

1. Einleitung

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Krankheitserreger zu bekämpfen. Es wird in zwei funktionelle Untereinheiten, das angeborene und das erworbene Immunsystem, eingeteilt. Die meisten angeborenen und alle erworbenen Immunreaktionen basieren auf Reaktionen der weißen Blutzellen. Das erworbene Immunsystem (z.B. Lymphozyten) ist von Interaktionen mit dem angeborenen Immunsystem (z.B. Makrophagen, natürliche Killerzellen, Komplement) abhängig. Während die Zellen der angeborenen Immunität beim ersten Kontakt mit einer fremden Substanz reagieren können, muß das erworbene Immunsystem zunächst aktiviert werden. Dies geschieht in den sekundären lymphatischen Organen (z.B. Milz, Lymphknoten). Hierzu ist eine Stimulierung durch Zellen des angeborenen Immunsystems erforderlich. Das Antigen wird von dendritischen Zellen (DC) über Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (MHC) den T Zellen präsentiert. T Zellen erkennen über den antigen-spezifischen T Zell-Rezeptor (TCR) diesen MHC-Antigen-Komplex. Zur vollständigen Aktivierung der T Zellen ist außerdem eine Interaktion verschiedener Moleküle (z.B. CD8, CD4, CD28) mit den entsprechenden Rezeptoren auf den DC (z.B. MHC I, MHC II, CD 86) erforderlich („Kostimulation“). Nach der Ausdifferenzierung zu spezifischen Effektorzellen (T Helferzellen oder zytotoxische T Zellen) verlassen diese die lymphatischen Organe und wandern in die betroffenen Gewebe. Parallel bilden sich „Gedächtnis“-Zellen (memory cells), die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen (Ag) eine schnellere und effektivere Reaktion ermöglichen. Zytotoxische T Zellen (CTL) vernichten infizierte und entartete Zellen durch lösliche Moleküle. T Helferzellen (Th Zellen) sind in den lymphatischen Organen an der Proliferation und Differenzierung der CD8⁺ Zellen zu CTL und der B Zellen zur antikörper-sezernierenden Plasmazelle nach Ag-Kontakt, beteiligt. Die sezernierten Antikörper (Ak) bewirken u.a. eine Ag-spezifische Phagozytose von Makrophagen (M) und neutrophilen Granulozyten und eine Aktivierung der natürlichen Killerzellen (NK). Weiterhin sezernieren aktivierte Th Zellen Zytokine, die für die Aktivierung von NK Zellen und M verantwortlich sind. Das angeborene Immunsystem wird so durch die Interaktionen des erworbenen Immunsystems ebenfalls stimuliert.

1.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) gehören zu den professionellen antigen-präsentierenden Zellen, die eine zentrale Bedeutung bei der Initiierung von Immunantworten haben. Paul Langerhans entdeckte 1868 die nach ihm benannten Zellen in der Haut (Langerhans Zellen), die er jedoch für Nervenzellen hielt. Als Immunzellen wurden sie erst ca. 100 Jahre später charakterisiert. Ihre langen Ausläufer bilden ein feines Netzwerk in der Haut. Birbeck entdeckte 1961 elektronenmikroskopisch für diese Zellen typische Granula. Diese nach ihm benannten Granula wurden in DC in der Haut, in den afferenten Lymphbahnen und Lymphknoten gefunden, woraufhin die Fähigkeit zur Migration und Transition von Langerhans Zellen (LC) der Haut zu DC im Lymphknoten vermutet und später gezeigt wurde (Silberberg-Sinakin et al., 1976; Schuler & Steinman, 1985; Cumberbatch & Kimber, 1992). Studien an Mausmodellen zeigten, daß LC *in vitro* zu DC differenziert werden konnten (Schuler & Steinman, 1985). Auf der Oberfläche von LC konnten Fc- und C3-Rezeptoren sowie MHC II Moleküle nachgewiesen werden (Stingl et al., 1977; Klareskog et al., 1977; Rowden et al., 1977; Stingl et al., 1978). Diese Rezeptoren kommen auf der Oberfläche von antigen-präsentierenden Zellen (APC) vor und spielen bei der Ag Erkennung eine Rolle. Im weiteren konnte gezeigt werden, daß LC von Zellen des Knochenmarks abstammen und CD1a als Oberflächenmarker, der sonst nur auf Thymozyten vorkommt, exprimieren (Katz et al., 1979; Misery et al., 1992; Meunier et al., 1993). LC gelten heute als Prototyp unreifer dendritischer Zellen (zusammengefaßt bei Steinman, 1991; Peters et al., 1996; Banchereau & Steinman, 1998).

DC wurden namensgebend erstmals 1973 in murinen Lymphknoten und der Milz als langgestreckte Zellen mit Ausläufern beschrieben (Steinman & Cohn, 1973). In geringerem Maße kommen sie in fast allen Organen (Epidermis der Haut, Lunge, Leber, Herz, Verdauungstrakt usw.) als unreife DC (iDC) vor. Dort nehmen sie Antigene oder Fremdkörper durch Pinozytose, Phagozytose oder Makropinozytose auf (Reis e Sousa et al., 1993; Filgueira et al., 1996; Rittig et al., 1998). Im Zusammenhang mit einem Gefahrensignal wie Lipopolysaccharid (LPS) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) erfolgt eine Aktivierung und Wanderung über die afferenten Lymphbahnen zum regionalen Lymphknoten (Cumberbatch & Kimber, 1992; De Smedt et al., 1996). DC konnten als sogenannte Schleierzellen (veiled

cells) in den afferenten Lymphbahnen bei verschiedenen Spezies sowie auch im Blut des Menschen nachgewiesen werden (Spry et al., 1980; Van Voorhis et al., 1982; Freudenthal & Steinman, 1990) (Tab.1). Sie liegen als sogenannte interdigitierende DC (IDC) in lymphatischen Organen wie Tonsillen, Milz, Lymphknoten oder Peyerschen Platten sowie im Thymus (Barclay & Mayrhofer, 1981; Witmer & Steinman, 1984; Hart & McKenzie, 1988). DC wandern in die T Zellareale, wo sie als IDC mit T Zellen und B Zellen in Kontakt treten und eine Immunantwort auslösen (Steinman, 1991; MacLennan, 1994; Banchereau & Steinman, 1998).

Tab.1: Terminologie der DC

Lokalisation	Morphologie	Aufgabe	Fähigkeit zur Ag-Präsentation
Gewebe DC/LC	sternförmige Zellen	Ag Aufnahme & Prozessierung	unreife (ruhende) DC
Migrierende DC	Schleierzellen (veiled cells)	Ag Transport	reifende DC
Lymphatische DC	Interdigitierende DC (IDC)	Ag Präsentation	reife (aktivierte) DC

modifiziert nach Steinbach et al., 1998a

Je nach Pathogen sollen verschieden geprägte Immunantworten initiiert werden. Bei einer Virusinfektion werden neutralisierende Antikörper (nAk) zur Inhibition freier Viren und CTL zum Abtöten infizierter Zellen benötigt. DC besitzen die Fähigkeit, Pathogene aufzunehmen, wonach diese in Endosome gelangen (Levine & Chain, 1992; Rittig et al., 1998). Hier findet mit Hilfe von proteolytischen Enzymen (z.B. Cathepsin) die Ag Prozessierung statt. Die MHC-Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum (eR) synthetisiert. Durch die Verbindung der MHC II-Moleküle mit einer invarianten Kette (Ii) wird eine vorzeitige Peptidbindung im eR verhindert und das MHC II-Molekül stabilisiert. Anschließend kann die Fusion zwischen Endosom und MHC II-Molekül stattfinden, dabei wird die invariante Kette abgespalten und das MHC II-Molekül kann das antigene Peptid binden. Der entstandene Peptid-MHC II-Komplex wird nach Fusion mit der

Plasmamembran an der Oberfläche präsentiert (Babbitt et al., 1985; Buus et al., 1987; Neefjes et al., 1992). Gelangen Proteine bei der Endozytose in das Zytosol oder wurden nach Infektionen in den APC neu synthetisiert, werden sie im Zytosol durch Proteasome in Peptide gespalten (Rock, 1996; Watts, 1997; Banachereau et al., 2000). Das TAP-Gen (Transporter associated with Antigen Processing) kodiert ein Protein, das den ATP-abhängigen Transport der Peptide in das ER ermöglicht. Dort verbinden sich die Peptide mit dem MHC I-Molekülen. Der Peptid-MHC I-Komplex wird durch β -2-Mikroglobulin stabilisiert. In Vesikeln wird dieser Komplex zur Zelloberfläche transportiert und den CTL (CD8⁺) präsentiert (Moore et al., 1988; Teyton et al., 1990; Yewdell & Bennink, 1992).

Von entscheidender Bedeutung für die Art der Immunantwort ist auch, welche T Helferzellen (Th) aktiviert werden. Man unterscheidet zwischen Th1 und Th2 Zellen. Th1 Zellen unterstützen die Entwicklung zellulärer Immunreaktionen und IgG1 Bildung (human), während Th2 Zellen bevorzugt die Antikörper-Synthese (IgG2a; human) in B Zellen stimulieren. DC können beide Arten aktivieren. Th1 und Th2 Zellen werden von verschiedenen Faktoren der Immunantwort induziert. Interferon (γ) (IFN γ) kann als Marker einer Th1 Antwort und Interleukin-4 (IL-4) als Marker einer Th2 Antwort verwendet werden. IFN γ unterstützt die Expression von Rezeptoren auf Th1 Zellen und inhibiert die Th2 Entwicklung. IL-4 wiederum inhibiert die Th1 Entwicklung und senkt die IFN γ Synthese (Janeway & Travers, 1994; Carter & Dutton, 1996; Abbas et al., 1996; London et al., 1998).

Die Bindung von TCR an MHC-Moleküle reicht jedoch nicht zur Aktivierung der T Zellen aus (1. Signal) (Cantrell, 1996). Sie benötigen eine sogenannte Kostimulation (2. Signal). Diese erhalten T Zellen vor allem durch Bindung ihres CD28 mit B7 (CD86/80) der DC (Linsley & Ledbetter, 1993; Hart et al., 1993; Lenschow et al., 1996). Es ist zu betonen, daß in der Situation einer primären Immunreaktion nur DC naive T Zellen ausreichend aktivieren können, denn nur sie besitzen alle notwendigen Rezeptoren in der ausreichenden Dichte (Inaba et al., 1986; Banachereau & Steinman, 1998). Weitere für die T Zell-Aktivierung wichtige Faktoren sind die von den APC sezernierten Zytokine wie z.B. IL-1 und IL-12 (Enk et al., 1993a; Kang et al., 1996; Banachereau & Steinman, 1998). IL-12 führt zur Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu Th1 Zellen, diese bilden IFN γ . IL-12 regt weiterhin die Expression von IL-18R auf Th1 Zellen an, so daß diese auf IL-18 reagieren, das ebenfalls die IFN γ Synthese verstärkt (Macatonia et al., 1993a;

1995; Yoshimoto et al., 1998; Xu et al., 2000; Nakanishi et al., 2001). IL-10 hingegen führt bei epidermalen LC zur Inhibierung der Produktion von IFN bei der Th1 Immunantwort, aber es beeinflusst nicht die T Zelle Proliferation (Enk et al., 1993b; Macatonia et al., 1993b).

Die Aktivierung der B Zellen durch T Zellen findet in den T Zellarealen des Lymphknotens statt. Die anfangs im Blut zirkulierenden B Zellen wandern in die Parakortex der Lymphknoten, dort treffen sie auf bereits aktivierte T Zellen (MacLennan, 1994). Diese T Zellen haben Ag-MHC II-Komplexe auf APC erkannt und gebunden. Die B Zellen wiederum binden u.a. über MHC II und CD40/CD40 Ligand an die T Helferzellen, werden aktiviert, wandern in die B Zellfollikel und reifen zur Plasmazelle (Clark & Ledbetter, 1994). Über CD 40 aktivierte DC sezernieren IL-12. Dieses wirkt mit dem IL-2 der Th Zellen auf die B Zelle ein und führt zu deren Differenzierung zur Plasmazelle und anschließender Ak Produktion (Cella et al., 1996). Gedächtnis-B Zellen können ebenfalls durch aktivierte DC zur IgG Sekretion angeregt werden (MacPherson & Liu, 1999; Banchereau et al., 2000). DC können naive B Zellen auch direkt zur Ak Bildung anregen (Wykes et al., 1998). Es entsteht dabei 4-13 mal mehr IgG als IgM.

Studien am Mausmodell zeigten, daß LC durch Zusatz von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) nach 1-3 Tagen in Kultur die Fähigkeit zur Antigenpräsentation entwickelten (Witmer-Pack et al., 1987; Heufler et al., 1988; Romani et al., 1990). Frisch isolierte LC dagegen prozessieren Ag am Besten (Romani et al., 1989a), allerdings ist ihre Stimulationskapazität für T Zellen nur schwach (Schuler & Steinman, 1985). TNF führt zu einer verbesserten Vitalität der gereinigten Langerhans Zellen aus der Haut, ohne eine akzessorische Funktion zu induzieren (Koch et al., 1990).

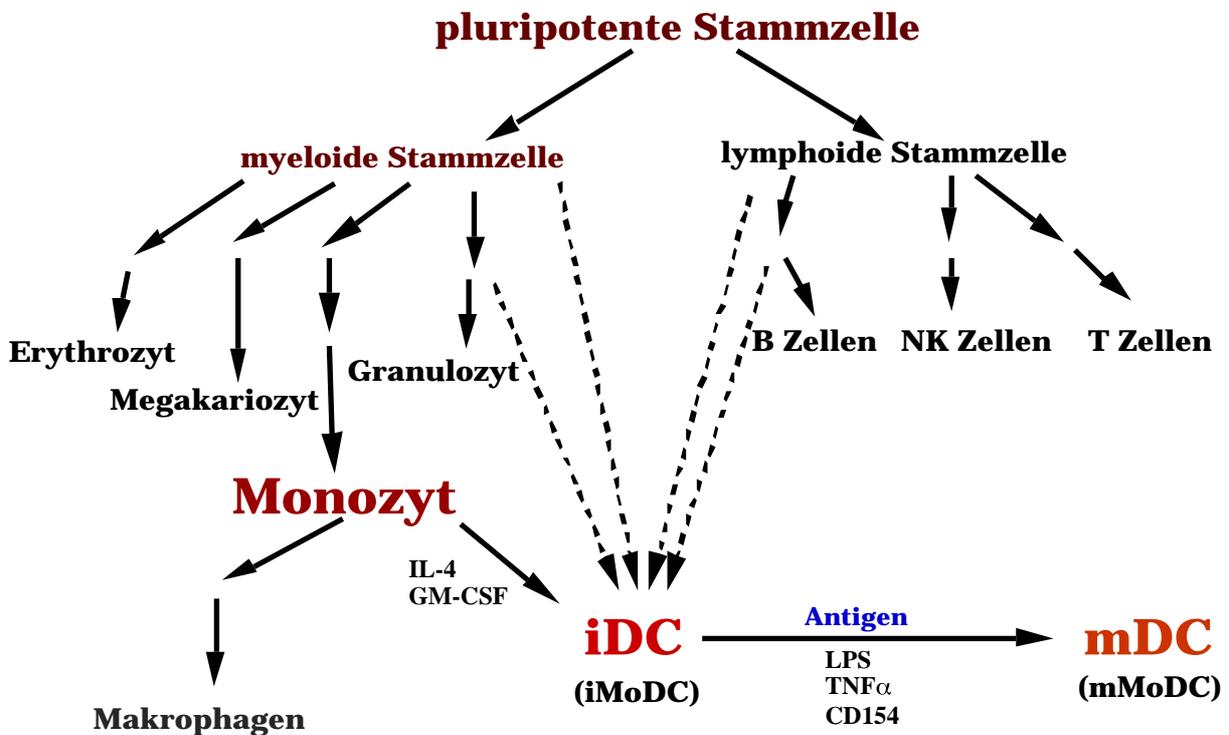
Um die Spezifität der Immunantwort zu gewährleisten, besitzt das Immunsystem ruhende (unreife) und aktivierte (reife) DC (siehe Tab.1). Nach Matzinger (1994) erfolgt die Aktivierung des Immunsystems (der DC) durch ein Gefahrensignal (danger signal). Dieses Gefahrensignal wird von Zellen freigesetzt, die durch Nekrose oder Infektion, nicht aber durch Apoptose zerstört wurden. Durch dieses Signal wandeln sich die ruhenden antigen-präsentierenden Zellen (APC) in aktivierte APC um und induzieren eine Immunantwort. Seit kurzem wird davon ausgegangen, daß DC nicht in der Haut auf eine Infektion (Gefahr) warten, sondern sich ständig in Bewegung befinden. Bleibt das Gefahrensignal aus, wandern

sogenannte tolerante APC zum Lymphknoten, ohne die Fähigkeit T Zellen zu aktivieren (Sallusto & Lanzavecchia, 1999; Heath & Carbone, 2001; Dhodapkar et al., 2001). In diesem Fall ist davon auszugehen, daß Autoantigene präsentiert werden. Es entsteht durch regulatorische T Zellen eine periphere Toleranz.

Die Abstammung der DC aus dem Knochenmark war lange bekannt. Ihre Eingliederung in die hämatopoetische Reihe ist bis heute umstritten. Beim Menschen konnten aus CD34⁺ Stammzellen mit Hilfe der Zytokine TNF , GM-CSF und IL-3 bzw. SCF CD1a⁺ Zellen, die zum Teil Birbeckgranula enthielten, hergestellt werden (Reid et al., 1992; Santiago-Schwarz et al., 1992). Ähnliche Ergebnisse konnten aus dem Nabelschnurblut gewonnen werden (Caux et al., 1992). Seit 1987 wurden bereits mehrere Verfahren zur Herstellung DC *in vitro* aus Monozyten (Mo) beschrieben. Bei ersten Untersuchungen zur Kultivierung peripherer Blutmonozyten (PBM) ohne Zytokine und unter serumfreien Bedingungen wurden akzessorische Zellen (AC) beschrieben, die eine erhöhte Stimulationskapazität für T Zellen aufwiesen (Peters et al., 1987). Solche Mo differenzierten spontan zu schwach CD1a⁺ AC, einem LC/DC ähnlichen Phänotypen. Der Monozyten/Makrophagen Marker CD14 hingegen war bei diesen Zellen herunterreguliert (Rossi et al., 1992). IL-4 induzierte die Suppression von CD14 auf Monozyten und die Expression von CD1a wird durch GM-CSF induziert (Lauener et al., 1990; Ruppert et al., 1991; Kasinrerck et al., 1993). Entsprechend konnte gezeigt werden, daß Mo aus dem Blut mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenzieren (Porcelli et al., 1992; Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Steinbach et al., 1995; Pickl et al., 1996; Peters et al. 1996) (Schema 1). Weitere Studien zeigten, daß bereits geringe Mengen GM-CSF (200 U/ml) und IL-4 (50 U/ml) ausreichen, um Mo zu stimulieren, die innerhalb von 4 Tagen zu monozytären DC (MoDC) differenzieren (Porcelli et al. 1992; Steinbach et al. 1995, 1998b). DC können phänotypisch anhand eines charakteristischen Markerprofils von Monozyten und Makrophagen unterschieden werden. CD14 gilt als Differenzierungsmarker der myeloischen Reihe und wird von Monoblasten, Monozyten und den meisten Makrophagen exprimiert (Schütt & Schumann, 1993). Die monozytären DC besitzen als Oberflächenmarker CD1, CD86, CD40 und MHC II. Diese Oberflächenmoleküle kommen bei Monozyten und Makrophagen nicht oder nur in geringem Maße vor. Funktionell zeigen MoDC Eigenschaften anderer DC, wie die Fähigkeit zur T Zell Stimulation in der

gemischten Leukozyten Reaktion (MLR) (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Pickl et al., 1996; Steinbach et al., 1998c). MoDC, die mit TNF aktiviert wurden, waren CD1a⁺ CD83⁺ und entsprachen phänotypisch und morphologisch reifen DC (mDC). Die Makropinozytose und der Fc Rezeptor war an diesen Zellen herunterreguliert, und auf der Oberfläche präsentierten sich vermehrt kostimulierende Moleküle; dieser Wechsel erfolgte innerhalb 48 h und war irreversibel. In der MLR zeigten die mDC starke T Zellaktivierung (Sallusto et al., 1995; Zhou & Tedder, 1996).

DC konnten, nicht zuletzt auf Grund der Plastizität von Stammzellen, aus Vorläuferzellen hergestellt werden (Schema 1), so z.B. aus Pro B Zellen und



Schema 1: Die pluripotenten Stammzellen erzeugen 2 spezialisierte Typen von Stammzellen. Die lymphoide Stammzelle als Vorläufer der B und T Lymphozyten und die myeloide Stammzelle aus der unter anderem die Monozyten entstehen. Durch IL-4 und GM-CSF wandeln sich Monozyten zu iDC (Prototyp DC; unreife DC) um. Diese reifen zu mDC (reife DC) z.B. durch Antigen, LPS, TNF- oder CD154 heran. Auch aus den lymphoiden Stammzellen, den Vorläuferzellen der Granulozyten und der B Zellen können sich in geringen Mengen DC entwickeln.

Vorläufern der Granulozyten (Björck & Kincade, 1998). Die Herkunft DC aus lymphoiden Stammzellen wurde vorgeschlagen, da Populationen der DC in Versuchen mit Mäusen CD8a positiv (CD8a⁺) waren. Neue *in vivo* Experimente zeigten, daß DC aus myeloiden und lymphoiden Stammzellen differenzieren können. Allerdings stammt nur ein geringer Teil aus lymphoiden Stammzellen ab. Der größte Teil DC (CD8a⁺ oder CD8a⁻) war myeloiden Ursprungs. Eine Differenzierung der DC aus den Lymphozyten des peripheren Blutes konnte bis heute nicht gezeigt werden (Manz et al., 2001).

DC sind nicht nur *in vitro* potente Immunmodulatoren, sondern eine Vielzahl von Untersuchungen an Mäusen rechtfertigen ihren therapeutischen Einsatz zur Unterstützung der Immunabwehr. Impfstoffe mit DC und Proteinen/Peptiden lösen *in vitro* eine antigen-spezifische T Zell-Antwort aus und *in vivo* wird durch die T Zell-Antwort Tumorwachstum verhindert (Mayordomo et al., 1995; 1996; Zitvogel et al., 1996; Celluzzi et al., 1996; Schuler & Steinman, 1997; Ashley et al., 1997; Lotze et al., 1997; Nestlé et al., 1998; 2001; Timmerman & Levy, 1999; Fong & Engelman, 2000).

Entsprechende Untersuchungen zu DC in der Veterinärmedizin sind bisher selten und insbesondere beim Pferd liegen mangelnde Kenntnisse zur Biologie der DC vor. Bisher konnten DC beim Pferd nur aus dem peripheren Blut gereinigt werden. Doch beträgt ihr Anteil dort < 0,1%, so daß dieses Verfahren für eingehende wissenschaftliche Studien ungeeignet ist. Da bisher kein equines GM-CSF zur Verfügung steht, sterben solche nach alten Protokollen isolierten DC binnen weniger Tage im *in vitro* Experiment ab (Siedek et al., 1997). Hammond und Mitarbeiter (1999) gelang erstmals die Isolierung einer größeren Menge DC durch Zugabe von rekombinantem humanen GM-CSF und rekombinantem equinen IL-4 aus Pferdeblut. Nach 6 tägiger Kultivierung zeigten stimulierte Zellen Eigenschaften von DC. Nach phänotypischen und funktionellen Untersuchungen konnten die Autoren ein Gemisch aus reifen (mature) und unreifen (immature) DC nachweisen. Für Maus, Ratte und Schaf konnte die Isolierung von DC bereits gezeigt und diese auf ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten untersucht werden (Hopkins et al., 1989; Bujdoso et al., 1989; Steinman, 1991; Steinbach et al., 1997). McKeever (1991) isolierte und charakterisierte phänotypisch und funktionell bovine DC aus dem Lymphknoten. Die Isolierung der DC aus dem Blut

des Rindes gelang nach dem Protokoll von Freudenthal und Steinman (1990) (Renjifo et al., 1997; Howard et al., 1999).

1.2 Zytokine

Zytokine haben große Bedeutung bei immunregulatorischen Prozessen. Es sind Proteine, die von verschiedenen aktivierten Zellen, wie z.B. Makrophagen und T Lymphozyten synthetisiert werden. Diese freigesetzten Zytokine wirken über Oberflächenrezeptoren vor allem parakrin an benachbarten Zellen. Zytokine regulieren und beeinflussen viele biologische Prozesse wie Zellwachstum, Zellaktivierung, den Typ der Immunantwort und Gewebereparation (Roitt et al., 2001).

1.2.1 IFN γ

Isaacs und Lindemann entdeckten 1957 den Einfluß von Interferonen (IFN) bei Virusinfektionen. Das Zytokin wurde aus Influenzavirus-infizierter Chorioalantoismembran freigesetzt und schützte benachbarte Zellen vor der Infektion. Heute werden zwei Gruppen der Interferone unterschieden, zu der Gruppe I gehören u.a. IFN α (früher bekannt als Leukozyten-IFN), IFN β (früher bekannt als Fibroblasten-IFN) und IFN γ , zur Gruppe II nur IFN δ (früher bekannt als Immun-IFN). Interferone stellen einen wichtigen Abwehrmechanismus bei Infektionen dar. Die bekannteste Eigenschaft der Interferone der Gruppe I ist ihre antivirale Wirkung (Adolf, 1987). Sie verfügen darüber hinaus aber auch über immunmodulatorische Funktionen, wie Aktivierung und Unterstützung der Aktivität von Lymphozyten, NK, DC und Makrophagen (Van den Broek et al., 1995; Boehm et al., 1997; Leonard, 1999). IFN γ wirkt hauptsächlich immunmodulatorisch.

Die IFN α , β und γ des Pferdes sind bereits kloniert und sequenziert worden (Himmler et al., 1986; Grünig et al., 1994; Himmler & Grünig, 1997). Es fehlten jedoch detaillierte Aussagen über ihre Wirkung, und rek. eq. IFN γ war nicht verfügbar. Um detaillierte Studien mit rek. eq. IFN γ durchführen zu können, wurden

die IFN γ und IFN β vom Pferd neu kloniert. Die rek. Proteine wurden in unterschiedlichen Expressionssystemen exprimiert, analysiert und auf ihre Bioaktivität untersucht (Beier, 1999).

Typ II IFN wird von aktivierten NK, CTL und Th1 Zellen produziert (Degliantoni et al., 1985; Farrar & Schreiber, 1993). Die aktive Form des humanen IFN γ ist ein Homodimer aus zwei ineinander verdrehten, gegenläufig orientierten Proteinen von 166 AS, die aber nicht kovalent gebunden sind. Das Gen liegt hier auf Chromosom 12 (DeGrado et al., 1982; Naylor et al., 1983). Das Signalpeptid besteht aus 23 AS. Es sind zwei biologisch aktive Formen von 20 kD ohne Glykosylierung und 25 kD mit Glykosylierung bekannt. Die Sequenzähnlichkeit zwischen IFN γ des Pferdes und dem Protein anderer Spezies liegen zwischen 82% (Schaf und Hund) und 46% (Maus). Das Gen von eq-IFN γ umfaßt wie bei Mensch, Schwein, Hund, Ratte und Maus 4 Exons und 3 Introns (Yip et al., 1982; Himmler et al., 1986; Grünig et al., 1994).

Der humane Typ II IFN-Rezeptor ist N- und O-glykosyliert und kommt auf vielen Zellen vor. Der funktionelle Rezeptor besteht aus zwei Ketten, IFNGR-1 und der IFNGR-2 (Marsters et al., 1995; Leonard, 1999). IFNGR-1 ist für die IFN-Bindung zuständig und IFNGR-2 für die Signalübermittlung. Die Anzahl der Rezeptoren variiert zwischen einigen hundert und mehreren tausend pro Zelle.

Die Aktivitäten von IFN γ sind vielfältig. IFN γ wirkt antiproliferativ auf Th2 Zellen und somit wird auch die Zytokinproduktion von Th2 inhibiert, wie z.B. IL-10. Das Ergebnis ist eine Umsteuerung zur zellabhängigen Immunantwort. Umgekehrt verhindert IL-10 die Produktion von IFN γ durch Th1 Zellen und NK Zellen, und es erfolgt eine humorale Immunreaktion (Farrar & Schreiber, 1993). Bei B Zellen führt IFN γ zu antiapoptotischen Effekten, es unterdrückt die IgG1 und IgE Produktion bei Menschen und fördert die von IgG2a (Finkelman et al., 1988; Snapper et al., 1988). IFN γ induziert die Expression von MHC I-Molekülen und MHC II-Molekülen auf der Oberfläche von Zellen und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Chen et al., 1987). Ferner führt es zur Aktivierung von Makrophagen und Zytotoxizität gegen Tumorzellen (Rubin & Gupta, 1980). Das Wachstum von intrazellulären Protozoen und Bakterien wird inhibiert und IFN γ hat stimulierende Wirkung auf die Synthese von IL-1 und IL-2 (Pestka et al., 1987; Nash, 1996). Darüber hinaus könnte es auch eine Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung dendritischer Zellen spielen, die die Immunantwort

initiieren (Peters et al., 1996). Young und Hardy (1995) kamen zu der Erkenntnis, daß IFN mehr als bisher bekannt, Einfluß und Auswirkungen auf das Immunsystem des Menschen hat. Sie untersuchten die Wirkung von IFN auf die Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen, Monozyten und Makrophagen, T Zellen, B Zellen und polymorphkernige Neutrophile. So wirkt IFN, z.B. auf frühe hämatopoetische Zellen inhibierend, wohingegen spätere Entwicklungsstadien zusammen mit anderen Zytokinen aktiviert werden.

In der Humanmedizin sind umfangreiche Studien zur klinischen Anwendung von IFN durchgeführt worden. Bei chronischer Polyarthritis wurde die Makrophagenaktivität gesteigert, die Gelenkschmerzen reduziert und die Kortisongaben konnten verringert werden, so daß es zu einer Verbesserung der klinischen Parameter führte (Lemmel et al., 1991; Freundlich et al., 1992; Machold et al., 1992). Die oberflächlichen Dermatiden von AIDS-Patienten zeigten nach IFN Gaben einen Rückgang der klinischen Symptome, der Entzündung und Eosinophilie (Reichel et al., 1992; Hanifin et al., 1993). Beim septikämischen Schock führt IFN bei den meisten Patienten zu einer Erhöhung der Monozytenaktivität (Döcke et al., 1997). Auch bei Myelomen, malignen Melanomen, Non-Hodgkin-Lymphom und Nierenzellkarzinomen wurde es teilweise mit guten Erfolgen eingesetzt (Krown, 1987; Baron et al., 1991; Barth & Morton, 1995; Bauernhofer et al., 1996).

In der Veterinärmedizin hat der klinische Einsatz von IFN bislang kaum Bedeutung. IFN kam bei Schafen zur Unterstützung von Impfprogrammen bei Clostridienerkrankungen und beim Hund zur Unterstützung der Behandlung der Leishmaniose zum Einsatz (Schijns & Horzinek, 1997). Rek. IFN vom Pferd lag exprimiert nicht vor, so daß Untersuchungen zur Immunmodulation und für den klinischen Einsatz fehlen.

1.2.2 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Humanes GM-CSF wurde 1985 kloniert und sequenziert (Cantrell et al., 1985). Ein Jahr zuvor wurde es bei der Maus kloniert und als ein Regulator für das Wachstum von Blutzellen beschrieben (Gough et al., 1984). Heute ist bekannt, daß GM-CSF das Wachstum von Granulozyten und Makrophagen beeinflusst, darüber hinaus stimuliert es auch Myeloblasten und Monoblasten und ist Auslöser für eine irreversible Differenzierung dieser Zellen. Weiterhin wirkt es chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Es verbessert die antimikrobielle Aktivität, oxidative Metabolismen und Phagozytose von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und deren Zytotoxizität. Auf basophilen Granulozyten werden Rezeptoren induziert für Komplement C3a (Demetri & Griffin, 1991; Moore, 1991). Für *in vitro* kultivierte LC stellt GM-CSF einen essentiellen Vitalitätsfaktor dar. Ebenfalls essentiell ist es für die Herstellung von DC aus Stammzellen des Knochenmarks und monozytären Zellen des Blutes (Peters et al., 1996). Weiterhin ist für GM-CSF eine chemotaktische Wirkung auf LC in der Haut nach intradermaler Injektion beschrieben (Kaplan et al., 1992).

Nach Aktivierung durch Antigene oder Mitogene werden T Lymphozyten und Makrophagen zur Produktion von GM-CSF angeregt. T Zellen können durch IL-1, IL-2 und IL-4 Einwirkung zur Produktion von GM-CSF angeregt werden (Moore, 1991). Ferner ist eine Synthese von GM-CSF von anderen Zellen, wie z.B. Endothelzellen und Fibroblasten nach Einwirkung von TNF α , Lymphotoxin, IL-1, IL-2 und IFN γ beschrieben (Gough et al., 1984; Crosier et al., 1991).

Das humane GM-CSF ist ein Monomer aus 144 AS mit zwei Glykosylierungsstellen (Gasson et al., 1984; Wong et al., 1985). Die Molmasse beträgt 14 kD ohne oder 35 kD mit Glykosylierung. Die Bioaktivität wird durch die Glykosylierung verstärkt. Das humane Gen liegt auf Chromosom 5, wie auch die Gene von M-CSF, IL-3, IL-4, IL-5 und des M-CSF Rezeptors (Yang et al., 1988; Van Leeuwen et al., 1989). Die Sequenzähnlichkeit zwischen Mensch- und Maus-Protein liegt bei 60%, und es existiert keine Kreuzreaktivität. Selbst zwischen artverwandten Spezies wie Schaf und Rind gibt es keine Kreuzreaktivität (D. Werling, persönliche Mitteilung). Der GM-CSF Rezeptor (GM-CSFR) besteht aus einer α und β Untereinheit. Nur in dieser Kombination besitzt er eine hohe Affinität

zu GM-CSF (Matsuguchi et al., 1997). Rezeptoren kommen auf der Oberfläche von myeloiden Zellen, aber auch auf nicht hämatopoetischen Zellen, wie den Endothelzellen, vor. Lymphoide und erythroide Zellen besitzen keine Rezeptoren.

In Tierversuchen mit transgenen Mäusen, die ständig GM-CSF produzieren, kam es zu massiven Gewebszerstörungen (z.B. Niere, Muskel), und die Tiere starben innerhalb einiger Monate (Lang et al., 1987). Knock out Mäuse hingegen sind gesund und fruchtbar, zeigten aber mit zunehmendem Lebensalter abnormale Lungenbefunde (Stanley et al., 1994; Dranoff et al., 1994). Veränderungen des Surfactant führte zu Verklebungen der Alveolen (Pulmonale alveoläre proteinosis). In der Humanmedizin findet hu.GM-CSF Einsatz bei der Chemo- und Radiotherapie. Es wird bei verminderter Leukozytenproduktion zur Wiederherstellung der Hämatopoese eingesetzt, z.B. bei malignen Lymphomen (Non-Hodgkin Lymphoma), soliden Tumoren (Brustkrebs) und Knochenmarktransplantationen (Gerhartz et al., 1993; Aglietta et al., 1993). Untersuchungen mit hu.GM-CSF sind weiterhin beim Myelodysplasie Syndrom, akuter myeloider Leukämie, autoimmuner Thrombozytopenie und Fehlfunktionen des Immunsystems durchgeführt worden (zusammengefaßt bei Moore et al., 1991).

Veterinärmedizinisch ist der klinische Einsatz von GM-CSF nicht von Bedeutung. Allerdings liegt rek. GM-CSF für einige Spezies vor. Hunde-spezifisches GM-CSF wurde in Versuchen an Hunden nach starken Verstrahlungen zur Wiederherstellung der Hämatopoese eingesetzt (Nash et al., 1994). Beim Rind konnte mit rek. bo.GM-CSF die antibakterielle Aktivität von neutrophilen Granulozyten *in vitro* und *in vivo* verbessert werden (Hirai et al., 1999).

1.2.3 Interleukin 4 (IL-4)

IL-4 wirkt auf eine Vielzahl von Immunzellen. Howard und Mitarbeiter (1982) beschrieben es erstmals aufgrund seiner B Zell-aktivierenden Eigenschaften als „B cell growth factor“ (BCGF). IL-4 wird hauptsächlich von aktivierten Th2 Zellen und Mastzellen produziert (Mosmann et al., 1986; Cherwinski et al., 1987; Brown et al., 1987; Burd et al., 1989; Plaut et al., 1989). Humanes IL-4 besteht aus 151 AS, einschließlich einer Signalsequenz von 24 AS, bei einer Molmasse von 20 kD und

wird über zwei N-Glykosylierungsstellen glykosyliert. Weiterhin enthält es sechs Cysteinreste, die verantwortlich für die Ausbildung der drei intramolekularen Disulfidbrücken sind (Paul & Ohara, 1987). Für murines IL-4 konnte von Ohara und Mitarbeitern (1987) gezeigt werden, daß die Disulfidbrücken für die biologische Wirksamkeit entscheidend sind. IL-4 gilt als spezies-spezifisch. Das humane Gen liegt, wie auch bei anderen Zytokinen (s.o.) auf Chromosom 5, das der Maus auf Chromosom 11. Die Sequenzähnlichkeit der AS zwischen Mensch und Maus liegt bei 49% (Yokota et al., 1986; Paul, 1991). Rezeptoren kommen in relativ kleiner Anzahl (ca. 400 pro Zelle) auf Lymphozyten, Makrophagen, aber auch auf einigen hämatopoetischen Zellen und Fibroblasten vor (Ohara & Paul, 1987; Lowenthal et al., 1988).

Auf ruhenden B Zellen induziert es die Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche und steigert die Expression von CD23-Molekülen (niederaffiner Rezeptor für IgE) und IL-4 Rezeptoren (Noelle et al., 1984; Kikutani et al., 1986; Conrad et al., 1987; Defrance et al., 1987; Ohara & Paul, 1988). In mehreren Versuchen konnte der Einfluß von IL-4 auf die Immunglobulin-Isotypen-Ausprägung der B Zellen gezeigt werden. So produzieren murine B Zellen, die mit IL-4 und LPS behandelt wurden *in vitro* IgG1 und IgE und *in vivo* IgE (Isakson et al., 1982; Vitetta et al., 1985; Finkelman et al., 1986; Coffman & Carty, 1986; Coffman et al., 1986). Wurde LPS alleine gegeben, induzierte es die Produktion von IgG3 und IgG2b (Kearney et al., 1976; Coutinho & Forni, 1982). Das nach Ag-Kontakt produzierte IgE bindet an Fc Rezeptoren von Mastzellen und basophilen Granulozyten und führt zur Freisetzung von Mediatoren (z.B. Histidin) aus diesen Zellen (Hypersensibilität Typ 1). Die IgE und IgG1 Synthese kann durch IFN unterdrückt werden (Coffman & Carty, 1986; Snapper & Paul, 1987; Heinzel et al., 1989).

IL-4 beeinflusst aber auch das Wachstum und die Differenzierung von anderen hämatopoetischen Zellen, wie T Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen (Schrader, 1986; Hu-Li et al., 1987; McInnes & Rennick, 1988; Brown et al., 1988). Es fördert die Proliferation von Vorläufern der zytotoxischen T Zellen (CTL) und deren Differenzierung in aktive CTL (Widmer & Grabstein, 1987; Trenn et al., 1988). Bei Makrophagen hemmt IL-4 das Wachstum, aber induziert gleichzeitig die Expression von MHC II-Molekülen auf deren Oberfläche (Crawford et al., 1987; Stuart et al., 1988; McInnes & Rennick, 1988; Jansen et al., 1989). Bei Monozyten

führt IL-4 zu einer Reduzierung der Expression von CD14 Molekülen auf der Oberfläche (Ruppert et al., 1991).

Versuche mit transgenen Mäusen zeigten, daß bei großer Expression von IL-4 die Mäuse 2 Wochen nach der Geburt starben. Bei geringerer Ausschüttung zeigten alle Mäuse allergische Reaktionen, wie Entzündungen und Ödeme des Augenlids (Tepper et al., 1990). Histologische Untersuchungen ergaben große Mengen an eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. In Knock out Versuchen konnte von Kühn und Mitarbeitern (1991) die Notwendigkeit von IL-4 für die Bildung von IgE *in vivo* nachgewiesen werden.

Die biologische Wirkung von IL-4 bei Mensch und Maus ist weitgehend bekannt, für andere Tiere fehlen Untersuchungen aufgrund der Spezies-Spezifität. Erst nach Klonierung und Herstellung des rek. Proteins von Ratte (McKnight & Classon, 1992) und Rind (Estes et al., 1995) konnte die Wirkung von IL-4 im Immunsystem dieser Spezies untersucht werden. Bei der Ratte verstärkt IL-4 die Expression von MHC II-Molekülen (McKnight & Classon, 1992). Bo.IL-4 induziert die Proliferation von bovinen B Zellen und die Expression von CD 23 und MHC II-Molekülen. Außerdem verstärkt es die Sekretion von IgE und IgG1. Hingegen hemmt es die Proliferation von T Zellen (Estes et al., 1995).

Die in der GenBank veröffentlichten Sequenzen von eq.IL-4 von Schrenzel und Mitarbeitern (AF305617) und Vandergriff und Horohov (L06010) unterscheiden sich in 2 Tripletts, die der von Vandergriff fehlen. Weitergehende Informationen wurden nur von der Sequenz von Vandergriff und Horohov veröffentlicht. Hier wurde die mRNA aus mitogen-stimulierten eq.PBMC gewonnen und mit aus der human Sequenz abgeleiteten Primern amplifiziert. Die AS-Sequenzähnlichkeit lag bei 62% zum Menschen (Vandergriff et al., 1994) und zur Maus 40%. Hammond und Mitarbeiter (1999) verwendeten, dieses in DHFR-Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen exprimierte, bioaktive rek. eq.IL-4, um DC aus Pferdeblut herzustellen (s.o.).

1.3 Vektorsysteme

Die Wahl eines geeigneten Protein-Expressionssystems wird von den Eigenschaften der herzustellenden Proteine bestimmt. Weitere Auswahlkriterien können Zeit- und Kostenaufwand für die Produktion und Reinigung, erreichbare Mengen und Qualität des Fremdproteins sein. Im Folgenden werden vier Systeme: prokaryotisches Expressionssystem (*E.coli*), Hefe- (*P.pastoris*), Pflanzen- (*N.tabacum*) und Säugetierzellen Expressionssysteme (P3X 63Ag8.653) zur Herstellung von rekombinanten Proteinen kurz vorgestellt, ihre Besonderheiten benannt und potentielle Anwendungsmöglichkeiten skizziert.

E.coli wird häufig als bakterielles Expressionssystem genutzt, da sowohl etablierte Techniken als auch ausführliche Expressionsprotokolle bekannt sind. Bei dem prokaryotischen Expressionssystem ist jedoch zu beachten, daß keine Glykosylierung oder andere posttranslationale Modifikationen der Fremdproteine erfolgen können. Nachteile dieses Systems sind die häufig entstehenden unlöslichen Einschlußkörper und das Fehlen der evtl. für die Bioaktivität notwendigen Glykosylierung. Um eine korrekte Faltung sekretorischer Proteine zu erreichen, ist ein Transport in den periplasmatischen Raum nötig. Weiterhin muß ein pferdespezifisches Signalpeptid durch ein bakterien-spezifisches Signalpeptid ersetzt werden.

Hefen stellen eine interessante Alternative zum Prokaryotensystem dar, da sie als eukaryotische Mikroorganismen mehrere bemerkenswerte Charakteristika in sich vereinigen. Sie verfügen über Proteinsekretion, können posttranslationale Modifikationen wie proteolytische Prozessierungen, N- und O-Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung etc. durchführen (Eckart & Bussineau, 1996) und zeigen auf anspruchslosen Medien das für viele Mikroorganismen relativ schnelle Wachstum. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) erreicht dabei mit bis zu 120 g Trockengewicht pro Liter Kulturmedium extrem hohe Zelldichten in Fermentationen. Ferner ist im Gegensatz zu anderen Hefen die (negative) Tendenz zur Hyperglykosylierung weniger stark vorhanden (Grinna & Tschopp, 1989). Dennoch stimmen die Glykosylierungsmuster nicht mit denen der Säugetierzellen überein, so daß eine genaue Charakterisierung der Funktion und der potentiellen immunogenen Reaktionen des Fremdproteins unumgänglich sind, bevor sie in

in vivo Untersuchungen Berücksichtigung finden können. Sollen die Proteine sezerniert werden, ist die Verwendung hefe-spezifischer Signalpeptide nötig.

Ein weiteres Expressionssystem, das die Fähigkeit zur N- und O-Glykosylierung besitzt, sind Pflanzen (u.a. *Nicotiana tabacum*). Wie auch bei den Hefen beschrieben, sind in dem Glykosylierungsschema der Pflanzen Unterschiede zu denen tierischer Zellen vorhanden, die jedoch nicht generalisiert werden können (Sturm et al., 1987; Kimura et al., 1988). Die pflanzen-spezifischen Glykosylierungsmuster scheinen sich z.B. nicht negativ auf die Bindungseigenschaften von Antikörperfragmenten auszuwirken und gelten daher für viele Anwendungsbereiche als vernachlässigbar (Hein et al., 1991). Biologisch aktives humanes IL-2 und IL-4 konnten aus genetisch modifizierten *N.tabacum* Zellen gewonnen werden (Magnuson et al., 1998). Voraussetzung für Faltung und Zusammenlagerung ist das Vorhandensein eines Signalpeptides, das die Proteine bei der Translation zum endoplasmatischen Retikulum dirigiert (Düring et al., 1990; Hein et al., 1991). Hier kann das Säuger Signalpeptid verwendet werden.

Wegen der Schwierigkeiten vollständig aktive tierische Proteine in Mikroorganismen herzustellen, wurde nach Möglichkeiten gesucht, Säugetierzellen zur rekombinanten Proteinsynthese einzusetzen. Bei Proteinen mit unentbehrlichen Glykosylierungsmustern, sind Säugetierzellen unter Umständen das einzige Expressionssystem, in dem aktive Proteine gebildet werden. Ein Nachteil dieses Systems ist die viel geringere Wachstumsgeschwindigkeit der tierischen Zellen als die der Mikroorganismen. Daher lassen sich hiermit rekombinante Proteine nur mit begrenzter Ausbeute herstellen (Brown, 1996). Heutzutage sind eine Reihe kommerzieller und nichtkommerzieller Vektorsysteme erhältlich. Davon konnten bereits einige erfolgreich für die Expression von Zytokinen eingesetzt werden. Die P3X 63Ag8.653-Zellen (Maus B Zell Linie) wurden für die Herstellung von rek. IL-2 und rek. IL-4 mit guter Expression verwendet (Karasuyama & Melchers, 1988; Karasuyama et al., 1990).