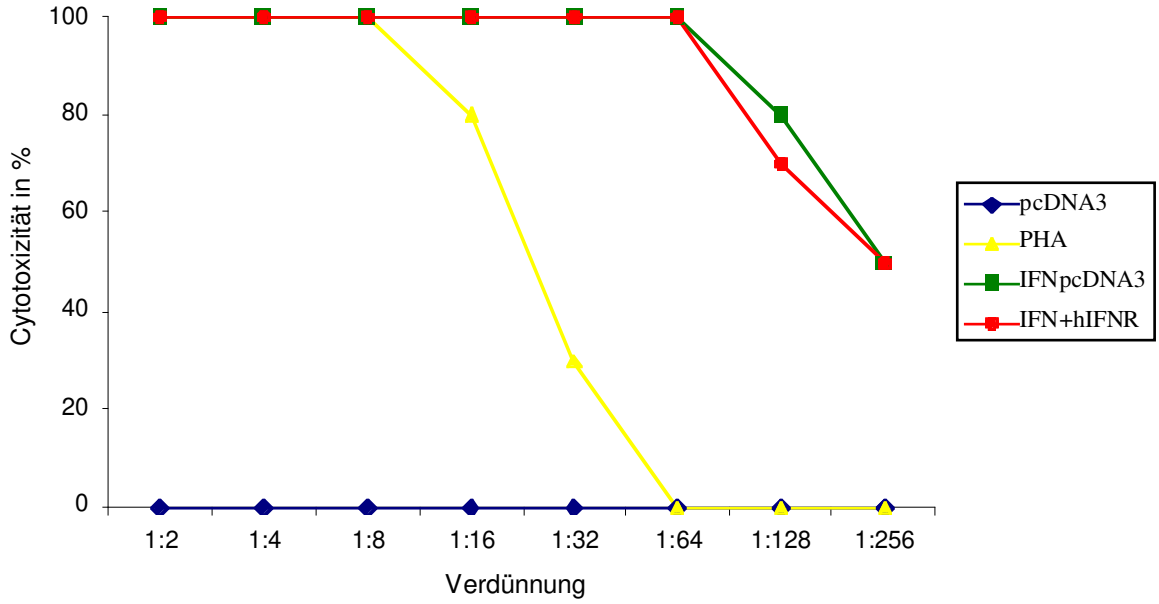


Abb. 22 IFN-γ Bioassay. Der Transfektionsüberstand des Woodchuck IFN-γ Klons IFNpcDNA3 wurde im IFN-γ Bioassay gemessen. Bei der als PHA bezeichneten Probe wurde der Überstand von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten eingesetzt. pcDNA3 steht für den Transfektionsüberstand der Kontrolltransfektion mit leerem pcDNA3 Vektor. Der IFNpcDNA3 Transfektionsüberstand wurde zusammen mit löslichem humanen IFNR inkubiert und in den Test eingesetzt.

Woodchuck IFN-γ ist in der Lage Woodchuckzellen (12/6) vor der Infektion mit EMC Virus zu schützen. Der Zellüberstand von PHA-stimulierten Lymphozyten wurde als Testkontrolle eingesetzt. Woodchuck IFN-γ kann nicht mit löslichem humanen IFN-γ Rezeptor neutralisiert werden.

4.2.1.3 IL-15

Im Plasmid IL15pcDNA3 steht Woodchuck TNF-α unter der Kontrolle des CMV Promotors. BHK Zellen wurden mit zwei leicht unterschiedlichen Klone transfiziert und die Überstände im IL-15 Proliferationsassay gemessen.

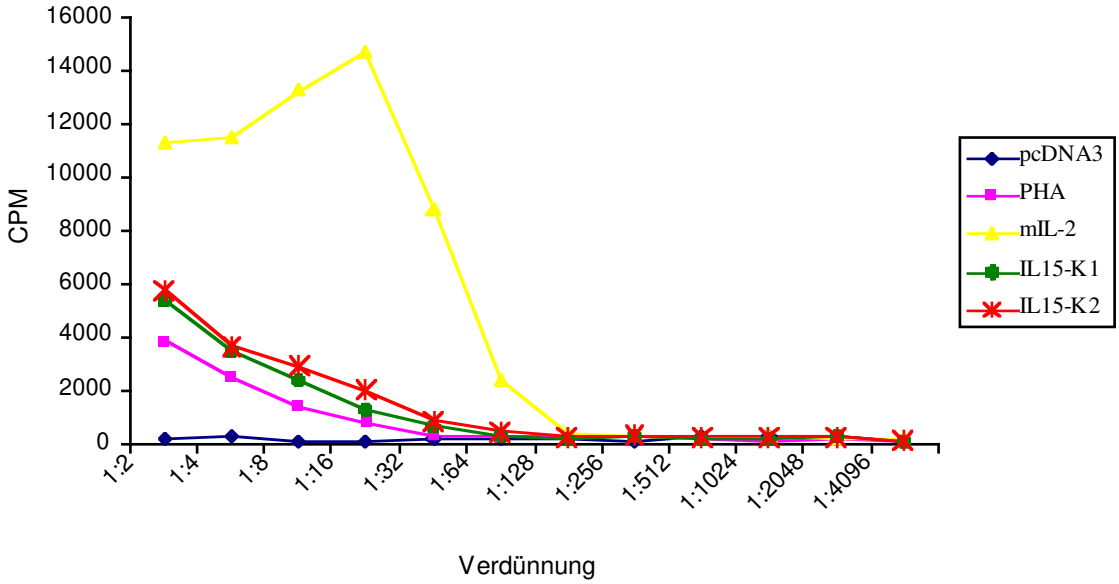


Abb. 23 IL-15 Proliferationsassay. Der Transfektionsüberstand der Woodchuck IL-15 Klone (IL15-K1 und IL15-K2) wurden im IL-15 Proliferationsassay gemessen. Bei der als PHA bezeichneten Probe wurde der Überstand von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten eingesetzt. pcDNA3 steht für den Transfektionsüberstand der Kontrolltransfektion mit leerem pcDNA3 Vektor. Murines IL-2 wurde als Positivkontrolle für den Test eingesetzt.

CTLL Zellen, die mit murinem IL-2 behandelt wurden, proliferierten am stärksten. Aber auch beide IL-15 Transfektionsüberstände und der Zellüberstand PHA stimulierter Woodchucklymphozyten führten zur Proliferation der CTLL Zellen.

4.2.2 Expression von Woodchuck TNF-α und IFN-γ im großen Maßstab

4.2.2.1 TNF-α: Expression und Reinigung

Biologisch aktives Woodchuck TNF-α wurde in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde der bakterielle Expressionsvektor TNFpQE30 (s. 2) in *E. coli* transformiert, die zur Kontrolle der Expression bereits das Plasmid pREP4 enthalten. Durch die Zugabe von IPTG kann dann die Expression von TNF-α induziert werden. Rekombinantes Woodchuck TNF-α erwies sich als löslich in 0,25% Tween; 0,1 mM EGTA und konnte unter diesen Bedingungen durch die Bindung des eingefügten *His-Tags* an Nickelionen und anschließende Elution mit Imidazol aufgereinigt werden (Details s. Teil III, Abschnitte 2.2.3 und 2.2.4). Abb. 24 zeigt die Analyse des Rohextraktes aus *E. coli,* rekombinantes TNF-α nach der Reinigung über

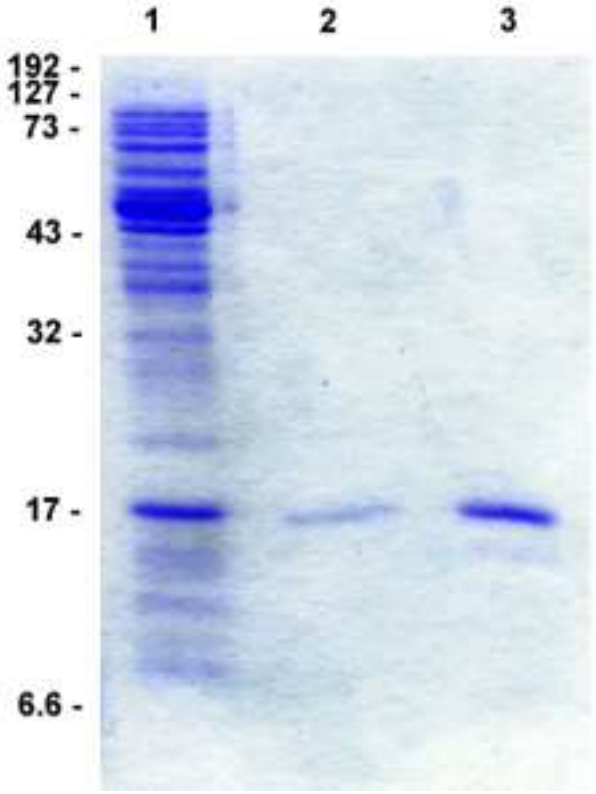


Abb. 24 Gelelektrophoretische Analyse von rekombinantem Woodchuck TNF-α. Spur 1: *E. coli* Rohextrakt; Spur 2: Eluat des zweiten FPLC Schrittes; Spur 3: entsalztes und konzentriertes TNF-α

Nickelagarose und nach Entsalzung und Konzentrierung.

In den Spuren 1-3 kann die Reinigung von Woodchuck TNF-α deutlich beobachtet werden. Die Laufstrecke von Woodchuck TNF-α entspricht einem Molekulargewicht von 17 kDa. Das berechnete Molekulargewicht der monomeren Form von TNF-α ist 14 kDa. Da unter den denaturierenden Bedingungen des SDS-Polyacrylamidgels nicht festgestellt werden kann, ob TNF-α in der funktionellen trimeren Form vorliegt, wurde eine Gelfiltration unter nativen Bedingungen durchgeführt. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde zunächst eine Eichgerade für die Superdex 75 HR 10/30 Säule aufgestellt. Als Eichproteine wurden Kälberserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) eingesetzt. Das Totvolumen der Säule wurde mit dem Farbstoff Blue Dextran 2000 (2000 kDa) bestimmt. Der Koeffizient K_{av} wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$K_{av} \quad \frac{V_r - V_o}{V_t - V_o}$$

mit V_r = Retentionsvolumen

V_o = Totvolumen der Säule = Retentionsvolumen von Blue Dextran 2000; hier = 7,9 ml

V_t = Gesamtbettvolumen der Säule; hier = 24 ml

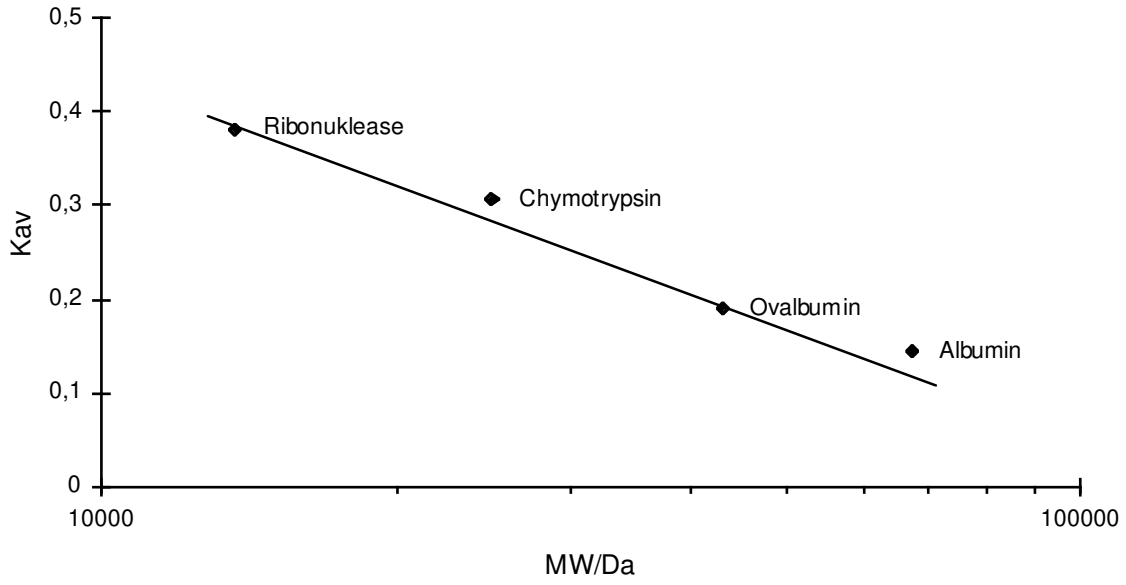


Abb. 25 Eichgerade für Superdex 75 Säule. Der Koeffizient K_{av} wurde semilogarithmisch gegen das Molekulargewicht in Da aufgetragen.

Nach der Kalibrierung der Säule und Aufstellung der Eichgerade wurde eine Gelfiltration mit Woodchuck TNF-α durchgeführt. Das aufgezeichnete Chromatogramm ist in Abb. 26 zu sehen.

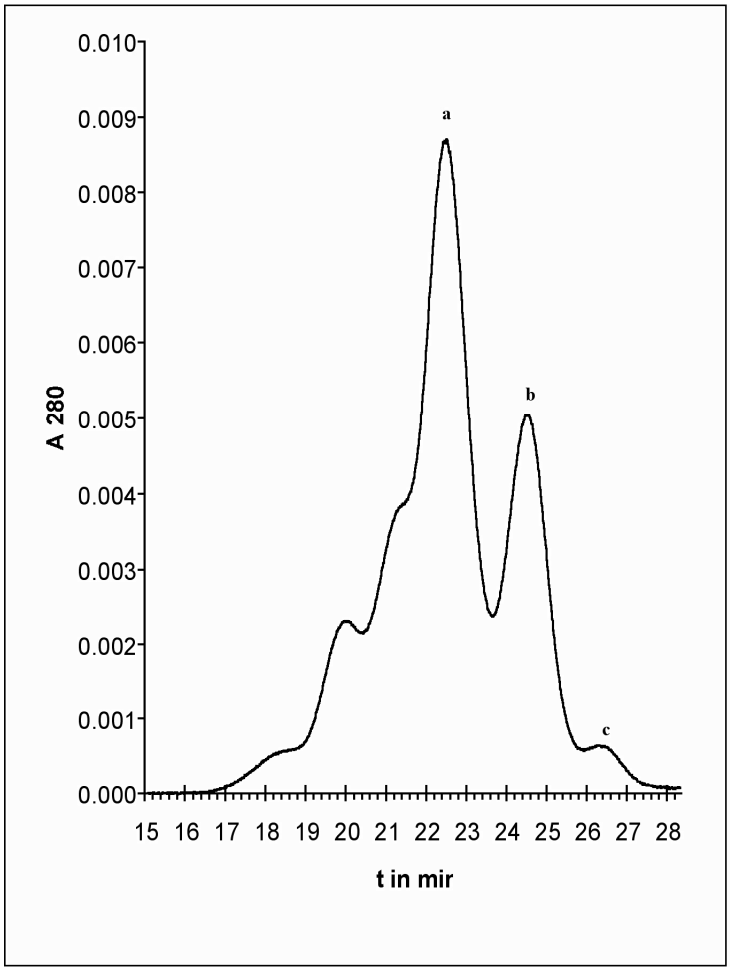


Abb. 26 Chromatogramm von TNF-α. Die Extinktion bei 280 nm ist gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Peak a: trimere Form; Peak b: dimere Form; Peak c: monomere Form. Laufmittel: PBS

Im Chromatogramm von TNF-α konnten 3 Peaks identifiziert werden. Der Gehalt an TNF-α in den entsprechenden Fraktionen wurde durch Westernblotanalyse unter Benutzung des Ni-HRP-Konjugates bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die trimere Form wurde zuerst eluiert, die Retentionszeit betrug 22,4 min; damit kann ihr ein Molekulargewicht von 49 kDa zugeordnet werden. Das aus der Anzahl der Aminosäuren vorausgesagte Molekulargewicht beträgt 51 kDa. Für die dimere bzw. monomere Form wurden Retentionszeiten von 24,2 min bzw. 26,4 min bestimmt. Daraus ergaben sich Molekulargewichte von 33 kDa bzw. 17 kDa. Die berechneten Molekulargewichte betragen hier 34 kDa bzw. 17 kDa. Der Anteil der trimere Form beträgt etwa 60% der Gesamtmenge. Die Ergebnisse der Gelfiltration sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

	T_r/min	V_r/ml	K_{av}	MW_{det}/kDa	MW_{calc}/kDa	Struktur
Peak a	22,4	10,8	0,18	49	51	Trimer
Peak b	24,2	11,6	0,23	33	34	Dimer
Peak c	26,4	13,2	0,33	17	17	Monomer

Tab. 15 Ergebnisse der Gelfiltration von Woodchuck TNF-α. Aufgeführt sind die Retentionszeit T_r, das Retentionsvolumen V_r, der Koeffizient K_{av}, das durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht MW_{det}, das aus der Anzahl der Aminosäuren berechnete Molekulargewicht MW_{calc} und die zugeordnete Struktur.

Zur Überprüfung der biologischen Funktion von rekombinantem Woodchuck TNF-α wurde ein Cytotoxizitätstest durchgeführt.

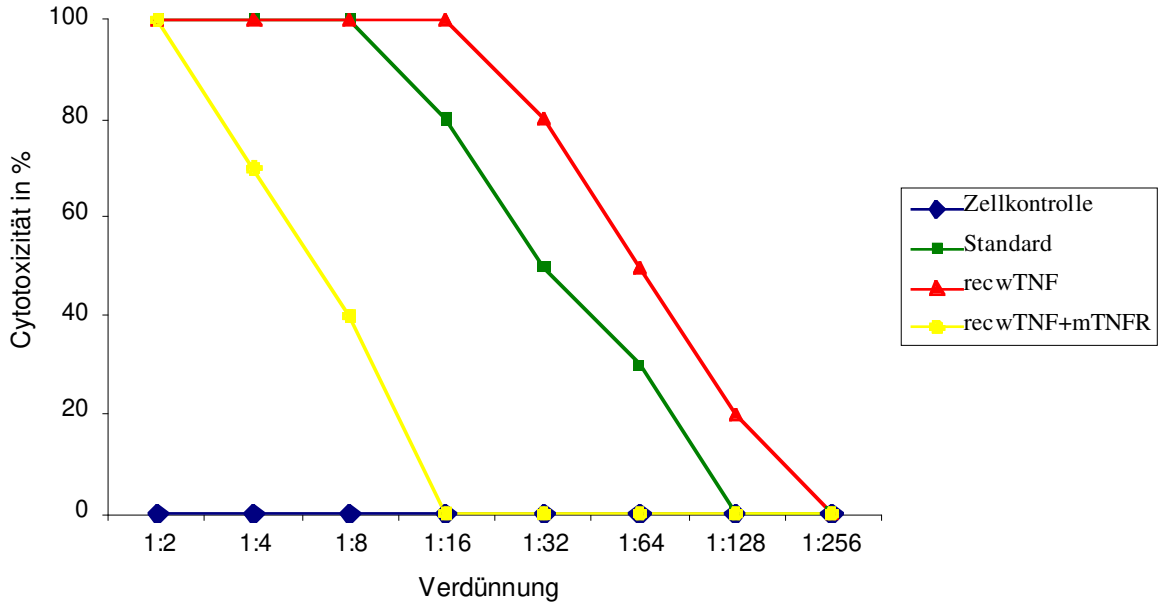


Abb. 27 Cytotoxizitätstest mit rekombinantem Woodchuck TNF-α. Die Zellkontrolle besteht aus unbehandelten L929 Zellen. Als Standard wurde murines TNF-α benutzt. Rekombinantes Woodchuck TNF-α (recwTNF) wurde in einer Konzentration von 16–0,125 µg/ml eingesetzt. Die gleiche TNF-α Verdünnungsreihe wurde mit murinem TNF-α Rezeptor I neutralisiert; der Rezeptor wurde konstant in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

Woodchuck TNF-α zerstört 50 % der Zellen bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Daraus ergibt sich eine spezifische Aktivität von 2000 U/mg. Die Aktivität von Woodchuck TNF-α wird durch Zugabe von murinem TNF-α Rezeptor I aufgehoben.

4.2.2.2 IFN-γ: Expression und Reinigung

Biologisch aktives Woodchuck IFN-γ wurde in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde der bakterielle Expressionsvektor IFNpQE30 (s. 2) in *E. coli* transformiert, die zur Kontrolle der Expression bereits das Plasmid pREP4 enthalten. Durch die Zugabe von IPTG kann dann die Expression von IFN-γ induziert werden. Rekombinantes Woodchuck IFN-γ erwies sich als löslich in 8M Harnstoff/PBS und konnte unter diesen Bedingungen durch die Bindung des eingefügten His-Tags an Nickelionen und anschließende Elution mit Imidazol aufgereinigt werden (Details s. Teil III, Abschnitte 2.2.3 und 2.2.4). Abb. 28 zeigt die Analyse des Rohextraktes aus *E. coli,* rekombinantes IFN-γ nach der Reinigung über Nickelagarose und

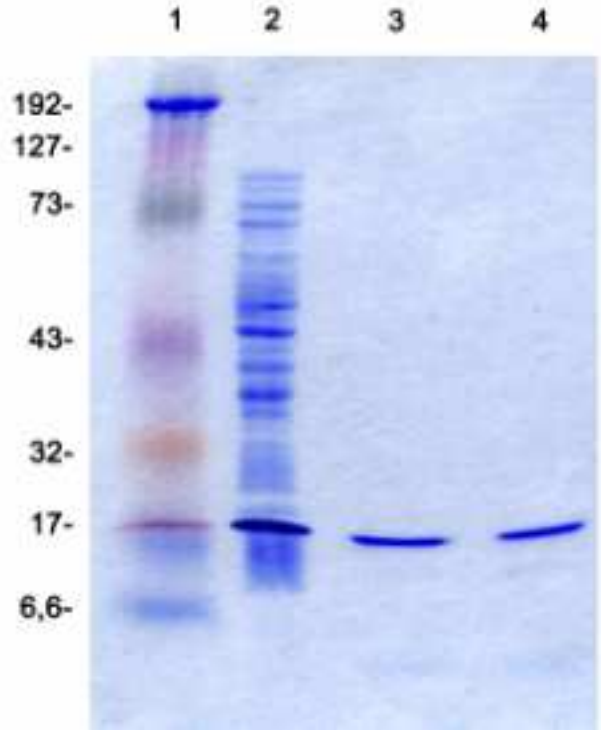


Abb. 28 Gelelektrophoretische Analyse von rekombinantem Woodchuck IFN-γ. Spur 1: *E. coli* Rohextrakt; Spur 2: Eluat des zweiten FPLC Schrittes; Spur 3: entsalztes und konzentriertes IFN-γ.

nach Entsalzung und Konzentrierung.

In den Spuren 1-3 ist die Reinigung von Woodchuck IFN-γ zu sehen. Die Laufstrecke von Woodchuck IFN-γ entspricht einem Molekulargewicht von 17 kDa. Das berechnete

Molekulargewicht der monomeren Form von IFN-γ beträgt 16 kDa. Da unter den denaturierenden Bedingungen des SDS-Polyacrylamidgels nicht festgestellt werden kann, ob IFN-γ in der funktionellen dimeren Form vorliegt, wurde eine Gelfiltration unter nativen Bedingungen durchgeführt.

Abb. 29 zeigt das Chromatogramm von Woodchuck IFN-γ. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde die Eichgerade aus Abb. 25 benutzt.

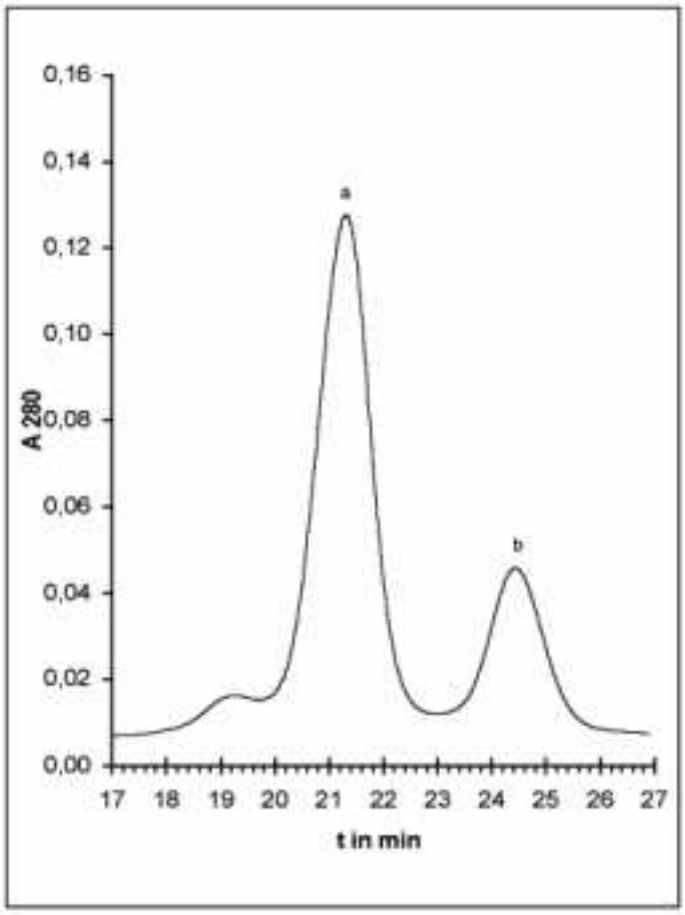


Abb. 29 Chromatogramm von IFN-γ. Die Extinktion bei 280 nm ist gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Peak a: dimere Form; Peak b: monomere Form. Laufmittel: PBS

Im Chromatogramm von IFN-γ konnten 2 Peaks identifiziert werden. Die entsprechenden Fraktionen wurden durch Westernblotanalyse unter Benutzung des Ni-HRP-Konjugates bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die dimere Form wurde zuerst eluiert, die Retentionszeit betrug 21,3 min; damit kann ihr ein Molekulargewicht von 34 kDa zugeordnet werden. Das aus der Anzahl der Aminosäuren vorausgesagte Molekulargewicht beträgt 32 kDa. Für die

monomere Form wurde eine Retentionszeit von 24,4 min bestimmt. Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 16 kDa. Das berechnete Molekulargewicht beträgt ebenfalls 16 kDa. Die dimere Form hat einen Anteil von etwa 75% der Gesamtmenge. Die Ergebnisse der Gelfiltration sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

	T_r/min	V_r/ml	K_{av}	MW_{det}/kDa	MW_{calc}/kDa	Struktur
Peak a	21,3	11,5	0,22	34	32	Dimer
Peak b	24,4	13,3	0,34	16	16	Monomer

Tab. 16 Ergebnisse der Gelfiltration von Woodchuck IFN-γ. Aufgeführt sind die Retentionszeit T_r, das Retentionsvolumen V_r, der Koeffizient K_{av}, das durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht MW_{det}, das aus der Anzahl der Aminosäuren berechnete Molekulargewicht MW_{calc} und die zugeordnete Struktur.

Zur Überprüfung der biologischen Funktion von Woodchuck IFN-γ und zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde ein Bioassay durchgeführt (Abb. 30). 12/6 Zellen wurden mit dem entsalzten rekombinanten Protein in Verdünnungen von 480 ng/ml bis 3,75 ng/ml behandelt.

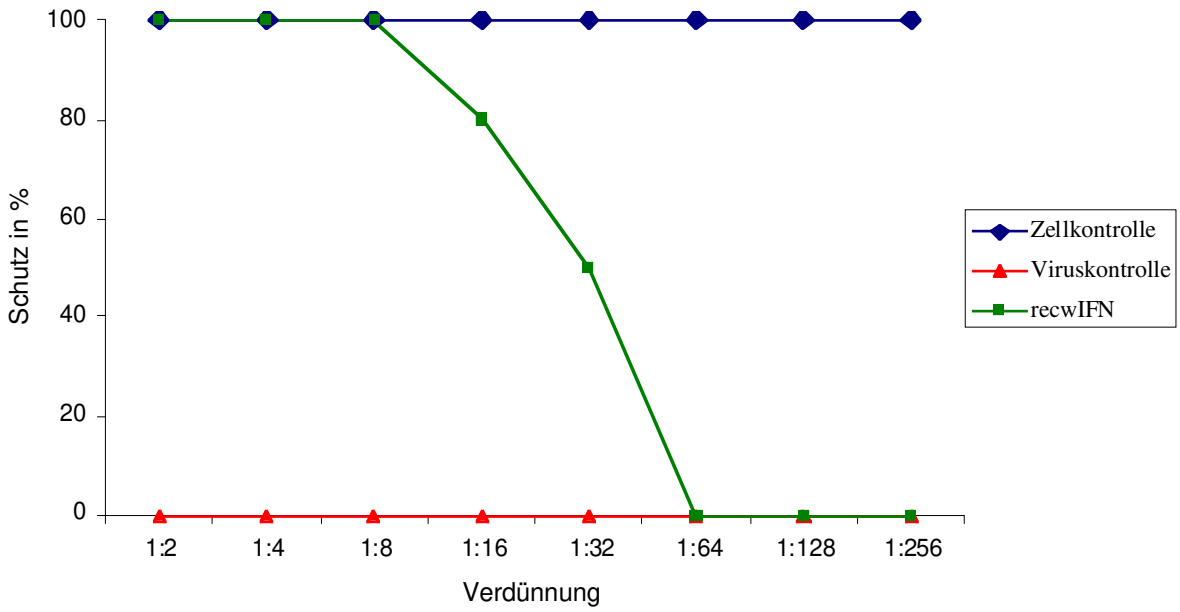


Abb. 30 Bioassay mit rekombinantem Woodchuck IFN-γ. Die Zellkontrolle besteht aus unbehandelten 12/6 Zellen. Für die Viruskontrolle wurden die Zellen nur mit Virus versetzt. Rekombinantes Woodchuck IFN-γ wurde in Konzentrationen von 480 ng/ml bis 3,75 ng/ml eingesetzt.

Das gereinigte Woodchuck IFN-γ ist in der Lage 12/6 Zellen vor der Infektion mit ECMV zu schützen. Da kein Standard zur Verfügung steht, wurde die Aktivität von IFN-γ durch Ermittlung der effektiven Dosis bei der die Hälfte der Zellen vor der Zerstörung durch das Virus geschützt sind (ED_{50}), berechnet. Die ED_{50} der benutzten Charge IFN-γ betrug 30 ng/ml. Daraus ergibt sich eine spezifische Aktivität von 30000 U/ml.

4.2.3 Generierung von Antiseren

4.2.3.1 TNF-α

Für die Generierung von Antiseren gegen Woodchuck TNF-α wurden 2 Kaninchen mit dem rekombinanten Woodchuckprotein immunisiert. Die Antiseren S1 und S2 wurden im Westernblot auf ihre Fähigkeit TNF-α zu binden getestet.

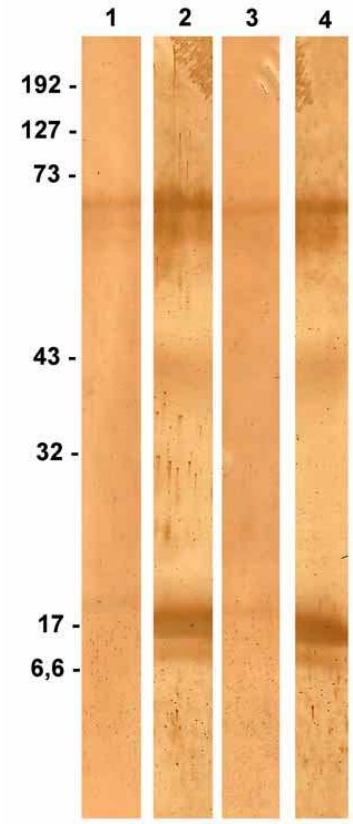


Abb. 31 Woodchuck TNF-α Immunoblot. Spur 1: Präserum 1, Spur 2: α-TNF-α Serum 1, Spur 3: Präserum 2, Spur 4: α-TNF-α Serum 2. Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

In Spur 2 und 4 konnte jeweils eine Bande mit einer Laufstrecke, die 17 kDa entspricht, identifiziert werden. Diese Bande konnte nicht durch die Inkubation mit den Präseren sichtbar gemacht werden. Beide Seren enthalten Antikörper, die in der Lage sind, Woodchuck TNF-α zu binden.

Zur Überprüfung der Neutralisationsfähigkeit der Antiseren wurde ein Cytotoxizitätstest durchgeführt, bei dem rekombinantes TNF-α und der Überstand von PHA stimulierten Lymphozyten vor dem Test mit den Prä- und Antiseren inkubiert wurden.

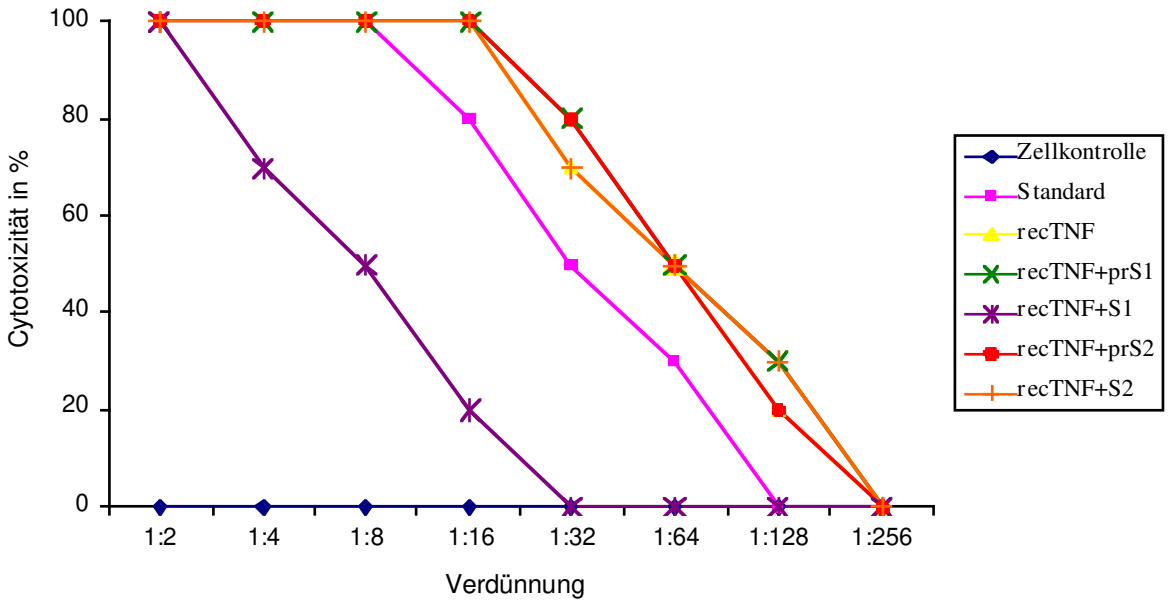


Abb. 32 Cytotoxizitätstest zur Überprüfung der Neutralisationseigenschaften der Antiseren gegen Woodchuck TNF-α. Die Zellkontrolle besteht aus unbehandelten L929 Zellen. Als Standard wurde murines TNF-α benutzt. Rekombinantes Woodchuck TNF-α (recwTNF) wurde in einer Konzentration von 16–0,125 µg/ml eingesetzt. Die gleiche Verdünnungsreihe wurde vor dem Test jeweils mit 10 µl Serum inkubiert.

Die cytotoxische Aktivität von rekombinantem Woodchuck TNF-α wurde im Test durch Serum 1 neutralisiert. Serum 2 dagegen wirkte sich nicht auf die Cytotoxizität aus. Beide Präseren beinträchtigten die Funktion von TNF-α nicht. Um festzustellen, ob Serum 1 auch in der Lage ist natürlich gebildetes TNF-α zu neutralisieren, wurde der Cytotoxizitätstest mit dem Überstand von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten wiederholt.

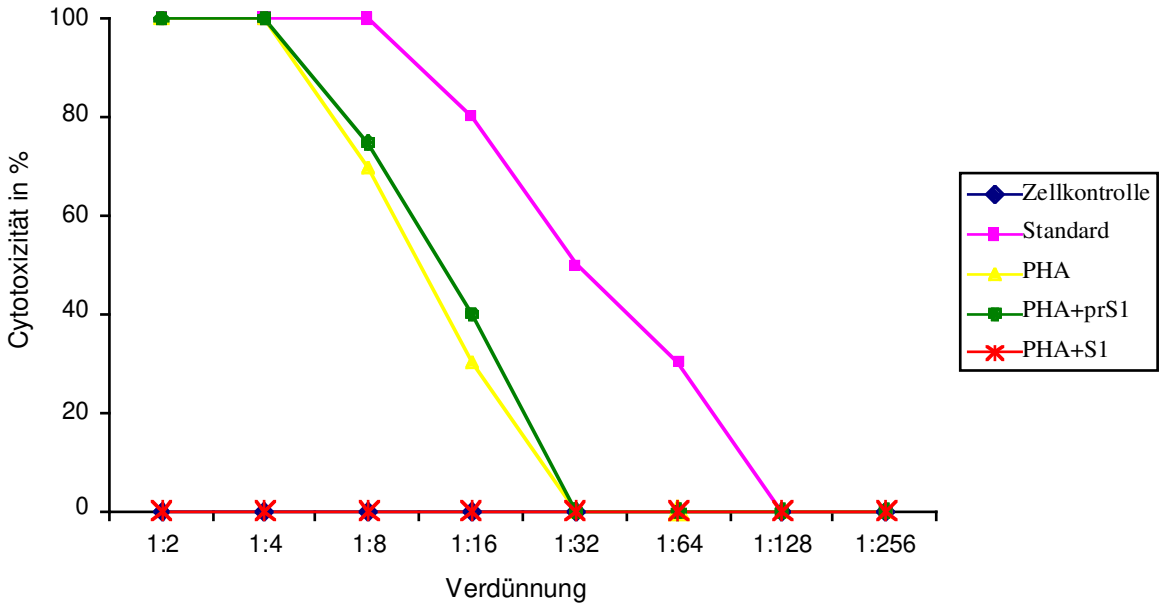


Abb. 33 Cytotoxizitätstest zur Überprüfung der Neutralisationseigenschaften der Antiseren gegen Woodchuck TNF-α. Die Zellkontrolle besteht aus unbehandelten L929 Zellen. Als Standard wurde murines TNF-α benutzt. Der Überstand von PHA stimulierten Zellen wurde entweder direkt (PHA) oder nach Inkubation mit jeweils 10 µl Präserum1 und Serum 1 in den Assay eingesetzt.

Serum 1 neutralisiert außer rekombinantem TNF-α auch das von Woodchuck Lymphozyten produzierte TNF-α. Das Präserum zeigte auch hier keine Wirkung auf die Funktion von TNF-α. Aus dem Serum wurde über eine Protein G Säule IgG Antikörper isoliert. Die aufgereinigten Antikörper wurden wiederum im Cytotoxizitätsassay getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnte ermittelt werden, daß 1 mg anti TNF-α IgG 24 µg TNF-α neutralisiert.

4.2.3.2 IFN-γ

Für die Generierung von Antiseren gegen Woodchuck IFN-γ wurden 3 Kaninchen mit dem rekombinanten Woodchuckprotein immunisiert. Die Antiseren S1, S2 und S3 wurden im Westernblot auf ihre Fähigkeit IFN-γ zu binden getestet.

In Spur 2, 4 und 6 konnte jeweils eine Bande mit einer Laufstrecke, die 18 kDa entspricht, identifiziert werden. Diese Bande konnte nicht durch die Inkubation mit den Präseren sichtbar

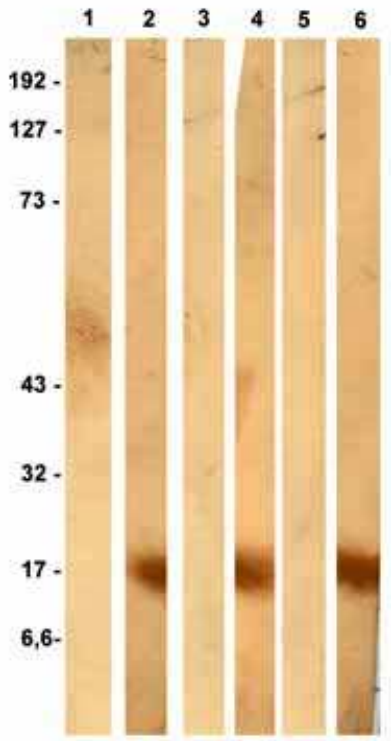


Abb. 34 Woodchuck IFN-γ Immunoblot. Spur 1: Präserum 1, Spur 2: Serum 1, Spur 3: Präserum 2, Spur 4: Serum 2, Spur 5: Präserum 3, Spur 6: Serum 3. Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

gemacht werden. Alle drei Seren enthalten Antikörper, die in der Lage sind, Woodchuck IFN-γ zu binden.

Zur Überprüfung der Neutralisationsfähigkeit der Antiseren wurde ein Schutzassay durchgeführt, bei dem rekombinantes IFN-γ und der Überstand von PHA stimulierten Lymphozyten vor dem Test mit den Prä- und Antiseren inkubiert wurden.

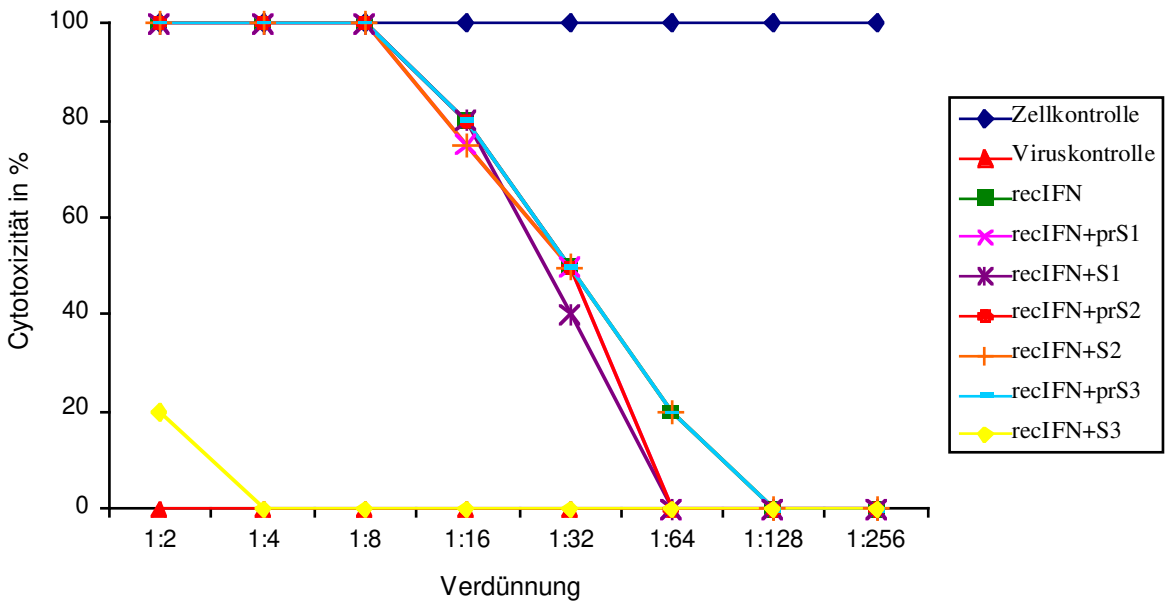


Abb. 35 IFN-γ Bioassay zur Überprüfung der Neutralisationseigenschaften der Antiseren gegen Woodchuck IFN-γ. Die Zellkontrolle besteht aus unbehandelten 12/6 Zellen. Für die Viruskontrolle wurden die Zellen nur mit Virus versetzt. Rekombinantes Woodchuck IFN-γ wurde in Konzentrationen von 480 ng/ml bis 3,75 ng/ml eingesetzt. Die gleiche Verdünnungsreihe wurde vor dem Test jeweils mit 10 µl Serum inkubiert.

Eins von drei Seren (Serum 3) ist in der Lage Woodchuck IFN-γ im Bioassay zu neutralisieren. Die Seren 1 und 2 dagegen wirken sich nicht auf die Schutzwirkung von IFN-γ aus. Die drei Präseren beinträchtigten die Funktion von IFN-γ nicht. Um festzustellen, ob Serum 3 auch in der Lage ist natürlich gebildetes IFN-γ zu neutralisieren, wurde der Schutzassay mit dem Überstand von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten wiederholt.

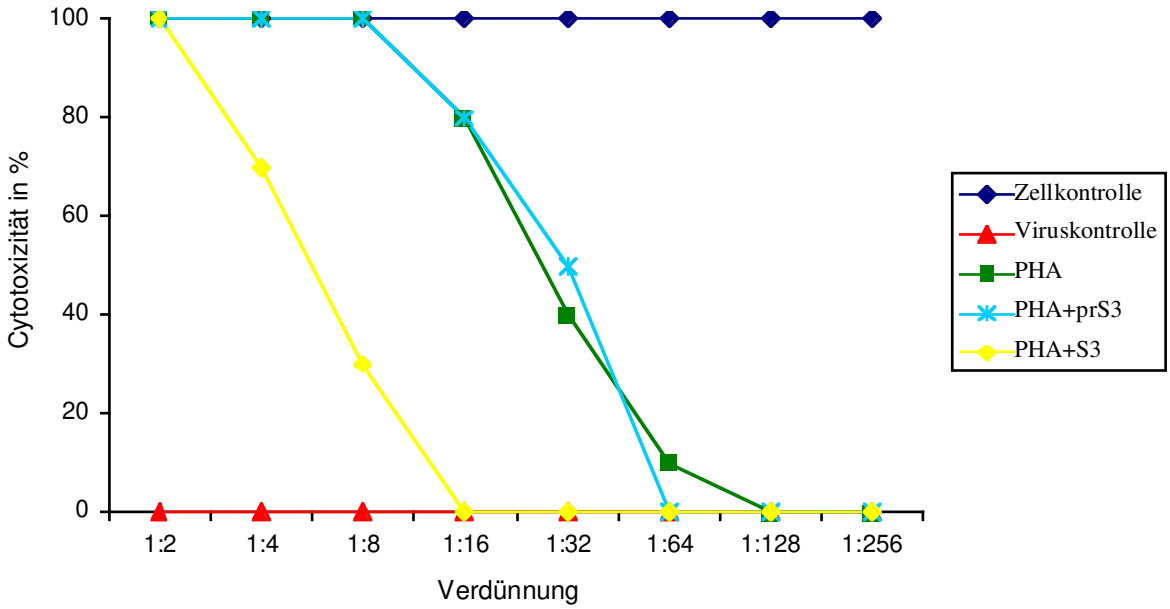


Abb. 36 IFN-γ Bioassay zur Überprüfung der Neutralisationseigenschaften der Antiseren gegen Woodchuck IFN-γ. Die Zellkontrolle besteht aus unbehandelten 12/6 Zellen. Für die Viruskontrolle wurden die Zellen nur mit Virus versetzt. Der Überstand von PHA stimulierten Zellen wurde entweder direkt (PHA) oder nach Inkubation mit jeweils 10 µl Präserum 3 und Serum 3 in den Assay eingesetzt

Serum 3 enthält Antikörper gegen IFN-γ, die in der Lage sind, sowohl rekombinantes als auch von stimulierten Lymphozyten produziertes IFN-γ im Bioassay zu neutralisieren. Das Präserum zeigte auch hier keine Wirkung auf die Funktion von IFN-γ. Aus dem Serum wurden über eine Protein G Säule Immunglobulin G (IgG) Antikörper isoliert. Die aufgereinigten Antikörper wurden wiederum im Schutzassay getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnte ermittelt werden, daß 1 mg anti IFN-γ IgG 13 µg IFN-γ neutralisiert.

4.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen

4.3.1 Bioassays

Für die Woodchuck Cytokine TNF-α, IFN-γ und IL-15 wurden Bioassays etabliert, die ursprünglich für die entsprechenden murinen oder humanen Proteine entwickelt wurden. Der TNF-α Test beruht auf der Cytotoxizität von TNF-α für die murine Zellinie L929.

Der Gehalt von biologisch aktivem IFN-γ kann indirekt durch die antivirale Schutzwirkung von IFN-γ auf L929 Zellen gemessen werden.

IL-15 wird anhand seiner proliferationsunterstützenden Wirkung für murine CTLL Zellen bestimmt.

Die Assays wurden jeweils mit PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten getestet (s. 3.1). Dabei stellte sich heraus, daß Woodchuck TNF-α und IL-15 nach den bekannten Protokollen für die entsprechenden murinen Proteine gemessen werden können. IFN-γ dagegen schützt die murine Zellinie L929 nicht vor der Infektion mit EMC Virus. Aus diesem Grund wurde der Assay so abgewandelt, daß die Woodchuckzellinie 12/6 mit EMC Virus infiziert wurde, aber der Test ansonsten entsprechend dem Protokoll für murines IFN-γ durchgeführt wurde.

4.3.2 RNAse Protection Assay

Für die quantitative Bestimmung der Cytokine auf mRNA Ebene wurde ein RNAse Protection Assay für einige Woodchuck Cytokine und etabliert. Die Nukleotidsequenzen der Cytokine TNF-α und IFN-γ sind in diesem Kapitel Abschnitt 1 abgebildet. Klone der T-Zellrezeptoren CD3 und CD4 wurden mit freundlicherweise von Dr. M. Lu und Dr. F. Siegel zur Verfügung gestellt (Abb. 39 und Abb. 40).

Mit Hilfe einer PCR wurden Amplifikate spezifischer Länge hergestellt, die am 5´-Ende eine EcoRI und am 3´-Ende eine HindIII Schnittstelle besitzen. Die Subklonierung erfolgte in den für die *in vitro* Transkription geeigneten Vektor pGEM-4Z. Die erhaltenen Inserts besitzen die folgenden Längen:

TNF-α	320 bp
CD3	300 bp
CD4	280 bp
IFN-γ	260 bp

Die Plasmide wurden mit EcoRI verdaut und durch Gelextraktion gereinigt. Die Transkription mit T7 RNA Polymerase resultierte in *antisense* Transkripten. Für die Etablierung der Methode wurde Gesamt-RNA aus stimulierten Lymphozyten benutzt. Als interner Standard wurde ein Plasmid eingesetzt, daß für das humane Haushaltsgen L32 codiert.

hL32	84 bp

Zunächst wurde nur die *in vitro* Transkription durchgeführt und die Transkripte auf einem Sequenzgel kontrolliert (Abb. 37).

Abb. 37 Autoradiographie der *in vitro* transkribierten RPA Plasmide.

Spur 1: TNF-α (338 bp)
Spur 2: CD3 (318 bp)
Spur 3: CD4 (298 bp)
Spur 4: IFN-γ (278 bp)
Spur 5: hL32 (97 bp)

Es wurden etwa 1500 cpm pro Spur aufgetragen.

Die Proben wurden erfolgreich transkribiert und dabei radioaktiv markiert. Sie sind gut voneinander diskriminierbar. Die Transkripte besitzen die folgenden Längen:

TNF-α	338 bp
CD3	318 bp
CD4	298 bp
IFN-γ	278 bp
hL32	97 bp

Abb. 38 zeigt die Analyse der protektierten mRNAs aus stimulierten Lymphozyten. In diesem Versuch wurden die Sonden für die Cytokine TNF-α und IFN-γ mit der Sonde für hL32 und die Sonden für die Oberflächenrezeptoren CD3 und CD4 vereinigt. Die nicht hybridisierten *in vitro* Transkripte wurden als Größenmarker aufgetragen.

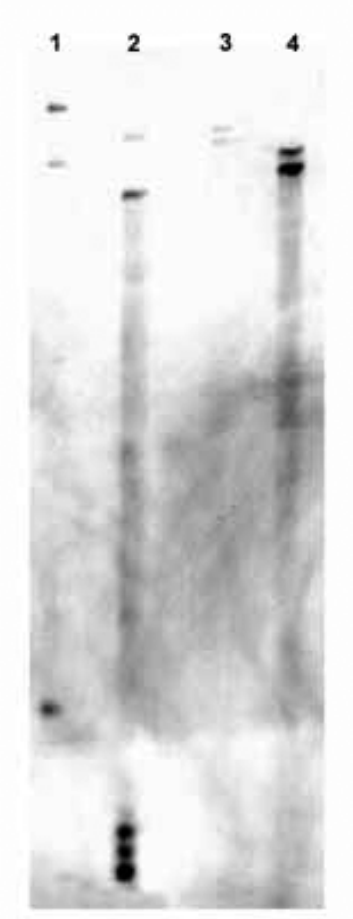


Abb. 38 Autoradiographie der *in vitro* Transkripte und der protektierten mRNA.

Spur 1: *in vitro* Transkripte
TNF-α 338 bp
IFN-γ 278 bp
hL32 97 bp

Spur 2: protektierte mRNA
TNF-α 320 bp
IFN-γ 260 bp
hL32 76 bp

Spur 3: *in vitro* Transkripte
CD3 318 bp
CD4 298 bp

Spur 4: protektierte mRNA
CD3 300 bp
CD4 280 bp

Die Transkripte von TNF-α, IFN-γ, CD3, CD4 und hL32 sind in der Lage die entsprechenden mRNA Fragmente aus stimulierten Lymphozyten vor dem RNAse Verdau zu schützen. Es ist möglich mehrere mRNA Fragmente in einem Ansatz zu identifizieren.

4.4 *In vivo* Neutralisation von TNF-α und IFN-γ

Um die Bedeutung der Cytokine IFN-γ und TNF-α bei der Infektion mit WHV besser zu verstehen, wurden 4 Woodchucks (Tiernummer: 9987, 9990, 9994 und 9995) mit WHV infiziert und gleichzeitig mit den aufgereinigten Antikörpern gegen TNF-α und IFN-γ behandelt. Zur Kontrolle wurden 2 Woodchucks (Tiernummer: 9989, 9992) mit WHV infiziert und mit einer unspezifischen IgG Präparation, die aus Kaninchenserum gewonnen wurde, behandelt. Die Virusreplikation wurde mittels PCR und Dot-Blot verfolgt. Die Antikörper gegen TNF-α und IFN-γ wurden im ELISA mit Kaninchenantikörpern nachgewiesen. In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Testgruppe (Tab. 17) und der Kontrollgruppe (Tab. 18) zusammengefaßt.

9987 Woche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Dot blot	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
anti-TNF-α	-	+	-	-	-	-						
anti-IFN-γ	-	+	-	-	-	-						
9990 Woche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Dot blot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
anti-TNF-α	-	+	-	-	-	-						
anti-IFN-γ	-	+	-	-	-	-						
9994	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Dot blot	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
anti-TNF-α	-	+	-	-	-	-						
anti-IFN-γ	-	+	-	-	-	-						
9995 Woche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Dot blot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
anti-TNF-α	-	+	-	-	-	-						
anti-IFN-γ	-	+	-	-	-	-						

Tab. 17 Dot Blot, PCR und ELISA Ergebnisse der mit Antikörpern gegen TNF-α und IFN-γ behandelten Testgruppe.

9989 Woche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Dot blot	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PCR	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
anti-TNF-α	-	-	-	-	-	-						
anti-IFN-γ	-	-	-	-	-	-						

9992 Woche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Dot blot	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
anti-TNF-α	-	-	-	-	-	-						
anti-IFN-γ	-	-	-	-	-	-						

Tab. 18 Dot Blot, PCR und ELISA Ergebnisse der Kontrollgruppe.

Die WHV Replikation konnte in allen Tieren aus der Test- und der Kontrollgruppe mittels Dot Blot und PCR nachgewiesen werden, außer Tier 9990 und 9995, die nur in der PCR positiv waren. Bei diesen Tieren wurde die Infektion in einem WhsAg ELISA bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tier 9989 war bis Woche 12 WHV DNA positiv. Dieses Tier wurde bis Woche 18 beobachtet. In Woche 16 war das PCR Ergebnis erstmalig negativ (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Kaninchen Antikörper gegen TNF-α und IFN-γ waren ausschließlich in der ersten Woche nach Infektion und Antikörperbehandlung in den Seren der Kontrollgruppe meßbar.

5 Diskussion

Die Hepatitis B Virusinfektion gehört zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Nach Schätzungen gibt es derzeit weltweit mehr als 350 Millionen Menschen, die mit diesem Virus chronisch infiziert sind. Chronisch HBV infizierte Patienten besitzen aufgrund der anhaltenden inflammatorischen Reaktion des Organismus ein deutlich höheres Risiko an Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom zu erkranken.[244,245] In Hoch-endemiegebieten, wie Südostasien, Zentral- und Südafrika und Teilen Südamerikas sind die Folgeerkrankungen der HBV-Infektion, die chronische Hepatitis mit Leberzirrhose und das primäre Leberkarzinom (HCC), neben der Infektion mit dem Humanen Immundefiziens Virus (HIV) die häufigste Todesursache durch Infektionskrankheiten.

Die Bedeutung der Cytokine für die Viruselimierung

Während der meisten Virusinfektionen geschieht die Viruseliminierung durch die Zerstörung von infizierten Zellen, wodurch das Virus freigesetzt wird und durch spezifische Antikörper neutralisiert werden kann. Dieser Mechanismus ist für den infizierten Organismus sinnvoll, wenn nur ein Teil der Zellen infiziert ist.

Im Fall einer HBV Infektion sind jedoch fast alle Leberzellen infiziert. Deshalb sprechen hier zwei Argumente gegen den cytolytischen Mechanismus. Zum einen liegt das Virus gegenüber den CTLs um mehrere Größenordungen im Überschuß vor und es ist unwahrscheinlich, daß die CTLs in der Lage sind, alle befallenen Hepatozyten zu erreichen, zu erkennen und dann zu zerstören.[159] Zum anderen wird die Leber bei einer HBV-Infektion bei weitem nicht in dem Ausmaß geschädigt, wie es bei einem ausschließlich cytolytischen Eliminierungs-mechanismus zu erwarten wäre.[246]

Über 90% der mehr als 10^{11} potentiell infizierbaren Hepatozyten in der humanen Leber werden durch das HBV infiziert.[247] Im menschlichen Körper liegen ungefähr 10^{12} Lymphozyten vor. Auf dem Höhepunkt der CTL Antwort eines Patienten mit akuter Hepatitis sind etwa 10^{8} dieser Lymphozyten HBV-spezifisch. Würden diese alle gleichzeitig die Leber infiltrieren, so käme auf einen CTL 1000 infizierte Hepatozyten.[248]

In den meisten *in vitro* Experimenten, die zur Untersuchung der CTL Antwort durchgeführt werden, ist das Effektor-:Zielzellen Verhältnis jedoch bedeutend höher. Im Normalfall werden CTLs im Überschuß eingesetzt. Dazu kommt, daß die Zielzellen, die in solchen Tests eingesetzt werden, aufgrund ihrer Empfänglichkeit für die Zerstörung durch CTLs selektiert wurden und damit wahrscheinlich nicht repräsentativ für infizierte primäre Zellen sind.[159] Ein weiteres Argument gegen die Zerstörung der Hepatozyten ist, daß bei den meisten infizierten Patienten die Infektion innerhalb von wenigen Wochen ohne schwerwiegende Schädigung der Leber ausheilt. Bei einem ausschließlichen Zerstörungsmechanismus sollte ein schwerer oder sogar tödlicher Verlauf der Hepatitis viel häufiger vorkommen.[246]

Für die Eliminierung des Virus scheinen also weitere CTL-Funktionen benötigt zu werden. Diese Funktionen wurden hauptsächlich bei transgenen Mäusen, die HBV in ihrer Leber replizieren, untersucht. Hier zeigte sich, daß die nichtcytopathische antivirale Wirkung der CTLs auf die Ausschüttung antiviraler Cytokine zurückzuführen ist. Die Hypothese eines nichtcytolytischen Eliminierungsmechanismus konnte im Modell der transgenen Maus bestätigt werden.[159,167-170]

Das Modell der transgenen Maus ist sehr gut dafür geeignet, erste Erkenntnisse über die Funktion der CTLs und die von ihnen ausgeschütteten Cytokine für den Verlauf der HBV Infektion zu gewinnen. Jedoch handelt es sich hier nicht um ein natürliches Infektionssystem. Die Immunantwort inder Maus wird erst durch einen adoptiven Immuntransfer hervorgerufen.[165] Die immunologischen Vorgänge bei einer Infektion mit HBV sind möglicherweise andere als die bei einem adoptiven Immuntransfer. Durch dieses Modell ist man auf die Untersuchung der viralen Replikation und Expression limitiert. Eintritt und Verteilung des Virus können nicht einbezogen werden. Aus unbekannten Gründen produzieren Mäuse nicht die episomale *covalently closed circular* (ccc) HBV DNA, die als *template* für die virale Replikation dient.[163,249,250] Damit das Virus vollständig aus den Zellen entfernt werden kann, muß auch die cccDNA eliminiert werden.

Aufgrund der nahen Verwandschaft des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) zum HBV eignet sich das mit WHV infizierte Woodchuck als Tiermodell zur Erforschung der HBV Infektion des Menschen. Die WHV Infektion des Woodchuck verläuft analog der HBV Infektion des Menschen und verursacht akute und chronische Erkrankungen der Leber. Im Gegensatz zur

HBV-transgenen Maus, wird in der Woodchuckleber cccDNA produziert. Auch die humorale und die T-Helfer Zellantwort des Woodchuck auf die WHV Infektion ähnelt der des Menschen, der mit HBV infiziert ist.[100,101] Allerdings war es bis jetzt schwierig die immunologischen Prozesse während der Infektion in diesem Modell zu untersuchen. Viele immunologische Reagenzien und Methoden, die in der Erforschung von humanen oder murinen Systemen selbstverständlich sind, stehen für das Woodchucksystem nicht zur Verfügung.

Das WHV Infektionsmodell kann erst dann in vollem Ausmaß für die Erforschung der Pathogenese der Hepadnavirusinfektion genutzt werden, wenn immunologische Reagenzien und Methoden zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurden durch Klonierung, Expression und Charakterisierung von Woodchuck Cytokinen die Grundlagen zur Untersuchung dieser Vorgänge in einem natürlichen Infektionsmodell geschaffen. Vor allem sollen die hier klonierten und exprimierten Cytokine und die entsprechenden Antikörper dazu genutzt werden, die Hypothese eines nichtcytolytischen Eliminierungsmechanismus in einem natürlichen Infektionsmodell zu bestätigen.

5.1 Klonierung und Sequenzierung von Woodchuck Cytokinen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die cDNAs der Woodchuck Cytokine TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-15 vollständig amplifiziert und kloniert werden. In dieser Arbeit wurden die Sequenzen der einzelnen Cytokine auf Aminosäureebene mit den entsprechenden Sequenzen anderer Spezies, die in der EMBL Genbank veröffentlicht wurden, verglichen. Die Ergebnisse wurden

	TNF-α	IFN-γ	IL-6	IL-15
Mensch	**80 %**	**60 %**	**49 %**	**83 %**
Maus	**84 %**	**43 %**	**46 %**	**74 %**
Ratte	**82 %**	**42 %**	**48 %**	**73 %**
Rind	**73 %**	**65 %**	**44 %**	**76 %**
Kaninchen	**79 %**	-	-	-

Tab. 19 Anzahl der Identitäten der klonierten Woodchuck Cytokine im Vergleich mit anderen Spezies.

in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Vollständige Woodchuck Cytokin Klone (TNF-α, IL-6, IL-10) wurden mittlerweile von Li et al. isoliert (Li et al., persönliche Mitteilung). Der TNF-α Klon war auf Aminosäureebene zu 81% bzw. 84% identisch zu den entsprechenden humanen bzw. murinen Proteinen. Woodchuck IL-6 war zu 43,5% bzw. 42% identisch mit den humanen bzw. murinen Proteinen. IL-10 wies Identitäten von 66% bzw. 58% zu den entsprechenden humanen bzw. murinen Proteinen auf. Diese Sequenzen konnten nicht direkt mit denen in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen verglichen werden, da sie noch nicht veröffentlicht wurden. Partielle Klone, die für den Nachweis der mRNA kloniert wurden, konnten von Nakamura et al. (TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-10) und Zhou et al. (TNF-α, IFN-γ) hergestellt werden.[251] Diese Klone wurden allerdings wie die von Li et al. nicht weiter charakterisiert (Li et al., Nakamura et al., Zhou et al., persönliche Mitteilung).

5.1.1 TNF-α: Sequenzvergleich

Das Woodchuck TNF-α Protein ist das am meisten konservierte der vier verglichenen Proteine. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Woodchuck TNF-α weist einen hohen Homologiegrad von 73% bis 84% auf. Die Werte für das humane bzw. murine Protein entsprechen den von Li et al. errechneten Werten. Geht man davon aus, daß die Signalsequenz des Woodchuck Proteins den Signalsequenzen von Mensch und Maus entspricht, ist das gereifte Protein vermutlich 156 Aminosäuren lang. Im Vergleich zur humanen Sequenz sind zwei Cysteinreste konserviert, von denen man weiß, daß sie eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden.[228] Die Aminosäurereste L29, R32, A143 und S145, die im humanen Protein essentiell für die Bindung an den Rezeptor sind, sind ebenfalls im Woodchuckprotein erhalten.[229,252]

5.1.2 IFN-γ: Sequenzvergleich

Die Woodchuck IFN-γ Sequenz zeigt Übereinstimmungen von 43% mit der murinen Sequenz und 60% mit der humanen Sequenz. Das putative gereifte Woodchuckprotein hat eine Länge von 143 Aminosäuren und enthält 9 Aminosäuren am C-terminalen Ende, die bei den anderen Nagersequenzen fehlen, aber im humanen und bovinen Protein hoch konserviert sind. Obwohl das Woodchuck taxonomisch zu den Nagern gehört, scheint die Sequenz eher dem humanem und bovinem Protein zu ähneln. Dies zeigte sich auch bei der Amplifikation von Woodchuck IFN-γ, da murine Primer nicht zur Amplifikation der Woodchuck cDNA geeignet waren. Erst die Benutzung von humanen Primern führte zur Generation des Woodchuck Klons. Für das murine Protein konnte gezeigt werden, daß das N-terminale Ende (AA1-31) und das C-terminale Ende (AA95-133) an der Rezeptorbindung beteiligt sind.[253] Die N-terminale Region ist jedoch nicht besser konserviert als andere Regionen des Moleküls. Es wird angenommen, daß diese Region für die Speziesspezifität verantwortlich ist. Der Histidinrest H111 des humanen Proteins soll direkt an den Rezeptor binden.[254] Punktmutationen dieses Restes führten zu einem biologisch inaktiven Protein.[255] Dennoch ist H111 in keiner der anderen Spezies konserviert. Der C-Terminus enthält jedoch eine polykationische Region

(128-132), die in allen untersuchten Spezies zu 100% erhalten ist. Die Entfernung dieser Aminosäurereste von murinem Woodchuck IFN-γ führte zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität.[256]

5.1.3 IL-6: Sequenzvergleich

Die vorausgesagte Aminosäuresequenz von Woodchuck IL-6 weist nur Übereinstimmungen von etwa 45% zu den entsprechenden Molekülen der anderen Spezies auf. Die für das humane bzw. murine Protein errechneten Zahlenwerte sind etwas höher als die von Li et al. bestimmten Identitäten. Die von Li et al. erhaltene Sequenz unterscheidet sich von der hier beschriebenen Sequenzen (persönliche Mitteilung). Das Vorläuferprotein besteht aus 207 Aminosäuren. Die exakte Schnittstelle für die Signalase konnte aufgrund der Heterogenität der IL-6 Sequenzen der unterschiedlichen Spezies nicht abgeleitet werden. Der N-Terminus zeigt jedoch charakteristische Eigenschaften einer Signalsequenz. Die Sequenz beginnt mit einem positiv geladenen Aminosäurerest K2, gefolgt von einigen hydrophoben Aminosäureresten F3FSIASLGLLLVV15. Es folgt eine kurze polarere Region, A16TA18. Vier Cysteinreste sind in allen untersuchten Spezies konserviert. Allerdings wurde für humanes IL-6 demonstriert, daß die Ausbildung einer Disulfidbrücke nicht essentiell für die biologische Aktivität des Proteins ist.[257] Der C-Terminus scheint im humanen und murinen Molekül wichtig für die Bindung an den Rezeptor zu sein. Substitution der Aminosäurereste R179, R182 und M184 führen zu einem kompletten Verlust der biologischen Aktivität des humanen IL-6 Moleküls. R179 und R182 sind beim Woodchuck und auch bei den anderen untersuchten Spezies konserviert. Im Gegensatz dazu ist M184 nur im humanen Protein enthalten. Eine weitere Region des humanen Proteins erwies sich als wichtig für die biologische Funktion. Zu dieser Region gehören die Aminosäurereste 29-34, die innerhalb der verschiedenen Spezies nur wenig konserviert sind. Es wird angenommen, daß diese Aminosäurereste nicht Teil einer Bindungstelle sind, sondern für die korrekte Faltung des Proteins wichtig sind.[258]

5.1.4 IL-15: Sequenzvergleich

Woodchuck IL-15 weist wie TNF-α einen hohen Homologiegrad zu den entsprechenden Proteinen anderer Spezies auf. Hier wurden Übereinstimmungen von 73% bis 84% berechnet. Auch in diesem Protein sind die Übereinstimmungen zum humanem und bovinem Protein

höher als zu den Nagersequenzen. Das Woodchuck IL-15 Vorläuferprotein ist 160 Aminosäuren lang. Durch den Vergleich mit der humanen Sequenz ergab sich ein 48 Aminosäuren langes Signalpeptid und ein gereiftes Protein, das aus 112 Aminosäuren besteht. Vier Cysteinreste, C35, C42, C85 und C88, die im humanen Protein bekanntermaßen zur Bildung von zwei Disulfidbrücken beitragen, sind in allen verglichenen Spezies erhalten.[208]

5.1.5 Amplifikation von Teilsequenzen: IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8

5.1.5.1 Amplifikation des IFN-γ Rezeptors

Während der *in vivo* Neutralisation wurde der im Kaninchen generierte Antikörper gegen IFN-γ sehr schnell abgebaut. Daher sollte die extrazelluläre Region des IFN-γ Rezeptors kloniert werden, um später den Antikörper durch ein lösliches rekombinantes Woodchuckprotein ersetzen zu können. Dieses Woodchuck eigene Protein wird vermutlich langsamer abgebaut, und kann wahrscheinlich mehrmals appliziert werden, ohne daß eine Immunreaktion gegen den Rezeptor stattfindet. Eine Subklonierung erfolgte in den Baculotransfervektor pAcHLT-C. Der IFN-γ Rezeptor kann somit im Baculovirussystem exprimiert werden. Die Expression der extrazellulären Region des humanen IFN-γ Rezeptors im Baculosystem führte zu einem löslichen Protein, das humanes IFN-γ neutralisiert.[259] Die Funktion des Woodchuck IFN-γ Rezeptors wird im IFN-γ Schutzassay in Verbindung mit rekombinantem und von Woodchuck Lymphozyten produziertem IFN-γ überprüft werden können. Der Klon, der die extrazelluläre Region des IFN-γ Rezeptors enthält, ist auf Aminosäureebene zu 60% bzw. 51% identisch mit dem jeweiligen humanen bzw. murinen Protein. Für diese Berechnung wurde jeweils nur die entsprechende extrazelluläre Region des Rezeptors verglichen.

5.1.5.2 Amplifikation von β-Aktin

Das in dieser Arbeit klonierte Woodchuck β-Aktin soll in zukünftigen Untersuchungen als Woodchuck spezifische Positivkontrolle für den RNAse Protection Assay benutzt werden. Es ist auf Nukleinsäureebene zu ca. 90 % identisch mit den entsprechenden humanen und murinen Sequenzen. Es ist nicht publiziert, ob Woodchuck β-Aktin von anderen Arbeitsgruppen als Positivkontrolle für RT-PCR oder RNAse Protection Assays benutzt wird.

5.1.5.3 Amplifikation von CD8

Die in der vorliegenden Arbeit generierte Woodchuck CD8 cDNA soll zukünftig zum Nachweis von $CD8^+$ Zellen (CTLs) in der Leber von Woodchucks benutzt werden. Ein Anstieg der CD8 mRNA in der Leber von WHV infizierten Woodchucks bedeutet, daß die Leber von CTLs infiltriert wird. Der CD8 Klon ist demnach besonders wichtig für die Bestätigung der Hypothese eines nichtcytolytischen Eliminierungsmechanismus. Die mRNA soll mit Hilfe des RNAse Protection Assays nachgewiesen werden.

Das klonierte Fragment ist zu kurz für eine sinnvolle Analyse der Aminosäuresequenz. Die erhaltene Nukleinsäuresequenz entspricht zu 100% der von C. Seeger in der GenBank veröffentlichten Sequenz, die für den Primerentwurf benutzt wurde.[222] Aufgrund der Primerwahl ist das Molekül jedoch um 9 Basen verkürzt. Die erhaltene cDNA ist mit 124 bp lange genug um für den RNAse Protection Assay benutzt zu werden.

5.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine

5.2.1 Expression in Säugerzellen

Woodchuck TNF-α, IFN-γ und IL-15 konnten in Zellüberständen von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten mit Hilfe der etablierten Bioassays nachgewiesen werden. Um die Identität der erhaltenen Klone zu überprüfen, wurden TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-15 in einen eukaryontischen Expressionsvektor subkloniert. BHK Zellen wurden mit diesen Expressionsklonen transfiziert und die Überstände im entsprechenden Assay untersucht. Die Funktionalität der Proteine TNF-α, IFN-γ und IL-15 konnten auf diese Weise nachgewiesen werden.

5.2.1.1 TNF-α: Expression und Funktionalität

Woodchuck TNF-α ist wie erwartet cytotoxisch für die murine Fibroblastenzellinie L929, mit der auch TNF-α anderer Spezies wie z.B. Mensch, Ratte, Kaninchen und Rind nachgewiesen werden können. Die cytotoxische Wirkung von TNF-α ist nicht speziesspezifisch. Ein Grund hierfür ist die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz bei den unterschiedlichen Spezies. Aminosäuren, die an der Bindung an den Rezeptor beteiligt sind, sind konserviert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Woodchuck TNF-α den murinen Rezeptor mTNFR-I bindet (s. Abb. 21). Durch Zugabe des löslichen Teils von mTNFR-I wird die cytotoxische Wirkung von TNF-α neutralisiert. Der Effekt ist konzentrationsabhängig; ist zuviel TNF-α im Überstand enthalten, wird seine Aktivität nicht vollständig aufgehoben. Das entsprechende Experiment wurde mit mTNFR-II durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Woodchuck TNF-α bindet ebenfalls an den murinen Rezeptor mTNFR-II, da dieser die cytotoxische Wirkung von TNF-α neutralisiert.

5.2.1.2 IFN-γ: Expression und Funktionalität

Zum Nachweis von Woodchuck IFN-γ wurde der Schutzassay mit Überständen von PHA stimulierten Woodchuck Lymphozyten mit L929 Zellen durchgeführt. Bei diesem Test zeigte sich, daß Woodchuck Interferone nicht in der Lage sind, murine Zellen vor der Infektion mit

EMCV zu schützen. Aus diesem Grund wurden Infektionsversuche mit verschiedenen Woodchuckzellinien durchgeführt. Die Zellinie 12/6 konnte mit EMCV infiziert werden. Der Titer des Virus wurde so eingestellt, daß gerade 100 % der 12/6 Zellen ohne Behandlung sterben. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, daß der Überstand von stimulierten Woodchuck Lymphozyten die Woodchuckzellinie 12/6 vor der Infektion mit EMCV schützen kann. In diesem Testsystem kann man nicht unterscheiden, ob dieser Effekt durch IFN-γ oder durch Interferone des Typs I hervorgerufen wird. Der Test wurde mit dem Überstand der mit IFNpcDNA3 transfizierten BHK Zellen wiederholt, der Überstand der stimulierten Lymphozyten wurde als Positivkontrolle eingesetzt (s. Abb. 22). Der Transfektionsüberstand schützte die Zellen vor der Infektion. Durch die Tatsache, daß der Klon ein funktionelles Protein codiert, und daß zwischen den Interferonen des Typ I und II nur wenig Ähnlichkeit bezüglich ihrer Sequenz besteht, kann man hier ausschließen, daß es sich bei dem Klon um ein Interferon des Typs I handelt.

Zusätzlich wurde versucht, Woodchuck IFN-γ mit löslichem humanem IFN-γ Rezeptor zu neutralisieren. In diesem Versuch wurde der humane Rezeptor anstatt des murinen Rezeptors eingesetzt, da aufgrund der Sequenzähnlichkeiten und der Tatsache, daß murine Zellen nicht durch Woodchuck IFN-γ geschützt wurden, die Wahrscheinlichkeit, daß Woodchuck IFN-γ den humanen Rezeptor bindet, größer erschien. Der lösliche Teil des humanen Rezeptors ist nicht in der Lage, die Schutzwirkung von Woodchuck IFN-γ aufzuheben. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da weder murines IFN-γ an den humanen Rezeptor noch humanes IFN-γ an den murinen Rezeptor bindet.

5.2.1.3 IL-15: Expression und Funktionalität

Um die biologische Aktivität des in der vorliegenden Arbeit klonierten Woodchuck IL-15 nachzuweisen, wurde ein Proliferationsassay mit der IL-2 abhängigen murinen CTLL-2 Zellinie durchgeführt. IL-15 hat eine proliferationsfördernde Wirkung auf die IL-2 abhängige Zellinie, da die Rezeptoren für IL-2 und IL-15 zwei Untereinheiten gemeinsam haben. Dieser Assay wurde bereits für murines und humanes IL-15 angewandt. Sowohl das murine als auch das humane Protein unterstützen die murine Zellinie. IL-15 scheint also nicht speziesspezifisch zu agieren. Der Zellüberstand von stimulierten Lymphozyten führt zu einer Proliferation der CTLL-2 Zellen (s. Abb. 23). Hier kann nicht zwischen IL-2 und IL-15

unterschieden werden. BHK Zellen wurden mit zwei Woodchuck IL-15 Klonen transfiziert. Die Zellüberstände wurden im Proliferationsassay getestet. Sowohl der Überstand der stimulierten Lymphozyten als auch die Transfektionsüberstände fördern die Proliferation der CTLL-2 Zellen. Im Vergleich zu rekombinantem IL-2 fällt die Reaktion eher schwach aus, was vermutlich an der geringeren Konzentration des Cytokins im Transfektionsüberstand liegt.

5.2.1.4 IL-6: Expression und Funktionalität

Zum Nachweis von Woodchuck IL-6 wurde die IL-6 abhängige Maus/Ratte Hybridomzellinie 7TD1 benutzt. Es zeigte sich, daß der Überstand von stimulierten Woodchuck Lymphozyten, das Wachstum dieser Zellinie unterstützt. Bei den Transfektionsüberständen zeigte sich jedoch keine erhöhte Proliferation gegenüber der Negativkontrolle mit pcDNA3. Der Hintergrund mit Kontrollzellüberständen war so hoch, daß sich dieser Test nicht eignet, um Woodchuck IL-6 aus Zellüberständen nachzuweisen.

5.2.2 Expression von Woodchuck TNF-α und IFN-γ im großen Maßstab

Um die Woodchuck Cytokine TNF-α und IFN-γ in großem Maßstab zu erhalten, wurden die Cytokine in *E. coli* exprimiert und in biologisch aktiver Form gereinigt. Zu Zeit sind keine Veröffentlichungen bekannt, in denen die Reinigung von Woodchuck Proteinen beschrieben wird. Deshalb mußte zunächst die Löslichkeit des in *E. coli* exprimierten Proteins bestimmt werden. Hierfür wurde das unlösliche Pellet mit verschiedenen Detergenzien wie Tween 20, Triton X-100 und SDS und verschiedenen denaturierenden Salzen wie Harnstoff und Guanidiniumchlorid in unterschiedlichen Konzentrationen extrahiert und der Überstand als auch das Restpellet im Immunoblot mit Ni-HRP-Konjugat getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Nach der Reinigung wurden die Molekulargewichte der beiden Cytokine unter denaturierenden (SDS-PAGE) und unter nativen Bedingungen bestimmt.

5.2.2.1 TNF-α: Expression und Reinigung

Als Lösungsmittel für die Extraktion von TNF-α aus dem Zellpellet wurde 0,25% Tween 20 benutzt. Als Laufmittel konnte dann PBS benutzt werden.

Unter denaturierenden Bedingungen wurde für TNF-α ein Molekulargewicht von 17 kDa bestimmt (s. Abb. 24) Für die monomere Form wurde ein Molekulargewicht von 17 kDa berechnet. Mit der SDS-PAGE Analyse konnte eine erfolgreiche Reinigung nachgewiesen werden. Die SDS-PAGE Analyse läßt jedoch keine Rückschlüsse auf die Faltung des Proteins zu. Aus diesem Grund wurde eine Gelfiltration durchgeführt, bei der das Molekulargewicht unter nativen Bedingungen bestimmt werden konnte (s. Abb. 26). Hier ergaben sich Molekulargewichte von 17, 33, und 49 kDa für die monomere, dimere bzw. trimere Form. Diese Werte entsprechen den berechneten Molekulargewichten von 17, 34 und 51 kDa. Aus der Flächenverteilung konnte berechnet werden, daß der Anteil der trimeren Form etwa 60% der Gesamtmenge beträgt.

Besonders interessant ist, ob das in *E. coli* exprimierte Protein biologisch funktionell ist. Deshalb wurde das rekombinante Protein im Cytotoxizitätsassay getestet (s. Abb. 27) und mit dem murinen Standard verglichen. Für das Woodchuckprotein ergab sich eine spezifische Aktivität von 2000 U/mg. Käuflich erhältliches murines TNF-α besitzt dagegen eine spezifische Aktivität von 5 x 10^7 U/mg. Dieser Unterschied beruht mit Sicherheit auf Verunreinigungen und mangelnder Faltung des Woodchuckproteins. Das in *E. coli* exprimierte TNF-α wird wie das durch Transfektion von Säugerzellen erzeugte Protein durch die Zugabe von murinem TNF-α Rezeptor I neutralisiert.

5.2.2.2 IFN-γ: Expression und Reinigung

IFN-γ konnte nur mit 8 M Harnstoff oder 4 M Guanidiniumchlorid aus den Zelltrümmern gelöst werden. Für die Reinigung wurde 8 M Harnstoff benutzt. Für Woodchuck IFN-γ wurde unter denaturierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 17 kDa bestimmt (s. Abb. 28). Das aus der Anzahl der Aminosäuren berechnete Molekulargewicht der monomeren Form beträgt 16 kDa. Durch die SDS-PAGE Analyse wird der Reinigungsprozeß deutlich. Im letzten Reinigungsschritt, der Entsalzung in der Amicon Rührzelle, wird das Protein zwar entsalzt, aber nicht höher konzentriert, da es relativ leicht ausfällt. Wie für TNF-α wurde eine Gelfiltration zur Beurteilung der Faltung des gereinigten Proteins durchgeführt (s. Abb. 29). Hier ergeben sich Molekulargewichte von 16 bzw. 34 kDa für die monomere bzw. dimere Form von IFN-γ. Die berechneten Werte sind 16 bzw. 32 kDa. Aus der Flächenverteilung

konnte berechnet werden, daß der Anteil der dimere Form einen Anteil von etwa 75% der Gesamtmenge hat.

Besonders wichtig war die Überprüfung der biologischen Funktion des in *E. coli* exprimierten Woodchuck Proteins. Hierfür wurde das rekombinante Woodchuck IFN-γ im Schutzassay getestet (s. Abb. 30). Woodchuck IFN-γ schützt Woodchuck 12/6 Zellen vor der Infektion mit EMCV und weist eine spezifische Aktivität von 3 x 10^4 U/mg auf. Die spezifische Aktivität konnte nicht durch Vergleich mit einem käuflichen Standard ermittelt werden. Deshalb wurde sie durch die Ermittlung der effektiven Dosis bei der die Hälfte der Zellen vor der Zerstörung durch das Virus geschützt sind (ED_{50}), berechnet. Die ED_{50} von IFN-γ betrug 30 ng/ml woraus sich die oben genannte spezifische Aktivität berechnet. Käuflich erhältliches humanes IFN-γ hat eine spezifische Aktivität von 1 x 10^7 U/mg, murines eine von 2 x 10^7 U/mg. Der Unterschied zwischen den kommerziell erwerblichen Proteinen beruht wie bei TNF-α mit Sicherheit auf Verunreinigungen und mangelnder Faltung des Woodchuckproteins. Der direkte Vergleich ist aufgrund der unterschiedlichen Zellinien schwierig.

5.2.3 Generierung von Antiseren

Gegen Woodchuck TNF-α und IFN-γ wurden Antikörper in Kaninchen generiert. Zwei Ansprüche wurden an diese Antikörper gestellt. Erstens sollten sie die Proteine spezifisch binden, damit sie für die Etablierung von Testsystemen eingesetzt werden können. Zweitens sollten sie die biologische Aktivität der beiden Woodchuck Cytokine neutralisieren, damit sie im Tiermodell eingesetzt werden können, um zu beobachten, ob sich der Verlauf der Infektion ändert, wenn TNF-α und IFN-γ neutralisiert sind (*in vivo* Neutralisation). Bevor die Antiseren für den Tierversuch eingesetzt werden konnten, wurde eine Immunglobulin G Isolierung durchgeführt. Es wurden zwei Isolierungsverfahren, die Isolierung der Immunglobuline durch fraktionierte Fällung mit Caprycylsäure und die Isolierung der Immunglobuline durch Bindung an eine Protein G Säule, verglichen. Es stellte sich heraus, daß die Immunglobuline, die im chromatographischen Verfahren gereinigt wurden, sowohl in einer höheren Ausbeute als auch mit einer höheren Aktivität der beiden Antikörper im jeweiligen Bioassay isoliert werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.2.4 Antiseren gegen TNF-α

Aufgrund der Ähnlichkeit der TNF-α Sequenzen unterschiedlicher Spezies, wurden vor der Generierung von woodchuckspezifischen Antikörpern, käuflich erwerbliche Antikörper gegen humanes und murines TNF-α im Cytotoxizitätsassay getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, daß nur ein gegen murines TNF-α gerichteter Antikörper in der Lage war, Woodchuck TNF-α im Cytotoxizitätstest zu neutralisieren. Als der Test mit einer neuen Charge des gleichen polyklonalen Antikörpers wiederholt wurde, zeigte sich, daß nur die zuerst benutzte, nicht mehr erhältliche Charge neutralisierende Wirkung hatte. Daraufhin wurden zwei Kaninchen mit gereinigtem rekombinantem TNF-α immunisiert. Die Kaninchen erhielten eine Immunisierung mit 100 µg TNF-α und drei Auffrischungsimmunisierungen mit ebenfalls jeweils 100 µg TNF-α. Die erhaltenen Präseren und Seren wurden im Immunoblot getestet, wobei sich zeigte, daß beide Seren TNF-α bindende Antikörper enthalten (s. Abb. 31).

Der nächste Schritt war die Überprüfung der Neutralisationseigenschaften der Antiseren. Hier zeigte sich, daß trotz der Bindungsfähigkeit beider Antiseren nur ein Antiserum in der Lage war, die Cytotoxizität von Woodchuck TNF-α aufzuheben (s. Abb. 32). Scheinbar muß das aktive Zentrum von TNF-α durch den Antikörper blockiert werden, um seine biologische Funktion zu hemmen. Die Bindung an den Antikörper reicht nicht aus, um die Zellen vor TNF-α zu schützen. Auch natives TNF-α aus stimulierten Lymphozyten wird von diesem Antiserum neutralisiert (Abb. 33).

5.2.5 Antiseren gegen IFN-γ

Käuflich erwerbliche Antikörper gegen IFN-γ wurden aufgrund der geringen Ähnlichkeit zwischen den unterschiedlichen Spezies nicht getestet. Das erste Kaninchen wurde mit noch nicht gereinigtem rekombinantem Woodchuck IFN-γ in Form eines SDS-Gelstücks immunisiert. Dafür wurde die IFN-γ Bande aus einem SDS-Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wird dem Kaninchen subkutan eingepflanzt. Diese Art von Immunisierung ist von der Firma Eurogentec für mehrere Proteine erfolgreich durchgeführt worden. Das erhaltene Serum (Serum 1) ist zwar in der Lage Woodchuck IFN-γ im Immunoblot zu binden (s. Abb. 34)., neutralisiert aber nicht seine biologische Aktivität (s. Abb. 35).

In der Zwischenzeit konnte rekombinantes Woodchuck IFN-γ isoliert werden, deshalb erfolgte die Immunisierung der beiden anderen Kaninchen (Serum 2 und Serum 3) mit löslichem gereinigtem IFN-γ. Das Immunisierungsprotokoll entspricht dem von TNF-α. Die so erhaltenen Antiseren wurden wiederum im Immunoblot und im Schutzassay zum Nachweis von IFN-γ getestet Auch in diesem Fall sind beide Antiseren in der Lage IFN-γ im Immunoblot (s. Abb. 34). zu binden, aber nur ein Serum (Serum 3) inhibiert die biologische Aktivität von IFN-γ im Bioassay (s. Abb. 35). Serum 3 neutralisiert auch natives IFN-γ aus stimulierten Woodchucklymphozyten (s. Abb. 36).

5.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen

5.3.1 Bioassays

Die Bioassays wurden aus zwei Gründen etabliert. Erstens sollte die Funktionalität der klonierten Cytokine *in vitro* nachgewiesen werden. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu anderen Spezies und der Funktionalität im entsprechenden Bioassay konnten die Klone sicher identifiziert werden (s.o.). Zweitens sollen die Cytokine durch die Bioassays als Proteine aus Woodchuckseren nachgewiesen werden. Das Problem bei diesen Messungen ist, daß einige Cytokine genau die biologische Funktion gemeinsam haben, die in den hier beschriebenen Bioassays zur Bestimmung der Cytokine ausgenutzt wird.

5.3.1.1 TNF-α und TNF-β

TNF-α und TNF-β wirken beide cytotoxisch für L929 Zellen. Bis jetzt ist nicht bekannt, ob Woodchuck TNF-β für die murine Zellinie cytotoxisch ist, aber es ist auch nicht auszuschließen. Um also den TNF-α Gehalt eines Woodchuckserums zu bestimmen, muß erstens das Serum allein in verschiedenen Verdünnungen getestet werden und zweitens dieselben Verdünnungen des Serums vor dem Test mit den in dieser Arbeit generierten Antikörpern oder mit murinem löslichen TNF-α Rezeptor I inkubiert werden. Die so erhaltenen Ergebnisse müssen dann miteinander verglichen werden. Wenn Antikörper bzw. Rezeptor im Überschuß vorliegen, kann man anhand der neutralisierten Menge auf den TNF-α Gehalt schließen.

5.3.1.2 IFN-γ und die Typ I Interferone

Aus Versuchen mit humanen und murinen Cytokinen weiß man, daß sowohl IFN-γ als auch Typ I Interferone in der Lage sind, Zellen vor der Infektion mit EMCV zu schützen. Führt man den Bioassay aus Serum durch, muß man wie oben unter 5.1.1 beschrieben einen Neutralisationstest mit den in dieser Arbeit generierten Antikörpern gegen Woodchuck IFN-γ

durchführen, da man davon ausgehen muß, daß in diesem Assay auch Typ I Interferone erfaßt werden.

5.3.1.3 IL-15 und IL-2

IL-15 und IL-2 sind sich in vielen ihrer biologischen Funktionen sehr ähnlich. Der Bioassay, der in dieser Arbeit benutzt wurde, um Woodchuck IL-15 nachzuweisen, beruht auf einem Test der ursprünglich für murines IL-2 entwickelt wurde. Man muß davon ausgehen, daß auch Woodchuck IL-2 in diesem Test erfaßt wird. Bis jetzt wurde Woodchuck IL-15 nicht in einer Weise exprimiert und isoliert, die ein für die Generierung von Antikörpern nutzbares IL-15 liefert. Käufliche Antikörper gegen murines oder humanes IL-15 sind noch nicht auf ihre Neutralisationseigenschaften getestet worden. Aus diesen Gründen gibt es bis jetzt noch nicht die Möglichkeit Woodchuck IL-15 und IL-2 in dem hier benutzten Bioassay zu unterscheiden.

Zur Zeit wird am Institut für Virologie der Universitätsklinikums Essen der IFN-γ Bioassay eingesetzt, um IFN-γ aus Woodchuckseren nachzuweisen. Chronisch WHV infizierte Woodchucks wurden mit humanem IL-12 behandelt. Durch diese Behandlung soll die Produktion von IFN-γ induziert werden, das dann die Expression und Replikation des WHV hemmen soll. Vor der Behandlung der Tiere mit IL-12 konnte durch den IFN-γ Bioassay gezeigt werden, daß Woodchuckzellen, die *in vitro* mit humanem IL-12 stimuliert wurden, verstärkt IFN-γ produzierten. Humanes IL-12 agiert in diesem Fall nicht speziesspezifisch (Dr. M. Fiedler, persönliche Mitteilung).
Die genaue Etablierung der Bioassays für die Woodchuck Cytokine TNF-α, IFN-γ, IL-6 und IL-15 wurde in den Abschnitten 3.1.1 bis 3.1.4 bei den entsprechenden Cytokinen diskutiert.

5.3.2 RNAse Protection Assay

Der RNAse Protection Assay wurde etabliert, um den Nachweis der Cytokine und der T-Zellmarker auf mRNA Ebene möglich zu machen. Der RNAse Protection Assay ist eine sensitive und spezifische Methode für den Nachweis und die Quantifizierung von mRNA Spezies. Er wurde durch die Charakterisierung von DNA-abhängigen RNA Polymerasen und ihren Promotor Sequenzen möglich gemacht. Diese Polymerasen sind ideal für die Synthese von RNA Sonden mit einer hohen spezifischen Aktivität, da sie ihre Promotoren mit hoher Genauigkeit erkennen, RNA mit einer hohen Geschwindigkeit synthetisieren und keine hohen Konzentrationen an Ribonukleotiden benötigen. Der entsprechende cDNA Klon muß nur in einen Vektor kloniert werden, der Bakteriophagenpromotoren enthält. Dieses Konstrukt kann dann als *template* für die Synthese von radioaktiv markierten *antisense* RNA Sonden eingesetzt werden. Eine oder mehrere Sonden werden mit der Ziel RNA in Lösung hybridisiert. Nach der Hybridisierung werden nichthybridisierte Sonden und andere einzelsträngige RNA verdaut. Markierte Sonden, die durch die Hybridisierung mit komplementärer RNA vor dem Verdau geschützt wurden, können durch Polyacrylamidgelanalyse aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Wenn die Sonde im Überschuß gegenüber der Ziel RNA vorliegt, ist die Intensität des geschützten Fragmentes direkt proportional zur Menge der komplementären RNA der Probe.
Im Vergleich zu Hybridisierungsmethoden, die auf einem Transfer der RNA auf einen festen Träger angewiesen sind (z.B. Northern Blot Analyse), können RNA Spezies, die nur in geringen Kopienzahlen vorliegen, leichter nachgewiesen und exakter bestimmt werden. Das liegt daran, daß die Hybridisierung in Lösung erfolgt. Erstens steht theoretisch jedes RNA Molekül für die Bindung zur Verfügung, weil Bindungstellen nicht von der Membran in Anspruch genommen werden und zweitens wird der Verlust durch unvollständigen Transfer auf die Membran umgangen. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Proben, die im RNAse Protection Assay nachgewiesen werden, wesentlich kürzer sind, als die entsprechende mRNA Spezies. Beschädigungen der mRNA, die außerhalb der hybridisierenden Region liegen, haben keinen Einfluß auf den RNAse Protection Assay, führen aber zu einem schwächeren Signal im Northern Blot.

Für die folgenden Cytokine und Oberflächenrezeptoren wurden Plasmide angefertigt, die für die Generierung von *antisense* Transkripten nötig sind.

TNF-α	320 bp
CD3	300 bp
CD4	280 bp
IFN-γ	260 bp
IL-15	240 bp
β-Aktin	160 bp
CD-8	127 bp

Damit die Transkripte und geschützten Hybride diskriminierbar sind, wurde die Länge der einzelnen Proben so gewählt, daß sie sich um mindestens 20 Nukleotide unterscheiden. Die ersten vier Proben, TNF-α, CD3, CD4 und IFN-γ, wurden bereits getestet. Zunächst wurde die Länge der Transkripte überprüft, indem eine *in vitro* Transkription mit radioaktiv markiertem ^{32}PdUTP durchgeführt wurde, die dann auf einem Sequenziergel überprüft wurde (s. Abb. 37).

Als nächstes wurde getestet, ob die Transkripte für den Protection Assay geeignet sind. Zu diesem Zweck wurde ein vollständiger Assay durchgeführt, indem die Gesamt-RNA aus stimulierten Woodchuck Lymphozyten mit den *antisense* Transkripten inkubiert und anschließend der RNAse Verdau durchgeführt wurde. Die geschützten mRNA Fragmente wurden im Sequenziergel analysiert. Als Positivkontrolle wurde ein Plasmid, das 84 bp des humanes L32 enthält, benutzt. Dieses Plasmid wurde mir freundlicherweise von Dr. F. Chisari (Scripps Institut, San Diego) zur Verfügung gestellt.

In dem hier durchgeführten Versuch wurde so verfahren, daß zwei bzw. drei Plasmide vor der *in vitro* Transkription vereinigt wurden. Nach der Transkription werden die radioaktiven RNA Transkripte mit einem Aliquot mRNA inkubiert. Dies geschieht aus dem Grund, daß in Zukunft Biopsieproben mit Hilfe des RNAse Protection Assays analysiert werden sollen. Die mRNA Menge, die aus solchen Proben gewonnen werden kann, ist so klein, daß sie nicht für mehrere Hybridisierungsansätze ausreicht. Es sollen also zukünftig alle Proben in einem Ansatz getestet werden. In dem hier durchgeführten Versuch sind die Transkripte und die

geschützten mRNA Fragmente von TNF-α, IFN-γ und hL32 sowie von CD3 und CD4 gut voneinander zu unterscheiden.

5.4 *In vivo* Neutralisation von IFN-γ und TNF-α

Im Modell der HBV transgenen Maus konnte gezeigt werden, daß durch simultane Behandlung mit Antikörpern gegen TNF-α und IFN-γ die CTL induzierte Inhibition der HBV Replikation und Genexpression vollständig blockieren wird. Wurden die Antikörper einzeln injiziert, war die Auswirkung nur minimal. Die beiden Cytokine scheinen also unabhängige regulatorische Signalkaskaden im Hepatozyten auszulösen. Durch die Gabe der beiden Antikörper wurde der Grad der Lebererkrankung, die durch die CTLs in diesen Tieren induziert wird, nicht verschlimmert. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß der regulatorische Effekt der CTLs nicht durch die Zerstörung der Hepatozyten herbeigeführt wird.

Dieses Experiment sollte im Woodchuck Modell bestätigt werden, um zu zeigen, daß TNF-α und IFN-γ diese Funktion auch bei einer natürlichen Infektion übernehmen. Dazu wurden 4 Woodchucks mit WHV infiziert und gleichzeitig mit den aufgereinigten Antikörpern gegen TNF-α und IFN-γ behandelt. Zur Kontrolle wurden 2 Woodchucks mit WHV infiziert und mit unspezifischen IgG Präparationen, die aus Kaninchenserum gewonnen wurden, behandelt. Die WHV Replikation wurde mittels PCR und Dot Blot verfolgt. Die Antikörper gegen TNF-α und IFN-γ wurden im ELISA mit rekombinantem Woodchuck TNF-α bzw. IFN-γ gebunden und mit Kaninchenantikörpern nachgewiesen.

Die WHV Replikation zeigt in beiden Versuchsgruppen keine Abweichung zum normalen Infektionsverlauf. Die Kaninchenantikörper zirkulierten nur etwa eine Woche im Serum der Woodchucks. Diese kurze Zeitspanne reicht vermutlich nicht aus, um die Virusreplikation signifikant zu beeinflussen.

Aus diesem Grund wurde die extrazelluläre Region des IFN-γ Rezeptors kloniert. Sobald der Rezeptor exprimiert wurde, und die Neutralisationseigenschaften überprüft wurden, kann das Protein für die *in vivo* Neutralisation eingesetzt werden. Der woodchuckspezifische IFN-γR wird nicht als körperfremd erkannt und kann deshalb mehrere Male appliziert werden. Dadurch kann IFN-γ hoffentlich über eine längere Zeitspanne neutralisiert werden. Für TNF-α soll zunächst die Halbwertzeit und die Verträglichkeit des murinen TNF-α Rezeptors I im

Tierversuch bestimmt werden. Sollte es möglich das murine Protein mehrmals zu applizieren ist es nicht nötig, das entsprechende Woodchuckprotein zu klonieren und zu exprimieren.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit gelang erstmalig die Klonierung, Expression und Charakterisierung von Woodchuck Cytokinen. Damit wurde die Grundlage für die immunologische Untersuchung der Hepadnavirusinfektion in einem natürlichen Infektionsmodell geschaffen.

6.1 Klonierung von Woodchuck cDNAs: TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-15, IFN-γ Rezeptor, β-Aktin und CD8

In dieser Arbeit wurde der vollständige offene Leserahmen der Woodchuck Cytokine TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-15 und die extrazelluläre Region des IFN-γ Rezeptors kloniert. Desweiteren wurden Teile der offenen Leserahmen des Haushaltgens β–Aktin und des Oberflächenrezeptors CD8 kloniert. Die Klone wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen auf Aminosäureebene mit den entsprechenden Sequenzen anderer Spezies verglichen. Die Woodchuckproteine sind im gleichen Maß homolog zu den entsprechenden Proteinen anderer Spezies, wie diese untereinander. Bei TNF-α, IL-6 und IL-15 sind für die Rezeptorbindung wichtige Aminosäuren bei den verschiedenen Spezies konserviert. Es zeigte sich, daß die Übereinstimmung zwischen den Woodchuck Proteinen IFN-γ, IL-15 und IFN-γR und den entsprechenden menschlichen Proteinen größer ist als zwischen den Woodchuck Proteinen und den Sequenzen anderer Nager.

6.2 Expression und Analyse der Woodchuck Cytokine

Die Funktionalität der Cytokinklone von TNF-α, IFN-γ und IL-15 konnte mittels in dieser Arbeit etablierten Bioassays nach der Transfektion in Säugerzellen nachgewiesen werden. IFN-γ und TNF-α wurden zusätzlich in *E. coli* exprimiert, damit eine größere Menge des jeweiligen Proteins gereinigt werden konnte. Die Reinigung und die Faltung der Proteine wurde durch Größenexclusionschromatographie überprüft und die Molekulargewichte bestimmt. Beide Proteine konnten funktionell exprimiert werden.

Gegen die Woodchuck Proteine TNF-α und IFN-γ konnten Antiseren generiert werden, die die Proteine sowohl im Immunoblot binden, als auch ihre biologische Aktivität *in vitro* inhibieren.

6.3 Etablierung von Testsystemen zum Nachweis von Woodchuck Cytokinen

Für die Cytokine TNF-α und IL-15 wurden Bioassays etabliert, die entsprechend den Tests für die murinen Cytokine durchgeführt werden konnten. Woodchuck TNF-α konnte mit löslichem murinen TNF-α Rezeptor I neutralisiert werden. IFN-γ agiert speziesspezifisch, deshalb wurde für den Schutzassay die Woodchuckzellinie 12/6 benutzt. Woodchuck IFN-γ konnte wie erwartet nicht mit humanem löslichem IFN-γ Rezeptor neutralisiert werden. Die Bioassays zum Nachweis von TNF-α und IFN-γ sind für die Quantifizierung der Cytokine aus Woodchuckserum geeignet.

Für den Nachweis der Cytokine und T-Zellmarker aus Woodchuckgewebe konnte ein *RNAse Protection Assay* etabliert werden. TNF-α, IFN-γ, CD3 und CD4 konnten mittels *RNAse Protection Assay* aus stimulierten Woodchucklymphozyten nachgewiesen werden. Es ist möglich mehrere mRNA Spezies in einem Hybridisierungsansatz nachzuweisen. Desweiteren wurden Plasmide für den Nachweis von IL-15, CD8 und β-Aktin kloniert.

6.4 *In vivo* Neutralisation von IFN-γ und TNF-α

Vier Woodchucks wurden während einer Infektion mit WHV mit den in dieser Arbeit generierten und gereinigten Antikörpern behandelt. Diese Behandlung hatte keinen Einfluß auf die WHV Replikation, da die Kaninchenantikörper zu schnell abgebaut wurden. Aus diesem Grund ist die extrazelluläre Region des Woodchuck IFN-γ Rezeptors kloniert worden. Das Experiment soll zukünftig mit löslichem TNF-α und IFN-γ Rezeptor durchgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Schödel F, Sprengel R, Weimer T, et al. Animal hepatitis B viruses. In: Klein G, editor. Advances in Viral Oncology. New York: Raven Press Ltd. 1989:72-103.

2. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, et al. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. N Engl J Med 1991 324:1705-9.

3. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970 1:695-8.

4. Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, et al. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate. Proc Natl Acad Sci USA 1998 95:5757-61.

5. Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc Natl Acad Sci USA 1978 75:4533-7.

6. Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, et al. A virus in beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. Proc Natl Acad Sci USA 1980 77:2941-5.

7. Testut P, Renard CA, Terradillos O, et al. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. J Virol 1996 70:4210-9.

8. Mason WS, Seal G, Summers J. An HBV-like virus of domestic ducks. In: Alter H, editor. Proceedings of the 1980 Symposium on Viral Hepatitis. Phiadelphia: The Franklin Institute Press 1980:107-16.

9. Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. J Virol 1988 62:3832-9.

10. Howard CR. The biology of hepadnaviruses. J Gen Virol 1986; 67:1215-35.

11. Feitelson MA, Millman I, Halbherr T, et al. A newly identified hepatitis B type virus in tree squirrels. Proc Natl Acad Sci USA 1986 83:2233-7.

12. Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. J Virol 1974 13:1231-6.

13. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Annu Rev Biochem 1987 56:651-93.

14. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. Cell 1980 21:801-9.

15. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. Nature 1985 317:489-95.

16. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. J Virol 1986 57:229-36.

17. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. Science 1986 232:477-84.

18. Will H, Reiser W, Weimer T, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. J Virol 1987 61:904-11.

19. Molnar-Kimber KL, Summers JW, Mason WS. Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcription. J Virol 1984 51:181-91.

20. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, et al. Compact organization of the hepatitis B virus genome. Hepatology 1989 9:322-7.

21. Galibert F, Chen TN, Mandart E. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. J Virol 1982 41:51-65.

22. Fields BN. Virology. 3rd ed. New York: Raven Press 1996.

23. Chisari FV, Ferrari C, Mondelli MU. Hepatitis B virus structure and biology. Microb Pathog 1989 6:311-25.

24. Uy A, Bruss V, Gerlich WH, et al. Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. Virology 1986 155:89-96.

25. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. J Virol 1984 52:396-402.

26. Neurath AR, Kent SB, Strick N, et al. Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. Nature 1985 315:154-6.

27. Gerlich WH, Bruss V, Heermann KH, et al. Presurface and precore products of human hepatitis B virus. In: Robinson W, Koike K, Will H, editors. New York: Alan R. Liss 1987:52-78.

28. Bavand M, Feitelson M, Laub O. The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene. J Virol 1989 63:1019-21.

29. Neurath AR, Thanavala YM. Hepadanviruses. In: van Regenmortel MHV, editor. Immunochemistry of Viruses II: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines. Amsterdam: Lesevier Science Publishers B.V. 1990:403-58.

30. Siddiqui A, Marion PL, Robinson WS. Ground squirrel hepatitis virus DNA: molecular cloning and comparison with hepatitis B virus DNA. J Virol 1981 38:393-7.

31. Mandart E, Kay A, Galibert F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. J Virol 1984 49:782-92.

32. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update. J Viral Hepat 1996 3:217-26.

33. Korba BE, Wells F, Tennant BC, et al. Lymphoid cells in the spleens of woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks are a site of active viral replication. J Virol 1987 61:1318-24.

34. Korba BE, Wells F, Tennant BC, et al. Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes *in vivo:* woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis. J Virol 1986 58:1-8.

35. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 1982 29:403-15.

36. Blum HE, Haase AT, Harris JD, et al. Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: demonstration of cytoplasmic minus-strand DNA by blot analyses and *in situ* hybridization. Virology 1984 139:87-96.

37. Fowler MJ, Monjardino J, Tsiquaye KN, et al. The mechanism of replication of hepatitis B virus: evidence of asymmetric replication of the two DNA strands. J Med Virol 1984 13:83-91.

38. Klingmuller U, Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. J Virol 1993 67:7414-22.

39. Ishikawa T, Kuroki K, Lenhoff R, et al. Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus. Virology 1994 202:1061-4.

40. Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. EMBO J 1990 9:3389-96.

41. Molnar-Kimber KL, Summers J, Taylor JM, et al. Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. J Virol 1983 45:165-72.

42. Fowler P, Nayersina R, Missale G, et al. The role of the cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B virus immunobiology and pathogenesis. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, editors. Viral hepatitis and liver disease. Tokyo: Springer-Verlag 1994:173-7.

43. Standring DN, Rutter WJ, Varmus HE, et al. Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region. J Virol 1984 50:563-71.

44. Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, et al. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1987 84:2678-82.

45. Etiemble J, Möröy T, Trepo C, et al. Nucleotide sequence of the woodchuck hepatitis virus surface antigen mRNAs and the variability of three overlapping viral genes. Gene 1986 50:207-14.

46. Möröy T, Etiemble J, Trepo C, et al. Transcription of woodchuck hepatitis virus in the chronically infected liver. EMBO J 1985 4:1507-14.

47. Enders GH, Ganem D, Varmus H. Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant. Cell 1985 42:297-308.

48. Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. EMBO J 1984 3:2191-6.

49. Chen PJ, Chen CR, Sung JL, et al. Identification of a doubly spliced viral transcript joining the separated domains for putative protease and reverse transcriptase of hepatitis B virus. J Virol 1989 63:4165-71.

50. Suzuki T, Masui N, Kajino K, et al. Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:8422-6.

51. Su TS, Lai CJ, Huang JL, et al. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. J Virol 1989 63:4011-8.

52. Obert S, Zachmann-Brand B, Deindl E, et al. A splice hepadnavirus RNA that is essential for virus replication. EMBO J 1996 15:2565-74.

53. Laub O, Rall LB, Truett M, et al. Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. J Virol 1983 48:271-80.

54. Cattaneo R, Will H, Hernandez N, et al. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. Nature 1983 305:336-8.

55. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, et al. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. Nature 1979 281:646-50.

56. Ono Y, Onda H, Sasada R, et al. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. Nucleic Acids Res 1983 11:1747-57.

57. Ganem D. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Third ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996 2703-37.

58. Summers J, Smith PM, Horwich AL. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. J Virol 1990 64:2819-24.

59. Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci USA 1991 88:1059-63.

60. Gerlich WH, Feitelson MA, Marion PL, et al. Structural relationships between the surface antigens of ground squirrel hepatitis virus and human hepatitis B virus. J Virol 1980 36:787-5.

61. Feitelson MA, Marion PL, Robinson WS. The nature of polypeptides larger in size than the major surface antigen components of hepatitis b and like viruses in ground squirrels, woodchucks, and ducks. Virology 1983 130:76-90.

62. Schaeffer E, Snyder RL, Sninsky JJ. Identification and localization of pre-s-encoded polypeptides from woodchuck and ground squirrel hepatitis viruses. J Virol 1986 57:173-82.

63. Itoh Y, Takai E, Ohnuma H, et al. A synthetic peptide vaccine involving the product of the pre-S(2) region of hepatitis B virus DNA: protective efficacy in chimpanzees. Proc Natl Acad Sci USA 1986 83:9174-8.

64. Neurath AR, Seto B, Strick N. Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein are virus-neutralizing and protective. Vaccine 1989 7:234-6.

65. Alberti A, Cavalletto D, Chemello L, et al. Fine specificity of human antibody response to the PreS1 domain of hepatitis B virus. Hepatology 1990 12:199-203.

66. Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, et al. A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. Gastroenterology 1983 85:268-74.

67. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. A frameshift mutation in the pre-S region of the human hepatitis B virus genome allows production of surface antigen particles but eliminates binding to polymerized albumin. Proc Natl Acad Sci USA 1985 82:3440-4.

68. Stahl S, MacKay P, Magazin M, et al. Hepatitis B virus core antigen: synthesis in Escherichia coli and application in diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA 1982 79:1606-10.

69. Ou JH, Laub O, Rutter WJ. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1986 83:1578-82.

70. Standring DN, Ou JH, Masiarz FR, et al. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in Xenopus oocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1988 85 :8405-9.

71. Chen HS, Kew MC, Hornbuckle WE, et al. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. J Virol 1992 66 :5682-4.

72. Takahashi K, Imai M, Miyakawa Y, I et al. Duality of hepatitis B e antigen in serum of persons infected with hepatitis B virus: evidence for the nonidentity of e antigen with immunoglobulins. Proc Natl Acad Sci USA 1978 75:1952-6.

73. Bavand MR, Laub O. Two proteins with reverse transcriptase activities associated with hepatitis B virus-like particles. J Virol 1988 62:626-8.

74. Kawamoto S, Yamamoto S, Ueda K, et al. Translation of hepatitis B virus DNA polymerase from the internal AUG codon, not from the upstream AUG codon for the core protein. Biochem Biophys Res Commun 1990 171:1130-6.

75. Weimer T, Schodel F, Jung MC, et al. Antibodies to the RNase H domain of hepatitis B virus P protein are associated with ongoing viral replication. J Virol 1990 64:5665-8.

76. Wang GH, Seeger C. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. J Virol 1993 67:6507-12.

77. Bartenschlager R, Junker Niepmann M, Schaller H. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. J Virol 1990 64:5324-32.

78. Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. Cell 1992 71:663-70.

79. Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G, et al. The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. Virology 1988 166:475-85.

80. Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:2046-50.

81. Balsano C, Billet O, Bennoun M, et al. The hepatitis B virus X gene product transactivates the HIV-LTR *in vivo*. Arch Virol Suppl 1993 8:63-71.

82. Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, et al. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. Biochem Biophys Res Commun 1991 176:985-92.

83. Zhou MX, Watabe M, Watabe K. The X-gene of human hepatitis B virus transactivates the c-jun and alpha-fetoprotein genes. Arch Virol 1994 134:369-78.

84. Blum HE, Zhang ZS, Galun E, et al. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle *in vitro*. J Virol 1992 66:1223-7.

85. Chen HS, Kaneko S, Girones R, et al. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. J Virol 1993 67:1218-6.

86. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. J Virol 1994 68:2026-30.

87. Heathcote J, Cameron CH, Dane DS. Hepatitis-B antigen in saliva and semen. Lancet 1974 1:71-3.

88. Mosley JW. The epidemiology of viral hepatitis: an overview. Am J Med Sci 1975 270:253-70.

89. McLean AA. Hepatitis B vaccine: a review of the clinical data to date. J Am Dent Assoc 1985 110:624-8.

90. Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Third ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996 2739-807.

91. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. Lancet 1981 2:1129-33.

92. Beasley RP, Hwang LY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. Semin Liver Dis 1984 4:113-21.

93. Barker LF, Chisari FV, McGrath PP, et al. Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. J Infect Dis 1973 127:648-62.

94. Bancroft WH, Snitbhan R, Scott RM, et al. Transmission of hepatitis B virus to gibbons by exposure to human saliva containing hepatitis B surface antigen. J Infect Dis 1977 135:79-85.

95. Tabor E, Purcell RH, Gerety RJ. Primate animal models and titered inocula for the study of human hepatitis A, hepatitis B, and non-A, non-B hepatitis. J Med Primatol 1983 12:305-18.

96. Thung SN, Gerber MA, Purcell RH, et al. Animal model of human disease. Chimpanzee carriers of hepatitis B virus. Chimpanzee hepatitis B carriers. Am J Pathol 1981 105:328-32.

97. Popper H, Shih JW, Gerin JL, et al. Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations. Hepatology 1981 1:91-8.

98. Gerin JL. Experimental WHV infection of woodchucks: an animal model of hepadnavirus-induced liver cancer. Gastroenterol Jpn 1990 25 Suppl 2:38-42.

99. Buendia MA. Hepatitis B viruses and liver cancer : the woodchuck model. In: Mirson A, Neil J, McCrae M, editors. Viruses and cancers. Cambridge: Cambridge University Press 1994 183-7.

100. Roggendorf M, Tolle TK. The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man. Intervirology 1995 38:100-12.

101. Gerin JL, Tennant BC, Ponzetto A, et al. The woodchuck animal model of hepatitis B-like virus infection and disease. Prog Clin Biol Res 1983 143:23-8.

102. Popper H, Roth L, Purcell RH, et al. Hepatocarcinogenicity of woodchuck hepatitis virus. Proc Natl Acad Sci USA 1987 84:866-70.

103. Ponzetto A, Cote PJ, Popper H, et al. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. Proc Natl Acad Sci USA 1984 81:2208-12.

104. Ponzetto A, Forzani B, Smedile A, et al. Acute and chronic delta infection in the woodchuck. Prog Clin Biol Res 1987 234:37-46.

105. Schlipkoter U, Ponzetto A, Fuchs K, et al. Different outcomes of chronic hepatitis delta virus infection in woodchucks. Liver 1990 10:291-301.

106. Choi SS, Rasshofer R, Roggendorf M. Propagation of woodchuck hepatitis delta virus in primary woodchuck hepatocytes. Virology 1988 167:451-57.

107. Choi SS, Rasshofer R, Roggendorf M. Inhibition of hepatitis delta virus RNA replication in primary woodchuck hepatocytes. Antiviral Res 1989 12:213-22.

108. Tyler GV, Summers JW, Synder RL. Woodchuck hepatitis virus in natural woodchuck populations. J Wildl Dis 1981 17:297-301.

109. Wright J, Tennant BC, May B. Genetic variation between woodchuck populations with high and low prevalence rates of woodchuck hepatitis virus infection. J Wildl Dis 1987 23:186-91.

110. Wong DC, Shih JW, Purcell RH, et al. Natural and experimental infection of woodchucks with woodchuck hepatitis virus, as measured by new, specific assays for woodchuck surface antigen and antibody. J Clin Microbiol 1982 15:484-90.

111. Chomel B, Trepo C, Pichoud C, et al. [Spontaneous and experimental infection of alpine marmots (*Marmota marmota*) by the North American woodchuck hepatitis virus (*Marmota monax*). Initial results] Infection spontanee et experimentale de la marmotte alpine (*Marmota marmota*) par le virus de l'hepatite de la marmotte nord-americaine (*Marmota monax*). Premiers resultats. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1984 7:179-94.

112. Robinson WS, Marion PL, Feitelson MA, et al. The hepadna virus Group: hepatitis B and related viruses. Philadelphia: Franklin Institute Press 1982.

113. Tyler GV. Natural and experimental infections of woodchuck hepatitis virus. 1984 University of Pennsylvania.

114. Millman I, Southam L, Halbherr T, et al Woodchuck hepatitis virus: experimental infection and natural occurrence. Hepatology 1984 4:817-23.

*115. Tyler GV, Snyder RL, Summers J. Experimental infection of the woodchuck (*Marmota monax*) with woodchuck hepatitis virus. Lab Invest 1986 55:51-5.*

116. Toshkov I, Hacker HJ, Roggendorf M, et al. Phenotypic patterns of preneoplastic and neoplastic hepatic lesions in woodchucks infected with woodchuck hepatitis virus. J Cancer Res Clin Oncol 1990 116:581-90.

117. Callard R, Gearing A. The Cytokine FactsBook. London Academic Press 1994.

118. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in desease. Blood 1996 87:2095-147.

119. Roberts RM, Liu L, Alexenko A. New and atypical families of type I interferons in Mammals: Comparative funktions, struktures, and evelutionary relationships. Prog. Nucleic Acid Res. Mol Biol 1997 56287-325.

120. Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, et al. A lymphotoxin-β-specific receptor. Science 1994 264:707-10.

121. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. Cell 1994 76:959-62.

122. van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb GC, et al. Molekular organization of the cytokine gen cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. Blood 1989 73:1142-8.

123. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. Immonol Today 1994 15:19-26.

124. Smirnov DV, Smirnova MG, Korobko VG, et al. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: Resemblance in their organization. Gene 1995 155:277-81.

125. Sprang SR, Bazan JF. Cytokine struktural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. Curr Opin Struct Biol 1993 3:815-27.

126. Bazan JF, Timans JC, Kastelein RA. A newly defined interleukin-1? Nature 1996 379:591.

127. Barbara JAJ, Van Ostade X, Lopez AF. Tumor necrosis Factor-alpha (TNF-α): The good, the bad and potentially very effective. Immunol Cell Biol 1996 74:434-43.

128. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. Curr Opin Immunol 1995 7:333-42.

129. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and funktion. Annu Rev Immunol 1997 15:707-47.

130. Akira S, Kishimot T. NF-IL6 and NF-κB in cytokine gene regulation. Adv Immunol 1997 65:1-46.

131. Foletta VC, Segal DH, Cohen DR. Transcritional regulation in the immun system: All roads led to AP-1. J Leuk Biol 1998 63:139-52.

132. Fitzpatrick DR, Kelso A. Independent regulation of cytokine genes in T cells. The paradox in the paradigm. Transplantation 1998 65:1-5.

133. Cosman D. Control of messenger RNA stability. Immunol. Today 1987 8:16-17.

134. Chen C-YA, Shyu A-B. AU-rich elements: Charakterization and importance in mRNA degradation. Trends Biochem Sci 1995 20:465-70.

135. Brown CY, Lagnado CA, Goodall GJ. A cytokine mRNA-destabilizing element that is structurally and functionally distinct from A+U-rich elements. Proc Natl Acad Sci USA 1996 93:13721-5.

136. Lindsten T, June CH, Ledbetter JA et al. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. Science 1989 244:339-43.
137. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. J Exp Med 1993 177:1675-80.

138. Kruys V, Marinx O, Shaw G et al. Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. Science 1989 245:852-5.

139. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature 1994 372:739-46.

140. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon-γ inducing factor mediated by interleukin-1β converting enzyme. Science 1997 275:206-9.

141. Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, et al. Processing of tumor necrosis factor-α precursor by metalloproteinases. Nature 1994 370:555-7.

142. Körner H, Sedgwick JD. Tumor necrosis factor and lymphotoxin: Molekular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. Immunol Cell Biol 1996 74:465-72.

143. Stein J, Borzillo GV, Rettmier CW. Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane-bound precursor of human CSF-1. Blood 1990 76:1308-14.

144. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: Association with granules and immunoglobulin dependent secretion. J Exp Med 1994 179:703-8.

145. Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Eosinophils: Biology and role in disease. Adv Immunol 1995 60:151-66.

146. Poo WJ, Conrad L, Janeway CA. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. Nature 1988 332:378-80.

147. Kupfer A, Mosmann TR, Kupfer H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991 88:775-9.

148. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, et al. Reciprocal expression of interleukin γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishnaniasis. Evidence for expansion of distinct helpert T cell subsets. J Exp Med 1989 169:59-72.

149. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. Science 1991 254:277-9.

150. Matesanz F, Alcina A. Glutamine and tetrapeptide repeat variations affect the biological activity of different mouse interleukin-2 alleles. Eur J Immunol 1996 26:1675-82.

151. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, et al. Variation in the TNF-α promotor region associated with suspectibility to cerebral malaria. Nature 1994 371 508-10.

152. Mansfield JC, Holden H, Tarlow, et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. Gastroenterology 1994 106:637-42.

153. Mosman TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989 7:145-73.

154. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper lymphocytes. Nature 1996 383:787-93.

155. Trinchieri G. Biology of Natural Killer Cells. Adv Imminol 1989 47:187-376.

156. Orange JS, Biron CA. characterization of early IL-12, IFN-α/β, and TNF effects on antiviral state and NK cell response during murine cytomegalovirus infection. J immunol 1996 156:4746-56.

157. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo*. Science 1996 272:1947-50.

158. Biron CA. cytokines in the genaration of immune responses to, and resolution of, virus infection. Curr Op Immunol 1994 6:530-8.

159. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. Curr Op Immunol 1996 8:478-83.

160. Lukacher AE, Braciale VL, Braciale TJ. *In vivo* effector function of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte clones is highly specific. J Exp Med 1984 160:814-26.

161. Kägi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature 1994 369:31-37.

162. Walsh CM, Matloubian M, Liu C, et al. Immune function in mice lacking the perforin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1994 91:10954-8.

163. Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, et al. High level hepatitis B virus replication in transgenic mice. J Virol 1995 69:6158-69.

164. Ando K, Guidotti LG, Wirth S, et al. Class I restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells *in vivo*. J Immunol 1994 152:3245-53.

165. Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, et al. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. Science 1990 154:361-364.

166. Wirth S, Guidotti LG, Ando K, et al. Breaking tolerance leads to autoantibody produktion but not autoimmune liver disease in HBV transgenic mice. Immunol 1995 154:2504-15.

167. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, et al. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 1996 4:25-36.

168. Gilles PN, Fey G, Chisari FV. Tumor necrosos factor-alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice . J Virol 1994 68:1265-70.

169. Guidotti LG, Guilhot S, Chisari FV. Interleukin-2 and interferon alpha/beta downregulate hepatitis B gene expression *in vivo* by tumor necrosis factor dependent and independent pathways. J Virol 1994 8:1265-70.

170. Guilhot S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-2 downregulates hepatitis B virus gene expression in trasnsgeneic mice by a post-transcritional mechanism. J Virol 1993 67:7444-9.

171. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem 1991 266:7313-6.

172. Davis JM, Narachi MA, Alton NK, et al. Structure of human tumor necrosis factor alpha derived from recombinant DNA. Biochem 1987 26:1322-6.

173. Jones EY, Stuart DI, Walker NP. Structure of tumor necrosis factor. Nature 338:225-8.

174. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. J Biol Chem 264:17595-605.

175. Kriegler M, Perez C, DeFay K, et al. A novel form of TNF/catechin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1988 53:45-53.

176. Luettig B, Decker T, Lohmann-Matthes ML. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. J Immunol 1989 143:4034-8.

177. Perez C, Albert I, DeFay K, et al. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. Cell 1990 63:251-8.

178. Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, et al. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. Cytokine 1990 2:231-7.

179. Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, et al. Molekular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. Cell 1990 61:361-70.

180. Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, et al. Molekular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. Cell 1990 61:351-9.

181. Gray PW, Leung DW, Pennica, D, et al. Expession of human interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. Nature 1982 295:2822-30.

182. Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. Natural human interferon.gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycolysation. J Biol Chem 1984 259:6790-7.

183. DeGrado WF, Wassermann ZR, Chowdhry V. sequence and structural homologies among type I and type II interferons. Nature 1982 300:379-81.

184. Zoon KC. Human interferons: structure and function. Interferon 1987 9:1-12.

185. Yip YK, Barrowclough BS, Urban C, et al. Purification of two subspecies of human gamma (immune) interferon. Proc Natl. Acad. Sci USA 1982 79:1820-4.

186. Kelker HC, Yip YK, Anderson P, et al. Effects of glycosidase treatment on the physiochemical properties and biological activity of human interferon.gamma. J Biol Chem 1983 13:8010-3.

187. Arakawa T, Hsu YR, Chang D, et al. Stricture and function of glycosylated human interferon-gamma. J Interferon Res 1986 6:687-95.

188. Lunn CA, Davies L, Dalgarno, et al. An active covalently linked dimer of human interferon-gamma. Subunit orientation in the native protein. J Biol Chem 1992 167:17920-4.

189. Rashidbaigi A, Langer JA, Jung V, et al. the gene for the human interferon receptor is located on chromaosome 6. Proc Natl Acad Sci USA 1986 83:384-8.

190. Aguet M, Dembic Z, Merlin G. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. Cell 1988 55:273-80.

191. Fischer DG, Novick D, Orchansky P, et al. Two molecular forms of the human interferon-gamma receptor. Ligand binding, internalization, and down-regulation. J Biol Chem 1988 263:2632-7.

192. Calderon J, Sheehan KC, Chance C, et al. Purification and characterization of human interferon-gamma receptor from placenta. Proc Natl Acad Sci USA 1988 85:4837-41.

193 Hershey GK, Schreiber RD. Biosynthetic analysis of the human interferon-gamma receptor. Identification of N-linked glycolysation intermediates. J Biol Chem 1989 264:11981-8.

194. Hemmi S, Bohni R, Stark G, et al. A novel member of the interferon receptor family complememts funcionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. Cell 1994 76:803-10.

195. Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, et al. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. Cell 1994 76:793-802.

196. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to INFs and other extracellular signaling proteins. Science 1994 264:1415-21.

197. Johnson HM, Bazer FW, Szente BE, et al. How interferons fight disease. Sci Am 1994 270:68-75.

198. Williams BR. Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. Eur J Biochem 1991 200:1-11.

199. Shuai K, Stark GR, Kerr IM, et al. a single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. Science 1993 261:1744-6.

200. Sadowski HB, Shuai K, Darnell JE. A common nuclear signal transduction pathway activated by groth factor and cytokine receptors. Science 1993 261:1739-44.

201. Decker T, Lew DJ, Mirkowski J, et al. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. EMBO J 1991 10:927-32.

202. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complemantary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobin. Nature 1986 324:73-6.

203. Haegeman G, Content J, Volckaert G, et al. Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. Eur J Biochem 1986 159:625-32.

204. Zilberstein A, Ruggieri, Korn JH, et al. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. EMBO J 1986 159:625-32.

205. May LT, Helfgott DC, Sehgal PB. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: struktural studies of the beta 2 interferon involved. Proc Natl Acad Sci USA 1986 83:8957-61.

206. Anderson DM, Johnson L, Glaccum, MB, et al. Chromosomal assignment and genomic strukture of IL15. Genomics 1995 25:701-6.
207. Brandhuber BJ, Boone T, Kenny WC, et al. Three-dimensional structure of interleukin-2. Science 1987 238:1707-9.

208. Grabstein KH, Eisenmann J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science 1994 264:965-8.

209. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. J Exp Med 1994 180:1395-403.

210. Giri JG, Ahdieh M, Eisenmann J, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel IL-15. EMBO J 1994 13:2822-30.

211. Pestka S. The purifikation of manufacture of human interferons. Sci Amer 1983 249:36-43.

212. Adolf GR, Maurer-Fogy I, Kalsner I, et al. Purification and characterization of natural human interferon omega. J Biol Chem 1990 265:9290-325.

213. Sen GC, Lengyel P. The interferon system. A bird´s eye view of its biochemistry. J Biol Chem 1992 267:5017-20.

214. Derynk R, Content J, deClercq C, et al. Isolation and structure of a human fibroblast gene. Nature 1980 285:542-7.

215. Sambrock J, Fritsch EF, Maniantis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

216. Pennica D, Hayflick JS, Bringmann TS, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for mouse tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci USA 1985 82:6060-4.

217. Nishi T, Fujita T, Nishi-Takaoka C, et al. Cloning and expressing of a novel variant of human interferon-gamma cDNA. J Biochem 1985 97:153-9.

218. Gray PW, Goeddel DV. Cloning and expression of mouse immune interferon cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 1983 80:5842-6.

219. Northeman W, Braciak TA, Hattori M, et al. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. J Biol Chem 1989 264:16072-82.

220. Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, et al. Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. Genomics 1995 25:701-6

221. Accession number GenBank: AB004047

222. Accession number GenBank: AF082499

223. Lefebvre B, Formstecher P, Lefebvre P. Improvement of the gene splicing overlap (SOE) method. Biotechniques 1995 19:186-8

224.Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1972 69:2110-4

225. Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 1979 6:23-8

226. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970 227:680-5

227. Hobbs MV, Weigle WO, Noonan DJ, et al. Patterns of Cytokine Gene Expression by $CD4^+$ T Cells from Young and Old Mice. J Immunol 1993 150:3602-14.

228. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, et al. Human necrosis factor: Production, purification and characterization. J Biol Chem 1985 260:2345-54.

229. Loetscher H, Stueber D, Banner D, et al. Human tumor necrosis factor α (TNF-α) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. J Biol Chem 1990 268:26350-7.

230. Wang AM, Creasey AA, Ladner MB, et al. Molecular cloning of the complementary DNA for tumor necrosis factor. Science 1985 228:149-54

231. Estler, HC, Grewe M, Gaussling R, et al. Rat tumor necrosis factor-alpha. Transcription in rat Kuppfer cells and *in vitro* posttranscriptional processing based on a PCR-derived cDNA. Biol Chem 1992 373:271-81

232. Mertens B, Muriuki C, Gaidulis L. Cloning of two members of the TNF-superfamily in cattle: CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha. Immunogenetics 1995 42:430-1

233. Kiyota T, Hayashi H, Kato M, et al. Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA coding for rabbit tumor necrosis factor. DNA 1986 5:149-56

234. Dijkema R, Van Der Meide PH, Dubbeld M, et al. Cloning, expression, purification of rat IFN-γ. Meth Enzymol 1986 119:453-63

235. Cerretti DP, McKereghan K, Larsen A, et al. Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma. J Immunol 1986 136:4561-4

236. May LT, Helfgott DC, Sehgal PB. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. Proc Natl Acad Sci USA 1986 83:8957-61

237. Grenett HE, Fuentes NL, Fuller GM. Cloning and sequence analysis of the cDNA for murine interleukin-6. Nucleic Acids Res 1990 18:6455

238. Grabstein KK, Eisenman J, Sheanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science 1994264:965-8

239. Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, et al. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin-15. Gastroenterology 1996

240. Zarlenga DS, Canals A, Boyd P, et al. Cloning and expression of bovine IL15: distribution and modulation of transcription in animals infected with gastrointestinal nematodes. Accession number: BTU42433

241. Aguet M, Dembic Z, Merlin G. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. Cell 1988 55:273-80

242. Gray PW, Leong S, Fennie EH, et al. Cloning and expression of the cDNA for the murine interferon gamma receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:8497-501

243. Neumann H. GenBank Accession number: RNU68272

244. Roggendorf M. Die Hepadnaviren und ihre Korrelation zum hepatozellularen Carcinom. Internist (Berlin) 1985 26:621-7

245. Zuckermann AJ. The development of novel hepatitis B vaccines. Bull World Health Organ 1987 65:265-75

246. Chisari FV, Ferrari C. Immunopathogenesis of hepatitis B virus. Annu Rev Immunol 1995 13:29-60.

247. Yoo JY, Howard R, Waggoner JG, et al. Peroxidase-anti-peroxidase detection of hepatits B surface and core antigen in liver biopsy specimens from patients with chronic type B hepatitis. J Med Virol 1987 23:273-81.

248. Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, et al. cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. J Clin Invest 1996 97:1655-65.

249. Guidotti LG, Rochford R, Chung J et al. Viral Clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science 1999 284:825-29.

250. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. Cell 1986 47:451-60.

251. Nakamura I, Nupp JT, Rao BS, et al. Cloning and characterization of partial cDNAs for woodchuck cytokines and CD3epsilon with applications for the detection of RNA expression in tissues by RT-PCR assay. J Med Virol 1997 53:85-95.

252. Van Ostade X, Vandenabeele P, Everaerdt B, et al. Human TNF mutants with selective activity of the p55 receptor. Nature 1993 361:266-269.

253. Griggs ND, Jarpe MA, Pace JL, et al. The N-terminus and C-terminus of IFN-γ are binding domains for cloned soluble IFN-γ receptor. J Immunol 1992 149:517-520.

254. Walter MR, Windsor WT, Natgabhushan, et al. Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. Nature 1995 376:230-5.

255. Lunn CA, Fossetta J, Dalgarno D, et al. A point mutation of human interferon-gamma abolishes receptor recognition. Protein Eng 1992 5:253-7.

256. Lundell DJ, Lunn CA, Dalgarno D, et al. The carboxy-terminal region of human interferon γ is important for biological activity: mutagenic and NMR analysis. Protein Eng 1991 4:335-41.

257. Jambou RC, Snouwaert JN, Bishop GA, et al. High level expression of a bioengineered, cysteine-free hepatocyte-stimulating factor (interleukin-6)-like protein. Proc Natl Acad Sci USA 1988 85:94426-30.

258. Brakenhoff JP, Hart M, de Groot ER, et al. Structure-function analysis of human IL-6. J Immunol 1990 145:561-8.

259. Fountoulakis M, Juranville JF, Maris A, et al. One interferon gamma receptor binds one interferon gamma dimer. J Biol Chem 1990 265:19758-67

8 Anhang

8.1 Sequenzen

```
   1  CTCAGCCTCC TAGCTGTTGG CACTTGTTTT CAGGAAGATG ATGAAGAAAA
  51  TGATGACCTA ACACAGATAC CATACAAAGT CTCCATCTCG GGAACTGATG
 101  TGATGCTGAC ATGCCCTCCA AAAGCTCTGC AGGGCACAAT AAATTGGGAA
 151  AGAAATGACA AAAAACTAGA AGGCGAAAAT GACGAACAAC TGATACTGAA
 201  GAATTTTTCA GAAATGGATA ACAGTGGTTA TTACGTCTGC TACACAACCC
 251  CAAGACAAAA AGAGAATATC CATTTTCTGT ACCTGAGAGC TAGAGTGTGT
 301  GAGAACTGCG TAGAGGTGGA TCTGACGGCT GTGGCCACAA TCATCGTAGT
 351  CGACATCTGT GTCACTCTGG GCTTGCTGAT GCTGGTTTAT TACTGGAGCA
 401  AGAATAGAAA GGCCAAGGCC AAACCTGTGA CACGTGGAGC AGGCGCTGGT
 451  GGCAGGCCCA GGGGACAAAA TAAGGAGAGG CCACCACCTG TTCCCAACCC
 501  GGACTATGAG CCCATCCGCA GGCCAGG  cd3
```

Abb. 39 527 bp des ORFs von Woodchuck CD3. Start- bzw. Stopcodon sind in diesem Fragment nicht enthalten.

```
   1  GAACATGTTG TTTACCTGGA AACATTCTAA CCAGAAGATT CTGGGAAATC
  51  AGAACAACTT CTTGACCAAA GGTTCCTCCC ATCTGAGTGA TCGCACTGAC
 101  TCAAAAAAAT CCCAGTGGGA TCAAGGATCC TTTCCTCTTA TCATCTCTAA
 151  ACTTAGGATG GAAGACTCAG GGACCTACAT CTGTGAAGTG GAGAATAAGA
 201  AGATAGAGGT GGAATTGCAA GTGTTCAGAT TAACGGCCAA CCCGGGTACC
 251  TGTCTGCTAC AGGGGCAAAG CCTGACCCTG ACCTTGGAAT CCCCTCCTGG
 301  TATTAAACCT TCAGTGAAAT TCAAGCAACC AGGGAATAAA ATTAGTACTG
 351  ATGTCGAGGT CTCAGTACCC AATGTGGGAT TCCAGGACAG TGGCACCTGG
 401  ACATGCTTCA TCTCCCAGGA CCAGAAGAGT CTGGAAATAA AAATAAACAT
 451  CTTGGTGTTG GGTTTCCAGG AGACGCTCAA CACAGTCTAT AAGAAAGCGG
 501  GGGAGCAGGT GGAGTTATCT TTTCCACTGA ATATCGGAGA TGAGGACCTG
 551  AGAGGGGAAC TGAAGTGGCA GGCAGAGAGG TCTTCTTCCT CCAAGACCTG
 601  GGTCACCTTC TCCTTAAAGA ATAAGCACTT TTCTGTGCAA AAGGTTACCC
 651  AGGACCCAAA GCTCCAGGTG GCTGAGAATC TCCCGCTGCG CTTCACCCTG
 701  TCCCAGGCTT TGCCTCAGTA TGCTGGTTCT GGAGACCTGA CTGTGACTCT
 751  TGACAAAGGA AATCTGCATA AGAACGTGAA GCTGGTGGTA ATGAATGTGA
 801  CTTATCACCA GAATGACTTG ATCTGTGAGG TGCTGGGACC CACTCCTCCC
 851  AAGCTGATGC TGAGCTTGAA GCTGAAGAAC CAGGAGGCTA AGGTCTCAAA
 901  GCCCGAGAAG AGGATTCGGG TGCCAAACCC CAAGGCAGGG ATGTGGCAGT
 951  GCCTACTGAG AGATGGGGAC AAGGTTCTAC TGGATTTCCA GATTGATGTT
1001  CCACCCACAG AGTTAAACCA GTACCAGCCA ATGTTCCTGG CTGTCATAAT
1051  TGGAGGCGCC TTGAGCTTCC TGCTCCTCGC TGGGCTCTGC ATCTTCTGTT
1101  GTGTCAAGTG CCGACACCGA AGGCGCCAGG CAGAGCGGAT GTC
```

Abb. 40 1143 bp des ORFs von Woodchuck CD. Start- bzw. Stopcodon sind in diesem Fragment nicht enthalten.