

Fraunhofer Gesellschaft
Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik,
Abteilung Gentechnologie in Hannover

Untersuchungen zum Viroceptor-Protein B8R
aus *Vaccinia Virus*
Entwicklung und Charakterisierung von
chimären B8R/ Interferon-gamma-Rezeptoren

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover,
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

DOCTOR RERUM NATURALIUM

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biochem. Marco Kresin
geb. 21.12.1968 in Peine

Anno domini 2000

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto
Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion 21.12.2000

Datum der Veröffentlichung: März 2001

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marco Kresin, geboren am 21.12.1968 in Peine, an Eides statt, daß ich die im Fachbereich Chemie an der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchungen zum Viroceptor-Protein B8R aus *Vaccinia Virus*
Entwicklung und Charakterisierung von chimären
B8R/ Interferon-gamma-Rezeptoren**

am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, IGB in der Abteilung Gentechnologie in Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. Bernd Otto ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder andere Arbeiten als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den 30.11.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1997 bis Dezember 2000 in der Fraunhofer Gesellschaft am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, IGB in der Abteilung Gentechnologie in Hannover, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Otto angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgender Stelle veröffentlicht:

Dengler, U.; Kresin, M.; Waschütza, G. & Otto, B. (1998). Molecular comparison of soluble human Interferon- γ receptor and *Vaccinia Virus* B8R-Protein. *Eur. Cytokine Netw.* **9**: 441

Vortrag beim Second Joint Meeting of the ISICR und ICS vom 25. – 30. Oktober 1998 in Jerusalem, Israel.

Zusammenfassung

IFN- γ stellt ein zentrales Protein des Immunsystems mit antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften dar. Bei einigen Krankheiten wie z. B. chronischer Polyarthrit (CP), chronischer Granulomatose (CG) und maligner Osteopetrose ist IFN- γ zur Zeit das einzige Medikament, welches die Krankheit bekämpfen kann. Bei einigen Krankheitsverläufen kann körpereigenes IFN- γ durch seine proinflammatorische Wirkung jedoch auch negative Eigenschaften entwickeln. Panitch konnte im Jahre 1987 zeigen, dass durch die Behandlung mit IFN- γ bei Multiple Sklerose Patienten eine deutliche Verschlechterung des Zustandes eintritt. In einem solchen Fall verursacht IFN- γ durch sein pleiotropes Wirkungsspektrum als zentraler Modulator des Immunsystems erhebliche Schäden. Die Suche nach Agenzien, die IFN- γ abblocken und dadurch die Wirkung auf die Zielzellen verhindern, stellt einen erfolgsträchtigen Ansatz bei der MS-Therapie dar. Eine Quelle für solch einem Agenz stellt das Vaccinia Virus dar, das ein lösliches Protein produziert, welches in der Lage ist IFN- γ von verschiedenen Spezies zu binden und dadurch die antivirale Aktivität die von IFN- γ ausgeht zu unterdrücken. Die Aufklärung von Struktur und Funktion des Viroreceptors B8R stellt die Basis für die biophysikalische und biochemische Charakterisierung des Proteins dar.

Auf molekularbiologischen Weg wurden verschiedene DNA-Konstrukte hergestellt, bestehend aus einem intrazellulären IFNGR Anteil und einem extrazellulären B8R Anteil. Die Entwicklung dieser chimären Konstrukte waren Voraussetzung für die *in vivo* Untersuchungen an somatischen Hybridzellen die das Verständnis von der Signaltransduktion und den stöchiometrischen Bindungsverhältnissen zwischen IFN- γ und dem B8R Protein erweitert haben.

Die umfangreichen Untersuchungen zur möglichen Struktur des Proteins haben, obwohl nur eine 21% Aminosäureidentität zwischen IFNGR1 und B8R besteht ein Proteinkonstrukt hervorgebracht, welches eine hohe strukturelle Identität aufweist.

Zusammen mit den Daten aus den *in vitro* Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem IFN- γ , und den *in vivo* Untersuchungen zur Bindung an chimäre Proteinkomplexe ergibt sich als Ergebnis ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis zwischen B8R und IFN- γ -Dimer von 2:1.

Stichworte:

Viroreceptorprotein; B8R; Vaccinia Virus; IFNGR; Signaltransduktion

Abstract

Interferon gamma (IFN- γ) is a cytokine that plays a complex and central role in the resistance of mammalian hosts to pathogens. IFN- γ is secreted by thymus-derived (T) cells under certain conditions of activation and by natural killer cells. Although originally defined as an agent with direct antiviral and antiproliferative activity, the properties of IFN- γ include regulation of several aspects of the immune response, stimulation of antigen presentation through MHC class I and class II, orchestration of leukocyte interaction, effects on cell proliferation and apoptosis, as well as regulation and repression of gene transcription. IFN- γ is in diseases like chronic granulomatosis, chronic polyarthritis or malignant osteopetrosis the only available treatment. In 1987 Panitch reported that IFN- γ has a bad influence in multiple sclerosis. In such a case it would be desirable to develop an antagonist or a protein that blocks the effects of IFN- γ .

The Poxvirus encodes a broad range of proteins that counteract the immune response initiated in the host after infection. Some of those proteins mimic the extracellular binding domain of cytokine receptors. These so called viroceptors are soluble proteins secreted from virus-infected cells. A very special viroceptor from vaccinia virus (poxvirus) is the B8R protein with a broad species-specificity towards the capability to block the effects of IFN- γ . This soluble B8R protein binds and blocks the antiviral activity of human, bovine, rat and chicken IFN- γ . The knowledge about structure and function of the Viroceptor B8R is the prerequisite for the biophysical understanding of the binding and antagonistic effects of this protein. In this thesis I used different chimeric receptors constructs consisting from an extracellular B8R part and an intracellular IFNGR part. The development of the chimeric receptors is the prerequisite for the investigation of the signal transduction in special somatic cell hybrids (CHO). The ability of the transfected chimeric cDNA to transduce a signal upon induction gives important clues about the signal transduction and the binding stoichiometry between the chimeric receptor and IFN- γ .

The sequence similarity between B8R protein and the extracellular part of the IFNGR1 is only 21% nevertheless the structure similarity, which was compared using a protein modelling workstation is amazing. Binding-assays with radioactive IFN- γ and the *in vivo* studies using the chimeric receptors show a complex with two B8R proteins and one IFN- γ -dimer protein.

Keywords:

viroceptor protein, B8R, vaccinia virus, IFNGR1, signal transduction, IFN- γ

Vorwort

An dieser Stelle ist es mir Freude und Bedürfnis zugleich, meinen aufrichtigen Dank an folgende Personen zu richten:

Herrn Prof. Dr. Bernd Otto danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seinem Labor auch außergewöhnliche Fragestellungen beantworten zu können, für das angenehme Arbeitsklima und stets ein aufmunterndes Wort.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller sei für die freundliche Übernahme des Korreferates der Dissertation gedankt und dafür, daß er die einzige feste Konstante im Biochemiestudium ist.

Den letztendlich gewonnenen Kampf gegen den Computer verdanke ich Herrn Dr. Hayssam Zakaria. In unzähligen Stunden erlaubte er mir Einblicke in die faszinierende Welt der Rechner und der Software. Für seine analytischen Fähigkeiten Probleme zu erkennen und auf den Punkt zu bringen, sein großes Spektrum an methodischem Wissen und seine unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft, die mich in meiner Dissertation vorangebracht hat, bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Mit seiner herzlichen, ungezwungenen Art und dem Mut, den er mir an Tagen des Mißerfolges machte, verstand es "Sam" immer wieder auf's Neue, die Stimmung im Labor zu steigern.

Herrn Dr. Gero Waschütza danke ich für die anregenden und interessanten Gespräche über verschiedene Aspekte der viralen Infektion von *Vaccinia Virus* und für seinen reichen Fundus an proteinchemischen Erfahrungen.

Frau Reinhild Bähr danke ich für die unzähligen Klonierungsarbeiten und die großartige technische Unterstützung im Labor sowie für ihr unermüdliches Bemühen bei der Herstellung von verschiedenen Rezeptorkonstrukten und das Lesen der "DNA-Sequenzen".

Herrn Dr. Uwe Dengler danke ich für die umfangreichen Alignmentuntersuchungen am IFNGR und B8R und für seine Fähigkeit, diese komplexe Materie hautnah zu vermitteln.

Allen Mitarbeitern der Abt. Gentechnologie am IGB (Thorsten Meyer, Andreas Busche, Florian Battermann, Christian Schmalz und Jens Lamerz) und der Abt. Immunbiologie am ITA danke ich für die freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. S. Pestka aus Piscataway, New Jersey, USA, danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor Experimente zur Signaltransduktion vorzunehmen. Ebenfalls ein großes Dankeschön an Herrn Dr. Serguei Kotenko und der gesamten Laborcrew (Chris; Kinthe; Lara; Lena; Olga; Simona) aus Piscataway von der UMDNJ, für das freundschaftliche Klima und die praktische Unterstützung bei meinen Experimenten und Untersuchungen.

Meiner Lebensgefährtin Nina Peters möchte ich an dieser Stelle für ihre Geduld und ihre tatkräftige Unterstützung in der Behebung meiner orthographischen Schwächen danken. Durch die Betrachtung eines Themas aus einer anderen Perspektive eröffneten sich für mich ganz neue Möglichkeiten.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank für die Unterstützung und das Vertrauen, welches sie mir in der ganzen Zeit des Studiums und der Promotion entgegengebracht haben. Und für das Verständnis an meiner Arbeit, für die Zeit bei ihnen zu Hause, in der ich neue Kraft schöpfen konnte sowie für die letzten 30 Jahre, in denen sie sich stets um mich bemüht haben.

*Aber das Leben selbst schien
unvermittelt. Wenn sich etwas
darüber aussagen ließ so war es dies:
es müsse von so hoch entwickelter
Bauart sein, daß in der unbelebten
Welt auch nicht entfernt
seinesgleichen vorkomme.
Aber was war das Leben?
Niemand wußte es, niemand kannte
den natürlichen Punkt, an dem es
entsprang und sich entzündete.
Nichts war unvermittelt oder nur
schlecht vermittelt im Bereich des
Lebens von jenem Punkt an.*

Thomas Mann „Der Zauberberg“

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Historie und Entdeckung der Interferone alpha, beta und gamma	1
1.2 Der funktionelle Interferon-gamma Rezeptorkomplex	3
1.2.1 Interferon-gamma Rezeptorkette 1 (IFNGR1)	3
1.2.2 Die sekundäre Rezeptorkette: IFNGR2 (AF1)	7
1.2.3 Der membrangebundene IFN- γ Rezeptor	8
1.2.4 Die Gene von IFNGR1 und IFNGR2	9
1.2.5 Auf der Suche nach einem zusätzlichen Faktor für den IFNGR	11
1.2.6 Strukturfunktionsanalyse des IFNGR	12
1.3 Die Jak-STAT-Signaltransduktion am IFNGR	14
1.3.1 Entdeckung der Jaks (Janusfamily tyrosine kinases)	14
1.3.2 Entdeckung der STATs (signal transducers and activators of transcription)	15
1.3.3 Das Zusammenspiel von Jak und STAT am IFNGR	17
1.4 Lösliche Cytokinrezeptoren	21
1.4.1 Virale Inhibition	22
1.4.2 <i>Vaccinia Virus</i> aus der Familie der Poxviridae	23
1.4.3 Lösliche virale Interferonrezeptoren	24
1.5 Zusammenfassung: Modell der IFNGR Signaltransduktion	26
1.6 Intention der Dissertationsarbeit (Ziele der Dissertationsarbeit)	27
2. Experimenteller Teil	28
2.1 Materialien, Geräte und Reagenzien	28
2.1.1 Verwendete Geräte	28
2.1.2 Allgemein verwendete Materialien und Reagenzien	28
2.1.3 Puffer und Lösungen	29
2.2 Sequenzalignment des huIFNGR1 und des Proteins B8R von <i>Vaccinia Virus</i> (WR)	30
2.3 Mikrobiologische Methoden	31
2.3.1 Verwendete Bakterienstämme	31
2.3.2 Erzeugung kompetenter <i>E.coli</i> und Transformation	32
2.3.3 Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	32
2.3.4 Ligation	33
2.3.5 Präparative PCR und Klonierungstechniken	34
2.3.6 Konstruktion von Expressionsplasmiden	35
2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	36
2.3.8 Sequenzierung	36
2.4 Prokaryontische Proteinexpression	37
2.4.1 Fermentation	37
2.4.2 Aufschluß der <i>E.coli</i> durch Ultraschallbehandlung	38
2.4.3 Renaturierungsuntersuchungen	38

2.5	Proteinchemische Methoden	39
2.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford	39
2.5.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	39
2.5.3	Silberfärbung	40
2.5.4	Chromatographische Methoden	41
2.5.5	Western Blot (Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran)	41
2.5.6	IFN- γ neutralisierender Assay	43
2.6	Bindungsnachweis durch radioaktives IFN- γ	44
2.6.1	Radioaktiv markieren von IFN- γ	44
2.6.2	Crosslinking Experimente und Gel-Shift Assay	44
2.7	Durchflußzytometrische Messung	45
2.8	Amplifikation des ORF B8R von <i>Vaccinia Virus</i> aus Vero-Zellkulturüberstand	45
2.9	Konstruktion der chimären Rezeptoren	47
2.9.1	Klonierungsstrategie	47
2.10	Zellkultur	49
2.10.1	Verwendete eukaryontische Zelllinien	49
2.10.2	Kultivierung von A549; L929, Vero und CHO-Zellen	50
2.10.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
2.10.4	Infektion von VEROS, L929 und A549 mit <i>Vaccinia Virus</i> VR119	51
2.10.5	Transfektion und Selektion von eukaryontischen Zellen	51
3.	Resultate	54
3.1	Klonierung des ORF B8R von <i>Vaccinia Virus</i> (Western Reserve)	54
3.2	Analyse der ORF B8R Sequenz	56
3.2.1	B8R Alignment von anderen Poxviridae-Stämmen	57
3.2.2	Sequenzalignment des huIFNGR1 (ECD) und des B8R-Proteins (WR)	59
3.2.3	Sequenzvergleich von verschiedenen Viroceptoren und IFNGR	66
3.3	Konstruktion von verschiedenen Expressionsplasmiden	69
3.3.1	Expressionsoptimierung	72
3.4	Biologisch aktives B8R aus <i>Vaccinia Virus</i>	73
3.4.1	IFN- γ Neutralisierungsassay	74
3.4.2	B8R Gewinnung durch Infektion von Vero Zellen mit <i>Vaccinia Virus</i> VR-119	76
3.4.3	Bestimmung der B8R Aktivität im Kulturüberstand	77
3.4.4	Kinetische Untersuchungen zur B8R Expression	78
3.4.5	Vermehrung von <i>Vaccinia Virus</i> in L929, A549 und Vero Zellen	79
3.4.6	Existiert ein B8R-Cofaktor	80
3.5	Crosslinking Ergebnisse	82
3.5.1	Kopplung von γ - ³² P an IFN- γ verschiedener Spezies	82
3.5.2	Natives B8R bindet huIFN- γ	84
3.5.3	Bindungsversuche mit rekombinantem B8R aus E.coli	87
3.5.4	Bindungsversuche mit rekobinantem B8R aus CHO Zellen	88
3.5.5	B8R aus drei verschiedenen Zelllinien bindet huIFN- γ	88
3.5.6	Bindungsversuche von B8R an huIFN- γ und muIFN- γ	90
3.6	Molekularbiologische Herstellung der chimären B8R/IFNGR Konstrukte	92
3.6.1	Konstrukt B8R/IFNGR1	92
3.6.2	Konstrukt B8R/GR1	96
3.6.3	Konstrukt B8R/IFNGR2	99
3.6.4	Durchflußzytometrische Bestimmung von MHC I Proteinen	101

4. Rezension	103
4.1 Klonierung und Sequenzalignment	103
4.2 Rekombinantes B8R	105
4.3 Natürliches B8R	106
4.4 Chimäre Rezeptoren	107
4.5 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen	108
5. Resümee	111
6. Literaturverzeichnis	113
Anhang	120
A) Adressen der verschiedenen Datenbanken	120
B) Nukleotid und Aminosäuresequenz von huIFNGR1	120
C) Nukleotid und Aminosäuresequenz von huIFNGR2	122
D) Nukleotid- und Aminosäuresequenz des in pTrcHisB klonierten ORF B8R von <i>Vaccinia Virus</i> VR-119 (Western Reserve)	123
E) In den Datenbanken veröffentlichte Sequenzen von <i>Vaccinia Virus</i> Stämmen	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Modell des humanen IFNGR.	9
Abbildung 1.2:	Schematisierte Darstellung der funktionellen Bereiche von Jak-Proteinen.	15
Abbildung 1.3:	Struktur von STAT-Proteinen.	15
Abbildung 1.4:	Modell des membranständigen IFNGR Komplexes und der Signaltransduktion nach Bindung des Liganden IFN- γ .	19
Abbildung 1.5:	Darstellung vom Aufbau viraler DNA.	24
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung der MID-PCR.	34
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pTrcHis B.	35
Abbildung 2.3:	Aufbau des Semi Dry Blotsandwich.	42
Abbildung 3.1:	Amplifikationsprodukt von ORF B8R.	54
Abbildung 3.2:	Graphik zur Identifizierung von hydrophilen Aminosäureabschnitten.	56
Abbildung 3.3:	AS-Sequenzalignment von B8R Western Reserve mit dem Profil von B8R-Proteinen aus anderen <i>Vaccinia</i> Stämmen.	59
Abbildung 3.4:	ClustalX Alignment von der extrazellulären Domäne des huIFNGR und B8R.	62
Abbildung 3.5:	Dreidimensionales Modell des B8R-Proteins.	65
Abbildung 3.6:	Strukturbasiertes multiples Sequenzalignment der ECD des huIFNGR1 mit homologen Proteinen von <i>Mus Musculus</i> und verschiedenen Viren.	68
Abbildung 3.7:	Position und Sequenz der Primer am ORF B8R zur Einfügung der Restriktionsschnittstellen und zur Einklonierung in den Vektor pTrcHis B.	69
Abbildung 3.8:	Nukleotid und Aminosäuresequenz des modifizierten pTrcHisB B8R Fusionsanteils mit Strep Tag an Stelle von His Tag.	71
Abbildung 3.9:	Kontrolle der Expressionsoptimierung von verschiedenen B8R-Fusionsproteinen.	73
Abbildung 3.10:	Mikrotiterplatte des IFN- γ inhibierenden Assays.	74
Abbildung 3.11:	Mikrotiterplatte zur Bestimmung der IFN- γ neutralisierenden B8R Einheiten.	77
Abbildung 3.12:	IFN- γ inhibierender Assay zur kinetischen Bestimmung der Feisetzung von B8R bei Vero Zellen nach Infektion mit VR-119.	78
Abbildung 3.13:	Qualitative Vergleichsbestimmung der B8R Konzentration aus den drei Zelllinien Vero, A549, L929.	80
Abbildung 3.14:	Assay zur Untersuchung auf einen weiteren Faktor bei der Anbindung von B8 an IFN- γ .	81
Abbildung 3.15:	Erfolgreiche Radiomarkierung von humanem und murinem IFN- γ mit γ - ^{32}P .	82
Abbildung 3.16:	Phosphorylierungsversuch von rat IFN- γ mit ^{32}P -ATP.	83
Abbildung 3.17:	B8R aus dem Überstand von infizierten Vero-Zellen bindet IFN- γ . Die beiden B8R-Proben stammen aus zwei unterschiedlichen Infektionschargen.	85
Abbildung 3.18:	Autoradiographie vom Gel-Shift-Assay.	86
Abbildung 3.19:	Autoradiographie eines Gel-Shift-Assay mit zwei Chargen von rekombinantem B8R-Fusionsprotein mit Strep Tag (C-terminal).	87
Abbildung 3.20:	Rekombinant hergestellte B8R Fusionsproteine im radioaktivem Gel-Shift-Assay.	87
Abbildung 3.21:	Kontrolle der verschiedenen CHO Überstände auf Expression von nativem B8R im radioaktivem Gel-Shift-Assay.	88
Abbildung 3.22:	B8R aus drei verschiedenen Zelllinien bindet huIFN- γ .	89

Abbildung 3.23:	Radioaktiver Gel Shift Assay. Test auf Bindung von B8R aus drei verschiedenen Zelllinien mit huIFN- γ und muIFN- γ .	91
Abbildung 3.24:	Ausgangsplasmid pcDEF3 TF/GR1.	92
Abbildung 3.25:	Schematische Darstellung des Zwischenproduktes pcDEF3 IFNGR1.	93
Abbildung 3.26:	PCR-Amplifikationsprodukt nach dem Restriktionsverdau mit <i>Bam</i> H I.	94
Abbildung 3.27:	Zwischenprodukt pcDEF3 B8R/IFNGR1.	95
Abbildung 3.28:	Schematische Darstellung des Endproduktes pcDEF3 B8R*/IFNGR1.	95
Abbildung 3.29:	Schematische Darstellung des Überganges von der B8R extrazellulären Domäne, den 8 AS Linker, die TMD in die ICD des IFNGR1.	96
Abbildung 3.30:	Schematische Darstellung des 8.596 bp großen Zwischenproduktes pcDEF3 B8R/TF/GR1.	96
Abbildung 3.31:	Schematische Darstellung des Zielplasmides pcDEF3 B8R/GR1.	97
Abbildung 3.32:	Transmembranbereich im Plasmid pcDEF3. B8R/GR1.	97
Abbildung 3.33:	Darstellung des Ausgangsvektors pcDEF3 IFNGR2.	98
Abbildung 3.34:	Schematische Darstellung des Zielplasmides pcDEF3 B8R/IFNGR2.	98
Abbildung 3.35:	DNA und AS Darstellung des Überganges von der extrazellulären in die intrazelluläre Domäne im chimären Konstrukt pcDEF3 B8R/IFNGR2.	100
Abbildung 4.1:	Dreidimensionales Modell von IFNGR1 (ECD), IFN- γ Dimer und B8R.	105
Tabelle 1.1:	Charakteristische Merkmale und Eigenschaften der Interferone.	3
Tabelle 1.2:	Nomenklatur der verschiedenen Interferonrezeptoren.	5
Tabelle 1.3:	Chromosomale Lokalisation und proteinchemische Eigenschaften der IFNGR-Ketten.	14
Tabelle 1.4:	Jak-Proteine und ihr Auftreten bei verschiedenen Cytokin- und Interferonrezeptoren.	15
Tabelle 1.5:	STAT-Proteine und ihr Auftreten bei den verschiedenen Rezeptoren.	17
Tabelle 1.6:	Taxonomie der <i>Poxviridae</i> .	22
Tabelle 2.1:	Temperaturprogramm für eine MID-PCR	35
Tabelle 2.2:	Temperaturprogramm für das Sequenzierprotokoll Cycle IPF.	37
Tabelle 2.3:	Protokoll zur Silbergefärbung.	40
Tabelle 2.4:	Im Westernblot verwendete Antikörper mit Angabe von Hersteller und AK-Typ.	42
Tabelle 2.5:	Temperaturprogramm für die Amplifikation von ORF B8R.	48
Tabelle 3.1:	AS-Homologien der einzelnen B8R-Proteine von fünf verschiedenen <i>Vaccinia Virus</i> Stämmen.	57
Tabelle 3.2:	Konservierte Cysteinbrücken bei B8R und IFNGR1.	63
Tabelle 3.3:	Gegenüberstellung der Aminosäuren von B8R und IFNGR aus den Alignmentdaten.	63
Tabelle 3.4:	Strukturmotivzuordnung beim B8R.	64
Tabelle 3.5:	Aminosäure Homologien bei IFN- γ bindenden Proteinen.	67
Tabelle 3.6:	Bestimmung der B8R Aktivität bei verschiedenen Infektionsversuchen in unterschiedlichen Zelllinien.	78
Tabelle 3.7:	Radioaktivitätsmessung bei den Proben des huIFN- γ <i>in vivo</i> Bindungsassays.	102

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	kDa	Kilo-Dalton
Amp	Ampicillin	MCS	multiple cloning site
AP	Alkalische Phosphatase	max.	maximal
APS	Ammoniumperoxydisulfat	min	Minute
AS	Aminosäure	NBT	Nitrotetrazoliumblau
ATCC	American Type Culture Collection	NaPP	Natriumphosphatpuffer
ATP	Adenosintriphosphat	OD	Optische Dichte
BCIP	5-Brom-4-chlor-indolylphosphat	ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
BSA	bovine serum albumine (Rinder-Serumalbumin)	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
C	Cytosin	PBS	phosphat buffer saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
cpm	Counts per minute	PCR	DNA polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
CSF	colony stimulating factor (Kolonie-stimulierender Faktor)	PFU	Plaque Forming Units
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	pI	Isoelektrischer Punkt
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	rhuIFN- γ	rekombinantes humanes Interferon- γ
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RPMI	Roswell Park Memorial Institut
DSS	Disuccinimidyl suberate	s	Sekunde (n)
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	TAE	Tris acetate (Tris-Acetat Puffer)
ECD	Extrazelluläre Domäne	TBE	Tris-Borat Puffer (Tris borate)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TBST	Tris buffered saline/Tween20 (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20)
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)	TCA	Trichloressigsäure
<i>EMC</i>	<i>Encephalomyocarditis</i>	TE	Tris Ethyldiamintetraacetat Puffer
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
FACS	Fluorescence activated cell scanner (sorter)	TMD	Transmembrane Domäne
FCS	fetal calf serum (Fötale Kälberserum)	TNF	Tumor Nekrose Faktor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
GH	growth hormon (Wachstumshormon)	TSS	Transformation and storage solution (Transformations- und Lagerlösung)
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid	U	Unit
ICD	Intrazelluläre Domäne	Upm	Umdrehungen pro Minute
IFN	Interferon	UV	Ultraviolett
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor	v/v	Volume per Volume
IL	Interleukin	w/v	Weight per Volume
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
kbp	kilo base pairs (Kilo-Basenpaare)	YT	Yeast Extract Medium
K	Gleichgewichtskonstante		

Alle physikalischen Größen wurden in SI-Einheiten angegeben. Nicht aufgeführte Abkürzungen, Symbole und Begriffe werden im Text erklärt.

Wenn wir glauben, an den Grenzen unserer Leistungsfähigkeit angekommen zu sein, dann sind wir in Wirklichkeit oft nur an den Grenzen unserer Vorstellungskraft gelangt.

(unbekannte Quelle)

1. Einleitung

Cytokine und Interferone sind Moleküle, die eine zentrale Rolle bei der Regulation von zellulären und immunologischen Funktionen besitzen. Interferon-gamma (IFN- γ) stellt ein zentrales Protein des Immunsystems mit einer großen Wirkungsbandbreite dar. Auf Grund seiner antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften ist es von großem pharmakologischem Interesse. Zu Beginn der 80er Jahre wurde damit begonnen, den Mechanismus der Interferon-gamma (IFN- γ) induzierten Signaltransduktion genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Forschung haben ein Modell der Signaltransduktion des Interferon-gamma-Rezeptor (IFNGR) ergeben, das immer noch kontrovers diskutiert wird. Anhand der Aufklärung von Struktur und Funktion des Rezeptors ist es möglich das Bild der Signaltransduktion zu verfeinern. Derzeit ergeben alle vorhandenen Ergebnisse ein Modell der IFN- γ Signaltransduktion, das als Paradigma für ein Mitglied der Cytokin-Rezeptor-Superfamilie gewertet werden kann, jedoch an einigen Punkten durchaus der weiteren Forschung bedarf.

1.1 Historie und Entdeckung der Interferone alpha, beta und gamma

Vor mehr als 40 Jahren wurde zum ersten Mal eine Substanz mit einer antiviralen Aktivität von Isaacs und Lindenmann identifiziert (Isaacs *et al.*, 1957). Ihre Schlußfolgerung aus einem Experiment, in dem diese Substanz negativ mit der viralen Replikation interferierte, verlieh einer neuen Klasse von Proteinen ihren Namen: Interferone. Es gibt zwei unterschiedliche Interferongruppen. Die heute als IFN- α , IFN- β , IFN- ω und IFN- τ bekannten Interferone werden als Typ I bezeichnet. Sie werden überwiegend von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und epithelialen Zellen gebildet. Ein weiteres im Jahre 1965 von Wheelock (Wheelock, 1965) beschriebenes Protein, das aus stimulierten humanen Lymphozytenkulturen stammte und ebenfalls antivirale Wirkung auf Zellen hatte, zeichnete sich im Unterschied zu den bekannten Interferonen durch eine pH-Labilität bei pH 2 aus. Für dieses Protein wurde später der Begriff IFN- γ (Interferon-gamma) geprägt und zur Abgrenzung zu den bis dahin bekannten Interferonen als Interferontyp II bezeichnet (Younger *et al.*, 1973). IFN- γ , auch Immuninterferon genannt, wird ausschließlich von T-Lymphozyten und NK-Zellen sezerniert und besitzt eine spezifische antivirale Aktivität von 2×10^7 International Units (U).

Das humane Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und enthält im Gegensatz zu den Typ-I-Interferonen drei Introns. Das aktive Protein ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa. An den beiden Aminosäuren Asn28 und Asn100 liegt eine N-glykosidische Verzuckerung vor. IFN- γ zeichnet sich wie alle Interferone durch eine hohe Spezifität aus, d. h. von humanen Zellen gebildetes Interferon besitzt keinerlei Schutzfunktion vor viralen Infektionen bei Zellen von anderen Spezies (z. B. murin). Das IFN- γ Monomer ist aus 143 AS (Aminosäuren) aufgebaut. Im Jahre 1991 wurde die Röntgenkristallstruktur von rhuIFN- γ , dem carboxyterminal fünf Aminosäuren fehlten, mit einer Auflösung von 3,5 Å aufgeklärt (Ealick *et al.*, 1991). Hier zeigte sich das sich die IFN- γ Struktur zu 62 % aus α -Helix und 38 % Random Coil zusammensetzt. Eine β -Faltblattstruktur ist nicht vorhanden.

Von den Typ I-Interferonen stellte sich IFN- α (Interferon-alpha) als das komplexeste dar. Im Gegensatz zu IFN- γ und IFN- β (Interferon-beta), deren Gruppe jeweils nur aus einer Proteinspezies besteht, wird IFN- α durch 20 Subtypen gebildet, welche genetisch determiniert sind. Die Homologie der einzelnen IFN- α -Subtypen untereinander liegt bei 50 % - 65 %. Die entsprechenden Gene liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 und besitzen keine Introns. Die IFN- α Subtypen besitzen unterschiedliche Expressionsraten und Wirkmechanismen, über die noch relativ wenig bekannt ist. Die Subtypen weisen eine Länge von 165-166 AS und ein Molekulargewicht von 16,0 kDa - 27,6 kDa auf. Sie sind durch einen stark konservierten 45 AS großen Abschnitt von Pro110 bis Ser155 gekennzeichnet, der wahrscheinlich die Rezeptorbindungsdomäne darstellt. Alle IFN- α Subtypen besitzen zwei Disulfidbrücken an der Position Cys1 – Cys99 sowie Cys29 – Cys139, wobei die letztgenannte Brücke essentiell für die Ausbildung der biologischen Aktivität ist. Hauptproduktionszellen von IFN- α sind die Leukozyten.

Im Gegensatz zu diesen heterogen auftretenden IFN- α Proteinen geht das IFN- β Protein aus nur einem Gen hervor, welches ebenfalls auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 liegt und auch keine Introns aufweist. Die Homologie zwischen IFN- α und IFN- β , die beide zum Interferon-Typ I zählen, beträgt ca. 45 % auf Nukleinsäureebene und ca. 29 % auf Aminosäureebene.

<i>Name</i>	<i>IFN-α</i>	<i>IFN-β</i>	<i>IFN-γ</i>
<i>Interferon-Typ</i>	Typ I Leukozyten IFN	Typ I Fibroblasten IFN	Typ II Immuninterferon
<i>Produktionszellen</i>	T-, B-Lymphozyten; Makrophagen	Fibroblasten; epitheliale Zellen	T-Lymphozyten; NK-Zellen
<i>Hauptauslöser</i>	Virus	Virus; LPS;	Antigen; Virus
<i>Genetische Merkmale und Besonderheiten</i>			
<i>Genlokalisierung human</i>	Chromosom 9p22	Chromosom 9p22	Chromosom 12q24.1
<i>Introns</i>	0	0	3
<i>Genlokalisierung murin</i>	Chromosom 4	Chromosom 4	Chromosom 10
<i>Physikalische Eigenschaften</i>			
<i>Molekulargewicht M_r nativ</i>	16,0 – 27,6 kDa	ca. 20 kDa	ca. 45 kDa (Homodimer)
<i>Aminosäureanzahl</i>	165/166	166	143
<i>pH-Stabilität</i>	stabil bei pH 2	stabil bei pH 2	labil bei pH 2
<i>Glykosilierung</i>	einige Subtypen	Asp80	Asn25/ Asn97
<i>Disulfidbrücken</i>	2	1	0

Tabelle 1.1: Charakteristische Merkmale und Eigenschaften der Interferone.

1.2 Der funktionelle Interferon-gamma Rezeptorkomplex

1.2.1 Interferon-gamma Rezeptorkette 1 (IFNGR1)

Im Jahre 1981 zeigten Branca und Baglioni (Branca *et al.*, 1981) anhand von Ligandenbindungsuntersuchungen, daß sich der Interferon- γ -Rezeptor (IFNGR) deutlich von dem Rezeptor unterscheidet, der IFN- α und IFN- β bindet. Durch Zellhybride konnte gezeigt werden, daß das Gen für die Ligandenbindungskette des humanen IFNGR auf dem Chromosom 6 lokalisiert ist (Rashidbaigi *et al.*, 1986). Trotz dieser Experimente mit somatischen Zellhybriden und der Erkenntnis, daß IFN- γ als Ligand an das entsprechende Genprodukt bindet, konnte im Experiment keine Initiierung der biologischen Funktion beobachtet werden. Erst mit der Entdeckung (Jung *et al.*, 1988, Jung *et al.*, 1987) eines zusätzlichen Faktors, der auf dem humanen Chromosom 21 (21q9) lokalisiert ist, kristallisierte sich heraus, daß zwei membranständige Proteine für den Aufbau eines biologisch funktionierenden Rezeptors nötig sind. Zum einen die Ligandenbindungskette IFNGR1 (frühere Bezeichnung CD119) und zum anderen die sekundäre Rezeptorkette IFNGR2, die auch als

accessory factor 1 (AF-1) bezeichnet wird. Die Isolierung und Klonierung des humanen IFNGR1, die codiert an Position 6q liegt, gelang im Jahre 1988 (Aguet *et al.*, 1988). Durch den Einsatz dieser somatischen Zellhybride war es gelungen, die sekundäre Rezeptorkette zu identifizieren und im weiteren Verlauf konnte anhand der Zelllinie das Gen isoliert und kloniert werden.

Parallel zu den humanen IFNGR-Ketten wurden auch bei der Maus die chromosomale Lokalisation der Gene identifiziert (Hibino *et al.*, 1991, Mariano *et al.*, 1987, Mariano *et al.*, 1996). Auch hier zeigte sich, daß der biologisch aktive Rezeptor aus zwei Proteinen besteht. Kurze Zeit später wurde von mehreren Gruppen (Cofano *et al.*, 1990, Gray *et al.*, 1989, Hemmi *et al.*, 1989, Kumar *et al.*, 1989, Munro *et al.*, 1989) die Klonierung der murinen IFNGR1-Kette gemeldet. Die Nomenklatur war uneinheitlich, so daß verschiedene Begriffe, wie z. B. α -Kette, bezugnehmend auf andere cytokinbindende Rezeptorketten Einzug in die Literatur hielten.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, daß bei vielen Rezeptorkomplexen zwei oder mehr Rezeptorketten an der Bindung mit dem Liganden beteiligt sein können und nur die Bindungskette, an welche der Ligand zuerst bindet, den Suffix 1 erhält. Die Nomenklatur für humane und murine Gene erlaubt auch nicht den Gebrauch von griechischen Buchstaben als Affix, da eine solche Bezeichnung ausschließlich für unterschiedliche Proteinspezies oder mRNA eines modifizierten Gens reserviert ist. Gene werden zur besseren Unterscheidung von den Proteinen in kursiver Schreibweise dargestellt. Die genaue Nomenklatur für die Rezeptorketten ist dem *Report of the Nomenclature Committee* der ISICR (International Society of Interferon and Cytokin Research) vom 6. November 1995 entnommen und in Tabelle 1.2 aufgelistet.

<i>Gen</i>	<i>mRNA Rezeptorkette</i>	<i>Referenz</i>
<i>Typ I Interferonrezeptoren (IFN-α, -β, -ω, -τ Rezeptoren)</i>		
<i>IFNAR1</i>	huIFN- α R1, huIFN- α R1a huIFNAR1, huIFNAR1a	Uze <i>et al.</i>
<i>IFNAR1</i>	huIFN- α R1s, huIFN- α 1Rb (Splicevariante ohne Exon IV, V)	Cleary <i>et al.</i> ; Cook <i>et al.</i>
<i>IFNAR2</i>	huIFN- α R2a (lösliche Variante) huIFNAR2a	Novick <i>et al.</i>
<i>IFNAR2</i>	huIFN- α R2b (verk. Variante) huIFNAR2b	Novick <i>et al.</i>
<i>IFNAR2</i>	huIFN- α R2c (lange Variante) huIFNAR2c	Domanski <i>et al.</i> ; Lutfalla <i>et al.</i>
<i>Typ II Interferonrezeptoren (IFN-γ Rezeptor)</i>		
<i>IFNGR1</i>	huIFN- γ R (Ligandenbindungskette) huIFNGR1	Aguet <i>et al.</i> ; Kumar <i>et al.</i> ; Cofano <i>et al.</i> ; Gray <i>et al.</i> ; Munro <i>et al.</i>
<i>IFNGR2</i>	huIFN- γ R2 huIFNGR2 (AF1)	Soh <i>et al.</i> ; Hemmi <i>et al.</i>

Tabelle 1.2: Nomenklatur der verschiedenen Interferonrezeptoren (Pestka *et al.*, 1997).

Eine große Anzahl von Experimenten wurden zur detaillierten Charakterisierung der Bindungsdomäne am IFNGR1 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das kürzeste Fragment mit 100 %iger Bindungseigenschaft für IFN- γ ein 25 kDa-Fragment ist und von Asp6-Lys227 des extrazellulären Teils des IFNGR1 gebildet wird. Die Bindungsdomänen von IFNGR1 zum Liganden wurden anhand von monoklonalen Antikörpern bestimmt (Garotta *et al.*, 1990). Dabei stellte sich auch heraus, daß nur nichtprotonierte Ligandenbindungsketten den Liganden binden können.

Site-directed-mutagenesis-Experimente haben bestätigt, daß für eine maximale Aktivierung über den IFNGR alle vier Disulfidbrücken (Cys60/68; Cys105/150; Cys178/183; Cys197/213) essentiell sind und auch alle in einem nicht reduzierten Zustand vorliegen müssen (Stuber *et al.*, 1993). An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, daß bei allen Positionsangaben beim humanen IFNGR1 die Aminosäure Glutamin an Position 1 steht (s. Sequenz: Anhang **B**) (Cook J.R. *et al.*, 1992, Farrar *et al.*, 1992). Die Anordnung der Disulfidbrücken in der extrazellulären Domäne legte schon früh den später bewiesenen Schluß nahe, daß dieser Teil des Rezeptors wie zwei immunglobulinähnliche Domänen mit je zwei 110 AS großen Abschnitten organisiert ist (Williams *et al.*, 1995). Auf der Suche nach der Bindungsdomäne für IFN- γ am extrazellulären Teil des IFNGR1 wurde ein 15 kDa großer Aminosäureabschnitt von Ser94 – Ser224 identifiziert, welcher in freier, löslicher Form dargestellt eine schwache Affinität

zum Liganden besitzt. Aber auch kurze Peptidfragmente, wie z. B. Asp6 – Glu21, mit nur 16 AS zeigten sich als ausreichend für eine schwache Bindung.

Durch eine homology scanning mutagenesis wurde untersucht, welcher Bereich des Rezeptors für die Bindung an den Liganden verantwortlich ist (Axelrod *et al.*, 1994). Dafür wurden verschiedene Segmente der humanen extrazellulären IFNGR1-Domäne gegen korrespondierende murine Sequenzen ausgetauscht. Von fünf hergestellten chimären Rezeptoren waren nur zwei in der Lage IFN- γ zu binden. Diese Mutanten enthielten die humanen Aminosäuresequenzen von Phe134 bis Val209 bzw. von Cys183 bis Val209 und vermochten den Liganden nur mit verminderter Affinität zu binden. Beide Mutanten wiesen auch eine verminderte Induzierung des Oberflächenmoleküls MHC-Klasse-I auf. Auf Grund der geringeren Bindungsfähigkeit wurde dieser Befund prognostiziert, wobei aber auch die Vermutung nahe lag, daß die Mutanten in einer anderen Form, wie z. B. der Dimerisierung oder Assoziation mit IFNGR2, einen Defekt aufwiesen.

Bei Punktmutationsexperimenten zeigten sich interessante speziesspezifische Bindungsphänomene. Bei einem doppelten AS-Austausch am humanen IFNGR1 von Trp56Arg und Gln38Arg konnte eine Bindung von humanem und murinem IFN- γ am mutierten Rezeptor festgestellt werden (Lai D., 1994, Lai D. *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, daß dieser Rezeptor nach Bindung von humanem IFN- γ als auch von murinem IFN- γ in der Lage war, die Induzierung von MHC-Klasse-I Molekülen einzuleiten. Dieses Ergebnis zeigte eindrucksvoll, daß die Interaktion zwischen den beiden Rezeptorketten nicht davon abhängig ist von welcher Spezies das IFN- γ stammt, das an den IFNGR1 bindet.

Die von Walter *et al.* (Walter *et al.*, 1995) publizierte Cokristallstruktur von einem IFN- γ Dimer mit zwei extrazellulären Domänen des IFNGR1 brachte Klarheit über die Kontaktstellen der Moleküle. Von den insgesamt acht AS (Lys50, Tyr47, Asn79, Trp82, Glu101, Arg106, His205, Trp207), mit denen IFN- γ interagiert, sind folgende AS beim humanen wie auch beim murinen Rezeptor konserviert: Lys47, Trp82, Glu101, Trp207.

Neben diesen Bindungsstellen für den Liganden auf der extrazellulären Seite treten beim IFNGR1 auf der cytosolischen intrazellulären Seite zwei spezifische Regionen in den Vordergrund (Farrer *et al.*, 1991):

Ein fünf AS großer Abschnitt Tyr440-Asp-Lys-Pro-His444, der beim humanen wie auch beim murinen IFNGR1 hoch konserviert ist und die Bindungdomäne für STAT1 α darstellt (Greenlund *et al.*, 1994).

Sowie die AS-Sequenz Leu266-Pro-Lys-Ser269, die für die Anbindung von Jak1 Proteinen nötig ist (Kaplan *et al.*, 1996). Beide Motive werden bei Betrachtung der Signaltransduktion nochmals genauer erläutert.

1.2.2 Die sekundäre Rezeptorkette: IFNGR2 (AF1)

Die 2-Ketten-Rezeptor-Theorie (Jung *et al.*, 1990) wurde durch Untersuchungen an somatischen Hybrid-CHO-Zellen bestätigt. Diese enthielten neben der cDNA von *IFNGR1* das humane Chromosom 21. Diese Hybrid-Zelllinie besaß einen funktionellen IFNGR-Komplex und konnte mit huIFN- γ stimuliert werden. Durch sukzessives Verkürzen des Chromosoms konnte ein 1- 3 mbp großes Fragment mit dem Gen für IFNGR2 identifiziert werden. In den Jahren 1993 und 1994 gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen die sekundäre Kette des humanen (Soh *et al.*, 1994, Soh *et al.*, 1993) und murinen (Hemmi *et al.*, 1994) IFNGR2 zu klonieren. Es zeigte sich, daß dieser zusätzliche Faktor ebenfalls hoch speziesspezifisch ist und keinen artübergreifenden Austausch zuläßt. Die humane Rezeptorkette, welche auf Chromosom 21 lokalisiert ist, verlieh zusammen mit IFNGR1 jedoch keinen 100 %igen antiviralen Schutz, so daß die Suche nach einem weiteren Faktor fortgesetzt wurde (Cook J. R. *et al.*, 1994, Soh *et al.*, 1994). Beide Rezeptorketten IFNGR1 und IFNGR2 gehören der Cytokin-Rezeptor-Superfamilie Klasse II an (Bazan, 1990, Thoreau *et al.*, 1991). Anhand von Mutationsexperimenten am murinen IFNGR2 konnte aufgeklärt werden, daß durch einen Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin die Fähigkeit der Signaltransduktion nicht eingeschränkt wurde. Auch die Deletion der letzten 30 AS, ausgehend vom Carboxyterminus, schränkte die Funktion des muIFNGR2 nicht ein. Eine Deletion um 43 AS unterbindet jedoch eine Signaltransduktion komplett. Auch beim humanen IFNGR2 verhindert eine Verkürzung um 49 AS eine Induktion der MHC-Klasse-I Produktion zu 100 % (Kotenko *et al.*, 1995, Kotenko *et al.*, 1994). Bei Versuchen mit radioaktiv markiertem huIFN- γ konnte bei Zellen die allein IFNGR2 exprimieren beschrieben werden, daß keine Assoziation zwischen Ligand und Rezeptor stattfindet (Kotenko *et al.*, 1995). Wurden von CHO-Zellen jedoch beide Rezeptorketten exprimiert, so trat bei Crosslinking-Experimenten ein Komplex bestehend aus IFN- γ , IFNGR1 und IFNGR2 auf. Dieser Befund festigte das Bild, daß die beiden Rezeptorketten räumlich sehr nahe beieinander liegen, wenn IFN- γ als Ligand am IFNGR1 gebunden hat.

Bei den von Kotenko *et al.* (Kotenko *et al.*, 1995) und Sakatsume *et al.* (Sakatsume *et al.*, 1995) sowie von Bach *et al.* (Bach *et al.*, 1996) dargestellten Experimenten kristallisierte sich heraus, daß bei der beschriebenen Verkürzung des IFNGR2 eine Jak1 und Jak2 Phosphorylierung und die daraus resultierende STAT1 α Aktivierung verhindert wird. Es zeigte sich auch, daß unter keinen Umständen eine Tyrosinphosphorylierung am IFNGR2 stattfindet. Eine weitere Erkenntnis war, daß Jak2 mit IFNGR2 über die beiden AS-Motive Pro263-Pro-Ser-Ile-Pro267 und Ile270-Glu-Glu-Tyr-Leu274 (Jak2 binding site) in Assoziation tritt. Alle Veränderungen (Mutationen, Deletionen), die an den cytoplasmatischen Domänen vorgenommen wurden, hatten keinen negativen Einfluß auf die Bindung des Liganden an die Rezeptorbindungskette und eine Aneinanderlagerung der beiden Rezeptorketten. Allein die Signaltransduktionskette wurde bei diesen Veränderungen eingeschränkt oder ganz verhindert.

1.2.3 Der membrangebundene IFN- γ Rezeptor

Wie in Abbildung 1.1 gezeigt, handelt es sich beim IFNGR um zwei separate glykosilierte Proteinketten IFNGR1 und IFNGR2 mit einem Molekulargewicht von 90 kDa bzw. 60 kDa. Die Glykolisierung ist für eine Ligandenbindung nicht essentiell. Untersuchungen mit Zelllinien, die nicht in der Lage sind eine Verzuckerung vorzunehmen, haben dies bewiesen. Der IFNGR-Komplex wird auf einer großen Anzahl verschiedenartiger Zellen exprimiert (Valente *et al.*, 1992, van Loon *et al.*, 1991). Die Expression der beiden IFNGR-Ketten auf der Oberfläche von Zellen ist in bezug auf die Quantität sehr unterschiedlich. So wird die IFNGR1-Kette auf allen Zelltypen mit Ausnahme von corticalen und medullaren Thymocyten in relativ hohen Mengen gefunden. Die IFNGR2-Kette hingegen wird nur in sehr geringem Maße exprimiert. Das Auftreten des kompletten funktionstüchtigen IFNGR auf der Oberfläche der verschiedenen Zelltypen variiert über eine große quantitative Spanne von 200 Rezeptoren bei Hepatocyten bis hin zu 25.000 Rezeptoren bei Makrophagen und epithelialen Zellen.

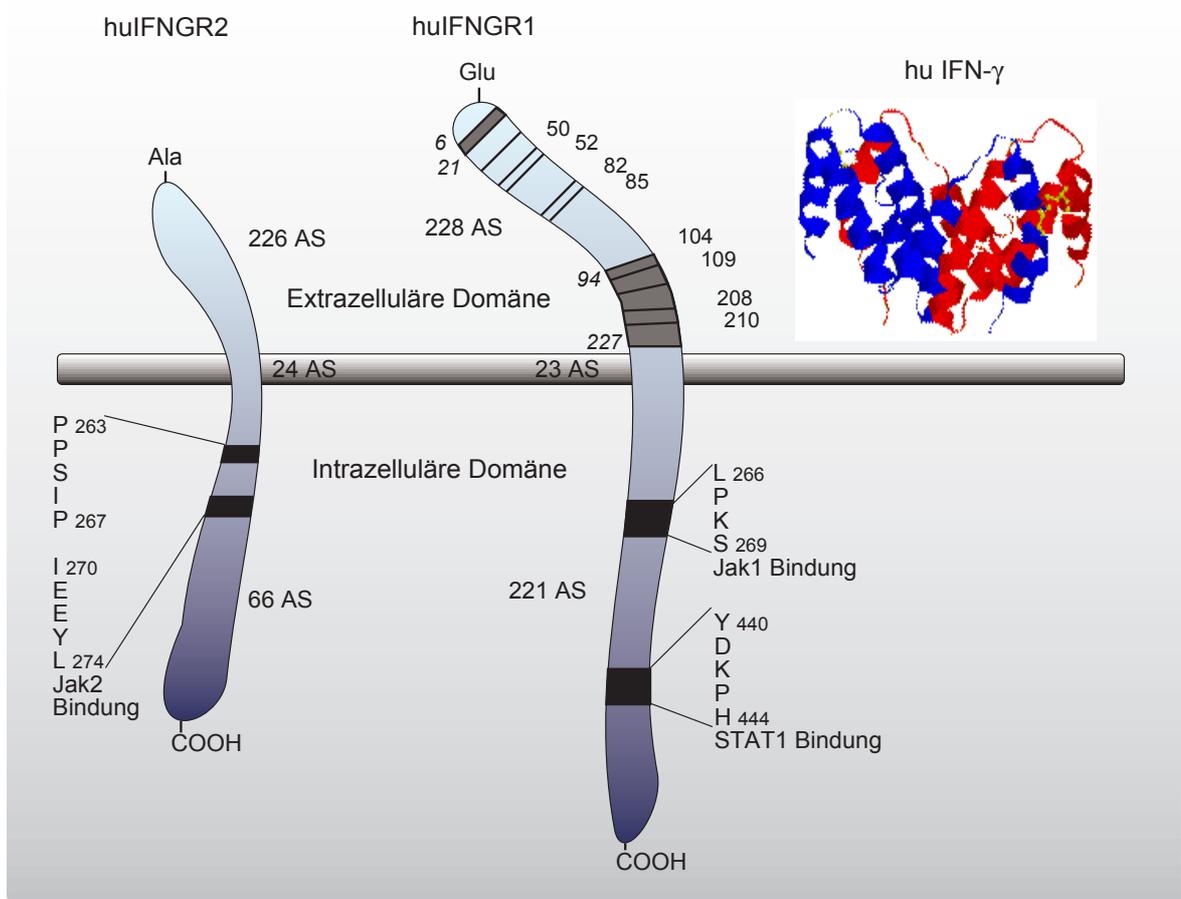


Abbildung 1.1: Modell des humanen IFNGR (Ausschnitt). Die Ligandenbindungskette IFNGR1 ist ein glykosyliertes 472 AS langes transmembranes Protein. Je zwei Ketten binden ein IFN- γ Dimer. Nummerierungen in Normalschrift zeigen die AS-Positionen an, mit denen der Rezeptor mit IFN- γ wechselwirkt. Beschriftungen in kursiv und grau unterlegt weisen essentielle Bereiche aus. Die auf der intrazellulären Seite schwarz markierten Bereiche weisen Kontaktstellen mit Proteinen (STAT1 α ; Jak1) der Signaltransduktionskette aus. Der IFNGR2 hat insgesamt 316 AS. Der weitaus größere Anteil (226 AS) befindet sich auf der extrazellulären Seite. Auf dem 66 AS großen intrazellulären Bereich liegt zwischen Pro263 und Leu274 die Jak2-Bindungsstelle (schwarz markiert).

1.2.4 Die Gene von IFNGR1 und IFNGR2

Das Gen des humanen IFNGR1 wurde, wie eingangs bereits erwähnt, auf dem langen Arm von Chromosom 6 (q16 – q22) identifiziert (Pfizenmaier *et al.*, 1988) und im Jahre 1988 kloniert (Aguet *et al.*, 1988). Parallel dazu wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die murine Ligandenbindungskette auf Chromosom 10 lokalisiert (Kozak *et al.*, 1990). Das humane und murine *IFNGR1* Gen ist ca. 30 kb groß (Merlin *et al.*, 1989) und in sieben Exons aufgeteilt. Das mRNA hat eine Größe von ca. 2,3 kb.

Bei Experimenten mit murinen Zellen, die Fragmente des humanen Chromosoms 21 trugen, konnten bereits 1988 erste Hinweise auf die chromosomale Lokalisierung des *IFNGR2*-Gens gefunden werden (Jung *et al.*, 1988, Jung *et al.*, 1987). Aber erst im Jahre 1996 wurde durch zwei sich überlappende Cosmide die Genstruktur von *IFNGR2* identifiziert, welche an Position 21q22 lokalisiert ist (Rhee *et al.*, 1996). An dieser Stelle sei noch angemerkt, daß in dieser Region ebenfalls die genetische Information für beide *IFNAR*-Ketten codiert vorliegt. Parallel dazu fand das Mapping des murinen *IFNGR2*-Gens statt, das sich auf Chromosom 16 befindet (Mariano *et al.*, 1996). Das humane wie auch das murine Gen enthält 6 Introns, wobei beim humanen Gen ein Bereich von 33 kbp und beim murinen Gen ein Bereich von 29 kbp überspannt wird (Ebensperger *et al.*, 1996, Hibino *et al.*, 1991). Die Homologien bei der Organisation des humanen und des murinen *IFNGR* untermauern die Bedeutung des Rezeptors in biologisch-immunologischer Weise. Dieser Befund wird durch die hohe AS-Homologie unter den beiden sekundären Rezeptorenketten unterstützt. So besteht, betrachtet man die vollständige Rezeptorkette, eine 58 %ige AS-Identität und sogar eine 73 %ige Identität beim separaten Vergleich der cytoplasmatischen Rezeptordomänen.

	IFNGR1		IFNGR2	
	<i>human</i>	<i>murin</i>	<i>human</i>	<i>murin</i>
Chromosomale Lokalisation	6	10	21	16
Primärstruktur				
Signalpeptid	17	26	21	18
natürliche Form	472	451	316	314
Homologie in % zur sek. Kette	52	58		
Rezeptordomänen				
	Aminosäureanzahl			
Extrazelluläre Domäne	228	228	226	224
Transmembrane Domäne	23	23	24	24
Intrazelluläre Domäne	221	200	66	66
potentielle Glykosilierungsstellen	5	5	5	6
Masse (kDa)	90	90	61-67	60-65
Berechnete Masse (kDa)	52,5	49,8	34,8	35,6

Tabelle 1.3: Chromosomale Lokalisation und proteinchemische Eigenschaften der IFNGR-Ketten.

1.2.5 Auf der Suche nach einem zusätzlichen Faktor für den IFNGR

Bei Versuchen mit einer Hamsterzelllinie, in die beide humane Gene des IFNGR transfiziert waren, wurde nach IFN- γ Inkubation eine STAT1 α Aktivierung und die Induktion von MHC-Klasse-I Molekülen beobachtet. Durch diese Beobachtung war die Bedeutung der beiden Rezeptorketten allgemein anerkannt. Bei Versuchen zur Identifizierung von weiteren, durch IFN- γ induzierten Genen, zeigte sich bei CHO-Zellen, daß diese vor einer Infektion mit *Encephalomyocarditis Virus (EMCV)* nach Inkubation mit humanem IFN- γ einen 100 %igen Schutz erhielten. Verwendete man jedoch einen *Vesicular Stomatitis Virus (VSV)*, so war der Schutz nur unzureichend. Dieser Befund wurde von verschiedenen Seiten (Cook J.R. *et al.*, 1992, Muthukumar *et al.*, 1996) dazu verwendet, einen zusätzlichen Proteinfaktor für den IFNGR zu postulieren. Die Möglichkeit, daß verschiedene Splice-Varianten des IFNGR-Gens für ein solches immunologisches Ergebnis verantwortlich sind, konnte nach weiteren Untersuchungen an genome yeast artificial clones (YAC) ausgeschlossen werden. Eine Überexpression von IFNGR1- und IFNGR2-Proteinen auf der Oberfläche von Zellen schien einen Schutz vor einem viralen Befall zu kompensieren (Lembo *et al.*, 1996). Andere Daten schienen darauf hinzudeuten, daß das verwendete Virus einen möglichen Einfluß auf eine veränderte Antwort der Zelle und somit auch auf unterschiedliche zusätzliche Rezeptorkomponenten hat (Cook J. R. *et al.*, 1994, Cook J.R. *et al.*, 1992, Soh *et al.*, 1993).

Neben diesen Ergebnissen wurde gleichzeitig deutlich, daß bei einer Expression von muIFNGR1 und muIFNGR2 auf CHO-Zellen für einen viralen Zellschutz nur muIFN- γ verantwortlich ist. Anhand der MHC-Klasse-I Oberflächenexpression und STAT1 α Aktivierung konnte gezeigt werden, daß allein Schutz gegen *EMCV* nicht jedoch gegen *VSV* erreicht wurde (Lembo *et al.*, 1996, Muthukumar *et al.*, 1996). Dieses Ergebnis ließ die Vermutung aufkommen, daß neben den beiden bekannten Rezeptorketten noch ein zusätzlicher weiterer Faktor für die biologische Abwehr von viralen Erregern benötigt wird. Auf der anderen Seite beobachtete man bei einem Experiment, bei dem in humane Zellen der komplette murine IFNGR transfiziert wurde, daß nach Gabe von murinem IFN- γ der vollständige antivirale Schutz vor *VSV* und *EMCV* vorhanden war (Hemmi *et al.*, 1994). Hierbei konnte die komplette Bandbreite an IFN- γ induzierten Genen beobachtet werden. Die hier aufgetretene Diskrepanz ist derzeit noch nicht vollständig und abschließend aufgeklärt. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 1996) von einem IFN- α/β induziertem Transkriptionskomplex berichtete, welcher für eine vollständige, maximale Aktivierung über

den IFNAR nötig ist. DNA-bindender Bestandteil dieses Komplexes ist das sogenannte p48-Protein. Bei p48-knockout Mäusen war die antivirale Aktivität gegen *EMCV* und *VSV* im Vergleich zu Kontrollmäusen nach Gabe von IFN- γ signifikant erniedrigt, jedoch nicht vollständig verschwunden. Dieser Befund manifestiert die Vermutung, daß weitere Faktoren bei einem optimalen, durch IFNGR induzierten, antiviralen Schutz vorhanden sein müssen. Darüber hinaus gibt es Aussagen, daß sich die beiden Signaltransduktionswege der IFN-Typen I und II in ihrer Funktion überlappen (Langer J. *et al.*, 1988).

1.2.6 Strukturfunktionsanalyse des IFNGR

Bei Experimenten mit radioaktiv markiertem IFN- γ und durch immunochemische Testsysteme wurde die Dissoziationsbindungskonstante (K_{Diss}) von IFN- γ zur IFNGR1-Kette mit $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-10}$ M bestimmt (Farrar *et al.*, 1993). Die heute allgemein gültige Vorstellung des nativen und vollständigen IFNGR basiert auf der wohlbegründeten Annahme, daß es sich hierbei um einen Viertransmembranketten-Komplex, bestehend aus je zwei IFNGR1 und IFNGR2 Proteinen, handelt. Lange Zeit wurde darüber gerätselt, inwieweit ein solcher spiegelsymmetrisch aufgebauter Komplex für eine Weiterleitung des biologischen Signals nötig ist. Krause *et al.* (Krause *et al.*, 2000) war nach Herstellung von amonovalenten IFN- γ (IFN- γ Dimer, das nur zur Bindung an ein IFNGR1 befähigt ist) in der Lage, eine Aussage über die Quantität der Signaltransduktion zu geben. In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, daß die STAT1 α und die MHC-Klasse-I Aktivierung, sowie die antivirale und antiproliferative Wirkung nur zu 50 % der normalen Menge erreicht wird. Der physiologisch auftretende Komplex aus vier Transmembranproteinen ist demnach für eine volle Aktivierung durch den homodimeren Liganden IFN- γ zwingend notwendig. Auch in zellfreien Extrakten konnte gezeigt werden, daß der Ligand IFN- γ zu jeder Zeit zwei IFNGR1-Ketten bindet. Nach der Bindung des Cytokins kondensieren die Rezeptoren in die aktive Konfiguration eines spiegelsymmetrisch aufgebauten Rezeptorkomplexes. Kristallographische Daten deuten darauf hin, daß es zwischen IFN- γ und IFNGR1 ein "fitting" gibt, das auf beide Proteine strukturelle Veränderungen ausübt (Walter *et al.*, 1995). So wird im IFN- γ Dimer der AB-Loop und das C-terminale Endstück, das nur minimal oder gar keine sekundären Strukturelemente im ungebundenen Zustand aufweist und hochflexibel ist, nach Bindung an die Rezeptorkette 1 in einen hohen Grad sekundärer Ordnung gefaltet. Strukturelle Veränderungen konnten aber nicht nur bei IFN- γ , sondern auch beim IFNGR1 bestimmt werden (Thiel *et al.*, 2000). Dieses gegenseitige Modellieren der tertiären Proteinstruktur gilt als Voraussetzung für die weitere

Anlagerung der IFNGR2-Kette. Ein weiteres Indiz für diese Annahme basiert auf der Tatsache, daß ohne den Liganden IFN- γ keine Komplexe bestehend aus IFNGR1 und IFNGR2 auf Zelloberflächen beobachtet werden konnten.

Eine weitere Studie (Marsters *et al.*, 1995) hat die Bedeutung der IFNGR2-Kette bei der Ligandenbindung untersucht. Bei einer selektiven Expression des humanen IFNGR2 auf der Oberfläche von murinen Fibroblasten stellte man keine direkte Interaktion zwischen der Rezeptorkette und IFN- γ fest. Wenn jedoch zusätzlich auch humaner IFNGR1 auf der Oberfläche exprimiert wurde, so konnte eine viermal höhere Bindung des Liganden an die humane IFNGR1-Kette beobachtet werden, als ohne die IFNGR2-Proteinkette. Betrachtet man selektiv die extrazelluläre Seite, so wurde aus diesen Ergebnissen geschlossen, daß IFNGR2 vor allem die Rolle eines Stabilisierungsfaktors für den gesamten IFNGR-Komplex zukommt. Auch wird vermutet, daß nach Formung des kompletten Komplexes mit einer Größe von ca. 345 kDa der IFNGR2 für eine weitere Steigerung der Affinität zwischen IFN- γ und IFNGR1 sorgt (Lai D., 1994, Marsters *et al.*, 1995). Abschließend zu den proteinchemischen Vorgängen auf der extrazellulären Seite sei nochmals auf die hohe Spezifität zwischen IFN- γ und dem IFNGR hingewiesen. So bewirkt humanes IFN- γ auf Zellen von Nagetieren keinerlei Aktivierung der Signaltransduktion. Gleiches gilt für humane Zellen, die mit IFN- γ von Nagern inkubiert wurden. Neben dieser Interaktion auf der extrazellulären Seite finden auf der intrazellulären Seite die für die weitere Signaltransduktion wichtigen Schritte statt.

In einer Serie von Experimenten wurden murine und humane Rezeptordomänen zu chimären Rezeptoren (murin-human, hamster-human) zusammengefügt und in somatische Zellhybride transfiziert. Alle Hybride enthielten zusätzlich das humane Chromosom 21, auf dem das Gen für den IFNGR2 lokalisiert ist. Die Experimente ließen keinen Zweifel daran, daß für eine Signaltransduktion die beiden extrazellulär gelegenen Rezeptorketten von ein und derselben Spezies sein müssen. Gleiches fand man bei Experimenten mit murinem IFN- γ heraus, das man auf Zellhybride mit dem hamster-murinen IFNGR1 gab. Auch hier fand eine Signalweiterleitung nur statt, wenn das murine Chromosom 16 transfiziert war und somit beide murinen extrazellulären Ketten auf der Oberfläche exprimiert wurden (Hibino *et al.*, 1992, Mariano *et al.*, 1996). Beim Aminosäureaustausch am humanen *IFNGR1* an den Positionen Gln38Arg und Trp56Arg, war dieser anschließend in der Lage, sowohl humanes als auch murines IFN- γ zu binden. Anschließend wurde die Mutante in Zellen transfiziert, die entweder den murinen IFNGR2 oder den humanen IFNGR2 exprimierten. Gab man nun IFN- γ auf die

Zellen, so stellte man allein bei der Kombination mit mutiertem muIFNGR1 / huIFNGR2 / huIFN- γ eine Signaltransduktion fest. In allen anderen Fällen wurde ausschließlich eine Bindung des Liganden an den mutierten Rezeptor festgestellt, aber keine Aktivierung von MHC-Klasse-I Oberflächenmolekülen. Diese Daten untermauern die Modellier- und Fitting-These, welche auf Grund der kristallographischen Daten gemacht wurde. Der Aufklärung über die Vorgänge innerhalb der Zelle ist auch zu Gute gekommen, daß die IFNGR1-Kette eine der ersten Rezeptorketten überhaupt war, bei der im Detail eine Struktur-Funktions-Analyse durchgeführt wurde. Wie bereits im Vorfeld ausgeführt, waren Mutagenesestudien an den Rezeptorketten die Wegbereiter für die Aufklärung der Jak-STAT-Signaltransduktion auf der cytoplasmatischen Seite.

1.3 Die Jak-STAT-Signaltransduktion am IFNGR

1.3.1 Entdeckung der Jaks (Janusfamily tyrosine kinases)

Jaks sind relativ große Kinasen von durchschnittlich 1150 AS und einem apparenten Molekulargewicht von 120 kDa – 130 kDa. Sie gehören alle zu einer Klasse von Tyrosinkinase, die mit ihrer katalytischen Domäne in der Lage sind, Tyrosinreste zu phosphorylieren (Guriak *et al.*, 1996, Lai K. S. *et al.*, 1995, Rane *et al.*, 1994). Die Familie der Januskinasen wurde durch Mutationsexperimente und der Beobachtung eines defizienten Signaltransduktionsweges entdeckt. Durch eine Partial-Sequenzanalyse identifizierte man ein Gen für eine Tyrosinkinase mit unbekanntem kinaseähnlichen Domänen (Darnell *et al.*, 1994, Harpur *et al.*, 1992, Valazquez *et al.*, 1992, Wilks *et al.*, 1991). Kennzeichen der derzeit vier bekannten Januskinasen (Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2) ist die Existenz einer Tandemkinase und Domänen mit Pseudokinaseeigenschaften. Aufgrund dieser Merkmale erhielt diese neue Klasse von Proteinen in Anlehnung an die römische Gottheit Janus, welche stets mit einem Doppelgesicht dargestellt wird, ihren Namen.

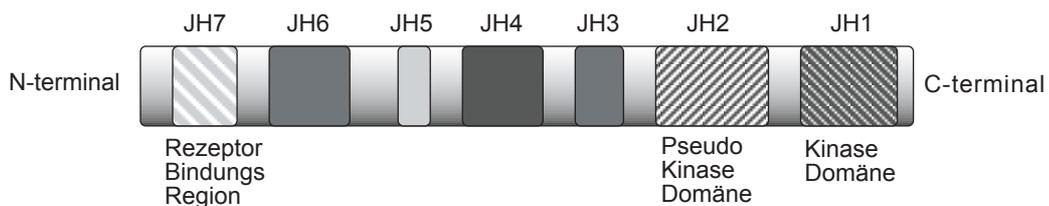


Abbildung 1.2: Schematisierte Darstellung der funktionellen Bereiche von Jak-Proteinen.

Das Protein ist in sieben zum Teil hochhomologe Segmente (JH) unterteilt, wobei allein die JH1-Domäne das katalytische Zentrum darstellt. Über die Funktion der anderen JH-Domänen ist derzeit wenig bekannt (Harpur *et al.*, 1992, Krolewski *et al.*, 1990, Wilks *et al.*, 1991). Allein vom N-terminus ist noch bekannt, daß dieser Teil für eine Bindung an den Cytokin-Rezeptor verantwortlich ist (Frank *et al.*, 1994, Frank *et al.*, 1995). Januskinasen sind in fast allen Signaltransduktionswegen von Cytokin- und Interferonrezeptoren integriert.

Jak Protein				Rezeptortyp
Jak1	Jak2			IFNGR
Jak1		Tyk2		IFNAR
Jak1			Jak3	IL-2-R, IL-4-R, IL-7-R, IL-9-R, IL-15-R
Jak1		Tyk2		IL-10-R
Jak1 o.	Jak2 o.	Tyk2		IL-6-R
	Jak2	Tyk2		IL12-R
	Jak2			EPO
	Jak2			IL-3-R, IL-5-R, GM-CSF-R
	Jak2			Prolactinrezeptor

Tabelle 1.4: Jak-Proteine und ihr Auftreten bei verschiedenen Cytokin- und Interferonrezeptoren.

1.3.2 Entdeckung der STATs (signal transducers and activators of transcription)

Die sieben bekannten Säugetier-STAT-Proteine haben eine Größe von 90 kDa bis 115 kDa (750 – 850 AS) und ihre Namensgebung ist auf die Reihenfolge ihrer Entdeckung und die Einordnung in die Klasse der STAT-Proteine zurückzuführen.

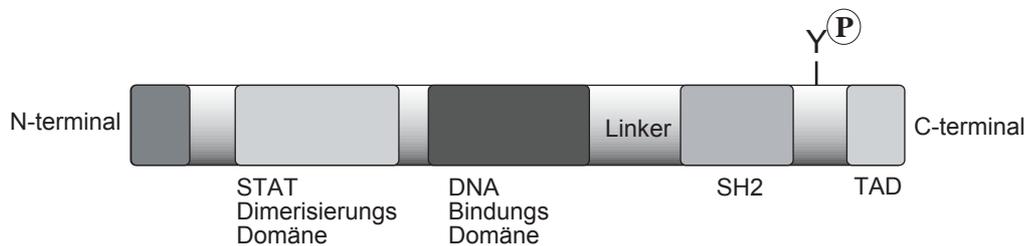


Abbildung 1.3: Struktur von STAT-Proteinen.

Der Signaltransduktionsweg über die STAT-Proteine ist ein bei vielen Cytokin- und Interferonrezeptoren auftretender Mechanismus. Merkmale aller STAT-Proteine ist zum einen die hochkonservierte, 125 AS große, endständige N-terminale Region mit bislang unbekannter Funktion. Daran schließt sich die Dimerisierungsdomäne an. Mit Ausnahme von STAT2, bei der keine DNA Bindungsdomäne identifiziert werden konnte liegt im mittleren Abschnitt die ca. 180 AS große DNA-Bindungsregion vor. Die zum C-terminus hin verschobene Src-homology2 (SH2) Domäne dient als Substrat für die Phosphorylierung (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000, Horvath *et al.*, 1997). Am C-terminus befindet sich die Transkriptionale Aktivierungs Domäne TAD.

Die STAT Proteine haben sechs essentielle Funktionen, durch die sie den Signaltransduktionsweg charakterisieren:

1. Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste
2. Tyrosinabhängige Autophosphorylierung
3. Dimerisierung als Homo- oder Heterodimer
4. Translokation in den Zellkern
5. Bindung an die DNA
6. Modulation der Genexpression

Das Zusammenspiel der einzelnen Proteine bei der Übertragung des biologischen Signals, das von IFN- γ ausgeht, war lange Zeit nicht eindeutig geklärt. Durch die Identifizierung einer Gruppe von Genen (interferon-stimulated genes, ISG), die am Ende des durch Interferone induzierten Signals bereits nach 10 bis 15 Minuten transkribiert werden, entdeckte man in der Promotorregion von IFN- γ induzierten Genen eine immer wieder auftretende neun Basen lange Sequenz. Auf Grund ihrer besonderen Bedeutung wurde sie gamma interferon activation site (GAS) genannt. Bei IFN- α/β induzierten Genen trat eine 12 - 15 Basen lange Promotorsequenz auf, die sogenannte ISRE (interferon stimulated response element). Durch synthetische Oligonucleotide, die das ISRE-Element aufweisen, war es möglich, Transkriptionsfaktoren der Masse 91 kDa und 113 kDa zu binden, die später als STAT1 α und STAT2 bezeichnet wurden. Das Besondere an diesen neuen Proteinen war die Src-homology site SH2, an welcher später alle weiteren STAT-Proteine identifiziert wurden.

STAT Protein	Rezeptortyp
STAT1	IFNAR, IFNGR
STAT2	IFNAR
STAT3	IL-6 Rezeptor-Familie, IL-10 Rezeptor, EGF Rezeptor
STAT4	IL-12 Rezeptor
STAT5	IL-2 Rezeptor, IL-3 Rezeptor-Familie, EPO Rezeptor
STAT6	IL-4 Rezeptor

Tabelle 1.5: STAT-Proteine und ihr Auftreten bei den verschiedenen Rezeptoren.

Die funktionale Verbindung zwischen den Jak- und den STAT-Proteinen wurde offensichtlich, als man bei Jak defizienten Zellen keine Aktivierung von STAT1 erreichen konnte (Watling *et al.*, 1993). Untermuert wurde der Befund durch Mausexperimente, bei denen eine Defektmutation an STAT oder Jak Genen vorgenommen wurde. Entweder fehlten bei den Mäusen Teile des Immunsystems, oder aber die Immunfunktionen waren fehlerhaft entwickelt.

1.3.3 Das Zusammenspiel von Jak und STAT am IFNGR

Nachdem die direkte Abhängigkeit von Jaks und STATs in der Signaltransduktion evident war, wurde nach den spezifischen Bindungsstellen am IFNGR gefahndet. Durch ein Alanin-Scanning entdeckte man auf der intrazellulären Seite der IFNGR1-Kette eine für die Jak1 Bindung essentielle 4 AS große Site (Leu266-Pro-Lys-Ser269) (Kaplan *et al.*, 1996). Nach Bindung von IFN- γ kommt es zur Transphosphorylierung der bereits mit den IFNGR-Ketten präassoziierten Jak1 und Jak2 (Igarashi *et al.*, 1994, Kaplan *et al.*, 1996).

Auf der IFNGR2-Kette wurden im Rahmen von Struktur-Funktions-Experimenten von drei unterschiedlichen Gruppen (Bach *et al.*, 1996, Kotenko *et al.*, 1995, Sakatsume *et al.*, 1995) zwei Motive mit je 5 AS Länge (Pro263-Pro-Ser-Ile-Pro267, Ile270-Glu-Glu-Tyr-Leu274) lokalisiert, die 13 AS von der Transmembrandomäne entfernt sind und für eine Anbindung von Jak2 von äußerster Wichtigkeit sind. Bei Mutationen an diesen beiden Motiven konnte keinerlei Jak2 Bindung und somit auch keine weitere Aktivierung festgestellt werden (Bach *et al.*, 1996). Bei Versuchen mit mutierten Rezeptorketten, die optimale Bindungsmotive für andere Januskinasen enthielten, konnte ebenfalls keinerlei biologische Aktivierung ermittelt werden. Alle Ergebnisse zusammengefaßt deuten darauf hin, daß die beiden Januskinasen Jak1 und Jak2 eine außerordentliche Rolle bei der substratspezifischen Aktivierung des IFNGR einnehmen und durch andere Tyrosinkinase nicht ersetzt werden können. Neben der hohen Spezifität, welche die beiden Januskinasen an den jeweiligen Transmembranketten aufweisen, ist die räumliche

Nähe der beiden Proteine zueinander für eine gegenseitige Phosphorylierung unabdingbar. Die unter 1.2.6 erwähnte Liganden-induzierte Oligomerisierung von zwei IFNGR-Untereinheiten hat zur Folge, daß sich die beiden Jak-Proteine auf der cytosolischen Seite derart nahe kommen, daß sie sich gegenseitig aktivieren können. Dabei sei nochmals auf Ergebnisse von Bach *et al.* (Bach *et al.*, 1996) hingewiesen, die eindeutig gezeigt haben, daß die Rezeptoruntereinheiten auf unstimulierten Zellen keinerlei Präassoziationen aufweisen.

Die Bedeutung der STAT1 Aktivierung am IFNGR für eine Signalübertragung war bereits mehrere Jahre anerkannt, während über den genauen Mechanismus des Jak/STAT Signalweges noch vieles unklar war. Bei Mutageneseversuchen am IFNGR1 wurde Tyr440 als Schlüsselaminosäure identifiziert. An ihr wurde eine reversible Phosphorylierung nach IFN- γ Behandlung festgestellt. Diese Phosphorylierung erregte daher Interesse, weil festgestellt wurde, daß Tyr440 keine Bedeutung für eine ligandeninduzierte Jak Aktivierung hatte (Greenlund *et al.*, 1994, Igarashi *et al.*, 1994).

Da jedoch bei einer Mutation von Tyr440 der durch IFN- γ ausgelöste Signalweg unterbrochen worden war, wurde die Hypothese von einer direkten Verbindung zwischen Jak und STAT Molekülen über exakt diese AS aufgestellt (Lai D., 1994). Überprüft wurde diese Hypothese durch Experimente, bei denen kurze phosphorylierte Peptide von 5 - 12 AS Länge, die alle von der IFNGR1-Sequenz abgeleitet waren, mit Zelllysaten inkubiert wurden. Alle Peptide mit einer Minimalsequenz von Tyr440(PO₄)Asp-Lys-Pro-His444 waren in der Lage, STAT1 auch in Abwesenheit von weiteren Proteinen mit einer hohen Affinität von $k_D = 1,37 \times 10^{-11}$ molar zu binden. Bei unphosphorylierten Vergleichspeptiden konnte keine Bindung von STAT1 Molekülen festgestellt werden. Es konnte auch keine Bindung von anderen STAT Molekülen, wie z. B. STAT2, an phosphorylierten oder unphosphorylierten Peptiden bewiesen werden (Greenlund *et al.*, 1995).

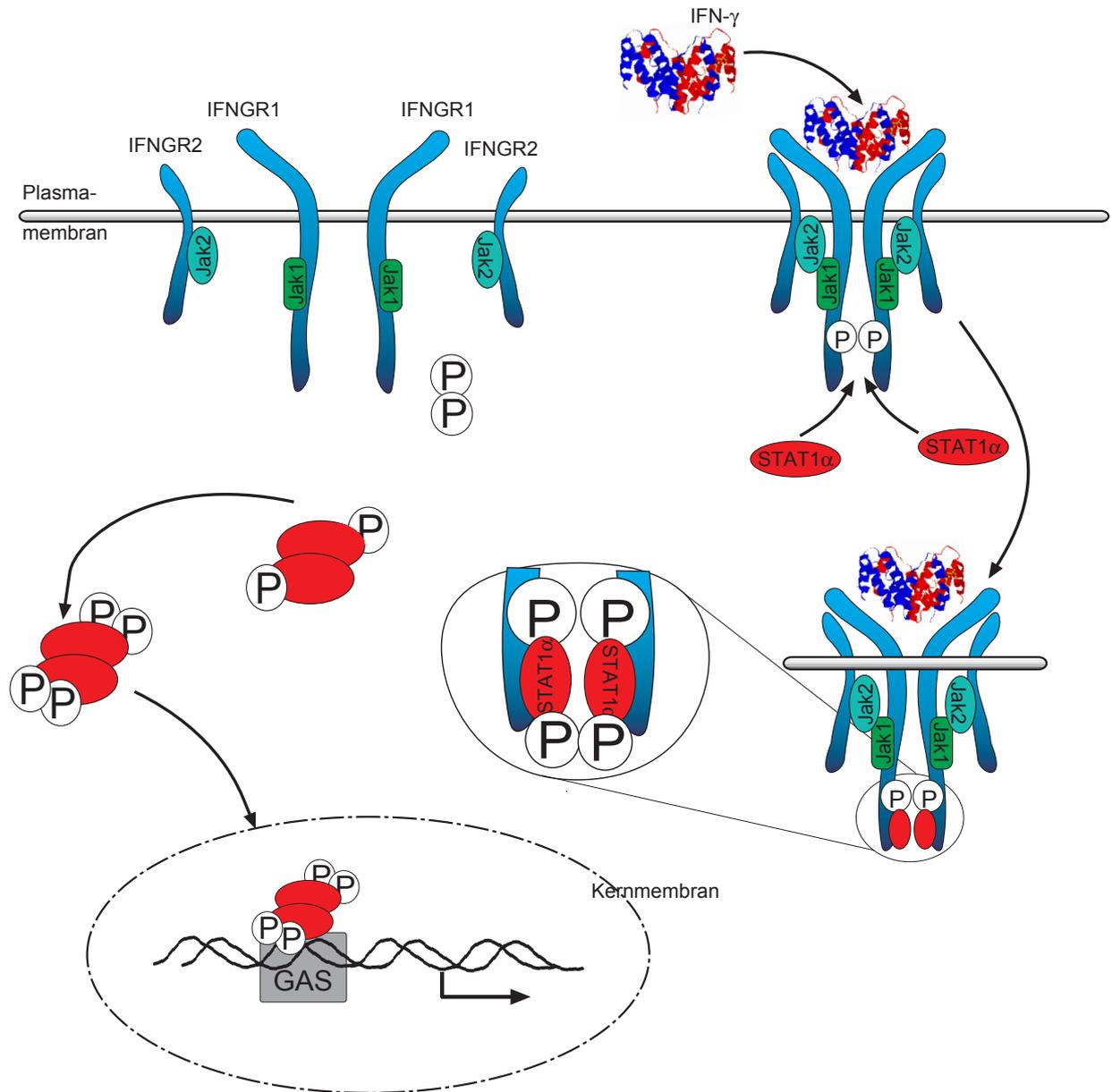


Abbildung 1.4: Modell des membranständigen IFNGR Komplexes und der Signaltransduktion nach Bindung des Liganden IFN-γ.

Bei diesen Experimenten trat auch zum Vorschein, daß die spezifische Rekrutierung von STAT1 Proteinen an die aktivierte Form des IFNGR1 durch zwei weitere AS beeinflusst wird. Asp440 und His444 wurden als die einzigen weiteren AS identifiziert, die für die biologische Funktion des Rezeptors relevant sind. Die STAT1 Moleküle binden mit ihrer SH2 Domäne an den Rezeptor und leiten so die Phosphorylierung von Tyr701 am STAT-Protein ein (Greenlund *et al.*, 1995). Es stellte sich heraus, daß die spezifische Bindung an den jeweiligen Rezeptor allein von der SH2 Domäne ausgeht. Beim Austausch von SH2 Domänen an verschiedenen STAT-Proteinen zeigte sich, daß ein STAT2-Protein, welches die SH2 Domäne von STAT1

trug, zu einer Bindung an den IFNGR1 fähig war. Beim Austausch von STAT Bindungsmotiven an verschiedenen Interferonrezeptoren festigte sich das Bild einer allein durch die SH2 Domäne hervorgerufenen spezifische Bindung (Heim *et al.*, 1995).

Nach der Phosphorylierung von Tyr701 am STAT1 Protein ist die Affinität zur Rezeptoruntereinheit IFNGR1 stark herabgesetzt und es findet eine Dissoziation statt. Die Phosphorylierung hat die Affinität der STAT1 Proteine zueinander erhöht. Durch gegenseitige SH2 Aneinanderlagerung kommt es zur Ausbildung eines punktsymmetrischen STAT1-Dimers, das durch seine kompakte Form äußerst stabil ist. Die Aneinanderlagerung wird auch dadurch gefördert, daß exakt in dieser Phase die optimale Nähe der beiden Proteine einen maximalen Wert erreicht hat. Nach Dimerisierung der STAT1 Proteine befindet sich der Komplex in einem ersten zwischenaktivierten Zustand. Nach Phosphorylierung des C-terminalen Serinrestes Ser₇₂₇ befindet sich das Dimer im vollaktivierten Zustand. Diese Phosphorylierung ist essentiell für die biologische Funktionalität des STAT1 Dimers. Neuere Untersuchungen belegen die Annahme, daß die Serinphosphorylierung durch eine MAP Kinase (mitogen-activated protein kinases) durchgeführt wird (David *et al.*, 1995, Wen *et al.*, 1995). Es wurden aber auch Beobachtungen gemacht, daß ERK2 (extracellular signal-regulated kinases) oder JNK (c-Jun kinases) in bestimmten Situationen eine Phosphorylierung des Serinrestes an Position 727 ausführen. Der Grund für die Aktivierung durch die eine oder andere Kinase ist derzeit noch völlig unklar (Kovarik *et al.*, 1999, Lim *et al.*, 1999). Ein Ausweichen auf einen anderen Weg der Aktivierung ist durchaus möglich. Das haben Experimente mit spezifischen Inhibitoren für den einen oder anderen Weg ergeben (Chung *et al.*, 1997, Schuringa *et al.*, 2000).

Im weiteren Verlauf wird das aktivierte STAT1 Homodimer nach Transport in den Zellkern transloziert und entfaltet dort durch Anbindung an spezifische GAS Sequenzen (IFN- γ activated site) zusammen mit anderen Proteinen seine eigentliche Aufgabe. Da STAT1 nicht nur bei der Signaltransduktion des IFN- γ , sondern auch bei IL-6, IL-10, EGF und PDGF eine Rolle spielt, wird die Anzahl der durch STAT1 induzierten Gene auf mehr als 100 geschätzt (Decker *et al.*, 1997).

1.4 Lösliche Cytokinrezeptoren

Cytokine, die von einer großen Anzahl verschiedener Zellen sekretiert werden, besitzen ein hohes Maß an regulatorischen Funktionen. Sie kontrollieren oder haben Einfluß auf die Immunantwort, Fieber, auf Tumorbekämpfung und Akut-Phasen-Antwort. Dieses breite Spektrum an biologischen Funktionen mit zum Teil drastischen physiologischen Folgen verlangt nach effektiven Kontrollmechanismen an verschiedenen Stellen, wie z. B. bei der Cytokinsekretion, der Rezeptoroberflächenexpression und der Produktion von Inhibitormolekülen (Dinarello, 1991, Fernandez-Botran, 1991).

Von besonderem Interesse sind die regulatorischen Effekte durch spezifische, lösliche Cytokinrezeptoren, wie sie in verschiedenen Körperflüssigkeiten gefunden wurden. Die inhibitorischen Moleküle verhindern eine Cytokin-Rezeptor-Interaktion durch Anbindung an das lösliche Cytokin oder aber durch Bindung an einen membranständigen Rezeptor. Dabei ist letzteres aus humanphysiologischer Sicht bisher nur einmal vorgefunden worden. Der lösliche IL-1 Rezeptorantagonist inhibiert durch Anbindung an den Rezeptor eine Signaltransduktion (Dinarello, 1991). Wesentlich häufiger wurden lösliche Formen von verschiedenen Cytokinrezeptoren beschrieben, die an das Cytokin binden. Hierbei handelt es sich um verkürzte Formen des membranständigen Rezeptors, bei dem die intrazelluläre und die Transmembran-Domäne fehlen. Einige lösliche Rezeptoren entstehen durch proteolytische Spaltung des eigentlichen Rezeptors, andere werden durch differentielles Splicing synthetisiert.

In humanen und murinen Körperflüssigkeiten wurden von folgenden Cytokinen und Interferonen lösliche Rezeptoren gefunden: IL-2; IL-4; IL-6; IL-7, IFN- γ ; IFN- α ; TNF; CSF; EGF; insulin-like-GF; GH und Transferrin (Debets *et al.*, 1994, Fernandez-Botran, 1991, Fridman *et al.*, 1993, Novick *et al.*, 1992, Novick *et al.*, 1989, Woith *et al.*, 1993).

Die Aufgabe der löslichen Cytokin-bindenden Proteine ist zur Zeit noch umstritten. Für eine feine Regulation der Immunantwort kommen sie nicht in Frage. Vielmehr scheinen sie einen Einfluß auf den eigentlichen Krankheitsverlauf zu haben, der sich im Schutz des Liganden durch Stabilisierung der Struktur und Schutz vor Proteasen in den verschiedenen Körperflüssigkeiten auszeichnet.

1.4.1 Virale Inhibition

Neben dieser körpereigenen Inhibition der Cytokinsignaltransduktion wurden zu Beginn der 90er Jahre bei verschiedenen Viren ebenfalls Proteine identifiziert, die in der Lage sind, Cytokine zu binden und so eine ligandeninduzierte Signaltransduktion zu verhindern. Vermutungen zur Existenz solcher Proteine wurden bereits Ende der 80er Jahre geäußert, und der Name "Viroceptor" war nach Entdeckung des ersten virusstämmigen Proteins mit Bindungseigenschaften zu einem Cytokin bald ein fester Begriff. 1991 wurde im Überstand von mit *Myxoma Virus* infizierten Zellen ein Protein identifiziert, welches hohe Homologien zum TNF-Rezeptor aufwies und die Fähigkeit besaß, TNF zu binden (Smith *et al.*, 1991, Upton *et al.*, 1991). In den folgenden Jahren wurden eine ganze Reihe weiterer rezeptorähnlicher cytokinbindender Proteine identifiziert, die alle viralen Ursprungs waren. Größte Bedeutung bei der Expression von Viroceptoren haben die *Poxviridae* (Pockenviren). Diese Virusfamilie, die sich in zwei Unterfamilien mit elf Gruppen aufteilt, zeichnet sich durch komplexe doppelsträngige DNS tragende Viren aus. Die obligaten Zellparasiten haben eine symmetrische Quaderstruktur, in deren innerer Capsidhülle sich ein S-förmiger Proteinstab befindet. Dieser enthält die 130 kbp - 300 kbp lange DNA und bildet mit ihr ein Nukleocapsid. Mit einer Größe von 100 x 200 x 300 nm sind die Pockenviren die mit Abstand größten Viren, die sogar unter dem Lichtmikroskop zu erkennen sind.

Subfamilien	Gruppe
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>
	<i>Parapoxvirus</i>
	<i>Avipoxvirus</i>
	<i>Leporipoxvirus</i>
	<i>Capripoxvirus</i>
	<i>Suipoxvirus</i>
	<i>Molluscipoxvirus</i>
	<i>Yatapoxvirus</i>
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Entomopoxvirus A</i>
	<i>Entomopoxvirus B</i>
	<i>Entomopoxvirus C</i>

Tabelle 1.6: Taxonomie der *Poxviridae*.

1.4.2 *Vaccinia Virus* aus der Familie der *Poxviridae*

Variola Virus stellt ein humanspezifisches Pathogen dar, das eine der verheerendsten humanen Ansteckungskrankheiten auslöst: die Pocken. Im Jahre 1796 übertrug Edward Jenner die Lymphe von mit Kuhpocken infizierten Rindern auf den Menschen und erreichte durch diese erste Impfung einen Schutz für die Menschen vor der meist tödlich verlaufenden Krankheit (Baxby, 1981). Jenner nannte das Impfmateriale, abgeleitet vom lateinischen “*vacca*” für Kuh, “*Vaccine*” und die Inoculation mit dem Material “*Vaccination*”. Soweit es sich heute noch nachvollziehen läßt, war das von Jenner verwendete Virus nicht nur auf bovinen Spezies zu finden. Im 18. und 19. Jahrhundert war das Virus für sporadische Infektionen bei Menschen und einer großen Anzahl von Tieren verantwortlich. 1939 konnte Downie (Downie, 1939) anhand der im letzten Jahrhundert verwendeten Pockenimpfschutzproben feststellen, daß sie alle eine unterschiedliche Virus-Spezies enthielten, die in der Natur in dieser Form nicht zu finden war. Diese für die Impfung verwendete Virus-Spezies ist seitdem unter dem Namen “*Vaccinia Virus*” bekannt.

Frühere Vermutungen, daß sich das *Vaccinia Virus* möglicherweise vom Kuhpocken-Virus oder vom *Variola Virus* ableiten läßt, wurden durch Vergleiche von biologischen Eigenschaften, DNA-Restriktionsverdau und DNA-Sequenzanalyse für unwahrscheinlich erachtet (Aguado *et al.*, 1992, Massung *et al.*, 1993, Shchelkunov *et al.*, 1993). Die Herkunft (Abstammung) und der natürliche Wirt des *Vaccinia Virus* ist bis heute ungeklärt. Trotz dieser unbeantworteten Fragen ist das *Vaccinia Virus* das am besten studierte Mitglied der *Poxviridae*. Die vollständige DNA-Sequenz des Genoms vom *Vaccinia Virus* wurde 1990 von Goebel *et al.* publiziert (Goebel *et al.*, 1990). Das Genom hat 191.636 Basenpaare mit einem A/T-Gehalt von 66,6 % und 263 potentiellen Genen (198 codierende Major-Proteinbereiche und 65 überlappende Minor-Proteinbereiche).

Die lineare doppelsträngige DNA des *Vaccinia Virus* (wie auch bei allen anderen *Poxviridae*) besitzt an jedem Strangende einen charakteristischen hairpin loop, an dem sich die Bereiche der tandem repeats (TR) und der invertet terminal repeats (ITR) unmittelbar anschließen (Abbildung 1.5).

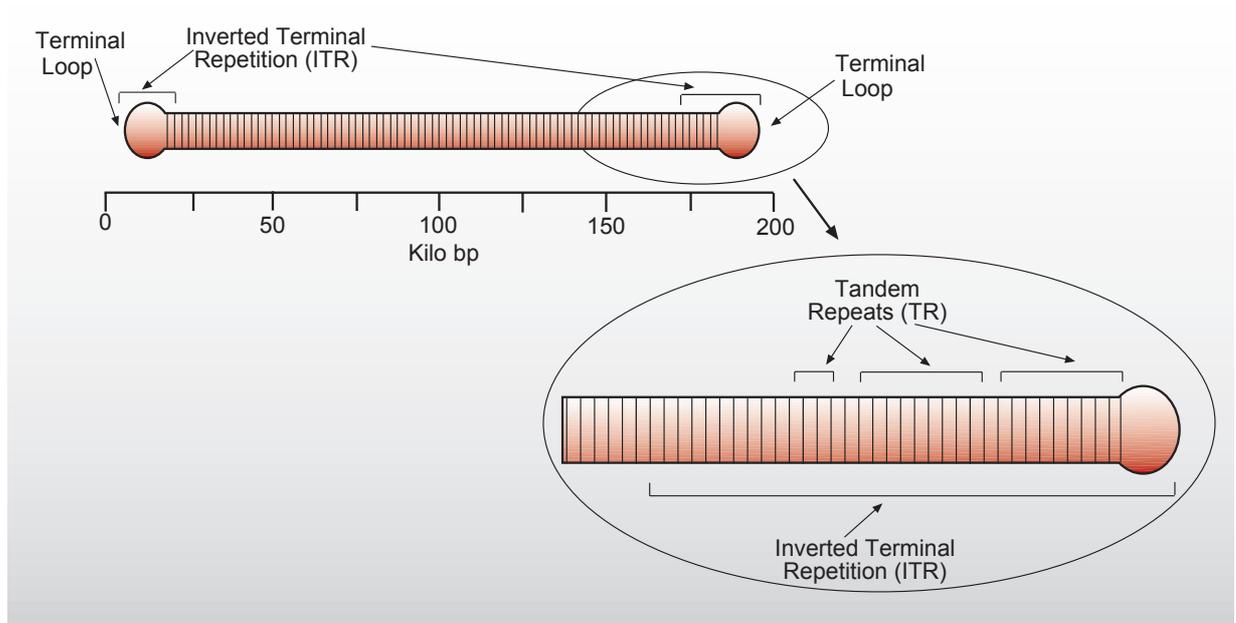


Abbildung 1.5: Darstellung vom Aufbau viraler DNA.

Weiter zur Mitte gelagert befinden sich Bereiche hoher Variabilität, die mit ihren ORF Gene codieren, die für eine Interaktion mit der jeweiligen Wirtszelle essentiell sind. Diese Regionen codieren auch für verschiedene Klassen von immunmodulierenden Proteinen. In der zentralen Mitte befinden sich die relativ hochkonservierten Gene, die für die virale Replikation verantwortlich sind sowie einige Strukturproteine.

Die Benennung der ORF des *Vaccinia Virus* Genoms folgte der allgemeingültigen Konvention zur Namensgebung: Danach wird die doppelsträngige DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind* III geschnitten. Die Fragmente werden dann der Größe nach mit Buchstaben versehen. Die ORF auf dem Abschnitt werden von links nach rechts durchnummeriert und schließlich je nach Ableserichtung des ORF mit einem R (rechts) oder L (links) versehen (Rosel *et al.*, 1985).

1.4.3 Lösliche virale Interferonrezeptoren

Der erste lösliche virale IFN- γ Rezeptor wurde von Upton *et al.* aus Zellen, die mit *Leporipoxvirus Myxoma Virus* infiziert waren, als ein 37 kDa großes Protein identifiziert (Upton *et al.*, 1992). Dieses Protein war das Produkt des ORF M-T7 und es wies zu den extrazellulären Domänen des murinen und humanen IFNGR eine Aminosäureidentität von 25 % auf. Das M-T7 Protein besaß keine Aminosäureabschnitte, die mit der intrazellulären oder der Transmembran-Domäne der IFNGR eine Homologie aufwiesen. Dieser Befund entsprach den Vorhersagen, die man auch auf Grund der Ergebnisse zum viralen TNF Rezeptor gemacht hatte. Das M-T7

Protein hatte die Potenz mit einer k_{Diss} von $1,2 \times 10^{-9}$ molar (1,2 nM) an rabbit IFN- γ zu binden und verhinderte dadurch den antiviralen Effekt des Cytokins. Das *Myxoma* IFN- γ Rezeptorprotein wird bereits in der frühen Phase der Infektion als eines der ersten Proteine, noch bevor eine Transkription von Hüll- und Strukturgenen eingeleitet ist, in einer Konzentration von 5×10^7 Molekülen/Zelle sekretiert (Mossman *et al.*, 1995, Mossman *et al.*, 1995).

Das Genom von *Vaccinia Virus* besitzt mit dem ORF B8R eine DNA Sequenz, welche eine hohe Homologie zum ORF M-T7 hat. Die Aminosäureidentität zum murinen und humanen IFNGR beträgt 20 % (Earl *et al.*, 1993, Goebel *et al.*, 1990, Upton *et al.*, 1992). Verwandte Gene zum ORF B8R wurden in *Ectromelia Virus* (Mossman *et al.*, 1995), zwei Stämmen des *Variola Virus* (Massung *et al.*, 1994, Shchelkunov *et al.*, 1993), sowie im *Suipox Virus* (Massung *et al.*, 1993) gefunden. Bei Crosslinking Experimenten mit radioaktiv markiertem IFN- γ wurde im Überstand von insgesamt 14 *Vaccinia Virus* Stämmen die Produktion eines IFN- γ bindenden Proteins identifiziert (Alcami *et al.*, 1995, Mossman *et al.*, 1995). Der *Vaccinia* Viroceptor hat eine Größe von ca. 43 kDa und ist damit etwas größer als der Viroceptor von *Myxoma Virus* mit ca. 37 kDa. Dieser Größenunterschied könnte durch eine weitere N-Glykosylierung des *Vaccinia* Proteins hervorgerufen sein (Howard *et al.*, 1991, Upton *et al.*, 1992). Bei den bis zum heutigen Tage untersuchten *Poxviridae* wurde in allen jeweils ein IFN- γ bindendes Protein oder aber eine entsprechende Gensequenz entdeckt. Dieser Befund untermauert die enorme Bedeutung eines solchen Viroceptors für alle *Poxviridae*. Dabei entfaltet B8R seine Wirkung auf zweierlei Art und Weise: Zum einen bindet das Protein an das Cytokin und verhindert dadurch den durch IFN- γ ausgelösten antiviralen Effekt und zum anderen wird durch das Abfangen von IFN- γ die allgemeine Mobilmachung des gesamten Immunsystems ausgesetzt.

Die Tatsache, daß das *Vaccinia Virus* unterschiedliche Spezies als Wirt hat, verlangt entweder ein großes Repertoire an verschiedenen Proteinen für den Einsatz bei der jeweiligen Spezies oder aber Proteine, die nicht speziesspezifisch sind. Bei *Vaccinia Virus* trifft trotz seiner Genmenge letzteres zu. B8R aus den verschiedenen *Vaccinia* Stämmen haben alle die Potenz IFN- γ von Mensch, Rind, Ratte und Huhn zu binden. Diese breite Akzeptanz gegenüber IFN- γ von verschiedenen Spezies ist ein einmaliger Präzedenzfall, der in dieser Art noch nie beschrieben wurde.

1.5 Zusammenfassung: Modell der IFNGR Signaltransduktion

Die Einzelergebnisse zeigen, betrachtet man sie in einem übergreifenden Kontext, ein in dieser Art einzigartiges Modell der Cytokin Signaltransduktion. Auf unstimulierten Zellen liegen die beiden unterschiedlichen Rezeptorketten IFNGR1 und IFNGR2 nicht assoziiert auf der Membran vor. Die intrazellulären Domänen der beiden Ketten sind jedoch mit der unaktivierten Form der Januskinasen sind Jak1 und Jak2 assoziiert. Bei Bindung von IFN- γ an die extrazelluläre Bindungsstelle kommt es zu einer Dimerisierung der IFNGR1-Ketten, wodurch sich die beiden Moleküle in ihrer räumlichen Struktur so verändern, daß eine speziesspezifische IFNGR2-Kettenanlagerung erfolgen kann. Der Ligand IFN- γ ist somit für eine Aneinanderlagerung der beiden Rezeptorketten und die daraus resultierende dichte Annäherung der beiden intrazellulären Proteinkomplexe von Jak1 und Jak2 zwingend notwendig. In diesem Stadium findet eine gegenseitige Aktivierung der Januskinasen und eine anschließende Phosphorylierung der für die weitere Funktion entscheidenden Aminosäure Tyr440 am IFNGR1 statt. Dadurch werden die beiden fünf Aminosäuren langen Bindungsstellen für eine Assoziation von STAT1 Molekülen aktiviert. Je ein STAT1 Molekül dockt mit hoher Affinität an die Bindungsdomäne an. In dieser Konstellation, in der die räumliche Nähe zwischen den beiden Januskinasen und den STAT Molekülen am höchsten ist, findet die Phosphorylierung der Aminosäure Tyr701 am jeweiligen STAT1 Molekül statt. Nach der Dissoziation von STAT1 von der Bindungsstelle kommt es zur Ausbildung eines Homodimers bestehend aus den phosphorylierten STAT1 Molekülen. In diesem Stadium findet eine Phosphorylierung der C-terminalen Aminosäure Ser727 statt. Insgesamt wurden bis jetzt drei verschiedene Kinasen identifiziert, die diese Aufgabe ausführen. Das aktivierte STAT1 Homodimer wird anschließend in den Kern transloziert und bindet dort an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion der durch IFN- γ früh induzierten Gene. Die Signaltransduktionskaskade des IFNGR-Komplexes stellt sich somit als ein geordneter, durch Molekülaffinitäten gesteuerter Prozess dar, der durch die Bindung von IFN- γ ausgelöst und über die Moleküle Jak1, Jak2 sowie STAT1 und der anschließenden Translozierung in den Kern manifestiert ist.

1.6 Intention der Dissertationsarbeit (Ziele der Dissertationsarbeit)

IFN- γ stellt ein zentrales Protein mit antiviraler, antiproliferativer und immunmodulierender Wirkung dar. Bei chronischer Polyarthrit (CP), chronischer Granulomatose (CG) und maligner Osteopetrose ist IFN- γ zur Zeit das einzige Medikament, welches die Krankheit bekämpfen kann. Bei einer Vielzahl anderer Krankheiten wird IFN- γ zur Unterstützung eines positiven Verlaufes eingesetzt. Neben diesem positiven Einfluß kann körpereigenes IFN- γ jedoch auch negative Eigenschaften entwickeln. Panitch *et al.* dokumentierten im Jahre 1987, daß durch Behandlung mit IFN- γ bei Multiple Sklerose Patienten eine deutliche Verschlechterung eintritt. In einem solchen Fall richtet IFN- γ durch seine pleiotrope Natur und seinen Einfluß auf das gesamte Immunsystem als Modulator erhebliche Schäden an. Die Suche nach Agenzien, die IFN- γ abblocken und dadurch die Wirkung auf die Zielzellen verhindern, stellt nach Meinung von Panitch einen erfolgsträchtigen Ansatz bei der MS-Therapie dar.

Im Jahre 1995 entdeckten Alcami und Smith in verschiedenen Stämmen von *Vaccinia Virus* (Poxviridae) ein IFN- γ bindendes Protein mit breiter Speziesakzeptanz. Die Aufklärung von Struktur und Funktion des Virorezeptors B8R sollte die Basis bilden für ein umfangreiches biophysikalisches Verständnis von der Bindung und der Wirkung des neuen Proteins. Voraussetzung für diese Untersuchungen ist die Herstellung des rekombinanten Proteins in einem Expressionssystem, das natives Protein liefert und die Entwicklung eines geeigneten Testsystems zur Messung der neutralisierenden Wirkung von B8R.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde mir von Herrn Prof. Dr. Sidney Pestka aus New Jersey und Herrn Dr. Serguei Kotenko (Department of Molecular Genetics and Microbiology von der University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, New Jersey, USA) die Möglichkeit zur Herstellung von chimären Rezeptoren gegeben. Die Struktur-Funktionsanalyse der chimären Rezeptoren bestehend aus einem extrazellulären B8R Anteil und einem intrazellulären IFNGR Anteil und die Aufklärung einer Signaltransduktion rückten im Laufe der Dissertation immer weiter in den Vordergrund und bilden einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

2. Experimenteller Teil

2.1 Materialien, Geräte und Reagenzien

2.1.1 Verwendete Geräte

Brutschrank (Zellkultur)	Brutschrank CO ₂ electronic, <i>Heraeus</i>
Kühlzentrifugen	Centrifuge 5417R, <i>Eppendorf</i>
Imager	Electronic Autoradiography Instant Imager, <i>Packard</i>
Pumpenanlagen	Econo System, <i>BioRad</i>
Chromatographiesystem	Perfusion Chromatography Workstation 60, <i>Applied Biosystems</i>
Ultraschallprozessor	UP 200H, <i>Dr. Hilscher GmbH</i>
Schüttelinkubator	Modell G25, <i>New Brunswick Scientific Co</i>
Spektralphotometer	Ultrospec 3.000, <i>Pharmacia Biotech</i>
Sterilwerkbank	Gelaire, <i>ICN Biomedicals</i>
Thermocycler	Peltier Thermal Cycler-200, <i>MJ Research</i>
Thermostat	Thermomixer 5436, <i>Eppendorf</i>
Zentrifugen	Avanti J-25, <i>Beckman</i> ; Universal, <i>Hettich</i>
	Minifuge RF, <i>Heraeus</i>
UV Transilluminator	TI 3, <i>Biometra</i>
Sequenzierautomat	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, <i>Applied Biosystems</i>
Blotapparatur	Semidry Blotter, <i>Biometra</i>
Page-Gelkammer	Mini Twin, <i>Biometra</i>
Agarose-Gelkammer	<i>Biometra</i>
Netzgerät	ECPS 500/400, <i>Pharmacia</i>

2.1.2 Allgemein verwendete Materialien und Reagenzien

Steriles Kunststoffmaterial	<i>Falcon, Nunc</i>
Einweg-Labormaterialien	<i>Sarstedt, Eppendorf, Landgraf</i>
Röntgenfilme	<i>BIOMAX, Kodak</i>
Feinchemikalien, Biochemica	<i>AppliChem, Merck, Roth, Fluka, Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Pierce</i>
Lösungsmittel	<i>AppliChem</i>
Nucleinsäuremodifizierende Enzyme	<i>New England Biolabs (NEB)</i>
DNA-Standard	<i>New England Biolabs (NEB)</i>
γ - ³² P ATP	<i>Amersham Pharmacia Biotech</i>
Oligonukleotide, HPLC gereinigt	<i>TIB MolBiol</i>
Protein-Molekulargewichtsstandard	<i>BioRad</i>
Bakterienwachstumsmedien	<i>DIFCO/Becton Dickinson</i>
Zellkulturmedien	<i>Gibco BRL</i>
Nitrocellulosemembran	<i>Schleicher & Schuell</i>

spezielle Materialien und Chemikalien sind bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

2.1.3 Puffer und Lösungen

SDS-Elektrodenpuffer

<u>Anode</u>	
25 mM	Tris pH 8,0
<u>Kathode</u>	
25 mM	Tris pH 8,0
250 mM	Glycin

SDS-Trenngel (7,5 % - 15 %)

12 %	Acrylamid/Bisacrylamid
0,1 %	SDS
375 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1 %	APS
0,05 %	TEMED

SDS-Sammelgel (5 %)

5 %	Acrylamid/Bisacrylamid
0,1 %	SDS
125 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,19 %	APS
0,05 %	TEMED

Coomassie-Entfärbelösung

40 %	Methanol
10 %	Essigsäure
50 %	Aqua bidest

Coomassie-Färbelösung

0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue
in Entfärbelösung aufnehmen

5x Laemmli-Puffer

250 mM	Tris pH 6,8
10 % (w/v)	SDS
10 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
50 % (w/v)	Glycerin

DNA-Probenpuffer

0,25 %	Bromphenol Blau
0,25 %	Xylene Cyanol FF
30 %	Glycerin

in Aqua bidest bei 4° C gelagert

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

150 mM	Natriumchlorid
20 mM	Natriumdihydrogen- /Dinatriumhydrogenphosphat

in Aqua bidest; pH 7,5 mit HCl eingestellt

Transferpuffer

25 mM	Tris pH 8,3
192 mM	Glycin
20 %	Methanol

TAE-Puffer pH 7,4

40 mM	Tris
1,0 mM	EDTA
0,11 % (v/v)	Essigsäure

TBE-Puffer pH 8,3

125 mM	Tris
40 mM	Borsäure
2,5 mM	EDTA
0,11 % (v/v)	Essigsäure

TE-Puffer pH 8,0

10 mM	Tris
1,0 mM	EDTA

TBST-Lösung

25 mM	Tris-HCl pH 7,4
125 mM	Natriumchlorid
5,0 mM	Magnesiumchlorid
0,05 %	Tween20

AP-Puffer

100 mM	Tris pH 9,5
100 mM	Natriumchlorid
5,0 mM	Magnesiumchlorid

DNA-Agarosepuffer

10 %	Glycerin
0,025 (w/v)	Bromphenolblau
0,025 (w/v)	Xylencyanol

2 x YT Medium

31 g/l 2 x YT Medium

Das Medium wurde autoklaviert, entsprechende Antibiotika wurden jeweils frisch zugesetzt.

TSS (Transformations- und Lagerungslösung)

10 % (w/v)	PEG 6.000
5 % (v/v)	DMSO
50 mM	MgCl ₂

in 2 x YT Medium lösen, autoklavieren

Selektivagar

12 g/l Agar in 2 x YT Medium

Nach dem Autoklavieren wurde der Agar auf 50° C temperiert, mit einer finalen Konzentration von 100 μ g/ml Antibiotika versetzt und in Petrischalen ausgegossen. Lagerung für max. 3 Wochen bei 4° C

*No amount of experimentation can ever prove me right,
a single experiment can prove me wrong.*

Albert Einstein

2.2 Sequenzalignment des huIFNGR1 und des Proteins B8R von *Vaccinia Virus* (WR)

Die Berechnungen zum Sequenzalignment wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Uwe Dengler zur Verfügung gestellt. Als Grundlage dafür dienten die freundlicherweise von Dr. Daniel Thiel erhaltenen vorläufigen Strukturdaten vom IFNGR1/IFN- γ Cokristall und den Ergebnissen des Sequenzalignment mit ORF B8R ein Modell des B8R-Proteins. Vor dem Hintergrund einer im September 2000 von Thiel *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur (Thiel *et al.*, 2000) der extrazellulären Domäne des IFNGR1 im Komplex mit dem IFN- γ Dimer, wurde von Herrn Dr. Dengler eine Überarbeitung des erstellten Sequenzalignments vorgenommen. Die Proteinsequenzen für IFNGR1 und das ORF B8R-Protein stammen aus der SWISS-PROT Datenbank (Bairoch *et al.*, 2000). Der IFNGR1 wird unter INGR_HUMAN mit der Accession No. P15260 (Aguet *et al.*, 1988) aufgeführt. Die Koordinaten des IFNGR/IFN- γ -Komplexes stammen aus der Proteindatenbank (Berman *et al.*, 2000). Die Sequenz vom ORF B8R hat die Bezeichnung: VB_08VACCV und die Accession No. P24770 (Howard *et al.*, 1991, Smith *et al.*, 1991). Die Proteinsequenzen sind in der Datenbank SWISS-PROT unter folgender Annotation aufgeführt:

IFNGR1:	Signalsequenz	AS 1-17	B8R:	Signalsequenz	AS 1-13
	ECD	AS 18-245		Lösliches Protein	AS 14-272
	TMD	AS 246-266			
	ICD	AS 267-489			

Bei der Herstellung des Sequenzalignments wurde die Nummerierung des nativen Proteins verwendet (d. h.: Sequenz ohne Signalpeptid). Die Nummerierung ist somit identisch mit der im Anhang aufgeführten Annotation der Aminosäuresequenz von IFNGR1 und B8R. Die Bearbeitung des Alignments unterteilte sich in 2 Abschnitte: Zum einen das Erstellen des Alignments unter Beachtung des Koordinatensatzes der IFNGR1-Kristallstruktur, so wie sie von Thiel *et al.* in die Proteindatenbank gestellt wurde. Zum anderen findet eine Editierung und Überprüfung des Alignments mit verschiedenen Programmen zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen statt.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Klonierung und Präparation von Plasmiden wurden verschiedene Stämme von *E.coli* (*Escherichia coli*) K12 verwendet.

Genotyp der verwendeten *E.coli* Stämme:

JM105 : *thi, rpsL, endA1, sbcB15, hsdR4, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZΔM15]*

JM109 : *thi, recA1, gyrA96, hsdR17,(r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZΔM15]*

JM110 : *dam, thi, leu, dcm, hsdR17,(r_K⁻, m_K⁺), supE44, rpsL, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZΔM15]*

HB2151 : *Δ(lac-pro), ara, nal^r thi/F' (traD36, proAB, lacI^q, lacZΔM15)*

TOP10 : *F', ΔmcrA, (mrr-hsd RMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, ga/U, ga/K, rpsL, endA1, nupG*

TG1 : *Δ(lac-pro), supE, thi, hsd, Δ5/F' (traD36, proAB, lacI^q, lacZΔM15)*

DH5α : *Φ80lacZΔM15, endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,(r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*

Die Methoden zur Kultivierung und Transformation sind den *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1994) entnommen. Die Bakterienstämme wurden in autoklaviertem 2 x YT Medium bei 37° C im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterienklone wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Dauerkulturen wurden angelegt, indem eine dicht gewachsene Bakterienkultur 1:1 mit sterilem Glycerin gemischt und bei – 80° C eingefroren wurde.

2.3.2 Erzeugung kompetenter *E.coli* und Transformation

Eine über Nacht gewachsene Bakterienkultur wurde 1:100 mit 2 x YT-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,4 - 0,6$) bei 37° C kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (5.000 x g, 5 min, 4° C) und in 1/10 des ursprünglichen Volumens eiskaltem TSS resuspendiert und für mindestens eine Stunde unter mehrmaligem leichtem Schütteln auf Eis gelagert. Die Suspension wurde sofort aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert. Zur Transformation wurden 20 µl der kompetenten *E.coli* mit 0,01 µg Plasmid-DNA oder 5 µl - 20 µl Ligationsansatz (siehe Abschnitt 2.3.4) versetzt. Der Ansatz wurde 60 min auf Eis inkubiert, 90 s auf 42° C erwärmt und für 2 min auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde mit 1,0 ml 2 x YT-Medium verdünnt und für 60 min bei 37° C inkubiert. Es folgte ein sanfter Zentrifugationsschritt bei dem die Bakterien sedimentiert wurden und eine anschließende Resuspension in 100 µl 2 x YT-Medium. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Mit der beschriebenen Methode ließen sich Transformationseffizienzen von $10^6 - 10^7$ Klone pro 1 µg Plasmid-DNA erreichen. Für kritische Klonierungen, die höhere Effizienzen erforderten, wurden kommerziell erhältliche, kompetente XL-Blue von *Novagen*, oder Epicurian Coli® Gold Supercompetent Cells von *Stratagene* verwendet und nach Herstellerangaben transformiert.

2.3.3 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine geeignete Menge Selektivmedium mit 50 µl - 100 µl der gewünschten Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37° C kultiviert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus bis zu 2 ml Bakteriensuspension wurde der *QIAGEN* MiniPrep Plasmid Kit verwendet. Größere Mengen wurden mit dem *QIAGEN* MidiPrep Plasmid Kit (bis 200 ml Kulturvolumen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. Die Ermittlung der DNA Konzentration erfolgte durch die Bestimmung der UV Absorption im Wellenlängenbereich von 260 nm und 280 nm. Die Konzentration ließ sich durch Multiplikation des Absorptionswertes (A) bei 260 nm mit dem Faktor 50 (für DNA) berechnen.

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260 \text{ nm}} \times 50$$

Der Faktor 50 stammt von der empirischen Beobachtung, daß bei 260 nm eine DNA-Lösung mit einer optischen Dichte 1 eine Konzentration von 50 µg/ml hat. Die Reinheit der DNA errechnet sich anhand des E_{260}/E_{280} -Quotienten. Für reine DNA sollte der Wert zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

DNA Isolierung aus infiziertem Kulturüberstand

Das Kulturmedium, von mit *Vaccinia Virus* VR-119 infizierten und lysierten Verozellen, enthielt neben einer großen Menge von Proteinen auch virale DNA. Die Phenolextraktion (Sambrock *et al.*, 1989) wurde angewandt, um aus proteinhaltigen Kulturüberständen den Proteinanteil zu entfernen. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die wässrige DNA-Kulturlösung (500 µl) wurde nacheinander mit gleichen Volumina verschiedener organischer Lösungsmittel (Phenol/ Chloroform 1:1; Chloroform; Ether) ausgeschüttelt. Die Fällung der DNA erfolgte durch eine saure Ethanol-fällung. Dabei wird zu der DNA-Lösung das 2,5 fache Volumen einer ethanolischen Lösung bestehend aus 25 Teilen 100 % Ethanol und 1 Teil 3M Na-Acetatlösung gegeben, für 15 min bei RT stehengelassen und anschließend für 20 min zentrifugiert (Minifuge RF; 14.000 Upm). Das erhaltene Pellet wurde nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4° C gelagert.

2.3.4 Ligation

Die Verknüpfung zweier DNA-Moleküle, die am 3'-Ende eine Hydroxyl- und am 5' Ende eine Phosphatgruppe tragen, wie z. B. bei einer dsDNA-Ringschlußreaktion, wird u.a. durch die T4-DNA Ligase katalysiert. Die beiden zu verknüpfenden DNA-Moleküle sollten dabei in ungefähr äquimolaren Mengen vorliegen. Der Ansatz zum Einbau eines DNA-Fragmentes bis zu einer Größe von ca. 1.000 bp in einen Vektor besaß folgende Grundrezeptur:

1 µg	Vektor DNA
4 µg	DNA Insertfragment
2 µl	10 x T4-DNA Ligasepuffer (<i>NEB</i>)
1 µl	T4-DNA Ligase (<i>NEB</i>) (1µl ≈ 2.000 U)
12 µl	Aqua bidest

Im Vorfeld der Ligation wurden beide DNA Fragmente für 5 min bei 65° C inkubiert, um eine eventuelle lockere Anlagerung der jeweiligen Enden aufzuheben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 15° C inkubiert, durch 10 minütiges Erhitzen auf 65° C von Ligaseaktivität befreit und zur Transformation eingesetzt.

2.3.5 Präparative PCR und Klonierungstechniken

Die PCR (Polymerase-chain-reaction) stellt eine *in vitro* Methode zur exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Zielsequenz dar. Dies wird durch den wiederholten Ablauf von definierten Zyklen erreicht (DNA-Denaturierung - Primer-Annealing - Elongation). Die Entdeckung der PCR durch Kary B. Mullis (Mullis *et al.*, 1987) und die Umsetzung (Saiki *et al.*, 1988) gilt als revolutionärer Schritt innerhalb der noch jungen Disziplin der Molekularbiologie.

Sämtliche PCR-Amplifikationen wurden mit der *Pwo*-(*Pyrococcus woesei*) DNA-Polymerase von Roche und den DNA-Primern von TIB-MOLBIOL vorgenommen. Das Endvolumen einer präparativen PCR betrug im allgemeinen 100 µl.

Sämtliche Mutationsamplifikationen wurden nach einem in unserem Labor entwickelten MID-PCR Protokoll durchgeführt. Dieses MID-PCR Verfahren (**M**utation-**I**nsertion-**D**eletion) stellt eine verbesserte und zeitlich verkürzte Site Directed Mutagenesis PCR dar. Grundprinzip dieser MID-PCR ist die Amplifikation des gesamten Plasmides unter Einführung der Mutation, Deletion oder Insertion durch die Primer. Die eingesetzte DNA-Templatekonzentration ist in diesem Fall sehr groß. Damit will man eine durch die Amplifikation hervorgerufene ungewollte Mutationen möglichst gering halten. Die eingesetzten Primerpaare sind so gewählt, daß die linearisierten DNA-Amplifikate nach Modifizierung der Nukleinsäure mit ihrem 5'-Ende des einen Stranges exakt an das 5'-Ende des jeweiligen anderen Primers passen.

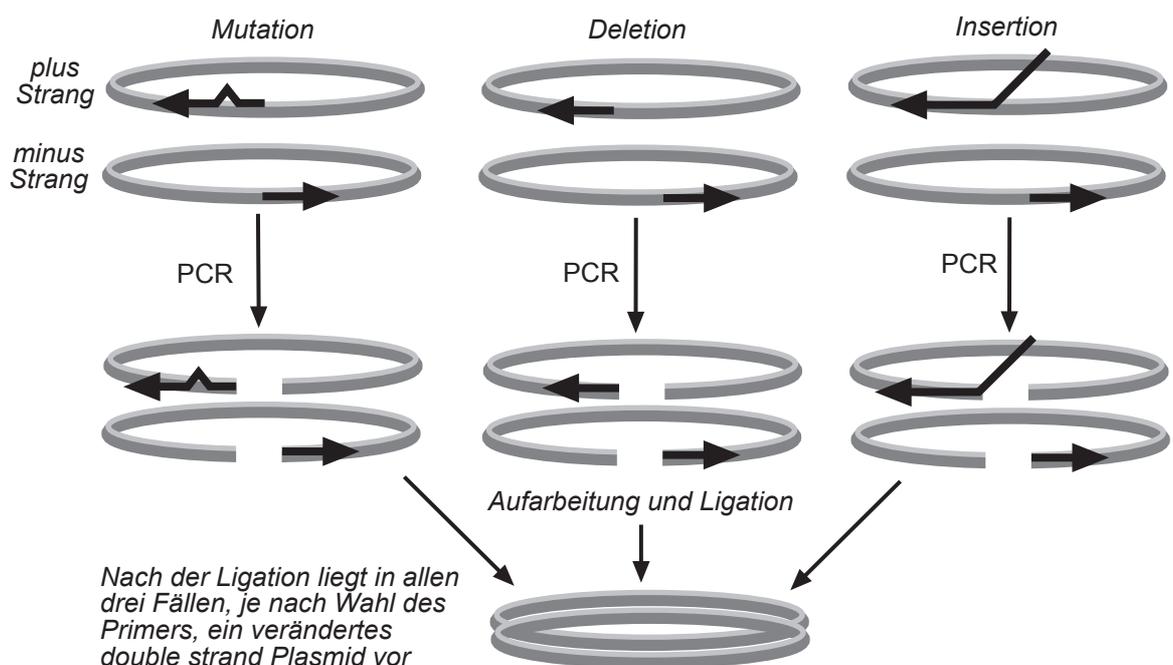


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der MID-PCR.

Zahl der Zyklen	Zeit in s	Temperatur ° C	Prozeß
1	240	95	initiale Denaturierung
11	45	95	Schmelzen
	60	45	Annealing
	600	68	Elongation
1	800	68	finale Elongation
1	∞	4	Lagerung

Tabelle 2.1: Temperaturprogramm für eine MID-PCR.

2.3.6 Konstruktion von Expressionsplasmiden

In der vorliegenden Arbeit wurde das *Vaccinia Virus* Protein im ORF B8R in prokaryontischen Zellen in Form von His-Tag- und Strep-TagII-Fusionsprotein (Schmidt *et al.*, 1996) exprimiert. Hierfür wurden das pKK233-3 Expressionsplasmid sowie der pTrcHis B Xpress Vektor (Invitrogen) verwendet. Das Strep-Tag II System stammt von der Firma *Institut für Bioanalytik (IBA)* und wurde in den pTrcHis B Vektor eingebracht. Zum Teil wurden an den angegebenen Vektoren zur Optimierung der Proteinexpression geringfügige Mutationen im Bereich des Fusionanteils durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3).

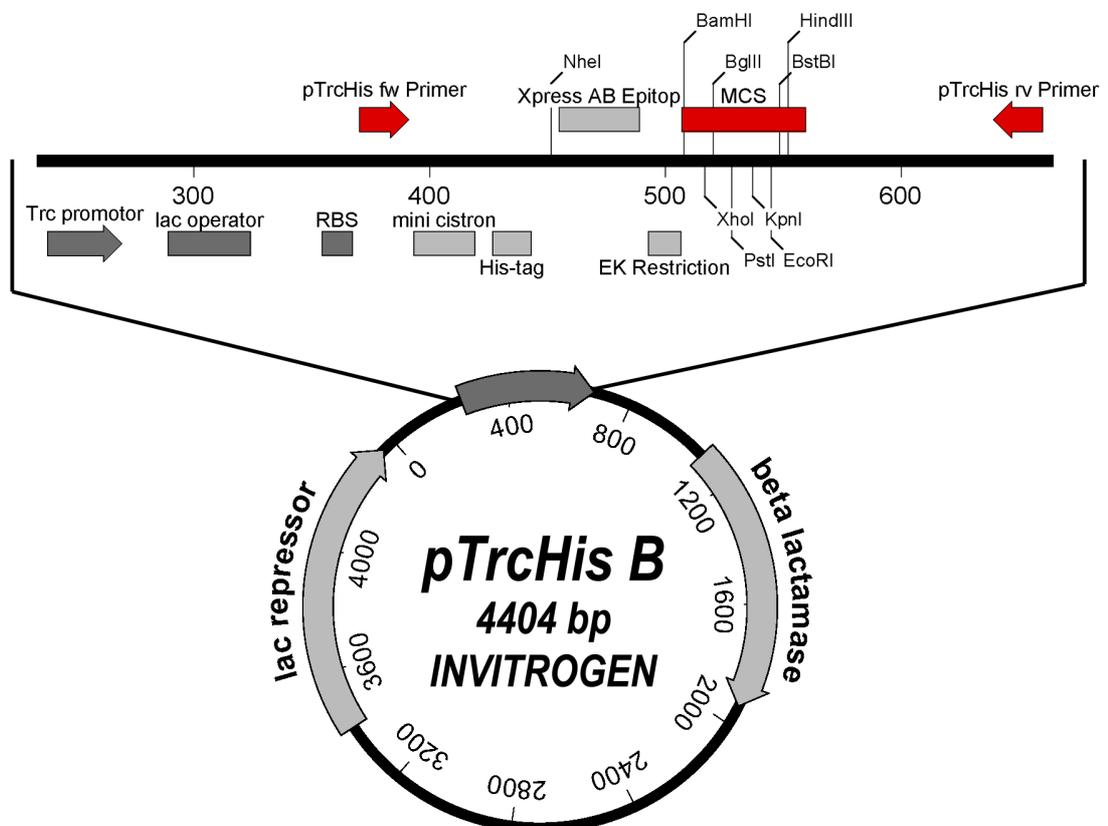


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pTrcHis B.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Visualisierung und Aufreinigung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung der Proben in einer Flachbett-Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurde 0,7 % bis 1,5 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer durch Erhitzen auf 80° C bis 90° C gelöst. Nach dem Gießen und Abkühlen des Gels wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10 x DNA-Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente dienten folgende Nukleinsäurestandards: Lambda DNA nach *BstE* II Verdau mit 14 Nukleinsäurefragmenten von 117 bp – 8.445 bp und ϕ X174 DNA nach *Hae* III Verdau mit 11 DNA-Fragmenten der Länge 72 bp – 1.153 bp. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer bei RT und einer konstanten Spannung von 100 V. Für alle analytischen und präparativen Gele wurden die Nukleinsäurebanden mit dem intercalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Dazu wurden die Gele für mindestens 15 min unter leichtem Schütteln in 0,1 % (w/v) Ethidiumbromid in TBE gefärbt.

2.3.8 Sequenzierung

Die Identität und Integrität der klonierten Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung des Inserts verifiziert. Dafür wurde das Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit (ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, *Applied Biosystems*) verwendet, das nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) die DNA-Fragmente in einer Sequenzier-PCR erzeugt.

In einer Polymerasekettenreaktion mit einem Gen- oder Vektorprimer werden bei der Amplifikation des Gens Fluorophor-gekoppelte Didesoxy-Nukleosidtriphosphate (ddNTP) statistisch mit eingefügt, die zum Kettenabbruch und zur gleichzeitigen Markierung der synthetisierten PCR-Fragmente führen. Da die vier verschiedenen ddNTP mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, reicht ein Reaktionsansatz zur Sequenzierung aller vier Basen aus.

Sequenzieransatz:

2 μ l	Ready Reaction Premix
0,25 μ g	Plasmid-DNA
5 pmol	Primer
ad 20 μ l	Aqua bidest

Die Sequenzierreaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

Zahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Prozeß
25	10 s	+2° C/s	Temperaturrampe
		96° C	Denaturierung
	50 s	-2° C/s	Temperaturrampe
		50° C	Annealing
	240 s	+2° C/s	Temperaturrampe
		60° C	Elongation
1	∞	-2° C/s	Temperaturrampe
		4° C	Lagerung

Tabelle 2.2: Temperaturprogramm für das Sequenzierprotokoll Cycle IPF.

Anschließend wurde die DNA durch Ethanol-fällung aufgereinigt, in Sequenzierpuffer (Template Suppression Reagent) aufgenommen und denaturiert (2 min, 95° C, abschrecken auf Eis).

Die Analyse der entstandenen fluoreszierenden DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillar-Gelelektrophorese im ABI Prism 310 Genetic Analyzer und anschließender Auswertung des Elektropherogramms mit Hilfe der Software (ABI Prism Sequencing 2.1.1, *Perkin Elmer*).

2.4 Prokaryontische Proteinexpression

2.4.1 Fermentation

Die Expression von rekombinantem B8R erfolgte, wenn Zellmengen größer als 3 g benötigt wurden, im thermostatisierbaren Schüttelinkubator (350 Upm) bei 37° C. Jeweils 500 ml 2 x YT Medium (100 µg Ampicillin/ml) wurden in 2 l Kolben gegeben und 1:50 mit einer Übernachtskultur angeimpft. Das B8R Gen stand im Expressionsplasmid unter der Kontrolle des *trc*-Promotors. Auf dem Plasmid befand sich zusätzlich noch das Gen *lacI^q*, das für das *lac*-Repressor Protein codiert. Bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0,5 - 0,6 wurde durch Zugabe des Lactoseanalogons IPTG in einer finalen Konzentration von 1 mM die Produktion des Proteins durch Derepression induziert. Die Fermentation wurde nach ca. 4 Stunden oder Erreichen einer konstanten OD_{600nm} beendet. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (JA14; 6.000 Upm) geerntet. Bis zur Aufarbeitung wurden die vereinigten Bakterienpellets bei -20° C gelagert.

2.4.2 Aufschluß der *E.coli* durch Ultraschallbehandlung

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in prokaryontischen Systemen kann das erzeugte Protein entweder "löslich" oder aber auf Grund der hohen Proteinexpressionsraten in Form von unlöslichen, nicht kristallinen Aggregaten (Inclusion bodies) im Cytoplasma vorliegen. Zur Gewinnung von löslich exprimierten Proteinen wurde das Bakterienpellet einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min in 40 ml Lysepuffer (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Lysozym) bei 37° C unter leichtem Schwenken inkubiert. Es schloß sich eine Ultraschallbehandlung (6 x 30 s) auf Eis an.

Sollte Protein, das sich in Einschlußkörperchen (Inclusion bodies) befand gewonnen werden, so wurde das gewaschene Pellet in einem chaotropen Reagenz, wie z. B. 6 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumhydrochlorid pH 7,5 in NaPP, aufgenommen und der Ultraschallbehandlung (6 x 30 s) auf Eis unterzogen. Die Suspension wurde im Anschluß in 30 ml Corexröhrchen überführt. Die festen Bestandteile wurden in einem 20-minütigen Zentrifugationsschritt im Rotor JS13.1 bei 10.000 Upm pelletiert. Der Überstand wurde für den darauffolgenden Chromatographieschritt dekantiert und bei 4° C gelagert; die festen Bestandteile wurden verworfen.

2.4.3 Renaturierungsuntersuchungen

Der Einsatz von chaotropen Reagenzien gilt als obligates Mittel für den Aufschluß von Inclusion bodies. Die Nachteile dieser Methode zur Gewinnung von Proteinen liegen im darauffolgenden Renaturierungsschritt. Durch das chaotrope Reagenz wurden sämtliche Proteine in ihrer räumlichen Struktur denaturiert. Die Wiederherstellung der nativen Proteinstruktur gilt als zwingende Voraussetzung für ein biologisch aktives Protein.

Die Renaturierung des durch 6 M GdnHCl gelösten Proteins nach dem ersten Chromatographieschritt mit der ProBond™ Resin Säule wurde durch zwei erschöpfende Renaturierungsdialysen vorgenommen. Dazu wurde das Eluat in Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgröße von 15 kDa gegeben und in zwei Schritten für je 24 Stunden bei 4° C gegen zwei Renaturierungslösungen dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wurde das ausgefallene Protein durch Zentrifugation entfernt (JA25.5; 10.000 Upm). Der klare Überstand wurde dekantiert und es schloß sich der zweite Chromatographieschritt an.

Eine weitere Möglichkeit zur Renaturierung des in 6 M GdnHCl gelösten Proteins boten zwei Verdünnungsschritte mit den Renaturierungslösungen. Unter leichtem Rühren wurde die klare Lösung aus Abschnitt 2.4.2 mit 3fachem Volumen eiskalter Renaturierungslösung II versetzt.

Die Zugabe der Pufferlösung wurde mit nicht mehr als 5 ml/min durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung weitere 30 min auf Eis leicht geschüttelt. Protein, das in dieser ersten Renaturierungsphase ausgefallen war, wurde durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. In einem zweiten Renaturierungsschritt wurde die Lösung nochmals um den Faktor 15 mit NaPP verdünnt. Die Endkonzentration an GdnHCl in der verbleibenden Lösung betrug 100 mM. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand direkt in den ersten Chromatographieschritt eingesetzt.

Renaturierungslösung I

0,1 M	Tris	pH 9,0
10 %	Glycerin	
100 U/ml	Aprotinin	
5 mg/l	PMSF	

Renaturierungslösung II

20 mM	NaPP	pH 7,5
100 U/ml	Aprotinin	
5 mg/l	PMSF	

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Eine quantitative Messung der Proteinkonzentration in Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) gemacht. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine in Lösung. Als Standard dienten Verdünnungen von BSA in PBS. Die Auswertung erfolgte am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Proteinkonzentrationen im Bereich von 1 µg - 20 µg Protein/ml weisen eine direkte Proportionalität zwischen Konzentration und Extinktion auf. Der Mikroassay (1 ml Volumen) wurde als Fertiglösung von *BioRad* bezogen.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteingemischen erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proben wurden zunächst durch Erhitzen in Laemmli-Puffer (5 min, 95° C) denaturiert und anschließend in einem Polyacrylamidgel (7,5 % - 15 %) getrennt. Zur Größenbestimmung wurden Molekulargewichtsmarker verwendet.

In einer horizontalen Elektrophoresekammer wurde zunächst das Trenngel gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde ein 5 %iges Sammelgel überschichtet, in dem die Probestaschen enthalten waren. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer bei Stromstärken von 15 mA im Sammelgel und 25 mA im Trenngel.

Anschließend wurden die Gele entweder zur Westernblotanalyse verwendet oder angefärbt. Dazu wurden die Gele für mindestens 60 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt (1-2 Stunden). Sollte das Gel einer Silberfärbung unterzogen werden, so schloß sich an dieser Stelle das entsprechende Protokoll an.

2.5.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung zeichnet sich durch eine hohe Proteinsensitivität aus und ist daher geeignet für den Nachweis von geringen Proteinkonzentrationen im Bereich von 50 ng. Aus Gründen der Übersicht werden die einzelnen Arbeitsschritte tabellarisch mit Angabe von Konzentration und Behandlungsdauer aufgelistet.

Schritt	Vorgang	Lösungen und Chemikalien	Zeit
1.	Fixieren	Fixierlösung (50 % Methanol;12 % Eisessig)	1 Std. oder über Nacht
2.	Waschen	50 % Ethanol	3 x 20 min
3.	Vorbehandlung	Na ₂ S ₂ O ₃ (0,4 g/l)(0,2 g ad 500 ml)	1 min
4.	Waschen	Wasser	3 x 20 s
5.	Imprägnieren	1 ml 25 % Silbernitratlösung Formaldehyd (37 %) 0,75 ml/l (0,25 g AgNO ₃ ad 100 ml + 75 µl Formaldehyd)	mind. 20 min
6.	Waschen	Wasser	3 x 20 s
7.	Entwickeln	Na ₂ CO ₃ (60 g/l)(6 g ad 100 ml) Formaldehyd (37 %) 0,5 ml/l Na ₂ S ₂ O ₃ 2 ml von obiger Lsg.	1 bis 10 min
8.	Waschen	Wasser	2 x 20 s
9.	Stoppen	Stoplösung (50 % Methanol;12 % Eisessig)	mind. 10 min
10.	Waschen	50 % Methanol	30 min
11.	Waschen	30 % Methanol	1 Std. oder über Nacht

Tabelle 2.3: Protokoll zur Silbergefärbung.

Die silbergefärbten Gele wurden nach dem letzten Waschschrift für 60 min in einer 20 %igen Glycerinlösung inkubiert und anschließend im Gelrockner auf einem Whatmanfilterpapier getrocknet. In diesem Zustand war das Gel unbegrenzt haltbar und konnte zu Dokumentationszwecken photographiert oder gescannt werden.

2.5.4 Chromatographische Methoden

Zur Reindarstellung des B8R-Fusionsproteins wurden unten aufgeführte chromatographische Säulenmaterialien verwendet. Die Aufreinigung über die POROS Materialien erfolgte an der BioCAD™ Anlage von *PerSeptive Biosystem* bei einem Druck von 20-50 bar. Wurde eine Säulenmatrix verwendet, die nur bei einem kontinuierlichen Druck von 2-3 bar bedient werden konnte, so wurden die Proteine mit dem Econo-Chromatographiesystem von *BioRad* aufgereinigt.

Verwendete chromatographische Säulenmaterialien

ProBond™ Resin	<i>Invitrogen</i>
Ni-NTA Superflow	<i>Qiagen</i>
POROS Perfusion Chromatography	<i>PerSeptive Biosystems</i>
StrepTactin Affinitätsmatrix	<i>Institut für Bioanalytik IBA</i>
Bio-Select Columns™ SEC-125 Column	<i>Biorad</i>

2.5.5 Western Blot (Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran)

Als Western Blot wird der Transfer von im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran und die anschließende immunchemische Detektion bezeichnet. Auf der Nitrocellulosemembran (*Schleicher & Schüll*) sind die Proteine gut für die verschiedenen analytischen Methoden zugänglich. Zwei Verfahren haben sich zum Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Trägermaterial durchgesetzt: Tank Blotting und das hier durchgeführte Semi Dry Blotting. Dabei wird Whatman-Filterpapier, das Gel und die Membran in Transferpuffer äquilibriert und anschließend als "Sandwich" in die Blotapparatur gestapelt.

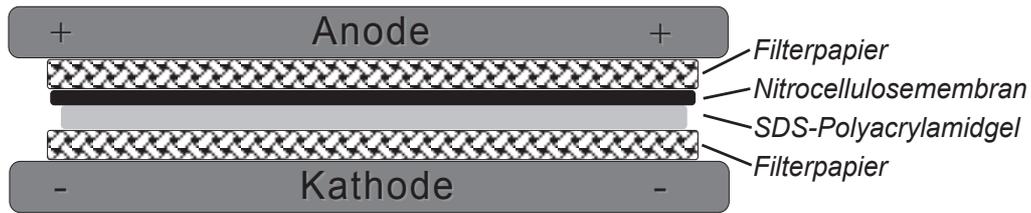


Abbildung 2.3: Aufbau des Semi Dry Blotsandwich.

Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/cm^2 bei RT für 30 min. Alle Arbeitsschritte des immunchemischen Nachweisverfahrens wurden bei RT durchgeführt. Zuerst wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch 5 % (w/v) Milchpulver oder 2 % BSA in TBST für 60 min abgesättigt. Der Blot wurde dreimal mit TBST gewaschen. Der Primäantikörper (verwendete Antikörper siehe Tabelle 2.4) wurde in TBST verdünnt (1:500 bis 1:5.000) und der Blot unter Schwenken für 60 min mit dem Antikörper inkubiert. Danach wurde dreimal für 5 min mit 20 ml TBST gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit einem alkalische Phosphatase konjugiertem sekundären Antikörper für 60 min unter Schütteln inkubiert. Es schloss sich eine dreimalige Waschung des Blots mit 20 ml TBST an. Zur pH-Äquilibrierung des Blots wurde dieser einmal mit 20 ml AP-Puffer gewaschen. Die Färbereaktion wurde mit NBT/BCIP-Färbelösung (*Roche*) in AP-Puffer durchgeführt. Durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wurde die Färbereaktion beendet. Die Blots wurden zur Dokumentation fotografiert und danach getrocknet.

Primäre Antikörper:		
Anti-Xpress™ -Antibody Erkennungssequenz: Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys	Mouse IgG1	<i>Invitrogen</i>
QIAexpress RGS His Antibody Erkennungssequenz: Arg-Gly-Ser-His-His-His-His	Mouse IgG1	<i>Qiagen</i>
QIAexpress Penta His Antibody Erkennungssequenz: His-His-His-His-His	Mouse IgG1	<i>Qiagen</i>
QIAexpress Tetra His Antibody Erkennungssequenz: His-His-His-His	Mouse IgG1	<i>Qiagen</i>
Sekundäre Antikörper:		
Anti Mouse IgG (H+L) alkalische Phosphatase konjugiert	Goat IgG	<i>Promega</i>

Tabelle 2.4: Im Westernblot verwendete Antikörper mit Angabe von Hersteller und AK-Typ.

2.5.6 IFN- γ neutralisierender Assay

Bei dem IFN- γ neutralisierenden Assay handelt es sich um ein *in vivo*-Testsystem zur Identifizierung von IFN- γ inhibierenden Proteinen. Der Assay basiert technisch auf dem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten antiviralen Assay.

Interferone haben antivirale Eigenschaften. Sie schützen Zellen vor dem Eindringen der Viren und deren cytopathischem Effekt. Der antivirale Assay stellt ein Modellsystem dar, in dem die spezifische biologische Aktivität von Interferonen untersucht werden kann. Nach Richtlinien der WHO (World Health Organization) ist eine Konzentration von 1 U/ml IFN- γ vorhanden, wenn innerhalb der Kultur 50 % aller Zellen nach Inkubation mit einem viralen Pathogen überleben. Nach dieser Definition konnte der in unserem Labor hergestellten rhuIFN- γ Probe eine spezifische Aktivität von 2×10^7 U/mg zugeordnet werden.

Der Viroceptor B8R besitzt die Potenz mit hoher Affinität an IFN- γ zu binden. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität verschiedener B8R-Proben wurde im Rahmen dieser Dissertation der IFN- γ neutralisierende Assay entwickelt. In ihm wird die neutralisierende Wirkung von B8R auf IFN- γ untersucht. Dazu wurden humane epitheliale Lungenkarzinomzellen A549 (ATCC: CCL-185) auf einen Titer von 3×10^5 Zellen/ml RPMI + 10 % (v/v) FCS eingestellt und je 100 μ l dieser Lösung wurden pro Well in eine 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach ca. 24-stündiger Inkubation bei 37° C und 6,5 % CO₂ Atmosphäre hatte sich ein geschlossener Monolayer gebildet.

Die auf ihre biologische Aktivität hin zu untersuchenden B8R Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rhuIFN- γ (0,01 - 10.000 U/ml) in gleichen Volumenverhältnissen für 1h inkubiert (Inkubationsplatte) und anschließend auf die Mikrotiterplatte mit dem A549 Monolayer (Proliferationsplatte) übertragen. Auf der Proliferationsplatte soll freies, nicht an B8R gebundenes rhuIFN- γ seine antivirale Wirkung auf die A549 Zellen ausüben. Nach 60 min Inkubation bei 37° C wurde die Platte abgeschlagen und die Viruslösung (*Encephalomyocarditis-Virus; EMC*) hinzugegeben. Der Virustiter war empirisch bestimmt, daß nach einer 18-bis 22-stündigen Inkubation die nicht mit IFN- γ geschützten Zellen vollständig lysiert waren. Zur Kontrolle wurden auf jeder Mikrotiterplatte eine Zell-Vitalkontrolle, eine Viruskontrolle und eine IFN- γ Standardkontrolle mit angelegt. Die Auswertung der Platte erfolgte nach Färbung der nicht lysierten Zellen mit Kristallviolett 0,1 % (w/v). Von jedem Meßwert wurden mindestens drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

2.6 Bindungsnachweis durch radioaktives IFN- γ

2.6.1 Radioaktives markieren von IFN- γ

Durch die radioaktive Markierung von IFN- γ mit ^{32}P wurde das Bindungsvermögen von B8R an IFN- γ von verschiedenen Spezies untersucht. Das Protokoll (Mariano *et al.*, 1995) zur Markierung von IFN- γ wurde bei unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Pestka in den USA entwickelt und zeichnet sich durch sehr hohe Markierungsausbeuten aus. Dabei macht man sich eine am IFN- γ Protein vorhandene Sequenz zu nutze, an welche die cAMP abhängige Protein Kinase C eine Phosphorylierung ausführen kann. Die Phosphorylierung hat keinen Einfluß auf die biologische Aktivität der verschiedenen Interferone. In allen Fällen wird jeweils die Aminosäure Serin phosphoryliert. Bei muIFN- γ und rat IFN- γ existiert nur ein Serinrest, der phosphoryliert werden kann, wohingegen es bei huIFN- γ zwei Phosphorylierungsstellen gibt.

Es wurden zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von verschiedenen B8R Proben rhuIFN- γ , rrat IFN- γ , sowie rmuIFN- γ radioaktiv markiert. Das rhuIFN- γ stammt aus Präparationen aus unserer Abteilung, das rrat IFN- γ wurde von der Firma *PeptoTechLTD* bezogen und das rmuIFN- γ wurde von *R&D Systems* bezogen.

Jeweils 1 μg Protein wurde bei 30° C für 60 min mit 0,25 mCi [γ - ^{32}P]ATP und 30 Units von der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Protein Kinase gemischt. Das Reaktionsvolumen von 60 μl enthielt zusätzlich noch 20 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl_2 sowie 1 mM DTT. Im Anschluß an die 60 minütige Labelingphase wurde die Lösung mit 500 μl kalter BSA Lösung (5 mg/ml), die in 10 mM Na-Pyrophosphatlösung pH 6,7 gelöst war, versetzt. Na-Pyrophosphat wird zur Inhibierung einer möglichen Dephosphorylierung verwendet. Der gesamte Ansatz wird anschließend in Dialyseschläuche gegeben und bei 4° C erschöpfend gegen 10 mM Na-Pyrophosphatpuffer pH 6,7 dialysiert. Nach dem letzten Dialyseschritt wurden der Ansätze in kleine Aliquote gesplittet und zur weiteren Verarbeitung bei -20 ° C gelagert.

2.6.2 Crosslinking Experimente und Gel-Shift Assay

Unterschiedliche B8R Proben wurden mit den verschiedenen radioaktiv markierten Interferonen der drei Spezies (human, murin, rat) für mindestens 60 min bei 37° C inkubiert. Alle 15 min wurden die Ansätze sanft geschüttelt. Die kovalente Crosslinking Reaktion wurde durch Zugabe von Disuccinimidyl suberate (DSS) (*Pierce*), das in DMSO gelöst vorlag, in einer finalen

Konzentration von 0,5 mM initiiert. Die Proben wurden für 20 min auf Eis gelagert, anschließend wurde durch Zugabe von Tris-HCl in einer finalen Konzentration von 20 mM die Crosslinking Reaktion gestoppt.

Die Analyse erfolgte mittels des SDS-PAGE Gel-Shift Assays und anschließender Auswertung des Gels durch autoradiographische Färbung. Dazu wurde das Gel je nach Intensität der Strahlung für 1 bis 24 Stunden bei -70° C in Filmkassetten auf *Kodak* BIOMAX Filmen gelegt und anschließend entwickelt. Zur Quantifizierung der ^{32}P -Radioaktivität der Gele, diente ein γ -Zählgerät des Modells Instant Imager der Firma *Packard*.

2.7 Durchflußzytometrische Messung

Die Messung von MHC-Klasse-I Oberflächenprotein auf den CHO 16/9 und den CHO Q21 Zellen nach Induktion durch IFN- γ wurde nach dem Protokoll vom Muthukumar *et al.* (Muthukumar *et al.*, 1996) durchgeführt. Die CHO Zellen mit den chimären B8R/IFNGR Rezeptoren wurden für drei Tage mit 1.000 U/ml IFN γ inkubiert und anschließend durch eine EDTA-haltige Lösung aus der Flasche geerntet. Die MHC-Klasse-I Oberflächenproteine wurden durch einen monoklonalen mouse anti-huMHC-Klasse-I Antikörper detektiert. Als sekundärer Antikörper diente ein FITC konjugiertes Ziege anti-mouse IgG (*Sigma*). Anschließend wurden die markierten Zellen im FACS (Coulter Epics Profile) mit einem 15 mW Argon Laser bei 488 nm vermessen. Jeweils 10.000 Zellen einer Probe wurden analysiert und mit der Software "Cytologic" ausgewertet.

2.8 Amplifikation des ORF B8R von *Vaccinia Virus* aus Vero-Zellkulturüberstand

Die Isolierung und Klonierung des ORF B8R aus *Vaccinia Virus*, Stamm: Western Reserve (WR); VR-119 (Ausgangskultur bezogen von ATCC, Manassas, USA) wurde mit Primern durchgeführt, welche aus der veröffentlichten Nukleinsäuresequenz (Goebel *et al.*, 1990) und der Sequenz aus der ExPASy Molecular Biology Datenbank (Accession No. P24770) abgeleitet wurden. Die virale DNA wurde wie unter 2.3.4 beschrieben gewonnen. Zur Reindarstellung des ORF B8R wurden zwei Primer generiert, die eine exakte Amplifikation des Gens ermöglichten. Die Primer wurden so gewählt, daß jeweils Start bzw. Stopcodon des Gens den Amplifikationsbereich eingrenzen.

B8R Primer forward:

Start
5' ATG AGA TAT ATT ATA ATT CTC GC 3'

B8R Primer revers:

Stop
5' TTA TGA ATA TTT AGT CAA GTT AAG C 3'

Erstamplifikation des ORF B8R wurden mit folgender Rezeptur durchgeführt. Dabei wurde die $MgSO_4$ Konzentration in verschiedenen Ansätzen variabel gestaltet.

0,5 µl	phenolgefällte virale DNA
100 pmol	B8R Primer forward
100 pmol	B8R Primer reverse
2 mM - 8 mM	$MgSO_4$
250 µM	Nucleotid-Mix
2 µl	<i>Pwo</i> Puffer
ad 20 µl	Aqua bidest

Für die darauffolgende präparative Amplifikation des Gens und zur weiteren Klonierung in zwei verschiedene Expressionsplasmide wurde jeweils 1 µl der DNA verwendet, welche in der Erstamplifikation gewonnen wurde. Desweiteren wurden Primer verwendet, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle 5' bzw. 3' Terminal vom B8R-Gen einfügen.

Primer: B8R *BamH I* fw

BamH I
5'Ph - AAA TAA CAA **AGG ATC CCA** TGA GAT ATA TTA TAA TTC T 3'

Primer: B8R *Hind III* rev

Hind III
5'Ph - ATT AAT AAA **AAG CTT** TTA TGA ATA TTT AGT CAA GTT A 3'

1 μ l	Erstamplifikationsprodukt
100 pmol	B8R <i>Bam</i> H I fw
100 pmol	B8R <i>Hind</i> III rv
4 mM	MgSO ₄
250 μ M	Nucleotide
10 μ l	PCR Puffer
ad 100 μ l	Aqua bidest

Das Protokoll zur Amplifizierung von kurzen DNA Fragmenten (bis ca. 1.000 bp) wurde von Carmen Villmann im Jahre 1994 im Rahmen ihrer Diplomarbeit entwickelt (Villmann, 1994).

Zahl der Zyklen	Zeit in s	Temperatur ° C	Prozeß
5	90	95	Denaturierung
	30	20	Annealing
	300	72	Elongation
25	90	95	Schmelzen
	120	50	Annealing
	300	72	Elongation
1	90	95	Schmelzen
	120	50	Annealing
	600	72	finale Elongation
1	∞	4	Lagerung

Tabelle 2.5: Temperaturprogramm für die Amplifikation von ORF B8R.

Das ORF B8R von *Vaccinia Virus* wurde in die Expressionsplasmide pKK233-2 von *Pharmacia* und pTrcHis B von *Invitrogen* kloniert.

Dazu wurden das amplifizierte Gen wie auch der Vektor in einem Doppelrestriktionsverdau für die anschließende Ligierung vorbereitet.

2.9 Konstruktion der chimären Rezeptoren

2.9.1 Klonierungsstrategie

Zur Herstellung der chimären Rezeptorkonstrukte wurde mir von unserem Kooperationspartner Dr. S. Kotenko aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Pestka aus Piscataway, New Jersey, USA, die cDNA der beiden IFN- γ Rezeptorketten *IFNGR1* und *IFNGR2*

großzügigerweise zur Verfügung gestellt. Die cDNA-Fragmente wurden über PCR modifiziert und in die entsprechenden Expressionsplasmide für eine spätere Transfektion in CHO Zellen kloniert.

Folgende Plasmide wurden zur Herstellung der chimären Rezeptoren verwendet:

Ausgangsplasmide

pcDNA IFNGR1	Eukaryontischer Klonierungsvektor von <i>Invitrogen</i> mit der cDNA für <i>huIFNGR1</i> .
pcDEF3 TF/IFNGR1	Eukaryontischer Klonierungs- und Expressionsvektor mit Tissue Faktor (TF), Transmembraner Domäne (TMD) mit WLA-Motiv und Intrazelluläre Domäne (ICD) vom <i>IFNGR1</i> .
pcDEF3 IFNGR2	Eukaryontischer Klonierungs- und Expressionsvektor mit der cDNA für <i>IFNGR2</i> . Mutation in TMD durch Einfügung von WLA Motiv.
pTrcHisB B8R	Prokaryontischer Expressionsvektor für His Tag Fusionsproteine von <i>Invitrogen</i> mit der cDNA für <i>ORF B8R</i> von <i>Vaccinia Virus VR-119</i> (Western Reserve).

Zwischenprodukt

pcDEF3 IFNGR1	Eukaryontischer Klonierungsvektor aus Vektor pcDEF3 TF/IFNGR1 und Insert pcDNA3 IFNGR1 über die Restriktionsstellen <i>BamH I</i> und <i>Xba I</i> kloniert.
pcDEF3 B8R/IFNGR1	Eukaryontischer Expressionsvektor kloniert aus pcDEF3 IFNGR1 und dem B8R PCR-Amplifikationsprodukt, das in die <i>BamH I</i> Schnittstelle inkloniert wurde.
pcDEF3 B8R/TF/GR1	Eukaryontischer Expressionsvektor kloniert aus pcDEF3 TF/GR1 und dem B8R PCR-Amplifikationsprodukt, das in die <i>BamH I</i> Schnittstelle inkloniert wurde.

Zielpasmide

pcDEF B8R*/IFNGR1	Eukaryontischer Expressionsvektor, der aus dem Vektor pcDEF3 B8R/IFNGR1 durch PCR Amplifikation hervorgegangen ist.
pcDEF3 B8R/GR1	Eukaryontischer Expressionsvektor, der aus dem Vektor pcDEF3 B8R/TF/GR1 durch PCR Amplifikation nach der MID-PCR Methode entwickelt wurde.
pcDEF3 B8R/IFNGR2	Eukaryontischer Expressionsvektor, der aus dem Vektor pcDEF3 IFNGR2 und dem Insert von pcDEF3 B8R/GR1, das über die Restriktionsstellen <i>KpnI</i> und <i>NheI</i> inkloniert wurde.

Die Konstruktion und die Wege der Bearbeitung sind in Abschnitt 3.6 dokumentiert.

2.10 Zellkultur

2.10.1 Verwendete eukaryontische Zelllinien

A549 (ATCC: CCL-185)

Humane epitheliale Lungencarcinomazelllinie (*Homo sapiens, Caucasian*).

L929 (ATCC: CCL-1)

Murine Fibroblastenzelllinie (*Mus Musculus*).

Vero (ATCC: CCL-81)

Epitheliale Nierenzelllinie aus der Afrikanischer Grüner Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*).

Vaccinia Virus WR (ATCC: VR-119 Western Reserve) (Taxonomy: Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; *Poxvirida; Orthopoxvirus*).

CHO-DUKX-B11 (dhfr)-Zellen (DSMZ; Nr. DSM ACC126)

Ovarialzelllinie aus chinesischem Hamster.

CHO-B7 entstammt der CHO Linie CHO-K1(ATCC: CCL-61), in die das Gen für das humane HLA-B7 transfiziert wurde.

CHO 16-9 ist eine somatische Hybridzelllinie, hervorgegangen aus der CHO Linie CHO-K1 (ATCC: CCL-61), in die der lange Arm vom humanen Chromosom 6 (enthält das IFNGR1 Gen) transloziert und das Gen HLA-B7 transfiziert wurde (Soh *et al.*, 1993).

CHO Q21 ist eine somatische Hybridzelllinie, hervorgegangen aus der CHO Linie CHO-K1 (ATCC: CCL-61), in die eine 1-3 Mb große Region vom Chromosom 21 (enthält das IFNGR2 Gen) transloziert und das Gen HLA-B7 transfiziert wurde (Cook J. R. *et al.*, 1994, Langer J. A. *et al.*, 1990, Soh *et al.*, 1993).

Alle in der Zellkultur verwendeten Medien wurden von *Life Technologies* bezogen.

2.10.2 Kultivierung von A549; L929, Vero und CHO-Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37° C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Zur Zellzählung wurde eine Probe der Zellsuspension im Verhältnis 1+1 mit Trypanblaulösung (8,8 % in PBS) gemischt und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer im Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau dringt durch die Zellmembran und wird von lebenden Zellen aktiv ausgeschieden, während geschädigte oder tote Zellen sich blau färben.

A549; L929 und Vero-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS (fötale Kälberserum), 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (*Life Technologies*) vom Flaschenboden abgelöst, gezählt, abzentrifugiert (1.000 UpM, 5 min, RT) und mit frischem Medium auf 5×10^4 – 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

CHO-DUKX-B11 Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin kultiviert. Alle vier bis fünf Tage wurde das Medium dekantiert, einmal mit sterilem PBS gewaschen und mit 4 ml Trypsin-EDTA (*Life Technologies*) bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen ablösten (3 - 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und je nach gewünschter Dichte auf neue Kulturflaschen mit je 15 ml Medium verteilt.

2.10.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in FCS mit 10 % DMSO eingefroren. Dazu wurden die Zellen in FCS auf 10^7 Zellen/ml eingestellt und auf 4° C gekühlt. Anschließend wurde die Zellsuspension 1+1 mit eiskaltem DMSO (20 % in FCS) gemischt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einem mit Isopropanol gefüllten und auf 4° C vorgekühlten Einfrierbehälter über Nacht bei -80° C eingefroren und anschließend bei -80° C in der Gefriertruhe oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen der Truhe entnommen, bei Handwärme aufgetaut und sofort mit 10 ml Medium gewaschen. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, im Brutschrank kultiviert und am folgenden Tag nochmals passagiert.

2.10.4 Infektion von VEROS, L929 und A549 mit *Vaccinia Virus VR119*

Zur Vermehrung von *Vaccinia Virus VR-119* wurden die drei Zelllinien L929; A549 und Vero verwendet. In allen drei Fällen wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 70 cm² in RPMI mit FCS bis zur Ausbildung eines 80 % - 90 % Monolayers kultiviert. Zur Vermehrung wurden die Zellen mit ca. 10 PFU/Zelle infiziert und bis zur vollständigen Lyse (24 bis 30 Stunden) in Kultur gehalten. Bei nachfolgenden Infektionsrunden wurde das lysierte und ultraschallbehandelte Zelltrümmerngemisch eingesetzt.

Bestimmungen zur PFU-Konzentration wurden ausschließlich mit L929 Zellen vorgenommen. Die Virulenz für diese murinen Zellen war identisch mit denen für humane Zellen. Die Auswertung gestaltete sich jedoch durch scharfe Abgrenzung zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen bei den L929 Zellen deutlich einfacher.

2.10.5 Transfektion und Selektion von eukaryontischen Zellen

Bei der Transfektion verwendete Selektions- und Expressionsplasmide:

- pCI Ausgangsexpressionsplasmid mit einem Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV Promotor), einem IRES-Element (internal ribosome entry site) aus dem Poliovirus und einem SV40-Polyadenylierungssignal. Mit freundlicher Unterstützung von Herrn Hauser, GBF, Braunschweig, zur Verfügung gestellt.
- pAG60neo Konstitutives Expressionsplasmid für das Neomycin-Resistenzprotein. Steht unter Kontrolle des HSV-Thymidinkinase Promotors. Von Herrn Hauser, GBF, Braunschweig, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- pSV2-dhfr Konstitutives Expressionsplasmid codiert unter anderem für die Dihydrofolatreduktase. Steht unter der Kontrolle des SV40 Promotors. (ATCC)
- pCI B8R Eukaryontisches Expressionsplasmid mit ORF B8R.
- pCI B8R/GFP Eukaryontisches, bicistronales Expressionsplasmid codiert für ORF B8R und dem GFP Gen aus *aequorea victoria*.

Für die Transfektion in eukaryontische Zellen kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Sowohl die Transformationsmethode mit Super Fect Transfection Regent von *Qiagen*, als auch die Calciumphosphat-Methode (Sussman *et al.*, 1984) beruhen auf dem gleichen Grundprinzip: Negativ geladene DNA wird durch ein positiv geladenes Agens komplexiert.

Dadurch kann sie an die Zellmembran adhären und wird in einem endocytoseartigen Vorgang in das Zellinnere aufgenommen. Die stabilen und transienten Transfektionsversuche wurden mit CHO-DUKX-B11 Zellen und dem Expressionsplasmid pCI B8R-Plasmid durchgeführt. Bei den Versuchen, eine stabile B8R-exprimierende CHO-Zelllinie zu entwickeln, schloß sich eine Einzelklonierung an. Als Kontrolllinie diente CHO-DUKX-B11, die keiner Transfektion unterzogen wurde. Um die Effizienz der Transfektion bestimmen zu können wurde auch ein GFP-haltiges Expressionsplasmid pCI-B8R/GFP transfiziert.

Als Selektionsmarker einer erfolgreichen Transfektion wurden die Plasmide pAG60-neo und pSV2-dhfr zusammen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid pCI-B8R, oder pCI-B8R/GFP cotransfiziert. Das Plasmid pAG60-neo kodiert das Resistenzgen für das Antibiotikum Geneticin (G418). Das Plasmid pSV2-dhfr kodiert das Dihydrofolatreduktasegen und entwickelt seine Selektionspotenz beim Einsatz von Mem- α Medium ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside.

Transfektion durch Calciumphosphat-Präzipitation

CHO-DUKX-B11 (dhfr)-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation nach etablierten Protokollen (Ausubel *et al.*, 1994, Doehmer *et al.*, 1988) transfiziert. Dazu wurden am Vortag pro Ansatz $1 - 2 \times 10^6$ CHO-Zellen in 145 mm Petrischalen mit 10 ml Vollmedium + FCS ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Zur Transfektion wurde eine Lösung aus 20 μ g Plasmid-DNA in 500 μ l Calciumchloridlösung (final 125 mM) hergestellt. Dieses Gemisch wurde langsam unter Schütteln in 500 μ l 2 x HBSS (Hanks gepufferte Kochsalzlösung) getropft und zur Ausbildung der Calciumphosphat/DNA Präzipitate 20 min bei Raumtemperatur stengelassen. Die Transfektion erfolgte durch Mischen der entstandenen Präzipitate mit dem Medium und Inkubation im Brutschrank für acht Stunden. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt.

Transfektion durch Super Fect™ Transfection Regent

Eine weitere Transfektionsmethode mit einer hohen Effizienz wurde mit dem Transformationsreagenz Super Fect™ von Qiagen durchgeführt. Durch ein aktiviertes Dendrimer wird die zu transferierende DNA in positiv geladene kompakte Strukturen "verpackt" und liegt so für einen aktiven Transport über negativ geladene Oberflächenrezeptoren in die Zelle und den Kern vor.

12 μ g Plasmid DNA wurden in 300 μ l serumfreien Medium aufgenommen und mit 60 μ l Super Fect™ Transfections Reagenz versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde mit

serumhaltigem Medium unter mehrmaligen Mischen das Volumen auf 3.000 µl aufgefüllt. Unter leichtem Schwenken wurde dieser Lösung auf die Zellen gegeben und für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS das Medium gegen Vollmedium + FCS gewechselt.

Bei einer transienten Transformation wurde das Medium nach 48 bis 72 Stunden von den Zellen genommen und bei -20 ° C für weitere Experimente gelagert.

Bei einer stabilen Transformation wurde nach 24 bis 48 Stunden das Kulturmedium gegen Vollmedium mit Antibiotika ausgetauscht. Nach weiteren 24 bis 48 Stunden erfolgte eine Vereinzelung der Zellklone in 24 Well Platten. Eine Kontrolle der Kulturüberstände auf IFN- γ inhibierendes B8R-Protein wurde vorgenommen, wenn sich in den Platten ein dichter Monolayer ausgebildet hatte.

Das Problem der Lebensentstehung ist offenbar im wesentlichen gleichbedeutend mit dem Problem der Entstehung biologischer Information. Demzufolge erweist sich der Begriff der biologischen Information als der Grundbegriff der physikalisch-chemischen Theorie der Lebensentstehung.

Bernd-Olaf Küppers „Der Ursprung biologischer Information“

3. Resultate

3.1 Klonierung des ORF B8R von *Vaccinia Virus* (Western Reserve)

Erste Voraussetzung für biochemische und biophysikalische Untersuchungen an einem rekombinanten Protein ist die Klonierung des entsprechenden Gens.

Die Isolierung und Amplifikation des Gens wurde durch die Polymerase Kettenreaktion erreicht. Die eingesetzte DNA stammt aus dem Überstand von mit *Vaccinia Virus* VR-119 infizierten Vero-Zellen. Der Anteil an viraler DNA im verwendeten Überstand war auf Grund der vollständig lysierten Vero-Zellen vergleichsweise gering. Die spezifischen Primer, die nach den Angaben der veröffentlichten Sequenz generiert wurden erreichten eine direkte Amplifikation des ORF B8R Gens aus diesem Material. Die im Gel durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar gemachte B8R Amplifikationsbande korrelierte mit der veröffentlichten Größe von 816 Basenpaaren.

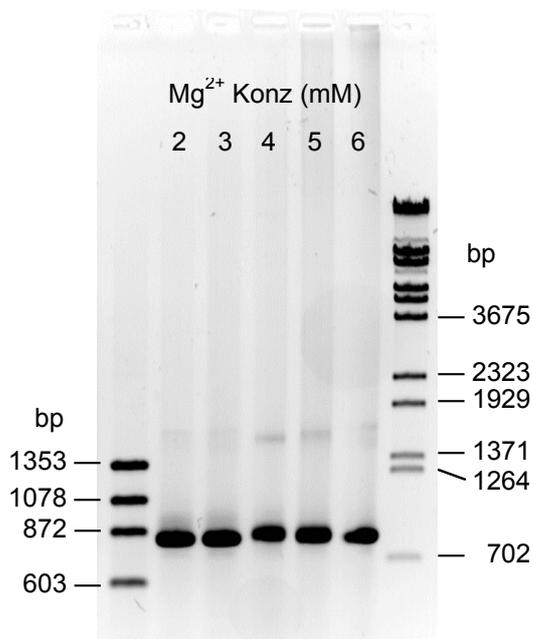


Abbildung 3.1: Amplifikationsprodukt von ORF B8R, das mit spezifischen Primern aus viraler DNA synthetisiert wurde.

Das Amplifikationsprodukt aus den PCR-Ansätzen mit 2 mM und 3 mM Mg^{2+} wurde aus dem Gel eluiert. Das Gel in Abbildung 3.1 weist auch bei höheren Mg^{2+} Konzentrationen ein deutliches PCR Produkt mit der exakten Größe auf. Da jedoch bei dem verwendeten *Pwo*-Polymeraseenzym die Fehlerrate beim Nucleotideinbau bei geringeren Magnesium-

konzentrationen am kleinsten ist, wurden für alle weiteren Schritte nur die PCR-Produkte aus den Ansätzen mit 2 mM und 3 mM Mg^{2+} ausgewählt. Mit vier Sequenzierprimern, die eine doppeltüberlappende Identifizierung der Nucleotidsequenz zuließen, wurde mit Ausnahme einer stillen Mutation die DNA-Sequenz für das ORF B8R aus *Vaccinia Virus* Western Reserve identifiziert. Als Vergleichssequenz lag die aus der NCBI Datenbank veröffentlichte Nucleotidsequenz mit der Accession No. P24770 (VB08_VACCV) vor. Bei der stillen Mutation an Position 651 wurde ein Austausch von Cytosin gegen Thymin an der dritten Stelle des codierenden Triplets ermittelt.

3.2 Analyse der ORF B8R Sequenz

Im Anhang (B) ist die cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF B8R von *Vaccinia Virus*, Western Reserve (WR) dargestellt. Die 816 Basen codieren für ein Protein von 272 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 31.161 Da. Der G + C Gehalt der cDNA liegt bei 36 %, der pI des Proteins wurde mit 5,39 berechnet. Das rekombinant hergestellte His Tag-Fusionsprotein ist 33 AS größer und kommt auf eine errechnete Masse von 34.788 Da bei einem pI von 5,68. Das ebenfalls hergestellte Strep Tag Fusionsprotein ist nochmals um 217 Da massereicher und kommt auf eine Masse von 35.005 Da. Die errechneten Daten zu den jeweiligen Massen stimmen mit den experimentellen Ergebnissen, die aus den SDS-Page Untersuchungen gewonnen wurden, überein.

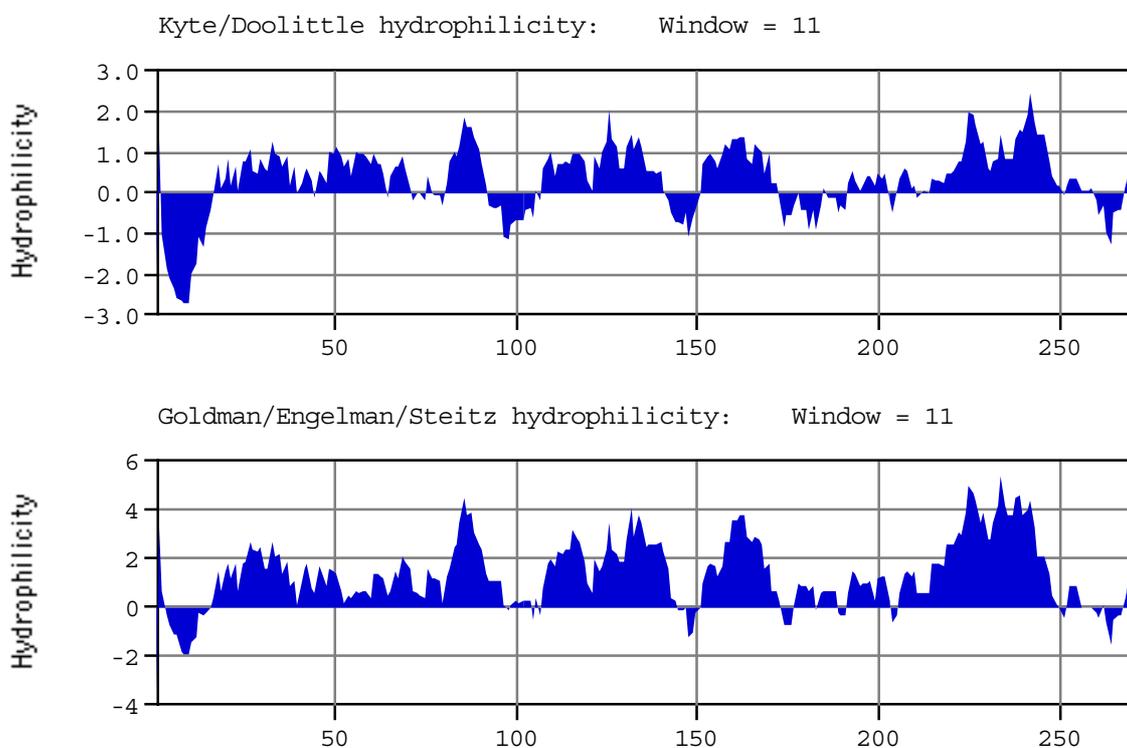


Abbildung 3.2: Graphik zur Identifizierung von hydrophilen Aminosäureabschnitten nach **A:** Kyte und Doolittle (1982) und **B:** Goldman, Engelman und Steitz (1985). Positive Werte zeigen Bereiche an, die einen hydrophilen Charakter haben. Beide Identifizierungsalgorithmen (**A;** **B**) kommen zu fast identischen Ergebnissen. Die Berechnungen wurden mit dem Programm MacVector (Version 6.5.3) durchgeführt.

3.2.1 B8R Alignment von anderen Poxviridae-Stämmen

Ein Vergleich von der Aminosäuresequenz des *Vaccinia Virus* Stammes Western Reserve (VR-119) mit Sequenzen von IFN- γ bindenden Proteinen von anderen *Vaccinia Virus* Stämmen ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Der hohe Homologiegrad wird durch die Abbildung evident. In die Betrachtung sind Sequenzen der in der Datenbank publizierten *Vaccinia* Viren eingegangen. Größte Abweichungen von einer Consensussequenz hat der Stamm Ankara. Bei diesem Protein liegt im mittleren Abschnitt von Gly95 bis Ile102 und von Asn117 bis Pro123 ein 8 bzw. 7 Aminosäure große Lücke (gap) vor. C-terminal fehlen bei dem Ankara-Protein im Vergleich mit den anderen B8R-Proteinen die letzten 31 Aminosäuren. Im ClustalW Alignment zwischen den verschiedenen Proteinen ergeben sich bei einem Insertionsstrafwert (open gap penalty; OGP) von 10 und einer extended gap penalty (EGP; Strafwert für die Verlängerung einer Insertion) von 1 folgende in Prozentzahlen ausgedrückte Homologien:

VV-Stamm	WR	Copenhagen	Tian Tan	LIVP	Ankara
Western Reserve	100				
Copenhagen	98	100			
Tian Tan	99	98	100		
LIVP	98	97	98	100	
Ankara	82	80	81	81	100

Tabelle 3.1: AS-Homologien der einzelnen B8R-Proteine von fünf verschiedenen *Vaccinia Virus* Stämmen (Angaben in Prozent).

Abgesehen von den beim Stamm Ankara immanenten Sequenzunterschieden zu den anderen *Vaccinia* Stämmen, gibt es noch Einzelaminosäureaustausche. Wählt man das ORF B8R von Western Reserve als Bezugssequenz, so sind es beim Stamm Copenhagen fünf Aminosäuren die unterschiedlich sind (Lys157Glu; Pro161Thr; Val179Ala; Lys205Glu; Ser213Asn). Die beiden letztgenannten Veränderungen sind auch beim Stamm Tian Tan vorhanden. Der Stamm Ankara stimmt an den fünf Positionen zu 100 % mit dem Stamm WR überein. Die Mutationen befinden sich ausnahmslos in Domäne 2 (vergleiche auch Abschnitt 3.2.2). Die Veränderungen an Position Lys157Glu und Pro161Thr liegen am Ende des C' beta-sheet. Aus dem Modell gehen für diese Positionen keine relevanten Kontakte zwischen dem B8R und dem IFN- γ hervor. Gleiches trifft für den Aminosäureaustausch Valin gegen Alanin an Position 179 (Val179Ala) zu. Dieser Bereich am Ende des beta-sheet mit der Bezeichnung E liegt dem Modell nach auf der abgewandten Seite der Kontaktbereiche zwischen den beiden interagierenden Proteinen. Die

beiden verbleibenden Mutationen Lys205Glu und Ser213Asn befinden sich im beta-sheet G und im Übergangsbereich zur random Formation und sollten ebenfalls keinen direkten Einfluß auf die Bindung ausüben. Der *Vaccinia Virus* Laborstamm LIVP hat drei Einzelaminosäuremutationen, die von keinem anderen Stamm geteilt werden (Tyr144Cys; Lys242Thr; Ser254Cys). Der Austausch Tyr144Cys liegt am Anfang vom beta-sheet C' zentral in der Domäne 2. Die beiden anderen Austausche befinden sich beide jenseits der Aminosäure Pro210 und somit in einem Bereich, in dem eine Strukturvorhersage nur unter sehr großen Vorbehalten gemacht werden kann. Bei den Aminosäuren Pro210 bis Ser272 existieren keine markanten Homologien zu anderen cytokinbindenden Rezeptoren, so daß eine Vorhersage nur auf Basis der Sequenz gemacht werden kann. Danach könnten sich die 62 C-terminalen Aminosäuren in eine ca. 10 AS bis 14 AS umfassende alpha-Helix und zwei beta-sheet Motive falten. Dieser Abschnitt ist stark geprägt von basischen Aminosäuren, wodurch auch der hohe pI von 10,1 für diesen Bereich zu erklären ist. Der hydrophobe Charakter könnte darauf hindeuten, daß dieser Strukturabschnitt keinerlei Funktion bei der Bindung an Proteine übernimmt. Es ist auch davon auszugehen, daß dieser Abschnitt relativ weit vom eigentlichen Core-Protein abgeklappt vorliegt und so eine eigene Domäne bildet. Die Mutation Thr242Cys und Ser254Cys ist auf Grund der chemischen Eigenschaften der SH-Gruppe am Cystein von besonderer Bedeutung. Durch zwei zusätzliche potentielle Disulfidbrückenbildner erhöht sich die Möglichkeit, daß sich fehlerhafte Disulfidbrücken ausbilden, die zu einer Fehlfaltung und dann gezwungenermaßen zu einer Disfunktion des Proteins führen.

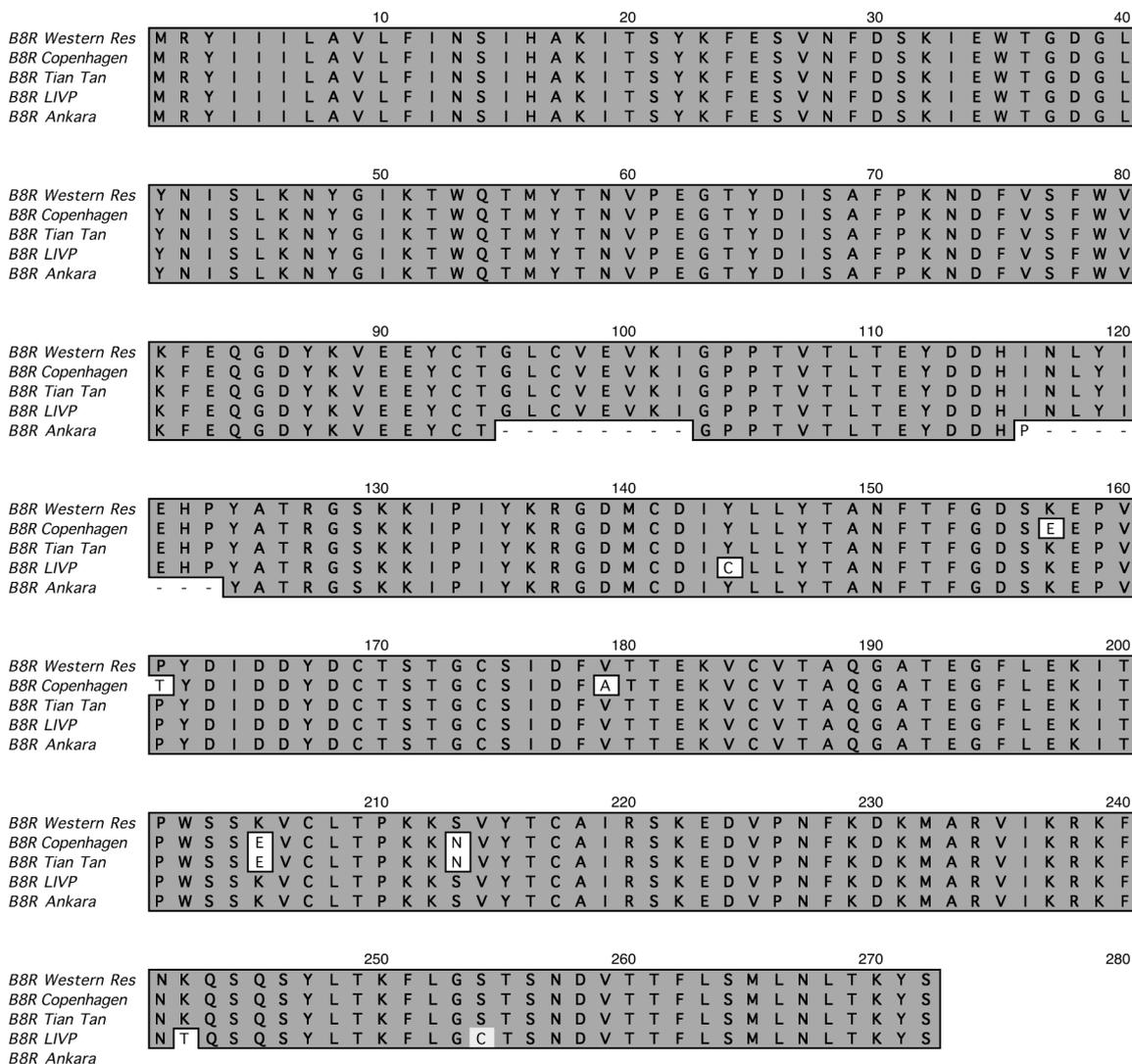


Abbildung 3.3: AS-Sequenzalignment von B8R Western Reserve mit dem Profil von B8R-Proteinen aus anderen *Vaccinia* Stämmen.

3.2.2 Sequenzalignment des huIFNGR1 (ECD) und des B8R-Proteins (WR)

Für das erneute Sequenzalignment wurden die kristallographischen Ergebnisse von Thiel *et al.* (Thiel *et al.*, 2000) verwendet (PDB-Code 1fg9). Aufgrund von unzureichenden Elektronendichten in bestimmten Bereichen und dadurch verursachten schlecht definierten Aminosäureresten, wurden nur die Daten der hochaufgelösten Kette C für das Alignment ausgewählt. Die Sekundärstruktur wurde mit dem Programm DSSP (Kabsch *et al.*, 1983) berechnet. Die Umsetzung in das Clustal Alignment Format erlaubt später beim ClustalX Alignment (Version 1.81) (Thompson *et al.*, 1997) eine Verwendung von sekundärstrukturabhängigen Strafwerten (gap penalties). Es wurden die Standardparameter von ClustalX 1.81 verwendet.

Es schlossen sich vier Runden einer Editierung und Überprüfung des entstandenen Alignments mit entsprechender Software an (Jalview Alignment-Editor; *vi*). Dabei wurde ein iteratives Vorgehen gewählt, d. h. die Zwischenergebnisse wurden anhand der Kristallstruktur sowie multiplen Alignments überarbeitet. Außerdem flossen Informationen über die Konservierung der Disulfidbrücken und der an einer IFN- γ Bindung beteiligten Reste mit in die Überprüfung ein.

In der **ersten Runde** wurden alle konservierten Cysteine zur Deckung gebracht. Es existieren in der ECD des IFNGR und im B8R jeweils acht Cysteine. Es ist jedoch nur bei sechs Cysteinen im B8R möglich eine Deckung mit Cysteinen aus dem IFNGR zu erreichen. Außerdem wurde die Deletionen kurz nach dem Linkerbereich zwischen den beiden Domänen (D1 und D2) geschlossen.

Für die Erstellung eines B8R-Strukturmodells müssen nach den Insertionen und Deletionen im ersten Schritt folgende Bereiche verändert werden, um ein B8R Modell zu erstellen:

- Nach Asn53, 2 Reste in B8R-Sequenz entfernen; in Ordnung, da im Loopbereich.
- Nach Val89, 1 Rest in B8R-Sequenz entfernen; in Ordnung, aber β -turn wird relativ eng.
- Nach Ser99, 4 Reste in B8R-Sequenz entfernen; eine Deletion von vier Resten an dieser Stelle ist problematisch und ein Einfluß auf größere Teile der Struktur ist nicht ausgeschlossen.
- Nach Pro131, 2 Reste in B8R-Sequenz einfügen; die AS-Seitenketten in diesem Bereich müssen eine nach außen gerichtete Orientierung aufweisen, was in diesem strukturellem Kontext möglich ist.
- Nach Ser190, 3 Reste in B8R-Sequenz entfernen; bei dieser Deletion ändert sich der Bereich der Ankergruppen, die Veränderungen sind aber durchaus erlaubt.
- Nach Lys213, 1 Rest in B8R-Sequenz eingefügen.

In der **zweiten Runde** wurden Reste, die auf Grund zu schwacher Elektronendichte nicht in den Koordinatensatz von IFNGR1 und damit auch nicht in der Aminosäuresequenz enthalten waren, in das Alignment eingefügt. Dadurch wird die noch in der ersten Runde vorgenommene Insertion von 2 Resten nach Pro131 geändert. An dieser Stelle liegt nun eine Deletion von 1 Rest (Val135 wird deletiert) vor.

Die Editierung in der **dritten Runde** befaßte sich mit der problematischen Deletion von 4 Resten nach der Aminosäure Ser99. Statt einer Deletion von 4 Resten nach Ser99 und einer

Deletion nach Val89, wurden beide Deletionen zu einer 5-Reste-Deletion zusammengefaßt. Eine alternative Lösung für diesen Bereich wurde an dieser Stelle zunächst ausgeschlossen.

In der **vierten Runde** wurden folgende Überarbeitungen an der Sequenz vorgenommen:

In einem Alignment von Cytokin-Rezeptoren der Klasse I und II ist, bezogen auf die Sequenz des IFNGR1, die Aminosäure Trp31 konserviert. Um diesem Ergebnis Rechnung zu tragen und Trp31 mit dem entsprechenden Gegenstück im B8R-Protein zur Deckung zu bringen, wurde eine Deletion von 5 Resten nach der Aminosäure Gln34 in das Alignment eingeführt. Eine Deletion in diesem Bereich ist trotz der Länge unproblematisch, da in dieser Region ein Loopstrukturmotiv vorhanden ist.

Die Aminosäure Ser223, die in der Kristallstruktur nicht aufgelistet wird, jedoch in die Sequenz gehört, wurde nachträglich eingefügt. Das Alignment wurde N- wie C-terminal wieder zurück auf die volle Länge gebracht. Da eine Konservierung der an der IFN- γ Bindung beteiligten AS-Reste wahrscheinlich ist, wurde das Alignment abschließend zwischen den Aminosäuren Ala87 und Val104 so modifiziert, daß die an einer Bindung beteiligten Aminosäuren im B8R (Lys98 und Glu101) vorhanden sind.

Im Alignment von huIFNGR1 und B8R-Protein weisen die Sequenzen nach Abschluß der Editierung 48 identische Positionen über eine Gesamtalignmentlänge von 219 Resten auf. Dies entspricht einer Sequenzidentität von 21,9 %. Ähnliche Aminosäuren mit gleichem chemischen Charakter treten im Alignment zu 15 % auf. Für die Berechnung der Sequenzidentität wurde nur der Bereich bis Gly228 berücksichtigt. Diese Position entspricht im IFNGR dem Ende der extrazellulären Domäne. Die folgenden Reste besitzen aus biologisch-funktionaler Sicht keinen Sinn und würden das Alignment verfälschen. Aus diesem Grund wurde das C-terminale Ende (insgesamt 63 Aminosäuren) beim B8R-Protein ab Pro210 bei den Alignmentuntersuchungen nicht berücksichtigt. Die entsprechenden Reste sind nur der Vollständigkeit halber in Abbildung 3.4 mit dargestellt.

B8R	IFNGR1
-	60 – 68
84 – 128	105 – 150
156 – 161	178 – 183
172 - 194	197 – 218

Tabelle 3.2: Konservierte Cysteinbrücken bei B8R und IFNGR1.

B8R	IFNGR1	Wechselwirkung
Lys 33	Lys 47	Salzbrücke (+)
Tyr 35	Tyr 49	Wasserstoffbrücke (++)
Gly 36	Gly 50	Wasserstoffbrücke (+)
Ile 37	Val 51	Wasserstoffbrücke (+++)
Thr 39	Asn 53	Wasserstoffbrücke (+)
-	Ser 54	Wasserstoffbrücke (-)
Val 63	Asn 79	Wasserstoffbrücke (-)
Trp 66	Trp 82	Wasserstoffbrücke (+)
Lys 75	Lys 98	Wasserstoffbrücke (+)
Glu 78	Glu 101	Salzbrücke (+) Wasserstoffbrücke (+)
Val 85	Arg 106	Salzbrücke (-)
Glu 180	His 205	Wasserstoffbrücke (-)
Phe 182	Trp 207	Wasserstoffbrücke (+ -)

Tabelle 3.3: Gegenüberstellung der Aminosäuren von B8R und IFNGR aus den Alignmentdaten. Die Informationen über die Art der Wechselwirkung (Wasserstoffbrücken und Salzbrücken) zwischen IFN- γ und IFNGR wurden der Arbeit von Thiel *et al.* (Thiel *et al.*, 2000) entnommen. Legende: (+) und (-) geben Auskunft die Möglichkeit und Anzahl der Wechselwirkungen zwischen B8R und dem Liganden.

Aus der Summe der Vorhersagen, basierend auf dem Sequenzalignment, der Identifizierung von konservierten Aminosäuren, die für eine Wechselwirkung mit IFN- γ zur Verfügung stehen, und Daten der Sekundärstrukturanalyse, ergibt sich folgendes Bild für ein B8R Modell:

Der Bereich von Aminosäure Lys33 bis Thr39 stellt einen hochkonservierten Cluster dar, in dem 5 AS eine Wechselwirkung mit IFN- γ eingehen können. Alle Aminosäuren befinden sich im Loopbereich von beta-sheet C und C'. Diese Region erscheint variabel genug für eine mögliche Verformung bei Einsetzen der Wechselwirkung.

Der nächste Cluster liegt im B8R-Protein bei den Aminosäuren Val63; Trp66; Lys75; Glu78 und Val85. Alle AS-Reste besitzen die Möglichkeit zur Ausbildung von Wechselwirkungen. Ohne Ausnahme befinden sich alle Aminosäuren am Anfang bzw. am Ende eines beta-sheets oder aber im dazwischenliegenden Loopbereich und die Reste sollten somit ausreichend Raum für eine mögliche Interaktion mit IFN- γ haben.

Der 11 Aminosäure lange Übergangsbereich von Domäne 1 in Domäne 2 stellt ebenfalls einen Cluster mit sehr hohem Konservierungsgrad dar. Sechs identische Aminosäuren plus zwei mit ähnlichem chemischen Charakter könnten auf einen bedeutenden Bereich hinweisen. Da es für diesen Bereich beim IFNGR keine Erkenntnisse über einen Kontakt mit dem Liganden gibt, sollte der hohe Konservierungsgrad einen anderen Grund haben: Die Einhaltung des exakten Zwischenraums zwischen den beiden Domänen oder aber die Bildung eines definierten Winkels, der sich zwischen den beiden Domänen ausbildet.

Domäne	Bezeichnung	Aminosäureposition
D1	beta-sheet A	Thr20 – Val27
	beta-sheet B	Asp30 – Thr36
	beta-sheet C	Leu40 – Asn47
	beta-sheet C`	Gln54 – Val60
	beta-sheet E	Thr64 – Asp66
	beta-sheet F	Phe78 – Gln84
	beta-sheet G	Gly85 – Tyr92
Übergangsbereich	Linker D1- D2	Gly95 – Pro105
D2	beta-sheet A	Thr106 – Tyr112
	beta-sheet B	Ile116 – Glu121
	beta-sheet C	Asp142 – Thr152
	beta-sheet C´	Asp155 – Tyr162
	beta-sheet D	Tyr167 – Thr170
	beta-sheet E	Gly173 – Thr180
	beta-sheet F	Lys183 – Thr192
	beta-sheet G	Leu196 – Thr209
C-terminus		Pro210 – Ser272

Tabelle 3.4: Strukturmotivzuordnung beim B8R. Grundlage für diese Einteilung ist das Sequenzalignment und die Vorhersagen für die Sekundärmotive. Die Namensgebung der beta-sheets im B8R sind in Anlehnung an die von Walter *et al.* beim IFNGR1 vorgenommenen Bezeichnungen gemacht worden.

Weitere Bereiche mit einem hohen Grad an konservierten Aminosäuren befinden sich im B8R-Protein zwischen Cys185 und Glu190 (Cys-Val-Thr-Ala-Gln Glu). Dieser Bereich (entspricht im IFNGR1 die AS Cys200 bis Glu205) liegt in Domäne 2 im beta-sheet F. Die Kristallstruktur zeigt für diese Aminosäuren keine Kontakte mit dem Liganden an.

Acht Aminosäuren vor Eintritt in die TMD konnte ein weiterer Cluster mit konservierten Aminosäuren identifiziert werden. In der IFNGR Sequenz wird der 8 AS große Bereich von

Ser218-Lys-Glu-Val-Cys-Ile-Thr224 überspannt. Im B8R befindet sich die konservierte Sequenz Ser203-Ser-Glu-Val-Cys-Leu-Thr209 in einem dem Liganden abgewandten Bereich von beta-sheet G.

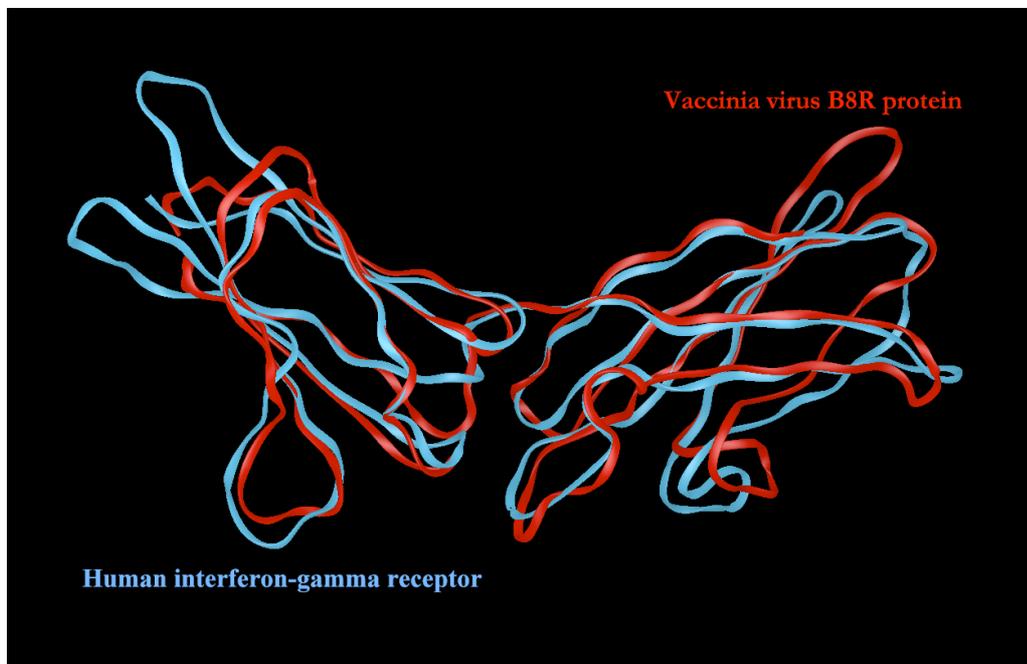


Abbildung 3.5: Dreidimensionales Modell des B8R-Proteins (rot). Die Übereinanderlagerung des B8R-Proteins mit der Extazellulären Domäne des IFNGR1 veranschaulicht die hohe Strukturhomologie der beiden Proteine.

Weitere Besonderheiten: In der Aminosäuresequenz vom B8R-Protein liegt von der Position 127 bis 129 mit der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp ein Motiv für die Zelladhärierung vor. Die Sequenz liegt im Loopbereich von beta-sheet B zu C in der Domäne 2. Die biologische Bedeutung einer solchen „Cell Attachment Sequence“ für das B8R-Protein könnte darin liegen, daß nach der Ausschüttung aus der infizierten Zelle eine relativ unspezifische Anlagerung an benachbarte Zellen stattfindet. Dadurch kann eine zu starke Ausdünnung im umliegenden extrazellulären Raum unterbunden werden und das B8R steht direkt am Ort der Zellinfektion bei Auftreten von IFN- γ zur Neutralisierung zur Verfügung.

3.2.3 Sequenzvergleich von verschiedenen Viroceptoren und IFNGR

Die Familie der Poxviridae stellt eine große Gruppe pathogener Viren dar, die sich im zytoplasmatischen Raum von eukaryontischen Wirtszellen replizieren. Ihre opportune Vermehrungsstrategie erlaubt selbst eine Infektion von Vögeln, Reptilien, Weichtieren und sogar Insekten. Dieses breite Spektrum von Wirten hat eine große Genvariation bei den verschiedenen Familienmitgliedern der Poxviridae zur Folge gehabt.

Das Überspringen von Speziesgrenzen stellt bei Viren keine Besonderheit dar, verlangt jedoch für ein erfolgreiches und effektives Weiterbestehen entweder einen enormen Genpool oder eine extrem hohe Anpassungsfähigkeit. Trotz der großen Anzahl von Genen bei den Viren dieser Gruppe trifft letzteres zu. Gene die für Proteine kodieren, die das wirtseigene Immunsystem inhibieren, liegen im äußeren Bereich der doppelsträngigen DNA und unterliegen einer höheren Mutationsrate als DNA-Bereiche die mittig orientiert vorliegenden. Virale Rezeptoren, die in der Lage sind, das antiproliferativ und antiviral wirkende Cytokin IFN- γ zu binden, sind Voraussetzung für eine Vermehrung innerhalb der Wirtszelle. Bei einem AS-Vergleich der extrazellulären Bereiche von murinen und humanen IFNGR mit fünf löslichen viralen Proteinen, die in der Lage sind, IFN- γ zu neutralisieren, traten evidente Homologien auf.

Tabelle 3.5 zeigt die prozentualen Werte von identischen (fett) und ähnlichen (kursiv) Aminosäuren bei einem Alignment mit einer open gap penalty von 10 und einer extended gap penalty von 1. Bemerkenswert ist, daß selbst das ORF M-T7 Protein von Myxoma Virus, das zum huIFNGR1 nur 16 % identischen Aminosäuren aufweist, trotzdem eine neutralisierende Wirkung besitzt.

	Human ECD	Murin ECD	B8R Western Res	B9R Variola	Ectromelia Virus	B7R Cowpox	M-T7 Myxoma
Human ECD	100	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>11</i>	<i>11</i>
Murin ECD	50	100	<i>16</i>	<i>17</i>	<i>17</i>	<i>16</i>	<i>12</i>
B8R Western Reserve	21	14	100	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>0</i>	<i>13</i>
B9RVariola	21	15	87	100	<i>5</i>	<i>4</i>	<i>15</i>
Ectromelia Virus	20	15	87	90	100	<i>3</i>	<i>15</i>
B7R Cowpox	20	15	95	90	90	100	<i>12</i>
M-T7 Myxoma	16	18	17	18	17	18	100

Tabelle 3.5: Aminosäure Homologien bei IFN- γ bindenden Proteinen. Die Alignmentanalyse wurde mit dem Programm MacVector mit den Parametern OGP = 10; EGP = 1 vorgenommen. **fett:** prozentualer Anteil an identischen AS; *kursiv:* prozentualer Anteil an ähnlichen AS.

Bei dem auf der nächsten Seite in Abbildung 3.6 gezeigten ClustalW Alignment sind Aminosäuren, die bei mindestens 6 der 7 Proteine an gleicher Stelle vertreten sind, dunkel unterlegt und fett hervorgehoben. Ähnliche Aminosäuren im Alignment mit gleichem chemischen Charakter sind eingerahmt dargestellt. Häufig treten diese beiden Hervorhebungen innerhalb eines Clusters gemeinsam auf (laufende Numerierung: Phe46-Tyr53; Lys115-Ile123; Gln130-Pro138; Cyt206-Gly209; Ser226-Ile229). Diese Bereiche stellen hochkonservierte Bereiche dar, die für die Funktion des B8R-Proteins von großer Bedeutung sind.

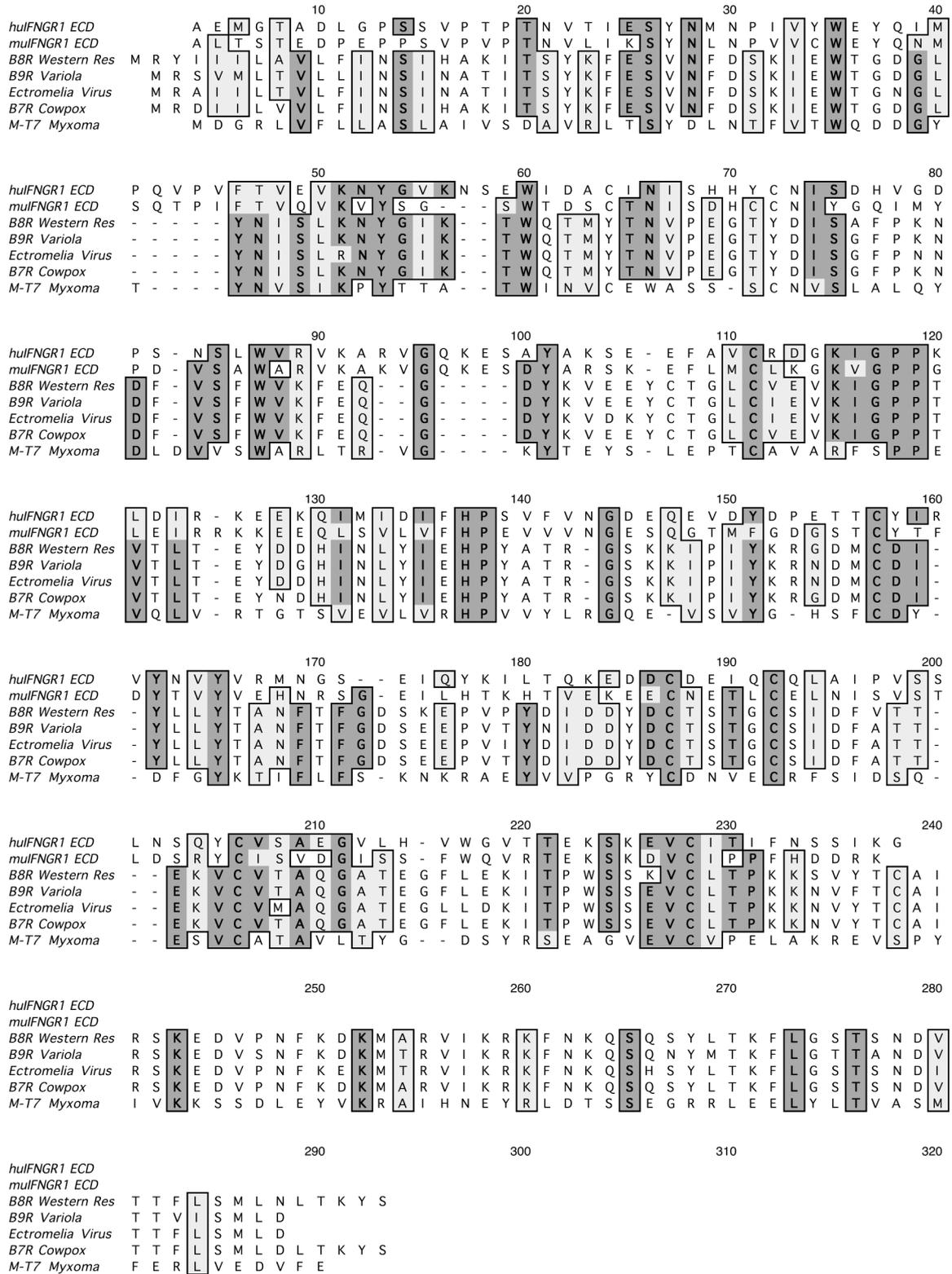


Abbildung 3.6: Strukturbasiertes multiples Sequenzalignment der ECD des huIFNGR1 mit homologen Proteinen von *Mus Musculus* und verschiedenen Viren. Cluster mit homologen oder ähnlichen AS sind durch Fettdruck oder Umrahmungen hervorgehoben.

3.3 Konstruktion von verschiedenen Expressionsplasmiden

pTrcHisB B8R

Nach eindeutiger Identifizierung des B8R-Gens aus *Vaccinia Virus* VR-119 wurde der Nukleinsäurestrang in einer weiteren PCR mit Primern, die 3'- und 5'-terminal Restriktions-Schnittstellen einführen, auf die Klonierung in den Expressionsvektor pTrcHis B vorbereitet. Das entstandene PCR Produkt wurde aufgereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Hind* III geschnitten.

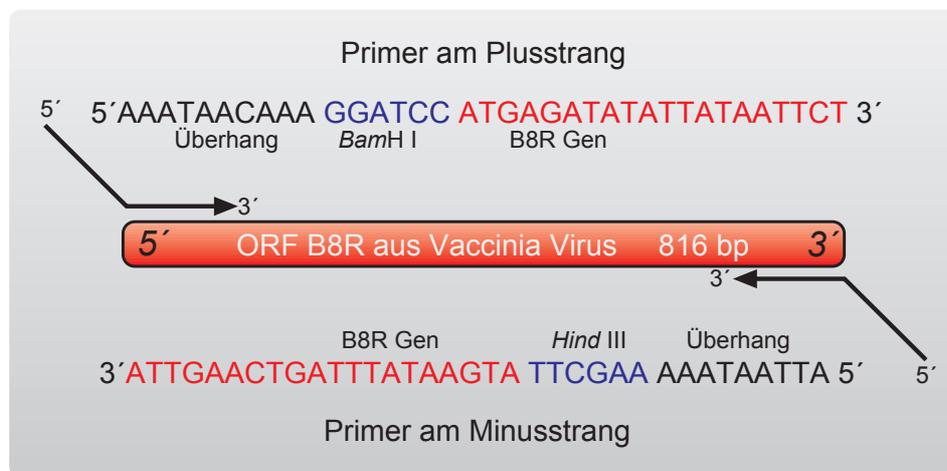


Abbildung 3.7: Position und Sequenz der Primer am ORF B8R zur Einfügung der Restriktionsschnittstellen und zur Einklonierung in den Vektor pTrcHis B.

Der Vektor wurde durch die gleichen Enzyme linearisiert und in einer anschließenden Reaktion mit dem B8R Gen zum Ringschluß ligiert. Nach Transformation in TOP10 Zellen wuchsen auf der ampicillinhaltigen Agarplatte 36 Klone. Die DNA von sechs Klonen wurde zur näheren Untersuchung aufgearbeitet. Die Integrität des B8R Gens in den Expressionsvektor wurde mittels DNA-Sequenzierung untersucht und war bei allen Klonen zu 100 % korrekt. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ist im Anhang: D) aufgelistet.

Deletions PCR am Fusionsanteil des Proteins

Die Verwendung eines Fusionsanteils am Protein an Stelle des unmodifizierten, nativen Proteins kann neben Vorteilen, die bei der Aufreinigung und Identifizierung eine Rolle spielen, auch Probleme für die Faltung des Proteins mit sich bringen. Aus diesen Überlegungen heraus und auf Grund der Ergebnisse im IFN- γ neutralisierenden Assay mit dem B8R-Fusionsprotein aus pTrcHis B, wurden Veränderungen am Fusionsanteil des pTrcHisB B8R-Plasmides vorgenommen. Durch eine MID-PCR wurden insgesamt 66 Basen zwischen dem His Tag Bereich und dem B8R-Gen entfernt. Durch diese Deletionsmutation wurden innerhalb des Fusionsanteils die Bereiche der Enterokinaschnittstelle und die Antikörpererkenntnissequenz deletiert. Die Sequenz für die sechs Histidine blieb unangetastet. Durch diesen Deletionskompromiss sollte zum einen eine Aufreinigung des Proteins über eine Metallaffinitätssäule gewährleistet bleiben und zum anderen der Fusionsanteil so klein wie möglich gemacht werden.

Strep TagII Einfügung im pTrcHisB B8R Plasmid durch eine Deletion/Insertions PCR

An Stelle des 6 AS langen His Tags im pTrcHisB B8R Plasmid wurde in einer kombinierten Deletion/Insertions PCR ein Strep TagII eingefügt. Das Strep TagII System basiert auf einer Expression eines Fusionsproteins in *E.coli* und einer Aufarbeitung des nativen Proteins unter schonenden Bedingungen. Das Strep Tag ist eine 8 AS lange Sequenz (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) die mit (Affinitätskonstante $K_{Diss} = 1 \mu M$) hoher Affinität an Streptactin bindet. Das Strep Tag System bietet durch die Einschritt-Affinitätschromatographie, die zu jeder Zeit unter physiologischen Bedingungen abläuft, große Vorteile bei der Aufreinigung.

Erreicht wurde die Insertion des Strep TagII bei gleichzeitiger Deletion des His Tag im Plasmid pTrcHis B B8R durch folgende Primer:

Primer: Strep pTrc fw

4 AS Strep TagII

5' Ph - **CAG TTC GAA AAA** GGT ATG GCT AGC ATG ACT GG 3'

Vorwärtsprimer der mit den ersten 12 Basen am 5' Ende die Hälfte der neuen Sequenz einfügt.

Primer: Strep pTrc rv

4 AS Strep TagII

5' Ph - **CGG GTG GCT CCA** AGA ACC CCC CAT GGT TTA TTC 3'

Der Gegenprimer inseriert ebenfalls 12 Basen für den neuen Sequenzabschnitt.

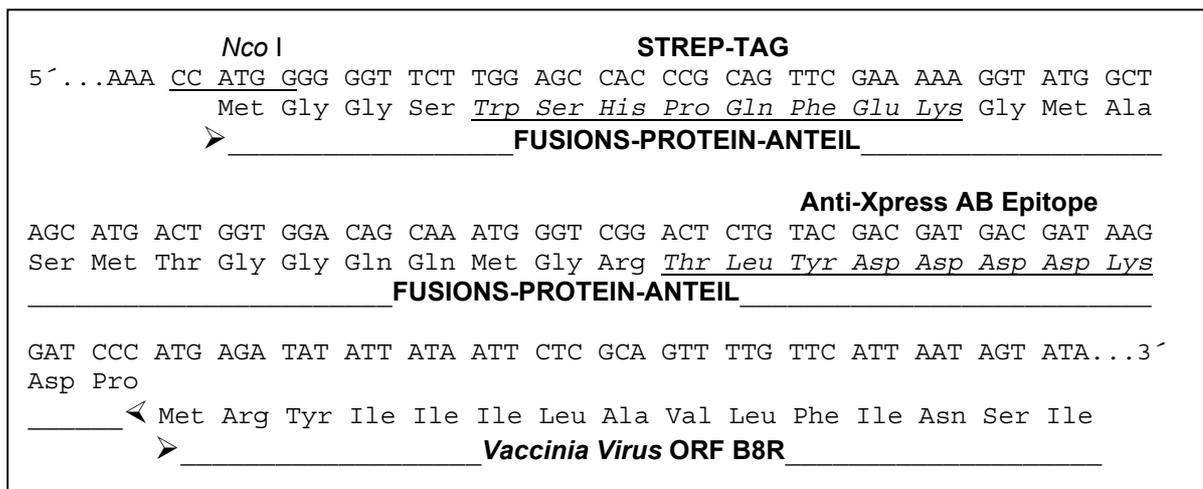


Abbildung 3.8: Nukleotid und Aminosäuresequenz des modifizierten pTrcHisB B8R Fusionsanteils mit Strep TagII an Stelle von His Tag.

C-terminale Strep TagII Einfügung im pTrcHisB B8R Plasmid

Die Alignmentuntersuchungen zwischen dem IFNGR und dem ORF B8R konnten dem C-terminalen Ende des B8R-Proteins keine eindeutige Funktion zuweisen. Das Modell des löslichen IFN- γ bindenden Viroceptors geht davon aus, daß dieser Bereich keinerlei Wechselwirkungen mit dem IFN- γ eingeht. Diese Annahme ist nach wie vor eine Hypothese und kann erst durch eingehende biophysikalische Untersuchungen am Protein selber bestätigt und verifiziert werden. Aus diesem Grund und weil auch kein Versuch ausgelassen werden sollte biologisch aktives B8R-Protein zu erhalten, wurde die B8R-Sequenz im pTrcHis B Vektor auch C-terminal mit einem Strep TagII versehen. Folgende Primer wurden dazu verwendet:

Primer: C Strep pTrc fw

4 AS Strep Tag

5' Ph - **CAG TTC GAA AAA** TAA AAG CTT GGC TGT TTT GGC GG 3'

Primer: C Strep pTrc rv

4 AS Strep Tag stop

5' Ph - **CGG GTG GCT CCA** TGA ATA TTT AGT CAA GTT AAG CAT GC 3'

Die Überprüfung der korrekten Integrität bei allen modifizierten Plasmiden wurde durch Restriktionsspaltungen mit ausgesuchten Enzymen und einer Sequenzierung des veränderten Bereiches vorgenommen. Nach Erhalt von 100 % korrekten Plasmiden wurden diese zur Expression des Proteins eingesetzt.

3.3.1 Expressionsoptimierung

Die verschiedenen B8R-Fusionsproteine (His Tag; N-term. Strep TagII; C-term. Strep TagII) wurden grundsätzlich in unterschiedlichen Stämmen von *E.coli* produziert. Die Proteinexpression wurde durch SDS Page/Commassie-Färbung und Western Blot Analyse kontrolliert. Für beide Analysemethoden eigneten sich am besten Gesamt *E. coli*-Lysate, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression gewonnen wurden. Nach erfolgter Induktion wurde bis zum Erreichen einer konstanten OD₆₀₀-Dichte innerhalb der Kulturflüssigkeit alle 60 min ein Aliquot mit einer optischen Dichte von 2,5 OD Einheiten abgenommen. Die Bakterien wurden pelletiert, mit 250 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgekocht. Je 10 µl wurden auf die Gele aufgetragen. Der Einsatz diese Menge hat sich für eine Analyse des Gels nach Coomassiefärbung als gut erwiesen. Der überwiegende Teil an exprimiertem Protein wurde von den Bakterien in Inclusion bodies eingelagert und somit war eine denaturierende Aufarbeitung unumgänglich. Um diese Art der Aufarbeitung zu umgehen wurde die Expression der Proteine bei verringerter Temperatur von nur noch 25° C und einer um den Faktor 20 verminderten IPTG-Konzentration von 50 µM vorgenommen. Bei diesen Bedingungen neigen die Bakterien dazu einen großen Teil als lösliches Protein im Cytosol zu produzieren. Eine Kontrolle der so hergestellten Fusionsproteine wurde ebenfalls über SDS-Page und anschließendem Western Blot vorgenommen. Einziger Unterschied: Bei der Aufarbeitung des Proteins werden die geernteten Zellen auf Eis mit Ultraschall behandelt und der Überstand nach Zentrifugation enthält das „löslich“ produzierte Protein.

Bei allen hergestellten Konstrukten konnte die Produktion von B8R-Fusionsprotein im Western Blot nachgewiesen werden. Die Herstellung von „löslichem“ Protein wurde unternommen, als bei dem B8R-Protein aus der denaturierenden Aufarbeitung keine biologische Aktivität im IFN-γ neutralisierenden Assay nachgewiesen werden konnte. Dabei war grundsätzlich festzustellen, daß die Bakterien bei der verringerten Inkubationstemperatur von nur 25° C ein verändertes Wachstumverhalten haben. Das äußert sich darin, das auch nach fünfstündigem Wachstum nur eine verringerte Zelldichte und damit einhergehend auch eine reduzierte Zellausbeute in der Kulturlösung zu beobachten war, und zum anderen in der nicht so steilen logarithmischen Wachstumsphase direkt nach Induktion mit IPTG.

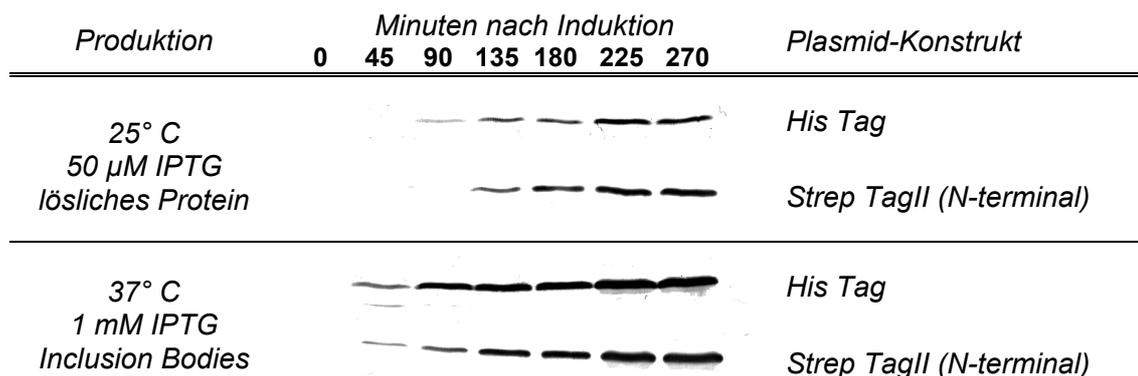


Abbildung 3.9: Kontrolle der Expressionsoptimierung von verschiedenen B8R-Fusionsproteinen bei Einfluß von Inkubationstemperatur und IPTG Konzentration im Western Blot. Primärer Antikörper bei dem His Tag Konstrukt war der Anti-Xpress-Antibody von *Invitrogen*. Zur Identifizierung des Strep TagII Fusionsproteins wurde die Streptavidin alkalische Phosphatase von *Amersham* verwendet.

Bei den in Abbildung 3.10 dargestellten Fusionsproteinbanden wurden jeweils gleiche Mengen Protein aufgetragen. Der von den Bakterien löslich produzierte Anteil fällt im Vergleich zur Inclusion body Fraktion deutlich kleiner aus, da auch unter diesen Verhältnissen sich immer noch Einschlußkörperchen mit Protein bilden. Da jedoch bei der Aufarbeitung von löslichem B8R-Protein die Renaturierung umgangen werden kann, bei der ein großer Anteil an Protein ausfällt, werden alle folgenden Proteinpräparationen mit diesem Material durchgeführt.

3.4 Biologisch aktives B8R aus *Vaccinia Virus*

IFN- γ ist ein Protein, das fast ausschließlich mit seinem membranständigen IFNGR wechselwirkt. Die Ausnahmen sind zum einen körpereigene, lösliche, Rezeptoruntereinheiten und zum anderen Proteine die von Viren gebildet werden. Diese viralen Proteine blockieren durch Bindung an IFN- γ das dazugehörige wirtseigene Immunsystem. In zwei unterschiedlichen Modellsystemen wurde die Bindungsfähigkeit des B8R-Proteins von *Vaccinia Virus* (VR-119) an IFN- γ bestimmt. Zum einen wurde in einem modifizierten antiviralen Assay die neutralisierende Wirkung *in vivo* untersucht. Zum anderen wurden durch Experimente mit ^{32}P markiertem IFN- γ *in vitro* Untersuchungen zur Bindungsstöchiometrie vorgenommen.

3.4.1 IFN- γ Neutralisierungsassay

Bei diesem Assay handelt es sich um ein Testsystem mit dem es möglich ist, die neutralisierende Interaktion zwischen dem viralen Protein B8R und IFN- γ festzustellen. Der Neutralisierungsassay basiert auf dem antiviralen Assay, in dem die Reduktion des zytopathischen Effektes von *Encephalomyocarditis Virus (EMCV)* auf A549 Zellen nach Behandlung mit IFN- γ bestimmt wird. Der Assay wurde in erster Linie zur Bestimmung der biologischen Aktivität der rekombinant hergestellten B8R-Proteine verwendet. Außerdem war es mit dem Testsystem möglich, eine Aussage über die Konzentration der neutralisierenden Units vorzunehmen.

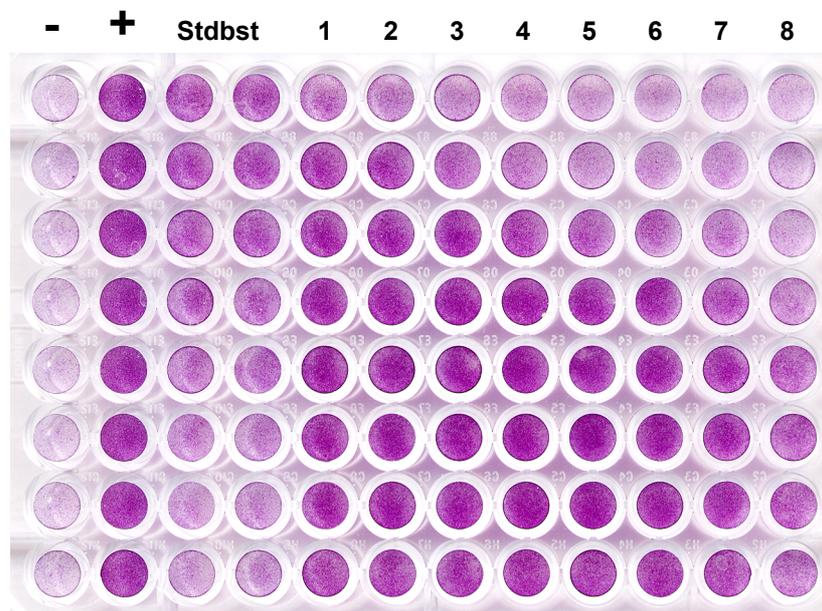


Abbildung 3.10: Mikrotiterplatte des IFN- γ inhibierenden Assays.

96-Well Platte mit gefärbten A549-Zellen nach Beendigung der Inkubationsphase mit *EMCV* und Färbung mit Kristallviolett. Allein die vitalen Zellen sind in der Lage den Farbstoff aufzunehmen und sind blau gefärbt. Wells mit lysierten Zellen sind hell.

Legende: -: Viruskontrolle; +: Zellvitalkontrolle; Stdbst: IFN- γ Standardbestimmung (IFN- γ Konzentrationsabnahme von oben nach unten); 1 – 8 Wells zur Probestestung.

Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis eines IFN- γ Neutralisierungsassays zur Bestimmung der B8R Units/ml. Die A549 Zellen sind in einigen Wells vollständig lysiert, während in anderen Wells die blaue Färbung den vitalen Charakter der Zellen anzeigt.

Für eine Beurteilung wurde auf jeder Platte eine IFN- γ Standardbestimmung durchgeführt. Der laborinterne Wildtyp rhuIFN- γ (spezifische Aktivität: 2×10^7 U/mg) wurde auf eine Konzentration von 100 U/ml eingestellt. Ausgehend von diesem Wert wurden 1:3 Verdünnungen in die darunterliegenden Wells pipetiert. Die IFN- γ Konzentration, die einen

50 %igen Virenschutz vermittelt, wurde definitionsgemäß die Aktivität von 1 U zugewiesen. Der Konzentrationsübergang von durch IFN- γ vermitteltem Schutz zu keinem Schutz wurde somit am Übergang vom vierten Well (1,23 U/ml) in das fünfte Well (0,41 U/ml) erreicht. Alle Messungen zur Bestimmung der neutralisierenden Wirkung von B8R auf IFN- γ wurden mindestens dreimal pro Probe durchgeführt.

Folgende rekombinant hergestellten und aufgereinigten B8R Proben wurden zur Bestimmung der biologischen Aktivität in den neutralisierenden Assay eingesetzt:

1. Fusionsprotein B8R aus Vektor pTrcHis B (Abschnitt 3.3)
2. Fusionsprotein B8R-His Tag aus modifizierter Vektor pTrcHis (Abschnitt 3.3)
3. Fusionsprotein B8R N-Term Strep Tag (Abschnitt 3.3)
4. B8R aus stabiler und transienter CHO-Transfektion (Abschnitt 2.10.5)

Sämtliche Proben der hier aufgelisteten B8R-Proteine zeigten im neutralisierenden Assay keine biologische Aktivität. Das eingesetzte Material (1./2./3.) war grundsätzlich über eine zweistufige chromatographische Aufarbeitung gereinigt worden. Strukturelle Veränderungen, die im Rahmen der Aufarbeitung am Protein entstanden sind und einen negativen Einfluß auf die biologische Aktivität haben, konnten zu keinem Zeitpunkt ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden nicht nur die hochaufgereinigten Proteinproben in den Assay eingesetzt, sondern auch Aliquote von sämtlichen Ausgangs- und Zwischenreinigungsprodukten. Dazu wurden alle in den *in vivo* Assay eingesetzten Proben auf einen für die A549 Zellen moderaten pH-Wert gepuffert und zur Abtrennung von möglichen Verunreinigungen sterilfiltriert.

Proben, die nur minimal aufgereinigt waren, und dazu zählten vor allem Überstände von ultraschallbehandelten *E.coli*-Lysaten oder angereicherte und aufgebrochene Inclusion-body-Fractionen, hatten zum Teil einen extrem hohen Fremdproteingehalt. Eingesetzt im IFN- γ Neutralisierungsassay wurden die A549 Zellen mit einem Protein- und Lipidfilm bedeckt, der eine objektive Auswertung nicht erlaubte. Bei Proteinproben, die im Westernblot eindeutig als B8R-Fusionsprotein identifiziert wurden (Abschnitt 3.3.1), konnte unter den durchgeführten Bedingungen keine biologische Aktivität nachgewiesen werden.

3.4.2 B8R Gewinnung durch Infektion von Vero Zellen mit *Vaccinia Virus* VR-119

Die biologische Funktion von B8R verlangt eine Sekretion des Proteins aus der Zelle in den Überstand. Außerhalb der infizierten Zelle bindet der Viroreceptor an IFN- γ und blockiert somit die Initiationsreaktion für eine durch das Cytokin vermittelte Signaltransduktion.

Zur Gewinnung von B8R-Protein aus dem Überstand wurden Vero Zellen, die einen 80 % - 90 % Monolayer gebildet hatten, mit *Vaccinia Virus* VR-119 infiziert. Zur Infektion wurde das FCS-haltige Medium abgenommen und durch 5 ml FCS-freies Medium ersetzt. Der eingesetzte Virustiter entsprach ca. 10 PFU/Zelle. Das geringe Volumen von nur 5 ml wurde nach der 15 minütigen Adhärierungsphase der Viren an die Zellen mit weiteren 10 ml Medium aufgefüllt. Nach sechs Stunden war bei den ersten Vero-Zellen eine morphologische Veränderung zu erkennen: Deformation der Zellmembran, Tendenz zur Ausbildung von kugeligen, an Stelle von langgestreckten Zellformen. Nach weiteren sechs Stunden war bei allen Verozellen der massive Virenbefall deutlich erkennbar. 80 % aller Zellen hatten eine kugelige Form angenommen und innerhalb der Zellen waren granuläre Bereiche zu erkennen. Zum Teil lagerten sich benachbarte deformierte Zellen aneinander. Durch den massiven Eingriff in den Zellhaushalt war die Proliferation der Vero Zellen nach der Infektion völlig eingestellt worden. Vereinzelt waren bereits lysierte Zellen, oder Zelltrümmer zu erkennen. Nach 30 Stunden wurde der Medienüberstand geerntet, zu diesem Zeitpunkt waren sämtliche Zellen in der Kulturflasche lysiert. Das Medium war durchsetzt mit zusammengeklumpten, lysierten Zellen oder Zelltrümmern. Das Medium wurde von Zellbestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt und bei -20° C gelagert.

3.4.3 Bestimmung der B8R Aktivität im Kulturüberstand

Der neutralisierende Assay wurde zu Beginn der Promotionsarbeit als ein Modellsystem etabliert, mit dem auf einfache und schnelle Weise die biologische Aktivität der aufgearbeiteten B8R Proben getestet wurde. Später diente der Assay zur Konzentrationsbestimmung der neutralisierenden B8R-Units. Zur exakten Quantifizierung wurden die zu untersuchenden Aliquote auf der Mikrotiterplatte systematisch so verdünnt, daß ein Konzentrationsraster entstand. Mit dieser Aufteilung war es möglich die B8R-Konzentration mit einem Fehler von 2.000 U/ml zu bestimmen. Die Mikrotiterplatte in Abbildung 3.11 zeigt das Ergebnis eines solchen IFN- γ neutralisierenden Assays zur B8R Quantifizierung. Das Testsystem ist auf Grund seiner biologischen Ausrichtung nicht in der Lage einen auf 1 - 2 Wells begrenzten Übergang von geschützten zu ungeschützten Zellen darzustellen. Diese relative Unschärfe wird jedoch durch die feine Konzentrationsrasterung bei der Auswertung kompensiert.

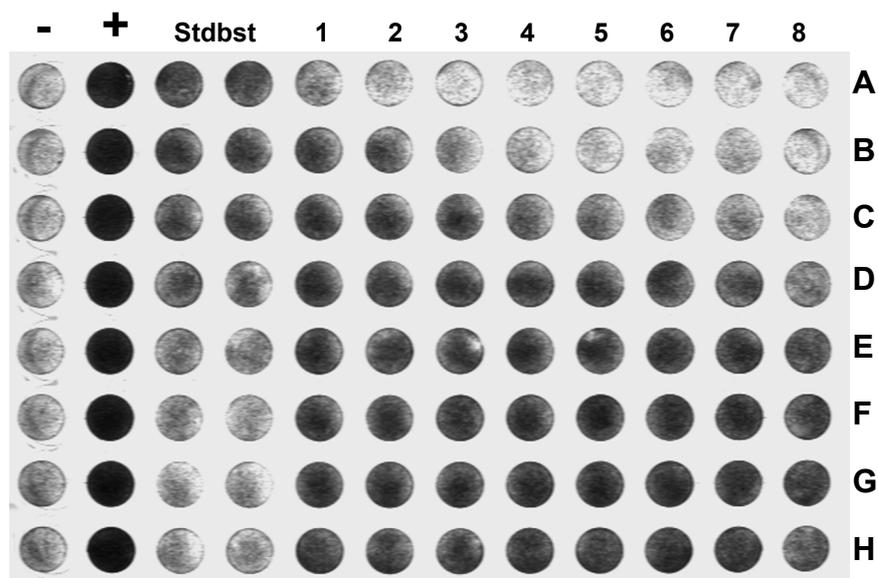


Abbildung 3.11: Mikrotiterplatte zur Bestimmung der IFN- γ neutralisierenden B8R Einheiten. Die B8R Probe wurde in der Inkubationsplatte in Spalte A von rechts nach links pro well 9+1 verdünnt. Anschließend erfolgte für jede Probenreihe (1 – 8) eine 1:3 Verdünnung. Dadurch wurde eine feine Konzentrationsrasterung gewährleistet, die eine genaue Aktivitätsbestimmung ermöglichte.

Proben, in denen die Konzentration der neutralisierenden IFN- γ Einheiten bestimmt werden sollten, wurden in der Regel 3 mal vermessen. In einigen Fällen war das Probenvolumen jedoch so gering, daß lediglich eine Einmalmessung vorgenommen werden konnte. Tabelle 3.6 enthält die B8R Konzentrationen aus fünf Infektionsexperimenten. Der angegebene Wert ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel der IFN- γ Konzentrationen bei der zum einen mehr als 50 % der Testzellen vital, und zum anderen mehr als 50 % der Zellen letal waren.

Infizierter Zelltyp	IFN- γ neutralisierende B8R-Einheiten (Unit/ml)	
Vero (1)	7,6 x 10 ⁴	Die Bestimmung der B8R Konzentration in allen Proben wurde mit einer Genauigkeit von +/- 2.000 Unit/ml vorgenommen.
Vero (2)	8,2 x 10 ⁴	
Vero (3)	7,2 x 10 ⁴	
A549	6,6 x 10 ⁴	
L929	5,7 x 10 ⁴	

Tabelle 3.6: Bestimmung der B8R Aktivität bei verschiedenen Infektionsversuchen in unterschiedlichen Zelllinien.

3.4.4 Kinetische Untersuchungen zur B8R Expression

Aus den vorangegangenen Analysen ging hervor, daß biologisch aktives B8R-Protein durch Infektion mit *Vaccinia Virus* VR-119 gewonnen werden kann. Eine Vermehrung des Virus ist nur dann effektiv gewährleistet, wenn das wirtseigene Immunsystem blockiert wird. Eine frühe Synthese und eine schnelle Freisetzung von B8R in das umliegende Medium ist Voraussetzung. In einer Studie wurde der zeitliche Verlauf der B8R Ausschüttung in das Medium verfolgt.

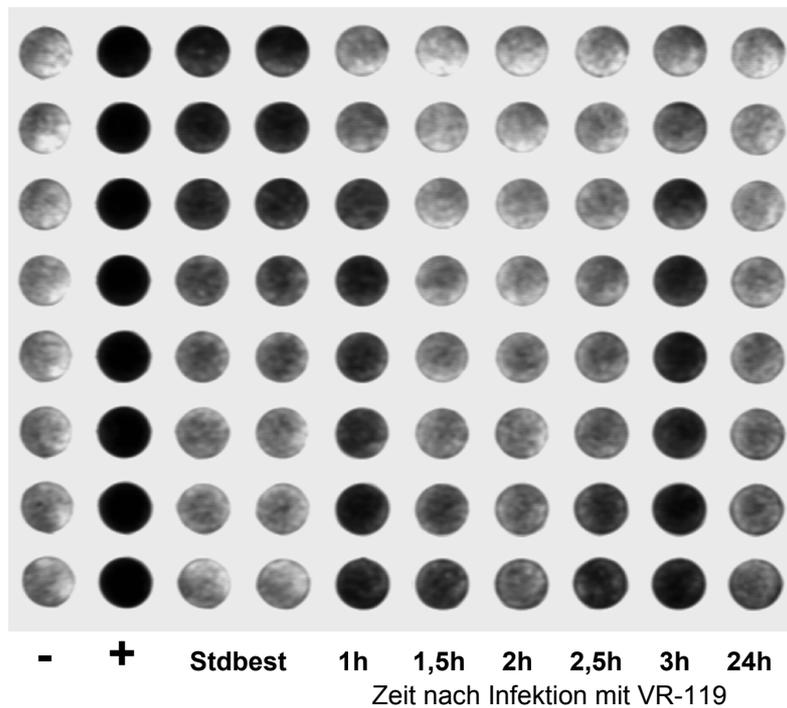


Abbildung 3.12: IFN- γ inhibierender Assay zur kinetischen Bestimmung der Freisetzung von B8R bei Vero Zellen nach Infektion mit VR-119.

Die in den Versuch eingesetzten Vero Zellen hatten einen 100 % Monolayer gebildet als sie mit dem *Vaccinia Virus* VR-119 mit einem Virustiter von ca. 10 PFU/Zelle infiziert wurden. Nach 60 min wurde das Medium vollständig abgenommen und die Zellen einmalig mit Medium gewaschen. Anschließend wurde die Kulturflasche mit 5 ml frischen Medium befüllt und in den Brutschrank gestellt. Diese Vorgehensweise zum Austausch des Mediums wurde alle 30 min weitere viermal durchgeführt, so daß eine Kinetik zur Synthese von B8R über einen Zeitraum von drei Stunden nach Infektion erreicht wurde. Der IFN- γ inhibierende Assay in Abbildung 3.12 verdeutlicht den B8R Spiegel zu den angegebenen Zeitpunkten. Wie nicht anders zu erwarten, tritt das Protein bereits in einer sehr frühen Phase (60 min) in Erscheinung. Im Zeitintervall 90 min – 120 min erreicht das Medium die maximale B8R Konzentration. Die Zunahme des B8R-Proteins im Zeitraum von 60 min – 90 min ist größer als der Abfall im Zeitraum von 120 min - 150 min. Der 24-Stundenwert zeigt eine deutlich größere Konzentration als die Probe des Zeitabschnittes 150 min – 180 min. Hier tritt ein kumulativer Effekt des Zeitintervalls 3h - 24h auf, da die Synthese von B8R wahrscheinlich zu keinem Zeitpunkt vollständig abgestellt wird.

3.4.5 Vermehrung von *Vaccinia Virus* in L929, A549 und Vero Zellen

Poxviridae stellen eine pathogene Erregerfamilie dar, die sich nicht auf einen spezifischen Wirt spezialisiert haben. Als konservatives Zellsystem zur Virusvermehrung wurde in den Unterlagen der ATCC Vero Zellen angegeben. Trotz dieser Empfehlung wurden bei den Infektionsversuchen auch andere Zellsorten verwendet. Zum einen A549, eine humane epitheliale Carcinomalungenzelllinie und zum anderen murine Fibroblastenzellen L929, die in unserer Abteilung zur Vermehrung des murinen *Encephalomyocarditis Virus (EMCV)* verwendet werden. Die Ausbeuten bei der B8R Produktion in diesen Zellen sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis einer rein qualitativen Vergleichsuntersuchung der drei Zellsorten auf B8R Produktion abgebildet. In die Kontrollreihe wurde Überstand aus einer nicht infizierten Verozellkultur eingesetzt.

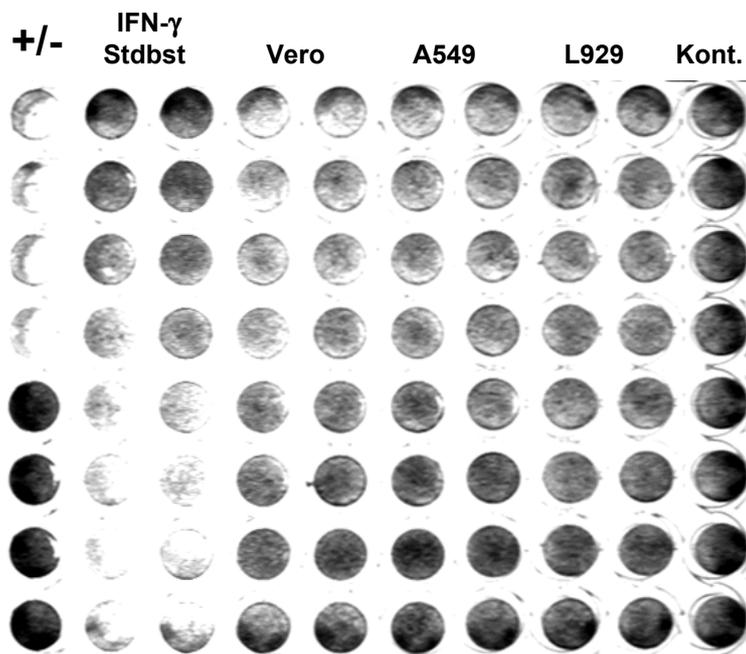


Abbildung 3.13: Qualitative Vergleichsbestimmung der B8R Konzentration aus den drei Zelllinien Vero, A549, L929.

3.4.6 Existiert ein B8R-Cofaktor

In drei verschiedenen Zellsorten konnte erfolgreich die Produktion von biologisch aktivem B8R-Protein gezeigt werden. In dem rekombinant hergestellten und aufgereinigten B8R-Protein hingegen konnte bis dato keinerlei biologische Aktivität nachgewiesen werden. Da in dem IFN- γ neutralisierenden Assay jeweils der unaufgereinigte Überstand einer infizierten Zellkultur eingesetzt wurde, sollte ein Experiment Aufschluß über einen möglichen dritten, noch unbekanntem Faktor bei der IFN- γ Inhibierung geben. Dazu wurde Überstand von einer infizierten Vero Zellkultur additiv mit rekombinant hergestelltem B8R-Protein in den IFN- γ inhibierenden Assay eingesetzt. Die Proteinmenge des eingesetzten rekombinanten B8R Materials war um den Faktor 1.000 größer, als die B8R Konzentration die im Kulturüberstand anzutreffen war. Sollte vom *Vaccinia Virus* VR-119 ein für die Protein-Proteininteraktion notwendiger Cofaktor gebildet worden sein, so sollte im IFN- γ neutralisierenden Assay unter diesen Versuchsbedingungen bei den rekombinanten Proben eine deutliche Steigerung der neutralisierenden Aktivität nachgewiesen werden.

Die Mikrotiterplatte in Abbildung 3.14 offenbart, daß trotz 1.000facher Konzentration von rekombinantem B8R Material keine Erhöhung der IFN- γ neutralisierenden Aktivität eingetreten ist. Es handelte sich bei den eingesetzten Proben um zwei hochaufgereinigte Fusionsproteine (His Tag in Lane 3 und Strep Tag in Lane 4) sowie um Kulturüberstand aus einer stabilen CHO Transfektion (Lane 2). Aus Gründen der Vollständigkeit wurden in das Testsystem auch Proben von weniger stark aufgereinigtem rekombinanten B8R-Material eingesetzt (nicht dargestellt). In keiner Probe wurde ein Anstieg der neutralisierenden Aktivität festgestellt.

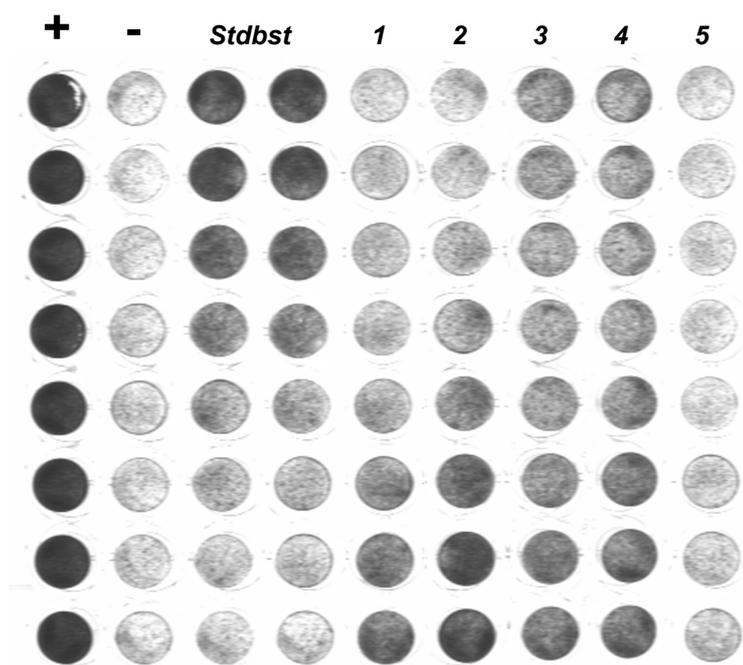


Abbildung 3.14: Assay zur Untersuchung auf einen weiteren Faktor bei der Anbindung von B8R an IFN- γ .

Die Summe der Daten aus dem IFN- γ inhibierenden Assay ergeben folgendes Bild:

Vaccinia Virus ist in der Lage in drei Zelllinien unterschiedlicher Spezies unter Ausnutzung des wirtseigenen Proteinsyntheseapparates B8R-Protein zu synthetisieren, das huIFN- γ bindet und dadurch neutralisiert wird. Die Konzentration an exprimierten B8R wurde bei infizierten Verozellen auf durchschnittlich $7,7 \times 10^4$ neutralisierenden B8R Units bestimmt. Bei einer infizierten Zellzahl von 2×10^6 in der Kulturflasche ergibt das eine Produktionsrate pro Zelle von 6×10^9 Molekülen in 24 Stunden.

3.5 Crosslinking Ergebnisse

Auf Grund der Tatsache, daß für das B8R-Protein noch kein Antikörper zur Verfügung steht, wurde nach einer sensitiven Methode zur Identifizierung einer Wechselwirkung von B8R mit IFN- γ gesucht. Vorhandene Antikörper für IFN- γ erwiesen sich alle als neutralisierend und kamen somit nicht zum Einsatz. Die Markierung von Proteinen mit radioaktiven Isotopen, die spezifische Bindung dieses Proteins an das Zielprotein und die sich daran anschließende Autoradiographie stellt in diesem Fall die optimale Lösung zur Analyse des Bindungsvermögens von B8R aus *Vaccinia Virus* an IFN- γ von verschiedenen Spezies dar.

3.5.1 Kopplung von γ -³²P an IFN- γ verschiedener Spezies

Voraussetzung für Untersuchungen zur Proteinwechselwirkung zwischen B8R und IFN- γ ist die Gewährleistung von ausreichend radioaktiv markiertem IFN- γ . Nach der Reaktion zur Kopplung von γ -³²P durch die cAMP abhängige Protein Kinase an IFN- γ lag der größte Teil des eingesetzten γ -³²P-ATP noch immer in der Lösung ungebunden vor. Die Abtrennung von freiem γ -³²P-ATP von markiertem IFN- γ wurde durch eine erschöpfende Dialyse erreicht. Dazu wurden die verschiedenen Ansätze in Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa gegeben und für 72 h bei dreimaligem Wechsel der Pufferlösung dialysiert. Die am Ende im γ -Counter gemessene Radioaktivität in der Dialyselösung betrug lediglich 0,02 ‰ der anfänglich bestimmten Aktivität.

Die erfolgreiche Phosphorylierung von murinem und humanem IFN- γ ist in Abbildung 3.15

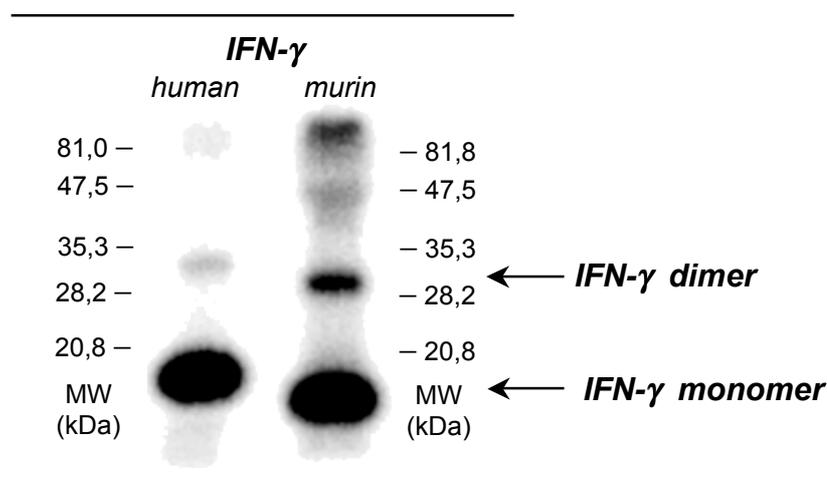


Abbildung 3.15: Erfolgreiche Radiomarkierung von humanem und murinem IFN- γ mit γ -³²P. Es wurde jeweils nur 1 μ l der gelabelten Proteinlösung auf das Gel aufgetragen und die Expositionszeit für diese Autoradiographie betrug 30 min.

dargestellt. Deutlich sind die unterschiedlichen Größen der beiden Interferone zu erkennen. Freies in der Lösung befindliches γ - ^{32}P -ATP sollte an der Lauffront des Geles auftreten. Bei der in Abbildung 3.15 dargestelltem Autoradiographie ist jedoch die Lauffront während der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus dem Gel gewandert und ist somit hier nicht vorhanden. Teilweise ist bei nachfolgenden Autoradiographien das freie γ - ^{32}P -ATP am unteren Rand der Autoradiographie zu erkennen.

Unter Beachtung der extrem kurzen Autoradiographiezeit bei diesem Gel von nur 30 min und den dennoch deutlichen Signalen der beiden IFN- γ Monomeren, wird die hohe Effektivität dieser Phosphorylierungsreaktion erkennbar. Neben den Schwärzungen, die durch das monomere IFN- γ entstanden sind, existieren auch Dimerbanden bei huIFN- γ mit einer Größe von ca. 34 kDa und bei dem muIFN- γ in einer Größe von ca. 31 kDa.

Die radioaktive Markierung von IFN- γ von der Ratte ist trotz dreimaliger Wiederholung des Versuches nicht gelungen. In Abbildung 3.16 ist in Lane 1 ratIFN- γ Proteinmaterial (1 μl) vom Zeitpunkt direkt nach der Kopplungsreaktion, und in Lane 2 die gleiche Menge Protein nach erschöpfender Dialyse aufgetragen.

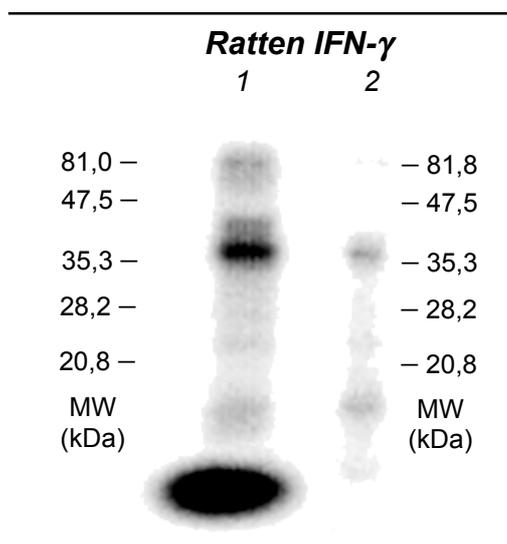


Abbildung 3.16: Phosphorylierungsversuch von rat IFN- γ mit ^{32}P -ATP. Lane 1: Aliquot direkt nach der Phosphorylierungsreaktion; Lane 2: nach Dialyse.

Die intensive Schwärzung am unteren Rand der Abbildung ist durch freies ungebundenes γ - ^{32}P -ATP verursacht. In dieser Lane, wie auch in Lane zwei, ist kein monomeres ratIFN- γ zu identifizieren. Eine zu niedrig eingesetzte Proteinkonzentration kann ausgeschlossen werden. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, daß die verwendete Substanz gar kein ratIFN- γ war oder aber in einem degradierten, nicht nativen Zustand mir zur Verfügung stand. In den anschließenden Versuchen wurde mangels radioaktiv markiertem ratIFN- γ ausschließlich mit murinem und humanem Material gearbeitet.

3.5.2 Natives B8R bindet huIFN- γ

Auf Grund der biologischen Funktion des B8R-Proteins sollte es im Kulturmedium von mit *Vaccinia Virus* infizierten Zellen zu finden sein. In einer Versuchsreihe wurden Kulturüberstände mit B8R-Protein von verschiedenen Infektionsansätzen auf ihre IFN- γ bindende Wirkung getestet. Jeweils 100 μ l der zu untersuchenden Kulturlösung wurde mit einem 5 μ l großen Aliquot des radioaktiv markierten huIFN- γ für die Dauer von einer Stunde bei 37° C inkubiert. Die detaillierte Beschreibung und praktische Vorgehensweise für alle darauffolgenden Schritte und die Kopplungsreaktion ist unter Abschnitt 2.6 beschrieben. In Abbildung 3.17 ist das Ergebnis eines der durchgeführten Autoradiographien dargestellt. Beide Proben von infizierten Vero-Zellen weisen eine Proteinbande mit einer Größe von ca. 47 kDa und eine weitere mit einem Molekulargewicht zwischen 70 kDa und 80 kDa auf. Die mitgeführten Kontrollen hingegen haben in dieser Größe kein Signal. Bei den Kontrollen handelt es sich auf der linken Spur um radioaktiv markiertes huIFN- γ (Beschriftung: IFN- γ), und die linke Spur zeigt das Ergebnis einer Inkubation von 32 P markiertem huIFN- γ mit nicht infiziertem Vero-Zellkulturüberstand. Bei der Bande mit einer Größe von ca. 47 kDa handelt es sich um den Proteinkomplex zwischen B8R und monomeren huIFN- γ . Das Auftreten von einem Komplex mit einem monomeren IFN- γ ist dadurch zu erklären, daß es bei der Crosslinking Reaktion nur zu einer Kopplung zwischen dem B8R-Protein und einer Proteinkette des IFN- γ gekommen ist. Die im Anschluß an die Kopplungsreaktion vorgenommene Behandlung in SDS-Probenpuffer führt zu einer Denaturierung aller Proteine und bei der Autoradiographie werden nur die Komplexe detektiert, bei denen DSS eine feste Bindung ausgebildet hat. Die Bande im höhermolekularen Bereich ist ein Komplex aus B8R und einem huIFN- γ Dimer.

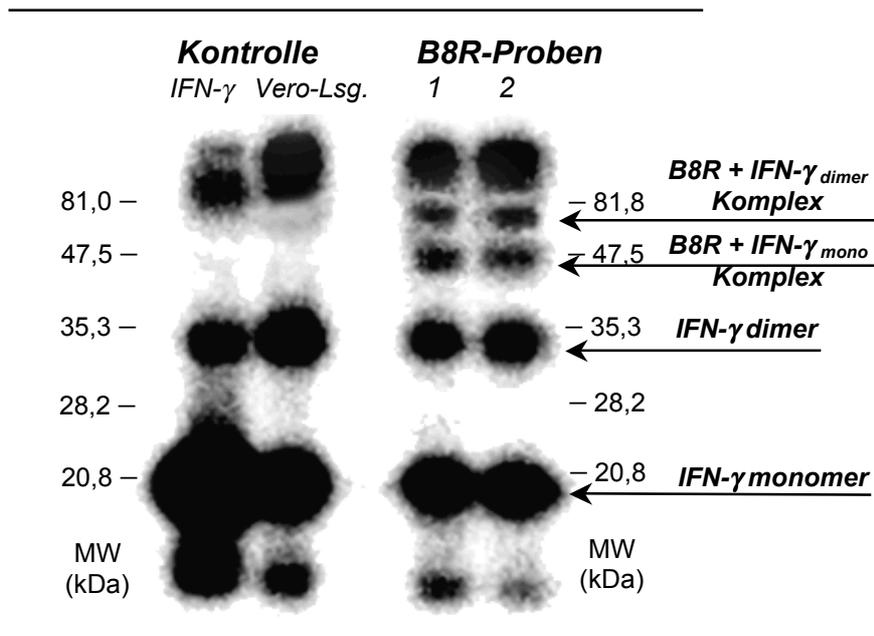


Abbildung 3.17: B8R aus dem Überstand von infizierten Vero-Zellen bindet IFN- γ . Die beiden B8R-Proben stammen aus zwei unterschiedlichen Infektionschargen.

Zur genaueren Bestimmung des Molekulargewichtes des B8R-Virorezeptors aus dem Kulturüberstand von infizierten Vero Zellen wurde ein 10 %iges SDS-Gel mit einer Trennauflänge von 17 cm hergestellt. Die Qualität der Auftrennung in diesem Gel (Abbildung 3.18 auf Seite 86) ist deutlich besser, so daß eine genauere Abschätzung der Molekulargrößen für die Banden möglich ist. Das Gel sollte auch Aufschluß über die stöchiometrischen Bindungsverhältnisse zwischen B8R und IFN- γ bringen. Da im Molekularbereich bis 50 kDa die Auftrennung im Mini-Gel ausreichend war, wurde beim Lauf des 17 cm-Geles der Schwerpunkt auf eine Trennung der Proteine im höhermolekularen Bereich gelegt. Bei der Auswertung der Autoradiographie des Gel-Shift-Assays (Abbildung 3.18) wurde ein Komplex aus B8R und monomerem IFN- γ mit einer Molekulargröße von 50 kDa bis 54 kDa identifiziert (Komplex 1). Komplex 2 mit einer Masse von 73 kDa bis 77 kDa wurde als B8R mit einem dimeren IFN- γ bestimmt. Oberhalb des Molekularmarkers mit der Größe 106 kDa konnte ebenfalls noch eine Bande festgestellt werden (Komplex 3). Unter Berücksichtigung der bekannten Masse von rhuIFN- γ von 33,5 kDa für das Dimer, zeichnet sich folgendes Bild ab: B8R aus dem Überstand von mit *Vaccinia Virus* VR-119 infizierten Vero Zellen hat eine Molekulargröße von ca. 38 kDa bis 42 kDa. Das Gel veranschaulicht auch die stöchiometrischen Verhältnisse bei der Bindung der beiden Proteine untereinander. Komplex 3 ist aus einem IFN- γ Dimer und zwei B8R-Proteinen zusammengesetzt.

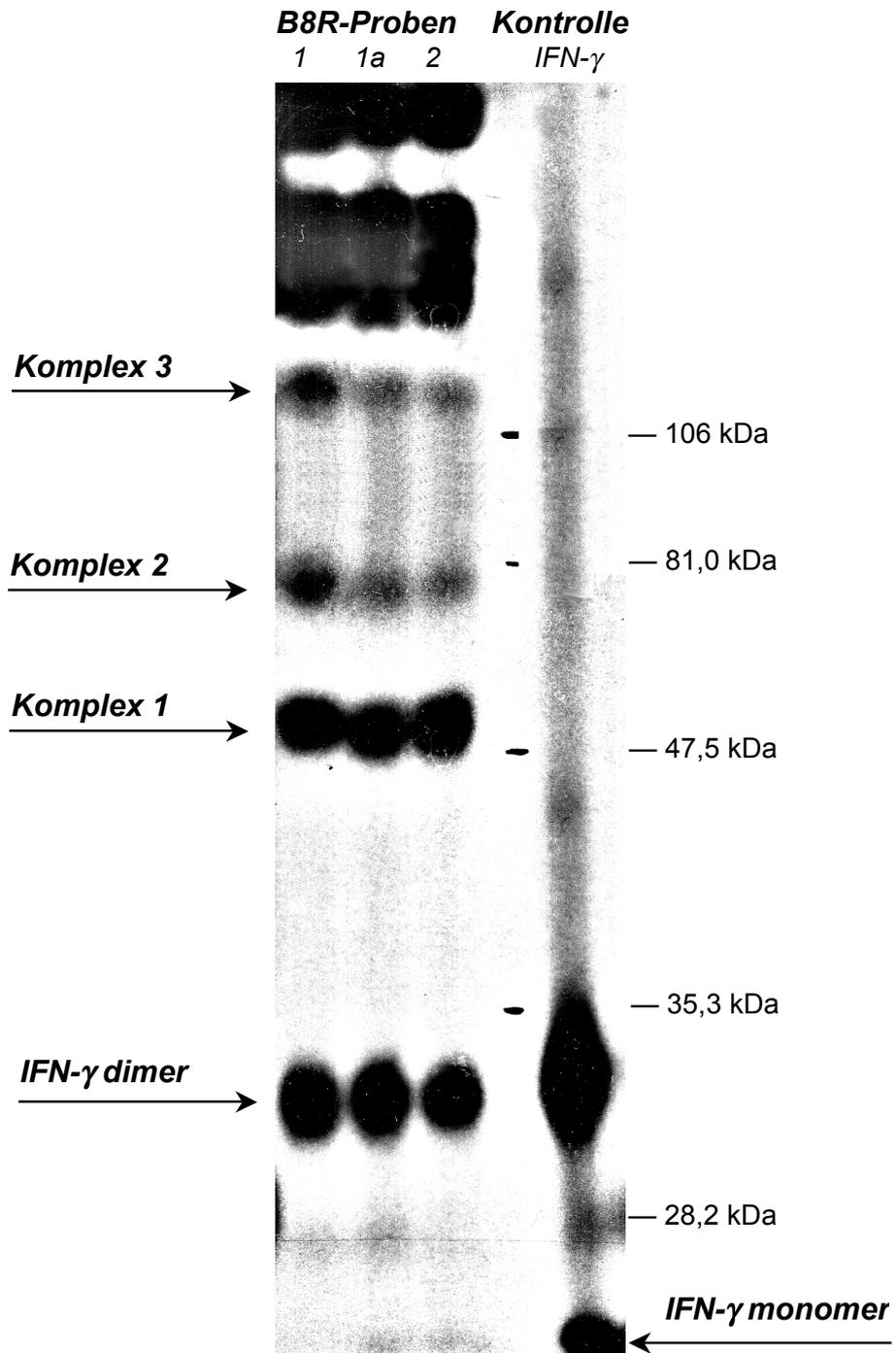


Abbildung 3.18: Autoradiographie vom Gel-Shift-Assay. Das 17 cm lange 10 % SDS-Gel wurde zur Identifizierung von Komplexen von radioaktiv markiertem huIFN- γ und B8R nach Crosslinking Reaktion angefertigt. Bei den B8R Proben handelt es sich um Kulturüberständen von infizierten Vero Zellen aus zwei Infektionschargen (1; 2). Probe 1a ist eine Verdünnung von Probe 1.

3.5.3 Bindungsversuche mit rekombinantem B8R aus E.coli

Nachdem mit natürlich hergestelltem B8R aus Vero Zellen eine Interaktion zwischen IFN- γ und B8R im Gel-Shift-Assay zweifelsfrei festgestellt werden konnte, wurde alle hergestellten

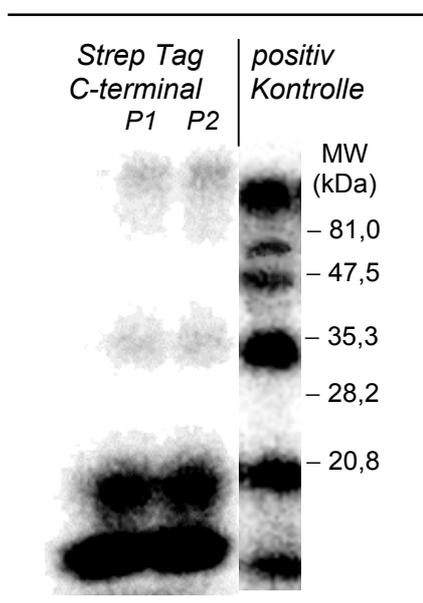


Abbildung 3.19: Autoradiographie eines Gel-Shift-Assay mit zwei Chargen von rekombinantem B8R-Fusionsprotein mit Strep Tag (C-terminal).

rekombinanten B8R-Fusionsproteine auf eine Bindung mit IFN- γ untersucht. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Gel-Shift-Assay eine B8R Probe aus infizierten Vero Kulturüberständen mit eingesetzt. In Abbildung 3.19 ist die Autoradiographie eines Gel-Shift-Assays mit zwei Chargen hochaufgereinigtem B8R Strep Tag Fusionsproteinen (C-terminal) dargestellt. Bei dem eingesetzten Fusionsprotein konnte keinerlei Bindung zu huIFN- γ beobachtet werden. Ebenfalls konnte keine Bindung von IFN- γ und B8R His Tag Fusionsprotein (N-terminal) festgestellt werden. In Abbildung 3.20 ist auf der rechten Seite auch eine Probe aufgetragen die nach dem Protokoll in Abschnitt 2.4.3 behandelt wurde.

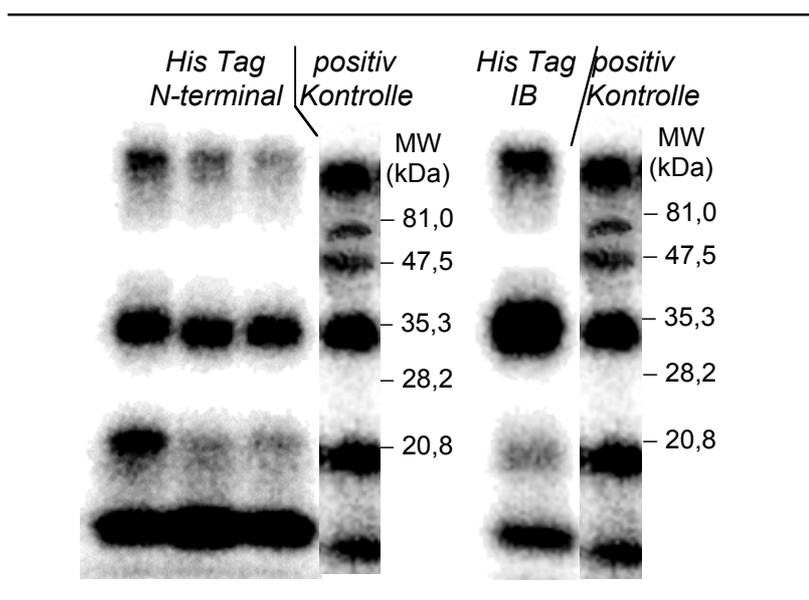


Abbildung 3.20: Rekombinant hergestellte B8R Fusionsproteine im radioaktivem Gel-Shift-Assay. Die drei Proben His Tag N-terminal wurden nach dem Protokoll für lösliche Proteine produziert. Bei der His Tag IB (inclusion body) Probe (rechts) konnte kein Interaktion mit IFN- γ nachgewiesen werden..

3.5.4 Bindungsversuche mit rekobinantem B8R aus CHO Zellen

Der Überstand von CHO Zellen, die durch eine stabile oder transiente Transfektion (Abschnitt 2.10.5) das B8R Gen trugen, wurde ebenfalls im radioaktiven Gel-Shift-Assay auf aktives B8R-Protein untersucht. Es konnte jedoch in keiner Probe eine Komplexbildung zwischen IFN- γ und B8R nachgewiesen werden.

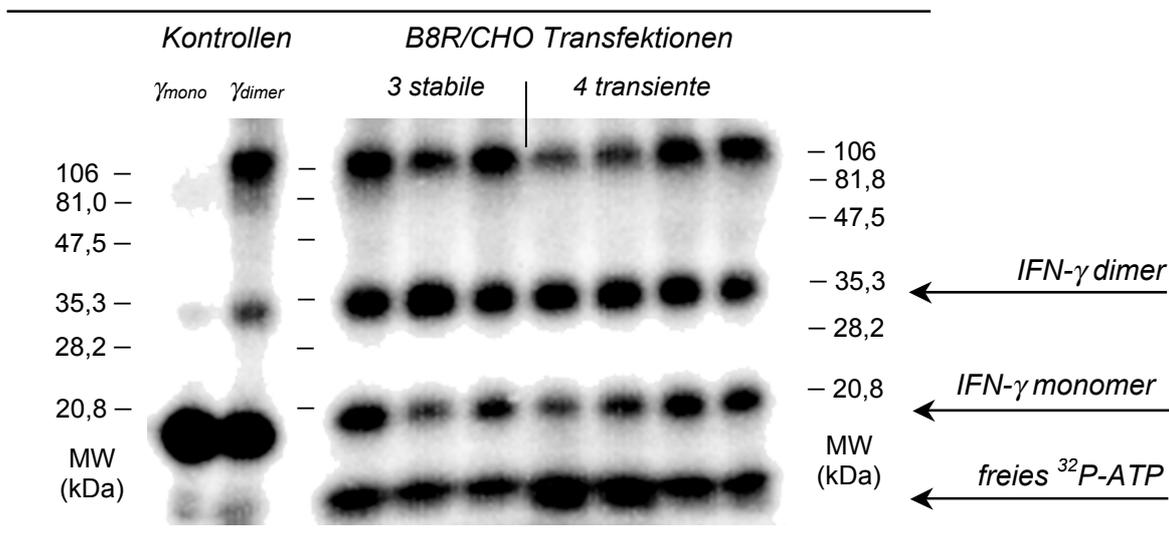


Abbildung 3.21: Kontrolle der verschiedenen CHO Überstände auf Expression von nativem B8R im radioaktivem Gel-Shift-Assay.

3.5.5 B8R aus drei verschiedenen Zelllinien bindet huIFN- γ

Die Tatsache, daß bei der Vermehrung von *Vaccinia Virus* nicht nur die von der ATCC empfohlenen Vero Zellen zum Einsatz kamen, ist auf ein Vertauschen von Zelllinien zurückzuführen. Die Ergebnisse einer ungewollten Infektion von L929 und A549 Zellen waren jedoch so vielversprechend, daß mit dem Kulturüberstand dieser Zellen Experimente angestrebt wurden. Darüber hinaus konnte die Beobachtung gemacht werden, daß eine PFU-Bestimmung mit L929 Zellen wesentlich effektiver geleistet werden kann. In Experimenten, in denen alle drei Zelllinien mit dem gleichen Virustiter infiziert wurden, konnte kein Unterschied bei der Virulenz für die verschiedenen Zellen festgestellt werden. Die genaue und effektive Bestimmung der PFU bei der Zelllinie L929 ist durch eine extrem scharfe Abgrenzung zwischen letalen und vitalen Zellen möglich.

Die Kulturüberstände der Zelllinien L929 und A549 wurden auf IFN- γ bindendes B8R untersucht. In Abbildung 3.22 ist das Ergebnis eines radioaktiven Gel-Shift-Assays abgebildet, in dem je drei Proben einer jeden Zelllinie aufgetragen wurden. In allen Fällen konnten

Komplexe aus radioaktiv markiertem IFN- γ und B8R-Protein nachgewiesen werden. Unterschiede an den B8R-Proteinen aus den verschiedenen infizierten Zelllinien sind anhand dieses Gels nicht festzustellen. Alle im Gel auftretenden Komplexe, in Form von IFN- γ als Monomer gekoppelt an B8R oder IFN- γ als Dimer gekoppelt an B8R, zeigen ein identisches Laufmuster im Gel.

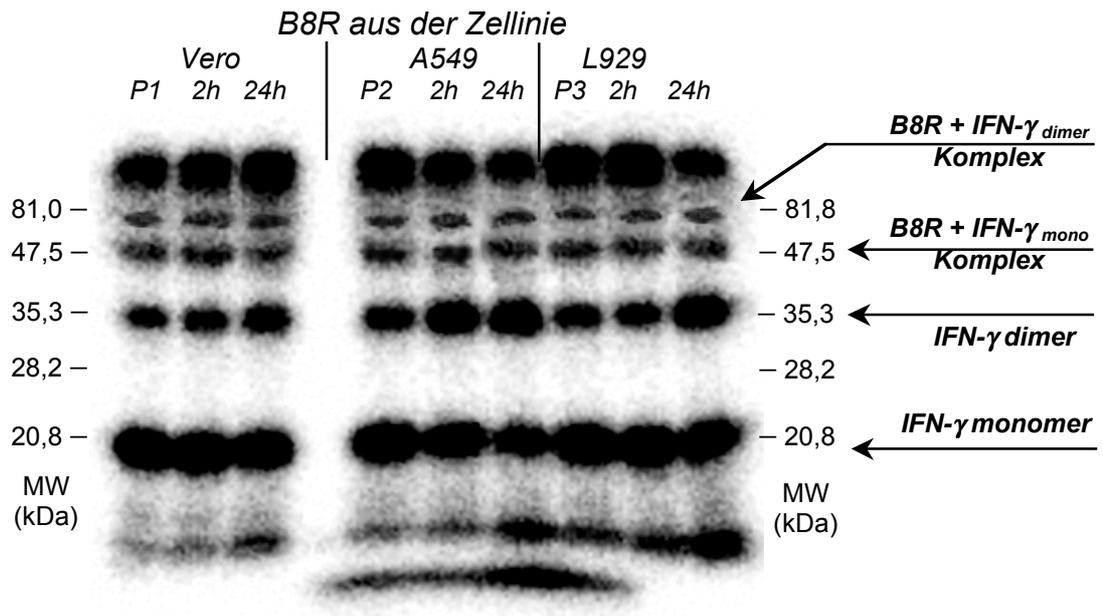


Abbildung 3.22: B8R aus drei verschiedenen Zelllinien bindet huIFN- γ . P1; P2; P3: Überstand von infizierten Zellen, nach 36 Stunden Inkubation. Kulturüberstand der verschiedenen Zellen aus der kinetischen Untersuchung zur B8R Expression.

3.5.6 Bindungsversuche von B8R an huIFN- γ und muIFN- γ

Alcami & Smith (Alcami *et al.*, 1995) publizierten eine durch B8R hervorgerufene Bindung und Inaktivierung von ratIFN- γ und huIFN- γ . In den gleichen Experimenten, die sie 1995 veröffentlichten, stellten sie fest, daß B8R jedoch nicht in der Lage ist, die Wirkung von murinem IFN- γ zu blockieren. Bei einem Vergleich der IFN- γ Aminosäuresequenzen von verschiedenen Spezies (hu; mu; ra; ov) erscheinen die Homologien evident. Bei einem separaten Vergleich von mouse IFN- γ und rat IFN- γ ist eine Aminosäureidentität von 85 % festzustellen. Mit dem B8R-Protein aus drei unterschiedlichen Zelllinien wurde das Ergebnis aus der Publikation überprüft. Dazu wurden huIFN- γ sowie muIFN- γ auf völlig identische Weise mit den drei Zellüberständen inkubiert, der Crosslinking Reaktion unterzogen und dann im Gel-Shift-Assay eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 dargestellt. Wie bereits aus dem vorherigen Experiment bekannt war, hat B8R die Potenz huIFN- γ zu binden, unabhängig davon durch welche Zelllinie das B8R-Protein produziert wurde. Bei muIFN- γ ist das Ergebnis des Assays inhomogen. Eindeutig konnte bei B8R-Protein, das in der humanen Lungencarcinomamzelllinie A549 produziert wurde, eine Bindung an muIFN- γ identifiziert werden. Die Ausbildung der verschiedenen Komplexe bestehend, aus einem IFN- γ Monomer und B8R sowie einem IFN- γ Dimer und B8R, sind zweifelsfrei festgestellt. B8R-Protein aus den anderen beiden Zelllinien hingegen zeigt nicht dieses Bindungsvermögen an muIFN- γ .

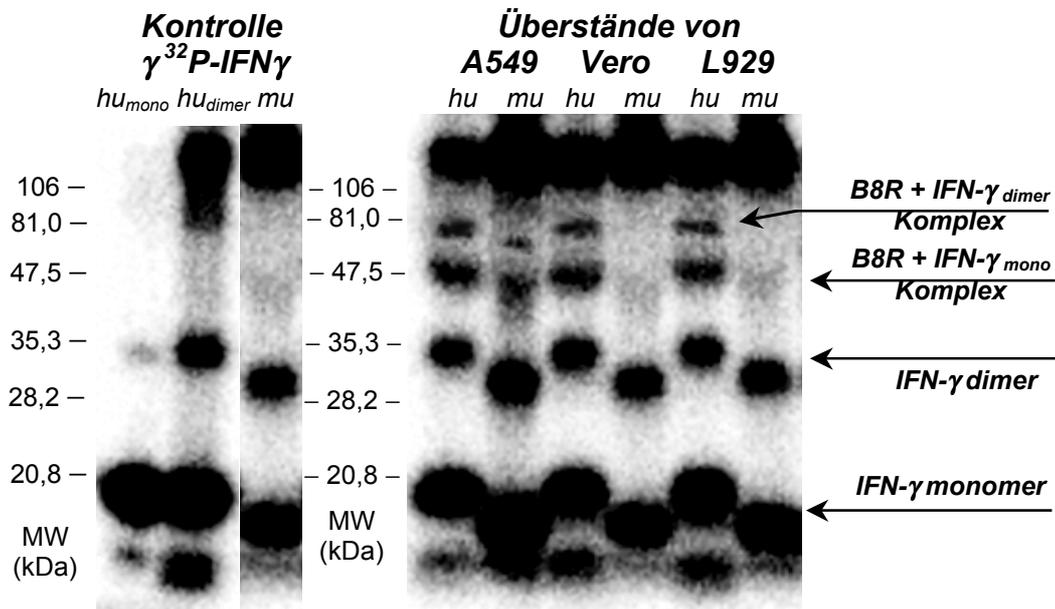


Abbildung 3.23: Radioaktiver Gel Shift Assay. Test auf Bindung von B8R aus drei verschiedenen Zelllinien mit huIFN- γ und muIFN- γ .

Linke Seite Kontrolle: hu_{mono}: huIFN- γ ohne Crosslinking Reaktion; hu_{dimer}: huIFN- γ nach Crosslinking Reaktion; mu: rekombinantes muIFN- γ nach Crosslinking Reaktion; **Rechte Seite Überstände** der drei Zelllinien inkubiert mit huIFN- γ = hu oder muIFN- γ = mu.

Die Ergebnisse der radioaktiven Gel Shift-Assays ergeben zusammengefaßt folgendes Bild: Nach der erfolgreichen radioaktiven Markierung von humanem und murinem IFN- γ konnte gezeigt werden, daß B8R-Protein im Überstand von drei verschiedenen, mit *Vaccinia Virus* VR-119 infizierten Zelllinien vorhanden ist.

Bei der Bindung von B8R an huIFN- γ konnten die stöchiometrischen Bindungsverhältnisse identifiziert werden. Danach können zwei B8R-Proteine an ein IFN- γ Dimer binden. Die Größe des natürlich produzierten Viroreptors beläuft sich auf 38 kDa bis 42 kDa. Auf Grund der theoretisch berechneten Größe von 31,1 kDa liegt die Vermutung nahe, daß das natürlich produzierte B8R-Protein glykosiliert vorliegt. Die Bindungsversuche zwischen mouse IFN- γ und B8R-Protein erbrachten ein uneinheitliches Ergebnis. Von den drei verwendeten infizierten Zelllinien war nur das B8R-Protein, welches durch A549 Zellen produziert wurde, in der Lage mouse IFN- γ zu binden. Bei rekombinant hergestelltem B8R-Protein aus *E.coli* als auch aus CHO Zellen konnte keine Bindung zu IFN- γ gezeigt werden.

3.6 Molekularbiologische Herstellung der chimären B8R/IFNGR Konstrukte

Die Alignmentanalyse zwischen B8R und dem IFNGR1 haben die Konstruktion der chimären Rezeptoren nachhaltig mitbestimmt. Als Signalsequenz wurden beim ORF B8R die ersten zwölf Aminosäuren bis einschließlich Ile12 identifiziert (NCBI signal peptid prediction). Beim Sequenzvergleich zwischen B8R und IFNGR1 wurden bis zur Aminosäure Thr209 Cluster mit signifikanten Homologien identifiziert. ORF B8R hat mit 272 AS insgesamt 44 AS mehr als die ECD des IFNGR1. Die Funktion dieser C-terminalen AS ist unbekannt. Bemerkenswert ist der hohe Anteil von basischen AS und der daraus resultierende hohe isoelektrische Punkt für diesen Bereich von 10,1. Bei der Herstellung der chimären Rezeptorkonstrukte wurde auf den C-terminalen Bereich aus den hier angegebenen Gründen verzichtet.

3.6.1 Konstrukt B8R/IFNGR1

Zur Herstellung der chimären Rezeptorkonstrukte wurde mir von unserem Kooperationspartner Herrn Dr. S. Kotenko aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Pestka aus Piscataway, New

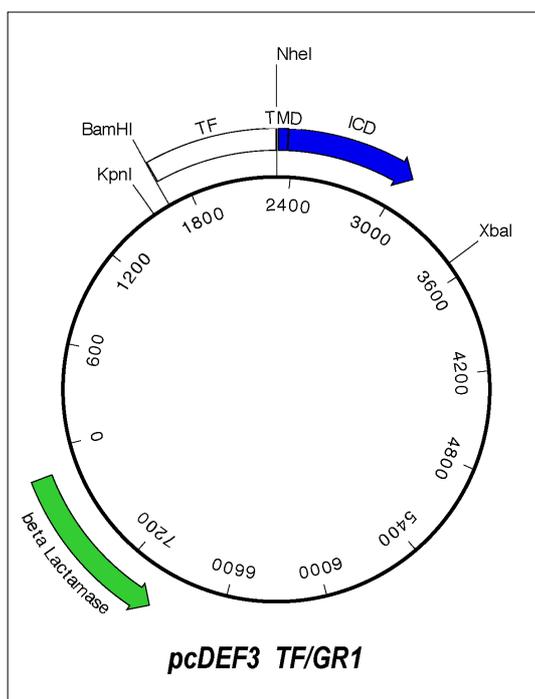
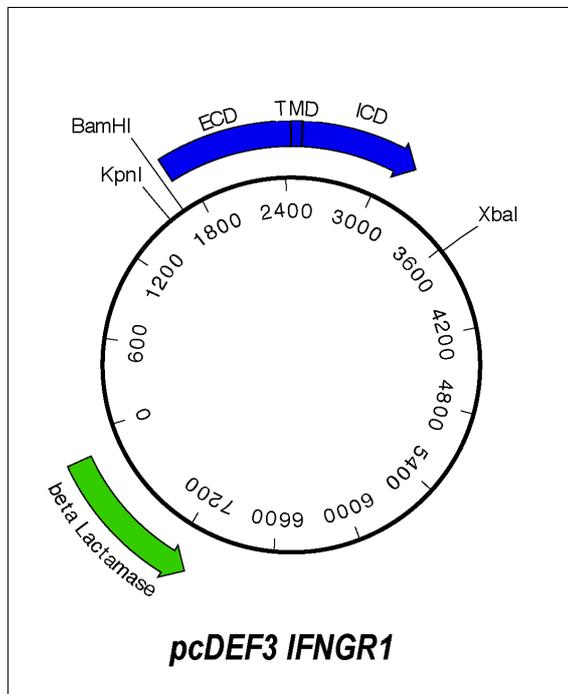


Abbildung 3.24: Ausgangsplasmid pcDEF3 TF/GR1. Auf dem Plasmid befindet sich das beta Lactamasegen, das für eine positive Selektionierung in ampicillinhaltigen Medien verantwortlich ist.

Jersey, USA, die cDNA der beiden IFN- γ Rezeptoren IFNGR1 und IFNGR2 großzügigerweise zur Verfügung gestellt. Die cDNA-Fragmente wurden über PCR modifiziert und in die entsprechenden Expressionsplasmide für eine spätere Transfektion in CHO Zellen kloniert.

Für die Konstruktion des Zielplasmides pcDEF3 B8R*/IFNGR1 wurde eine dreistufige Klonierungsstrategie entwickelt. In einem ersten Schritt wurde eine Umklonierung des IFNGR1 Genes aus dem Plasmid pcDNA3 IFNGR1 in den Vektor pcDEF3 vorgenommen. Dazu wurde aus dem Plasmid pcDNA3 IFNGR1 mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *Xba* I das vollständige *IFNGR1* Gen herausgeschnitten und

in den ebenfalls mit *BamH I* und *Xba I* geschnittenen Vektor pcDEF3 (Abbildung 3.24) ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pcDEF3 IFNGR1 (Abbildung 3.25) und wurde durch eine Identifikationsrestriktion auf Integrität überprüft.



Das verkürzte ORF B8R wurde in einer PCR Amplifikation mit den beiden Primern B8R Chimer 2 und B8R *BamH I* rv amplifiziert. Durch die Wahl dieser Primer wurde ein Nukleinsäurestrang erzeugt, der jeweils am 3' und am 5' Ende eine *BamH I* Schnittstelle aufweist. Der Primer Chimer 2 wurde derart konstruiert, daß die 12 Aminosäure lange Signalsequenz vom B8R Gen nicht mitamplifiziert wird.

Abbildung 3.25: Schematische Darstellung des Zwischenproduktes pcDEF3 IFNGR1.

Primer: B8RChimer 2



Der Primer B8R *BamH I* rv bindet in einem Bereich des B8R Gens, der für die endgültige Konstruktion der chimären Rezeptoren unbedeutend ist und in einem folgenden Schritt wieder entfernt wird. Dieser Abschnitt wurde ausgewählt, weil zur Einfügung einer *BamH I* Restriktionsstelle nur eine Base mutiert werden muß.

Primer: B8R *BamH I* rv

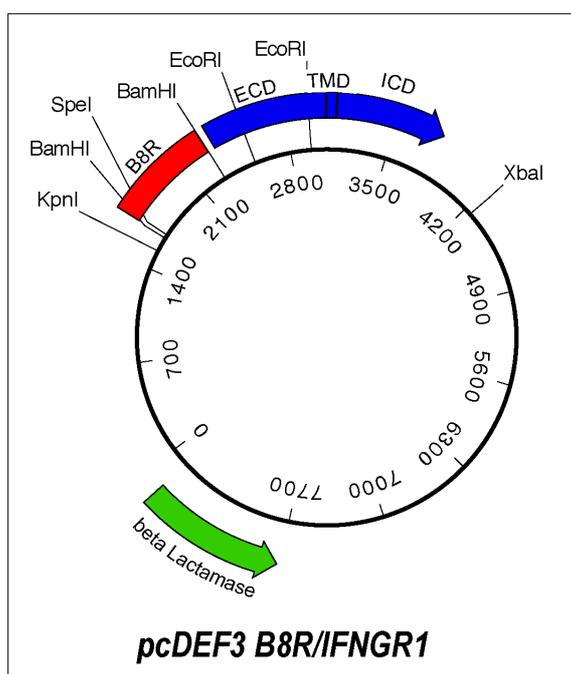


Das PCR-Amplifikationsprodukt wurde nach Aufreinigung mit dem Restriktionsenzym *BamH I* geschnitten.

<i>Bam</i> H I	<i>PCR-Amplifikationsprodukt ORF B8R</i>	<i>Bam</i> H I
GATCC A	AAT AGT ATA CAC ... >>> ... ACA TGT GCA ATT G	
G T	TTA TCA TAT GCG ... >>> ... TGT ACA CGT TAA CCTAGG	
	Asn Ser Ile His ... >>> ... Thr Cys Ala Ile	

Abbildung 3.26: PCR-Amplifikationsprodukt nach dem Restriktionsverdau mit *Bam*H I.

Ebenso wurde mit dem Plasmid pcDEF3 IFNGR1 verfahren. Zur Verhinderung einer sofortigen Ringschlußligierung wurde das Plasmid für eine Stunde mit Shrimp Alkaline Phosphatase von *Amersham Pharmacia Biotech* dephosphoryliert.



Die anschließende Ligation des Inserts B8R mit dem Plasmid wurde in einem Mengenverhältnis von 3:1 vorgenommen. Dadurch wurde die angestrebte Inserierung des B8R Gens in das Plasmid aus rein stochastischer Sicht vergrößert. Das entstandene Zwischenprodukt pcDEF3 B8R/IFNGR1 (Abbildung 3.27) hatte eine Größe von 8.714 bp. Die Integrität des Gens wurde durch einen Restriktionsverdau mit *Eco*R I und *Spe* I untersucht. Bei korrekter Inserierung des B8R-Abschnittes war das Restriktionsfragment anhand der entstandenen Größe eindeutig zu identifizieren.

Abbildung 3.27: Zwischenprodukt pcDEF3 B8R/IFNGR1. Das B8R Insert wurde durch einen *Eco*RI/*Spe*I Restriktionsverdau auf korrekte Integrität untersucht.

Das Zielplasmid pcDEF3 B8R*/IFNGR1 (Abbildung 3.28) wurde mit Hilfe einer MID-PCR mit den beiden Primern IFNGR 8AS und B8R* rv hergestellt.

Primer: IFNGR 8AS

8AS von ECD IFNGR1

TMD IFNGR1

5' Ph - **ATT TTC AAT AGC AGT ATA AAA** GGT TCT CTT TGG 3'

Der Primer ist so konstruiert, daß die letzten acht AS der extrazellulären Domäne des IFNGR1 ebenfalls amplifiziert werden (kursiv, fett). Bei Alignmentstudien wurde diesem acht AS langen

Linkerbereich eine mögliche Bedeutung bei der optimalen Anpassung des Rezeptors an das IFN- γ zugewiesen. Da bei ORF B8R eine solche Sequenz nicht vorhanden ist, wurde dieser Bereich als extrazelluläres Linkerstück mit in die Herstellung des chimären Konstruktes B8R*/IFNGR einbezogen.

Primer: B8R* rv

ORF B8R bis Thr209 (TGT)

5' Ph - TGT CAG ACA TAC TTT CGA ACT CC 3'

Dieser am 5' Ende phosphorylierte Primer bindet an die AS Trp202 (ACC) bis Thr209 (TGT) im

ORF B8R. Die am 3' Ende vorhandene AS Thr209 ist die letzte Aminosäure eines im ORF B8R vorhandenen Clusters, der hohe Homologien mit einem cytosolisch liegenden Bereich des IFNGR1 aufweist. Die mit diesen Primern durchgeführte MID-PCR ergibt ein linearisiertes Plasmid mit einer Länge von 7.929 bp, das durch die Primer am jeweiligen 5' Ende eine Phosphatgruppe aufweist, über die eine Ringschlußreaktion erreicht wird. Die Besonderheit dieser Mutagenese PCR ist in Abschnitt 2.3.5 ausgeführt.

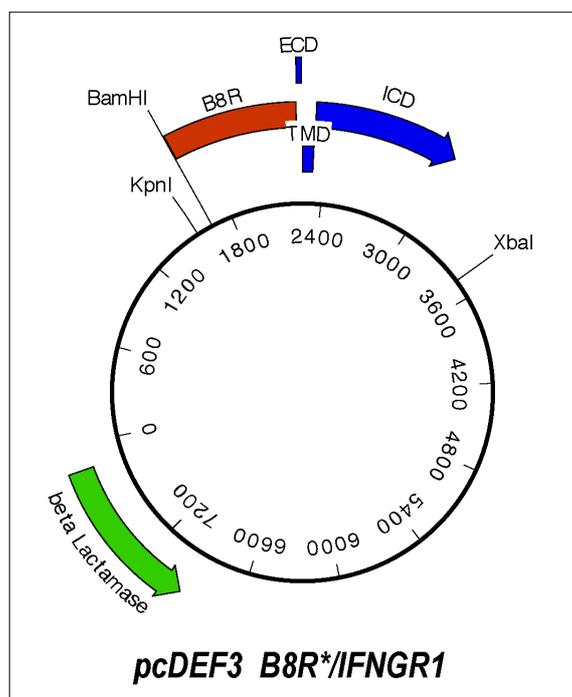


Abbildung 3.28: Schematische Darstellung des Endproduktes pcDEF3 B8R*/IFNGR1.

Im Zielplasmid pcDEF3 B8R*/IFNGR bildet ein 8 AS langer Linkerbereich der extrazellulären Domäne des IFNGR1 den Übergang zwischen dem ORF B8R Fragment und der transmembranen Domäne (Abbildung 3.29).

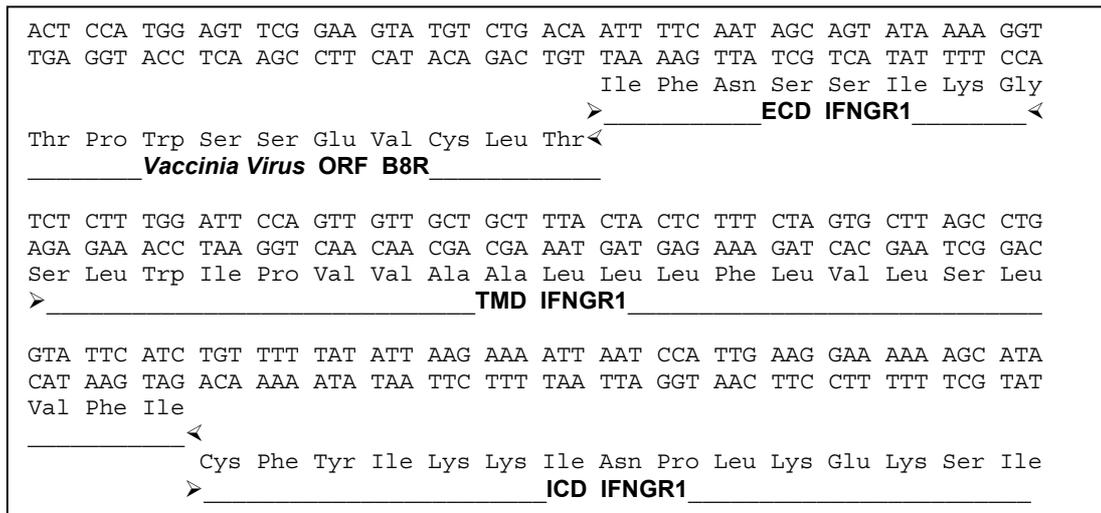


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung des Überganges von der B8R extrazellulären Domäne, den 8 AS Linker, die TMD in die ICD des IFNGR1.

3.6.2 Konstrukt B8R/GR1

Die Konstruktion von B8R/GR1 wurde ebenfalls nach Alignmentstudien und nach Diskussion mit Herrn Dr. S. Kotenko aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Pestka aus New Jersey, USA, vorgenommen. Der Unterschied zu dem Rezeptorkonstrukt pcDEF3 B8R*/IFNGR1 besteht im Übergang vom B8R-Proteinanteil in die Transmembrane Domäne. Es wird darauf

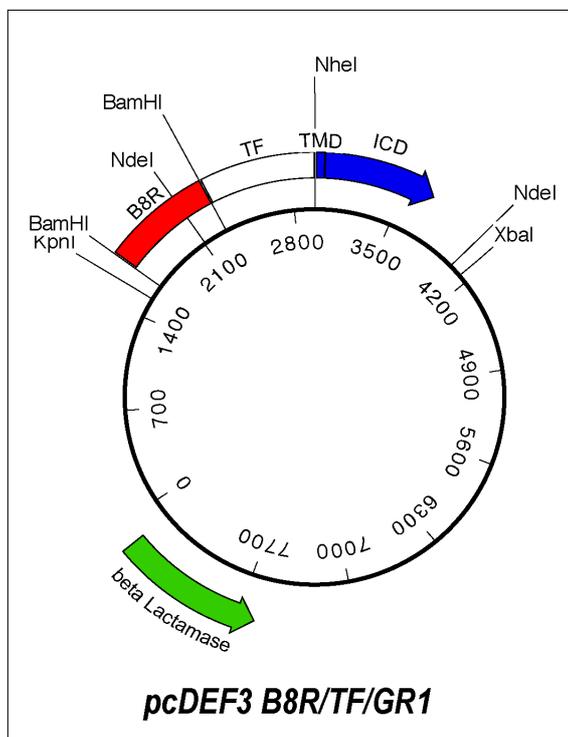


Abbildung 3.30: Schematische Darstellung des 8.596 bp großen Zwischenproduktes pcDEF3 B8R/TF/GR1.

verzichtet eine acht AS lange Sequenz der Extrazellulären Domäne des IFNGR1 als Linkerstück einzubauen. Die Konstruktion verläuft über eine zweistufige Klonierung. Auf Grund eines von unserem Kooperationspartner eingebauten WLA Aminosäuremotives befindet sich im ECD/TMD Übergangsbereich auf DNA Basis eine *NheI* Restriktionsschnittstelle mit der ein kassettenartiger Austausch von Genabschnitten möglich ist.

Im ersten Schritt wurde das Ausgangsplasmid pcDEF3 TF/GR1 (Abbildung 3.24) mit *BamH I* linearisiert und die am 5'Ende vorhandenen Phosphatgruppen mit Shrimp Alkaline

Phosphatase entfernt. Das PCR Amplifikationsprodukt von ORF B8R wurde mit dem Primerpaar B8R Chimer 2 und B8R *BamH I* rv generiert und ebenfalls mit *BamH I* geschnitten. Das Produkt der Restriktion (Abbildung 3.26) wurde mit dem linearisierten pcDEF3 TF/GR1 Plasmid in die Ligation eingesetzt. Das Zwischenprodukt pcDEF3B8R/ TF/GR1 (Abbildung 3.30) hat eine Größe von 8596 bp. Die Inserierung des B8R Genfragmentes wurde mit einer *Nde I* Identifikationsrestriktion kontrolliert. Bei einem korrekten Einbau des ORF B8R-Genamplifikates wurden Nukleinsäurefragmente der Größe 1.928 bp und 6.668 bp gefunden. Im Falle eines Einbaus in verkehrter Richtung wurden Fragmente der Größe 2.206 bp und 6.390 bp identifiziert. Dieser Größenunterschied konnte eindeutig im Agarosegel bestimmt werden und wurde als positiver Beweis gewertet.

Mit den beiden Primern B8Rmut rv und WLA-TMD GR1 wurde zur Erlangung des Zielproduktes eine MID-PCR durchgeführt.

Der Primer B8Rmut rv mutierte die Aminosäure Cys217 zu Glutamin. Dieser Austausch wurde vollzogen, da Cys zur Ausbildung von Disulfidbrücken und somit zur Ausbildung von bedeutenden Konformationsänderungen in der Lage ist. Außerdem wurde bei keinem der Cytokinrezeptorfamilie angehörigem Protein ein Cystein in unmittelbarer Nähe der Transmembranen Domäne gefunden.

Primer: B8Rmut rv

mut zu Gln ORF B8R bis Gln217 (CTG)
 5' Ph - CTG TGT ATA TAC ACT CTT TTT AGG TGT CAG AC 3'

Der zweite Primer setzt direkt an das WLA Motiv und Teile der TMD an und ist für die vorwärts gerichtete Amplifikation verantwortlich.

Pimer: WLA-TMD GR1

W L A - Motiv TMD IFNGR1
 5' Ph - TGG CTA GCG CCA GTT GTT GCT GCT TTA C

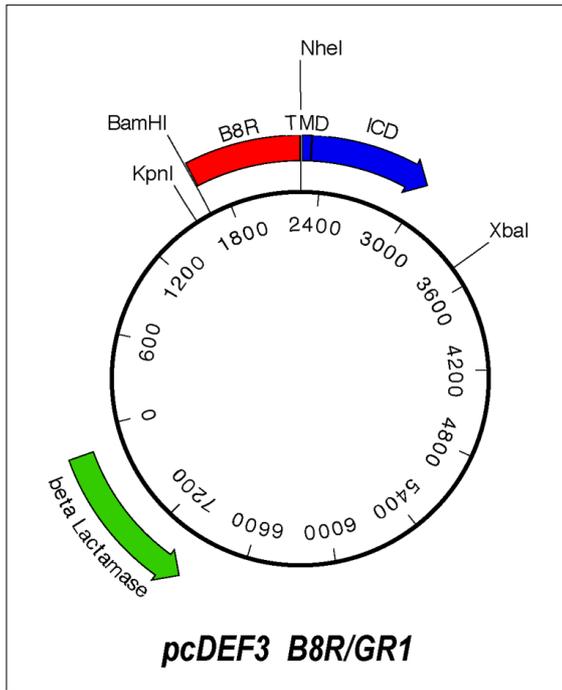


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung des Zielplasmides pcDEF3 B8R/GR1.

Das MID-PCR Produkt wurde aus dem Gel aufgereinigt und zur Ringschlußreaktion für 16 Stunden mit T7 Ligase bei 16° C inkubiert. Das Zielplasmid pcDEF3B8R/GR1 (Abbildung 3.31) hatte eine Größe von 7.926 bp.

Der Bereich um die Transmembrandomäne ist im pcDEF3 B8R/GR1 charakteristisch. Zum einen ist das B8R Fragment acht AS länger als im pcDEF3 B8R*/IFNGR1 Konstrukt, zum anderen befindet sich direkt im Anschluß an die B8R Sequenz, in einem Bereich der bereits der Transmembranen Domäne zugeordnet wird, das WLA Motiv. Diese Restriktionskassette (*Nhe* I) hat große Ähnlichkeit mit Sequenzen, wie sie auch in einigen

Transmembranen Domänen von anderen Cytokinen vorkommen. Direkt an diesen drei Aminosäure langen künstlichen Bereich schließt sich die TMD an. Auf Grund dieses künstlich generierten Bereiche ist die Transmembrane Domäne um eine Aminosäure, im Vergleich zur natürlichen TMD des IFNGR1, verkürzt.

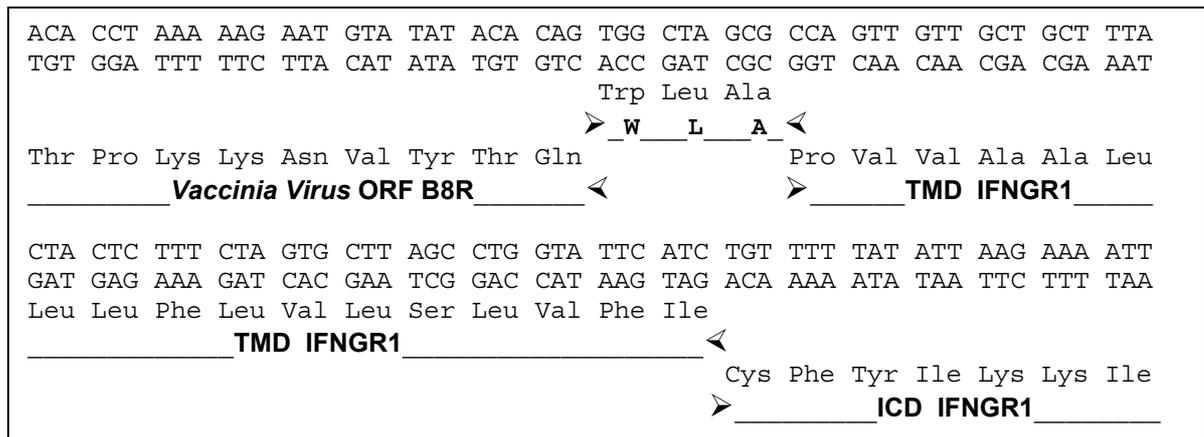


Abbildung 3.32: Transmembranbereich im Plasmid pcDEF3. B8R/GR1.

3.6.3 Konstrukt B8R/IFNGR2

Für die Herstellung des chimären B8R/IFNGR2 wurde mir als weiterer Ausgangsvektor von unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Pestka das Plasmid pcDEF3 IFNGR2

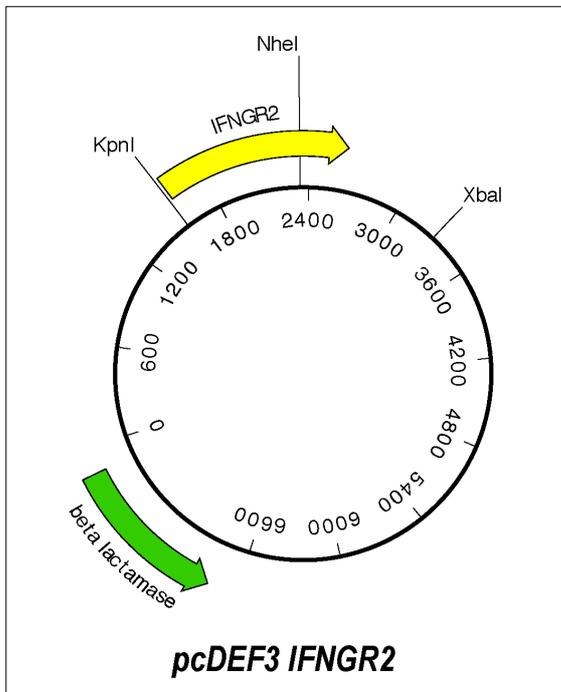


Abbildung 3.33: Darstellung des Ausgangsvektors pcDEF3 IFNGR2.

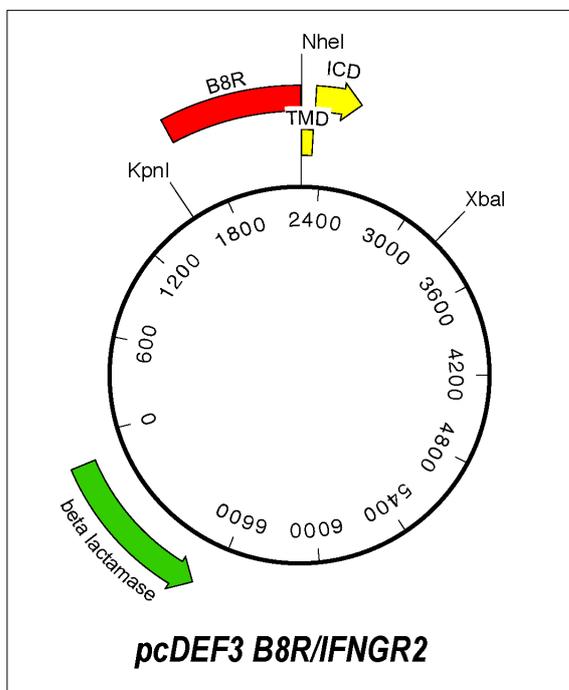


Abbildung 3.34: Schematische Darstellung des Zielplasmides pcDEF3 B8R/IFNGR2. TMD und ICD von IFNGR2 sind gelb dargestellt.

(Abbildung 3.30) zur Verfügung gestellt. Dem *IFNGR2* Gen wurde innerhalb der Transmembran Domäne eine *Nhe I* Restriktionsstelle eingefügt. Sie erlaubt eine leichte Umklonierung von ECD bzw. TMD + ICD zur Herstellung von verschiedenen chimären Rezeptorkonstrukten. Unter Ausnutzung dieser Möglichkeit wurden das Plasmid B8R/IFNGR2 (Abbildung 3.34) hergestellt. Dazu wurde dem Plasmid pcDEF3 B8R/GR1 (Abbildung 3.31) die TMD und die ICD des IFNGR1 zwischen den Restriktionsstellen *Nhe I* und *Xba I* entfernt und durch die TMD und ICD des IFNGR2 ersetzt. Die Überprüfung der korrekten Integrität des IFNGR2 Fragmentes wurde durch Sequenzierungen mit entsprechenden Primern durchgeführt. Der Übergang vom B8R Fragment über die TMD in die ICD des IFNGR2 ist in Abbildung 3.35 dargestellt. Das WLA Motiv mit der *Nhe I* Restriktionsschnittstelle zu Beginn der TMD ist hervorgehoben. Die Transmembran Domäne umfaßt im nativen IFNGR2 21 Aminosäuren. Zur Einfügung des hervorgehobenen WLA Motives mit der *Nhe I* Restriktionsstelle wurden die ersten drei AS, unter Beibehaltung der TMD-Gesamtlänge von 21 AS, mutiert. (s. Sequenz: Anhang C).

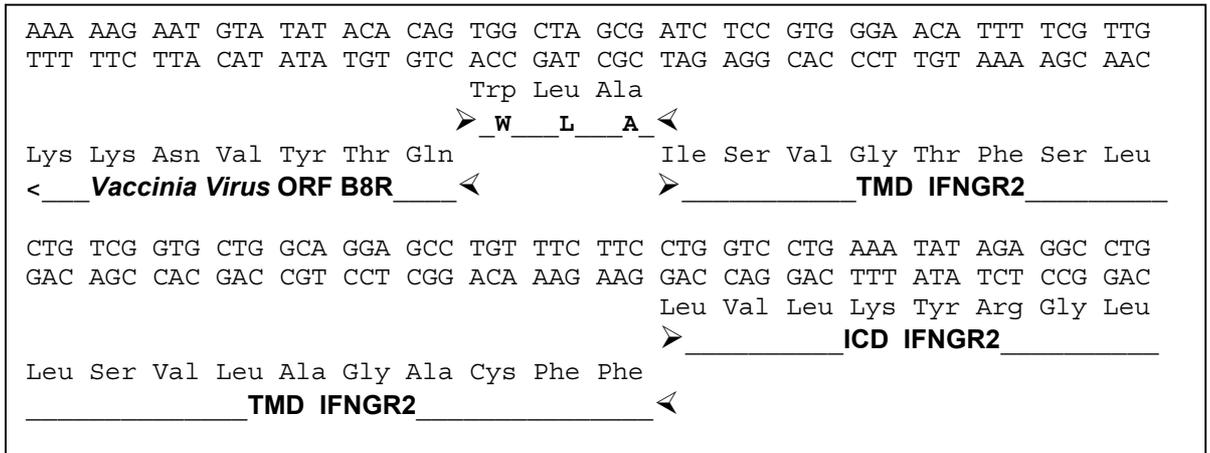


Abbildung 3.35: DNA und AS Darstellung des Überganges von der extrazellulären in die intrazelluläre Domäne im chimären Konstrukt pcDEF3 B8R/IFNGR2.

3.6.4 Durchflußzytometrische Bestimmung von MHC I Proteinen

Alle hergestellten chimären Konstrukte (B8R/IFNGR1; B8R/GR und B8R/IFNGR2) wurden im Labor von Herrn Prof. Dr. S. Pestka in die beiden Zelllinien CHO 16-9 und CHO Q21 transfiziert (Abschnitt 2.10.1). 1×10^7 CHO-Zellen wurden mit 5 µg hochaufgereinigter Plasmid-DNA nach dem *Qiagen* Protokoll mit Super Fect Transfection Reagent behandelt (Abschnitt 2.10.5). Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank (37° C; 5% CO₂; hohe Luftfeuchtigkeit) wurde eine Selektionierung der Klone vorgenommen. Kriterium für die Selektionierung der Zellen war ein vitales Erscheinungsbild und eine offensichtliche Teilung der adhären Zellen in der Kulturschale mit Selektionsmedium. Nach sieben weiteren Tagen und mehrmaliger Passagierung der Zellen in frisches Medium, waren für das folgende Experiment ausreichend Zellen vorhanden. In Kulturflaschen mit einer Fläche von ca. 70 cm² wurden ca. 5×10^5 Zellen ausgesät. Diese zu Beginn eingesetzte Anzahl von Zellen ist so gewählt, daß nach dreitägiger Inkubation mit IFN-γ der Konzentration 1.000U/ml noch immer ein Konfluieren der Zellen nicht stattgefunden hat. Mittels einer trypsinhaltige Lösung wurden die CHO-Zellen aus der Flasche geerntet und nacheinander mit dem Primär- und Sekundärantikörper zur MHC-I Erkennung inkubiert (Abschnitt 2.7).

Als Kontrollen wurden CHO 16-9 Zellen mit einem IFNGR2 tragenden Plasmid und CHO Q21 Zellen mit einem IFNGR1 tragenden Plasmid transfiziert und parallel behandelt. Bei der anschließenden Messung im FACS konnten auf den CHO-Zellen, in die die Plasmide mit den chimären B8R/IFNGR-Konstrukten transfiziert worden waren, keine MHC-I Proteine auf der Oberfläche detektiert werden. Bei den Kontrollzellen war die Detektierung von MHC-Klasse-I Proteinen erfolgreich gewesen, sodaß eine mißglückte Transfektion der Plasmide mit den chimären Konstrukten ausgeschlossen werden kann.

Die Expression der chimären Rezeptoren auf der Oberfläche der CHO Zellen wurde in einem IFN-γ *in vivo* Bindungsassay überprüft. Dazu wurden die CHO Zellen für eine Stunde bei 4° C unter Schütteln mit einem Aliquot ³²P-radioaktiv markiertem huIFN-γ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS pH 7,5 so oft gewaschen, daß in der Waschlösung keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Die Zellen wurden in 500 µl PBS aufgenommen und zur Bestimmung der Radioaktivität in den Gamma Counter gegeben. Als Kontrollzellen wurden normale CHO Zellen und CHO 16-9 Zellen (somatische Hybridzelle die den huIFNGR1 exprimiert) exakt gleich behandelt. Die Messung der Radioaktivität hat eindeutig gezeigt, daß die Zellen mit den chimären Rezeptoren (B8R/IFNGR1 und B8R/IFNGR2) IFN-γ mit hoher

Affinität binden. Der gemessene Wert der Radioaktivität lag bei diesen Zellen nur 12 % bis 18 % niedriger als bei den CHO Zellen, die den IFNGR1 auf der Oberfläche exprimieren. Nachfolgend sind für den *in vivo* Bindungsassay die absoluten Zahlen der Radioaktivitätsmessung aufgeführt:

<i>Probe</i>	<i>cpm</i>	<i>%</i>
Kontrolle CHO 16-9 Zellen	518.520	100.0
Kontrolle CHO	1.461	0.3
B8R/IFNGR1	457.419	88.2
B8R/GR1	425.322	82.0
B8R/IFNGR2	447.979	86.4

Tabelle 3.7: Radioaktivitätsmessung bei den Proben des huIFN- γ *in vivo* Bindungsassays.

„Ich kann es nicht glauben, was ich sehe“, murmelt Rabbi Löw in seinen Bart, „dort liegt ein lebendiges Wesen. Der Lehm ist Fleisch geworden, ruhig atmend hebt und senkt sich die Brust, wie bei einem Schlafenden.“

Harry Mulisch „Der Golem“ aus „Die Prozedur“

4. Rezension

Die Fähigkeit von Viren in Wirtszellen zu überleben und sich zu vermehren hängt davon ab, in welchem Ausmaß das Virus das wirtseigene Immunsystem neutralisieren und blockieren kann. Poxviridae besitzen ein breites Spektrum an Proteinen, die ausschließlich mit Proteinen der Wirtszelle interagieren, die nach einer viralen Infektion gebildet werden. Daß die überwiegende Anzahl von viralen Infektionen für den Menschen glimpflich und ohne bleibende Schäden für den Organismus ablaufen, unterstreicht den wahren Wert, den das Immunsystem bei der Abwehr von obligaten Zellparasiten, zu deren Gruppe auch die Viren gehören, einnimmt. Schlüsselproteine bei der Abwehr einer viralen Infektion sind die Interferone, die mit ihrer antiviralen wie auch antiproliferativen Wirkung maßgeblichen Anteil bei der Bekämpfung haben. Da jedoch in der Biologie die Aussage der Darwinschen Lehre „survival of the fittest“ immer noch die treibende Kraft der Evolution darstellt, ist es nicht verwunderlich, daß die Gruppe der Poxviridae es geschafft haben, auch dieses immanente bedeutende Protein des Immunsystems auszuschalten. Das *Vaccinia Virus*, welches zu der Gruppe der Orthopoxviren gehört, besitzt mit dem Translationsprodukt des Gens ORF B8R ein löslich vorliegendes Protein mit der Fähigkeit, IFN- γ von verschiedenen Spezies zu binden. Dadurch steht das IFN- γ nicht mehr dem natürlichen Rezeptor zur Verfügung und kann somit auch nicht die Signaltransduktion durch Anbindung an denselben auslösen.

4.1 Klonierung und Sequenzalignment

An Hand der Veröffentlichung der DNA Sequenz von *Vaccinia Virus* durch Goebel *et al.* (Goebel *et al.*, 1990) und Daten aus der SWISS-PROT Datenbank wurden Primer generiert, die in einer PCR das B8R Gen aus dem Kulturüberstand von mit *Vaccinia Virus* (Stamm Western Reserve) infizierten Vero Zellen amplifizierten. Die 100 %ige Identität des B8R Gens wurde durch eine Sequenzierung verifiziert.

Die Herstellung eines dreidimensionalen B8R-Proteinmodells ist Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Untersuchungen, die am Viroceptor vorgenommen werden können. Voraussetzung für ein solches Modell ist jedoch die Kenntnis von der Faltungstruktur der Aminosäurekette. Da jedoch die Erkennung der Proteinfaltung allein aus der Aminosäuresequenz noch nicht

befriedigend gelöst ist, ist es sinnvoll und unabdingbar bei der Erstellung eines Modells topologisch ähnliche Proteinstrukturen mit einzubeziehen. In Anbetracht der Tatsache, daß das B8R-Protein in der Lage ist huIFN- γ zu binden, lag die Vermutung nahe, daß dieses Protein Ähnlichkeit mit dem natürlichen Bindungspartner, dem IFNGR1, aufweist. Aus diesem Grund wurde bei der Erstellung eines B8R-Modells auf kristallographische Strukturdaten des IFNGR1 in Assoziation mit IFN- γ zurückgegriffen (Thiel *et al.*, 2000). Das Sequenzalignment des Proteins B8R (*Vaccinia Virus*, Stamm WR) mit der Extracellulären Domäne des huIFNGR1 wurde nach dem ersten Alignment durch ein iteratives Überprüfungs- und Editierungsverfahren verfeinert. Das abschließend erstellte Alignment von B8R weist mit 21,9 % identischen Aminosäuren zum IFNGR1 eine relativ geringe Homologie auf. Die Prozentangabe von identischen Aminosäuren beschreibt allein den Grad der Homologie, nicht jedoch eine Strukturähnlichkeit der beiden Proteine untereinander. Auch bei einer unterschiedlichen Sequenzabfolge können kompatible Struktur motive entstehen. Für die Funktion eines Proteins zeichnen in der Regel nur wenige distinguierte Aminosäuren verantwortlich. Bei 48 identischen Aminosäuren von insgesamt 219, die bei dem Alignment berücksichtigt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit für homolog auftretende Aminosäuren mit identischer Funktion relativ groß. Desweiteren erbrachte das Alignment, daß sechs von acht Cysteinen eine konservierte Position einnehmen. Bei der Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen nehmen die Disulfidbrücken eine zentrale Position ein, daher ist das Auftreten von sechs konservierten Cysteinen ein deutlicher Hinweis auf ähnliche Strukturen. Die Daten der Röntgenstrukturanalyse (Thiel *et al.*, 2000) weisen innerhalb des IFNGR1 einigen Aminosäureresten Wechselwirkungen zum IFN- γ zu. Bei einem Vergleich dieser Aminosäuren im B8R und im IFNGR1 haben 8 von 13 Aminosäuren das gleiche Potential zur Ausbildung einer Salz- oder Wasserstoffbrücke (Tabelle 3.3). Im B8R-Protein sind an vier Positionen Aminosäuren plziert, die nicht in der Lage sind eine physikalische Wechselwirkung, wie sie im IFNGR1 vorhanden ist, einzugehen. Die daraus abzuleitenden Schlußfolgerungen stehen direkt im Kontext mit den positiven Bindungsergebnissen aus dem IFN- γ inhibierenden Assay und dem radioaktiven Gel-Shift-Assay, in denen eine Bindung von B8R und IFN- γ nachgewiesen werden konnte. Danach sind die acht Aminosäuren, die in der Lage sind eine identische Wechselwirkung einzugehen, vollkommen ausreichend für eine spezifische Bindung an das Cytokin IFN- γ . Das nach dem Sequenzalignment entwickelte dreidimensionale Modell des B8R-Proteins basiert auf einer Reihe von theoretischen Annahmen. Für die Validierung dieses theoretischen Modells sind weitere biophysikalischen Experimente wie z.B CD-Spektroskopie notwendig. Eine zukünftige Überprüfung des B8R Alignments mit kompatiblen

Sequenzabschnitten konnte eine Verfeinerung des Modells ergeben, ersetzt jedoch auf gar keinen Fall Erkenntnisse zur Struktur aus direkten Experimenten.

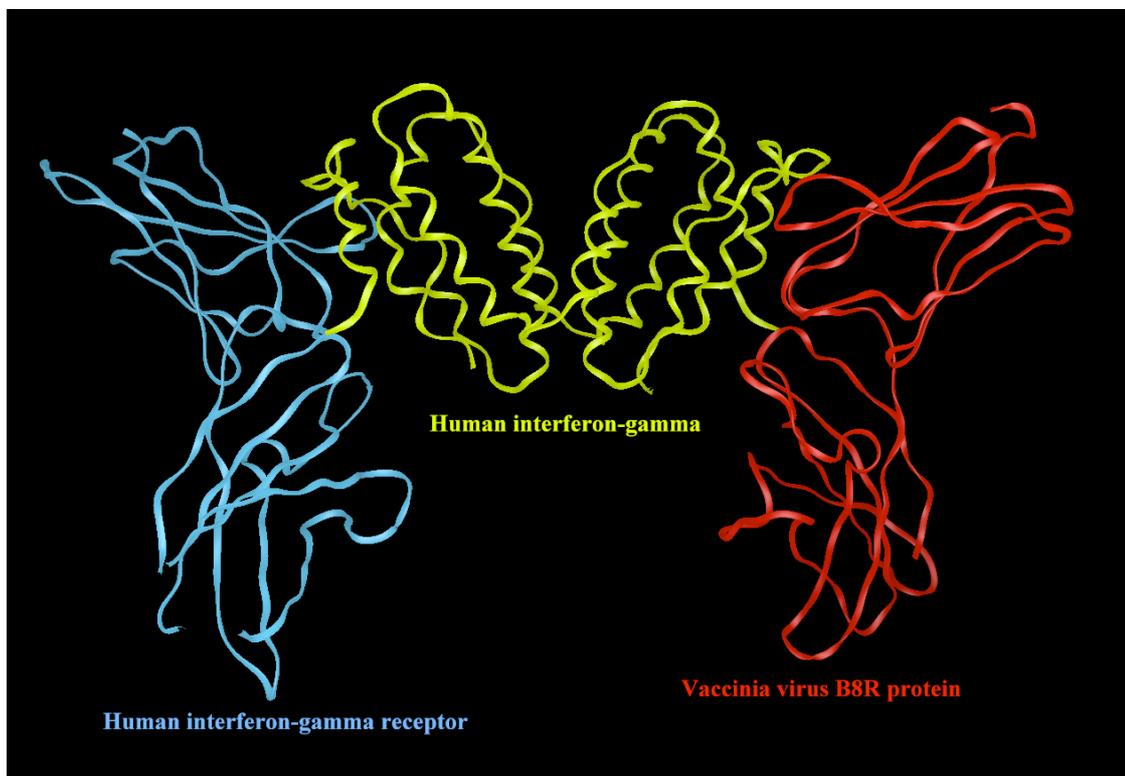


Abbildung 4.1: Dreidimensionales Modell von IFNGR1 (ECD), IFN- γ Dimer und B8R.

4.2 Rekombinantes B8R

Bei biophysikalischen Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur werden relativ große Mengen an Protein benötigt. Aus diesem Grunde wurde das B8R Gen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und als His Tag und Strep Tag Fusionsprotein exprimiert. In coomassiegefärbten Gelen und im Western Blot konnte das Fusionsprotein eindeutig identifiziert werden. Die in den proteinchemischen Methoden festgestellten Größen der Proteine stimmten exakt mit den berechneten Werten überein. Das in prokaryontischen Systemen produzierte Protein lag überwiegend in Inclusion Bodies vor. Die zur Aufarbeitung notwendige Denaturierung des Proteins mit chaotropen Reagenzien wurde dadurch umgangen, daß veränderte Wachstumsbedingungen für die Zellen eingestellt wurden. Bei einer auf 25° C verringerten Temperatur und einer um den Faktor 20 verringerten IPTG Konzentration lag ein großer Teil der exprimierten Proteine in löslicher Form im cytosolischen Raum vor. Die

Ausbeute nach einer zweistufigen chromatographischen Aufarbeitung belief sich auf ca. 3 mg bis 5 mg hochaufgereinigtes Fusionsprotein aus einem Kulturansatz mit 2 l Volumen.

Bei Untersuchungen zur biologischen Charakterisierung des rekombinanten B8R-Proteins konnte keine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Weder im IFN- γ neutralisierenden Assay noch im radioaktiven Gel-Shift-Assay war es möglich eine Interaktion zwischen rekombinant hergestelltem B8R aus *E.coli* und IFN- γ zu identifizieren. Erste Vermutungen, das B8R-Protein habe im Laufe der intensiven Aufarbeitung Schaden genommen, führten dazu, daß ein Schwerpunkt auf die native Aufarbeitung des Proteins gelegt wurde. Trotz intensiver Bemühungen konnte im Rahmen dieser Promotionsarbeit kein rekombinant hergestelltes biologisch aktives B8R-Protein dargestellt werden. Die Ergebnisse mit natürlichem B8R-Protein weisen darauf hin, daß für die biologische Aktivität aller Wahrscheinlichkeit nach eine Glykosilierungen des B8R-Protein notwendig sind.

4.3 Natürliches B8R

Die biologische Funktion des B8R-Proteins ist die Neutralisierung von IFN- γ . Das setzt voraus, daß der Viroceptor bereits in der frühen Phase der viralen Proteinproduktion synthetisiert und sekretiert wird. Bei der Infektion von Zellkulturen mit *Vaccinia Virus* VR-119 konnte exakt diese Annahme beobachtet werden. Durch die Infektion von drei verschiedenen Zelllinien war es möglich, biologisch aktives B8R-Material herzustellen. Im IFN- γ neutralisierenden Assay konnte eine Mengenabschätzung bei der Produktion des Proteins an den drei Zelllinien vorgenommen werden.

Der Befund, daß Viren für unterschiedliche Zelllinien die gleiche oder ähnliche Virulenz besitzen, wurde in der Literatur (Alcami *et al.*, 1996) beschrieben. Erreger der Kuhpocken aus der Gruppe der Orthopoxviren sind durch sporadisch aufgetretene Infektionen bei verschiedenen Zootieren, Hauskatzen und dem Mensch aufgefallen. Die Abstammung und der natürliche Wirt von *Vaccinia Virus* sind derzeit noch unbekannt. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen ist jedoch die familiäre Verwandtschaft zwischen *Vaccinia Virus* und dem Erreger der Kuhpocken evident. Mit diesem Hintergrundwissen ist die identische Virulenz für humane 549 Zellen, affenstämmige Vero Zellen und murine L929 Zellen erklärbar.

Mit dem B8R-Protein aus den Überständen der infizierten Zelllinien wurden Untersuchungen zu Molekülgröße und zur Bindungsstöchiometrie zu IFN- γ durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das B8R-Protein eine apparente Größe von 38 kDa bis 42 kDa aufweist. Damit übersteigt das gemessene Molekulargewicht des Proteins das berechnete Molekulargewicht um ca. 30 %.

Diese Diskrepanz basiert mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Glykosilierungen, die in der posttranslationalen Modifikation des Proteins erzeugt werden. Das Potential für eine mögliche Verzuckerung des B8R-Proteins ist innerhalb der Aminosäuresequenz vorhanden.

In der Crosslinking Reaktion wurde der Bindungsstatus zwischen B8R und IFN- γ festgehalten. Die anschließende Bestimmung des stöchiometrischen Bindungsverhältnisses zwischen IFN- γ und B8R konnte im Gel-Shift-Assay eindeutig festgestellt werden. Danach binden zwei B8R-Proteine ein IFN- γ Dimer. Das spiegelsymmetrisch aufgebaute IFN- γ Dimer bindet in gleicher Weise das B8R-Protein, wie es auch den IFNGR1 bindet. Mit zwei homologen Seiten besitzt IFN- γ zwei identische Bindungsplätze für das B8R-Protein. In Abbildung 4.1 ist ein dreidimensionales Modell dargestellt, in dem die räumliche Anordnung von B8R an IFN- γ gezeigt wird. Die virale Entwicklung eines IFN- γ neutralisierenden Proteins, das exakt an die Bindungsstelle für IFNGR1 bindet, erscheint nach den Ergebnissen von Krause *et al.* (Krause *et al.*, 2000) mit amonovalentem IFN- γ als genialer Entwicklungsschritt bei den Viren. Krause *et al.* konnten durch modifiziertes IFN- γ , das in der Lage war nur an einer Seite des IFNGR zu binden zeigen, daß auch nur 50 % der üblichen Aktivierung entsteht. Nur durch eine vollkommene Blockierung von IFN- γ , die durch Anbindung von zwei B8R-Proteinen erreicht wird, ist eine Vermehrung der Viren gewährleistet.

Bei den Bindungsexperimenten mit muIFN- γ an B8R war der Zufall Pate für die Erkenntnis, daß nur B8R das in A549 Zellen produziert wurde eine Bindung eingehen kann. Der fälschlichen Infektion von humanen A549 Zellen anstelle von Vero Zellen ist dieser Befund zu verdanken. Diese auftretende Diskrepanz, daß nur B8R aus A549 Zellen in der Lage ist an muIFN- γ zu binden, könnte durch eine veränderte posttranslationale Modifikation des B8R-Proteins erklärt werden.

4.4 Chimäre Rezeptoren

Die Konstruktionen der verschiedenen chimären Rezeptoren basierten direkt auf den Sequenzalignmentstudien, die vom B8R-Protein und IFNGR1 gemacht wurden. Bei der Herstellung des Rezeptorkonstruktes B8R/IFNGR1 wurden acht Aminosäuren der Extrazellulären Domäne (Ile221-Phe-Asn-Ser-Ser-Ile-Lys-Glu228) als Linkerbereich beibehalten. Vom B8R wurden die letzten 63 Aminosäuren am C-terminus nicht mit in die Rezeptorkonstruktion eingebracht, da dieser Bereich keinerlei homologe Strukturen zum Extrazellulären Bereich des IFNGR1 aufweist. Die anderen Konstrukte wurden ebenfalls basierend auf den Studien und nach Absprache mit Dr. S. Kotenko konstruiert. Nach

Fertigstellung wurden die Plasmide mit den chimären Konstrukten in CHO Zellen transfiziert, die in der Lage waren, entweder die huIFNGR1 Kette (CHO 16-9) oder die huIFNGR2 Kette (CHO Q21) zu exprimieren. Die breit angelegte Testreihe sollte Aufschluß über eine mögliche Signaltransduktion von IFN- γ über die verschiedenen chimären Rezeptoren geben. Eine Detektion der Signaltransduktion wurde indirekt über die Bestimmung von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Oberfläche der CHO Zellen erreicht. Bei allen eingesetzten chimären Konstrukten konnte keine Signaltransduktion beobachtet werden.

Bei einem ebenfalls mit den CHO Zellen durchgeführten IFN- γ *in vivo* Bindungsassay konnte die Rezeptorexpression auf der Oberfläche und die Bindung von IFN- γ an die chimären Rezeptoren festgestellt werden. Damit wurde definitiv bewiesen, daß auch ein um 63 Aminosäuren verkürztes B8R-Protein in membranständiger Stellung in der Lage ist, IFN- γ zu binden.

Die Bestimmung der Radioaktivität zeigte, daß die chimären Rezeptoren die gleiche Bindungstöchiometrie mit dem Liganden eingehen, wie der natürliche IFNGR (1 IFN- γ -Dimer bindet 2 IFNGR1 Ketten). Die um 12 % bis 18 % verringerte Radioaktivität ist auf eine schlechtere Bindungsaffinität zwischen Ligand und dem chimären Rezeptor zurückzuführen.

4.5 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen

Das Sequenzalignment und das daraus resultierende dreidimensionale Modell des B8R-Proteins werden durch die Ergebnisse mit den chimären Rezeptoren und den Crosslinking Experimenten in ihrer Richtigkeit untermauert. Die Annahme, daß das B8R-Protein sich in zwei Domänen faltet, von denen die Wechselwirkungen mit dem Liganden IFN- γ ausgehen, hat sich durch den IFN- γ *in vivo* Bindungsassay an CHO Zellen mit den chimären Rezeptoren bestätigt. Es ist nicht möglich über die Funktion der 63 C-terminalen Aminosäuren im B8R Molekül Aussagen zu treffen. Die Ermittlung der Bindungstöchiometrie zwischen B8R und IFN- γ manifestiert das bildhafte Modell, daß das B8R-Protein um den gleichen Bindungsplatz konkurriert wie der IFNGR1. Das nahezu gleiche Ergebnis bei der Bestimmung der Radioaktivität im IFN- γ *in vivo* Bindungsassay zeigt dieses ebenfalls. Würde das B8R-Protein den Liganden IFN- γ nicht in gleicher symmetrischer Weise binden, wie es auch der IFNGR1 macht, könnte man davon ausgehen, daß die gemessene Radioaktivität auf Grund des veränderten Bindungsverhältnisses von einem chimären B8R-Rezeptor zu einem IFN- γ Dimer größer sein sollte, als die Vergleichsmessung mit IFNGR1 und IFN- γ , die im Verhältnis 2:1 binden. Die Experimente mit radioaktiv markiertem IFN- γ bestätigen ebenfalls ein Bindungsverhältnis von 2 : 1 zwischen

dem B8R-Protein und dem IFN- γ -Dimer. Die Ausbildung und Detektierung von drei verschiedenen Komplexen entspricht exakt der rechnerisch möglichen Anzahl von Verknüpfungen, die nach dem Modell möglich sind.

Die bei den chimären Konstrukten ausbleibende Signaltransduktion bei gleichzeitiger Bindung des Liganden IFN- γ an die chimären B8R/IFNGR Ketten, kann ursächlich daran liegen, daß ein fitting zwischen den beteiligten Reteptorketten nicht stattfindet und dadurch die intrazelluläre Aneinanderlagerung der Proteine des Jak-STAT Pathway nicht vollzogen werden kann. Trotz der hohen Strukturhomologie zwischen dem extrazellulären Anteil des IFNGR1 und des B8R-Proteins zeigt die fehlende Signaltransduktion, daß die Aminosäuresequenz der beiden beteiligten Rezeptoren einen höheren Stellenwert einnimmt als angenommen.

Die daraus abzuleitende Schlußfolgerung ist, daß die Wechselwirkungen der beiden extrazellulären IFNGR-Ketten von der Existenz spezifischer Aminosäuren abhängig ist. Somit ist das vorhandene Bild der Signaltransduktion am IFNGR, welches davon ausging, daß nach der Anbindung des Liganden IFN- γ an die Rezeptorkette 1 alle weiteren wichtigen Schritte intrazellulär ablaufen, zu erweitern. Ohne eine spezifische Wechselwirkung der beiden Rezeptorketten auf der extrazellulären Seite findet eine Weiterleitung des Signals auf der intrazellulären Seite nicht statt.

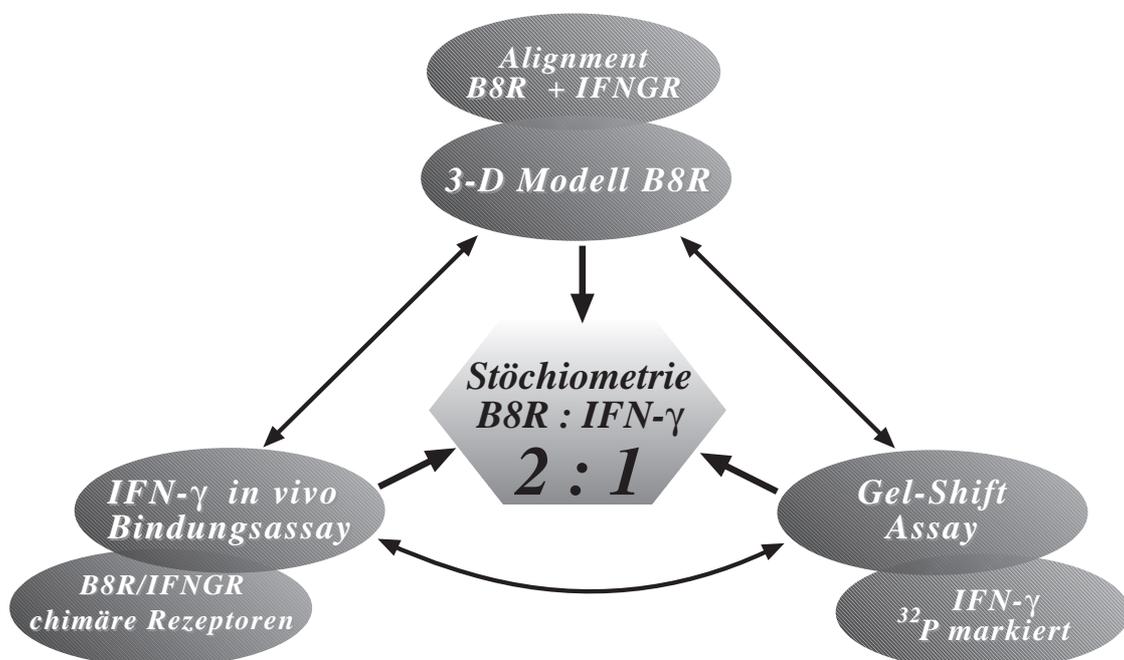


Abbildung 4.2: Die Daten aus dem dreidimensionalen Modell des B8R-Proteins, aus dem IFN- γ *in vivo* Bindungsassay und aus dem Gel-Shift-Assay zeigen alle unabhängig voneinander das stöchiometrische Bindungsverhältnis zwischen B8R und IFN- γ von 2 : 1 auf.

Die im Rahmen der Dissertationsarbeit produzierten Ergebnisse erlauben auch eine Aussage über die Herkunft des B8R-Proteins. Die zentrale Frage hierbei ist: Handelt es sich bei dem B8R-Protein um eine analoge Entwicklung zum IFNGR1, oder besitzen das B8R-Protein und der IFNGR1 einen homologen Ursprungs? Bei der Klärung dieser Frage gehen vor allem die Daten des Sequenzalignments und das daraus entwickelte dreidimensionale Modell mit ein. Trotz der relativ geringen Aminosäurehomologie von nur 21,9 % hat das Modell des Proteins hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der extrazellulären Domäne des IFNGR1. Die Strukturhomologie und die ebenfalls in Experimenten ermittelte Stöchiometrie zwischen IFN- γ und dem B8R-Protein von 1 : 2 deuten darauf hin, daß es sich um eine homologe Proteinentwicklung handelt. Die Inhibierung von IFN- γ durch Anbindung eines viralen Proteins würde für den Fall einer analogen Entwicklung mit hoher Wahrscheinlichkeit noch größere Unterschiede hervorgebracht haben. Es ist auch anzunehmen, daß ein virales Protein, das nicht homologen Ursprungs ist, eine vollkommene Blockierung des IFN- γ Proteins durch eine Bindung im Verhältnis 1 : 1 vollbringen würde. Mit diesem Hintergrund erscheint folgendes Modell plausibel: Vorläufer der *Vaccinia* Viren eigneten sich im Laufe der Entwicklungsgeschichte das genetische Material des IFNGR an und erzielten dadurch einen evolutiven Vorteil gegenüber anderen Viren. Die hohe Divergenz der Aminosäuresequenz zwischen dem viralen und dem humanen Rezeptor ist auf eine optimale Anpassung auf verschiedene IFN- γ von verschiedenen Spezies zurückzuführen und auf die Tatsache, daß der Erwerb des Gens stammesgeschichtlich schon sehr früh geschah.

Mein kleiner Eobiont hatte das Licht der Welt erblickt: Ein äußerst komplexes, chemisches hochwertig ausgestattetes, organisches Lehmkristall mit dem Charakter von Proto-RNA, eine Art Ur-Ribosom, das ein paar kurze Eiweiße produzierte, so daß meine kleine Kreatur, vom Sonnenlicht mit Energie versorgt, sich fortpflanzte und über einen Stoffwechsel verfügte. – Wir hatten ein lebendiges Wesen aus dem Tod geboren.

Harry Mulisch „Der Sprecher“ aus „Die Prozedur“

5. Resümee

Im Mittelpunkt der Dissertationsarbeit stand das von *Vaccinia Virus* stammende Viroceptor Protein B8R. Dieses Protein besitzt die Fähigkeit mit hoher Affinität an IFN- γ von verschiedenen Spezies zu binden. Durch diese Bindung erreicht das Virus, daß die von IFN- γ ausgehende antivirale und antiproliferative Wirkung inhibiert wird. Intention der Experimente war die Charakterisierung der biophysikalischen Eigenschaften des Proteins, die Erstellung eines dreidimensionalen Modells des Proteins, sowie die Ermittlung der Bindungseigenschaften zum Liganden. Der Hintergrund für den Ansatz, ein IFN- γ inhibierendes Protein näher darzustellen, erwächst aus der Tatsache, daß dieses zentrale Protein des Immunsystems für eine Reihe von Krankheiten wie z. B. Rheuma, Lupus erythematodes und Multiple Sklerose verantwortlich ist.

Die Erstellung eines Aminosäurealignments von B8R mit IFNGR erfolgte auf der Grundlage von kristallographischen Strukturdaten aus der Veröffentlichung von Thiel *et al.* (Thiel *et al.*, 2000) und Vergleichen mit Strukturinformationen verschiedener Sequenzabschnitte von Klasse I- und II- Cytokinrezeptoren. Es konnte mit einem iterativen Editierungsverfahren ein Alignment erzeugt werden, das den Kriterien der Sequenz- und Strukturkompatibilität entspricht. Die Sekundärstruktur und das Modell des B8R-Proteins wurden auf der Grundlage des Alignments und auf wissensbasierten, repräsentativen Datensätzen von bekannten Proteinstrukturen erzeugt. Mit nur 21,9 % identischen Aminosäuren zwischen der ECD von IFNGR1 und B8R ist der Homologiegrad relativ gering. Bei Betrachtung der generierten Sekundärstruktur hingegen ist die Homologie evident. Eine Validierung des Modells mit Strukturdaten aus direkten Experimenten mit dem B8R Protein sind jedoch für eine Verfeinerung und Konsolidierung der Struktur zwingend notwendig.

Bei der Analyse des B8R-Proteins wurde festgestellt, daß rekombinant erzeugtes Material nicht in der Lage ist eine biologische Aktivität zu entwickeln. Das auf natürlichem Wege durch Infektion von kultivierten Zelllinien mit *Vaccinia Virus* (Western Reserve) erzeugte B8R-Protein, zeigte im IFN- γ inhibierenden Assay seine biologische Wirksamkeit durch

Inhibierung der durch IFN- γ vermittelten antiviralen Wirkung. Im radioaktiven Gel-Shift-Assay nach Crosslinking Reaktion konnte ebenfalls eine Komplexbildung identifiziert werden. Das apparente Molekulargewicht des B8R-Proteins wurde mit 38 kDa bis 42 kDa bestimmt. Somit übersteigt das apparente Molekulargewicht das berechnete um ca. 8 kDa. Diese Diskrepanz in der Masse des Proteins und die fehlende Aktivität des rekombinanten B8R-Proteins aus *E.coli* weisen darauf hin, daß das Protein Glykosilierungen besitzt, die für ein biologisch aktives Protein zwingend erforderlich sind.

In Untersuchungen zur Bindungsstöchiometrie zwischen dem B8R-Protein und IFN- γ konnte ein Verhältnis von 2 : 1 festgestellt werden. Dieses Ergebnis untermauert das generierte B8R-Modell und die daraus resultierende Annahme, daß der Viroreceptor B8R an die gleiche Stelle am IFN- γ anbindet, wie auch der IFNGR1.

Durch die Herstellung der chimären Rezeptorkonstrukte, bestehend aus einem extrazellulären Anteil B8R und einem intrazellulären Anteil des IFNGR, war es möglich, nach Transfektion in somatische CHO-Hybridzellen die Signaltransduktion zu untersuchen. Die Konstruktionen basierten maßgeblich auf den Ergebnissen des Aminosäurealignments von B8R und IFNGR. Es konnte bei keinem chimären Rezeptor eine Signaltransduktion detektiert werden.

Die Ergebnisse aus den IFN- γ *in vivo* Untersuchungen unterstreichen, daß der membranständige, chimäre B8R/IFNGR in der Lage ist, IFN- γ zu binden. Das Bindungsverhältnis von IFN- γ -Dimer zum chimären Rezeptor beträgt dabei 1 : 2.

Das dreidimensionale B8R Proteinmodell, die Ergebnisse des Gel-Shift-Assays nach Crosslinking Reaktion und auch der IFN- γ *in vivo* Assay zeigen auf, daß sich ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis zwischen dem B8R-Protein und dem IFN- γ -Dimer von 2 : 1 ausbildet.

Rekombinantes B8R-Protein aus einem geeigneten Expressionssystem, das biologisch aktives Material in ausreichender Menge hervorbringt, wird zur experimentellen Untersuchung der Struktur des Proteins und zum besseren Verständnis der Bindungseigenschaften beitragen.

Man muß viel studieren, um wenig zu wissen.
Charles de Secondat Montesquieu

6. Literaturverzeichnis

- Aguado, B., Selmes, I.P. & Smith, G.L.** (1992). Nucleotide sequence of 21.8 kbp of variola major virus strain Harvey and comparison with *Vaccinia Virus*. *J Gen Virol* **73**: 2887-902
- Aguet, M., Dembic, Z. & Merlin, G.** (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* **55**: 273-80
- Alcami, A. & Smith, G.L.** (1995). *Vaccinia*, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *Journal of Virology* **69**: 4633-9
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, M.M., Seidman, J.G., Smith, G.A. & Struhl, K.** (1994). Current Protocols in Molecular Biology. *Greene Publishing Associates/Wiley & Sons: New York*
- Axelrod, A., Gibbs, V.C. & Goeddel, D.V.** (1994). The interferon-gamma receptor extracellular domain. Non-identical requirements for ligand binding and signaling. *J Biol Chem* **269**: 15533-9
- Bach, E.A., Tanner, J.W., Marsters, S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Shaw, A.S. & Schreiber, R.D.** (1996). Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol Cell Biol* **16**: 3214-21
- Bairoch, A. & Apweiler, R.** (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acid Res* **28**: 45-8
- Baxby, D.** (1981). Jenner's Smallpox Vaccine. The Riddle of the Origin of *Vaccinia Virus*. *Heinemann*
- Bazan, J.F.** (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6934-8
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E.** (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res* **28**: 235-42
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54
- Branca, A.A. & Baglioni, C.** (1981). Evidence that type I and II interferons have different receptors. *Nature (London)* **194**: 768-70
- Chatterjee-Kishore, M., van den Akker, F. & Stark, G.R.** (2000). Association of STATs with relatives and friends. *Trends Cell Biol* **10**: 106-11
- Chung, J., Uchida, E., Grammar, T.C. & Blenis, J.** (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Cell Biol* **17**: 6508-16
- Cofano, F., Moore, S.K., Tanaka, S., Yuhki, N., Landolfo, S. & Appella, E.** (1990). Affinity purification, peptide analysis and cDNA sequence of mouse interferon-gamma receptor. *J Biol Chem* **265**: 4064-71
- Cook, J.R., Emanuel, S.L., Donnelly, R.J., Soh, J., Mariano, T.M., Schwartz, B., Rhee, S. & Pestka, S.** (1994). Sublocation of the human interferon-gamma receptor accessory factor gene and characterization of accessory factor activity by yeast artificial chromosomal fragmentation. *J Biol Chem* **269**: 7013-18
- Cook, J.R., Jung, V., Schwartz, B., Wang, P. & Pestka, S.** (1992). Structural analysis of the human interferon gamma receptor: a small segment of the intracellular domain is specifically required for class I major histocompatibility complex antigen induction and antiviral activity. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **89**: 11317-21
-

- Darnell, J.E.J., Kerr, I.M. & Stark, G.R.** (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**: 1415-21
- David, M., Petricoin, E., Benjamin, C., Pine, R., Weber, M.J. & Larner, A.C.** (1995). Requirement of MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha and interferon beta stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* **269**: 1721-23
- Debets, R. & Savelkoul, H.F.J.** (1994). Cytokine antagonist and their potential therapeutic use. *Immunol Today* **15**: 455-7
- Decker, T., Kovarik, P. & Meinke, A.** (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **17**: 121-34
- Dinarelli, C.A.** (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**: 1627-52
- Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H. & Oesch, F.** (1988). Stable expression of rat cytochrome P-450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5769-73
- Downie, A.W.** (1939). *J Pathol Bacteriol* **48**: 361-79
- Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabushan, T.L., Trotta, P.P. & Bugg, C.E.** (1991). Three-dimensional structure of recombinant human Interferon gamma. *Science* **252**: 698-702
- Earl, P.L. & Moss, B.** (1993). *Vaccinia Virus*. Genetic maps: locus maps of complex genomes. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1157-65
- Ebensperger, C., Rhee, S., Muthukumaran, G., Lembo, D., Donnelly, R., Pestka, S. & Dembic, Z.** (1996). Genomic organization and promoter analysis of the gene IFNGR2 encoding the second chain of the mouse interferon-gamma receptor. *Scand J Immunol* **44**: 599-606
- Farrar, M.A., Campbell, J.D. & Schreiber, R.D.** (1992). Identification of a functionally important sequence in the C terminus of the interferon-gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11706-10
- Farrar, M.A. & Schreiber, R.D.** (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* **11**: 571-611
- Farrar, M.A., Fernandez-Luna, J. & Schreiber, R.D.** (1991). Identification of two regions within the cytoplasmic domain of the human interferon-gamma receptor required for function. *J Biol Chem* **266**: 19626-35
- Fernandez-Botran, R.** (1991). Soluble cytokin receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J* **5**: 2567-74
- Frank, S.J., Gilliland, G., Kraft, A.S. & Arnold, C.S.** (1994). Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the Jak2 tyrosine kinase. *Endocrinology* **135**: 2228-39
- Frank, S.J., Yi, W., Zhao, Y., Goldsmith, J.F., Gilliland, G., Jiang, J., Sakai, I. & Kraft, A.S.** (1995). Regions of the Jak2 tyrosine kinase required for the coupling to the growth hormone receptor. *J Biol Chem* **270**: 14776-85
- Fridman, W.H., Teillaud, J.L., Bouchard, C., Teillaud, C., Astier, A., Tartour, E., Galon, J., Mathiot, C. & Sautes, C.** (1993). Soluble Fc-gamma receptors. *J Leukoc Biol* **54**: 504-12
- Garotta, G., Ozmen, L., Fountoulakis, M., Dembic, Z., van Loon, A.P. & Stuber, D.** (1990). Human interferon-gamma receptor. Mapping of epitopes recognized by neutralizing antibodies using native and recombinant receptor proteins. *J Biol Chem* **265**: 6908-15
- Goebel, J.S., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P. & Paoletti, E.** (1990). The Complete DNA Sequence of *Vaccinia Virus*. *Virology* **179**: 247-66
-

- Gray, P.W., Leong, S., Fennie, E.H., Farrar, M.A., Pingel, J.T., Fernandez-Luna, J. & Schreiber, R.D.** (1989). Cloning and expression of the cDNA for the murine interferon gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8497-501
- Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L. & Schreiber, R.D.** (1994). Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J* **13**: 1591-600
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J. & Schreiber, R.D.** (1995). STAT recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* **2**: 677-87
- Gurniak, C.B. & Berg, L.J.** (1996). Murine Jak3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* **87**: 3151-60
- Harpur, A.G., Andres, A.C., Ziemiecki, A., Aston, P.R. & Wilks, A.F.** (1992). Jak 2 a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**: 1347-53
- Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R. & Darnell, J.E., Jr.** (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* **267**: 1347-9
- Hemmi, S., Bohni, R., Stark, G., Di Marco, F. & Aguet, M.** (1994). A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. *Cell* **76**: 803-10
- Hemmi, S., Peghini, P., Metzler, M., Merlin, G., Dembic, Z. & Aguet, M.** (1989). Cloning of murine interferon gamma receptor cDNA: expression in human cells mediates high-affinity binding but is not sufficient to confer sensitivity to murine interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9901-5
- Hibino, Y., Kumar, C.S., Mariano, T.M., Lai, D.H. & Pestka, S.** (1992). Chimeric interferon-gamma receptors demonstrate that an accessory factor required for activity interacts with the extracellular domain. *J Biol Chem* **267**: 3741-9
- Hibino, Y., Mariano, T.M., Kumar, C.S., Kozak, C.A. & Pestka, S.** (1991). Expression and reconstitution of a biologically active mouse interferon gamma receptor in hamster cells. Chromosomal location of an accessory factor. *J Biol Chem* **266**: 6948-51
- Horvath, C.M. & Darnell, J.E.** (1997). The state of STAT's: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 233-9
- Howard, S.T., Chan, Y.S. & Smith, G.L.** (1991). *Vaccinia Virus* homologues of the Shope fibroma virus inverted terminal repeat proteins and a discontinuous ORF related to the tumor necrosis factor receptor family. *Virology* **180**: 633-47
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Larner, A.C. & Finblom, D.S.** (1994). Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem* **269**: 14333-6
- Isaacs, A. & Lindenmann, J.** (1957). Virus interference. The Interferon. *Proc Royal Soc Lond* **147**: 258-67
- Jung, V., Jones, C., Kumar, C.S., Stefanos, S., O'Connell, S. & Pestka, S.** (1990). Expression and reconstitution of a biologically active human interferon-gamma receptor in hamster cells. *J Biol Chem* **265**: 1827-30
- Jung, V., Jones, C., Rashidbaigi, A., Geyer, D.D., Morse, H.G., Wright, R.B. & Pestka, S.** (1988). Chromosome mapping of biological pathways by fluorescence-activated cell sorting and cell fusion. *Somatic Cell Mol Genet* **14**: 583-92
- Jung, V., Rashidbaigi, A., Jones, C., Tischfield, J., Shows, T.B. & Pestka, S.** (1987). Human chromosome 6 and 21 are required for sensitivity to human interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4251-55
- Kabsch, W. & Sander, C.** (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded geometrical features. *Biopolymers* **22**: 2577-637
-

- Kaplan, D.H., Greenlund, A.C., Tanner, J.W., Shaw, A.S. & Schreiber, R.D.** (1996). Identification of an interferon-gamma receptor alpha chain sequence required for JAK-1 binding. *J Biol Chem* **271**: 9-12
- Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R.S., Takasugi, T., Matsuyama, T., Mak, T.W., Noguchi, S. & Taniguchi, T.** (1996). Essential and non redundant roles of p48 (ISGF-gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes to cell* **1**: 115-24
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumaran, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O. & Ihle, J.N.** (1995). Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem* **270**: 20915-21
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollak, B.P., Mariano, T.M., Garotta, G. & Pestka, S.** (1994). Interaction between the component chains of the interferon-gamma receptor. *J Interferon Res* **14**: 93-8
- Kovarik, P., Stoiber, D., Eysers, P.A., Menghini, A., Neininger, A., Gaestel, M., Cohen, P. & Decker, T.** (1999). Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13956-61
- Kozak, C.A., Peyers, M., Krall, M., Mariano, T.M., Kumar, C.S., Pestka, S. & Mock, B.A.** (1990). Molecular genetic markers spanning mouse chromosom 10. *Genomics* **8**: 519-24
- Krause, C.D., Lunn, C.A., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O., Kotenko, S.V., Lundell, D.J., Narula, S.K. & Pestka, S.** (2000). Signaling by covalent heterodimers of interferon-gamma: Evidence for one-sided signaling in the active tetrameric receptor complex. *J Biol Chem* **275**: 22995-3004
- Krolewski, J.J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T.B. & Dalla-Favera, R.** (1990). Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* **5**: 277-82
- Kumar, C.S., Muthukumaran, G., Frost, L.J., Noc, M., Ahn, Y.H., Mariano, T.M. & Pestka, S.** (1989). Molecular characterization of the murine interferon gamma receptor cDNA. *J Biol Chem* **264**: 17939-46
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the haed of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lai, D.** (1994). The mapping of the murine and human interferon gamma receptor. Ph.D. thesis submitted to the Graduate School - New Brunswick. *The State University of New Jersey, and the Graduate School of Biomedical Sciences Robert Wood Johnson Medical School*
- Lai, D., Zhou, M. & Pestka, S.** (1993). Mapping the ligand binding site of IFN-gamma receptors: overcoming the barrier of species specificity. *J Interferon Res* **13**: 80
- Lai, K.S., Jin, Y., Graham, D.K., Witthuhn, B.A., Ihle, J.N. & Liu, E.T.** (1995). A kinase-deficient splice variant of the human Jak3 is expressed in hematopoetic and epithelial cancer cells. *J Biol Chem* **270**: 25028-36
- Langer, J. & Pestka, S.** (1988). Interferon receptors. *Immunol Today* **9**: 393-400
- Langer, J.A., Rashidbaigi, A., Lat, L.W., Patterson, D. & Jones, C.** (1990). Sublocalization on chromosom 21 of human interferon-alpha receptor gene and the gene for an interferon-gamma response protein. *Somatic Cell Mol Genet* **16**: 231-40
- Lembo, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Alber, G., Ozmen, L., Landolfo, S., Bluthmann, H., Dembic, Z., Kotenko, S.V., Cook, J.R., Pestka, S. & Garotta, G.** (1996). Mouse macrophages carrying both subunits of the human interferon-gamma (IFN-gamma) receptor respond to human IFN-gamma but do not acquire full protection against viral cytopathic effect. *J Biol Chem* **271**: 32659-66
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J.** (1998) **JAKS and STATS: Biological Implication.** *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 293-322
-

- Lim, C.P. & Cao, X.** (1999). Serine phosphorylation and negative regulation of STAT3 by JNK. *J Biol Chem* **274**: 31055-61
- Mariano, T.M., Izotova, L.S. & Pestka, S.** (1995). Receptor-binding studies. *LB UMDNJ R Wood Medical School* **6**: 77-91
- Mariano, T.M., Kozak, C.A., Langer, J.A. & Pestka, S.** (1987). The mouse immune interferon receptor gene is located on chromosome 10. *J Biol Chem* **262**: 5812-14
- Mariano, T.M., Muthukumaran, G., Donnelly, R.J., Wang, N., Adamson, M.C., Pestka, S. & Kozak, C.A.** (1996). Genetic mapping of the gene for the mouse interferon-gamma receptor signalling subunit to the distal end of chromosome 16. *Genome* **7**: 321-2
- Marsters, S.A., Pennica, D., Bach, E., Schreiber, R.D. & Ashkenazi, A.** (1995). Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5401-5
- Massung, R.F., Esposito, J.J., Liu, L.I., Qi, J., Utterback, T.R., Knight, J.C., Aubin, L., Yuran, T.E., Parsons, J.M. & Loparev, V.N.** (1993). Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature* **366**: 748-51
- Massung, R.F., Jayarama, V. & Moyer, R.W.** (1993). DNA sequence analysis of conserved and unique regions of swinepox virus: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein-coupled receptor homologue. *Virology* **197**: 512-28
- Merlin, G., Van der Leede, B.J., Aguet, M. & Dembic, Z.** (1989). The human Interferon gamma receptor gene. *J Interferon Res* **9**: 89 (Abstr.)
- Mossman, K., Upton, C., Buller, R.M. & McFadden, G.** (1995). Species specificity of ectromelia virus and *Vaccinia Virus* interferon-gamma binding proteins. *Virology* **208**: 762-9
- Mossman, K., Upton, C. & McFadden, G.** (1995). The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *J Biol Chem* **270**: 3031-8
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50
- Munro, S. & Maniatis, T.** (1989). Expression cloning of murine interferon-gamma receptor, cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9248-52
- Muthukumaran, G., Donnelly, R.J., Ebensperger, C., Mariano, T.M., Garotta, G., Dembic, Z., Poast, J., Baron, S. & Pestka, S.** (1996). The intracellular domain of the second chain of the interferon-gamma receptor is interchangeable between species. *J Interferon Cytokine Res* **16**: 1039-45
- Novick, D., Cohen, B. & Rubinstein, M.** (1992). Soluble interferon-alpha receptor molecules are present in body fluids. *FEBS Lett* **314**: 445-8
- Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. & Rubinstein, M.** (1989). Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Expl Med* **170**: 1409-14
- Pfizenmaier, K., Wiegmann, K., Scheurich, P., Krönke, M., Merlin, G., Aguet, M., Knowles, B.B. & Ucer, U.** (1988). High affinity human IFN-gamma-binding capacity is encoded by a single receptor gene located in proximity to c-ros on human chromosome 6q16 to q22. *J Immunol* **141**: 856-60
- Pestka, S., Kotenko, S.V., Muthukumaran, G., Izotova, L.S., Cool, J. F. & Garotta, G.** (1997) The interferon Gamma (IFN- γ) Receptor: A Paradigma for the Multichain Cytokine Receptor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **8**: 189-206
- Rane, S.G. & Reddy, E.P.** (1994). Jak3: a novel Jak kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* **9**: 2415-23
-

- Rashidbaigi, A., Langer, J.A., Jung, V., Jones, C., Morse, H.G., Tischfield, J., Trill, J.J., Kung, H.-F. & S, P.** (1986). The gene for the human immune interferon receptor is located on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 384-8
- Rhee, S., Ebensperger, C., Dembic, Z. & Pestka, S.** (1996). The structure of the gene for the second chain of the human interferon-gamma receptor. *J Biol Chem* **271**: 28947-52
- Rosel, J. & Moss, B.** (1985). Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a *Vaccinia Virus* gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b. *J Virol* **56**: 830-8
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, A.H.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91
- Sakatsume, M., Igarashi, K., Winestock, K.D., Garotta, G., Larner, A.C. & Finbloom, D.S.** (1995). The Jak kinases differentially associate with the α and β (accessory factor) chains of the interferon- γ receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J Biol Chem* **270**: 17528-34
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning; A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-67
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A.** (1996). Molecular interaction between the Strep-Tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J Mol Biol* **255**: 753-66
- Schuringa, J.J., Jonk, L., Dokter, W.H.A., Vellenga, E. & Kruijer, W.** (2000). Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* **347**: 389-96
- Shchelkunov, S.N., Blinov, V.M. & Sandakhchiev, L.S.** (1993). Genes of variola and *Vaccinia Viruses* necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS Lett* **319**: 80-3
- Smith, G.A., Chan, Y.S. & Howard, S.T.** (1991). Nucleotide sequence of 42kbp of *Vaccinia Virus* strain WR from near the right inverted terminal repeat. *J Gen Virol* **72**: 1349-76
- Smith, G.A., Davis, T., Wignall, J.M., Din, W.S., Farrah, T., Upton, C., McFadden, G. & Goodwin, R.D.** (1991). T2 open reading frame from Shope fibrome virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem biophys Res Commun* **176**: 335-42
- Soh, J., Donnelly, R.J., Kotenko, S., Mariano, T.M., Cook, J.R., Wang, N., Emanuel, S., Schwartz, B., Miki, T. & Pestka, S.** (1994). Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell* **76**: 793-802
- Soh, J., Donnelly, R.J., Mariano, T.M., Cook, J.R., Schwartz, B. & Pestka, S.** (1993). Identification of a YAC clone encoding an accessory factor for the human interferon gamma receptor: evidence for multiple accessory factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8737-41
- Stuber, D., Friedlein, A., Fountoulakis, M., Lahm, H.W. & Garotta, G.** (1993). Alignment of disulfide bonds of the extracellular domain of the interferon gamma receptor and investigation of their role in biological activity. *Biochemistry* **32**: 2423-30
- Sussman, D.J. & G., M.** (1984). Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol Cell Biol* **4**: 1641-43
- Thiel, D., le Du, M., Walter, R., D'Arcy, A., Chene, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F. & Ealick, S.** (2000). Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex. *Structure Fold Des* **8**: 927-36
-

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.J.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res* **25**: 4876-84
- Thoreau, E., Petridou, B., Kelle, P.A. & Mornon, J.P.** (1991). Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptor revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett* **282**: 26-31
- Upton, C., Macen, J.L., Schreiber, R.D. & McFadden, G.** (1991). Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* **184**: 370-82
- Upton, C., Mossman, K. & McFadden, G.** (1992). Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science* **258**: 1369-72
- Valazquez, L., Fellous, M., Stark, G.R. & Pellegrini, S.** (1992). A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* **70**: 313-22
- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G. & Garotta, G.** (1992). Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol* **22**: 2403-12
- van Loon, A.P., Ozmen, L., Fountoulakis, M., Kania, M., Haiker, M. & Garotta, G.** (1991). High-affinity receptor for interferon-gamma (IFN-gamma), a ubiquitous protein occurring in different molecular forms on human cells: blood monocytes and eleven different cell lines have the same IFN-gamma receptor protein. *J Leukoc Biol* **49**: 462-73
- Villmann, C.** (1994). Einfluß von Deletionen auf den flexiblen Oberflächenloop zwischen AS 16 - 27 des rekombinanten humanen Interferon-gamma. *Diplomarbeit am ITA in der FhG, Hannover* 27
- Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zanodry, P.J. & Narula, S.K.** (1995). Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* **376**: 230-35
- Watling, D., Guschin, D., Müller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N. & Kerr, I.M.** (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase Jak2 of a mutant cell line effective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* **366**: 166-70
- Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J.E.J.** (1995). Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**: 241-50
- Wheelock, E.F.** (1965). Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* **149**: 401-5
- Wilks, A.F., Harpur, A.G., Kurban, R.R., Ralph, S.J., Zurcher, G. & Ziemiecki, A.** (1991). Two novel protein tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* **11**: 2057-65
- Williams, G., Ruegg, N., Birch, A., Weber, C., Hofstadter, K., Robinson, J.A., Aguet, M., Garotta, G., Schlatter, D. & Huber, W.** (1995). Dissection of the extracellular human interferon gamma receptor alpha-chain into two immunoglobulin-like domains. Production in an Escherichia coli thioredoxin gene fusion expression system and recognition by neutralizing antibodies. *Biochemistry* **34**: 1787-97
- Woith, W., Nüsslein, I., Antoni, C., Dejica, D.I., Winkler, T.H., Hermann, M., Pirner, K., Kalden, J.R. & Manger, B.** (1993). A soluble form of the human transferrin receptor is released by activated lymphocytes in vitro. *Clin Expl Immunol* **92**: 537-42
- Younger, J.S. & Salvin, S.B.** (1973). Type I and Type II Interferons. *J Immunol* **136**: 2451-5
-

Anhang

A) Adressen der verschiedenen Datenbanken

American Type Culture Collection (ATCC)(<http://www.atcc.org/>)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>)

SWISS-PROT Datenbank (Bairoch & Apweiler) (<http://www.expasy.ch/>)

B) Nukleotid und Aminosäuresequenz von huIFNGR1

Blau markierte AS: *Jak1 und STAT1 Bindungsstelle*

Rot markierte AS: *Kontaktstellen von IFN- γ zu IFNGR*

```

ATG GCT CTC CTC TTT CTC CTA CCC CTT GTC ATG CAG GGT GTG AGC AGG GCT
M  A  L  L  F  L  L  P  L  V  M  Q  G  V  S  R  A
➤                               Signalpeptid IFNGR1                               ⬅
1      5      10      15      20
GAG ATG GGC ACC GCG GAT CTG GGG CCG TCC TCA GTG CCT ACA CCA ACT AAT GTT ACA ATT
E  M  G  T  A  D  L  G  P  S  S  V  P  T  P  T  N  V  T  I
➤      ECD IFNGR1      ➤➤➤
30      40
GAA TCC TAT AAC ATG AAC CCT ATC GTA TAT TGG GAG TAC CAG ATC ATG CCA CAG GTC CCT
E  S  Y  N  M  N  P  I  V  Y  W  E  Y  Q  I  M  P  Q  V  P
50      60
GTT TTT ACC GTA GAG GTA AAG AAC TAT GGT GTT AAG AAT TCA GAA TGG ATT GAT GCC TGC
V  F  T  V  E  V  K  N  Y  G  V  K  N  S  E  W  I  D  A  C
70      80
ATC AAT ATT TCT CAT CAT TAT TGT AAT ATT TCT GAT CAT GTT GGT GAT CCA TCA AAT TCT
I  N  I  S  H  H  Y  C  N  I  S  D  H  V  G  D  P  S  N  S
90      100
CTT TGG GTC AGA GTT AAA GCC AGG GTT GGA CAA AAA GAA TCT GCC TAT GCA AAG TCA GAA
L  W  V  R  V  K  A  R  V  G  Q  K  E  S  A  Y  A  K  S  E
110      120
GAA TTT GCT GTA TGC CGA GAT GGA AAA ATT GGA CCA CCT AAA CTG GAT ATC AGA AAG GAG
E  F  A  V  C  R  D  G  K  I  G  P  P  K  L  D  I  R  K  E
130      140
GAG AAG CAA ATC ATG ATT GAC ATA TTT CAC CCT TCA GTT TTT GTA AAT GGA GAC GAG CAG
E  K  Q  I  M  I  D  I  F  H  P  S  V  F  V  N  G  D  E  Q
150      160
GAA GTC GAT TAT GAT CCC GAA ACT ACC TGT TAC ATT AGG GTG TAC AAT GTG TAT GTG AGA
E  V  D  Y  D  P  E  T  T  C  Y  I  R  V  Y  N  V  Y  V  R
170      180
ATG AAC GGA AGT GAG ATC CAG TAT AAA ATA CTC ACG CAG AAG GAA GAT GAT TGT GAC GAG
M  N  G  S  E  I  Q  Y  K  I  L  T  Q  K  E  D  D  C  D  E
190      200
ATT CAG TGC CAG TTA GCG ATT CCA GTA TCC TCA CTG AAT TCT CAG TAC TGT GTT TCA GCA
I  Q  C  Q  L  A  I  P  V  S  S  L  N  S  Q  Y  C  V  S  A
210      220
GAA GGA GTC TTA CAT GTG TGG GGT GTT ACA ACT GAA AAG TCA AAA GAA GTT TGT ATT ACC
E  G  V  L  H  V  W  G  V  T  T  E  K  S  K  E  V  C  I  T

```

```

                230                                240
ATT TTC AAT AGC AGT ATA AAA GGT TCT CTT TGG ATT CCA GTT GTT GCT GCT TTA CTA CTC
  I  F  N  S  S  I  K  G
<<<<      ECD IFNGR1      <
                S  L  W  I  P  V  V  A  A  L  L  L
                >      TMD IFNGR1
                250                                260
TTT CTA GTG CTT AGC CTG GTA TTC ATC TGT TTT TAT ATT AAG AAA ATT AAT CCA TTG AAG
  F  L  V  L  S  L  V  F  I
      TMD IFNGR1      <
                C  F  Y  I  K  K  I  N  P  L  K
                >      ICD I FNGR1      >>>
                270                                280
GAA AAA AGC ATA ATA TTA CCC AAG TCC TTG ATC TCT GTG GTA AGA AGT GCT ACT TTA GAG
  E  K  S  I  I  L  P  K  S  L  I  S  V  V  R  S  A  T  L  E
                290                                300
ACA AAA CCT GAA TCA AAA TAT GTA TCA CTC ATC ACG TCA TAC CAG CCA TTT TCC TTA GAA
  T  K  P  E  S  K  Y  V  S  L  I  T  S  Y  Q  P  F  S  L  E
                310                                320
AAG GAG GTG GTC TGT GAA GAG CCG TTG TCT CCA GCA ACA GTT CCA GGC ATG CAT ACC GAA
  K  E  V  V  C  E  E  P  L  S  P  A  T  V  P  G  M  H  T  E
                330                                340
GAC AAT CCA GGA AAA GTG GAA CAT ACA GAA GAA CTT TCT AGT ATA ACA GAA GTG GTG ACT
  D  N  P  G  K  V  E  H  T  E  E  L  S  S  I  T  E  V  V  T
                350                                360
ACT GAA GAA AAT ATT CCT GAC GTG GTC CCG GGC AGC CAT CTG ACT CCA ATA GAG AGA GAG
  T  E  E  N  I  P  D  V  V  P  G  S  H  L  T  P  I  E  R  E
                370                                380
AGT TCT TCA CCT TTA AGT AGT AAC CAG TCT GAA CCT GGC AGC ATC GCT TTA AAC TCG TAT
  S  S  S  P  L  S  S  N  Q  S  E  P  G  S  I  A  L  N  S  Y
                390                                400
CAC TCC AGA AAT TGT TCT GAG AGT GAT CAC TCC AGA AAT GGT TTT GAT ACT GAT TCC AGC
  H  S  R  N  C  S  E  S  D  H  S  R  N  G  F  D  T  D  S  S
                410                                420
TGT CTG GAA TCA CAT AGC TCC TTA TCT GAC TCA GAA TTT CCC CCA AAT AAT AAA GGT GAA
  C  L  E  S  H  S  S  L  S  D  S  E  F  P  P  N  N  K  G  E
                430                                440
ATA AAA ACA GAA GGA CAA GAG CTC ATA ACC GTA ATA AAA GCC CCC ACC TCC TTT GGT TAT
  I  K  T  E  G  Q  E  L  I  T  V  I  K  A  P  T  S  F  G  Y
                450                                460
GAT AAA CCA CAT GTG CTA GTG GAT CTA CTT GTG GAT GAT AGC GGT AAA GAG TCC TTG ATT
  D  K  P  H  V  L  V  D  L  L  V  D  D  S  G  K  E  S  L  I
                470                                472
GGT TAT AGA CCA ACA GAA GAT TCC AAA GAA TTT TCA TGA
  G  Y  R  P  T  E  D  S  K  E  F  S  stop
      <<<<      ICD IFNGR1      <
    
```

C) Nukleotid und Aminosäuresequenz von huIFNGR2

Blau markierte AS: *Jak2* Bindungsstelle

```

ATG CGA CCG ACG CTG CTG TGG TCG CTG CTG CTG CTG CTC GGA GTC TTC GCC GCC GCC GCC
M  R  P  T  L  L  W  S  L  L  L  L  L  G  V  F  A  A  A  A
➤                                     Signalpeptid IFNGR2
1                                     10
GCG GCC CCG CCA GAC CCT CTT TCC CAG CTG CCC GCT CCT CAG CAC CCG AAG ATT CGC CTG
A  A  P  P  D  P  L  S  Q  L  P  A  P  Q  H  P  K  I  R  L
◀ ➤ ECD IFNGR2                ➤➤➤
20                                     30
TAC AAC GCA GAG CAG GTC CTG AGT TGG GAG CCA GTG GCC CTG AGC AAT AGC ACG AGG CCT
Y  N  A  E  Q  V  L  S  W  E  P  V  A  L  S  N  S  T  R  P
40                                     50
GTT GTC TAC CGA GTG CAG TTT AAA TAC ACC GAC AGT AAA TGG TTC ACG GCC GAC ATC ATG
V  V  Y  R  V  Q  F  K  Y  T  D  S  K  W  F  T  A  D  I  M
60                                     70
TCC ATA GGG GTG AAT TGT ACA CAG ATC ACA GCA ACA GAG TGT GAC TTC ACT GCC GCC AGT
S  I  G  V  N  C  T  Q  I  T  A  T  E  C  D  F  T  A  A  S
80                                     90
CCC TCA GCA GGC TTC CCA ATG GAT TTC AAT GTC ACT CTA CGC CTT CGA GCT GAG CTG GGA
P  S  A  G  F  P  M  D  F  N  V  T  L  R  L  R  A  E  L  G
100                                    110
GCA CTC CAT TCT GCC TGG GTG ACA ATG CCT TGG TTT CAA CAC TAT CGG AAT GTG ACT GTC
A  L  H  S  A  W  V  T  M  P  W  F  Q  H  Y  R  N  V  T  V
120                                    130
GGG CCT CCA GAA AAC ATT GAG GTG ACC CCA GGA GAA GGC TCC CTC ATC ATC AGG TTC TCC
G  P  P  E  N  I  E  V  T  P  G  E  G  S  L  I  I  R  F  S
140                                    150
TCT CCC TTT GAC ATC GCT GAT ACC TCC ACG GCC TTT TTT TGT TAT TAT GTC CAT TAC TGG
S  P  F  D  I  A  D  T  S  T  A  F  F  C  Y  Y  V  H  Y  W
160                                    170
GAA AAA GGA GGA ATC CAA CAG GTC AAA GGC CCT TTC AGA AGC AAC TCC ATT TCA TTG GAT
E  K  G  G  I  Q  Q  V  K  G  P  F  R  S  N  S  I  S  L  D
180                                    190
AAC TTA AAA CCC TCC AGA GTG TAC TGT TTA CAA GTC CAG GCA CAA CTG CTT TGG AAC AAA
N  L  K  P  S  R  V  Y  C  L  Q  V  Q  A  Q  L  L  W  N  K
200                                    210
AGT AAC ATC TTT AGA GTC GGG CAT TTA AGC AAC ATA TCT TGC TAC GAA ACA ATG GCA GAT
S  N  I  F  R  V  G  H  L  S  N  I  S  C  Y  E  T  M  A  D
220                                    230
GCC TCC ACT GAG CTT CAG CAA GTC ATC CTG ATC TCC GTG GGA ACA TTT TCG TTG CTG TCG
V  I  L  I  S  V  G  T  F  S  L  L  S
A  S  T  E  L  Q  Q ➤ TMD IFNGR2
◀◀◀ ECD IFNGR2                ◀
240                                    250
GTG CTG GCA GGA GCC TGT TTC TTC CTG GTC CTG AAA TAT AGA GGC CTG ATT AAA TAC TGG
V  L  A  G  A  C  F  F  L  V  L  K  Y  R  G  L  I  K  Y  W
TMD IFNGR2                ◀ ➤ ICD IFNGR2                ➤➤➤
260                                    270
TTT CAC ACT CCA CCA AGC ATC CCA TTA CAG ATA GAA GAG TAT TTA AAA GAC CCA ACT CAG
F  H  T  P  P  S  I  P  L  Q  I  E  E  Y  L  K  D  P  T  Q
280                                    290
CCC ATC TTA GAG GCC TTG GAC AAG GAC AGC TCA CCA AAG GAT GAC GTC TGG GAC TCT GTG
P  I  L  E  A  L  D  K  D  S  S  P  K  D  D  V  W  D  S  V
300                                    310
TCC ATT ATC TCG TTT CCG GAA AAG GAG CAA GAA GAT GTT CTC CAA ACG CTT TGA
S  I  I  S  F  P  E  K  E  Q  E  D  V  L  Q  T  L  stop
    
```

D) Nukleotid- und Aminosäuresequenz des in pTrcHisB klonierten ORF B8R von *Vaccinia Virus VR-119* (Western Reserve)

Die Nummerierung der Aminosäuren im Protein bezieht sich auf die in der Datenbank angegebene Annotation

Nco I		His - Tag																
5´	..AAA	<u>CC</u>	<u>ATG</u>	GGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT
		M	G	G	S	<u>H</u>	G	M	A	S	M	T						
Anti-Xpress Antibody Epitop																		
GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGG	ACT	CTG	TAC	GAC	GAT	GAC	GAT	AAG	GAT	CCC	ATG	AGA
G	G	Q	Q	M	G	R	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	D	P	Met	Arg
10																		
TAT	ATT	ATA	ATT	CTC	GCA	GTT	TTG	TTC	ATT	AAT	AGT	ATA	CAC	GCT	AAA	ATA	ACT	AGT
Tyr	Ile	Ile	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Ile	Asn	Ser	Ile	His	Ala	Lys	Ile	Thr	Ser
20																		
TAT	AAG	TTT	GAA	TCC	GTC	AAT	TTT	GAT	TCC	AAA	ATT	GAA	TGG	ACT	GGG	GAT	GGT	CTA
Tyr	Lys	Phe	Glu	Ser	Val	Asn	Phe	Asp	Ser	Lys	Ile	Glu	Trp	Thr	Gly	Asp	Gly	Leu
30																		
TAC	AAT	ATA	TCC	CTT	AAA	AAT	TAT	GGC	ATC	AAG	ACG	TGG	CAA	ACA	ATG	TAT	ACA	AAT
Tyr	Asn	Ile	Ser	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Ile	Lys	Thr	Trp	Gln	Thr	Met	Tyr	Thr	Asn
40																		
GTA	CCA	GAA	GGA	ACA	TAC	GAC	ATA	TCC	GCA	TTT	CCA	AAG	AAT	GAT	TTC	GTA	TCT	TTC
Val	Pro	Glu	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Ser	Ala	Phe	Pro	Lys	Asn	Asp	Phe	Val	Ser	Phe
50																		
TGG	GTT	AAA	TTT	GAA	CAA	GGC	GAT	TAT	AAA	GTG	GAA	GAG	TAT	TGT	ACG	GGA	CTA	TGC
Trp	Val	Lys	Phe	Glu	Gln	Gly	Asp	Tyr	Lys	Val	Glu	Glu	Tyr	Cys	Thr	Gly	Leu	Cys
60																		
GTC	GAA	GTA	AAA	ATT	GGA	CCA	CCG	ACT	GTA	ACA	TTG	ACT	GAA	TAC	GAC	GAC	CAT	ATC
Val	Glu	Val	Lys	Ile	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Glu	Tyr	Asp	Asp	His	Ile
70																		
AAT	TTG	TAC	ATC	GAG	CAT	CCG	TAT	GCT	ACT	AGA	GGT	AGC	AAA	AAG	ATT	CCT	ATT	TAC
Asn	Leu	Tyr	Ile	Glu	His	Pro	Tyr	Ala	Thr	Arg	Gly	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Ile	Tyr
80																		
AAA	CGC	GGT	GAC	ATG	TGT	GAT	ATC	TAC	TTG	TTG	TAT	ACG	GCT	AAC	TTC	ACA	TTC	GGA
Lys	Arg	Gly	Asp	Met	Cys	Asp	Ile	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asn	Phe	Thr	Phe	Gly
90																		
GAT	TCT	GAA	GAA	CCA	GTA	ACA	TAT	GAT	ATC	GAT	GAC	TAC	GAT	TGC	ACG	TCT	ACA	GGT
Asp	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Thr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asp	Cys	Thr	Ser	Thr	Gly
100																		
TGC	AGC	ATA	GAC	TTT	GCC	ACA	ACA	GAA	AAA	GTG	TGC	GTG	ACA	GCA	CAG	GGA	GCC	ACA
Cys	Ser	Ile	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Val	Cys	Val	Thr	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr
110																		
AAT	TTG	TAC	ATC	GAG	CAT	CCG	TAT	GCT	ACT	AGA	GGT	AGC	AAA	AAG	ATT	CCT	ATT	TAC
Asn	Leu	Tyr	Ile	Glu	His	Pro	Tyr	Ala	Thr	Arg	Gly	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Ile	Tyr
120																		
AAA	CGC	GGT	GAC	ATG	TGT	GAT	ATC	TAC	TTG	TTG	TAT	ACG	GCT	AAC	TTC	ACA	TTC	GGA
Lys	Arg	Gly	Asp	Met	Cys	Asp	Ile	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asn	Phe	Thr	Phe	Gly
130																		
GAT	TCT	GAA	GAA	CCA	GTA	ACA	TAT	GAT	ATC	GAT	GAC	TAC	GAT	TGC	ACG	TCT	ACA	GGT
Asp	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Thr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asp	Cys	Thr	Ser	Thr	Gly
140																		
TGC	AGC	ATA	GAC	TTT	GCC	ACA	ACA	GAA	AAA	GTG	TGC	GTG	ACA	GCA	CAG	GGA	GCC	ACA
Cys	Ser	Ile	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Val	Cys	Val	Thr	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr
150																		
AAT	TTG	TAC	ATC	GAG	CAT	CCG	TAT	GCT	ACT	AGA	GGT	AGC	AAA	AAG	ATT	CCT	ATT	TAC
Asn	Leu	Tyr	Ile	Glu	His	Pro	Tyr	Ala	Thr	Arg	Gly	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Ile	Tyr
160																		
AAA	CGC	GGT	GAC	ATG	TGT	GAT	ATC	TAC	TTG	TTG	TAT	ACG	GCT	AAC	TTC	ACA	TTC	GGA
Lys	Arg	Gly	Asp	Met	Cys	Asp	Ile	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asn	Phe	Thr	Phe	Gly
170																		
GAT	TCT	GAA	GAA	CCA	GTA	ACA	TAT	GAT	ATC	GAT	GAC	TAC	GAT	TGC	ACG	TCT	ACA	GGT
Asp	Ser	Glu	Glu	Pro	Val	Thr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Asp	Tyr	Asp	Cys	Thr	Ser	Thr	Gly
180																		
TGC	AGC	ATA	GAC	TTT	GCC	ACA	ACA	GAA	AAA	GTG	TGC	GTG	ACA	GCA	CAG	GGA	GCC	ACA
Cys	Ser	Ile	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Val	Cys	Val	Thr	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr
190																		

200 210
 GAA GGG TTT CTC GAA AAA ATT ACT CCA TGG AGT TCG GAA GTA TGT CTG ACA CCT AAA
 Glu Gly Phe Leu Glu Lys Ile Thr Pro Trp Ser Ser Glu Val Cys Leu Thr Pro Lys

220 230
 AAG AAT GTA TAT ACA TGT GCA ATT AGA TCC AAA GAA GAT GTT CCC AAT TTC AAG GAC
 Lys Asn Val Tyr Thr Cys Ala Ile Arg Ser Lys Glu Asp Val Pro Asn Phe Lys Asp

240
 AAA ATG GCC AGA GTT ATC AAG AGA AAA TTT AAT AAA CAG TCT CAA TCT TAT TTA ACT
 Lys Met Ala Arg Val Ile Lys Arg Lys Phe Asn Lys Gln Ser Gln Ser Tyr Leu Thr

250 260
 AAA TTT CTC GGT AGC ACA TCA AAT GAT GTT ACC ACT TTT CTT AGC ATG CTT AAC TTG
 Lys Phe Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp Val Thr Thr Phe Leu Ser Met Leu Asn Leu

270 272
 ACT AAA TAT TCA TAA AAGCTTGGC...3'
 Thr Lys Tyr Ser stop

Hind III

E) In den Datenbanken veröffentliche Sequenzen von *Vaccinia Virus* Stämmen

Stamm	Accession No.	Locus	Bemerkung
Western Reserve	P24770	VB_08VACCV	272 AS
Copenhagen	P21004	VB_08VACCC	272 AS 5 Mutationen
Ankara	AAC40830	AF 016273.1	226 AS
Tian Tan	AF 095689	AF 095689	272 AS 2 Mutationen
Weyth	AJ 404659		Sequenz wie WR
Praha	AAD22050	AF120160.1	Sequenz wie WR
LIVP			272 AS 3 Mutationen

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Marco Kresin
Geburtstag	21.12.1968
Geburtsort	Peine
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulausbildung

08/1997 - 12/2000	Dissertation in der Fraunhofer Gesellschaft am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, IGB in Hannover, in der Abteilung Gentechnologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Otto.
12/1996 - 05/1997	Diplomarbeit in der Fraunhofer Gesellschaft am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB; Abteilung Gentechnologie Herrn Prof. Dr. Bernd Otto in Hannover. Betreuung durch Herrn Dr. Gero Waschütza
10/1991 - 05/1997	Studium der Biochemie mit Studienziel Diplom am Fachbereich Chemie der Universität Hannover

Wehrdienst

06/1989 - 06/1991	3. PzArtBtl 335 in Dedelsdorf; Ausbildung zum Reserveoffizier
-------------------	---

Schulbildung

08/1981 - 05/1989	Gymnasium am Silberkamp, Peine
08/1979 - 06/1981	Orientierungsstufe Burgstraße, Peine
08/1975 - 06/1979	Grundschule Burgschule, Peine

Hannover, im Dezember 2000