

Thorsten Ulf Meyer

**Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer
Variante des humanen Interferon- β aus CHO-Zellen mit
verbesserten biochemischen und pharmakokinetischen
Eigenschaften**

Promotionsarbeit

Oktober 2000

**Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer Variante
des humanen Interferon- β aus CHO-Zellen mit verbesserten
biochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften**

**Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines**

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

**DOCTOR RERUM NATURALIUM
(Dr.rer.nat)**

**genehmigte Dissertation
von**

**Dipl. Biochem. Thorsten Ulf Meyer,
geboren am 30.11.1971, in Hannover**

Oktober 2000

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto
Koreferent: PD Dr. Walter H. Müller
Tag der Promotion: 23. November 2000

Die vorgelegte Dissertation wurde von Oktober 1997 bis Oktober 2000 unter der Betreuung von Prof. Dr. Bernd Otto in der Abteilung Gentechnologie am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Hannover angefertigt.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch die finanzielle Förderung des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Theoretische Grundlagen	2
2.1.	Einleitung	2
2.2.	Interferone	3
2.2.1.	Klassifikation der Interferone	3
2.2.1.1.	Alpha-Interferone (IFN- α)	4
2.2.1.2.	Beta-Interferon (IFN- β)	4
2.2.1.3.	Gamma-Interferon (IFN- γ)	5
2.2.2.	<i>In vivo</i> -Induktion der Typ-I-Interferonexpression	5
2.2.3.	Transduktion des IFN-Signals und Effekte in der Zielzelle	6
2.2.3.1.	Rezeptor der Typ-I-Interferone	6
2.2.3.2.	Signaltransduktionswege des Interferonsignals	7
2.2.3.3.	Interferon-induzierte biologische Effekte	8
2.2.3.3.1.	Antivirale Aktivität	9
2.2.3.3.2.	Immunmodulatorische und zelldifferenzierende Wirkungen	10
2.2.3.3.3.	Antiproliferative und antitumorale Wirkungen	11
2.3.	Struktur der Typ-I-Interferone	12
2.3.1.	Bedeutung der Glykosylierung von IFN- β	13
2.4.	Stand der Forschung in Bezug auf die Entwicklung, Produktion und klinische Anwendung eines IFN- β mit verbesserten Eigenschaften	14
2.4.1.	Struktur-Funktionsbeziehungen des IFN- β	14
2.4.2.	Gentechnologische Produktion des IFN- β und klinischer Einsatz	15
2.4.3.	Ansätze zur Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen und Vorarbeiten in Bezug auf ein IFN- β mit verbesserten Eigenschaften	17
2.5.	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	20

3.	Material und Methoden	21
3.1.	Material	21
3.1.1.	Rechner und Software	21
3.1.2.	Chemikalien	21
3.1.3.	Enzyme, Antikörper und Interferonaktivitätsstandards	22
3.1.4.	Geräte	23
3.1.5.	Chromatographiematerialien	24
3.1.6.	Zellkultur	24
3.1.7.	Nährmedien für <i>E. coli</i> -Zellen	25
3.1.8.	Mikroorganismen	25
3.1.9.	Selektions- und Expressionsplasmide	26
3.2.	Methoden	27
3.2.1.	Anzucht der Bakterienstämme	27
3.2.2.	Molekularbiologische Arbeitstechniken	27
3.2.2.1.	Gerichtete PCR-Mutagenese von Plasmidabschnitten	27
3.2.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	29
3.2.2.3.	Isolierung von genomischer DNA aus CHO-Zellen	29
3.2.2.4.	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	29
3.2.2.5.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	30
3.2.2.6.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	30
3.2.2.7.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	31
3.2.2.8.	Ligation von DNA-Fragmenten	31
3.2.2.9.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	31
3.2.2.10.	DNA-Sequenzierung	32
3.2.2.11.	Klonierung der Expressionsplasmide für IFN- β und IFN- β (9x)	34
3.2.3.	Zellkulturtechniken	35
3.2.3.1.	Kultivierung, Transfektion, Selektion und Expressionssteigerung der CHO-Zellen	35
3.2.3.2.	„overlay assay“ zur Analyse IFN- β -exprimierender Klone	38
3.2.3.3.	Biologische Aktivitätsbestimmung IFN- β -haltiger Proben im antiviralen Assay (AVA)	39
3.2.3.4.	Optische Analyse der CHO-Klone mit GFP-Koexpression	40

3.2.3.5.	Serumfreie Expression von IFN- β und IFN- β (9x)	40
3.2.4.	Proteinchemische Analysemethoden	41
3.2.4.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
3.2.4.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2.4.3.	Enzymgekoppeltes Immunelektrotransfer-Blotverfahren	42
3.2.4.4.	ELISA für IFN- β	43
3.2.4.5.	Aufreinigung von IFN- β und IFN- β (9x)	44
3.2.4.5.1.	Affinitätschromatographie an einer Blue Sepharose-Säule	44
3.2.4.5.2.	Affinitätschromatographie an einer Chelating Sepharose-Säule	44
3.2.4.5.3.	Gelfiltration	45
3.2.4.6.	„reversed phase“ HPLC	46
3.2.4.7.	Massenspektrometrische Analyse	46
3.2.5.	Pharmakologische Tierversuche	46
4.	Ergebnisse	48
4.1.	Expression von IFN- β und IFN- β (9x)	48
4.1.1.	Transfektion, Selektion und Expressionssteigerung der CHO-Zellen	48
4.2.	Aufreinigung von IFN- β und IFN- β (9x)	51
4.2.1.	Blue Sepharose FF-Affinitätschromatographie	51
4.2.2.	Chelating Sepharose FF-Affinitätschromatographie	53
4.2.3.	Gelfiltration von IFN- β und IFN- β (9x)	55
4.2.4.	Reinheitskontrolle der IFN- β - und IFN- β (9x)-Fraktionen	57
4.2.5.	Bilanzierung der Aufreinigung	59
4.3.	Charakterisierung von IFN- β und IFN- β (9x)	60
4.3.1.	Spezifische Aktivität	60
4.3.2.	„reversed phase“ HPLC	61
4.3.3.	Massenspektrometrische Analyse	62
4.3.4.	Pharmakologische Tierversuche	64
4.3.4.1.	Tierversuch I	65
4.3.4.2.	Tierversuch II	66

5.	Diskussion	69
5.1.	Expression von IFN- β und IFN- β (9x) in CHO-Zellen	69
5.2.	Aufreinigung, Hydrophobizität und Löslichkeitsverhalten von IFN- β und IFN- β (9x)	72
5.3.	Charakterisierung von IFN- β und IFN- β (9x)	76
5.3.1.	Spezifische Aktivität und Struktur	76
5.3.2.	Pharmakokinetik des IFN- β (9x) im Vergleich zu Rebif®	77
6.	Literaturverzeichnis	80
7.	Abbildungsverzeichnis	89
8.	Appendix	90
8.1.	AVA- und ELISA-Meßwerte der Tierversuche	90
8.2.	Lebenslauf	91
8.3.	Danksagung	92

Abkürzungen

AK	Antikörper
As	Aminosäure
AVA	antiviraler assay
bp	Basenpaare
CD	clusters of differentiation
CDK	cyclin dependend kinase
CHO	chinese hamster ovary
GDP	Desoxyguanosindiphosphat
GTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMC	Encephalomyocarditis
FACS	fluorescence activated cell sort
FBS	fetal bovin serum
GAS	interferon-gamma activation site
GFP	green fluorescent protein
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
HSA	humanes Serumalbumin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	internal ribosom entry site
ISGF	interferon stimulated gene factor
ISRE	interferon stimulated response element
IU	international unit
Jak	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LMW	low molecular weight marker
MW	Molekulargewicht
NaP	Natriumphosphatpuffer
NK	natural killer
NMR	nuclear magnetic resonance
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidifluorid

Rb	retinoblastoma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleosinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	src-homology 2
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
VWD	various wave detector
w/v	weight per volume
YT	Yeast Extract Kulturmedium
Z	Zellen

Summary

Human interferon-beta (IFN- β) is characterized by a high degree of hydrophobic, surface exposed amino acids resulting in a significant tendency to aggregate and therefore causing problems to purification and protein stability. Due to its hydrophobicity, IFN- β has a low bioavailability reducing its clinical applications. To overcome these problems we have mutated eight unpolar amino acids of IFN- β into serines and have expressed and purified this less hydrophobic variant from CHO cells. This IFN- β variant (IFN- β (9x)) shows improved biochemical and pharmaco-kinetical properties. In serum free medium the expression rates of IFN- β and IFN- β (9x) are two to three times higher than those of industrial CHO clones that are currently in use.

Up to now the purification of IFN- β has done under acid conditions to prevent the protein from aggregation. In contrast, we established an efficient purification procedure for IFN- β (9x) under neutral and non-denaturing conditions. Thereby, the specific activity and glycan structure of the highly purified protein is identical to the natural or recombinant IFN- β produced in CHO. Compared to IFN- β , IFN- β (9x) has a reduced tendency to aggregate, especially in concentrated solutions. The decreased hydrophobic character of IFN- β (9x) has been proven by an apparent lower affinity to a reversed phase and a blue sepharose matrix.

Finally, in experiments with rabbits we have shown IFN- β (9x) to have significantly improved pharmacokinetics in contrast to commercially available IFN- β (Rebif®, Serono Corp.). After subcutaneous injections of identical activity amounts the maximum plasma concentration of IFN- β (9x) has been fourfold compared to that of IFN- β and the absolute bioavailability has been six times higher. Consistent with these results the half-life of IFN- β (9x) was distinctly longer than that of IFN- β .

These results suggest that IFN- β (9x) is a potential candidate for an optimized IFN- β -therapy and for new therapeutic applications.

Keywords: interferon-beta; CHO cells; hydrophobicity engineering; pharmacokinetics

1. Zusammenfassung

Humanes Interferon- β (IFN- β) zeichnet sich durch einen hohen Anteil hydrophober, oberflächenexponierter Aminosäuren aus, der eine starke Aggregationstendenz mit daraus resultierenden Problemen bei der Aufreinigung und der Stabilität des Proteins bedingt. Als weitere Folge seiner Hydrophobizität zeigt das IFN- β im klinischen Einsatz eine ausgesprochen geringe Bioverfügbarkeit, die die Indikationsmöglichkeiten erschwert und einschränkt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit ist es nach gezieltem Austausch acht unpolarer Aminosäuren gelungen, die Expression und Aufreinigung einer weniger hydrophoben Variante des humanen IFN- β mit verbesserten biochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften in CHO-Zellen zu etablieren. Die in serumfreiem Medium erzielten Expressionsraten des IFN- β und seiner Variante (IFN- β (9x)) liegen dabei um den Faktor zwei bis drei höher als diejenigen der zur Zeit in der industriellen Produktion von IFN- β verwendeten CHO-Klone. Um eine Aggregation mit Verlust an spezifischer Aktivität zu vermeiden, mußte die Aufreinigung von IFN- β bisher in saurem Milieu erfolgen. Im Gegensatz dazu konnte für IFN- β (9x), bedingt durch dessen verminderte Hydrophobizität, ein effektives Aufreinigungsverfahren bei neutralem pH-Wert und nicht denaturierenden Bedingungen entwickelt werden.

Das hochreine Protein besitzt die gleiche spezifische Aktivität wie natürliches oder rekombinant in CHO-Zellen gewonnenes IFN- β sowie eine identische Glykanstruktur und zeigt eine verringerte Aggregationsneigung in konzentrierter Lösung. Der im Gegensatz zu IFN- β reduzierte hydrophobe Charakter des IFN- β (9x) ließ sich in einer stark verminderten Affinität zu einer „reversed phase“- und einer Blue Sepharose-Matrix nachweisen.

Schließlich konnte im Tierversuch mit Kaninchen für IFN- β (9x) eine signifikant verbesserte Pharmakokinetik gegenüber dem kommerziell erhältlichen IFN- β -Präparat Rebif® ermittelt werden. So liegen nach subkutaner Injektion gleicher Aktivitätsmengen die maximal erreichten Plasmakonzentrationen für IFN- β (9x) viermal und die absolute Bioverfügbarkeit sechsmal höher als bei IFN- β . Gleichzeitig ist die Halbwertszeit von IFN- β (9x) deutlich größer als die von IFN- β .

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte mit IFN- β (9x) ein Kandidat für eine optimierte IFN- β -Therapie generiert worden sein mit dem sich darüber hinaus neue medizinische Anwendungen erschließen lassen.

Schlagwörter: Interferon-beta; CHO-Zellen; Pharmakokinetik; verbesserte Löslichkeit

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Einleitung

Seit Anfang der 80iger Jahre hat auf dem Gebiet der Biowissenschaften eine revolutionäre Entwicklung begonnen, die in ihren Konsequenzen mindestens ebenso weitreichend wie die der elektronischen Datenverarbeitung sein wird. Die Entschlüsselung des humanen Genoms, die rekombinante Produktion von Arzneimitteln und der Einsatz gezielt genveränderter Agrarpflanzen sind Ergebnisse dieser Entwicklung, die das Leben jedes einzelnen Menschen beeinflussen wird.

Viele pathogene Ereignisse im menschlichen Organismus sind von ausgeprägter Komplexität und lassen sich nicht durch ein einfaches Ursache-/Wirkungsschema erklären. Die Möglichkeit der Untersuchung von Krankheiten auf molekularer Ebene und ihre Behandlung hat einer neuen Substanzklasse den Weg in der Arzneimittelforschung geebnet: den Proteinen. So können heute im Körper nur in geringen Konzentrationen vorkommende Proteine mittels gentechnologischer Verfahren in großen Mengen der Medizin zur Verfügung gestellt werden. Der Beginn dieser Entwicklung war die Zulassung rekombinant produzierten Humaninsulins 1982 durch die amerikanische Fa. Ely Lilly. Es folgten weitere, gentechnisch hergestellte Arzneimittel wie Erythropoetin- α , Somatotropin, Interleukin-2, Impfstoffe gegen Hepatitis-B, Interferone, etc.

Die Vielfalt der Proteine und ihrer Funktionen ist bedingt durch die chemischen Unterschiede der sie aufbauenden 20 Aminosäuren, deren Modifikationen und der aus unterschiedlichen Primärsequenzen resultierenden, dreidimensionalen Molekülstrukturen. In den evolutionär so optimierten Proteinstrukturen sind häufig hohe Wirksamkeit und Spezifität miteinander verknüpft.

Gesteigerte Rechnerleistungen und verbesserte Analysemethoden liefern immer mehr dreidimensionale Molekülstrukturen, so daß mittlerweile eine planmäßige Wirkstoffsuche und -veränderung auf Strukturbasis möglich ist.

In der nachfolgenden Arbeit wurde ein therapeutisch genutztes Protein gezielt so verändert, rekombinant exprimiert und aufgereinigt, daß sich sowohl seine Stabilität als auch seine pharmakologischen Eigenschaften verbesserten und sich dadurch neue medizinische Anwendungen eröffnen.

2.2. Interferone

Die Geschichte der Interferone begann im Jahr 1957 mit einer Entdeckung durch Isaacs und Lindemann (Isaacs und Lindemann, 1957). Diese hatten aus Influenzavirus-infizierten Hühnerembryonalzellen Substanzen isoliert, welche die Eigenschaft besaßen, andere Zellen vor einer Infektion mit Influenza- oder anderen Viren zu schützen. Sie bezeichneten diese Stoffe als Interferone, die heute nach ihren antigenen Eigenschaften in drei Klassen unterteilt werden: α -, β -, γ -Interferone. Neben der beobachteten antiviralen Aktivität wurden im Laufe der Zeit weitere biologische Wirkungen der Interferone entdeckt. Die verschiedenen Interferonklassen kommen in jedem bisher untersuchten Wirbeltier vor, sie entfalten ihre Aktivitäten jedoch weitgehend artspezifisch. Nachfolgend wird ausschließlich auf die menschlichen Interferonklassen Bezug genommen.

In der Systematik gehören die Interferone zusammen mit Interleukinen, Tumornekrose- und Wachstumsfaktoren zu der Gruppe der Zytokine. Diese sind ubiquitär im Körper nach spezifischer Stimulation vorkommende (Glyko-)Proteine, welche Einfluß auf Wachstum, Funktion und Differenzierung von Zellen, insbesondere denen des Immunsystems, ausüben. Die meist im Rahmen pathogener Ereignisse in geringen Mengen von spezifischen Zellen sezernierten Zytokine entfalten ihre Wirkungen bevorzugt bei Nachbarzellen durch Interaktion mit einem spezifischen Rezeptormolekül. Dieses induziert über Signaltransduktionskaskaden eine veränderte Genexpression, welche zu einer auf das pathogene Ereignis abgestimmten Zellreaktion führt.

Mittlerweile sind über 150 Zytokine bekannt, von denen 21 gentechnisch hergestellt werden und Anwendung in der Krankheitstherapie finden.

Im folgenden werde ich auf das beta-Interferon (IFN- β) als Zielmolekül dieser Dissertation näher eingehen, gleichzeitig jedoch die Erkenntnisse über die anderen Interferone mit einbeziehen.

2.2.1. Klassifikation der Interferone

Folgende drei Interferonklassen werden unterschieden, wobei sich die früheren Bezeichnungen von den Hauptproduzentenzellen beim Menschen ableiten:

- alpha-Interferone (IFN- α) (früher: Leukozyteninterferon) und omega-Interferon (IFN- ω)
- beta-Interferon (IFN- β) (früher: Fibroblasteninterferon)
- gamma-Interferon (IFN- γ) (früher: Immuninterferon)

2.2.1.1. Alpha-Interferone (IFN- α)

Für die Klasse der alpha-Interferone sind derzeit 25 kodierende, keine Introns enthaltenden Gene bekannt, von denen neun Pseudogene sind (Pestka, 1997). Für die anderen beiden Interferonklassen ist je nur ein kodierendes Gen bekannt. Die Gene für IFN- β und IFN- α sind beim Menschen auf Chromosom 9, das für IFN- γ auf Chromosom 12 lokalisiert. Die alpha-Interferone und IFN- β sind phylogenetisch miteinander verwandt.

Das oben erwähnte IFN- ω wurde früher als eigene Interferonklasse geführt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß es sich beim IFN- ω und dem beim Menschen nicht vorkommenden IFN- τ (Trophoblasteninterferon) um Abkömmlinge der Klasse der alpha-Interferone mit sehr ähnlicher Struktur handelt (Cross und Roberts, 1991).

Humane alpha-Interferone enthalten 156-172 Aminosäurereste, besitzen eine Homologie von 70 % bis 90 % (Kontsek, 1994) und liegen teilweise N-glykosyliert vor. Einziges O-glykosyliertes Typ-I-Interferon ist das IFN- α_2 (Adolf *et al.*, 1987). Die Molekulargewichte der alpha-Interferone variieren zwischen 17,5 und 24 kDa.

2.2.1.2. Beta-Interferon (IFN- β)

IFN- β besteht aus 166 Aminosäuren, ist an Asparagin 80 N-glykosyliert (Obert, 2000, S. 17 f.) und besitzt eine etwa 30 %ige Aminosäuresequenz-Homologie zu den alpha-Interferonen. Sein Molekulargewicht beträgt glykosyliert etwa 22-23 kDa und unglykosyliert 18,7 kDa. Es besitzt mit einem Anteil von 40 % aromatischen und unpolaren Aminosäuren einen ausgeprägt hydrophoben Molekülcharakter.

Neben der deutlichen Homologie auf Aminosäureebene binden IFN- α und IFN- β an gemeinsame Rezeptoren und werden deshalb als Typ-I-Interferone (Typ-I-IFN) zusammengefaßt. Die Produktion von Typ-I-IFN ist nicht auf einen speziellen Zelltypus beschränkt. Bei entsprechender Stimulation scheinen alle Zellen in der Lage, diese Art der Zytokine bilden zu können. Typ-I-Interferone weisen eine große Temperatur- und pH-Stabilität auf. So über-

stehen IFN- β , als auch die meisten IFN- α -Subtypen ein kurzzeitiges Erhitzen auf 100°C bzw. ein pH-Minimum von zwei ohne Verlust der biologischen Aktivität. IFN- γ besitzt diese Stabilitäten nicht.

2.2.1.3. Gamma-Interferon (IFN- γ)

Den Typ-I-Interferonen gegenüber steht das, mit einem distinkten Rezeptor reagierende, ebenfalls N-glykosylierte (an Asn25 und Asn97) IFN- γ . Dieses, auch als Typ-II-Interferon bezeichnete, 143 Aminosäuren lange Protein wird im Unterschied zu IFN- α und IFN- β von einem Exons enthaltenden Gen auf Chromosom 12 kodiert. Die biologisch aktive Form des IFN- γ liegt als Dimer mit einem Molekulargewicht von 45 kDa vor. Chemisch wie auch phylogenetisch ist IFN- γ nicht mit den beiden anderen Interferonklassen verwandt. *In vivo* wird IFN- γ ausschließlich durch inflammatorische CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen produziert.

2.2.2. *In vivo*-Induktion der Typ-I-Interferonexpression

Die Expression der Typ-I-IFN-Gene wird unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren, IRF-1, IRF-2 und IRF-3 (*interferon regulatory factor*), reguliert (Talou et al., 2000; Fujita *et al.*, 1989). IRF-1 und IRF-2 konkurrieren um die Bindung an den Promotor von Typ-I-IFN-Genen, wobei IRF-1 einen transkriptionsaktivierenden, IRF-2 hingegen einen inhibierenden Effekt ausübt (Taniguchi, 1997; Hauser *et al.*, 1982).

In einer proliferierenden Zelle ist normalerweise IRF-2 im Überschuss vorhanden und die Interferontranskription daher blockiert. Erfolgt jedoch eine Stimulation der Zelle mit Zytokinen, wie TNF- α / β , IL-1, IL-6, LIF oder aber mit doppelsträngiger RNA (dsRNA), die im Replikationszyklus vieler Viren auftritt, so steigt die Konzentration an IRF-1 und die Transkription der Typ-I-IFN wird initiiert (Abdollahi *et al.*, 1991).

Viele der von Interferonen stimulierten Gene besitzen in ihrer Promotorregion ebenfalls IRF-1- und IRF-2-bindende Sequenzen, so daß diese Gene zusätzlich einer direkten Kontrolle unterliegen. Interferone selbst induzieren die Expression von IRF-1 und, zeitlich verzögert, von IRF-2, so daß eine Selbstregulation der Interferonexpression vorliegt (Fujita *et al.*, 1989).

Die Regulation von IRF-3 geschieht mittels Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsmechanismen und unter Beteiligung von CBP (Kim et al., 1999).

2.2.3. Transduktion des IFN-Signals und Effekte in der Zielzelle

Nach Bindung des Interferons an seinen Rezeptor nehmen in der Zielzelle die Transkription und Translation von mindestens 100 Genen (Niederle et al., Zytokine, S. 23, 1996) deutlich zu. Einige Gene werden dabei selektiv nach der Bindung von Typ-I- oder Typ-II-Interferonen transkribiert, andere wiederum werden von beiden Typen gleichermaßen aktiviert.

Bei einer dritten Gruppe von Genen, zu der auch einige Protoonkogene gehören, führt das IFN-Signal zu einer Hemmung ihrer Transkription (Stark, 1991; Sen und Lengyel, 1992).

Die im weiteren beschriebenen Rezeptoren der Typ-I-Interferone sowie der Rezeptor für IL-10 gehören zur Klasse II der Zytokinrezeptoren. Im Gegensatz dazu werden aufgrund genetischer, funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten die Rezeptoren für Erythropoietin, den Großteil der Interleukine, diejenigen der Tumornekrose- und der Wachstumsfaktoren als Klasse-I-Zytokinrezeptoren bezeichnet (Bazan, 1990).

2.2.3.1. Rezeptor der Typ-I-Interferone

Der Rezeptor aller Typ-I-Interferone (IFNAR) besteht aus zwei glykosylierten Hauptuntereinheiten (IFNAR-1 und IFNAR-2c) und mehreren assoziierten Komponenten (Novick *et al.*, 1994; Russel-Harde *et al.*, 1996 und 1999). Nach Bindung des Typ-I-Interferons oligomerisieren die Rezeptorkomponenten und lösen damit eine Signaltransduktionskaskade aus (Pfeffer und Constantinescu, 1997). Das Molekulargewicht des IFNAR beträgt etwa 300 kDa. Die kodierenden Gene befinden sich beim Menschen auf Chromosom 21. IFNAR scheint auf allen menschlichen Zellen exprimiert zu werden, wobei die Anzahl der Rezeptormoleküle je nach Zellzyklusphase und Differenzierungsgrad pro Zelle zwischen 500 und 20000 schwankt. Bisherige Untersuchungen zeigen, daß IFNAR-1 entscheidend für die Signaltransduktion über Tyrosinkinassen (Tyk) ist (Cleary *et al.*, 1994). Weitere Studien belegen, daß IFNAR-2c in Wechselwirkung mit IFNAR-1 bei der Signaltransduktion über Janus-Kinasen (Jak) eine Rolle spielt, wichtiger aber seine Bedeutung für die Bindung des Typ-I-Interferons ist (Russel-Harde et al., 2000). So waren IFNAR-1 „knock-out“-Zellen zwar nicht mehr in der Lage den

Signaltransduktionsweg zu initiieren, wohl aber besaßen sie die Fähigkeit, Typ-I-Interferone zu binden (Cleary *et al.*, 1994).

1998 schließlich konnten Lewerenz *et al.* bestätigen, daß alpha-Interferone und IFN- β deutlich unterschiedliche Wechselwirkungen mit beiden Rezeptorketten ausbilden. So wurden durch Alaninaustausche in IFNAR-1 und IFNAR-2c Bereiche identifiziert, welche spezifisch für die Signalübertragung durch IFN- α bzw. IFN- β sind. Nach Mutation dreier Aminosäuren auf der extrazellulären Domäne von IFNAR-2c war eine Aktivierung durch IFN- α nicht mehr möglich, durch IFN- β hingegen schon. Es konnte gezeigt werden, daß zur Signaltransduktion bei IFN- α eine Bindung mit IFNAR-1 und IFNAR-2c notwendig ist, während durch IFN- β -Bindung allein an IFNAR-2c eine Teilaktivität hervorgerufen wird. Russel-Hard *et al.* wiesen 1999 nach, daß nur bei Bindung von IFN- β ein stabiler Komplex aus IFNAR-1, IFNAR-2c und IFN- β koimmunpräzipitiert, hingegen bei Bindung von IFN- α 2 an IFNAR nicht. Bereits 1998 hatten Domanski *et al.* durch Deletion eines Teils der cytoplasmatischen Domäne von IFNAR-2c eine Verminderung der antiviralen Antwort bei IFN- β , nicht aber bei IFN- α 2 beobachtet. Möglicherweise ist der C-terminale Bereich von IFNAR-2c an einer IFN- β -spezifischen Induktion eines DNA-bindenden Komplexes beteiligt, welcher nicht nur die ISRE-Bereiche erkennt. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung unterschiedlicher biologischer Aktivitäten von alpha-Interferonen und IFN- β .

Zusammengefaßt kann man sagen, daß die verschiedenen Typ-I-Interferone zwar mit demselben Rezeptor interagieren, sowohl aber die Art dieser Wechselwirkungen, als auch die Interaktion der Rezeptoreinheiten untereinander eine Signalspezifität von alpha-Interferonen und IFN- β bedingt. Eine früher bei IFN- γ vermutete Internalisierung des Interferon-Rezeptorkomplexes mit anschließender Bindung an nukleäre Proteine (MacDonald *et al.*, 1986), scheint nach neueren Untersuchungen von Johnson *et al.* (1998) auch bei Typ-I-Interferonen eine Rolle zu spielen.

2.2.3.2. Signaltransduktionswege des Interferonsignals

Die Signaltransduktion nach Bindung des Typ-I-IFN an seinen Rezeptor beginnt mit einer Assoziation der Rezeptorketten IFNAR-1 und IFNAR-2c. Nach einer gegenseitigen Phosphorylierung der den zytoplasmatischen Rezeptordomänen angelagerten Protein-tyrosinkinasen Tyk2 und Jak1 erfolgt durch diese eine Phosphorylierung von Tyrosinresten der Rezeptorketten. Diese Phosphotyrosine wiederum fungieren als Erkennungsmotiv für

STAT1- und STAT2-Proteine, welche über ihre SH2-Domäne mit den Rezeptorketten assoziieren und durch Jak1 an einem einzelnen Tyrosinrest phosphoryliert werden (Sanceau et al., 2000). STAT1 und STAT2 dimerisieren nachfolgend und bilden nach Assoziation des zytoplasmatischen Faktors p48 den regulatorisch wirksamen Komplex ISGF-3, der nach Transport in den Zellkern durch Bindung an das Promotorelement ISRE die Transkriptionsaktivität Interferon-stimulierbarer Gene reguliert (Lau et al., 2000; Decker und Meinke, 1997; Darnell *et al.*, 1994). Aktivierte STAT1-Moleküle können auch ein Homodimer bilden, das seinerseits im Nukleus an das Promotorelement GAS bindet und andere Gene als ISRE reguliert (Decker und Meinke, 1997). Neben dem beschriebenen Weg werden durch Typ-I-Interferone gewebspezifisch auch noch STAT3- und STAT5b-Proteine aktiviert (Meinke *et al.*, 1996).

Der Einfluß weiterer Faktoren auf die Signaltransduktionskaskade wird diskutiert. So scheinen eine zusätzliche Phosphorylierung von STAT-Proteinen an einem carboxyterminalen Serinrest durch Zytokin-aktivierbare Serinkinasen sowie eine im Zellkern stattfindende Dephosphorylierung, eine Rolle in der Regulation zu spielen.

Unterschiede gibt es in der Signaltransduktion zwischen den alpha-Interferonen und IFN- β . *Tyk2*-defiziente Zellen sind auf IFN- β und IFN- α_8 sensitiv, während andere alpha-Interferone keine Aktivierung bewirken (Pellegrini, 1989). IFN- β induziert gegenüber den alpha-Interferonen stärker die Bildung von STAT1-Dimeren, die wiederum die GAS-abhängige Transkription beeinflussen (Grumbach et al., Decker und Meinke, 1997). Es wird in diesem Fall vermutet, daß die durch IFN- β am STAT1-Molekül ausgelöste Phosphorylierung effektiver ist, als die durch IFN- α_{2b} . Schon auf Rezeptor-Interferon-Komplex-Ebene wurden SH2-Domänen enthaltende Tyrosinphosphatasen mit unterschiedlicher Spezifität, je nach gebundenem Interferon, entdeckt (David *et al.*, 1995). Neben der Freisetzung verschiedener Zytokine als Antwort auf eine Interferonstimulation und deren Einfluß auf den Jak-STAT-Signaltransduktionsweg sind zusätzliche transkriptionale Kofaktoren, wie p300 und CBP, für die Spezifität der Interferonantwort verantwortlich (Bhattacharya *et al.*, 1995).

2.2.3.3. Interferon-induzierte biologische Effekte

Prinzipiell läßt sich das Aktivitätsspektrum der Interferone in drei Gruppen unterteilen:

- antivirale Aktivitäten

- immunmodulatorische und zelldifferenzierende Wirkungen
- antitumorale Wirkungen

Die Entdeckung der Interferone geschah aufgrund ihrer signifikanten Rolle bei der Virusabwehr, wo sie die erste zelluläre Reaktion auf das Eindringen eines Virus darstellen. Mittlerweile können die Interferone nicht mehr als in ihrer Wirkung einheitliche Gruppe von Zytokinen betrachtet werden. Es gibt sowohl überlappende Mechanismen, die bei allen Interferonen vorhanden sind, sich in ihrem Ausmaß aber zwischen den einzelnen Klassen unterscheiden, als auch spezifische Mechanismen, die nur einer Interferonklasse eigen sind.

2.2.3.3.1. Antivirale Aktivität

Alle Interferone versetzen die Zielzelle in einen antiviralen Zustand. Dieser Zustand ist unabhängig vom angreifenden Virus. Es scheint keinen, für alle Virusspezies gemeinsamen, Mechanismus der Hemmung des viralen Wachstums zu geben. Beim Encephalomyocarditisvirus, Vesiculären Stomatitis Virus (VSV), den Retroviren, Vacciniaviren und dem Simian Virus-40 (SV40) wird die Translation gehemmt. Die Penetration der Zellmembran durch das Virus wird dagegen nur beim VSV, das sog. „uncoating“ dagegen bei Herpes simplex Virus I und die Virionenfreisetzung bei Retroviren inhibiert.

1971 gab es erste Hinweise auf Faktoren, die, durch dsRNA aktiviert, in zellfreien Systemen die Proteinsynthese inhibieren und den Abbau zellulärer RNA beschleunigen (Ehrenfeld und Hunt, 1971). Diese Aktivitäten waren nur detektierbar, wenn die Zellen vor ihrem Aufschluß mit Interferonen behandelt wurden. Interferone induzieren eine 2`5`-Oligoadenylat-Synthetase-Aktivität (OAS) in den Zielzellen. Dieses Enzym synthetisiert aus ATP 2`5`-verknüpfte Oligoadenylate. Aktiviert wird die Synthetase durch dsRNA, welche im Replikationsmechanismus vieler RNA-Viren als Intermediärprodukt auftaucht und selbst ein potenter Induktor der IFN-Produktion ist. Die synthetisierten 2`5`-Oligoadenylate aktivieren eine konstitutiv exprimierte Ribonuklease (RNase L), welche die Degradation zellulärer als auch viraler RNA bewirkt (Zhou *et al.*, 1993). Ebenfalls Zhou *et al.* wiesen 1997 *in vivo* an RNase L-defizienten Mäusen die Bedeutung des OAS-Weges bei der Virusabwehr nach. Neben einer deutlichen Erhöhung von letalen Virusinfekten zeigten die Mäuse weiterhin eine Störung der Apoptose, so daß Interferone auch hier eine Rolle spielen können.

Ein weiteres, Interferon-induziertes, dsRNA-aktiviertes Enzym ist die Proteinkinase R (PKR) (Meurs *et al.*, 1990). Ein Substrat der PKR ist der eukaryontische Initiationsfaktor der

Translation eIF-2. Bei durch die PKR phosphoryliertem eIF-2 ist der Austausch von GDP gegen GTP durch den „guanylnucleotide exchange factor“ nicht mehr möglich, so daß die Initiation der Translation nicht stattfinden kann. Des weiteren bindet die PKR an STAT1 und übt damit einen Einfluß auf die Transkriptionsaktivierung aus (Wong *et al.*, 1997). Gleichzeitig zeigt die PKR auf Transkriptionsebene noch andere Effekte, so durch Inaktivierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B (Visvanathan *et al.*, 1989) und Beeinflussung der IRF-1-Aktivität (Kim *et al.*, 2000; Kirchhoff *et al.*, 1995).

Mittlerweile wird als Marker für die Wirkung einer Interferontherapie das MxA-Protein detektiert (Kracke *et al.*, 2000). Dieses 75 kDa große Protein wird spezifisch durch Typ-I-Interferone induziert, ist das Produkt des Myxovirus-Resistenzgens-A und besitzt eine GTP-Bindungsstelle (Pitossi *et al.*, 1993; Pavlovic und Straehli, 1991). Die Menge an gebildetem MxA-Protein korreliert dabei direkt mit der des auf die Zelle einwirkenden Interferons (von Wussow *et al.*, 2000), wobei seine Halbwertszeit deutlich über der des Interferons liegt. MxA und das mit ihm verwandte MxB-Protein interferieren mit der Virusreplikation, vermutlich durch Blockade der Synthese spezifischer, viraler Proteine (Weber *et al.*, 2000; Kochs und Haller, 1999) und durch Hemmung der RNA-Polymerase (Zürcher *et al.*, 1992).

Neuerdings wird aufgrund seines antiviralen Potentials die Möglichkeit einer IFN- β -vermittelten HIV-Therapie in Betracht gezogen (Cremer *et al.*, 2000).

2.2.3.3.2. Immunmodulatorische und zelldifferenzierende Wirkungen

Die Zelloberflächenantigene des „major histocompatibility complex“ (MHC)-Klasse-I werden durch alle Interferone induziert. Sowohl die schweren Ketten des MHC-I-Komplexes, HLA-A, -B und -C beim Menschen, als auch die leichte Kette β 2-Microglobulin werden präferenziell stärker durch IFN- γ induziert (Revel und Chebath, 1986) als durch die Typ-I-Interferone.

Die Induktion der Gene des humanen MHC-Klasse-II, HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ, findet in der frühen Phase der Immunabwehr durch IFN- γ statt, während IFN- β diese hemmt. Ein weiteres, ausschließlich durch IFN- γ induziertes Zelloberflächenantigen mit immunregulatorischer Wirkung, ist der Fc-Rezeptor von T- und B-Lymphozyten. IFN- γ bewirkt bei B-Zellen einen Isotypenwechsel von IgM und IgD zu IgG2a und IgG3.

Die Aktivierung von Makrophagen ist ebenfalls eine immunregulatorische Eigenschaft von IFN- γ . Sowohl die Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen, deren Sekretion von

IL-1, IL-6, TNF- α und IL-2 als auch die zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen und Mikroorganismen werden von IFN- γ ausgelöst (Reiter, 1993; Sanceau *et al.*, 1989). Sie geht Hand in Hand mit der, durch IFN- γ verursachten, Stimulation der TNF- α - und TNF-Rezeptor-expression und der Sekretion von Lymphotoxin durch aktivierte T-Lymphozyten. IFN- γ ist folglich von proinflammatorischer Wirkung.

Typ-I-Interferone, insbesondere IFN- β , hemmen die IL-2-, TNF- α - und MHC-Klasse-II-Produktion und somit die Antigenpräsentation durch Makrophagen sowie die T-Zell-aktivierung und -proliferation und induzieren gleichzeitig die IL-10- und TGF- β -Ausschüttung (Wang *et al.*, 2000). IL-10- und TGF- β stimulieren CD8⁺-zytotoxische T-Zellen, welche ihrerseits eine Reihe von immunsuppressiven Reaktionen auslösen. Typ-I-Interferone regulieren weiterhin die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf Epithel- und T-Zellen herunter, wirken also antagonistisch zu IFN- γ (Revel *et al.*, 1995) und somit entzündungshemmend. Für IFN- β konnte ein deutlicher Effekt auf die T-Helfer-Zelldifferenzierung und deren Erkennungsrezeptorexpression gezeigt werden (McRae *et al.*, 1997).

2.2.3.3.3. Antiproliferative und antitumorale Wirkungen

Die antiproliferative Wirkung aller drei Interferonklassen wurde schon kurz nach der Entdeckung der antiviralen Aktivität experimentell an Fibroblastenkulturen gezeigt. Heute ist weiterhin erwiesen, daß Interferone zu den wichtigsten antiproliferativ wirkenden, endogenen Substanzen gehören, wobei ein Synergismus zwischen den Typ-I- und Typ-II-Interferonen zu beobachten ist (Ozenci *et al.*, 2000; Fleischmann *et al.*, 1984).

Der antitumorale Einfluß der Interferone kann direkt über antiproliferative, zytostatische, differenzierende oder antigeninduzierende Effekte erfolgen. Indirekt können sie das Tumorwachstum über zytotoxische, zytokinvermittelte oder antikörpervermittelte Mechanismen beeinflussen (Sanceau *et al.*, 2000; Fleischmann und Fleischmann, 1992). Durch Induktion von CDK-Inhibitoren, wie p21 und p27, führen Interferone zu einer Arretierung des Zellzyklus am Übergang der G1- zur S-Phase (Chin *et al.*, 1996; Mandal *et al.*, 1998). Für IFN- α konnte eine Aktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie p53 und dem Rb-Gen, nachgewiesen werden (Kumar und Atlas, 1992). Gleichzeitig führt IFN- α zu einer verminderten Expression der Protoonkogene *c-myc* und *c-fos* (Einat *et al.*, 1985). Einfluß auf die Zellzykluskontrolle nehmen Interferone ebenfalls über das 2'5'-OAS-System (Ravandi *et al.*, 1999; Salzberg *et al.*, 1997).

Durch Veränderung des Expressionsmusters von Oberflächenproteinen, wie MHC-Klasse-I und II sowie Zytokinrezeptoren, können Tumorzellen durch Interferone zum Ziel der zellulären Immunabwehr werden. Interessanterweise reagieren maligne Zellen wesentlich sensitiver auf die, von Interferonen vermittelten, antiproliferativen Effekte als nicht entartete Zellen (Obert, 2000, S. 173).

2.3. Struktur der Typ-I-Interferone

Die Strukturen der Typ-I-Interferone zeigen deutliche Ähnlichkeiten. Bei allen handelt es sich um α -helikale, globuläre Proteine. Vier dicht gepackte α -Helices (A, B, C und E) bilden dabei ein sog. „Bündel“, während Helix D an dieses Bündel über hydrophobe Wechselwirkungen der Helix E angelagert ist. Diese Struktur wird als „linkshändiges, Typ Zwei-Vier-Helix-Bündel“ bezeichnet (Presnell und Cohen, 1989) und findet sich auch bei anderen Zytokinen, z. B. IL-10. Die Helices A und B sind parallel angeordnet und durch einen 25 Aminosäuren langen „loop“ verknüpft, welcher das gesamte Molekül überspannt. Die anderen Helices sind miteinander über kurze „loops“ verbunden. Die Anordnung der α -Helices wird durch eine Anzahl hochkonservierter Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophober Wechselwirkungen stabilisiert (Senda *et al.*, 1992; Karpusas *et al.*, 1997).

Von entscheidender Bedeutung für die biologische Aktivität und Stabilität des IFN- β und der alpha-Interferone ist die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 29 und 139 (IFN- α) bzw. 31 und 141 (IFN- β). Nach gezieltem Austausch einer oder beider Cysteine gegen eine andere Aminosäure wurden Abnahmen der biologischen Aktivität auf Werte von 0,2 % bis 4 % der Aktivität des Ursprungproteins gemessen (Waine *et al.*, 1992; Edge *et al.*, 1986).

Die meisten Typ-I-Interferone galten bisher als nicht glykosyliert. Ausnahmen bildeten IFN- α_{2a} , IFN- α_{2b} , IFN- ω und IFN- β . Mittlerweile aber werden immer mehr alpha-Interferone gefunden, die, abhängig vom Gewebstyp, nativ glykosyliert vorliegen (Obert, 2000, S. 28-29). Natürliches IFN- β trägt am Asparagin 80 eine N-Glykosylierung. Die Größe des Zuckerrestes schwankt zwischen drei und fünf kDa. Auf die Bedeutung dieser Glykosylierung werde ich in Kapitel 2.3.1 noch genauer eingehen.

Die ersten Röntgenstrukturen von Typ-I-Interferonen wurden 1992 und 1995 von Senda *et al.* veröffentlicht (murines IFN- β). 1996 folgte die des humanen IFN- α_{2b} (Radhakrishnan, 1996) und 1997 die des humanen IFN- β (Karpusas *et al.*, 1997) sowie des IFN- α_{2a} (Klaus *et al.*, 1997).

In den Kristallstrukturen von IFN- α_{2b} und IFN- β liegen die Moleküle als Dimere mit einem Zn^{2+} -Ion als Koordinationszentrum vor. Interessanterweise dimerisieren die beiden IFN- β -Moleküle, im Gegensatz zu IFN- α_{2b} , mit unterschiedlichen Berührungsflächen (Karpusas *et al.*, 1997). Eine biologische Bedeutung der Dimerisierung für die Aktivität des IFN- β und der Diskriminierung innerhalb der Typ-I-Interferone ist nicht auszuschließen.

2.3.1. Bedeutung der Glykosylierung von IFN- β

Natürliches IFN- β aus menschlichen Fibroblastenzellen als auch rekombinant aus CHO-Zellen gewonnenes, ist, im Gegensatz zu rekombinant in *E. coli* hergestelltem IFN- β , am Asparagin 80 glykosyliert. Es handelt sich dabei um sog. bi- und triantennäre Oligosaccharide unterschiedlicher Zusammensetzung (Obert, 2000, S. 26; Conradt *et al.*, 1987). Während für die Rezeptorbindung die Glykosylierung entbehrlich zu sein scheint (Runkel *et al.*, 1998a; Adolf, 1987), ist ihre Bedeutung für Stabilität, Löslichkeit sowie Pharmakokinetik und -dynamik weitreichend (Obert, 2000, S. 24 ff.; Runkel *et al.*, 1998a; Karpusas *et al.*, 1997).

Alle Versuche, eine Röntgenstruktur des nicht glykosylierten IFN- β -1b aus *E. coli* zu erhalten, sind bisher an der hohen Hydrophobizität des Proteins gescheitert (Mitsui *et al.*, 1993). Auch das glykosylierte beta-Interferon konnte aufgrund seiner stark hydrophoben Oberfläche und der daraus resultierenden Tendenz zur Aggregatbildung (Utsumi *et al.*, 1989) erst 1997 kristallisiert werden (Karpusas *et al.*, 1997). Der stark polare und hydrophile Zuckerrest verleiht dem Molekül eine bessere Wasserlöslichkeit. Die Röntgenstruktur belegt, daß die Glykosylierung einen ungeladenen, hydrophoben Bereich der IFN- β -Oberfläche gewissermaßen nach außen abschirmt und somit einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des Moleküls leistet. Eine Bedeutung der Glykanstruktur bei der Faltung des Proteins *in vivo* wird diskutiert (Karpusas *et al.*, 1998).

Eine Deglykosylierung des IFN- β führt zu einer signifikanten Verstärkung der Aggregations-tendenz und zur Herabsetzung des Schmelzpunktes, wie sie beim IFN- β aus *E. coli* gefunden wird (Runkel *et al.*, 1998a). Die spezifische Aktivität des IFN- β wird durch die entstehenden Aggregate um den Faktor 10 verringert. Weiterhin hat die Glykosylierung Einfluß auf die Antigenität von IFN- β -Präparaten in der Therapie (s. Kapitel 2.4.2). Auch muß bei der Aufreinigung des IFN- β aus *E. coli* zu noch drastischeren Maßnahmen gegriffen werden, als bei IFN- β aus CHO-Zellen, um eine Solubilisierung und damit die Bioaktivität des Proteins zu gewährleisten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß in der Therapie mit IFN- β -Präparaten die bislang unterschätzte Bedeutung der Glykosylierung des IFN- β eine immer größere Rolle spielt.

2.4. Stand der Forschung in Bezug auf die Entwicklung, Produktion und klinische Anwendung eines IFN- β mit verbesserten Eigenschaften

2.4.1. Struktur-Funktionsbeziehungen des IFN- β

Senda *et al.* (1995) unterscheiden prinzipiell zwei für die Rezeptorbindung wichtige Regionen in der Struktur des IFN- β :

- „hot area 1“, welche die Helix D, den DE „loop“ sowie den AB „loop“ einschließt,
- „hot area 2“, bestehend aus Helix C und Teilen der Helix A.

Die „hot area 1“ tritt mit der Rezeptoruntereinheit IFNAR-2c in starke Wechselwirkung und scheint das, für Typ-I-Interferone charakteristische, an den Rezeptor bindende Merkmal zu sein. Die „hot area 2“ hingegen zeigt deutlich schwächere Wechselwirkungen mit der IFNAR-1-Untereinheit des Rezeptors und dürfte für die von Interferontyp zu Interferontyp variierenden Zellantworten verantwortlich sein.

In einer Mutationsanalyse haben 1998 Runkel *et al.* Aminosäurereste identifiziert, die IFN- β -spezifische Wechselwirkungen mit dem IFNAR vermitteln. Die Einführung negativ geladener Reste an den Positionen 86 und 92 verschob die Spezifität der Rezeptorinteraktion von IFN- β zu IFN- α . Gleichzeitig führten die Mutationen Asn86Glu und Tyr92Asp weder einzeln noch gemeinsam zu einem Verlust an spezifischer Aktivität. Mutationen im Bereich der vermuteten Rezeptorbindestelle (Arg27Ala, Arg35Thr, Lys123Ala) reduzierten jedoch die Aktivität um den Faktor drei bis zehn. Die systematische Substitution von Aminosäuren durch Alanin bewies die Bedeutung der Reste Arg33 bis Glu41 sowie Lys134 bis Ser137 für die biologische Aktivitätsvermittlung des humanen IFN- β (Karpusas *et al.*, 1997; Senda *et al.*, 1995a).

Besonders wichtig für die Stabilisierung des Vier-Helix-Bündels sind u. a. hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren Leu63, Phe70, Trp79, Leu88, Trp143, Leu151 und Phe154. Im allgemeinen ragen hydrophobe Aminosäureseitenketten ins Proteininnere, wo sie gegen Wasser abgeschirmt sind und ein Netzwerk von Wechselwirkungen bilden, welche die Molekülstruktur stützen. Oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren sind häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Sie werden nur schlecht von Wassermolekülen hydratisiert und können, sofern sie als „cluster“ auftreten, zu einer Aggregation von Proteinmolekülen und damit zu einer Beeinträchtigung der biologischen Funktion führen.

2.4.2. Gentechnologische Produktion des IFN- β und klinischer Einsatz

Bereits 1981 wurde von Jacobs *et al.* das pharmazeutische Potential des IFN- β erkannt, jedoch erst die rekombinante Herstellung konnte ausreichende Mengen für den klinischen Einsatz liefern. Hauptanwendungsgebiet für IFN- β ist die Behandlung der Multiplen Sklerose. Des weiteren findet es Einsatz bei:

- a) akuten viralen Infektionen: Virusenzephalitis, Herpes zoster, Tollwut, Masernpneumonie;
- b) chronischen Virusinfektionen: Hepatitis B und C, Papillomavirustumore, Herpes zoster;
- c) malignen Erkrankungen: nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Hauttumoren und -metastasen (Kaposi-Sarkom), Haarzell-Leukämie, chronische myeloische Leukämie.

Folgende IFN- β -Präparate sind derzeit erhältlich:

1. natürliches IFN- β aus humanen Fibroblastenzellen (nhu-IFN- β);
2. rekombinantes humanes IFN- β aus CHO-Zellen (rhu-IFN- β -1a);
3. rekombinantes humanes IFN- β aus *E. coli* (rhu-IFN- β -1b).

Diese drei IFN- β -Präparate besitzen unterschiedliche Produktcharakteristika, nachfolgend zusammengefaßt in Tab. 1. Die Applikation erfolgt jeweils als wäßrige Lösung mittels subkutaner (s.c.), intramuskulärer (i.m.) oder intravenöser (i.v.) Injektion.

	nhu-IFN-β	rhu-IFN-β-1a	rhu-IFN-β-1b
Primärstruktur	166 As	166 As (identisch zu nhu-IFN- β)	165 As (Met1 fehlt, Cys17 gegen Ser ausgetauscht)
Sekundärstruktur	natürlich	natürlich	modifiziert
Glykosylierung	vorhanden	vorhanden	keine
spez. Aktivität [IU]/mg	$3 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$
Reinheit	> 95 %	> 98 %	> 98 %
Antikörperinduktion	< 20 %	< 20 %	> 80 %
Handelsname	FRONE	REBIF®/AVONEX™	BETA FERON®
Hersteller	Serono Pharma	Serono Pharma, Biogen	Schering

Tab. 1: Produktcharakteristika der verschiedenen IFN- β -Präparate

Das IFN- β hat mit einem Anteil von 40 % aromatischen und unpolaren Aminosäuren einen hochgradig hydrophoben Molekülcharakter. Folglich besitzt IFN- β eine nur geringe Löslichkeit und eine ausgeprägte Tendenz zur Aggregatbildung. Diese stellen ein großes Problem bei Herstellung und klinischen Einsatz des IFN- β dar, denn sie führen zu einer Verminderung der spezifischen Aktivität und sind stark immunogen. Die nach subkutaner bzw. intramuskulärer Injektion gemessenen Serumkonzentrationen an IFN- β sind aufgrund der hohen Gewebsaffinität des Moleküls ausgesprochen gering.

Die größte Aggregationsneigung besitzt das IFN- β aus *E. coli*-Zellen. Diese ist bei den glykosylierten Formen aus humanen Fibroblastenzellen oder CHO-Zellen schwächer ausgeprägt. In der Klinik zeigt IFN- β -1b daher die höchste Immunogenität und die deutlichsten Nebenwirkungen wie subkutane Nekrosen an der Injektionsstelle (Kivisakk et al., 2000; Schmid, 1999).

Es wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um die negativen Auswirkungen der Hydrophobizität des Proteins zu überwinden. So müssen zur Solubilisierung des in „inclusion bodies“ exprimierten IFN- β -1b aus *E. coli*-Zellen Detergenzien wie SDS, Laureth 12 oder Sulfobetain SB 14 verwendet werden. Da die anschließende Rückfaltung des Proteins in den nativen Zustand nicht bei allen Molekülen gelingt, muß eine Verminderung der spezifischen Aktivität in Kauf genommen werden. Als weiteres Problem des IFN- β aus *E. coli* erwies sich der freie Cysteinrest in Position 17. Er wurde gegen Serin ausgetauscht, um inter- und intramolekulare Fehlpaarungen zu verhindern (Mark et al., 1984).

Beim IFN- β aus humanen Fibroblasten- oder CHO-Zellen müssen einige Aufreinigungsschritte bei pH 3 durchgeführt werden (Dr. Rosa, Fa. Biogen, persönliche Mitteilung). Zwar ist bekannt, daß IFN- β selbst bei pH 2 noch stabil ist, jedoch sind Veränderungen der Glykanstruktur durch saure Hydrolyse nicht auszuschließen.

Allen IFN- β -Präparationen muß bereits während der Aufreinigung die 50- bis 500fache Menge an humanem Serumalbumin (HSA) zur Stabilisierung zugesetzt werden, wodurch sich bei IFN- β -Konzentrationen bis 0,25 mg/ml dessen Aggregation verhindern läßt. Höher konzentrierte IFN- β -Lösungen sind auch in Anwesenheit von HSA nur wenige Stunden stabil. Erst Zusätze von 30-50 % (v/v) Ethylenglykol oder 14 % (w/v) PEG 4000 und ein saurer pH (< 5) wirken hier der Aggregation von IFN- β -Molekülen entgegen.

2.4.3. Ansätze zur Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen und Vorarbeiten in Bezug auf ein IFN- β mit verbesserten Eigenschaften

Die wenigen Ansätze zur Erhöhung der Löslichkeit von rekombinant produzierten Proteinen zielten bisher alle auf das Expressionssystem *E. coli* ab. Bei der Überexpression heterologer Gene in Bakterienzellen aggregiert das Protein häufig und wird in Form unlöslicher Einschlußkörperchen („inclusion bodies“) abgelagert. Bei strukturell anspruchsvollen Proteinen ist die Bildung von „inclusion bodies“ von Nachteil, da zunächst eine Solubilisierung des Proteins mittels denaturierender Reagenzien und dann eine Rückfaltung in die native Molekülform erfolgen muß. Beide Schritte beeinträchtigen die Ausbeute und Qualität und sind zeit- sowie kostenintensiv.

Durch Austausch vierer unpolarer Oberflächenamino­säuren gegen Aspartat- und Glutamatreste gelang es 1994 Dale *et al.*, die in *E. coli* löslich exprimierte Menge an Dihydrofolat-Reduktase um den Faktor 250 zu steigern. Mit diesem als „hydrophobicity engineering“ bezeichneten Vorgehen erreichten 1995 Murby *et al.* in *E. coli* eine Zunahme der löslich produzierten Proteinmenge eines 39 kDa großen, viralen Proteins von 27 auf 75 %. Gleichzeitig erhöhte sich dessen *in vitro*-Löslichkeit um den Faktor fünf.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgte unsere Arbeitsgruppe in Bezug auf das humane beta-Interferon. Im Rahmen der Dissertation von C. Schneider-Fresenius (1999) wurde basierend auf der bekannten 3D-Struktur des murinen IFN- β (Senda *et al.*, 1995) mittels eines

homologievergleichenden Verfahrens die damals noch nicht bekannte 3D-Struktur des humanen IFN- β berechnet. Nach Ermittlung der Aminosäurereste, welche sich in früheren Mutationsstudien als funktional wichtig erwiesen hatten, erfolgte die Bestimmung hydrophober, oberflächenexponierter Aminosäurereste, die sich für einen Austausch gegen hydrophilere Aminosäurereste eigneten. Es wurden fünf Leucin- und fünf Phenylalaninreste identifiziert, welche wir (Promotionsarbeit Dr. Schneider-Fresenius, 1999; Diplomarbeit J. Garbe, 1998 und Diplomarbeit T. Meyer, 1997) nachfolgend durch gerichtete PCR-Mutagenese gegen Serinreste austauschten. Zusätzlich wurde bei allen Varianten das Cystein 17 gegen Serin ausgetauscht, um Fehlpaarungen mit internen (Cys31 oder Cys141) oder freien Cysteinresten anderer IFN- β -Moleküle zu verhindern.

Von den Austauschen erwiesen sich zwei als aktivitätsmindernd, so daß sie bei der Herstellung der Variante des IFN- β mit der Bezeichnung IFN- β (9x) nicht berücksichtigt wurden. Folgende Aminosäuren sind bei IFN- β (9x) gegen Serin ausgetauscht worden: Leu5, Phe8, Cys17, Leu47, Phe50, Leu106, Phe111, Leu116 und Leu120.

Nachdem 1997 von Karpusas *et al.* die dreidimensionale Struktur des IFN- β vorlag, konnte ein Vergleich der von uns berechneten Struktur mit der durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten vorgenommen werden. Die beiden 3D-Strukturen stimmten nahezu überein. Auch lagen mit Ausnahme von Phe50 alle ausgetauschten hydrophoben Aminosäuren oberflächenexponiert vor. Die nachfolgende Abb. 1 zeigt eine Übersicht der Moleküloberflächen von IFN- β und IFN- β (9x).

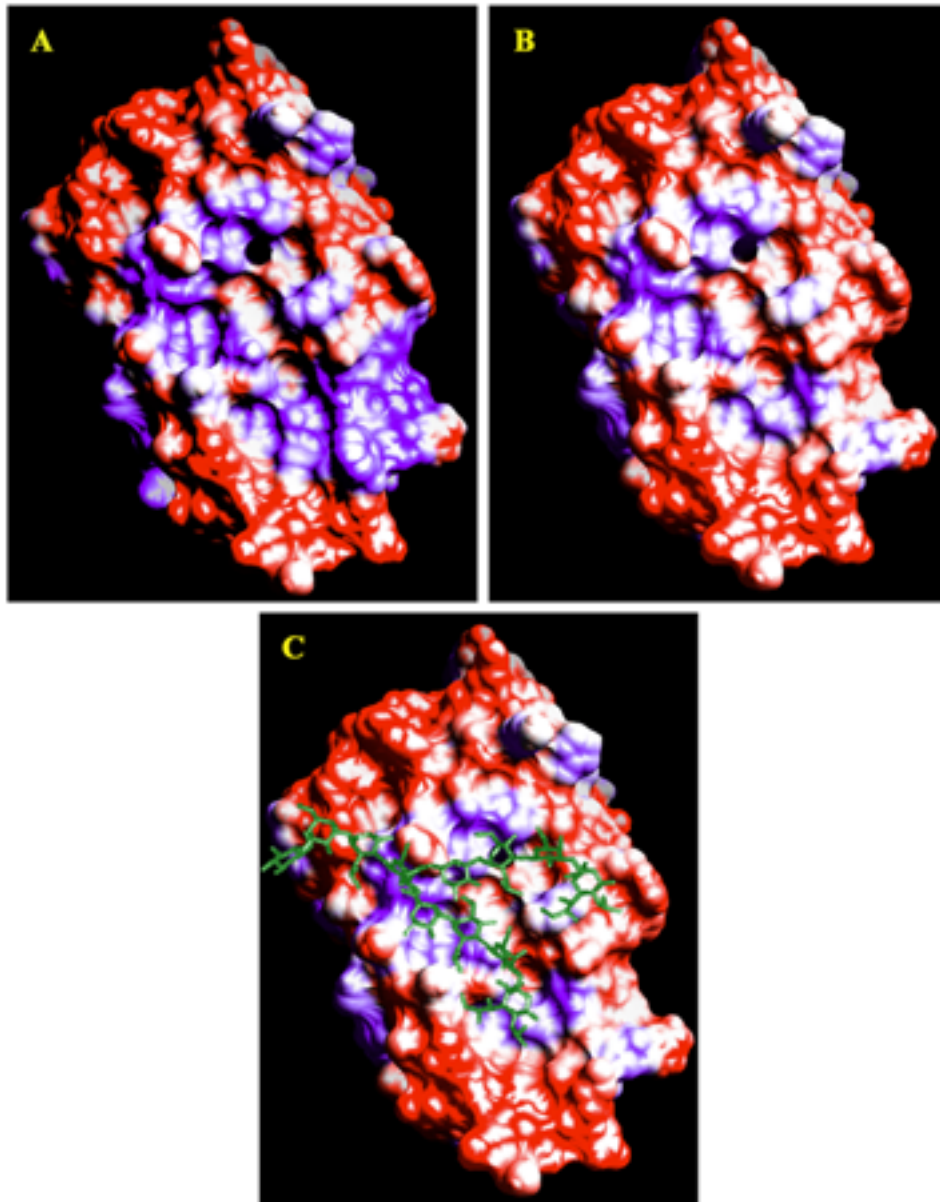


Abb. 1: Moleküloberflächen von A) unglykosyliertem IFN- β , B) unglykosyliertem IFN- β (9x) und C) glykosyliertem IFN- β (9x). Hydrophobe Bereiche sind blau, hydrophile rot eingefärbt, die Glykanstruktur ist grün.

Die Expression der Variante IFN- β (9x) erfolgte in *E. coli*-Zellen. Die spezifische Aktivität des Proteins entsprach der des IFN- β -1b. Es konnte im Vergleich allerdings keine Verbesserung der löslichen Expressionsraten oder eine vereinfachte Aufreinigung festgestellt werden. Die verminderte Oberflächenhydrophobizität des IFN- β (9x) zeigte sich jedoch in der verminderten Affinität zu einer „reversed phase“-Matrix, als auch in einer günstigeren Pharmakokinetik.

2.5. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Basierend auf den Vorarbeiten im Rahmen der Dissertation von C. Schneider-Fresenius (1999) und den Diplomarbeiten von J. Garbe (1998) und T. Meyer (1997), sollte nach gezieltem Proteindesign eine Variante des humanen Interferon-beta mit verbesserten biochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften in CHO-Zellen exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert werden.

Humanes IFN- β zeichnet sich durch einen hohen Anteil hydrophober, oberflächenexponierter Aminosäuren aus. Daraus resultieren eine stark ausgeprägte Aggregationsneigung, geringe Bioverfügbarkeit, hohe Immunogenität sowie Probleme bei der Herstellung und dem klinischen Einsatz von IFN- β -Präparaten. Die Aggregationstendenz ist bei der glykosylierten Form aus CHO-Zellen nicht so stark ausgeprägt wie bei der unglykosylierten aus *E.coli*.

So zeichnete sich zu Beginn dieser Arbeit immer mehr die Bedeutung der Glykosylierung des IFN- β für Stabilität, Löslichkeit sowie Pharmakokinetik und -dynamik ab. Da ein großes medizinisches und wirtschaftliches Interesse an IFN- β -Präparaten mit verbessertem Löslichkeitsverhalten besteht, wurde eine Produktion der glykosylierten IFN- β -Variante in CHO-Zellen angestrebt.

Zusammen mit der Glykosylierung sollte der Austausch acht oberflächenexponierter, hydrophober Aminosäuren zu einem neuartigen, verbesserten IFN- β führen. Dieses könnte in der IFN- β -Therapie zu wirksameren und verträglicheren Präparaten führen und eventuell neue medizinische Indikationen ermöglichen.

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Konstruktion des Expressionssystems in CHO-Zellen, die Aufreinigung und die biologische sowie biochemische Charakterisierung einer Variante des humanen IFN- β mit verbesserter Löslichkeit.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Rechner und Software

Die Planung und Dokumentation der Klonierungsexperimente wurde mit dem Programm MacVector 6.01 (Fa. Oxford Molecular, Erlangen) durchgeführt.

Sowohl der Entwurf der Molekülbilder als auch die Berechnung der hydrophoben Moleküloberflächenbereiche erfolgte an einer Indigo 2-Workstation (Fa. Silicon Graphics, München) mit R 4400-Prozessor unter dem Betriebssystem IRIX 6.2. Als Software wurden die Programme Sybyl 6.3 (Fa. Tripos, München), BRAGI 5.0 (Schomburg und Reichelt, GBF, Braunschweig) und „Analytical Surface Calculation“ (Eisenhaber und Argos, 1993) benutzt.

Die Dokumentation von SDS-PAGE-Gelen, „westernblots“, „overlay“- und antiviralen „assay“ wurde mit einem Flachbettscanner des Typs Power Look der Fa. UMAX (Software: UMAX MagicScan Version 3.0) vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels des Programmes Adobe Photoshop Version 5.0.2 an einem Macintosh Power PC der Fa. Apple (Cupertino, CA, USA).

Standardsoftware bei der Erstellung von Graphiken und Tabellen sowie der Textverarbeitung waren MS-Excel97, MS-Word97 (Fa. Microsoft, Redmond, WA, USA) und Canvas 6.0 (Fa. Deneba, Miami, FL, USA).

3.1.2. Chemikalien

Die eingesetzten Mutageneseprimer lieferte die Fa. Tib Molbiol (Berlin). Alle anderen Chemikalien stammten, falls nicht anders erwähnt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), AppliedBiosystems (Weiterstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Stratagen (La Jolla, CA, USA).

Spezialchemikalien wurden bezogen von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) und Roche Diagnostics (Mannheim).

Die zur Stabilisierung der IFN- β - und IFN- β (9x)-enthaltenden Fraktionen eingesetzte humane Albumin-Lösung (c = 200 mg/ml; Natrium-n-octanoat (16 mM); Natrium-N, α -Acetyl-DL-tryptophanat (16 mM)) kam vom Blutspendedienst des DRK.

3.1.3. Enzyme, Antikörper und Interferonaktivitätsstandards

Die in den Experimenten verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Roche Diagnostics (Mannheim) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen.

Verwendete monoklonale Antikörper:

- Mouse-Anti-Human-IFN- β , MMHB-1, Fa. PBL Biomedical Lab. (New Brunswick, NJ, USA); eingesetzte Verdünnung: 1 : 50000
- Mouse-Anti-Human-IFN- β , Fa. Cytimmune (College Park, ML, USA) (freundlicherweise von der Fa. Rentschler Biotechnology, Laupheim überlassen); eingesetzte Verdünnung: 1 : 10000

Verwendete polyklonale Antikörper:

- Sheep-Anti-Human-IFN- β , Fa. BioSource (Camarillo, CA, USA); eingesetzte Verdünnung: 1 : 10000
- Sheep-Anti-Human-IFN- β , Fa. RDI (Flanders, NJ, USA); eingesetzte Verdünnung: 1: 10000
- Rabbit-Anti-Human-IFN- β , Fa. RDI (Flanders, NJ, USA); eingesetzte Verdünnung: 1: 20000

Verwendete sekundäre Antikörper:

- Goat-Anti-Mouse-IgG (H+L), AP gekoppelt, Fa. Promega (Madison, WI, USA); eingesetzte Verdünnung: 1: 10000
- Goat-Anti-Rabbit-IgG (Fc), AP gekoppelt, Fa. Promega (Madison, WI, USA); eingesetzte Verdünnung: 1: 10000
- Donkey-Anti-Sheep-IgG (H+L), AP gekoppelt, Fa. Dianova (Hamburg); eingesetzte Verdünnung: 1: 20000

Der ELISA-Kit für humanes IFN- β stammte von der Firma Toray Industries, vertrieben durch die Fa. Biosource International (Nivelle, Belgien).

Als Interferonaktivitätsstandards dienen:

- internationaler Standard für humanes Fibroblasten-Interferon (Gb-23-902-531) der WHO
- Avonex™, Fa. Biogen (Ismaning), lyophilisiert
- Rebif™, Fa. Serono (Unterschleißheim), Lösung mit $c = 2,4 \cdot 10^7$ IU/ml bzw. $c = 88 \mu\text{g/ml}$

3.1.4. Geräte

Agarosegeldokumentation	BioDoc II, Software BioDoc (Fa. Biometra, Göttingen)
Semi-dry-Elektro-Blotapparatur	Fastblot B44 (Fa. Biometra; Göttingen)
Brutschrank	B5060 EKCO ₂ (Fa. Heraeus, Hamburg)
Chromatographie-Anlage	BioCAD Perfusion Chromatography Workingstation 60 (Fa. Perseptive Biosystems, Wiesbaden)
HPLC-Anlage	Chem Station 1100 mit VWD und beheiztem Säulenofen (Fa. Hewlett-Packard, Greeley, CO, USA)
Massenspektrometer	Quadrupol-TOF QStar (Fa. PE Sciex, Überlingen)
Mikroskope	Axiophot2 (Fa. Zeiss, Oberkochen); CK2 (Fa. Olympus, Hamburg)
Photometer	Spektralphotometer Ultrospec [®] 3000 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Rotoren	JA 14, JA-25.50, JS-13.1 (Fa. Beckmann, München)
Schüttelinkubator	Model G 25 (Fa. New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Sequenziergeräte	ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt)
Thermocycler	MJ Research Thermocycler PTC-200 (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)
Werkbank	BSB 6 TUV 2 (Fa. ICN Biomedicals, Meckenheim)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417 R (Fa. Eppendorf, Hamburg) Biofuge 15 (Fa. Heraeus, Hamburg) Avanti J-25 (Fa. Beckmann, München) Sepatech Varifuge F (Fa. Heraeus, Hamburg) Universal (Fa. Hettich, Tuttlingen)

3.1.5. Chromatographiematerialien

Affinitätschromatographie

- Blue-Sepharose FF-Säule, Fa. Amersham Pharmacia Biotech Biotech (Freiburg); 26/93 mm, Säulenvolumen (V_0) = 49 ml
- Chelating Sepharose FF, Fa. Amersham Pharmacia Biotech; 26/123 mm; V_0 = 65 ml; gekoppelt mit Zn^{2+} -Ionen

Gelfiltrationschromatographie

- BioSil SEC125 5-Säule, Fa. BioRad; 7,8/600 mm; V_0 = 26,5 ml
- PD-10, Fa. Amersham Pharmacia Biotech; als Pufferaustauschsäule
- Superdex 75- (Fa. Amersham Pharmacia Biotech; 10/360 mm; V_0 = 28,4 ml)

„reversed phase“ HPLC

- Source 5RPC, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, 4,6/150 mm, V_0 = 2,5 ml

3.1.6. Zellkultur

Zelllinien

- A549; humane Lungenkarzinomzelllinie; Fa. DSMZ, Nr. DSM ACC 107
- CHO-dhfr; Ovarialzelllinie aus chinesischem Hamster; Fa. DSMZ, Nr. DSM ACC 126
- L929; murine Fibroblastenzelllinie; Fa. DSMZ, Nr. DSM ACC 2

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert.

Wachstumsmedien und Zusätze

- CHO-S-SFM II; Fa. Life Technologies (Karlsruhe)
- FBS; Fa. Life Technologies
- Geneticin (G418); Fa. Life Technologies; c = 50 mg/ml
- HBSS; Fa. Life Technologies
- Methotrexat; Fa. Sigma-Aldrich; c = 56 mg/ml in 0,1 M NaOH-Lösung
- Mem- α mit Ribonukleosiden/Desoxyribonukleosiden (Mem- α^+); Fa. Life Technologies
- Mem- α ohne Ribonukleoside/Desoxyribonukleoside (Mem- α^-); Fa. Life Technologies

- Mem Vitaminlösung, 100x; Fa. Life Technologies
- RPMI 1640; Fa. Life Technologies
- Trypsin-EDTA; Fa. Life Technologies
- Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen; Fa. Life Technologies; c = 1 mg/ml in HBSS
- Trypanblaulösung; Fa. Life Technologies; c = 4 mg/ml

Kulturgefäße

- Kulturflaschen: 25 cm², 80 cm², 175 cm², alle mit Filterkappe; Fa. Greiner (Buxtehude)
- Kulturschalen: 145 cm² mit Nocken; Fa. Greiner
- Multischalen: 6-Loch, 24-Loch, 48-Loch; Fa. Nunc; 96-Loch; Fa. Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
- Flachbettstapel mit 10 Ebenen; Fa. Nunc (Wiesbaden)

3.1.7. Nährmedien für *E. coli*-Zellen

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in 2x YT-Medium der Fa. DIFCO (Augsburg). Für die selektive Aufzucht wurden 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Bei der Herstellung von Agarplatten wurden in 2x YT-Medium 16 g/l Agar zugesetzt.

3.1.8. Mikroorganismen

Die Enterobakterienstämme *E. coli* JM 105 und JM 109, beides Derivate des Stammes K 12, wurden für die Klonierungsexperimente und die Plasmidamplifikation verwendet.

JM 105 F' *traD36 lacI^q Δ(lacZ) M15 proA⁺B⁺/thi rpsL (Str^r) endA sbcB15 hsdR4 (r_K⁻ m_K⁺) Δ(lac-proAB)*

JM 109 F' *traD36 lacI^q Δ(lacZ) M15 proA⁺B⁺/e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (NaI^r) endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 recA1*

3.1.9. Selektions- und Expressionsplasmide

pAG60-neo	konstitutive Expression des Neomycin-Resistenzproteins unter Kontrolle eines HSV-Thymidinkinase-Promotors; siehe Colbere <i>et al.</i> (1981); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. H. Hauser, GBF, Braunschweig;
pSV2-dhfr	konstitutive Expression der Dihydrofolatreduktase unter Kontrolle eines SV40-Promotors; bezogen von ATCC (Rockville, ML, USA);
pCI-1	Ausgangsvektor für alle Expressionsplasmide von IFN- β und IFN- β (9x). Enthält einen Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV-Promotor), ein IRES (internal ribosom entry site)-Element aus Poliovirus und ein SV40-Polyadenylierungssignal; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Hauser, GBF, Braunschweig;
pCI-ifn β	konstitutive Expression des IFN- β ;
pCI-ifn β (9x)	konstitutive Expression des IFN- β (9x);
pCI-ifn β ,gfp	bicistronale, konstitutive Expression des IFN- β und des GFP aus <i>aequorea victoria</i> , verbunden durch das IRES-Element;
pCI-ifn β (9x),gfp	bicistronale, konstitutive Expression des IFN- β (9x) und des GFP, verbunden durch das IRES-Element.

Der ausgewählte CMV-Promotor eignet sich besonders gut zur konstitutiven Hochexpression eukaryontischer Gene in CHO-Zellen (Rotondaro *et al.*, 1997) und zeigt höhere Expressionsraten als der bisher in CHO-Zellen zur industriellen Produktion von IFN- β eingesetzte SV40-Promotor.

Zur Selektion in *E. coli* enthalten alle Plasmide ein β -Lactamasegen (Vermittlung einer Ampicillinresistenz).

3.2. Methoden

3.2.1. Anzucht der Bakterienstämme

Die Kultivierung der Bakterienstämme erfolgte in einem thermostatisierbaren Schüttelinkubator bei 37°C und 320 rpm. Verwendet wurden 10 ml Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben in den benötigten Größen.

Zur Lagerung der Bakterienstämme wurden 800 µl einer Übernachtskultur auf 800 µl Glycerin gegeben und bei -80°C tiefgefroren.

3.2.2. Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.2.1. Gerichtete PCR-Mutagenese von Plasmidabschnitten

Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode diente der Einführung von Schnittstellen für Restriktionsenzyme und der Amplifikation von Plasmidabschnitten zur weiteren Klonierung. Zur Minimierung des Einbaus von Fehlbasen wurde die Amplifikation mit Hilfe der *Pwo*-DNA-Polymerase unter Verwendung der folgenden Protokolle durchgeführt:

1. Das PCR-Produkt besitzt eine ähnliche Größe wie das Ausgangsplasmid:

PCR- Ansatz:

Plasmid-DNA	≈ 10 µg
Primer	je 1 µM
Nukleotidmix	200 µM je dNTP
MgSO ₄	2-8 mM (je nach Ansatz)
<i>Pwo</i> -Pol	3,5 U
10x <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase-Puffer	1x
H ₂ O	ad 100 µl

PCR-Programm:

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| 1) 240 s | 95°C |
| Zugabe der <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase | |
| 2) 45 s | 95°C |
| 3) 60 s | 40-65°C (je nach Primerpaar) |
| 4) 600 s | 68°C |
| 5) 11x GOTO 2) | |
| 6) 600 s | 68°C |
| 7) unbegrenzt | 4°C |

Nach Beendigung der Reaktion enthielt die Lösung neben dem linearen Amplifikat noch Ausgangsplasmid-DNA von ähnlicher Größe. Da diese methyliert vorlag, konnte sie durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* beseitigt werden. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 40 U *DpnI* versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine gelelektrophoretische Reinigung über ein 1,2 %iges Agarosegel.

2. Das PCR-Produkt besitzt eine vom Ausgangsplasmid deutlich abweichende Größe:

PCR- Ansatz:

Plasmid-DNA	20 ng
Primer	je 10 pM
Nukleotidmix	200 µM je dNTP
MgSO ₄	2-8 mM (je nach Ansatz)
<i>Pwo</i> -Pol	3,5 U
10x <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase-Puffer	1x
H ₂ O	ad 100 µl

PCR-Programm:

- | | |
|---------------------------------------|------|
| 1) 90 s | 94°C |
| Zugabe der <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase | |
| 2) 90 s | 94°C |
| 3) 30 s | 20°C |
| 4) 300 s | 72°C |
| 5) 6x GOTO 2) | |

- | | |
|----------------|--------------------------|
| 6) 90 s | 94°C |
| 7) 120 s | 45-55°C (je nach Primer) |
| 8) 300 s | 72°C |
| 9) 30x GOTO 6) | |
| 10) unbegrenzt | 4°C |

Aufgrund der unterschiedlichen Größen von PCR-Produkt und Ausgangsplasmid konnte direkt eine elektrophoretische Auftrennung durchgeführt werden.

In beiden Ansätzen wurde nachfolgend das PCR-Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNA extrahiert, mit T4-DNA-Ligase ligiert, schließlich in *E. coli* JM105 oder JM109 transformiert und auf einer YT-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

3.2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Verwendet wurden die „plasmid-DNA-Isolation-Kits Mini, Midi und Maxi“ der Fa. Qiagen (Hilden) gemäß Herstellerprotokoll.

Die isolierte DNA wurde in 20 µl (Mini), 100 µl (Midi) bzw. 250 µl (Maxi) H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm.

3.2.2.3. Isolierung von genomischer DNA aus CHO-Zellen

Zur Analyse der in das CHO-Zell-Genom transfizierten IFN-β-Sequenzen wurde der „Genomic-tip“-Kit der Fa. Qiagen verwendet.

Die Vorgehensweise geschah gemäß Herstellerprotokoll.

3.2.2.4. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Klonierung von Plasmidfragmenten und PCR-Amplifikaten in Vektoren erfolgte mit Hilfe von Restriktionsenzymen.

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt 200-1000 ng DNA und 10 bis 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym in 10 µl gepufferter Lösung. Puffer- und Inkubationsbedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt.

3.2.2.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte in 1,2 %igen Agarosegelen. Verwendet wurde „High Strength Analytical Grade“ Agarose der Fa. BioRad.

Es wurden die Elektrophoresekammern Mini SubTM Cell und Wide Mini SubTM Cell der Fa. BioRad eingesetzt, welche die Benutzung von Flachbettgelen der Größe 10 x 6,5 cm mit acht Probestaschen oder der Größe 15 x 10 cm mit 20 Probestaschen ermöglichten. Die Agarose wurde in 1x TBE Puffer, welcher auch als Laufpuffer diente, unter Erhitzen gelöst, abkühlen gelassen und die Elektrophorese anschließend bei einer konstanten Spannung von 100 V bei RT durchgeführt. Vorab wurden die DNA-haltigen Proben im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer (30 % (v,v) Glycerin, 0,25 % (w,v) Xylencyanol FF, 0,25 % (w,v) Bromphenolblau) versetzt. Das maximale Probenvolumen bei der verwendeten Taschengröße betrug 25 µl.

Als Größenstandards dienten die Phagen-λ-DNA, gespalten mit *BstEII*, und die Phagen-φX174-DNA, gespalten mit *HaeIII* (beide Fa. New England Biolabs, Schwalbach). Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid (c = 0,25 mg/ml) gefärbt und bei 302 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mittels einer Digitalkamera.

3.2.2.6. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um aufgereinigte DNA aus Agarosegelfragmenten zu isolieren, wurde der „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Fa. Qiagen gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt.

3.2.2.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die zur Klonierung eingesetzten Vektorfragmente wurden mit alkalischer Phosphatase aus Krabben (SAP, Fa. New England Biolabs) dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu unterbinden.

Reaktionsansatz:

1 µg geschnittenen Vektor-DNA

1x SAP-Puffer

1 U SAP

Die Dephosphorylierung erfolgte 30 min bei 37°C. Vor der anschließenden Ligation wurde die SAP 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.2.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor- und „insert“-fragment wurden etwa im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 18°C.

Ligationsansatz:

1 µg Vektor-DNA

1 µg „insert“-DNA

1x Ligase-Puffer

2000 U T4-DNA-Ligase

3.2.2.9. Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen bediente sich der TSS-Methode.

TSS-Lösung:

10 % (m/v) PEG 6000

5 % (v/v) DMSO (Zugabe nach dem Autoklavieren)

50 mM MgCl₂
in 2x YT-Medium

50 ml 2x YT-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur des zu transformierenden Bakterienstammes beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 bei 37°C im Schüttelinkubator bei 230 rpm kultiviert. Die *E. coli*-Zellen wurden 10 min bei 3000 xg und RT abzentrifugiert, in 2 ml TSS-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien konnten direkt transformiert oder nach Zugabe von 2 ml Glycerin bei -80°C zur späteren Verwendung gelagert werden.

Zur Transformation wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit 5 µl des Ligationsansatzes vermischt, 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 45 Sekunden auf 42°C erwärmt, kurz erneut auf Eis gestellt, dann mit 900 µl 2x YT-Medium versetzt und 1 h im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Nach Sedimentation mit 3000 xg für 5 min wurden die Zellen in 100 µl 2x YT-Medium resuspendiert und auf eine ampicillinhaltige Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert und von den gewachsenen *E. coli*-Kolonien Plasmid-Minipräparationen zur weiteren Analyse angefertigt.

3.2.2.10. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem von der Firma Perkin Elmer vertriebenen Sequenzierkit „ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit mit AmpliTaq®Gold DNA-Polymerase“. Die aufgereinigten Oligonukleotide wurden in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer der Fa. Perkin Elmer analysiert und mit Hilfe des Programmes MacVector 6.01 ausgewertet.

Sequenzieransatz:

Terminator Premix	3 µl
DNA-Template	250 ng
Sequenzierprimer	5 pmol
H ₂ O	ad 20 µl

Reaktionszyklus:

- 1) 10 s 96°C
- 2) 5 s 50°C
- 3) 240 s 60°C
- 4) 25x GOTO 1)
- 5) unbegrenzt 4°C

Alle Temperaturänderungen erfolgten mit einer Rate von 2°C/s.

Die DNA wurde anschließend mit 70 % Ethanol präzipitiert, 15 min bei 14000 xg zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das Sediment im Exikator getrocknet. Dem DNA-Pellet wurden nachfolgend 20 µl „template suppression reagent“ zugesetzt, die Lösung zwei min auf 95°C erwärmt und auf Eis abgekühlt.

Sequenzierung genomischer DNA-Bereiche aus CHO-Zellen

Zur Sequenzierung der im Genom eingebauten IFN-β-Genbereiche wurde die aus den CHO-Zellen gewonnene genomische DNA einer „touch down“-PCR zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte unterzogen.

Reaktionsansatz zur Amplifikation der genomischen IFN-β-Bereiche:

genomische DNA	20-50 ng
Primer	10 pM
Nukleotidmix	200 µM je dNTP
MgSO ₄	2-4 mM (je nach Ansatz)
<i>Pwo</i> -Polymerase	3,5 U
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase-Puffer	1x
H ₂ O	ad 100 µl

PCR-Protokoll:

- 1) 60 s 94°C
nach 30 Sekunden Zugabe der *Pwo*-DNA-Polymerase
- 2) 5 s 92°C
- 3) 20 s 70°C
- 4) Verminderung der Temperatur in 3) um -0,5°C
- 5) 39x GOTO 2)

- | | |
|-------------------------------|------|
| 6) 5 s | 92°C |
| 7) 30 s | 60°C |
| 8) Verlängerung von 7) um 1 s | |
| 9) 19x GOTO 6) | |
| 10) 420 s | 72°C |
| 11) unbegrenzt | 4°C |

Nach elektrophoretischer Auftrennung des Amplifikats und anschließender Agarosegel-extraktion, konnte die DNA im obigen Sequenzieransatz verwendet werden.

3.2.2.11. Klonierung der Expressionsplasmide für IFN- β und IFN- β (9x)

Die cDNA des intronfreien, humanen IFN- β -Gens, bestehend aus Signalpeptidsequenz und IFN- β -Proteinsequenz, wurde freundlicherweise von PD Dr. H. Hauser, GBF Braunschweig in dem Plasmid pBHEIF zur Verfügung gestellt. Die Klonierungsstrategie sah die Einführung einer *XhoI*-Restriktionsschnittstelle vor, mit der dann das IFN- β -Gen über die Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in den Expressionsvektor pCI-1 kloniert wurde. Der so erhaltene Vektor pCI-ifn β besaß neben dem, unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stehenden, IFN- β -Gens mit Signalpeptidsequenz, ein nachgeschaltetes IRES-Element mit sich anschließendem SV40-Polyadenylierungssignal. Ausgehend von pCI-ifn β wurde hinter dem IRES-Element über *NotI*- und *ClaI*-Restriktionsschnittstellen eine GFP-Sequenz kloniert. Diese stammte aus dem Plasmid pSBC2-gfp. Vor der Klonierung mußte hinter dem 3'-Ende des GFP-Gens die *ClaI*-Restriktionsschnittstelle über PCR-Mutagenese eingefügt werden.

Bei dem IRES-Element handelt es sich um eine nicht translatierte RNA-Sequenz, die eine „cap“-unabhängige Translationsinitiation ermöglicht. Bei dem so erhaltenen bicistronischen Vektor pCI-ifn β ,gfp sollte das IFN- β - mit dem GFP-Expressionsniveau korrelieren und das intrazellulär vorliegende GFP als optischer Selektionsmarker für hochexprimierende CHO-Zellen dienen.

Die Klonierung des Vektors pCI-ifn β (9x) zur Expression von IFN- β (9x) geschah durch PCR-Amplifikation von pCI-ifn β unter Entfernung der IFN- β -Sequenz zwischen dem ATG-Startcodon und der *EcoRI*-Schnittstelle hinter dem 3'-Ende des IFN- β -Gens. In diesen, die Signalpeptidsequenz enthaltenden Vektor, wurde das aus pET-19bFW1B β (9x) (Promotions-

arbeit Dr. Schneider-Fresenius, 1999) stammende IFN- β (9x)-Gen am 5'-Ende „blunt end“ und am 3'-Ende über die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

Nach Entfernung der IFN- β -Sequenz aus pCI-ifn β ,gfp über die *XhoI/XbaI*-Schnittstellen wurde das, aus pCI-ifn β (9x) stammende, IFN- β (9x)-„insert“ über die gleichen Schnittstellen eingefügt. Der so erhaltene Expressionsvektor erhielt die Bezeichnung pCI-ifn β (9x),gfp. Eine schematische Übersicht bietet nachfolgende Abb 2.

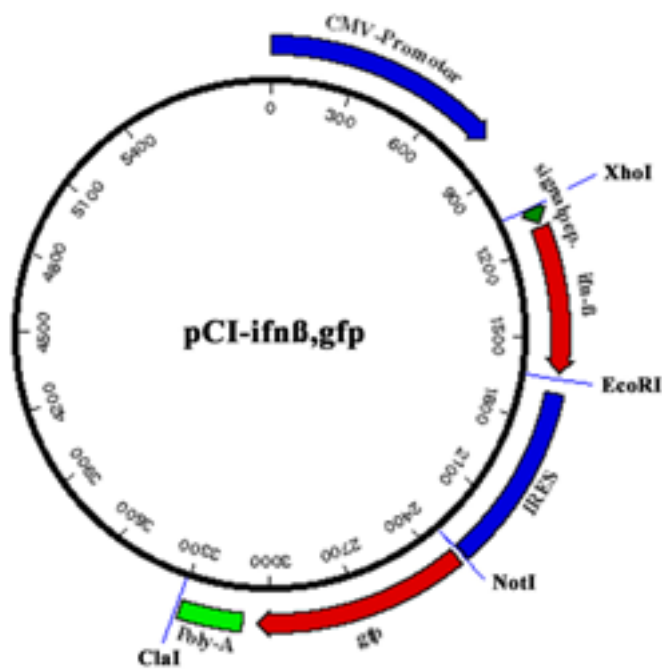


Abb. 2: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCI-ifn β ,gfp

3.2.3. Zellkulturtechniken

3.2.3.1. Kultivierung, Transfektion, Selektion und Expressionssteigerung der CHO-Zellen

Kultivierung:

Alle Zelllinien wurden unter den von der DSMZ empfohlenen Bedingungen kultiviert und gelagert. Antibiotika wurden nicht eingesetzt, mit Ausnahme des Geneticin-enthaltenden Selektionsmediums.

Die zur Transfektion verwendete Zelllinie CHO-dhfr war Dihydrofolatreduktasegen-defizient, wodurch den Zellen die Fähigkeit zur Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat fehlte. Tetrahydrofolat wird bei der Synthese von dTMP zur Übertragung einer CH₃-Gruppe auf ein dUMP benötigt. Zur Kultivierung ist folglich die externe Zufuhr von Ribo- und Desoxyribonukleosiden erforderlich. Als Wachstumsmedium wurde Mem- α -Medium mit Ribonukleosiden und Desoxyribonukleosiden mit einem Anteil von 10 % FBS (interne Bezeichnung: Mem- α^+) benutzt.

Die nach erfolgreicher Transfektion und Selektion IFN- β stabil exprimierenden CHO-Klone wurden ohne Selektionsdruck in Mem- α -Medium ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside mit einem Anteil von 10 % FBS (interne Bezeichnung: Mem- α^-) weiter kultiviert. Die zur Langzeitlagerung bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen wurden rasch aufgetaut, sofort 1:20 in dem entsprechenden Kulturmedium verdünnt und nach 3-4 h durch einen Medienwechsel von DMSO-Resten befreit. Das Wachstum aller Zelllinien erfolgte in Kulturschalen und -flaschen der Firmen Greiner oder Nunc bei 5 % CO₂ und 37°C. Die Passagierung der adhärent wachsenden Zellen geschah mittels Trypsinierung durch Trypsin-EDTA-Lösung. Je nach Bedarf ließen sich die abgelösten Zellen anschließend zählen, abzentrifugieren, aussäen oder zur Langzeitlagerung verwenden. Die Trypsin-EDTA-Lösung sollte nicht länger als 10 min auf die Zellen einwirken, weshalb sie durch Zugabe des 10-15fachen Volumens an Medium neutralisiert wurde.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Zur Ermittlung der Zellvitalität wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Trypanblaulösung (0,4 % w/v) versetzt.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen nach der Trypsinierung bei 1200 xg für 3 min abzentrifugiert, mit Medium gewaschen, erneut zentrifugiert, dann in RPMI-Medium mit 20 % FBS und 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese kühlten in einer Kryobox bei -80°C langsam mit ca. -2°C/min ab und konnten nach 1–2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Transfektion und Selektion der CHO-Zellen:

Die verwendete Methode der Calciumphosphat-Kopräzipitation basiert auf den von Graham und van der Eb (1973) sowie von Chen und Okayama (1988) veröffentlichten Verfahren.

Als Selektionsmarker einer erfolgreichen Transfektion dienten die Plasmide pSV2-dhfr und pAG60-neo, welche zusammen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid (pCI-ifn β , pCI-ifn β (9x), pCI-ifn β ,gfp oder pCI-ifn β (9x),gfp) kotransfiziert wurden. pAG60-neo kodiert ein

Resistenzgen für das Antibiotikum Geneticin (G418) und pSV2-dhfr kodiert das Dihydrofolatreduktasegen. Letzteres diente neben der Selektion durch Mem- α -Medium ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside hauptsächlich der späteren Genamplifikation mittels Methotrexat.

Es wurden $1 \cdot 10^6$ CHO-dhfr Zellen in einer 145 mm-Petrischale ausgesät und über Nacht inkubiert. 4 h vor der Transfektion wurde das Medium erneuert.

Zur Transfektion wurden 20 μg des Expressionsvektors sowie 2 μg des pAG60-neo- und 2 μg des pSV2-dhfr-Plasmides eingesetzt. Alle Plasmide wurden durch mehrfache ethanolische Fällung gereinigt, bis das Verhältnis von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bei 1,9 bis 2,0 lag und in sterilem H_2O aufgenommen.

Die Plasmidlösungen wurden mit 50 μl einer 250 mM CaCl_2 -Lösung vermennt und mit H_2O auf 500 μl aufgefüllt. In einem 5 ml Reaktionsgefäß wurden dann 500 μl des 2x HEBS-Puffers (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,1) vorgelegt und unter ständigem „Vortexen“ die DNA/ CaCl_2 -Lösung langsam zugefügt. Diese Mischung wurde 30 min bei RT inkubiert, erneut gemischt und tropfenweise, unter leichtem Schwenken auf die CHO-Zellen gegeben. Die Zellen wurden so 16 h im Brutschrank inkubiert, anschließend das Medium abgesaugt und durch 15 % Glycerin in Mem- α^+ für 60 s ersetzt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen 24 h in 35 ml Mem- α^+ inkubiert und dieses dann durch 35 ml Selektivmedium (Mem- α^- mit 0,36 mg/ml G418) ersetzt. Ein Medienwechsel erfolgte alle 3–4 Tage. 5–7 Tage nach der Transfektion waren die meisten Zellen abgestorben. Nach 12–15 Tagen zeigten sich erste Klone, unter denen sich aber noch keine stabilen Expressierer befanden. Erst 20–25 Tage nach der Transfektion bildeten sich sichtbare Klone mit stabiler IFN- β -Expression, welche nach 25–35 Tagen Kolonien von 0,5 bis 2 mm Durchmesser gebildet hatten und im „overlay assay“ (s. 3.2.3.2.) auf IFN- β -Expression hin getestet werden konnten. Die danach ausgewählten Klone wurden vereinzelt, die genaue IFN- β -Expressionsrate mittels des antiviralen Assay (AVA) bestimmt und die stärksten Produzierer einer Expressionssteigerung durch Behandlung mit Methotrexat unterzogen.

Expressionssteigerung durch Behandlung der CHO- Klone mit Methotrexat:

Die bei der Transfektion eingesetzte Methode der Calciumphosphat-Kopräzipitation führt zu stabil exprimierenden CHO-Klonen, welche in der Regel Expressions- und Selektionsplasmide in direkter Nachbarschaft im Genom eingebaut haben. Methotrexat (Mtx) ist ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolatreduktase. Durch Behandlung der Klone mit Mtx kommt es, als Folge des erhöhten Selektionsdruckes, zu einer Genamplifikation der um

das/die dhfr-Gen(e) liegenden Bereiche. Nach erfolgreicher Genamplifikation wird so nicht nur eine Expressionssteigerung der Dihydrofolatreduktase, sondern auch des gewünschten Proteins erzielt (Hamlin *et al.*, 1991).

Die Expressionssteigerung bei den am stärksten IFN- β -exprimierenden Klonen erfolgte mittels stufenweiser Erhöhung der Mtx-Konzentration ($c = 20, 50, 100, 500$ und 1000 nM) im Kulturmedium (Mem- α^-). Dazu wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen des entsprechenden Klons in einer 145 mm-Kulturschale in Mem- α^- -Medium ausgesät, bis zu einer Wachstumsdichte von 50-60 % kultiviert und dann das Medium durch Mem- α^- -Medium mit 20 nM Mtx ersetzt. Nach etwa 5-7 Tagen waren die meisten Zellen abgestorben, nur diejenigen, welche ausreichend Dihydrofolatreduktase bilden konnten, überlebten. 4-6 Wochen nach Beginn der Mtx-Behandlung hatten sich gut sichtbare Kolonien ($\varnothing \approx 1-2$ mm) gebildet, die im „overlay assay“ auf IFN- β -Expression hin analysiert wurden. Nach Vereinzelung und genauer Bestimmung der Expressionsraten der Klone im antiviralen Assay, wurden die am stärksten exprimierenden Klone der nächsten Mtx-Stufe ($c = 50$ nM, 100 nM, usw.) wie oben unterzogen.

3.2.3.2. „overlay assay“ zur Analyse IFN- β -exprimierender Klone

Zur Detektion und Isolation von IFN- β -exprimierenden CHO-Kolonien aus Kulturschalen wurde ein von McCracken und Brown (1984) bzw. Walls und Grinnell (1990) beschriebenes Verfahren angewendet. Dazu wurde das Medium entfernt, die Kulturschale zweimal mit HBSS-Lösung gespült und dann die Zellkolonien mit 10 ml einer 40°C warmen Mischung aus 0,5 % Agarose in Mem- α^- ohne FBS etwa 3 mm hoch überschichtet. Auf die fest gewordene Agarschicht wurde eine zuvor an mehreren Stellen markierte PVDF-Membran (Immobilon-P; 0,45 μ m) der Fa. Millipore gelegt, die Markierungen auf den Boden der Kulturschale übertragen, 12-16 h im Brutschrank inkubiert und danach die Membran wieder abgenommen. Sie wurde anschließend einer Immunfärbung (s. 3.2.4.3.) unterzogen. Die erste Agarschicht wurde dann mit einer zweiten 6 mm starken Schicht aus 0,5 % Agarose in Mem- α^- /10 % FBS überschichtet, um eine Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren zu gewährleisten, und die Schale wieder in den Brutschrank gestellt.

Die Lokalisationen der hochexprimierenden Klone erschienen nach der Immunfärbung als intensive Punkte auf der PVDF-Membran. Durch Vergleich mit den Markierungen auf der Kulturschale konnten die zugehörigen Kolonien markiert, mit einer 100 μ l-Pipette unter mikroskopischer Kontrolle (Invertmikroskop, 40fache Vergrößerung) „gepickt“ und in einer

6-Loch-Platte in Mem- α 7/10 % FBS vereinzelt werden. Die so erhaltenen Klone wurden in 25 cm²-Kulturflaschen überführt und einer Bestimmung der IFN- β -Expression im AVA unterzogen.

3.2.3.3. Biologische Aktivitätsbestimmung IFN- β -haltiger Proben im antiviralen Assay (AVA)

Dieser Test bedient sich des Schutzes sensitiver Zellen durch Interferone gegen den zytopathischen Effekt von Viren als Maß für die in der Meßprobe enthaltene Interferonaktivität. Eine genaue Ausführung der verschiedenen AVAs findet sich bei Antonetti *et al.* (1997).

Im Test wurde die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 eingesetzt, welche mit EMC-Viren infiziert wurden. Die Auswertung erfolgte durch Anfärbung der nicht lysierten Zellen mit Kristallviolett. Eine Probe wurde dann als IFN- β positiv eingestuft, wenn mehr als 50 % der A549-Zellen nicht lysiert waren. Als laborinterner Standard diente das aus CHO-Zellen stammende IFN- β -Präparat Rebif® der Fa. Serono mit einer spezifischen antiviralen Aktivität von $2,77 \cdot 10^8$ IU/mg. Zur Vermehrung des EMC-Virus wurden schnell infizierbare, murine L929-Zellen verwendet und nach deren Lyse der, die Viren enthaltende, Kulturüberstand als Stammlösung eingesetzt. Die Kultivierung der A549- und L929-Zellen geschah analog derjenigen der CHOdhfr-Zellen, nur wurde hier RPMI-Medium mit 10 % FBS benutzt.

Für den Assay wurden trypsinierte A549-Zellen mit Medium auf einen Titer von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt, auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte („flat bottom“) der Fa. Becton Dickinson mit je 100 μ l pro Loch ausgesät und im Brutschrank bis zur Ausbildung einer geschlossenen Zellschicht über Nacht inkubiert. Die Titration der IFN- β -Aktivität in den Proben erfolgte je nach gewünschter Genauigkeit durch sukzessive 1:3-, 1:2- oder 1:1,5-Verdünnungsschritte, indem das entsprechende Volumen der zu testenden Lösung in das erste „well“ gegeben, zweimal vermischt und dann in das folgende pipettiert wurde usw.

Jede Platte trug neben neun Meßspalten, zwei mit definierter IFN- β -Lösung als Standard sowie eine als Zellwachstums- und Viruskontrolle. Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde das EMC-Virus in einem Titer hinzugegeben, der eine vollständige Lyse der ungeschützten Zellen der Viruskontrollspalte nach 16-22 h bewirkt. Nach einer anschließenden Vitalfärbung der Zellen mit Kristallviolett konnte durch Vergleich mit der IFN- β -Standardreihe die antivirale Aktivität der Proben ermittelt werden.

Als Maßeinheit für die Expressionstärke eines CHO-Klones gilt die von 10^6 Zellen in 24 h produzierte Aktivitätsmenge an IFN- β .

3.2.3.4. Optische Analyse der CHO-Klone mit GFP-Koexpression

Bei den CHO-Klonen, welche mit den bicistronischen Vektoren pCI- $\text{ifn}\beta$,gfp oder pCI- $\text{ifn}\beta(9x)$,gfp transfiziert worden waren, wurde zusätzlich zur IFN- β -Expressionsstärke eine Fluoreszenzintensitätsbestimmung durchgeführt. Ziel war, gegebenenfalls bei Korrelation beider Größen, die Fluoreszenzstärke, z. B. mittels eines „Facs“, als Selektionsmarker für IFN- β -hochexprimierende Klone zu verwenden.

Nach Vereinzeln der aus der Transfektion erhaltenen Klone und deren Kultivierung, wurden die Zellen trypsiniert, zweimal mit HBSS-Lösung gewaschen und auf einem Objektträger gebracht. Die Abschätzung und fotografische Dokumentation der Fluoreszenzstärke erfolgte bei 1000facher Vergrößerung und 480 nm Fluoreszenzanregungswellenlänge in einem Mikroskop des Typs „Axiophot“.

3.2.3.5. Serumfreie Expression von IFN- β und IFN- $\beta(9x)$

Um die Fremdproteinmenge zu reduzieren, wurde das zur Aufreinigung eingesetzte IFN- β bzw. IFN- $\beta(9x)$ in serumfreiem CHO-SFM II-Medium mit 0,5 mg/ml HSA und Mem-Vitaminzusatz exprimiert. Dazu war es erforderlich, die CHO-Klone vorab an die serumfreien Expressionsbedingungen zu adaptieren. Sie wurden in vier 175 cm²-Kulturflaschen ausgesät und sukzessive in Medium kultiviert, das zunächst 5 %, dann 2,5 %, 1,0 %, 0,5 % und schließlich 0 % FBS enthielt. Bis einschließlich 2,5 % FBS konnte als Medium Mem- α verwendet werden. Unter 2,5 % FBS wurde das CHO-SFM II-Medium, supplementiert mit Mem-Vitaminlösung, benutzt. Die Zellen wurden auf jeder FBS-Konzentration für mindestens drei Passagierungen gehalten, bei denen jeweils eine Kontrolle der Vitalität und der IFN- β -Expressionsstärke erfolgte. Unter 2,5 % FBS wurde das zur Passagierung notwendige Trypsin, abweichend vom Standardprotokoll, mittels Trypsin-Inhibitor-Lösung inaktiviert. Die an serumfreie Expressionsbedingungen adaptierten CHO-Zellen wurden auf acht 175 cm²-Kulturflaschen verteilt, bis zu einer Dichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/Flasche kultiviert und dann in einen Flachbettstapel mit 10 Ebenen in 2 l CHO-SFM II-Medium mit 0,5 mg/ml HSA und Vitaminzusatz zur IFN- β -Produktion überführt. Der Zusatz des HSA war zur Stabilisierung des IFN- β in serumfreien Kulturüberständen erforderlich (van Damme und Billiau, 1981). Nach 3-5 Tagen wurde der Kulturüberstand abgenommen, bei 4°C gelagert und durch neues Medium ersetzt.

3.2.4. Proteinchemische Analysemethoden

3.2.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue R 250 (Fa. Merck) nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die Quantifizierung des gebildeten farbigen Komplexes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Der Mikroassay wurde als Fertiglösung von der Fa. BioRad bezogen. Die Abgleichung der Meßwerte geschah anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA; Eichlösung der Fa. BioRad).

3.2.4.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde zuerst von Laemmli (1970) beschrieben.

Als Apparatur wurde das vertikale Gelsystem Minigel Twin G42 der Fa. Biometra benutzt.

Die 15 %igen Gele hatten eine Schichtdicke von 1 mm und Abmessungen von 80 x 65 mm.

Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel im Verhältnis 1:5 mit 5x Auftragspuffer versetzt, für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, 10 s mit Ultraschall (Einstellung: „cycle“ 1) behandelt und nachfolgend 10 min bei 15000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert.

5x Auftragspuffer:	250 mM Tris/HCl, pH 6,8
	10,0 % (v/v) β -Mercaptoethanol
	20,0 % (v/v) Glycerin
	10,0 % (w/v) SDS
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Als Molekulargewichtstandard diente der „low molecular weight marker“ der Fa. BioRad.

Als IFN- β -Standard kam das Präparat Rebif® der Fa. Serono zum Einsatz. Es handelt sich dabei um rekombinant hergestelltes, menschliches IFN- β (c = 88 μ g/ml) aus CHO-Zellen mit Zusätzen von HSA (c = 10 mg/ml), Mannit und Natriumacetat, pH 4,0.

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei RT wurde im 5 %igen Sammelgel eine Stromstärke von 6 mA und im 15 %igen Trenngel eine Stromstärke von 12 mA als limitierende Größe angelegt. Der Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 0,1 % SDS und 192 mM Glycin in wäßriger Lösung. Tab. 2 bietet eine Übersicht der Zusammensetzung der Gele.

	Sammelgel 5 %ig	Trenngel 15 %ig
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (29,22 %/ 0,78 %)	0,5 ml	4 ml
Wasser	1,65 ml	2 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,7 ml	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	2 ml
10 % APS	50 µl	100 µl
TEMED	2 µl	5 µl

Tab. 2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der SDS-PAGE

Die Proteinbanden wurden entweder durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R 250 oder durch eine Silberfärbung nach Merril *et al.* (1983) sichtbar gemacht. Verfahren wurde nach den angegebenen Herstellerprotokollen.

3.2.4.3. Enzymgekoppeltes Immunelektrotransfer-Blotverfahren

Die nachfolgend verwendete, von Burnett *et al.* (1981) entwickelte Methode ermöglicht den spezifischen Nachweis von, auf Nitrocellulose immobilisierten, Proteinen mit mono- oder polyklonalen Antikörpern.

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE-Gel auf die Nitrocellulosemembran (Typ BA 85, Porengröße 45 µm, Fa. Schleicher und Schuell) erfolgte innerhalb von 35 min bei konstanter Stromstärke von 100 mA ($\cong 2 \text{ mA/cm}^2$) und RT, als Transferpuffer diente dabei eine Lösung mit 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % (v,v) Methanol. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für zwei min mit einer Ponceau S Lösung der Fa. SigmaAldrich gefärbt und die Proteine des Molekulargewichtstandards mit Bleistift markiert.

Die noch freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran wurden nachfolgend mit 5 % Milchpulver-enthaltenden TBST-Puffer abgesättigt und einer Immunfärbung zur Identifizierung IFN- β -haltiger Proben unterzogen. Nach der Bindung des ersten IFN- β -

spezifischen Antikörpers, wurde das Protein mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der gegen die schweren Ketten des Immunglobulins des ersten Antikörpers gerichtet und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war, visualisiert. Dabei reagiert im verwendeten AP-Puffer ein künstliches Substrat der alkalischen Phosphatase, 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, Fa. Roche) mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT, Fa. Roche) zu einem unlöslichen, blauvioletten Niederschlag an den Orten der Enzymaktivität.

Verwendete Lösungen:

TBST-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 150 mM NaCl
 0,05 % Tween 20

AP-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 9,5
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂

Die Durchführung geschah nach dem von Maniatis *et al.* (1989) angegebenen Verfahren.

Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 3.1.3. aufgeführt. Die NBT/BCIP-Lösung wurde 1:100 verdünnt eingesetzt.

3.2.4.4. ELISA für IFN- β

Der verwendete „sandwich“-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis IFN- β -haltiger Proben stammte von der Fa. Toray Industries, Kyoto, Japan. Die Mikrotiterplatte war dabei mit einem polyklonalen Serum gegen natürliches humanes IFN- β beschichtet. Zur Detektion des gebundenen IFN- β wurde ein, mit alkalischer Phosphatase gekoppelter, monoklonaler Antikörper verwendet (s. 3.1.3.).

Die Eichung auf IFN- β bzw. IFN- β (9x) sowie die Durchführung des ELISA erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die Messungen vollzog freundlicherweise Dr. Heim (Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover).

3.2.4.5. Aufreinigung von IFN- β und IFN- β (9x)

Alle zu den Affinitätschromatographien und der Gelfiltration eingesetzten Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 μ m PVDF-Filter der Fa. Millipore) und im Vakuum entgast. Die Chromatographieläufe wurden alle bei RT an einer „BioCAD Perfusion Chromatography Workingstation 60“ (Fa. Perseptive Biosystems) durchgeführt und bei 280 nm verfolgt.

Die Interferonkonzentration in den verschiedenen Elutionsfraktionen der Chelating Sepharose- und der BioSil SEC 125 5- bzw. Superdex 75-Säule sollte 0,1-0,3 mg/ml nicht überschreiten, da sonst Aggregation eintrat. Alle Elutionsfraktionen wurden sofort mit mindestens 2 mg/ml HSA stabilisiert. Die Lagerung der IFN-Präparationen erfolgte bei 4°C.

3.2.4.5.1. Affinitätschromatographie an einer Blue Sepharose-Säule

Verwendet wurde eine Blue Sepharose FF-Säule der Fa. Amersham Pharmacia Biotech mit 26/93 mm, Säulenvolumen (V_0) = 49 ml.

Die Reinigung erfolgte bei umgekehrtem Fluß und einer Flußrate von 8 ml/min mit vier V_0 0,1 M NaOH, dann mit zwei V_0 Wasser und vier V_0 2,0 M KSCN. Die anschließende Regeneration geschah durch Spülen mit 3-5 V_0 Auftragspuffer (15 % EG, 1 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,2) mit 8 ml/min.

Zur Proteinbindung wurden etwa 15 l des vorher sterilfiltrierten Zellkulturüberstandes auf 15 % Ethylenglykol (EG) und 1 M NaCl, pH 7,2 gebracht, auf Eis gekühlt und mit einer Flußgeschwindigkeit von 12 ml/min aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 3-5 V_0 Auftragspuffer gespült. Ein nachfolgender Waschschriff mit drei V_0 30 % EG, 1 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,2 wurde nur bei IFN- β durchgeführt, da etwa 1/3 des gebundenen IFN- β (9x) bereits bei einer Konzentration von 30 % EG eluierten.

Die Elution erfolgte mit 0,25-0,5 V_0 60 % EG, 1 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,2 bei umgekehrter Flußrichtung und einer Flußrate von 0,5 ml/min.

3.2.4.5.2. Affinitätschromatographie an einer Chelating Sepharose-Säule

Verwendet wurde eine mit Zn^{2+} -Ionen gekoppelte Chelating Sepharose FF-Säule der Fa. Amersham Pharmacia Biotech, 26/123 mm, V_0 = 65 ml.

Das Vorbereiten und Reinigen der Säule erfolgte durch Spülen mit einem V_0 0,05 M EDTA, 0,02 M Na-P, pH 7,2, gefolgt von zwei V_0 Wasser, danach mit zwei V_0 1 M NaOH-Lösung und abschließend mit 10 V_0 Wasser bei einer Flußrate von 8 ml/min.

Das Beladen der Säule mit Zn^{2+} -Ionen geschah durch zwei V_0 0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl, pH 5,0, gefolgt von zwei V_0 0,2 M $ZnCl_2$, 0,5 M NaCl, 0,1 M NaAc, pH 5,0 bei einer Flußrate von 4 ml/min. Anschließend wurde mit 10 V_0 Wasser gespült und die Säule mit drei V_0 Auftragspuffer (30 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0) äquilibriert.

Zur Proteinbindung wurde das Eluat der Blue Sepharose-Säule auf 30 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0 gebracht und mit 4 ml/min aufgetragen.

Nach dem Wachen mit drei V_0 30 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0 und dann mit zwei V_0 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0 bei IFN- β bzw. zwei V_0 10 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0 bei IFN- β (9x) mit einer Flußrate von 4 ml/min, erfolgte die Protein-elution bei IFN- β mit 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,2 oder mit 0,1 M Imidazol, 10 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0 bei IFN- β (9x). Die Flußrate betrug jeweils 0,5 ml/min.

3.2.4.5.3. Gelfiltration

Als letzten Aufreinigungsschritt schloß sich eine Gelfiltration mittels einer Superdex 75- (Fa. Amersham Pharmacia Biotech; 10/360 mm; $V_0 = 28,4$ ml; $V_{void} = 18,4$ ml) oder einer BioSil SEC 125 5-Säule (Fa. BioRad; 7,5/600 mm; $V_0 = 26,5$ ml; $V_{void} = 17,2$ ml) an.

Die Säulenmaterialien wurden bei umgekehrter Flußrichtung mit 10 V_0 50 % (v/v) Acetonitril in Wasser und dann 10 V_0 Wasser gereinigt.

Das Injektionsvolumen betrug 100 μ l (BioSil SEC 125 5) bzw. 500 μ l (Superdex 75) des Eluats von der Chelating Sepharose FF-Säule. Als Laufpuffer dienten 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 4,2 für IFN- β und IFN- β (9x) oder 10 % EG, 0,15 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 6,8 für IFN- β (9x). Der Fluß betrug 0,5 ml/min (BioSil SEC 125 5) bzw. 1 ml/min (Superdex 75).

Die, das IFN- β enthaltenden, Fraktionen wurden in Gegenwart von HSA mittels einer Ultrafiltration (Ultra-free Filtereinheiten der Fa. Millipore) eingeeengt und anschließend, sofern notwendig, mit einer PD 10-Säule der Fa. Amersham Pharmacia Biotech auf 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 4,2 umgepuffert.

Die Eichung der Säulen geschah mittels des „Gel Filtration Standard“ der Fa. BioRad.

3.2.4.6. „reversed phase“ HPLC

Die „reversed phase“ Chromatographie diente dem chemischen Nachweis einer im Vergleich zu IFN- β verminderten Oberflächenhydrophobizität des IFN- β (9x). Je stärker die hydrophobe Wechselwirkung eines Proteins mit der unpolaren, stationären Phase ist, um so geringer ist die Tendenz zur Elution mittels eines polaren Laufmittels.

Verwendet wurde eine Source 5RPC-Säule der Fa. Amersham Pharmacia Biotech mit 4,6/150 mm, $V_0 = 2,5$ ml und einer Partikelgröße von 5 μm .

Die IFN- β -Proben wurden mit einem Fluß von 1 ml/min in 0,05 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 33°C mit einem linearen Gradienten von 28 auf 56 % Acetonitril in 0,05 % TFA über 42 min und mit 1 ml/min. Die Proteinpeaks wurden bei 214 nm detektiert.

Die Läufe wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. R. Heß, Fa. BioVision, Hannover, an einer Hewlett Packard Chem Station 1100 durchgeführt.

3.2.4.7. Massenspektrometrische Analyse

Die Molekularmassen von IFN- β und IFN- β (9x) wurden auf einem Massenspektrometer des Typs Quadrupol-TOF QStar der Fa. Perkin Elmer Sciex bestimmt (mit freundlicher Unterstützung von Dr. M. Jürgens, Fa. BioVision, Hannover). Nach Aufnahme der Spektren wurden die Massen mit dem Programm BioMultiview (Fa. Perkin Elmer Sciex) errechnet.

3.2.5. Pharmakologische Tierversuche

Das pharmakokinetische Verhalten von IFN- β und IFN- β (9x) wurde in zwei Tierversuchen mit insgesamt 20 Kaninchen untersucht. Der erste Tierversuch diente dabei der Dosisfindung, der zweite der Bestätigung der Ergebnisse. Der Versuchsablauf entsprach dem von Bocci *et al.* (1988) veröffentlichten Verfahren. Als Versuchstiere dienten männliche Kaninchen der Rasse „New Zealand White“ mit einem Gewicht von 2,3-2,7 kg (Fa. Charles River, Sulzfeld). Die Tierhaltung erfolgte im Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen.

Die beiden eingesetzten IFN- β -Präparationen, IFN- β (9x) und Rebif® der Fa. Serono, wurden zunächst, mit freundlicher Unterstützung von Dr. Heim (Inst. für Virologie, Medizinische Hochschule Hannover), im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test auf Endotoxin hin untersucht.

Die subkutane Injektion an zwei Stellen unter die Nackenhaut der Tiere gewährleistete eine bessere Verteilung der Proteinlösungen. Die Dosis pro Tier betrug beim ersten Tierversuch $1 \cdot 10^7$ IU ($\cong 37 \mu\text{g}$) IFN- β (9x) bzw. $2 \cdot 10^7$ IU ($\cong 72 \mu\text{g}$) IFN- β . Beim zweiten Tierversuch wurden von beiden Proteinen $1 \cdot 10^7$ IU verabreicht. Nach Applikation der Proteinlösungen wurde nach 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 24 und 48 Stunden aus der Ohrarterie Blut entnommen, war dies nicht möglich, erfolgte die Entnahme aus der Ohrvene. Um ein sofortiges Gerinnen des Blutes zu verhindern, wurde das Blut in Reaktionsgefäßen, in denen $10 \mu\text{l}$ mit 100 Einheiten Heparin vorgelegt worden waren, gesammelt und 10 min bei $5000 \times g$ zentrifugiert. Die Lagerung des Plasmaüberstandes bis zur weiteren Untersuchung im AVA sowie im ELISA erfolgte bei -20°C .

Die Berechnung der pharmakologisch entscheidenden Größen der „Fläche-unter-der-Konzentrations-/Zeitkurve („area under the curve“, AUC) und die der Elimination („clearance“, CL) geschah mittels folgender Formeln (Salmon *et al.*, 1993):

$$AUC_{0-t_z} = \sum_{i=1}^z \left(\frac{C_i \cdot t_i + C_{i-1} \cdot t_{i-1}}{2} \right) \cdot (t_i - t_{i-1})$$

$$CL = \frac{\text{injizierte Dosis}}{AUC_{0-t_z}},$$

wobei C_i die gemessenen Konzentrationen von IFN- β bzw. IFN- β (9x) zum Zeitpunkt t_i sind und t_z dem letzten berücksichtigten Zeitpunkt (hier 48 h) entspricht.

Die AUC ist dabei ein Maß für die Bioverfügbarkeit einer Substanz, die CL beschreibt die Verweildauer des Stoffes im Blut.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von IFN- β und IFN- β (9x)

4.1.1. Transfektion, Selektion und Expressionssteigerung der CHO-Zellen

Nach erfolgreicher Konstruktion der Plasmide pCI-ifn β , pCI-ifn β (9x), pCI-ifn β ,gfp bzw. pCI-ifn β (9x),gfp, wurden die CHOdhfr-Zellen mit jeweils einem der vier verschiedenen Expressionsvektoren und den beiden Selektionsvektoren pSV2-dhfr sowie pAG60-neo kotransfiziert. Insgesamt erfolgten 25 Transfektionsansätze in 145 mm Kulturschalen, davon je acht mit pCI-ifn β und pCI-ifn β (9x), sechs mit pCI-ifn β ,gfp und drei mit pCI-ifn β (9x),gfp. Im Schnitt wuchsen in jeder Kulturschale vier bis fünf Wochen nach der Transfektion um die 1000 Klonkolonien, welche mittels des „overlay assay“ und des AVA auf ihre Expressionsstärke hin getestet wurden. Über 80 % dieser Klone zeigten eine konstitutive Interferonexpression, von denen jedoch über 95 % eine Expressionsstärke von unter 5000 IU pro 10^6 Zellen in 24 h [IU/(10^6 Z·24h)] besaßen. Nur 0,1 % zeigten eine Expression von mehr als 20000 IU/(10^6 Z·24h). Die CHO-Klone mit einer GFP-Koexpression wiesen signifikant seltener Expressionsraten über 5000 IU/(10^6 Z·24h) auf als solche ohne GFP-Expression (s. Tab. 3).

	pCI-ifn β	pCI-ifn β (9x)	pCI-ifn β ,gfp	pCI-ifn β (9x),gfp
getestete Klone	≈ 7000	≈ 7000	≈ 5000	≈ 2000
mit IFN-Expression	≈ 5500	≈ 5500	≈ 4000	≈ 1500
> 1.000 IU/(10^6Z·24 h)	≈ 10 %	≈ 10 %	≈ 2 %	≈ 2 %
> 5.000 IU/(10^6Z·24 h)	≈ 1 %	≈ 1 %	≈ 0,1 %	≈ 0,1 %
> 20.000 IU/(10^6Z·24 h)	≈ 0,1 %	≈ 0,1 %	0 %	0 %

Tab. 3: Unterschiedliche CHO-Transfektanten und ihre Expressionsstärken

Die Verwendung des GFP als optischer Selektionsmarker erwies sich als nicht sinnvoll, da zwischen Fluoreszenzintensität und IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-Expressionsniveau keine Korrelation gemessen werden konnte.

Die 10 am stärksten IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-exprimierenden CHO-Klone wurden im folgenden einer Expressionssteigerung durch Behandlung mit 20 nM Methotrexat unterzogen. Nach etwa fünf Wochen hatten sich je Kulturschale 300–400 Klonkolonien mit im Schnitt 1-2 mm Durchmesser gebildet, welche im „overlay assay“ auf ihre jeweilige Menge an exprimiertem Interferon- β hin getestet wurden (s. Abb. 3).

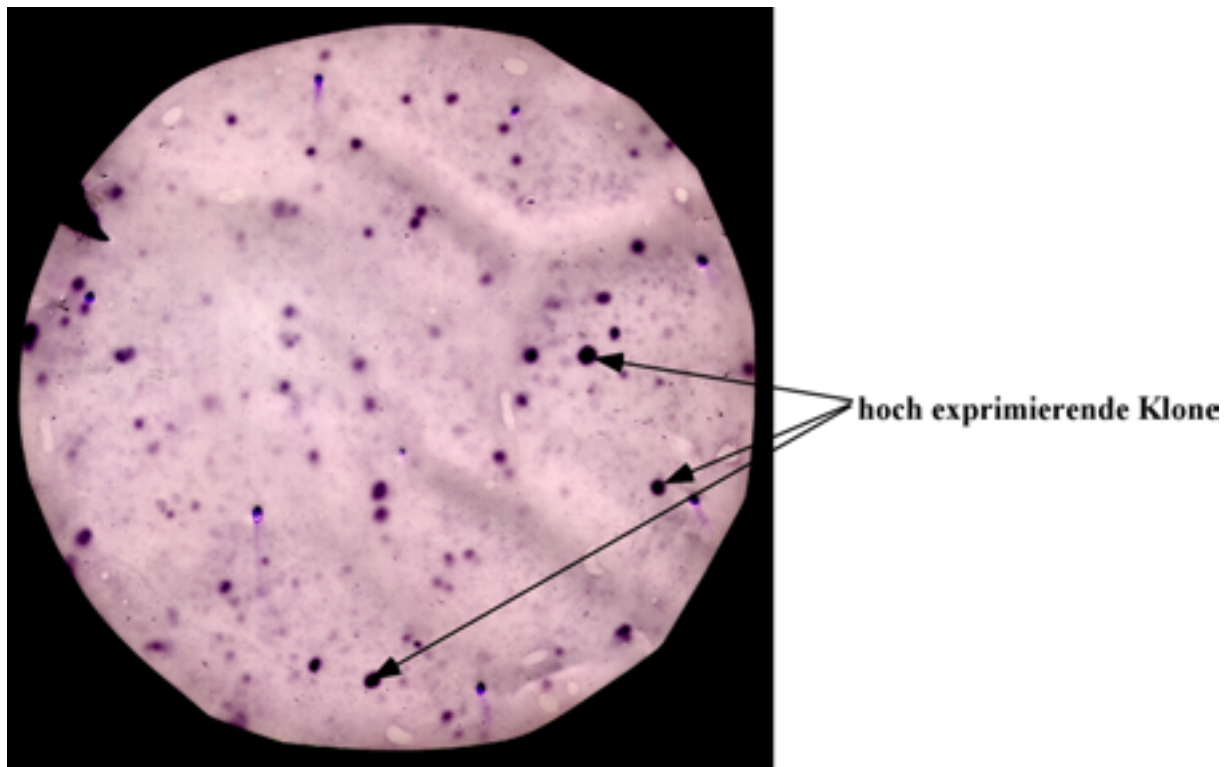


Abb. 3: Immunfärbung eines „overlay assay“. Die zur Expressionssteigerung ausgewählten Klone zeigten eine intensivere Violett-färbung als benachbarte Klone ähnlicher Größe.

Die stark Interferon-produzierenden Zellkolonien wurden unter mikroskopischer Kontrolle „gepickt“, vereinzelt und im AVA ihre Expressionsstärke ermittelt. Die am höchsten exprimierenden Klone wurden der nächsten Mtx-Stufe mit 50 nM Mtx unterzogen. Die für die Produktion ausgewählten Klone, 17 A1 (10) 16 I für IFN- β und 21 A8 (0,1) 11 IV für IFN- β (9x), durchliefen erfolgreich die anschließenden Mtx-Stufen 100 nM und 500 nM. Eine Behandlung mit 1 μ M Mtx brachte hingegen keine weitere Expressionssteigerung (s. Tab. 4).

Mtx-Konzentration [nM]	Expressionsstärke von 17 A1 (10) 16 I [IU/(10 ⁶ Z·24h)]	Expressionsstärke von 21 A8 (0,1) 11 IV [IU/(10 ⁶ Z·24h)]
vor Mtx-Behandlung	4,0·10 ⁴	3,0·10 ⁴
20	1,0·10 ⁵	1,0·10 ⁵
50	2,2·10 ⁵	2,0·10 ⁵
100	5,0·10 ⁵	5,0·10 ⁵
500	1,5·10 ⁶	1,2·10 ⁶
1000	1,5·10 ⁶	1,2·10 ⁶

Tab. 4: Expressionsstärken der zur IFN- β - und IFN- β (9x)-Produktion eingesetzten CHO-Klone nach den verschiedenen Mtx-Stufen

Die beiden Produktionsklone 17 A1 (10) 16 I und 21 A8 (0,1) 11 IV wurden noch einmal vereinzelt und auf unverändert hohe Expression hin kontrolliert. Diese lag für 17 A1 (10) 16 I bei $1,5 \cdot 10^6$ IU/(10⁶Z·24h) und für 21 A8 (0,1) 11 IV bei $1,2 \cdot 10^6$ IU/(10⁶Z·24h). Weiterhin wurden die Sequenzen der genomisch eingebauten Interferonexpressionsvektoren kontrolliert. Beide CHO-Klone hatten die Primärsequenz des IFN- β und des IFN- β (9x) unverändert in ihr Genom eingebaut. Diese beiden CHO-Klone wurden sukzessive an eine serumfreie Expression adaptiert und lieferten die in den Aufreinigungen verwendeten Kulturüberstände. Die IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-Expressionsraten blieben dabei über die beobachtete Zeit von zwei Monaten stabil. Die maximal zu erreichende Interferonkonzentration im Kulturüberstand betrug $1,2 \cdot 10^5$ IU/ml. Diesen Befund bestätigten auch frühere Expressionsversuche von IFN- β in CHO-Zellen (PD Dr. H. Hauser, GBF Braunschweig, persönliche Mitteilung). Offensichtlich trat bei einer Interferon- β -Konzentration von über 10^5 IU/ml eine Inhibierung der weiteren IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-Expression ein, ohne daß eine Beeinflussung des Zellwachstums oder der Zellvitalität beobachtet wurde. Durch einen Medienwechsel war es möglich, die Expressionsinhibierung zu beheben.

Insgesamt wurden 13,5 l serumfreier Zellkulturüberstand mit IFN- β und 18 l mit IFN- β (9x) gewonnen und zur Aufreinigung eingesetzt.

4.2. Aufreinigung von IFN- β und IFN- β (9x)

Um hochreines Protein zu erhalten, wurden 13,5 l IFN- β - bzw. 18 l IFN- β (9x)-haltiges CHO SFM II-Medium mit 0,5 mg/ml HSA eingesetzt. Die in Flachbettstapeln gewonnenen und sterilfiltrierten Zellkulturüberstände wurden auf 15 % Ethylenglykol (EG), 1 M NaCl, pH 7,2 gebracht. Als erster Aufreinigungsschritt schloß sich eine Affinitätschromatographie an einer Blue Sepharose FF-Säule an. Die Lagerung der Zellkulturüberstände konnte bei 4°C ohne Aktivitätsverlust erfolgen.

In der Literatur (Heine und Billiau, 1981) wird als erste Aufreinigungsstufe eine sehr selektive, hydrophobe Bindung des beta-Interferons an „controlled-pore glass“ (CPG) bei pH 7,0 vorgeschlagen. Die Elution erfolgt hier bei pH 3,0. In Vorversuchen konnte jedoch gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu IFN- β , IFN- β (9x) nicht an CPG band.

4.2.1. Blue Sepharose FF-Affinitätschromatographie

Nach dem Proteinauftrag wurde die Blue Sepharose FF-Säule mit 3–5 Säulenvolumina (V_0) Auftragspuffer gespült. Der anschließende Waschschrift mit drei V_0 30 % EG, 1 M NaCl, 0,02 M Na-P., pH 7,2 wurde nur bei IFN- β durchgeführt, da etwa $\frac{1}{3}$ des gebundenen IFN- β (9x) bereits bei einer Konzentration von 30 % EG eluierten. Die Elution erfolgte mit 60 % EG, 1 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,2 bei umgekehrter Flußrichtung und einer Flußrate von 0,5 ml/min.

Da sich die Elutionsprofile nicht unterschieden, ist in Abb. 4 exemplarisch das des IFN- β gezeigt.

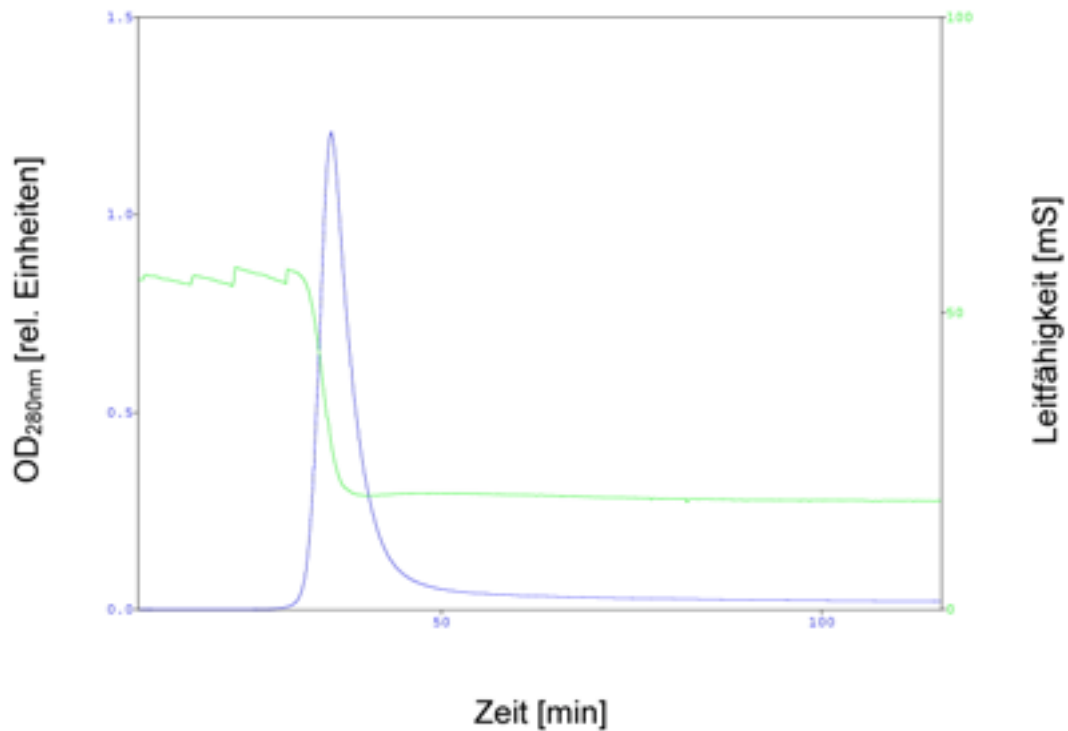


Abb. 4: Blue Sepharose FF-Säule: Elutionsprofil von IFN- β bzw. IFN- β (9x)

Die Ausbeute betrug etwa 85 % der eingesetzten Interferonmenge. Das erhaltene Eluat wurde auf 30 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0 gebracht und zu einer weiteren Affinitätschromatographie an einer Chelating Sepharose FF-Säule verwendet.

Die Reinheit des gewonnenen Proteins nach der Blue Sepharose FF-Chromatographie wurde gelelektrophoretisch und mittels Western-Analyse, die antivirale Aktivität mit Hilfe des AVA bestimmt (s. 3.2.3.3.).

4.2.2. Chelating Sepharose FF-Affinitätschromatographie

Verwendet wurde eine vorab mit Zn^{2+} -Ionen beladene Chelating Sepharose FF-Säule.

Die Proteinelution erfolgte bei IFN- β mit 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,2 durch einen pH-Sprung und bei IFN- $\beta(9x)$ mit 0,1 M Imidazol, 10 % EG, 0,5 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 7,0. Die Flußrate betrug jeweils 0,5 ml/min.

Abb. 5 zeigt das Elutionsprofil von IFN- β , Abb. 6 das von IFN- $\beta(9x)$.

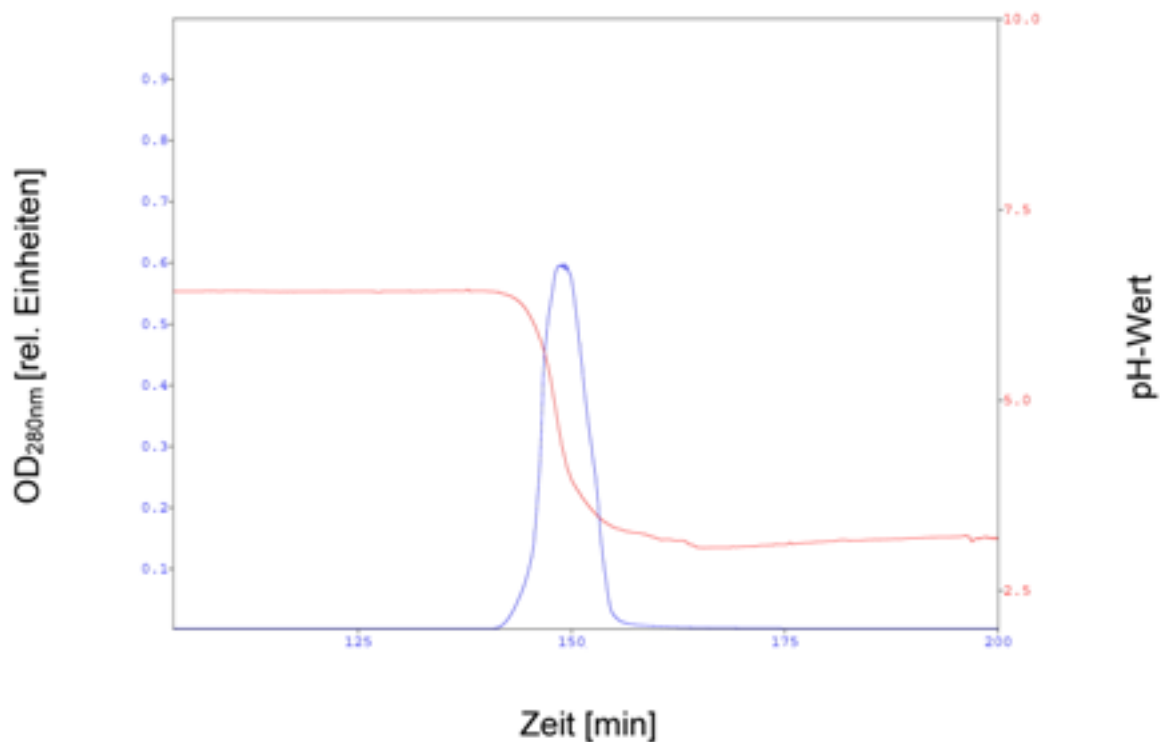


Abb. 5: Chelating Sepharose FF-Säule: Elutionsprofil von IFN- β

Die Ausbeute an IFN- β für diese Stufe lag bei rund 90 %. Die „peak“-Fraktionen wurden vereinigt und zur Abtrennung von Verunreinigungen mit deutlich höherem oder niedrigerem Molekulargewicht zur Gelfiltration eingesetzt.

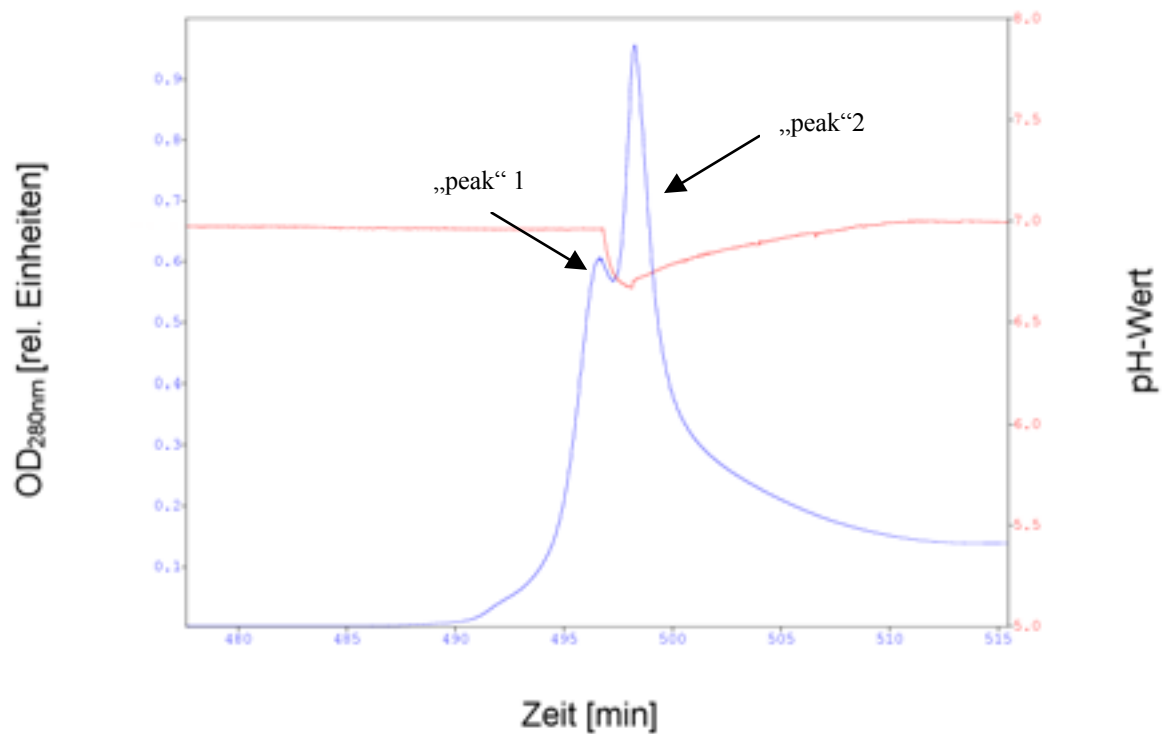


Abb. 6: Chelating Sepharose FF-Säule: Elutionsprofil von IFN-β(9x)

Das IFN-β(9x) konnte mit einer Ausbeute von 90 % unter beiden „peaks“ nachgewiesen werden. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und über eine Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die Extinktion von OD_{280nm} 0,15 nach den „peaks“ war bedingt durch die Eigenabsorption des Imidazols.

Die Reinheit der gewonnenen Proteine nach der Chelating Sepharose FF-Chromatographie wurde gelelektrophoretisch sowie mittels Western-Analyse, die antivirale Aktivität mit Hilfe des AVA bestimmt.

4.2.3. Gelfiltration von IFN- β und IFN- β (9x)

Als letzter Aufreinigungsschritt wurde eine Größenfraktionierung der Proteinlösung mittels einer Superdex 75- oder einer BioSil SEC 125 5-Säule gewählt. Das Injektionsvolumen betrug 100 μ l (BioSil SEC 125 5) bzw. 1 ml (Superdex 75) des Eluats der Chelating Sepharose FF-Säule. Als Laufpuffer dienten 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 4,2 für IFN- β und IFN- β (9x) oder 10 % EG, 0,15 M NaCl, 0,02 M Na-P, pH 6,8 für IFN- β (9x). Der Fluß betrug 0,5 ml/min (BioSil SEC 125 5) bzw. 1 ml/min (Superdex 75).

Zum Vergleich wurde parallel das IFN- β -Präparat Rebif® der Fa. Serono ebenfalls den Gelfiltrationen unterzogen. Bei pH 4,2 waren die Elutionsprofile von Rebif®, IFN- β und IFN- β (9x) auf beiden Säulen identisch (s. Abb. 7).

Die Ausbeuten lagen in allen drei Fällen bei 80 % der eingesetzten Interferonmenge.

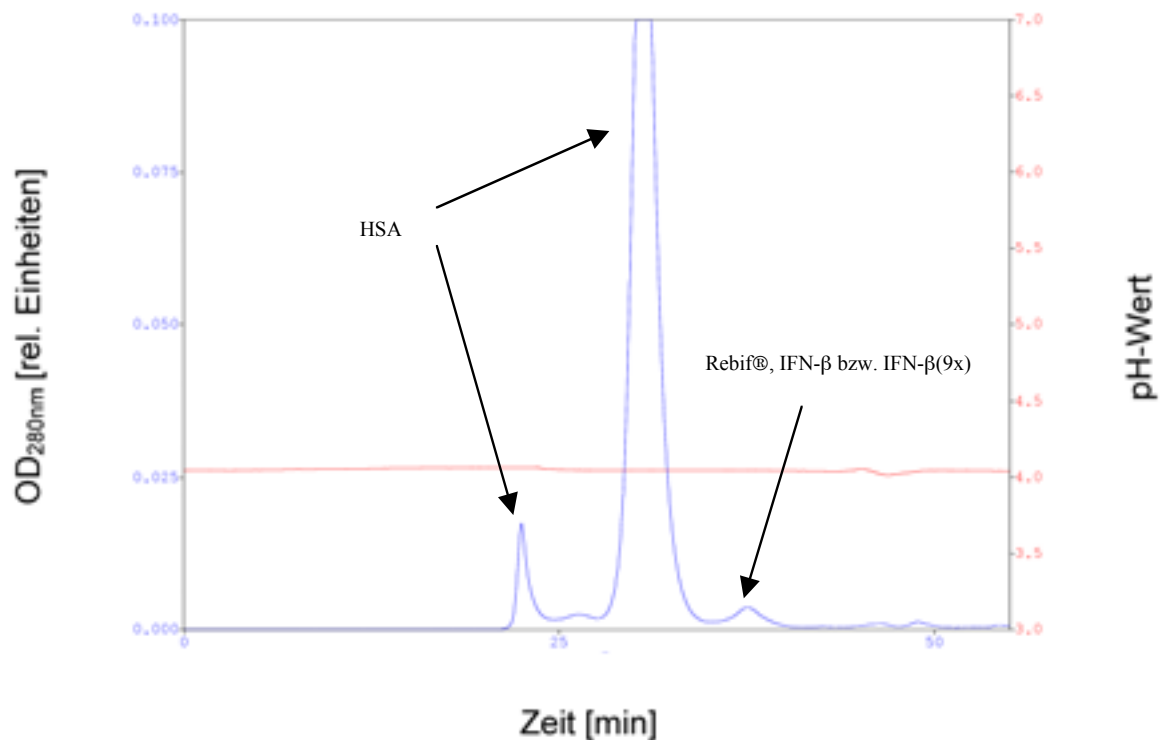


Abb. 7: BioSil SEC 125 5-Säule: Elutionsprofil von Rebif®, IFN- β und IFN- β (9x) bei pH 4,2

Die das IFN- β (9x) enthaltenden Fraktionen wurden in Gegenwart von HSA mittels einer Ultrafiltration eingengt und im Tierversuch (s. 4.3.4.) eingesetzt.

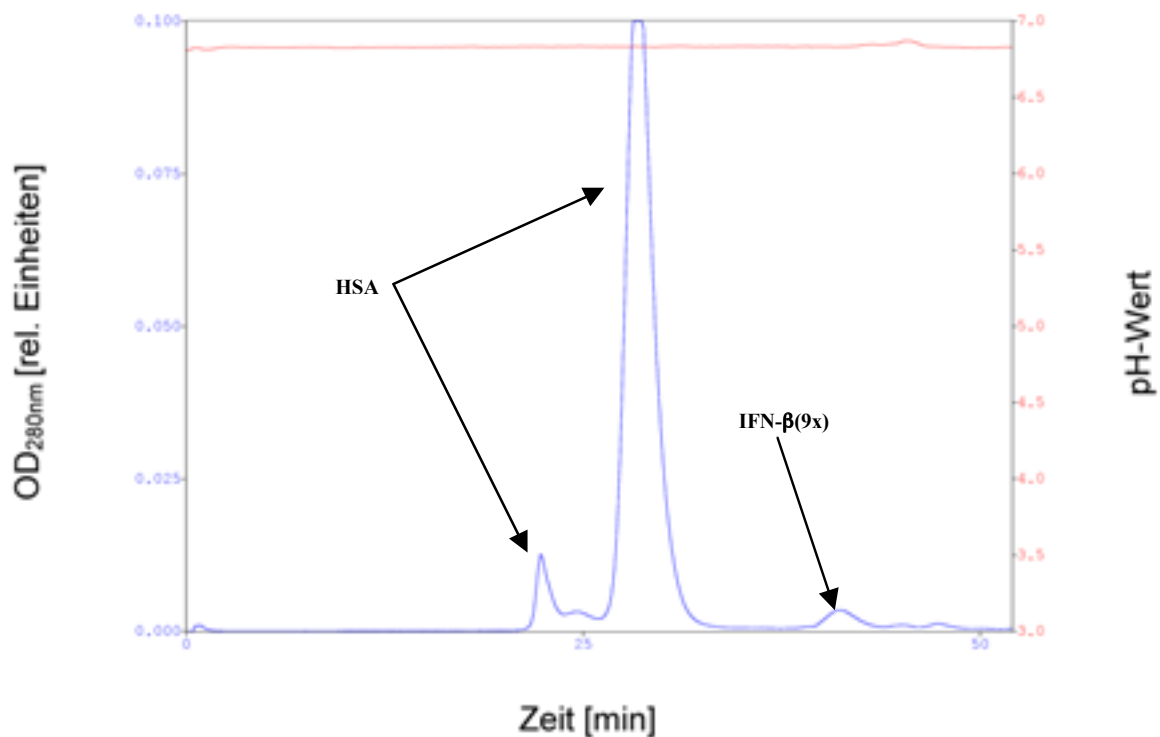


Abb. 8: BioSil SEC 125 5-Säule: Elutionsprofil IFN-β(9x) bei pH 6,8

Im Vergleich zu pH 4,2 ist die Trennleistung der Gelfiltrationssäule bei pH 6,8 im Bereich von 10–100 kDa erhöht (s. Abb. 8). Dieser Effekt konnte sowohl für IFN-β, IFN-β(9x), Rebif® als auch beim Gelfiltrationsstandard beobachtet werden.

Die Gelfiltrationsläufe von IFN-β und Rebif® bei pH 6,8 waren nicht erfolgreich, da die Ausbeute an IFN-β nur etwa 10 % der eingesetzten Aktivitätsmenge betrug, während diejenige von IFN-β(9x) unter gleichen Bedingungen bei 80 % lag.

Mit Hilfe des AVA wurde die antivirale Aktivität der gewonnenen Proteinfraktionen bestimmt, der Grad der Reinheit ging aus Gelelektrophorese und Western-Analyse hervor.

4.2.4. Reinheitskontrolle der IFN- β - und IFN- β (9x)-Fraktionen

Zur Dokumentation wurden die Aufreinigungsfractionen der beiden Proteine in der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blue- bzw. Silberfärbung und im enzymgekoppelten Immunoelktrotransfer-Blotverfahren (Westernblot) analysiert (s. Abb. 9 und Abb. 10).

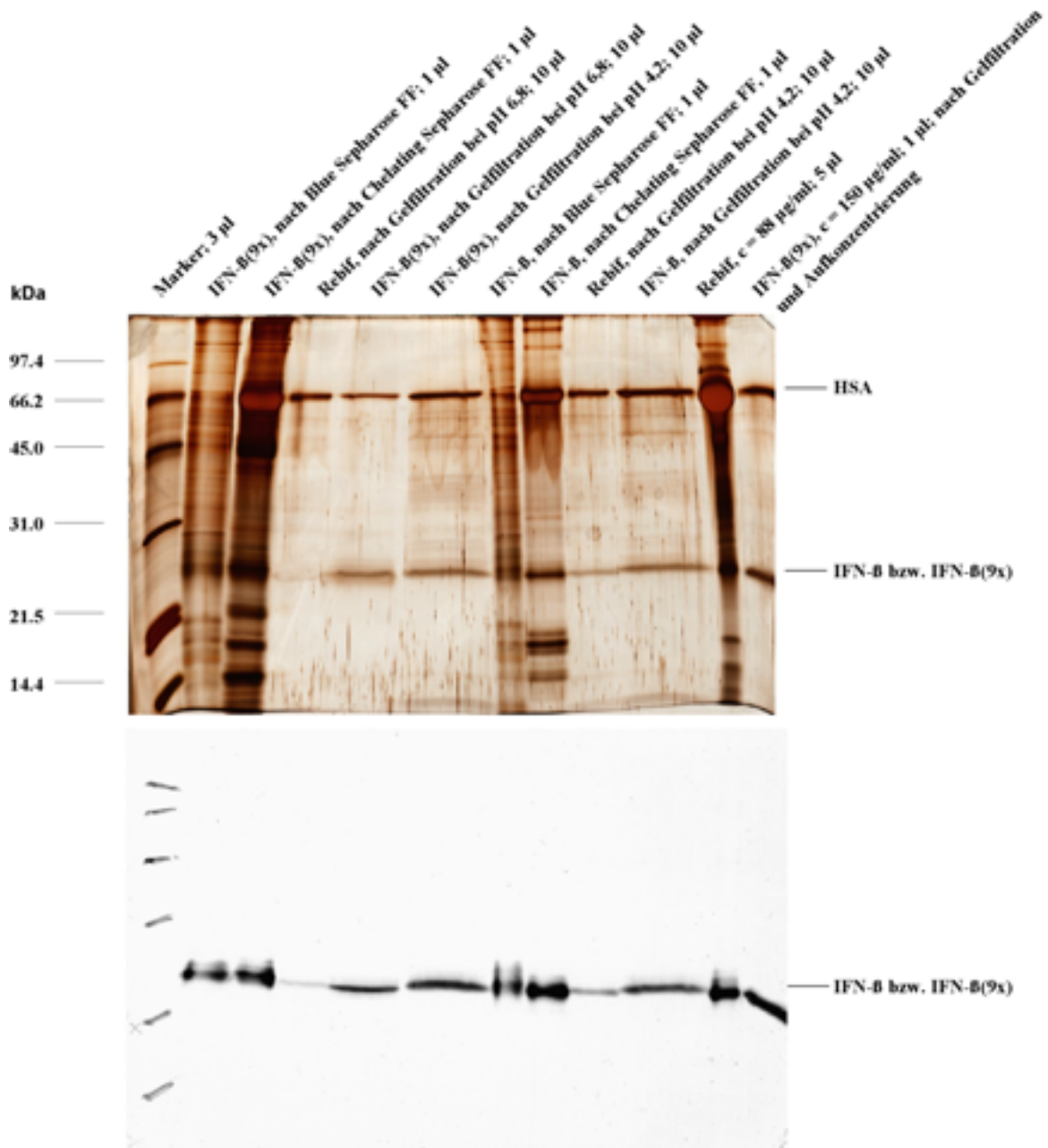


Abb. 9: Silbergefärbtes SDS-Gel und entsprechender Westernblot der verschiedenen Aufreinigungsschritte von IFN- β und IFN- β (9x). Deutlich sind im Silbergel bei die Banden des IFN- β bzw. IFN- β (9x) 23-24 kDa zu erkennen. Die hochmolekulare Bande bei 67 kDa ist die des, den Proben zur Stabilisierung zugesetzten, HSA.

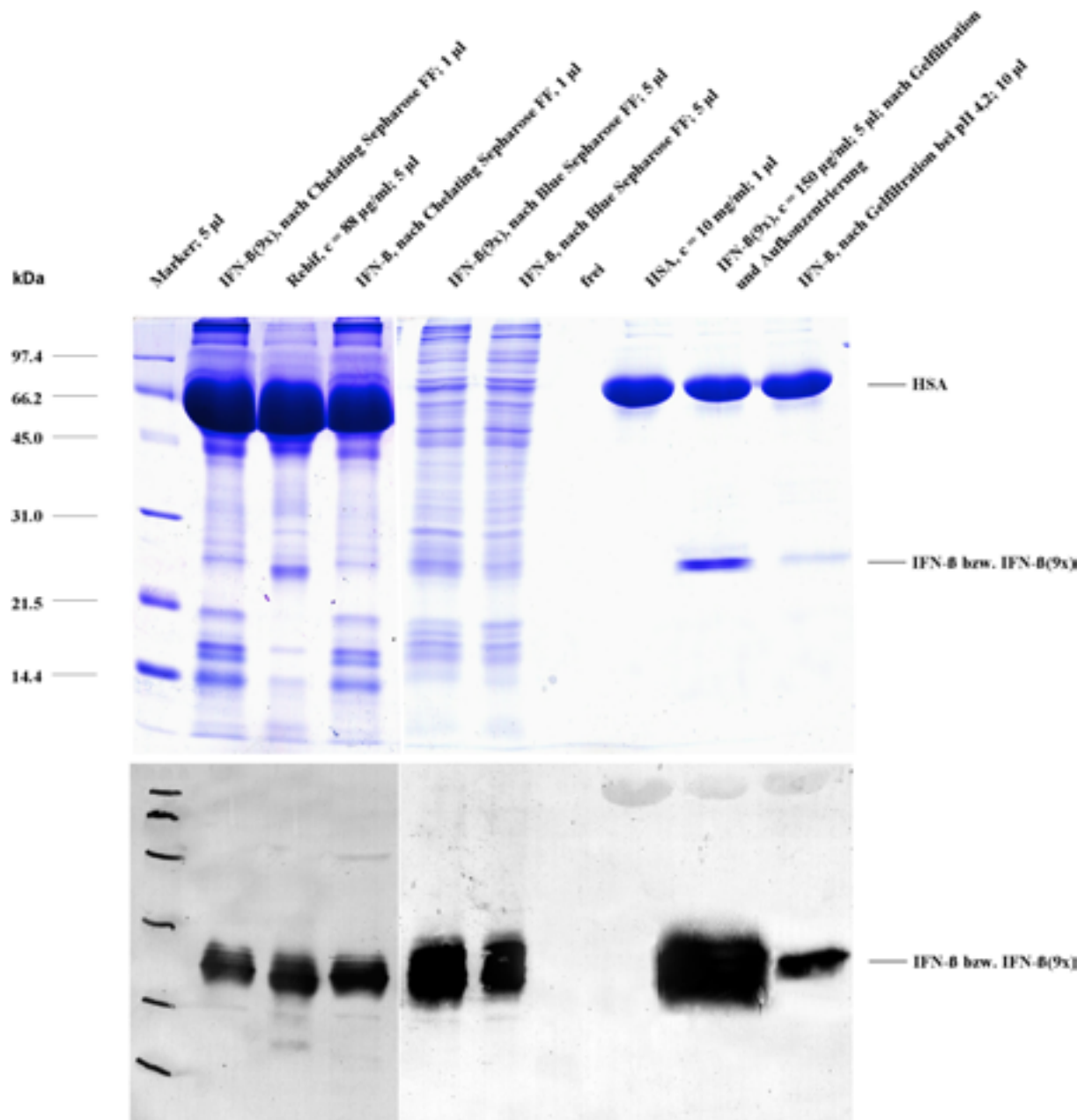


Abb. 10: Coomassie-Blue-gefärbtes SDS-Gel und entsprechender Westernblot der verschiedenen Aufreinigungsschritte von IFN- β und IFN- β (9x). Die verbreiterten Banden im Westernblot resultieren aus den verschiedenen Glykosylierungsstufen des IFN- β und IFN- β (9x).

Allen Fraktionen wurde zur Stabilisierung mindestens 0,5 mg/ml HSA zugesetzt. Deutlich zu erkennen sind die hohe Reinheit von IFN- β (9x) und IFN- β nach der Gelfiltration im Vergleich zu Rebif® und die geringe Ausbeute an IFN- β nach der Gelfiltration bei pH 6,8.

Die aufgereinigten Interferonlösungen waren bei 4°C mindestens zwei Monate stabil. In Aufkonzentrierungsversuchen zeigte sich jedoch, daß IFN- β -Präparationen mit einem Gehalt von mehr als 0,2-0,3 mg/ml IFN- β in 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 4,2 trotz Stabilisierung mit 10 mg/ml HSA nach 8–12 h zur Aggregation mit Niederschlagsbildung neigten. Für

IFN- β (9x) konnte dieser Effekt unter gleichen Bedingungen bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml nicht beobachtet werden.

4.2.5. Bilanzierung der Aufreinigung

IFN- β :

Chromatographiestufe	Konz. [IU/ml·10 ⁶]	Volumen [ml]	Menge IFN- β [IU·10 ⁸]	Ausbeute (gesamt) IFN- β [%]	Reinheit [%]
Zellkultur-überstand	0,1	13500	13,5	---	< 1 %
Blue Sepharose	55	21,6	11,9	88 (88)	> 5 %
Chel. Sepharose	80	13,6	10,9	92 (81)	> 25 %
Gelfiltration	7,8	114	8,9	81 (66)	> 95 %

IFN- β (9x):

Chromatographiestufe	Konz. [IU/ml·10 ⁶]	Volumen [ml]	Menge IFN- β (9x) [IU·10 ⁸]	Ausbeute (gesamt) IFN- β (9x) [%]	Reinheit [%]
Zellkultur-überstand	0,12	17600	21,1	---	< 1 %
Blue Sepharose	60	30,2	18,1	85 (85)	> 5 %
Chel. Sepharose	140	11,8	16,5	91 (78)	> 25 %
Gelfiltration	10,6	168	13,1	79 (62)	> 95 %

Tab. 5: Übersicht der Aufreinigung von IFN- β und IFN- β (9x) im Vergleich.

Insgesamt unterscheiden sich die Ausbeuten an IFN- β und IFN- β (9x) über alle Aufreinigungsschritte nicht wesentlich.

4.3. Charakterisierung von IFN- β und IFN- β (9x)

4.3.1. Spezifische Aktivität

Unter Verwendung des AVA wurden für IFN- β - und IFN- β (9x) die spezifischen antiviralen Aktivitäten ermittelt. Als Standard diente das IFN- β -Präparat Rebif® der Fa. Serono mit einer spezifischen Aktivität von $2,77 \cdot 10^8$ IU/mg. Zum weiteren Vergleich wurde das Präparat Avonex™ der Fa. Biogen eingesetzt. In der Literatur schwanken die Angaben der spezifischen Aktivitäten von natürlichem bzw. rekombinant gewonnenem, glykosyliertem Interferon-beta zwischen $2,4 \cdot 10^8$ und $3,4 \cdot 10^8$ IU/mg, je nach verwendetem Standard und Meßsystem (Obert, 2000, S. 210-11).

Für IFN- β als auch für IFN- β (9x) konnten spezifische antivirale Aktivitäten von $2,7 \cdot 10^8 \pm 0,3$ IU/mg gemessen werden, welche also nicht von der spezifischen Aktivität des Rebif® abwichen.

4.3.2. „reversed phase“ HPLC

Zum chemischen Nachweis einer im Vergleich zu IFN- β verminderten Oberflächenhydrophobizität des IFN- β (9x) wurde eine „reversed phase“ Chromatographie an einer Source 5RPC-Säule durchgeführt. Eingesetzt wurden eine IFN- β (9x)-Probe und zum Vergleich das Präparat Rebif® in äquimolaren Mengen. Die Präparationen enthielten 10 mg/ml (Rebif®) bzw. 2,5 mg/ml (IFN- β (9x)) HSA zur Stabilisierung.

Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 28 % auf 56 % Acetonitril in 0,05 % TFA bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die „peaks“ wurden bei 214 nm detektiert (s. Abb. 11).

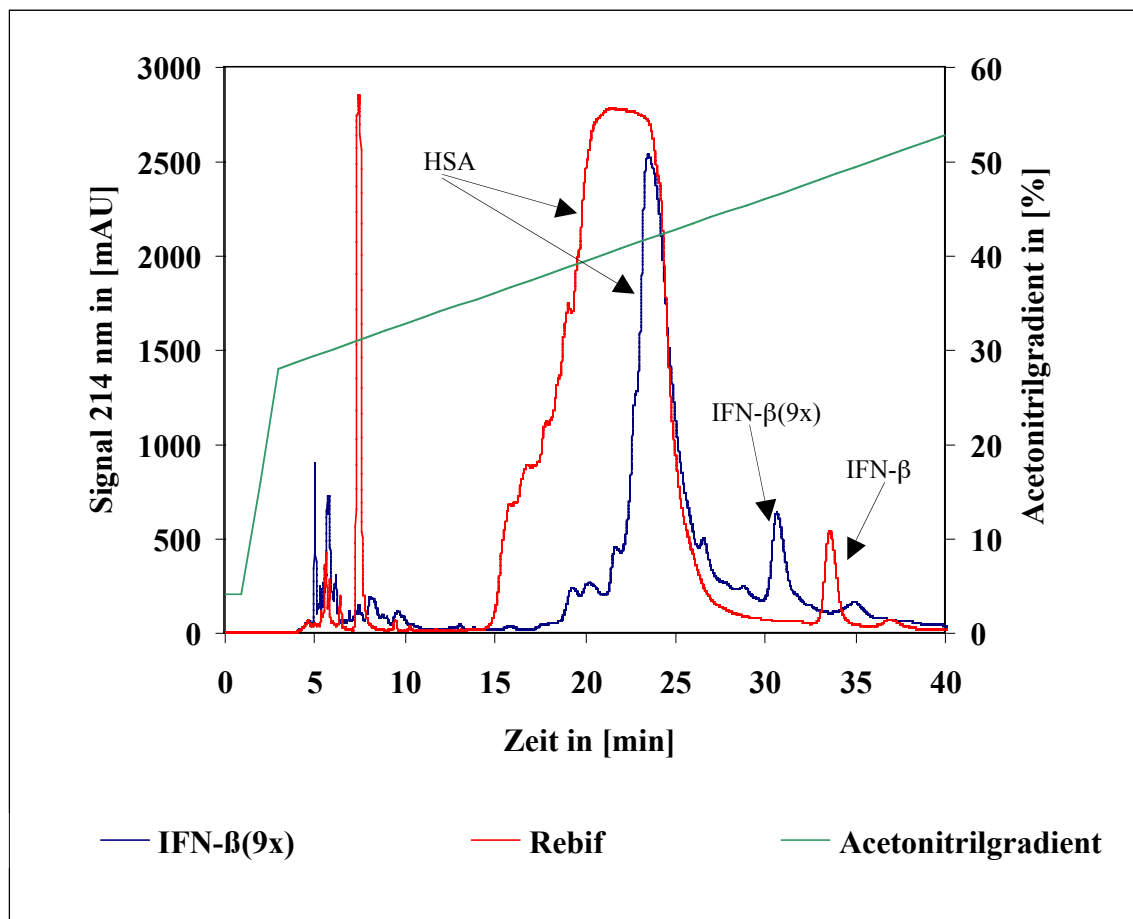


Abb. 11: „reversed phase“ Chromatogramm von Rebif® und IFN- β (9x). Bei den in beiden Proben zwischen fünf und 10 min auftretenden „peaks“ handelt es sich um den HSA-Lösungen zugesetzte Stabilisatoren (s. 3.1.2.). Die Verschiebung des HSA-„peaks“ bei Rebif® resultiert aus der hohen HSA-Konzentration, hat aber keinen Einfluß auf den Elutionszeitpunkt des IFN- β .

IFN- β (9x) eluierte nach 30,7 min bei 46,5 % Acetonitril, das IFN- β aus Rebif® hingegen erst nach 33,6 min bei 48,5 % Acetonitril. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die im Vergleich schwächeren hydrophoben Wechselwirkungen des IFN- β (9x) mit der Säulenmatrix und ist ein Indiz für dessen erwartete, veränderte Oberflächenstruktur.

4.3.3. Massenspektrometrische Analyse

Die Molekularmassen von IFN- β und IFN- β (9x) wurden auf einem Massenspektrometer (MS) des Typs Quadrupol-TOF QStar bestimmt (s. Abb. 12 und 13). Geringe Mengen von HSA in den Präparationen störten die Messung nicht.

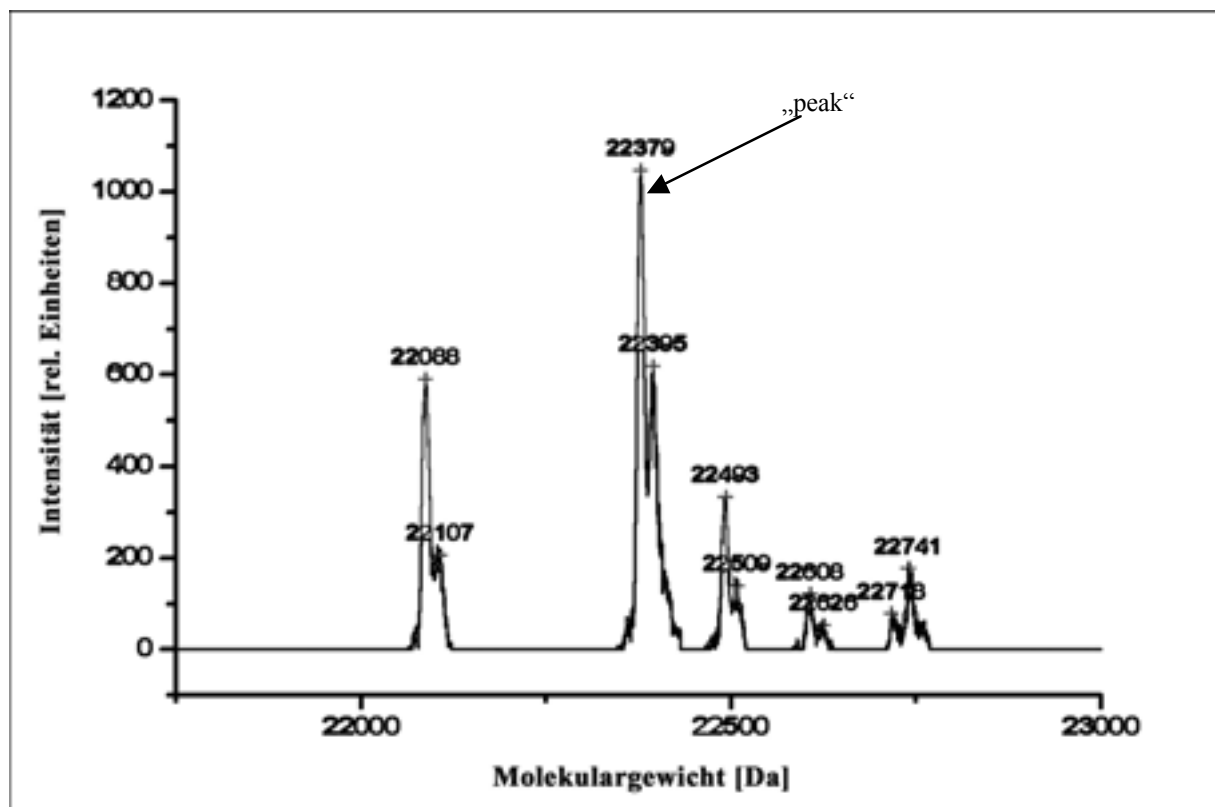


Abb. 12: Massenspektrum des IFN- β aus Rebif®

Die erwartete Masse für IFN- β liegt bei 22376 Da, gemessen wurden 22379 Da. Diese Abweichung liegt im Bereich der Messgenauigkeit von ± 5 Da. Bei den weiteren „peaks“ handelt es sich um die unterschiedlichen Glykosylierungsstufen des IFN- β (s. Analyse des IFN- β (9x)).

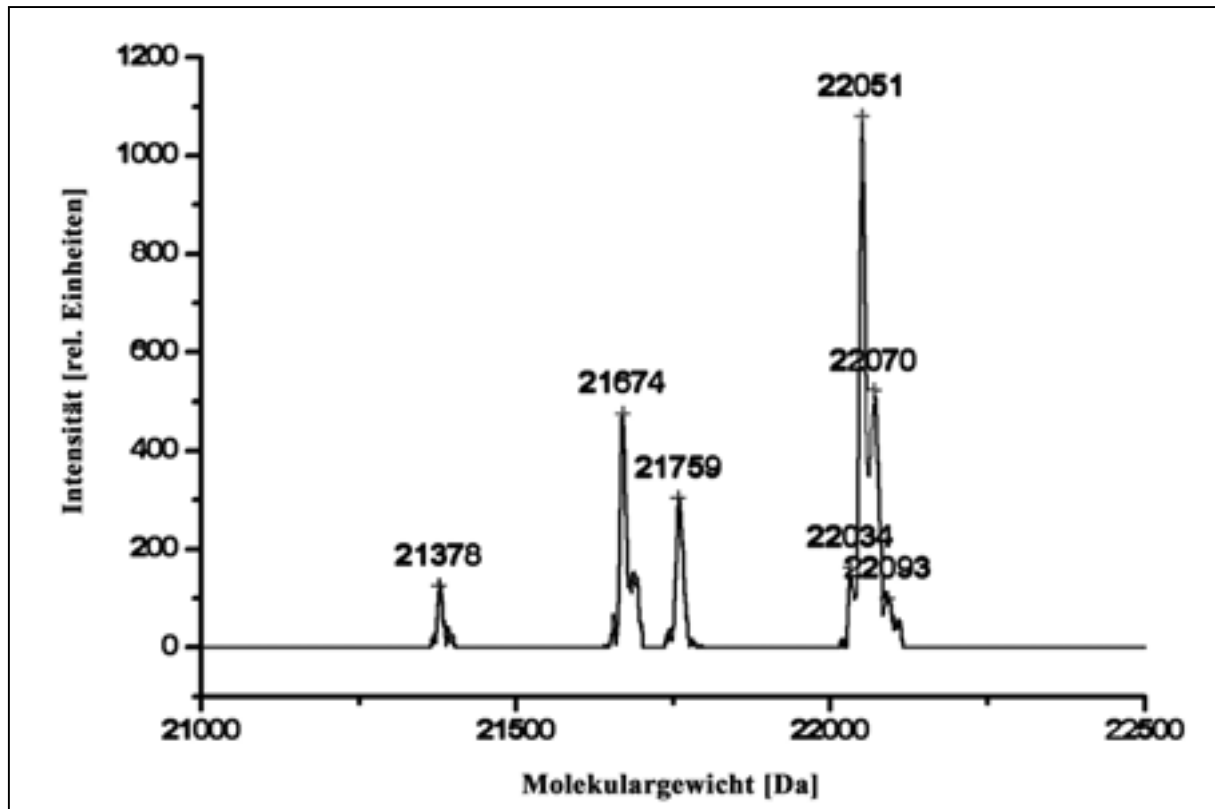


Abb. 13: Massenspektrum des IFN- β (9x)

Die erwartete Masse des IFN- β (9x) liegt bei 22052 Da, gemessen wurden 22051 Da („peak“ A). Bei den weiteren „peaks“ handelt es sich, wie beim IFN- β , um verschiedene Glykosylierungsstufen des Moleküls bzw. massenspektrometrische Fragmente (s. Tab. 6).

„peak“	erwartete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]	Glykanstruktur
A	21375	21378	P ¹ .(1-163 As.) + 1Biant ² .F ³ . + 1SS ⁴ .
B	21666	21674	P.(1-163 As.) + 1Biant.F. + 2SS.
C	21758	21759	P. + 1Biant.F. + 1SS.
D	22049	22051	P. + 1Biant.F. + 2SS.

IFN- β (9x); ²biantennäre Oligosaccharidstruktur; ³Fucose; ⁴Sialinsäurerest

Tab. 6: Zuordnung der verschiedenen im MS des IFN- β (9x) detektierten Massenfragmente

Die Oligosaccharidstrukturen des IFN- β (9x) bestehen hauptsächlich aus biantennären Zuckern, welche über einen oder zwei Sialinsäurereste mit dem Protein verbunden sind. Sie

gleichen damit denen des natürlichen und denen des industriell in CHO-Zellen hergestellten IFN- β , beispielsweise Rebif® oder Avonex™. Die Übersicht der zu erwartenden Glykanstrukturen wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. D. Kenett (Fa. Serono) übermittelt.

4.3.4. Pharmakologische Tierversuche

Zur Untersuchung des pharmakokinetischen Verhaltens des IFN- β (9x) im Vergleich zu einem kommerziellen IFN- β -Präparat (Rebif® der Fa. Serono) wurden zwei Tierversuche durchgeführt. Der erste mit 10 Kaninchen diente der Dosisfindung und der Abschätzung des pharmakokinetischen Verhaltens von IFN- β und IFN- β (9x), der zweite mit acht Kaninchen der Bestätigung der Meßwerte. Die verwendeten IFN- β (9x)-Präparationen wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf die Pufferbedingungen des Rebif® (0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 4,2, 10 mg/ml HSA) eingestellt. Die Endotoxinkonzentrationen betragen beim ersten Tierversuch 4 ng/ml und beim zweiten Tierversuch unter 0,01 ng/ml in der IFN- β (9x)-Präparation. Beim IFN- β -Präparat Rebif wurden beide Male unter 0,01 ng/ml Endotoxin gemessen.

Jedem Tier wurde nach 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 24 und 48 Stunden Blut abgenommen, um die Interferonaktivitäten bzw. -konzentrationen im Plasma mittels AVA und ELISA zu bestimmen.

4.3.4.1. Tierversuch I

Je sechs Kaninchen wurden subkutan $2 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. $1 \cdot 10^7$ IU IFN- β (9x) pro Tier injiziert. Zur Auswertung wurden die Einzelmessungen zusammengefaßt und die Standardabweichung berechnet (s. Abb. 14 und Abb. 15).

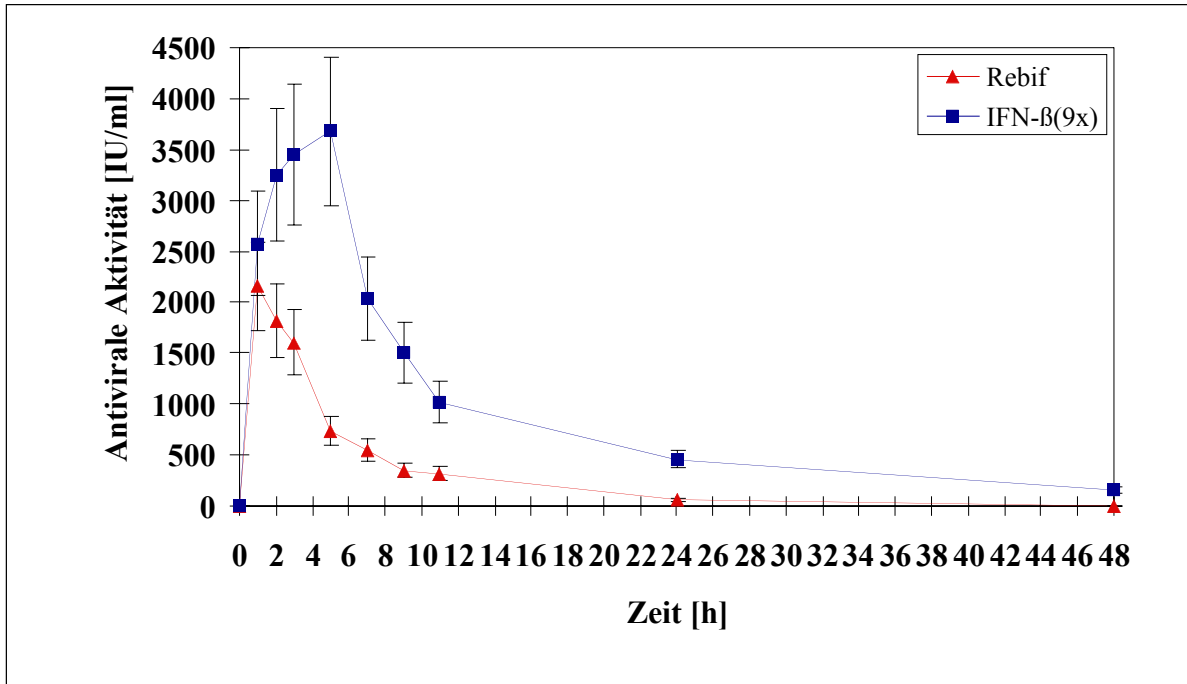


Abb. 14: Antivirale Aktivitäten im Plasma nach subkutaner Injektion von $2 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. $1 \cdot 10^7$ IU IFN- β (9x)

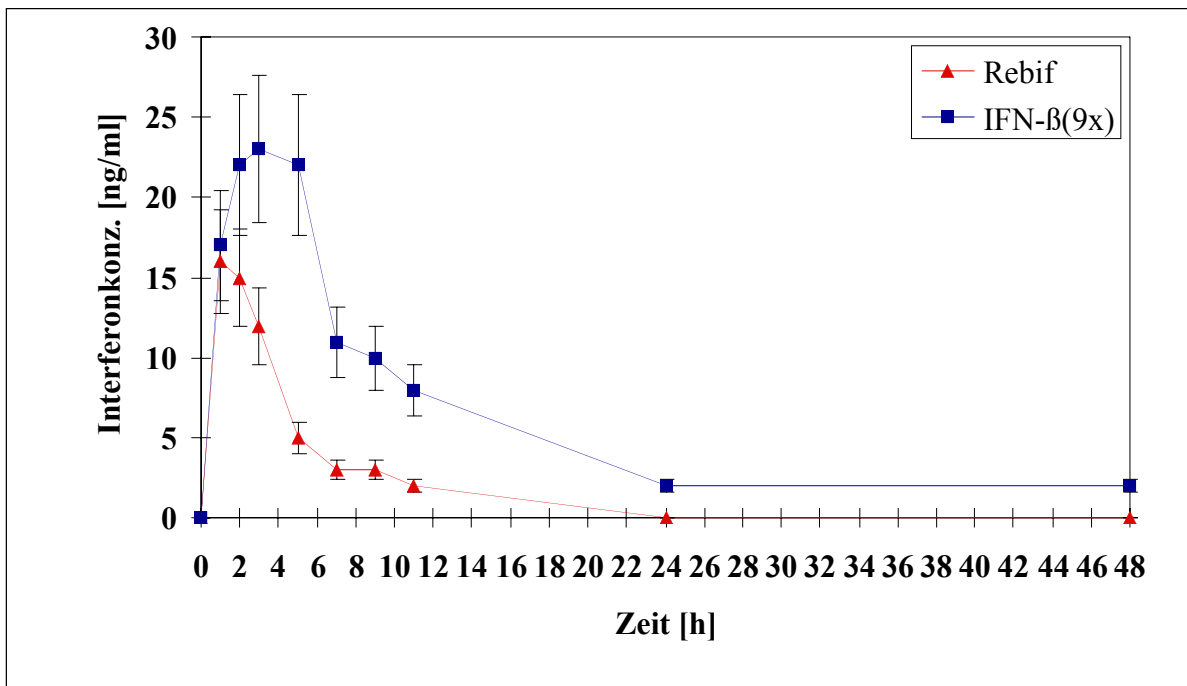


Abb. 15: ELISA-Bestimmung der Interferonkonzentrationen im Plasma nach subkutaner Injektion von $2 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. $1 \cdot 10^7$ IU IFN- β (9x)

4.3.4.2. Tierversuch II

Insgesamt vier Kaninchen wurden subkutan $1 \cdot 10^7$ IU Rebif® injiziert, vier weiteren $1 \cdot 10^7$ IU IFN- β (9x). Die AVA- und ELISA-Daten sind in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt. Abb. 18 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer AVA-Platte.

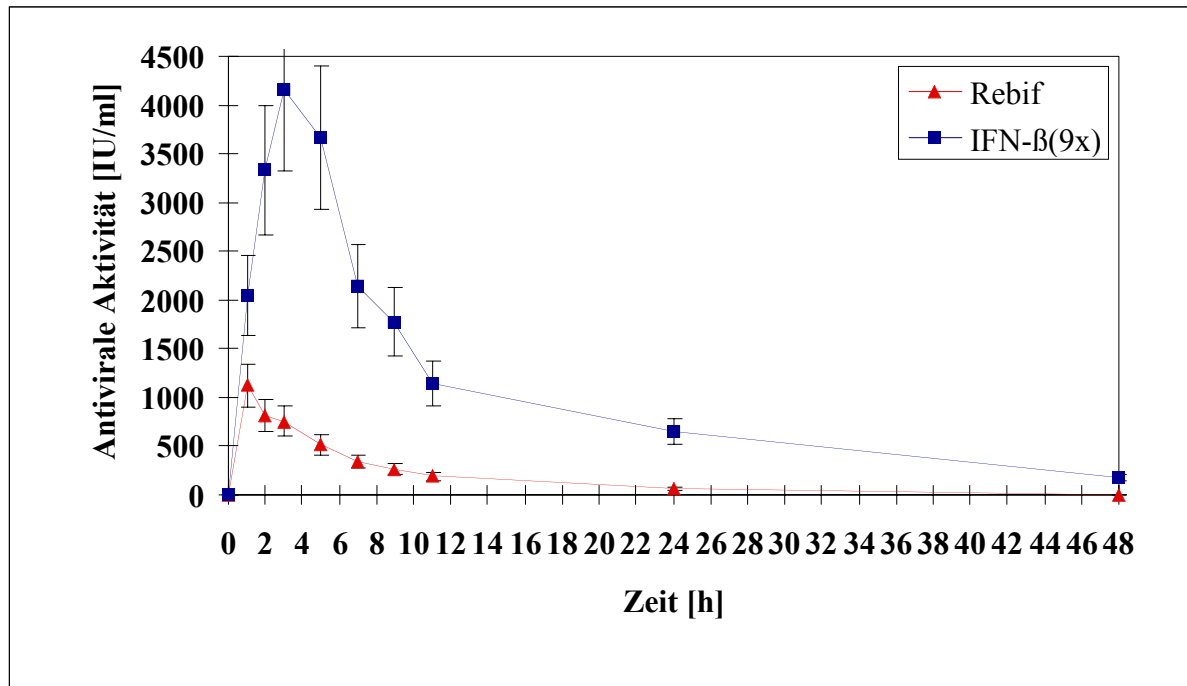


Abb. 16: Antivirale Aktivitäten im Plasma nach subkutaner Injektion von $1 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. IFN- β (9x)

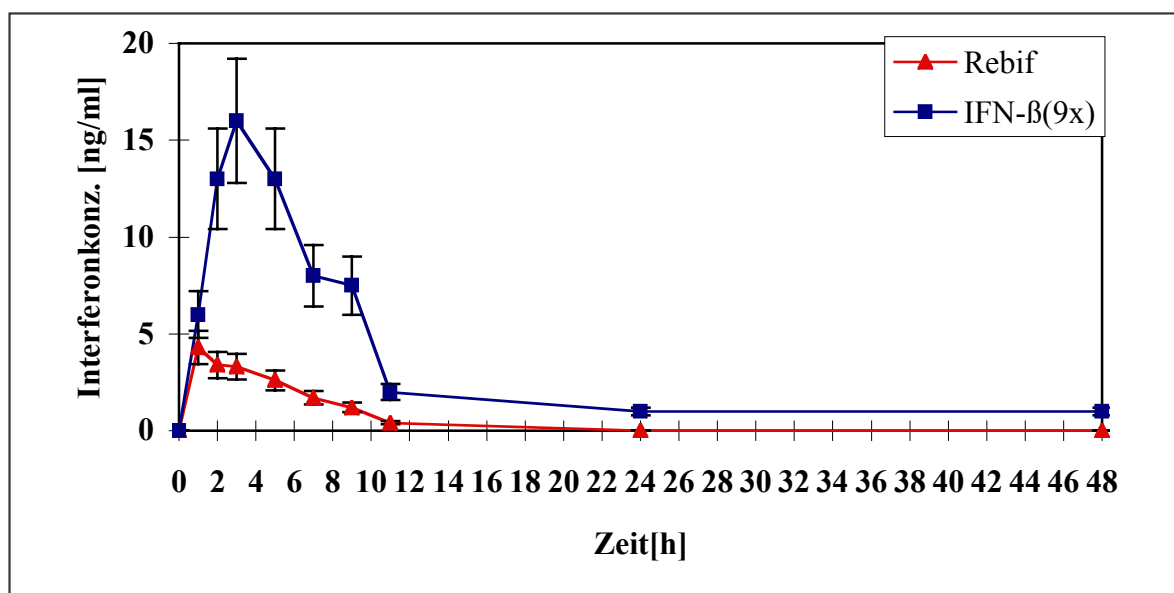


Abb. 17: ELISA-Bestimmung der Interferonkonzentrationen im Plasma nach subkutaner Injektion von $1 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. IFN- β (9x)

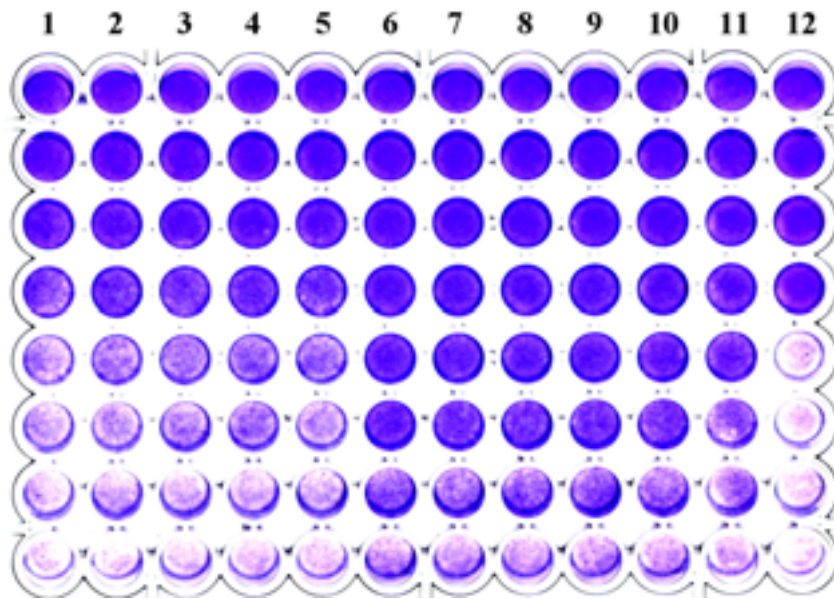


Abb. 18: Exemplarische Darstellung eines AVA, zur Ermittlung der antiviralen Aktivitäten im Plasma fünf Stunden nach subkutaner Injektion von Rebif® bzw. IFN-β(9x). Spalte 1–5: Tier 1 bis 5 (Rebif™); Spalte 6–10: Tier 6 bis 10 (IFN-β(9x)); Spalte 11: IFN-β-Standard mit $c = 50$ IU/ml; Spalte 12: Positiv- und Negativkontrolle

Eine Übersicht der gemittelten AVA- und ELISA-Meßwerte findet sich unter 7.1.

Beide Meßmethoden, AVA und ELISA, zeigten, daß IFN-β(9x) zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Serumspiegel als das IFN-β aus Rebif® erreichte. Die Schwankungsbreite der Meß-ergebnisse von Kaninchen zu Kaninchen fiel mit 25 % gering aus. IFN-β hatte seine maximalen Plasmakonzentrationen direkt nach der Injektion, danach fielen sie rasch ab und 48 h nach der Injektion waren nur noch kaum nachweisbare Mengen vorhanden. Bei IFN-β(9x) wurden die maximalen Konzentrationen erst nach drei bis fünf Stunden erreicht. Sie lagen bei gleicher Injektionsmenge fünf- bis siebenmal höher als die des IFN-β, wie sich im AVA deutlich nachweisen ließ (s. Abb. 8c). Ab fünf Stunden nach der Applikation sanken die IFN-β(9x)-Konzentrationen, allerdings mit einer wesentlich geringeren Rate als bei IFN-β. So wurden im Vergleich zu IFN-β nach 24 bzw. 48 Stunden 10–30 Mal höhere Plasmakonzentrationen an IFN-β(9x) gemessen, dessen Halbwertszeit gleichzeitig deutlich über der des IFN-β liegt.

Ausgehend vom zweiten Tierversuch, korrelierten die im ELISA ermittelten Interferon-beta-Konzentrationen sehr gut mit den im AVA bestimmten Werten, so daß beide Proteine nach der Injektion keinen Verlust an spezifischer Aktivität zeigten und folglich keine Inaktivierung aufgetreten war.

Die pharmakologischen Parameter AUC und CL von Rebif® und IFN- β (9x) in beiden Tierversuchen wurden mit Hilfe der AVA-Daten ermittelt und sahen wie folgt aus (s. Tab. 7 und Tab. 8):

	Rebif®	IFN-β(9x)
AUC [IU/ml·h] · 10 ⁴	1,3 +/- 0,2	4,4 +/- 0,4
CL [l/h]	1,5 +/- 0,3	0,23 +/- 0,02

Tab. 7: Die pharmakologischen Parameter AUC und CL für Rebif® und IFN- β (9x) im ersten Tierversuch

	Rebif®	IFN-β(9x)
AUC [IU/ml·h] · 10 ⁴	0,8 +/- 0,1	5,0 +/- 0,5
CL [l/h]	1,2 +/- 0,2	0,20 +/- 0,02

Tab. 8: Die pharmakologischen Parameter AUC und CL für Rebif® und IFN- β (9x) im zweiten Tierversuch

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit ist es nach gezieltem Proteindesign erfolgreich gelungen, eine weniger hydrophobe Variante des humanen Interferon-beta mit verbesserten biochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften in CHO-Zellen konstitutiv zu exprimieren, aufzureinigen und zu charakterisieren. Zum Vergleich wurden alle Arbeiten ebenfalls mit dem humanen Wildtypprotein (IFN- β) durchgeführt. Die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse ist dementsprechend in die Abschnitte Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des IFN- β und der Variante IFN- β (9x) unterteilt.

5.1. Expression von IFN- β und IFN- β (9x) in CHO-Zellen

Die Wahl von Dihydrofolatreduktasegen-defizienten CHO-Zellen als Expressionssystem geschah zum einen aufgrund der übereinstimmenden Glykosylierungsmuster von natürlichem IFN- β aus humanen Fibroblastenzellen und rekombinantem aus CHO-Zellen und zum anderen aufgrund der weiten Nutzung von CHO-Zellen in der industriellen Produktion rekombinant hergestellter, glykosylierter Proteine, insbesondere der des IFN- β (Obert, 2000, S. 38). Von den nach den Transfektionen mit den Expressions- und Selektionsvektoren erhaltenen CHO-Klonen zeigten mehr als 80 % eine stabile Interferon-beta-Produktion. Insgesamt wurden die Expressionsraten von circa 25000 CHO-Klonen bestimmt. Bei einem Großteil der Klone (> 95 %) lagen diese allerdings bei unter 5000 IU/(10⁶Z·24h) an sezerniertem IFN- β bzw. IFN- β (9x). Etwa 1 % der mit den Vektoren pCI-ifn β oder pCI-ifn β (9x) transfizierten Klone besaß Expressionsstärken von mehr als 5000 IU/(10⁶Z·24h) und bei 0,1 % konnten mehr als 20000 IU/(10⁶Z·24h) gemessen werden. Diese hyperbelartige Verteilung der Anzahl von Niedrig- zu Hochexprimierenden findet sich häufig (Wirth *et al.*, 1988). Sie ist zum einen durch die Anzahl der in das Genom eingebauten Vektorsequenzen zum anderen durch den Ort dieses Einbaus bedingt (Hauser und Wagner, 1997. S. 122 ff.).

Bei den CHO-Klonen, welche mit den bicistronischen Plasmiden pCI-ifn β .gfp oder pCI-ifn β (9x).gfp transfiziert worden waren, lagen die Expressionsraten deutlich niedriger. So produzierten nur etwa 0,1 % über 5000 IU/(10⁶Z·24h) und keiner der Klone sezernierte mehr als 20000 IU/(10⁶Z·24h). Gründe könnten in einer kürzeren Halbwertszeit der entsprechenden mRNAs oder einer sterischen Behinderung des Transkriptions- bzw. des Translations-

komplexes, verursacht durch die anhängende GFP-Sequenz, zu suchen sein (Hauser und Wagner, 1997). Die Verwendung des intrazellulär bleibenden GFP als optischer Selektionsmarker zur Unterscheidung hoch- und niedrigexprimierender CHO-Klone mißlang, da keine Korrelation zwischen Interferonproduktion und Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Bei der Verwendung IRES-Elemente-enthaltender, bicistronischer Expressionvektoren wird je nach Konstrukt eine um den Faktor 5-10 schwächere Expression des zweiten Cistrons beobachtet (persönliche Mitteilung PD Dr. Hauser, GBF, Braunschweig). Aufgrund der resultierenden, geringen GFP-Expression war folglich eine reproduzierbare optische Beurteilung der Fluoreszenzstärke im Fluoreszenzmikroskop nicht möglich. Auch die genauere Analyse und Trennung der neben Interferon-beta, GFP-koproduzierenden Zellen mittels eines FACS erschien mit Blick auf die niedrigen Interferonexpressionsraten nicht sinnvoll.

Die zehn am stärksten IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-exprimierenden CHO-Klonen durchliefen nachfolgend sukzessive vier Genamplifikationszyklen mit 20, 50, 100 und 500 nM Methotrexat (Mtx). Nach jedem Zyklus wurden die neuen Klone auf ihre Interferon-beta-Expression hin getestet und die stärksten Expressierer der nächsten Selektionsstufe unterzogen. Die so erhaltenen Klone besaßen Expressionsraten zwischen $0,9 \cdot 10^6$ und $1,5 \cdot 10^6$ IU/(10^6 Z \cdot 24h) und lagen damit um den Faktor zwei bis drei über denen der in der industriellen Produktion von IFN- β eingesetzten CHO-Klone (persönliche Mitteilung PD DR. Hauser, GBF, Braunschweig). Dieser Umstand ist nicht zuletzt den Mtx-Amplifikationszyklen und der Verwendung des CMV-Promotorsystems zu verdanken, welches höhere Expressionsraten als das des bisher verwendeten SV40-Promotors ermöglicht (Brightwell *et al.*, 1997). Ein Unterschied in den Expressionsstärken zwischen IFN- β - und IFN- β (9x)-produzierenden Zellen war nicht zu beobachten. Erklärungen wären möglich durch Untersuchungen über Anzahl der Genkopien, Unterschiede in der mRNA- oder Proteinstabilität sowie der Toxizität. Eine weitere Expressionssteigerung durch Behandlung mit 1 mM Mtx konnte nicht erreicht werden. Vielmehr zeigten einige Klone nach der Behandlung mit 1 mM Mtx ähnlich hohe oder sogar geringere Expressionsraten als nach der 500 nM Mtx-Stufe. Die Erklärung dieses Phänomens liegt in dem Mechanismus der Genamplifikation, welche unter Mtx-Behandlung beobachtet wird. Die in CHO-Zellen mittels der Calciumphosphatmethode stabil kotransfizierten Vektoren werden häufig in direkter Nachbarschaft zueinander im Genom der Zellen eingebaut. Die Mtx-Behandlung nun führt zu einer Vervielfachung der das *dhfr*-Gen-enthaltenden und dazu benachbarter Chromosomenbereiche, die dann sog. HSRs („homogeneously staining regions“) im Genom bilden. Diese Bereiche enthalten Hunderte bis Tausende Kopien der zu Beginn transfizierten Vektorsequenzen (Hauser und Wagner, 1997, S. 95-97). Als

Folge kommt es zu einer Steigerung der Expression des Zielproteins (hier Interferon-beta). Die Amplifikationen treten bei jeder Mtx-Stufe erneut auf und nur diejenigen Klone überleben, welche in ausreichender Menge Dihydrofolatreduktase produzieren. Setzt man bei Mtx-Konzentrationen bis 100 nM den Mtx-Selektionsdruck ab, so bleiben in den meisten Fällen die HSRs stabil im Genom integriert und man beobachtet keine Abnahme der Produktivität. Bei Mtx-Konzentrationen von 100-500 nM beginnen sich auch instabile HSRs zu bilden, welche bei Wegfall des Selektionsdruckes jedoch wieder verschwinden und daraufhin eine Expressionsverringerung die Folge ist (Hauser und Wagner, 1997, S. 109 ff.). Ab welchem Mtx-Gehalt dieser Effekt auftritt ist nicht vorhersagbar und muß empirisch ermittelt werden.

Zwei der solcherart selektierten Klone, 17 A1 (10) 16 I für IFN- β und 21 A8 (0,1) 11 IV für IFN- β (9x), wurden an eine serumfreie Expression adaptiert. Ihre Expressionsraten lagen bei $1,5 \cdot 10^6$ IU/(10^6 Z·24h) für 17 A1 (10) 16 I bzw. $1,2 \cdot 10^6$ IU/(10^6 Z·24h) für 21 A8 (0,1) 11 IV und blieben für die Dauer der zweimonatigen Kultivierung stabil. Es ist somit davon auszugehen, daß der Genotyp und die Expressionsraten dieser beiden Klone für mehr als 30 Generationen konstant bleiben. Der Vorteil einer serumfreien Proteinproduktion liegt in einem deutlich geringeren Fremdproteingehalt der gewonnenen Zellkulturüberstände und damit in einer Vereinfachung der Aufreinigung. Darüber hinaus birgt der Einsatz von Serum die Gefahr der Kontamination des Präparates mit pathogenen Stoffen (z. B. BSE, Viren) und ist bei einer industriellen Produktion nicht erwünscht.

Des weiteren konnte mittels Massenspektrometrie und Sequenzierung der im CHO-Zellgenom integrierten IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-Sequenzen nachgewiesen werden, daß die Primärsequenzen des IFN- β und des IFN- β (9x) unverändert in das CHO-Zellgenom eingebaut und korrekt exprimiert wurden.

Interessanterweise betrug die in den Kulturüberständen maximal zu erreichende IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-Konzentration $1,2 \cdot 10^5$ IU/ml, was etwa 0,2 % des Gesamtproteingehaltes entsprach. Offensichtlich trat bei Interferonkonzentrationen über 10^5 IU/ml eine Inhibierung der weiteren IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-Expression ein, welche allerdings durch einen Medienwechsel behoben werden konnte. Eine gleichzeitige Beeinflussung des Zellwachstums oder der -vitalität war nicht zu beobachten. Dieser Befund wird durch andere Laboratorien bei früheren Expressionsversuchen von IFN- β in CHO-Zellen bestätigt (PD Dr. H. Hauser, GBF Braunschweig und Dr. Pungor, Fa. Berlex, Richmond, CA, USA, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich eine serum- und Mtx-freie Expression von IFN- β und IFN- β (9x) in CHO-Zellen mit hohen Expressionsraten etabliert werden konnte.

5.2. Aufreinigung, Hydrophobizität und Löslichkeitsverhalten von IFN- β und IFN- β (9x)

Für die Aufreinigung von IFN- β und IFN- β (9x) unter nicht denaturierenden Bedingungen auf einen Reinheitsgrad von über 95 % wurden drei Chromatographieschritte benötigt. Wenngleich auch die verwendeten Chromatographiematerialien für IFN- β und IFN- β (9x) identisch waren, zeigten sich doch bereits während der Aufreinigungsprozedur deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proteinen, welche auf eine verringerte Oberflächenhydrophobizität des IFN- β (9x) schließen ließen. So wurde für IFN- β aus Zellkulturüberständen in der Literatur (Heine und Billiau, 1981) als erste Aufreinigungsstufe eine sehr selektive Bindung des IFN- β über hydrophobe Wechselwirkungen an „controlled-pore glass“ (CPG) bei pH 7,0 beschrieben. Für die anschließende Elution ist ein pH-Sprung auf 3,0 notwendig. Es konnte gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu IFN- β , IFN- β (9x) unter gleichen Bedingungen nicht an CPG band. Die Ursache hierfür dürfte in einer verminderten Oberflächenhydrophobizität des IFN- β (9x) liegen.

Die erste von mir angewandte Säulenchromatographie an einer Blue Sepharose FF-Matrix diente der Aufkonzentrierung der IFN- β - bzw. IFN- β (9x)-haltigen Zellkulturüberstände unter gleichzeitiger Abtrennung von Fremdproteinanteilen. Diese stammten zum einen aus den im Medium bereits vorhandenen Proteinzusätzen (HSA, Wachstumsfaktoren), zum anderen handelte es sich um CHO-Zellproteine, welche entweder direkt sezerniert oder aber aus toten Zellen in die Kulturüberstände gelangten.

Bei der Bindung an das Blue Sepharose FF-Material handelt es sich um eine Form der Affinitätschromatographie über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Farbstoffmolekülen der Säulenmatrix. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Verminderung der hydrophoben Bindungen z.B. mit steigenden Ethylenglykol (EG)-Gradienten. Für, an eine Blue Sepharosematrix gebundenes, IFN- β wird ein Waschschrift mit 30 % EG zur Beseitigung weniger hydrophober Verunreinigungen vorgeschlagen (Utsumi *et al.*, 1989). Die eigentliche IFN- β -Elution erfolgt anschließend mit 60 % EG. Tatsächlich konnte bei IFN- β dieser Waschschrift ohne bedeutende IFN- β -Verluste (< 5 %) durchgeführt

werden. Bei IFN- β (9x) eluierten jedoch etwa 33 % der eingesetzten IFN- β (9x)-Menge bereits bei 30 % EG, so daß die Elution mit 60 % EG ohne vorangegangenen Waschschrift vorgenommen wurde. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine verringerte Hydrophobizität der Variante gegenüber IFN- β hin. Die Elutionsprofile von IFN- β und IFN- β (9x) glichen sich erwartungsgemäß, da beide Proteine mit einer EG-Stufe auf 60 % und nicht mit einem Gradienten eluiert wurden, der zu einer deutlichen „peak“-Verbreiterung geführt hätte. Die Ausbeuten betragen bei IFN- β 88 % und bei IFN- β (9x) 85 % der eingesetzten Aktivitätsmengen. Für beide Proteine lag der Anteil am Gesamtprotein in der Elutionsfraktion bei 6 % und somit um den Faktor 30 höher als in den Zellkulturüberständen.

Als zweite Aufreinigungsstufe wurde eine Affinitätschromatographie an einer mit Zn^{2+} -Ionen beladenen Chelating Sepharose FF-Säule verwendet. IFN- β bzw. IFN- β (9x) besitzen die Fähigkeit, Zn^{2+} -Ionen zu chelatieren (Heine und Billiau, 1981). Diese Eigenschaft wurde zur Abtrennung eines Großteils der verunreinigenden Proteine, welche nicht an die Säule banden ausgenutzt. Für IFN- β wurde die Elution mittels eines pH-Sprunges von 7,0 auf 4,2 gewählt. Für IFN- β (9x) konnte eine Elution bei neutralem pH-Wert mit einer Imidazol-Stufe etabliert werden. Dies ist insofern von Vorteil, als das bei der Aufreinigung von IFN- β als auch von IFN- β (9x) denaturierende Bedingungen und extreme pH-Werte vermieden werden sollten, um die native Struktur der Proteine zu erhalten. Für IFN- β war eine Elution mit Imidazol bei pH 7,0 nicht erfolgreich, da sich aufgrund der hohen IFN- β -Konzentration in der Elutionsfront sofort Aggregate bildeten und das IFN- β präzipitierte. IFN- β (9x) zeigte diese Tendenz nicht und lieferte damit einen weiteren Hinweis auf seine verminderte Oberflächenhydrophobizität.

Das großtechnisch hergestellte, glykosylierte IFN- β wird bei saurem pH-Wert aufgereingt, um eine Aggregation und damit einen Verlust an spezifischer Aktivität zu vermeiden (persönliche Mitteilung Dr. Rosa, Fa. Biogen, Cambridge, MA, USA). Ungünstigerweise führen niedrige pH-Werte zu einer partiellen Hydrolyse von Zuckerresten und erhöhen dadurch die strukturelle Diversität. Die Möglichkeit der Aufreinigung des IFN- β (9x) bei neutralem pH-Wert ist folglich von Vorteil für den Erhalt der nativen Molekülstruktur.

Die Ausbeuten nach der Metallchelatchromatographie lagen für beide Proteine bei 90 % der eingesetzten Interferonaktivität. Der Anteil von IFN- β bzw. IFN- β (9x) am Gesamtprotein lag bei 25 %. Als Verunreinigungen waren hauptsächlich Proteine mit Molekulargewichten unter 20 kDa zu erkennen, welche ebenfalls spezifische Zn^{2+} -Chelatkomplexe mit dem Säulenmaterial ausgebildet hatten und deshalb nicht abgetrennt werden konnten.

Zur Entfernung dieser Verunreinigungen wurden die Elutionsfraktionen der Chelating Sepharose FF-Säule einer Gelfiltration unterzogen. Die Gelfiltration des IFN- β mußte, um eine irreversible Bindung an das Säulenmaterial zu verhindern (s.u), bei einem pH-Wert von 4,2 erfolgen, die von IFN- β (9x) konnte auch bei neutralem pH-Wert durchgeführt werden. Eine Gelfiltration bei pH 6,8 war bei IFN- β , als auch beim IFN- β -Präparat Rebif® der Fa. Serono auf zwei verschiedenen Gelfiltrationschromatographiematerialien nicht erfolgreich, da nur etwa 10 % der eingesetzten Interferon-beta-Menge von den Säulen in einem diskreten „peak“ eluierten. Die restliche Aktivität eluierte im Ausschlußvolumen bzw. konnte nicht mehr mit Laufpuffer von der Säule entfernt werden. Im Vergleich dazu lagen die Ausbeuten der Gelfiltrationen von IFN- β (9x) bei pH 6,8 bei 79 %. Diese Beobachtung läßt den Rückschluß zu, daß das IFN- β im Gegensatz zu IFN- β (9x) bei pH 6,8 aufgrund seiner Hydrophobizität größtenteils in Komplexen mit HSA- oder weiteren IFN- β -Molekülen vorliegt. Bedingt durch seine wasserabweisende Oberfläche haftet es darüberhinaus an den Gelfiltrationsmatrizes und kann erst durch Lösungsmittel wie Acetonitril oder DMSO abgetrennt werden. Bei einem pH-Wert von 4,2 sind hingegen viele Aminosäurereste des IFN- β positiv geladen und die Aggregationstendenz ist deutlich verringert, so daß die Gelfiltration bei pH 4,2 erfolgreich mit einer Ausbeute von 81 % durchgeführt werden konnte. Für IFN- β als auch für IFN- β (9x) sind nach der Gelfiltration Reinheitsgrade von mehr als 95 % bestimmt worden. Sie lagen damit über dem des IFN- β -Präparates Rebif®, bei dem im SDS-Polyacrylamidgel deutlich mehrere Fremdproteinbanden mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa beobachtet werden konnten.

Die aufgereinigten Interferonlösungen waren stabilisiert mit 10 mg/ml HSA bei 4°C und pH 4,2 mindestens zwei Monate ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Bei IFN- β -Konzentrationen über 0,3 mg/ml in 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl-Lösung, pH 4,2 trat jedoch nach 8-12 h Aggregation mit Niederschlagsbildung auf. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen der Fa. Schering bestätigt (persönliche Mitteilung Dr. Pungor, Fa. Berlex, Richmond, CA, USA). Für IFN- β (9x) konnte dieser Effekt, bedingt durch seine verminderte Oberflächenhydrophobizität, selbst bei Konzentrationen von 0,5 mg/ml nicht beobachtet werden.

Damit bestätigt sich, daß die im Strukturmodell für IFN- β (9x) (s. 2.4.3.) berechnete Entfernung hydrophober Oberflächenbereiche bei gleichzeitiger Abschirmung der verbleibenden unpolaren Bereiche durch die Glykosylierung (Karpusas *et al.*, 1998) zu einer Verringerung der Aggregationstendenz des Moleküls geführt hat. Für das nicht glykosylierte IFN- β (9x) aus *E. coli* konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden (Promotionsarbeit Dr. Schneider-Fresenius, 1999). Offenbar führt die durch den Wegfall der Glykosylierung bedingte

Exponierung hydrophober Oberflächenregionen des IFN- β (9x) aus *E. coli* zu einer deutlichen Verstärkung der Aggregationstendenz, die auch durch die Aminosäureaustausche nicht kompensiert werden kann.

Die Gesamtausbeuten über alle Chromatographieschritte unterschieden sich für IFN- β und IFN- β (9x) nicht wesentlich und fielen für beide Proteine mit über 60 % bei gleichzeitig hoher Reinheit sehr zufriedenstellend aus. So wurden von den bisher beschriebenen Aufreinigungsverfahren für IFN- β Ausbeuten zwischen 40 und 70 % bei vergleichbaren Reinheitsgraden von mehr als 80 % erreicht (Methods in Enzymology, Vol. 78, S. 114 und S. 434-454).

Der analytische Nachweis einer verminderten Oberflächenhydrophobizität des IFN- β (9x) im Vergleich zum IFN- β des Präparates Rebif® gelang mit Hilfe einer „reversed phase“ Chromatographie. IFN- β (9x) eluierte nach 30,7 min bei 46,5 % Acetonitril, das IFN- β aus Rebif® hingegen erst bei 33,6 min und 48,5 % Acetonitril. Dieses Ergebnis zeigte die signifikant schwächeren hydrophoben Wechselwirkungen des IFN- β (9x) mit der Säulenmatrix, insbesondere wenn man berücksichtigt, daß das im Unterschied zu IFN- β sehr viel hydrophilere HSA nach 25 min und somit bei 42,5 % Acetonitril eluierte.

Wie bei der Massenspektroskopie und den Tierversuchen wurde das kommerziell erhältliche, ebenfalls rekombinant in CHO-Zellen produzierte IFN- β -Präparat Rebif® der Fa. Serono als Referenzsubstanz eingesetzt und nicht das von mir aufgereinigte IFN- β . Diese Wahl geschah, um einen laborunabhängigen, bereits in der IFN- β -Therapie erprobten, IFN- β -Standard als Vergleich zu besitzen, an dem sich eine spätere Verwendung des IFN- β (9x) in der Klinik orientieren muß. Das sich ebenfalls auf dem Markt befindliche, rekombinant in *E. coli* produzierte IFN- β verliert aufgrund der nicht vorhandenen Glykosylierung und den daraus resultierenden, entscheidenden Nachteilen bei Aufreinigung, spezifischer Aktivität und klinischem Einsatz (Kivisakk *et al.*, 2000; Obert, 2000, S. 40-41) zunehmend an Bedeutung und wird in der Therapie immer häufiger durch die glykosylierten IFN- β -Präparate aus CHO-Zellen verdrängt.

5.3. Charakterisierung von IFN- β und IFN- β (9x)

5.3.1. Spezifische Aktivität und Struktur

Die im antiviralen „assay“ gemessenen spezifischen Aktivitäten von IFN- β als auch von IFN- β (9x) unterschieden sich nicht und lagen bei $2,7 \cdot 10^8 \pm 0,3 \cdot 10^8$ IU/mg. Diese Werte gleichen der für das IFN- β -Präparat Rebif® angegebenen spezifischen antiviralen Aktivität von $2,77 \cdot 10^8$ IU/mg und denen, in der Literatur für natürliches bzw. rekombinant gewonnenes, glykosyliertes Interferon-beta veröffentlichten (Obert, 2000, S. 210-11). Die veränderte Oberflächenstruktur des IFN- β (9x) hat ergo nicht zu einer Beeinträchtigung der spezifischen Aktivität geführt. Dies war insofern auch nicht zu erwarten, da keine der ausgetauschten Aminosäuren mit den für die Rezeptorbindung wichtigen Aminosäuren überlappt (persönliche Mitteilung Dr. Runkel, Fa. Biogen, Cambridge, MA, USA).

Auch die Möglichkeit, daß die Aminosäureaustausche beim IFN- β (9x) zu einer Verschiebung der IFN- β - hin zu einer Interferon-alpha-Spezifität geführt haben, konnte unter Verwendung einer IFN- β -sensiblen aber IFN-alpha-refraktären, humanen myocardialen Fibroblastenzelllinie im AVA ausgeschlossen werden. Während in dem von uns verwendeten AVA die spezifischen Aktivitäten von alpha-Interferonen und IFN- β vergleichbar sind, werden die myocardialen Fibroblastenzellen in diesem Test durch IFN- β etwa hundertmal besser vor der Infektion durch Cocksackievirus B3 als durch IFN- α_{2a} geschützt (Heim *et al.* 1996). Im Vergleich zum IFN- β -Präparat Rebif® zeigte IFN- β (9x) in diesem Zellsystem eine vergleichbare Aktivität, welche deutlich über der des IFN-alpha lag (Dr. Heim, MH Hannover, persönliche Mitteilung). Demzufolge haben die eingeführten Mutationen des IFN- β (9x) nicht einen Verlust der IFN- β -Spezifität und eine Verschiebung hin zu einer IFN- α -Spezifität verursacht. Vielmehr haben sie eine Auflösung von unpolaren Regionen auf der Oberfläche des IFN- β bewirkt und somit zu der angestrebten Verminderung der Oberflächenhydrophobizität geführt.

Die in der massenspektrometrischen Analyse ermittelten Oligosaccharidstrukturen des IFN- β (9x) bestehen hauptsächlich aus biantennären Zuckern und gleichen damit denen des natürlichen und denen des industriell in CHO-Zellen hergestellten IFN- β (persönliche Mitteilung Dr. Kenett, Fa. Serono, Ness-Ziona, Israel). Infolgedessen kann auch beim IFN- β (9x) die Glykosylierung ihre wichtige Funktion zur Abschirmung verbleibender

hydrophober Oberflächenbereiche und bei der Stabilisierung des Moleküls leisten (Obert, 2000, S. 24 ff.; Runkel *et al.*, 1998a; Karpusas *et al.*, 1997).

5.3.2. Pharmakokinetik des IFN- β (9x) im Vergleich zu Rebif®

Der deutlichste Nachweis einer möglichen Verbesserung der Pharmakologie des IFN- β durch den Austausch hydrophober Oberflächenamino­säuren gelang mittels zweier Tierversuche. Als Versuchsmodell wurden Kaninchen ausgewählt, da zum einen das pharmakokinetische Verhalten von IFN- β -Präparaten in Kaninchen demjenigen im Menschen ähnelt, zum anderen bereits Daten über die Pharmakokinetik des natürlichen humanen IFN- β in Kaninchen vorlagen (Bocci *et al.*, 1988).

Die bei subkutaner oder intramuskulärer Injektion von IFN- β -Präparaten beobachteten, sehr niedrigen Plasmakonzentration von IFN- β werden auf die hohe Gewebsaffinität des Proteins zurückgeführt (Obert, 2000, S. 212 f.; Chofflon, 2000; Salmon *et al.*, 1996). Diese ist bedingt durch seinen stark hydrophoben Molekülcharakter und stellt besonders bei Krankheitsgeschehen, die zur Therapie hohe IFN- β -Konzentrationen im Zielgewebe erfordern, ein großes Problem dar. Die auf diese Weise absorbierte IFN- β -Aktivität verbleibt im Gewebe an der Injektionsstelle und wird dort abgebaut, die Bioverfügbarkeit ist somit gering. Bei intravenöser Injektion werden zwar direkt nach der Injektion hohe Serumkonzentrationen gemessen, diese fallen allerdings sehr rasch ab und nach wenigen Stunden ist kein IFN- β im Blut mehr nachweisbar, so daß bei vielen akuten Viruserkrankungen eine Dauerinfusion mit den entsprechenden Nebenwirkungen und einer stationären Aufnahme des Patienten indiziert ist (Obert, 2000, S. 87 ff. und S. 170).

Im zweiten Tierversuch konnten zu allen Meßzeitpunkten nach der Injektion gleicher Aktivitätsmengen für IFN- β (9x) deutlich höhere Plasmaspiegel als für Rebif® sowohl im AVA, als auch im ELISA gemessen werden. Die Schwankungsbreite der Meßergebnisse von Tier zu Tier fiel mit 25 % gering aus und lag damit in dem von Bocci *et al.*(1988) erreichten Rahmen. Die maximale Plasmakonzentration wurde bei Rebif® nach einer Stunde mit etwa 1000 IU/ml, bei IFN- β (9x) erst nach drei bis fünf Stunden mit etwa 4000 IU/ml erreicht. Nach ihren Maxima fielen bei beiden Proteinen die Plasmakonzentrationen ab. Beim IFN- β (9x) allerdings mit einer wesentlich geringeren Rate als beim IFN- β des Rebif®. So wurden im Gegensatz zu IFN- β nach 24 bzw. 48 Stunden 10-30 mal höhere Plasmakonzentrationen an IFN- β (9x) gemessen. Diese Ergebnisse entsprechen denen des ersten Tierversuches, wenn

man berücksichtigt, daß dort den Kaninchen doppelt so viel Rebif® wie IFN- β (9x) injiziert wurde. So lag in Tierversuch I die, von der Injektionsmenge abhängige, absolute Bioverfügbarkeit (AUC) für Rebif® bei $1,3 \cdot 10^4$ IU/ml·h, diejenige für IFN- β (9x) mit $4,4$ IU/ml·h indessen um den Faktor drei höher. Vergleicht man die von der Injektionsmenge unabhängigen Werte der „clearance“ (CL), so war dieser Wert bei Rebif® mit $1,5$ l/h um den Faktor sechs größer als bei IFN- β (9x) mit $0,23$ l/h. Der zweite Tierversuch, also bei Injektion gleicher Aktivitätsmengen, bestätigte diese Daten. So wurde für Rebif® eine AUC von $0,8 \cdot 10^4$ IU/ml·h und für IFN- β (9x) von $5,0 \cdot 10^4$ IU/ml·h errechnet. Die Elimination betrug dabei für Rebif® $1,2$ l/h und für IFN- β (9x) $0,20$ l/h. Auch diese Ergebnisse zeigen, daß IFN- β (9x) gegenüber dem IFN- β aus Rebif® eine sechsfach höhere absolute Bioverfügbarkeit besitzt. Diese Unterschiede können nur eine Folge der veränderten Oberflächenstruktur des IFN- β (9x) sein und geben Anlaß zur Hoffnung, daß sich dem IFN- β (9x) in der Klinik verbesserte oder neue Einsatzmöglichkeiten erschließen werden, besonders, wenn hohe Interferon-beta-Konzentrationen oder lange IFN- β -Halbwertszeiten im Zielgewebe zur Behandlung notwendig sind.

Die von Bocci *et al.* (1988) ermittelten Daten für natürliches IFN- β aus humanen Fibroblastenzellen zeigten eine ähnliche Pharmakokinetik in Kaninchen wie Rebif® in unseren Tierversuchen. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist aufgrund der von Bocci *et al.* nicht veröffentlichten Rohdaten und der von ihnen verwendeten, sehr unreinen IFN- β -Präparation mit einer spezifischen Aktivität von nur $6,5 \cdot 10^6$ IU/mg nicht möglich.

Bei einem früheren, von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, ähnlichen Tierversuch (Promotionsarbeit Dr. Schneider-Fresenius, 1999) wurden die Pharmakokinetiken von nicht glykosyliertem IFN- β bzw. IFN- β (9x) aus *E. coli* in Kaninchen ermittelt. Jedem Tier wurden dabei etwa $1,6 \cdot 10^7$ IU injiziert. Die um den Faktor vier voneinander abweichenden Werte der Einzelmessungen verschiedener Versuchstiere lassen auch hier keinen direkten Vergleich mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit zu, jedoch lagen die für die nicht glykosylierten Proteine gemessenen, maximalen Plasmakonzentrationen bei ungefähr 10 IU/ml (IFN- β) bzw. 60 IU/ml (IFN- β (9x)), so daß auch hier, ähnlich den Meßergebnissen mit den glykosylierten Proteinen, der Faktor sechs beobachtet werden konnte. Sieht man sich allerdings die bei etwa gleicher Injektionsmenge erreichten, maximalen Plasmakonzentrationen an, so liegen die des unglykosylierten IFN- β bzw. IFN- β (9x) um den Faktor 100 niedriger als die der glykosylierten Proteine. Folglich findet sich auch hier ein deutlicher Hinweis auf die entscheidende Rolle der Glykosylierung, insbesondere für die klinischen Anwendung.

Ziel weiterer Untersuchungen wird nun in Zusammenarbeit mit einem industriellen Partner das pharmakologische Verhalten des IFN- β (9x) im Menschen und schließlich die Weiterentwicklung zum Therapeutikum sein.

6. Literaturverzeichnis

- Abdollahi, A., Lord K.A., Hoffmann-Liebermann, B. and Liebermann D.A. (1991). Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by IL-6 an leukemia inhibitory factor: Role in growth inhibition. *Cell Growth Differ* **2**, 401-407
- Adolf, G.R. (1987): Glycosylation of IFN-alpha-2a. *J. Gen. Virol.* **68**, 1669-1676
- Antonetti, F., Mascia, M., Terlizze, M. et al. (1997). Controversies in the measurement of biological activity of beta interferons. In: *7th meeting of the European Neurological Society (ENS)*. Rhodes, Griechenland. 14-18 June
- Bazan, F. (1990). Shared architecture of hormone binding domains in type I and type II Interferon receptors. *Cell* **61**, 753-754
- Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A. and Livingston, D.M. (1996). Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* **383**, 344-347
- Bocci, V., Pessina, G.P., Paulesu, L., Muscettola, M. and Valeri, A. (1988). The lymphatic route. Distribution of human natural interferon-beta in rabbit plasma and lymph. *J. Interferon Res.* **8**, 633-40
- 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**, 248-254
- Brightwell, G., Poirier, V., Cole, E., Ivins, S. and Brown, K.W. (1997). Serum-dependent and cell cycle-dependent expression from a cytomegalovirus-based mammalian expression vector. *Gene* **194**, 115-123
- Chen, C.A. and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gen transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**, 632-638
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y. and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* **272**, 719-22
- Chofflon, M. (2000). Recombinant human interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a review of the major clinical trials. *Eur. J. Neurol.* **7**, 369-380
- Cleary, C.M., Donnelly, R.J., Soh, J., Mariano, T.M. and Pestka, S. (1994). Knock-out and reconstruction of a functional human type I interferon receptor complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 18747-18749
- Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. and Garapin, A.-C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* **150**, 1-14

- Conradt, H.S., Egge, H., Peter-Katalinic, J., Reiser, W., Siklosi, T. and Schaper, K. (1987). Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *J. Biol. Chem.* **262**, 14600-14605
- Cremer, I., Vieillard, V. and de Maeyer, E. (2000). Retrovirally mediated IFN-beta transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J. Immunol.* **164**, 1582-1587
- Cremer, I., Vieillard, V., Sautes-Fridman, C. and de Maeyer, E. (2000). Inhibition of human immunodeficiency virus transmission to CD4+ T cells after gene transfer of constitutively expressed interferon beta to dendritic cells. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1695-1703
- Cross, J.C. and Roberts, R.M. (1991). Constitutive and trophoblast-specific expression of a class of bovine interferon genes. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3817-3821
- Dale, G. E., Broger, C., Langen, H., D'Arcy, A. and Stüber, D. (1994). Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: solubilization of the trimethoprim-resistant type S1 dihydrofolate reductase. *Protein Engineering* **7**, 933-939
- Darnell, J.E., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994). Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to interferons and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421
- David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C. and Nell, B.G. (1995). Different regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2-domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 7050-7058
- Dirks, W., Wirth, M. and Hauser, H. (1993). Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* **128**, 247-249
- Dixkens, C., Posseckert, G., Keller, T. and Hameister, H. (1998). Structural analysis of the amplified IFN-beta and DHFR genes in a Chinese hamster ovary cell line using multicolour FISH analysis. *Chromosome Res.* **6**, 329-332
- Domanski, P., Nadeau, O.W., Platanias, L.C., Fish, E., Kellum, M., Pitha, P. and Colamonici, O.R. (1998). Differential use of the betaL subunit of the type I interferon (IFN) receptor determines signaling specificity for IFNalpha2 and IFNbeta. *J. Biol. Chem.* **273**, 3144-7
- Ehrenfeld, E. and Hunt, T. (1971). Double-stranded poliovirus RNA inhibits initiation of protein synthesis by reticulocyte lysates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1075-8
- Einat, M., Resnitzky, D. and Kimchi, A. (1985). Close link between reduction of c-myc expression by interferon and, G0/G1 arrest. *Nature* **313**, 597-600

- Eisenhaber, F. und Argos, P. (1993). Improved strategy in analytic surface calculation for molecular systems: handling of singularities and computational efficiency. *J Comput Chem*, **14**, 1272-80
- Fleischmann, W.R. and Fleischmann, C.M. (1992). Mechanisms of Interferons' Antitumor Actions. In *Interferon: Principles and Medical Applications*, 299-309, (Hrsg. Baron, S.), University of Texas, Galveston, Texas, USA
- Fleischmann, W.R., Jr., Newton, R.C., Fleischmann, C.M., Colburn, N.H. and Brysk, M.M. (1984). Discrimination between nonmalignant and malignant cells by combinations of IFN-gamma and IFN-alpha/beta. *J. Biol. Response Mod.* **3**, 397-405
- Fujiata, T., Miyamoto, M. et al. (1989). Induction of endogenous IFN- α and IFN- β genes by a regulatory transcription factor IRF-1. *Nature* **337**, 270-272
- Garbe, J. (1998). Darstellung und Charakterisierung einer neuen Interferon-beta-Variante mit verbesserter Löslichkeit. *Diplomarbeit*, Universität Hannover
- Garber, E.A., Chute, H.T., Condra, J.H., Gotlib, L., Colonno, R.J. and Smith, R.G. (1991). Avian cells expressing the murine Mx1 protein are resistant to influenza virus infection. *Virology* **180**, 754-62
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **52**, 456-467
- Grumbach, I.M., Fish, E.N., Uddin, S., Majchrzak, B., Colamonici, O.R., Figulla, H.R., Heim, A. and Platanias, L.C. (1999). Activation of the Jak-Stat pathway in cells that exhibit selective sensitivity to the antiviral effects of IFN-beta compared with IFN-alpha. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 797-801
- Hamlin, J.L., Leu, T.H., Vaughn, J.P., Ma, C. and Dijkwel, P.A. (1991). Amplification of DNA sequences in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **41**, 203-239
- Hauser, H., Gross, G., Bruns, W., Hochkeppel, H.K., Mayr, U. and Collins, J. (1982). *Nature* **24**, 650-654
- Hauser, H. und Wagner, R. (1997). Mammalian cell biotechnology in protein production. *Walter de Gruyter & Co*, Berlin.
- Heim, A., Stille-Siegenger, M., Pring-Akerblom, P., Grumbach, I., Brehm, C., Kreuzer, H. and Figulla, H.-R. (1996). Recombinant Interferons β and γ have a higher antiviral activity than interferon- α in Cocksackievirus B3-infected carrier stat cultures of human myocardial fibroblasts. *J. Interferon Cyt. Res.* **16**, 283-287
- Heine, J.W., van Damme, J., de Ley M., Billiau, A. and de Somer, P. (1981). Purification of human fibroblast interferon by zinc chelate chromatography. *J. Gen. Virol.* **54**, 47-56

- Iarlori, C., Reale, M., Lugaesi, A., de Luca, G., Bonanni, L., di Iorio, A., Feliciani, C., Conti, P. and Gambi, D. (2000). RANTES production and expression is reduced in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1b. *J. Neuroimmunol.* **107**, 100-107
- Isaacs, A. und Lindenmann, J. (1957). Virus interference: 1. The interferon. *Proc R Soc London Ser*, **147**, 258-67
- Jacobs, L., O'Malley, J. und Freeman, A. (1981). Intrathecal interferon reduces exacerbations of MS. *Science* **214**, 1026-28
- Karpusas, M., Nolte, M., Benton, C.B., Meier, W., Lipscomb, W.N. and Goelz, S. (1997). The crystal structure of human interferon beta at 2.2-A resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11813-11818
- Karpusas, M., Whitty, A., Runkel, L. and Hochman, P. (1998). The structure of human interferon-beta: implications for activity. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 1203-1216
- Kim, T., Kim, T.Y., Song, Y.-H., Min, I.M., Yim, J. and Kim, T.K. (1999). Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* **274**, 30686-30689
- Kirchhoff, S., Koromilas, A.E., Schaper, F., Grashoff, M., Sonenberg, N. and Hauser, H. (1995). IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR. *Oncogene* **11**, 439-45
- Kivisakk, P., Alm, G.V., Fredrikson, S. and Link H. (2000). Neutralizing and binding anti-interferon-beta (IFN-beta) antibodies. A comparison between IFN-beta-1a and IFN-beta-1b treatment in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **7**, 27-34
- Klaus, W., Gsell, B., Labhardt, A.M., Wipf, B. and Senn, H. (1997). The three-dimensional high resolution structure of human interferon alpha-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* **274**, 661-75
- Kochs, G. and Haller, O. (1999). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2082-2086
- Kontsek, P. (1994). Human Type I Interferons: structure and function. *Acta virologica* **38**, 345-360
- Kracke, A., von Wussow, P., Al-Masri, A.N., Dalley, G., Windhagen, A. and Heidenreich, F. (2000). Mx proteins in blood leukocytes for monitoring interferon beta-1b therapy in patients with MS. *Neurology* **54**, 193-199
- Kumar, R. and Atlas, I. (1992). Interferon alpha induces the expression of retinoblastoma gene product in human Burkitt lymphoma Daudi cells: role in growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6599-603
- Lau, J.F., Parisien, J.P. and Horvath, C.M. (2000). Interferon regulatory factor subcellular localization is determined by a bipartite nuclear localization signal in the DNA-

- binding domain and interaction with cytoplasmic retention factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7278-7283
- Lewerenz, M., Mogensen, K.E. and Uze, G. (1998). Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons. *J. Mol. Biol.* **282**, 585-599
- MacDonald, H.S., Kushnaryov, V.M., Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E. (1986). Transport of gamma-interferon into the cell nucleus may be mediated by nuclear membrane receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 254-60
- Mandal, M., Bandyopadhyay, D., Goepfert, T. M. and Kumar, R. (1998). Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene* **16**, 217-25
- Mark, D. F., Lu, S. D., Creasey, A. A., Yamamoto, R. and Lin, L. S. (1984). Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Biochemistry* **81**, 5662-5666
- McCracken, A.A. and Brown, J.L. (1984). A filter immunoassay for detection of protein secreting cell colonies. *Biotechniques* **4**, 82-87
- McRae, B.L., Picker, L.J. and van Severen, G.A. (1997). Human recombinant interferon-beta influences T helper subset differentiation by regulating cytokine secretion pattern and expression of homing receptors. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2650-6
- Meike, A., Barahmand-Pour, F., Wöhrl, S., Stoiber, D. and Decker, T. (1996). Activation of different Stat5 isoforms contributes to cell-type-restricted signalling in response to interferons. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6937-6944
- Merril, C.R., Goldman, D. and van Keuren, M.L. (1983). Silver staining methods for polyacrylamid gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **96**, 230-239
- Methods in Enzymology. Vol. 78: Interferons, Part A. (1981). *Academic Press, Inc.*, New York
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R. and Hovanessian, A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA- activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**, 379-90
- Meyer, T. (1997). "Hydrophobicity Engineering" rekombinanter humaner Interferon- β -Varianten. *Diplomarbeit*, Universität Hannover
- Mitsui, Y., Senda, T., Shimazu, T., Matsuda, S. and Utsumi, J. (1993). Structural, functional and evolutionary implications of the three- dimensional crystal structure of murine interferon-beta. *Pharmacol. Ther.* **58**, 93-132
- Miyaji, H., Harada, N., Mizukami, T., Sato, S., Fujiyoshi, N. and Itoh, S. (1990). Efficient expression of human beta-interferon in Namalwa KJM-1 cells adapted to serum-free medium by a dhfr gene coamplification method. *Cytotechnology* **4**, 173-180

- Morehead, H., Johnston, P.D. and Wetzel, R. (1984). Roles of the 29-138 disulfide bond of subtype A of human alpha interferon in its antiviral activity and conformational stability. *Biochemistry* **23**, 2500-7
- Niederle, N., Bergmann, L. und Ganser, A. (1996). Zytokine: Prälinik und Klinik. *Gustav Fischer Verlag*, Jena
- Niederle, N. und von Wussow, P. (1990). Interferone: Präklinische und klinische Befunde. *Springer-Verlag*, Berlin
- Obert, H.-J. and Pöhlau, D. (2000). Beta-Interferon, Schwerpunkt Multiple Sklerose, 3. Auflage, Springer Verlag
- Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Pashenkov, M., Fredrikson, S. and Link, H. (2000). Multiple sclerosis: pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN-beta. *J. Neuroimmunol.* **108**, 236-243
- Pavlovic, J. and Staeheli, P. (1991). The antiviral potential of Mx-Proteins. *J. Interferon Res.* **11**, 215-219
- Pellegrini, S., John, J., Shearer, M., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1989). Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4605-12
- Pestka, S. (1997). The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Semin. Oncol.* **24**, 9-17
- Pitossi, F., Blank, A., Schroder, A., Schwarz, A., Hussi, P., Schwemmler, M., Pavlovic, J. and Staeheli, P. (1993). A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.* **67**, 6726-32
- Presnell, S.R. and Cohen, F.E. (1989). Topological distribution of four-alpha-helix bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6592-6
- Ravandi, F., Estrov, Z., Kurzrock, R., Breitmeyer, J.B., Maschek, B.J. and Talpaz, M. (1999). A phase I study of recombinant interferon-beta in patients with advanced malignant disease. *Clin. Cancer Res.* **5**, 3990-3998
- Reiter, Z. (1993). Interferon-a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Interferon Res.* **13**, 247-57
- Revel, M., Chebath, J., Mangelus, M., Harroch, S. and Moviglia, G.A. (1995). Antagonism of interferon beta on interferon gamma: inhibition of signal transduction in vitro and reduction of serum levels in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* **1**, 5-11
- Revel, M. and Chebath, J. (1986) Interferon activated genes. *TIBS* **11**, 166-170

- Rotondaro, L., Mazzanti, L., Mele, A. and Rovera, G. (1997). High-level expression of a cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor in Chinese hamster ovary cells. Effect of 3'-noncoding sequences. *Mol. Biotechnol.* **7**, 231-240
- Runkel, L., Meier, W., Pepinsky, R.B., Karpusas, M., Whitty, A., Kimball, K., Brickelmaier, M., Muldowney, C., Jones, W. and Goelz, S.E. (1998a). Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta. *Pharm. Res.* **15**, 641-9
- Runkel, L., Pfeffer, L., Lewerenz, M., Monneron, D., Yang, C.H., Murti, A., Pellegrini, S., Goelz, S., Uze, G. and Mogensen, K. (1998). Differences in activity between alpha and beta type I interferons explored by mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **273**, 8003-8
- Russell-Harde, D., Knauf, M. and Croze, E. (1995b). The use of Zwittergent 3-14 in the purification of recombinant human interferon-beta Ser17 (Betaseron). *J. Interferon Cytokine Res.* **15**, 31-7
- Russel-Harde, D., Wagner, T.C., Perez, H.D. and Croze, E. (1999). Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon beta is dependent upon particular interactions between interferon beta and its receptor and independent of tyrosin phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 539-544
- Russell-Harde, D., Pu, H., Betts, M., Harkins, R.N., Perez, H.D. and Croze, E. (1995a). Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons. *J. Biol. Chem.* **270**, 26033-6
- Russell-Harde, D., Wagner, T.C., Rani, M.R., Vogel, D., Colamonici, O., Ransohoff, R.M., Majchrzak, B., Fish, E., Perez, H.D. and Croze, E. (2000). Role of the intracellular domain of the human type I interferon receptor 2 chain (IFNAR2c) in interferon signaling. Expression of IFNAR2c truncation mutants in U5A cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 23981-23985
- Salmon, P., Le Cottonnec, J.Y., Galazka, A., Abdul-Ahad, A. and Darragh, A. (1996). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human interferon-beta in healthy male volunteers. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 759-64
- Salzberg, S., Hyman, T., Turm, H., Kinar, Y., Schwartz, Y., Nir, U., Lejbkowitz, F. and Huberman, E. (1997). Ectopic expression of 2-5A synthetase in myeloid cells induces growth arrest and facilitates the appearance of a myeloid differentiation marker. *Cancer Res.* **57**, 2732-40
- Sanceau, J., Beranger, F., Gaudalet, C. and Wietzerbin, J. (1989). IFN-gamma is an essential cosignal for triggering IFN-beta 2/BSF-2/IL-6 gene expression in human monocytic cell lines. *Ann. NY Acad. Sci.* **557**, 130-41
- Sanceau, J., Hiscott, J., Delattre, O. and Wietzerbin, J. (2000). IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene* **19**, 3372-3383

- Schmid, M. and Haas, J. (1999). Adverse events of interferon beta and reasons for discontinuation of therapy a prospective surveillance of 540 patients. *ECTRIMS/ACTRIMS*. Basel, Poster
- Schneider-Fresenius, C. (1999). Entwicklung eines neuen Interferon- β mit erhöhter Löslichkeit und verbesserter Bioverfügbarkeit. *Promotionsarbeit*, Universität Hannover
- Sen, G.C. and Lengyel, P. (1992). The interferone system. A Bird's eye view of its biochemistry. *J. Biol. Chem.* **267**, 5017-5020
- Senda, T., Shimazu, T., Matsuda, S., Kawano, G., Shimizu, H., Nakamura, K.T. and Mitsui, Y. (1992). Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon-beta. *Embo J.* **11**, 3193-201
- Senda, T., Saitoh, S. and Mitsui, Y. (1995). Refined crystal structure of recombinant murine Interferon- β at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **253**, 187-207
- Stark, G.R. (1991). Interferons: Biosynthesis, physiological roles, mechanism of induction and response. In: *Interferons: Mechanism of action and role in cancer therapy*. S. 15-23, hrsg. von D.Crowther, Springer, Berlin
- Takane, H., Ohdo, S., Yamada, T., Yukawa, E. and Higuchi, S. (2000). Chronopharmacology of antitumor effect induced by interferon-beta in tumor-bearing mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 746-752
- Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (2000). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* **74**, 7989-7996
- Taniguchi, T. (1997). The role of interferon responsive factors in the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* **173**, 128-130
- Utsumi, J., Mizuno, Y., Hosoi, K., Okano, K., Sawada, R., Kajitani, M., Sakai, I., Naruto, M. and Shimizu, H. (1989). Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon-beta 1s. Identical polypeptides and non-identical carbohydrate moieties compared to natural ones. *Eur. J. Biochem.* **181**, 545-553
- Utsumi, J., Yamazaki, S., Kawaguchi, K., Kimura, S. and Shimazu, K. (1989). Stability of human interferon- β 1: oligomeric human interferon- β 1 is inactive but is reactivated by monomerization. *Biochim. biophys. Acta* **998**, 167-172
- Visvanathan, K.V. and Goodbourn, S. (1989). Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. *Embo J.* **8**, 1129-38
- Waine, G.J., Tymms, M.J., Brandt, E.R., Cheetha, B.F., and Linnane, A.W. (1992). *J. Interferon Res.* **12**, 43-48

- Walls, J.D. and Grinell, W. (1990). A rapid and versatile method for the detection and isolation of mammalian cell lines secreting recombinant proteins. *Biotechniques* **8**, 138-142
- Wang, X., Chen, M., Wandinger, K.P., Williams, G. and Dhib-Jalbut, S. (2000). IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **165**, 548-557
- Weber, F., Haller, O. and Kochs, G. (2000). MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J. Virol.* **74**, 560-563
- Williams, D.C., Van Frank, R.M., Muth, W.L. and Burnett, J.P. (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* **215**, 687-9
- Wirth, M., Bode, J., Zettlmeissl, G. and Hauser, H. (1988). Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. *Gene* **73**, 419-426
- Wong, A.H., Tam, N.W., Yang, Y.L., Cuddihy, A.R., Li, S., Kirchhoff, S., Hauser, H., Decker, T. and Koromilas, A.E. (1997). Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *Embo J.* **16**, 1291-304
- Zhou, A., Hassel, B.A. and Silverman, R.H. (1993). Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* **72**, 753-65
- Zürcher, T., Pavlovic, J. and Stäheli, P. (1992). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *Embo J.* **11**, 1657-61

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Moleküloberflächen von A) unglykosyliertem IFN- β , B) unglykosyliertem IFN- β (9x) und C) glykosyliertem IFN- β (9x)	19
Abb. 2:	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCI-ifn β ,gfp	35
Abb. 3:	Immunfärbung eines „overlay assay“	49
Abb. 4:	Blue Sepharose FF-Säule: Elutionsprofil von IFN- β bzw. IFN- β (9x)	52
Abb. 5:	Chelating Sepharose FF-Säule: Elutionsprofil von IFN- β	53
Abb. 6:	Chelating Sepharose FF-Säule: Elutionsprofil von IFN- β (9x)	54
Abb. 7:	BioSil SEC 125 5-Säule: Elutionsprofil von Rebif [®] , IFN- β und IFN- β (9x) bei pH 4,2	55
Abb. 8:	BioSil SEC 125 5-Säule: Elutionsprofil IFN- β (9x) bei pH 6,8	56
Abb. 9:	Sibergefärbtes SDS-Gel und entsprechender Westernblot der verschiedenen Aufreinigungsschritte von IFN- β und IFN- β (9x)	57
Abb. 10:	Coomassie-Blue-gefärbtes SDS-Gel und entsprechender Westernblot der verschiedenen Aufreinigungsschritte von IFN- β und IFN- β (9x)	58
Abb. 11:	„reversed phase“ Chromatogramm von Rebif [®] und IFN- β (9x)	61
Abb. 12:	Massenspektrum des IFN- β aus Rebif [®]	62
Abb. 13:	Massenspektrum des IFN- β (9x)	63
Abb. 14:	Antivirale Aktivitäten im Plasma nach subkutaner Injektion von $2 \cdot 10^7$ IU Rebif [®] bzw. $1 \cdot 10^7$ IU IFN- β (9x)	65
Abb. 15:	ELISA zur Bestimmung der Interferonkonzentrationen im Plasma nach subkutaner Injektion von $2 \cdot 10^7$ IU Rebif [®] bzw. $1 \cdot 10^7$ IU IFN- β (9x)	65
Abb. 16:	Antivirale Aktivitäten im Plasma nach subkutaner Injektion von $1 \cdot 10^7$ IU Rebif [®] bzw. IFN- β (9x)	66
Abb. 17:	ELISA zur Bestimmung der Interferonkonzentrationen im Plasma nach subkutaner Injektion von $1 \cdot 10^7$ IU Rebif [®] bzw. IFN- β (9x)	66
Abb. 18:	Exemplarische Darstellung eines AVA, zur Ermittlung der antiviralen Aktivitäten im Plasma fünf Stunden nach subkutaner Injektion von Rebif [®] bzw. IFN- β (9x)	67

8. Appendix

8.1. AVA- und ELISA-Meßwerte der Tierversuche

Zeit [h]	Rebif® [IU/ml (ng/ml)]	IFN-β(9x) [IU/ml (ng/ml)]
0	0 (0,0)	0 (0,0)
1	2161 (16,0)	2578 (17,0)
2	1822 (15,0)	3247 (22,0)
3	1601 (12,0)	3456 (23,0)
5	735 (5,0)	3678 (22,0)
7	547 (3,0)	2039 (11,0)
9	350 (3,0)	1507 (10,0)
11	321 (2,0)	1015 (8,0)
24	61 (0,0)	462 (2,0)
48	5 (0,0)	152 (2,0)

Tab. 9: Tierversuch I: Gemittelte AVA- und in Klammern ELISA-Meßwerte im Plasma nach subkutaner Injektion von $2 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. $1 \cdot 10^7$ IU IFN-β(9x). Die Standardabweichungen der Werte lag bei 20 %

Zeit [h]	Rebif® [IU/ml (ng/ml)]	IFN-β(9x) [IU/ml (ng/ml)]
0	0 (0,0)	0 (0,0)
1	1122 (4,3)	2050 (6,0)
2	824 (3,4)	3331 (13,0)
3	760 (3,3)	4150 (16,0)
5	521 (2,6)	3663 (13,0)
7	346 (1,7)	2144 (8,0)
9	270 (1,2)	1772 (7,5)
11	194 (0,4)	1144 (2,0)
24	68 (0,0)	656 (1,0)
48	6 (0,0)	181 (1,0)

Tab. 10: Tierversuch II: Gemittelte AVA- und in Klammern () ELISA-Meßwerte im Plasma nach subkutaner Injektion von $1 \cdot 10^7$ IU Rebif® bzw. IFN-β(9x). Die Standardabweichungen der Werte lag bei 20 %

8.2. Lebenslauf

- 30.11.1971:** Geboren in Hannover, als Sohn des Chemikers Dr. Boris Meyer und Margarethe Meyer, geborene Lincke
- 08.1978-07.1982:** Besuch der Grundschule Hannover-Kirchrode
- 08.1982-07.1984:** Besuch der Orientierungsstufe Hannover-Anderten
- 08.1984-06.1991:** Besuch des Gymnasiums Schillerschule Hannover mit Erhalt der Hochschulzugangsberechtigung
- 10.1991-09.1992:** Ableistung des Grundwehrdienstes
- 10.1992:** Beginn des Biochemiestudiums (Diplom) an der Universität Hannover
- 10.1994:** Vordiplom (Biochemie)
- 01.1997:** Diplomprüfung (Biochemie)
- 02.1997-08.1997:** Diplomarbeit bei Prof. Dr. B. Otto, Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Hannover, Abt. Gentechnologie
- 08.1997:** Diplom (Biochemie)
- 10.1997:** Beginn der Promotionsarbeit bei Prof. Dr. B. Otto, Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Abt. Gentechnologie, Hannover
- 10.1999:** Erhalt des, vom bayrischen Wirtschaftsministerium gestifteten, Hugo-Geiger-Preises für die Leistungen im Rahmen der Diplomarbeit

8.3. Danksagung

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Bernd Otto für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seinen Einsatz und die einmalige Arbeitsatmosphäre in unserer Abteilung.

PD Dr. Hansjörg Hauser für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, seine Hintergrundinformationen und die Start- bzw. Methodenhilfe durch seine Abteilung, namentlich durch Dr. Meike Hennecke, Meike Tümmeler und Dr. Andrea Kröger.

den Mitarbeitern der Abteilung Gentechnologie, insbesondere Dr. Hayssam Zakaria, Dr. Gero Waschütza, Dr. Marco Kresin und Reinhild Bähr, für das freundschaftliche Klima während der vergangenen drei Jahre.

Prof. Dr. Herwig Brunner, Dr. Thomas Graeve und den Mitarbeitern des Fraunhofer-Institutes für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei meinen Aufenthalten in Stuttgart.

meinen Diplomanden, Dipl.-Biochemikerin Tanja Momot und Dipl.-Biochemiker Florian Battermann, für ihre Mitarbeit.

Reinhild Bähr für die Tips und Tricks im und außerhalb des Laboralltags.

Dr. R. Heß und Dr. M. Jürgens der Fa. BioVision für Ihre Betreuung und Hilfe bei „reversed-phase“-HPLC und Massenspektrometrie.

Dr. Müller für seine Unterstützung bei Prüfungs- und organisatorischen Fragen.

Dr. Albert Heim für seine Mithilfe bei 170 Blutentnahmen und der Analyse von samstäglich vorgebrachten Hiobsbotschaften.

Dr. Hans-Joachim Obert für seine großzügigen Rebif®-Lieferungen und mehrere hochinteressante Diskussionen über IFN- β und seine klinischen Anwendungen.

Prof. Dr. Karl Bauer, Prof. Dr. W.-G. Forssmann und Dr. Sabine Barlach-Bölle, stellvertretend für das Graduiertenkolleg „Charakterisierung regulatorischer Peptide und ihrer Zielproteine“.

nicht zuletzt der rettenden, praktischen Unterstützung durch Dr. Hadam, selbst an späten Sonntagabenden.

besonders meiner Freundin Sonja Weiß für unendlich viele Korrekturlesungen, Anregungen und die Unterstützung in allen Hochs und Tiefs des letzten Jahres.