

Struktur und Funktion von viralem Interleukin-6

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Ingo Bußmeyer

Kiel,
2006

Referent/in: Prof. Dr. Dr. h. c. Bosch

Korreferent/in: Prof. Dr. Rose-John

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZYTOKINE	1
1.2	ZYTOKINE DER INTERLEUKIN-6-FAMILIE	2
1.3	SIGNALTRANSDUKTION IL-6-ARTIGER ZYTOKINE.....	2
1.3.1	<i>Rezeptorkomplexe IL-6-artiger Zytokine</i>	<i>2</i>
1.3.2	<i>Signalkaskade IL-6-artiger Zytokine.....</i>	<i>4</i>
1.3.3	<i>Der lösliche IL-6 Rezeptor</i>	<i>5</i>
1.3.4	<i>Pathophysiologische Bedeutung des IL-6 Transsignallings</i>	<i>6</i>
1.4	HUMANES HERPESVIRUS-8.....	7
1.4.1	<i>HHV-8 assoziierte Erkrankungen</i>	<i>8</i>
1.5	VIRALES INTERLEUKIN-6	9
1.6	ZIEL UND KONZEPT DER ARBEIT	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	CHEMIKALIEN	14
2.2	PLASMIDE UND VEKTOREN	14
2.3	BAKTERIENSTÄMME.....	14
2.4	ZYTOKINE	15
2.5	ANTIKÖRPER	15
2.5.1	<i>Primärantikörper</i>	<i>15</i>
2.5.2	<i>Sekundärantikörper.....</i>	<i>15</i>
2.6	NUKLEINSÄURE- UND PROTEINSTANDARDS	15
2.7	RADIOCHEMIKALIEN	16
2.8	ENZYME UND KITS	16
2.9	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	16
2.10	GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN.....	17
2.11	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	17
2.11.1	<i>Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme.....</i>	<i>17</i>
2.11.2	<i>Dephosphorylierung von DNA-Enden</i>	<i>18</i>
2.11.3	<i>Ligation</i>	<i>18</i>
2.11.4	<i>Klonierung mit dem Gateway-System</i>	<i>19</i>

2.11.5	<i>Transformation kompetenter Bakterien</i>	20
2.11.6	<i>Plasmid-DNA-Minipräparation</i>	21
2.11.7	<i>Plasmid-DNA-Midi-Präparation</i>	22
2.11.8	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	23
2.11.9	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	23
2.11.10	<i>RT-PCR</i>	25
2.11.11	<i>Southern-Blot</i>	26
2.11.12	<i>Isolierung von RNA</i>	28
2.11.13	<i>Northern-Blot</i>	29
2.12	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	30
2.12.1	<i>Zellkultur</i>	30
2.12.2	<i>Zelllinien</i>	31
2.12.3	<i>Transfektion von Säugerzellen</i>	31
2.13	BIOCHEMISCHE METHODEN	32
2.13.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	32
2.13.2	<i>Western-Blot</i>	34
2.13.3	<i>Indirekte Immunfärbung</i>	34
2.13.4	<i>Gewinnung von Serum aus Mäuseblut</i>	35
2.13.5	<i>ELISA</i>	35
2.13.6	<i>vIL-6-ELISA</i>	36
2.14	GENERIERUNG VON vIL-6 TRANSGENEN MÄUSEN	37
2.14.1	<i>Isolation und Reinigung der Expressionskassette aus dem Plasmid pEPCK- vIL6*ΔBamHI</i>	37
2.14.2	<i>Pronukleusinjektion von DNA</i>	37
2.14.3	<i>Nachweis des Transgens in genomischer DNA durch PCR</i>	37
2.14.4	<i>Nachweis des Transgens in genomischer DNA durch Southern-Blot</i>	39
2.14.5	<i>Tierhaltung</i>	40
2.14.6	<i>Zucht der transgenen Mäuse</i>	41
2.14.7	<i>Zucht und Test auf homozygote transgene Mäuse</i>	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	vIL-6-TRANSGENE MÄUSE.....	42
3.1.1	<i>Expressionsvektor für die Expression von vIL-6 in transgenen Mäusen</i>	42
3.1.2	<i>Expression des vIL-6 in Zellkultur</i>	43

3.1.3	<i>Mikroinjektion des Transgens in Vorkerne</i>	44
3.1.4	<i>Genotypisierung transgener Mäuse</i>	45
3.1.5	<i>Vergleich der Kopienzahl des Transgens in den vIL-6 transgenen Linien 11, 25 und 26</i>	46
3.1.6	<i>Überprüfung der Expression von vIL-6 auf Ebene der mRNA in der Leber....</i>	47
3.1.7	<i>Northern-Blot mit RNA aus Nieren</i>	49
3.1.8	<i>Nachweis von vIL-6 auf Proteinebene</i>	50
3.1.9	<i>Akute-Phase-Reaktion durch vIL-6 in transgenen Mäusen.....</i>	51
3.2	SIGNALTRANSDUKTION DURCH vIL-6 VON INNERHALB DER ZELLE.....	58
3.2.1	<i>Klonierung der Konstrukte für die Überprüfung einer intrazellulär durch vIL-6 induzierten Signaltransduktion.....</i>	59
3.2.2	<i>Signaltransduktion durch vIL-6 von innerhalb der Zelle.....</i>	60
3.3	SIGNALTRANSDUKTION DURCH IL-6 UND HYPER-IL-6 VON INNERHALB DER ZELLE	62
3.3.1	<i>Klonierung der Konstrukte für die Überprüfung einer intrazellulär induzierten Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6</i>	62
3.3.2	<i>Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6 von innerhalb der Zelle</i>	65
3.3.3	<i>Intrazelluläre Signaltransduktion durch IL-6 und HIL-6?</i>	66
3.4	GENERIERUNG TRANSGENER MÄUSE MIT vIL-6 UNTER DER TRANSKRIPTIONELLEN KONTROLLE DES MURINEN H2-PROMOTORS	70
3.4.1	<i>Klonierung des Expressionsvektors für die Generierung transgener Mäuse ..</i>	71
3.4.2	<i>Vergleich der Expression von vIL-6 nach Transfektion von HepG2-Zellen mit codonoptimierter und nicht optimierter cDNA.....</i>	72
3.4.3	<i>Expression von vIL-6 über das Expressionskonstrukt H2-vIL6-c-myc-opt.....</i>	73
4	DISKUSSION	75
4.1	vIL-6 TRANSGENE MÄUSE	75
4.2	SIGNALTRANSDUKTION DURCH vIL-6 VON INNERHALB DER ZELLE.....	82
4.3	SIGNALTRANSDUKTION DURCH IL-6 UND HYPER-IL-6 VON INNERHALB DER ZELLE	84
4.4	GENERIERUNG TRANSGENER MÄUSE MIT vIL-6 UNTER DER TRANSKRIPTIONELLEN KONTROLLE DES MURINEN H2-PROMOTORS	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	SUMMARY.....	91
7	LITERATURVERZEICHNIS	93

8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	105
9	ANHANG	109
9.1	ZUSAMMENSETZUNG DES ALLEINFUTTERS SSNIFF R/M-H	109
9.2	VEKTOR- / PLASMIDKARTEN.....	110
9.3	NUKLEOTID- UND AMINOSÄURESEQUENZEN.....	119
9.4	GEGENÜBERSTELLUNG DER ORIGINALSEQUENZ UND DER CODONOPTIMIERTEN SEQUENZ DES VIL-6	129
9.5	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	130
10	DANKSAGUNG	131
11	LEBENS LAUF	132
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	133

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 15-25 kDa, die von Zellen als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz freigesetzt werden. Sie besitzen hormonähnliche Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch von klassischen Peptidhormonen, wie z.B. dem Insulin, durch die Art ihrer Sekretion. Peptidhormone werden von spezialisierten Zellen eines endokrinen Organs sezerniert. Dahingegen werden Zytokine von einer Vielzahl an Zelltypen freigesetzt, deren Funktion nicht allein die Produktion von Zytokinen ist.

Zytokine wirken parakrin oder autokrin. Sie können also das Verhalten von benachbarten Zellen beeinflussen, oder auch das der Zellen von denen sie sezerniert wurden. Da ein Zytokin verschiedene Zelltypen stimulieren kann wird von einem pleiotropen Wirkungsspektrum gesprochen. Weiterhin können unterschiedliche Zytokine den gleichen Signalweg anschalten, was als Redundanz bezeichnet wird. Aufgrund einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Expression und Freisetzung von Zytokinen ist eine differenzierte Koordination unterschiedlicher Signale möglich. Hierdurch wird eine komplexe Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen gewährleistet.

Eine wichtige Rolle spielen Zytokine u.a. in der Embryonalentwicklung und in der Regulation der Immunantwort. Einige Zytokine wirken systemisch und beeinflussen inflammatorische Prozesse wie die Akute-Phase-Reaktion, die Hämatopoese und die Wundheilung. Auch wenn die meisten Zytokine keine ausgeprägte Sequenzhomologie besitzen, können sie aufgrund ihrer Sekundär- und Tertiärstrukturen klassifiziert werden [1]. Es wird hierbei zwischen den „Vier-Helix-Bündel“- , den „ β -faltblattreichen“- und den kleinen „ $\alpha\beta$ “-Zytokinen unterschieden. Die Vier- α -Helix-Bündel-Zytokine weisen eine gemeinsame Faltungstopologie auf, bei der die vier Helices in einer „auf-auf-ab-ab“-Orientierung angeordnet sind. Die aufwärtsgerichteten Helices A und B, sowie die abwärts gerichteten Helices C und D sind hierbei durch eine lange Schleife und die Helices B und C durch eine kurze Schleife verbunden [2]. Entsprechend der unterschiedlichen Längen ihrer α -Helices werden die „Vier-Helix-Bündel-Zytokine“ weiter in „langkettige Vier-Helix-Bündel-Zytokine“ oder Typ-I Zytokine und „kurzkettige Vier-Helix-Bündel-Zytokine“ oder Typ-II Zytokine unterteilt [3].

1.2 Zytokine der Interleukin-6-Familie

Interleukin-6 (IL-6) zählt zur Gruppe der „langkettigen Vier-Helix-Bündel-Zytokine“. Zytokine dieser Gruppe, die zudem als signaltransduzierendes Rezeptorelement das Glykoprotein 130 (gp130) verwenden, werden auch als IL-6-artige Zytokine bezeichnet.

Die Zytokine der IL-6-Familie besitzen hämato- und neuropoetsche- Wirkung und sind darüber hinaus Induktoren der hepatischen Akute-Phase-Reaktion [4]. So sind sie an der Entwicklung und Regulation des Immunsystems [5-7], der Kardiogenese [8], der Hämatopoese [9-11] und der Neurodifferenzierung und -regenerierung beteiligt [12-14].

Zur Familie der Interleukin-6-artigen Zytokine gehören das Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin M* (OSM), *Cardiotropin-1* (CT-1), *Cardiotrophin-like Cytokine*, auch *New Neurotrophin-1* genannt (CLC/NNT-1), *Neuropoietin* (NPN), Interleukin-27 (IL-27) und Interleukin-31 (IL-31) [15-18], sowie das virale Interleukin-6 (vIL-6).

vIL-6 ist ein dem IL-6 homologes Zytokin, das vom humanen Herpesvirus-8 (HHV-8, auch als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus bezeichnet (KSHV)) codiert wird [19, 20].

1.3 Signaltransduktion IL-6-artiger Zytokine

1.3.1 Rezeptorkomplexe IL-6-artiger Zytokine

Um in Zielzellen ein Signal zu vermitteln, benötigen Zytokine Rezeptoren. Sind diese an der Signaltransduktion durch Zytokine der IL-6-Familie beteiligt, lassen sie sich in nicht signaltransduzierende α -Rezeptoren und signaltransduzierende β -Rezeptoren unterteilen. Der erste Schritt in der Signaltransduktionskaskade ist die Bindung der Zytokine an homo- oder heterodimere β -Rezeptor-Komplexe. Den Zytokinen der IL-6-Familie ist hierbei gemein, dass mindestens ein Molekül gp130 an diesem Komplex beteiligt ist. IL-6 und IL-11 signalisieren über gp130-Homodimere [16]. Alle weiteren Mitglieder der IL-6-Familie signalisieren über Heterodimere von β -Rezeptor-Komplexen. Die Zytokine LIF, OSM, CNTF, CT-1 und NNT-1 signalisieren über gp130 und den LIF-Rezeptor (LIF-R) [16]. OSM kann auch einen heterodimeren Komplex aus gp130 und dem OSM-Rezeptor (OSM-R) bilden. IL-31 signalisiert über einen heterodimeren Komplex aus GPL (gp130-like-receptor) und dem OSM-R [21], IL-27 verwendet gp130 und WSX-1 [22].

Die Bindung an die β -Rezeptoren erfordert im Fall von IL-6, IL-11 und CNTF zunächst die Bindung an einen spezifischen α -Rezeptor, den IL-6-Rezeptor (IL-6R), den IL-11-Rezeptor

(IL-11R) bzw. den CNTF-Rezeptor (CNTF-R) [16]. Im Fall von CT-1 wird vermutet, dass auf neuronalen Zellen ein bislang nicht identifizierter Rezeptor existiert [23]. IL-27 und NNT-1 benötigen lösliche Rezeptoren für die Bindung an die β -Rezeptoren. IL-27 wird als präformierter Komplex aus dem Zytokin p28 und dem α -Rezeptor *Epstein-Barr-virus induced Gene 3* (EBI3) sezerniert [18, 22], während NNT-1 im Komplex mit dem löslichen Rezeptor *cytokine like factor-1* (CLF-1) oder dem löslichem CNTF-Rezeptor (sCNTF-R) sezerniert wird [12, 24-26].

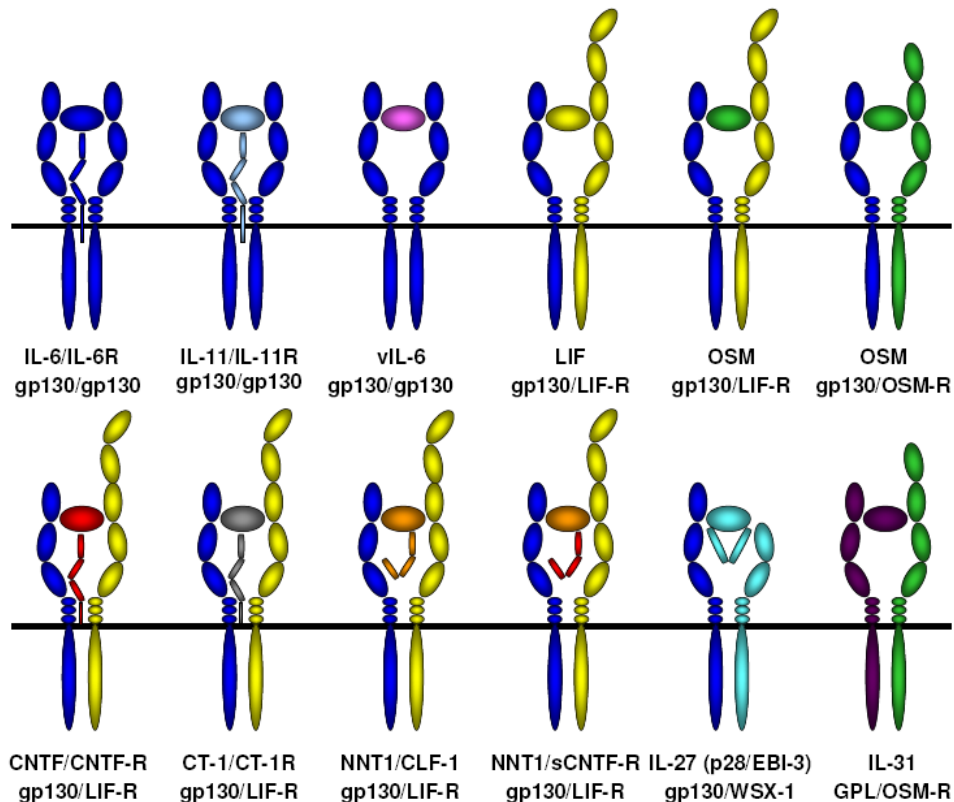


Abb. 1 Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe IL-6-artiger Zytokine:

Zur Gruppe der IL-6-artigen Zytokine zählen IL-6 (blau), IL-11 (hellblau), vIL-6 (pink), LIF (gelb), OSM (grün), CNTF (rot), CT-1 (grau), NNT-1 (orange), IL-27 (türkis) und IL-31 (lila).

Alle Zytokine der IL-6-Familie binden mindestens ein Molekül gp130 (blau). Einige der Zytokine benötigen für die Signaltransduktion zusätzliche β -Rezeptoren LIF-R (gelb), OSM-R (grün), Wsx-1 (türkis), GPL (lila) und/oder sie benötigen zur Bildung der Rezeptorkomplexe zusätzliche, nicht signaltransduzierende α -Rezeptoren, wie IL-6R (blau), IL-11R (hellblau), CNTF-R (rot), sCNTF-R (rot), CT-1 (grau), CLF-1 (orange) EBI-3 (türkis).

Ein weiteres Zytokin, das über gp130 Homodimere signalisiert, ist das dem IL-6 homologe virale Zytokin vIL-6, das vom humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) codiert wird. Es bindet gp130, ohne dass es jedoch zunächst einen α -Rezeptor binden muss [3]. Abb. 1 zeigt eine Übersicht der IL-6 Zytokinfamilie.

1.3.2 Signalkaskade IL-6-artiger Zytokine

Die Bildung der oben genannten multimeren Rezeptorkomplexe führt zur Aktivierung der Janus-Kinasen JAK1, JAK2 und TYK2, die konstitutiv an β -Rezeptoren gebunden sind. Die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich der β -Rezeptoren [27-29]. Nach der Phosphorylierung spezifischer Tyrosine der Rezeptoren dienen diese Tyrosinreste als Anlagerungsstellen für die *Src homology 2* (SH2) Domäne von Transkriptionsfaktoren der *Signal Transducer and Aktivator of Transkription-* (STAT-) Familie. Im Fall von IL-6 werden vorwiegend STAT3-Monomere rekrutiert und zu einem geringeren Maße STAT1-Monomere.

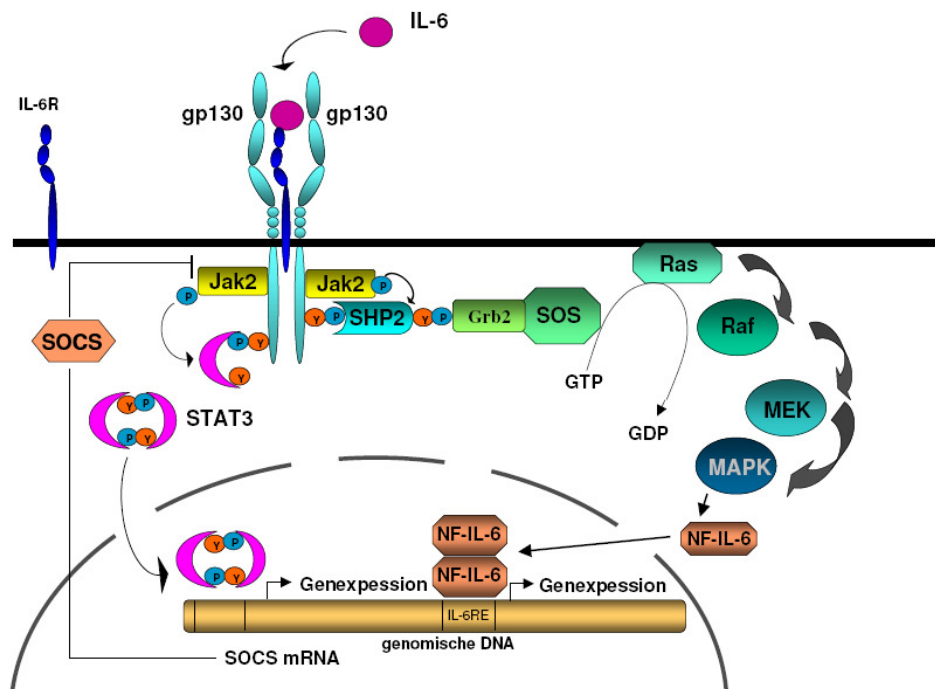


Abb. 2 Schematische Darstellung des JAK/STAT- und des MAP-Kinase-Signalwegs IL-6-artiger Zytokine:

IL-6 (lila) bindet an den IL-6R (blau) und gp130 (türkis). Die Bildung dieses Komplexes führt u.a. zur Aktivierung von JAK-Kinasen sowie der Aktivierung der Ras/Raf/MAPK-Kaskade. Phosphoryliertes und dimerisiertes STAT3 und NF-IL-6 aktivieren Zielgene im Zellkern.

Die Anlagerung der STAT-Monomere an den Rezeptor und ihre anschließende Phosphorylierung durch Janus-Kinasen führt zur Bildung von STAT-Dimeren. Diese Dimerisierung ermöglicht ihre Translokation in den Nukleus, wo sie als Transkriptionsfaktoren an spezifische Konsensussequenzen ihrer Zielgene binden und hierdurch die Genexpression beeinflussen. [29-35].

Zu den Zielgenen der STATs zählen u.a. die der *suppressors of cytokine signaling* (SOCS). Diese Proteine stellen entweder direkte Inhibitoren von Janus-Kinasen dar oder es sind

Kompetitoren für deren Bindungsstellen am Zytokinrezeptor, so dass die Janus-Kinasen nicht mehr binden können. Da die Gene, welche für die inhibitorischen SOCS-Proteine codieren, Zielgene der JAK-STAT-Signaltransduktion sind, handelt es sich um eine klassische negative *feedback*-Regulation [36].

Neben der Aktivierung von STATs erfolgt über Adapterproteine (SHP-2, GBR2 und SOS) eine Aktivierung des MAP-Kinase (*Mitogen Activated Protein Kinase*) -Signalweges und des PI3-Kinase (*Phosphoinositol-3-Kinase*) -Signalweges, wodurch die Transkriptionsfaktoren NF-IL-6 (*Nuclear Faktor IL-6*) und AP-1 (*Aktivator Protein-1*) aktiviert werden [36]. Eine Übersicht, des durch IL-6 aktivierten JAK/STAT sowie des Ras/Raf/MAPK Signalwegs ist in Abb. 2 dargestellt.

1.3.3 Der lösliche IL-6 Rezeptor

Neben der membrangebundenen Form existiert der IL-6R auch in einer löslichen Form die als *soluble* IL-6R (sIL-6R) bezeichnet wird [37]. Dieser lösliche Rezeptor besitzt die gleiche Bindungsaffinität zu gp130 wie die membrangebundene Form des Rezeptors [38].

Der sIL-6R kann durch alternatives Spleißen oder durch proteolytische Abspaltung von der Zelloberfläche gebildet werden. Dem durch alternatives Spleißen entstandenen löslichen IL-6R fehlt die Transmembrandomäne. Er unterscheidet sich am COOH Terminus um 14 Aminosäuren von der membranständigen Form des IL-6R und ist nicht in der Membran verankert [38-40].

Die proteolytische Spaltung des membrangebundenem IL-6R erfolgt auf der extrazellulären Seite der Transmembrandomäne durch Proteasen. Dieser Vorgang wird als *Shedding* bezeichnet [41]. Die in Säugetierzellen identifizierten, für das *Shedding* verantwortlichen Proteasen gehören zur Familie der *A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-* (ADAM-) Metalloproteinasen.

Eine Beteiligung am *Shedding* des IL-6R wurde für ADAM17, die auch als *TNF α -converting enzyme* (TACE) bezeichnet wird, und ADAM10 gezeigt [42, 43].

Während IL-6 nur Zellen stimulieren kann, die sowohl gp130 als auch den IL-6R exprimieren, ist der Komplex aus IL-6 und sIL-6R auch in der Lage Zellen zu stimulieren, die nur gp130 exprimieren (s. Abb. 3) [11, 44, 45]. gp130 wird von fast allen Körperzellen exprimiert. Hingegen ist die Expression des IL-6R auf Hepatozyten, Neutrophile, Monozyten/Makrophagen und einige Lymphozyten begrenzt [16, 46]. Die durch IL-6 und den sIL-6R vermittelte Signaltransduktion wird als *Transsignalling* bezeichnet [38]. Bei

Zelltypen, die ausschließlich durch IL-6/sIL-6R aber nicht durch IL-6 allein stimulierbar sind, handelt es sich z.B. um hämatopoetische Vorläuferzellen [45], endotheliale Zellen [47], Osteoklasten [48], glatte Muskelzellen [49] und neuronale Zellen [50, 51].

Eine Regulation des *Transsignallings* kann über die Freisetzung des löslichen IL-6R aber auch durch lösliches gp130 (sgp130) erfolgen [52].

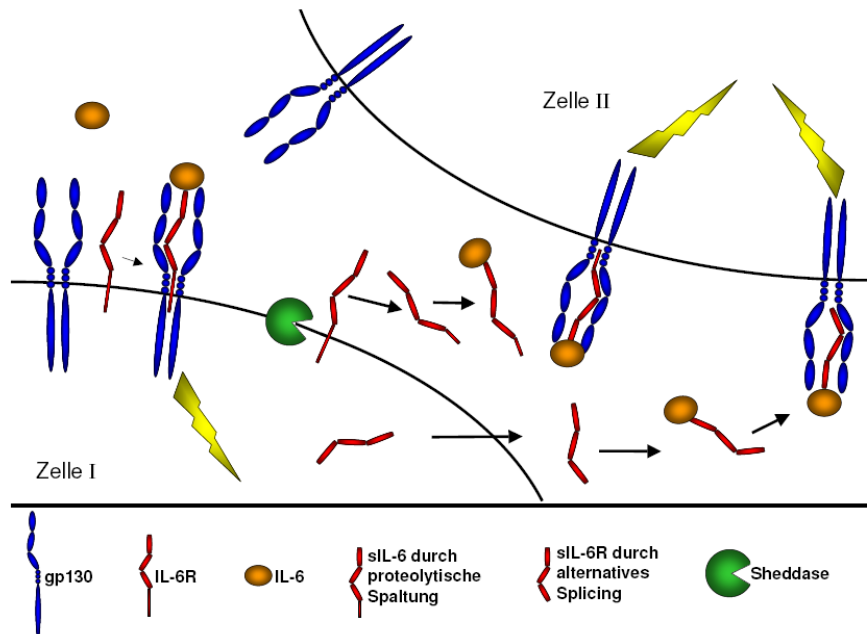


Abb. 3 Transsignalling durch den Komplex aus IL-6 und sIL-6R:

Die klassische Aktivierung von Zellen durch IL-6 erfolgt, indem IL-6 an den membrangebundenen IL-6R bindet, was zu einer Rekrutierung von gp130 und damit zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade führt. Der sIL-6R wird entweder durch alternatives Spleißen oder durch proteolytische Spaltung gebildet. Beide lösliche Formen des IL-6R können IL-6 binden und Zellen aktivieren, die keinen IL-6R exprimieren und somit normalerweise nicht durch IL-6 stimuliert werden können.

Während eine Freisetzung des sIL-6R wie beschrieben das *Transsignalling* stimuliert, verhindert sgp130 durch Bindung an den IL-6/sIL-6R-Komplex dessen Bindung an membrangebundenes gp130. Es ist also inhibitorisch wirksam. Hervorzuheben ist, dass sgp130 nur die Signalvermittlung über IL-6 und den löslichen IL-6R, also das *Transsignalling*, inhibiert. Die Bindung von IL-6 an den membrangebundenen IL-6R sowie eine hierdurch ausgelöste Signaltransduktion wird nicht beeinflusst da sgp130 nicht alleine an IL-6 binden kann [53].

1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung des IL-6 *Transsignallings*

IL-6 wurde ursprünglich als ein B-Zell-Differenzierungsfaktor (*B-cell stimulatory factor 2*, BSF-2) identifiziert [54, 55]. Es zeigte sich jedoch, dass es noch eine Vielzahl anderer Funktionen besitzt. Hierzu gehört, dass es die Differenzierung von Makrophagen [56],

Megakaryozyten [57] und Osteoklasten [58] induziert. In der Akute-Phase-Reaktion moduliert es in Hepatozyten die Transkription von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und Serum Amyloid A (SAA) [59, 60]. Ferner wirkt es als Wachstumsfaktor für epidermale Keratinozyten [61, 62] und für verschiedene Typen von Tumorzellen, wie z. B. für Zellen des multiplen Myeloms [63] und Kaposi-Sarkom Zellen [64].

Auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem Morbus Crohn, der Peritonitis, dem allergischen Asthma bronchiale und der rheumatoiden Arthritis, sowie bei entzündungsinduziertem Darmkrebs konnte eine Beteiligung von IL-6 gezeigt werden. Es wird davon ausgegangen, dass in diesen Fällen in erster Linie das IL-6-*Transsignalling* eine entscheidende Bedeutung hat [65-70].

1.4 Humanes Herpesvirus-8

Das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) oder Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) wurde erstmals 1994 von Chang *et al.* [71] in Kaposi-Sarkom Läsionen von AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)-Patienten identifiziert. Er gehört zur Gruppe der Gamma-Herpesviren und ist das erste humane Gamma-2 Herpesvirus (Rhadinovirus) das identifiziert wurde [72].

Seit der zunehmenden Verbreitung des HI-Virus (humaner Immundefizienz-Virus) wird auch eine Zunahme an HHV-8 Infektionen beobachtet. In der Allgemeinbevölkerung von Nordeuropa und Nordamerika liegt die Seroprävalenz bei ca. 0-20 % [73]. Im Vergleich hierzu ist die Seroprävalenz bei HIV-positiven homosexuellen Männern in Nordeuropa und Nordamerika deutlich erhöht. Sie liegt zwischen 20 und 70 % [73].

Das Genom vom HHV-8 besitzt eine Länge von 165-170 kb [74] und enthält ca. 95 offene Leserahmen [19]. Während einer latenten Infektion persistiert das Genom in einer episomalen Form. Während der lytischen Replikation werden durch „rolling circle“ Replikation lineare Formen gebildet [74]. Neben Strukturgenen trägt das HHV-8 Genom mehrere Gene, die Homologien zu zellulären Genen aufweisen. Es wird angenommen, dass das Virus sie vom Wirt über mRNA-Vorstufen erworben hat, da sie keine Introns besitzen [75]. Diese Gene besitzen Homologien zu zellulären Wachstumsfaktoren, Angiogenesefaktoren, antiapoptotischen Proteinen sowie Proteinen, die den Zellzyklus regulieren. Hierzu gehören beispielsweise vGPCR (konstitutiv aktives Homolog des IL-8 Rezeptors), vBCL2, vCyclin D und vIL-6.

Eine Infektion durch HHV-8 konnte *in vitro* für humane B-Zellen, epitheliale und endotheliale Zellen, sowie für Fibroblasten und Keratinozyten gezeigt werden [76-78].

1.4.1 HHV-8 assoziierte Erkrankungen

Seit seiner ersten Entdeckung in Kaposi-Sarkom Läsionen wurde das HHV-8 in allen Formen des Kaposi-Sarkoms nachgewiesen. Man unterscheidet hierbei zwischen dem klassischem Kaposi-Sarkom [79], dem endemischen Kaposi-Sarkom [80], dem Transplantations-assoziierten Kaposi-Sarkom [81], und dem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom [82].

Neben dem Kaposi-Sarkom ist das HHV-8 auch mit zwei B-Zell-lymphproliferativen Krankheiten assoziiert. Hierbei handelt es sich um das Primäre Effusions-Lymphom (*primary effusion lymphoma*, PEL) [83] sowie die multizentrische Form des Morbus Castleman (*multicentric Castleman's disease*, MCD) [84]. Weiterhin wird eine Rolle des HHV-8 auch im Zusammenhang mit verschiedenen anderen Krankheiten, wie z.B. dem Multiplen Myelom, diskutiert [85, 86].

1.4.1.1 Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom ist eine multifokale neovaskuläre Krankheit mit inflammatorischen Eigenschaften, die zum häufigsten malignen Tumor bei HIV-Infizierten geworden ist [82]. Alle Formen des Kaposi-Sarkoms zeigen die gleiche Histopathologie, die charakterisiert ist durch ein untypisches Gefäßsystem, das aus spindelförmigen Zellen und Ödemen besteht [87]. Aufgebaut sind Kaposi-Sarkom-Tumore in erster Linie aus spindelförmigen Zellen, die eine endotheliale Herkunft besitzen. Sie tragen die Oberflächenmarker eines lymphatischen Endotheliums. Außer in endothelialen Zellen wurde das HHV-8 auch in B-Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen [88-90].

1.4.1.2 Primäres Effusions-Lymphom

Das Primäre Effusions-Lymphom (PEL) ist ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom der Körperhöhlen. In den meisten Fällen liegt eine Koinfektion mit dem Epstein-Barr-Virus vor. Charakteristische Eigenschaften dieses Lymphoms sind die Beteiligung der pleuralen und perikardialen Körperhöhlen an lymphomatöse Effusionen ohne eine solide Tumormasse [91]. Die Lymphomzellen haben die meisten B-Zell assoziierten Antigene verloren, zeigen jedoch Neuordnungen von Immunglobulinomänen und verschiedene B-Zell-Marker [92, 93]. Für alle HIV positiven Fälle des PEL wird angenommen, dass sie eine Koinfektion mit dem

Epstein-Barr-Virus aufweisen. Hingegen liegt in HIV negativen Fällen allein eine Infektion mit HHV-8 vor [94]. Es wurden aber auch seltene Fälle ohne HHV-8-Infektion beschrieben [95].

1.4.1.3 Morbus Castleman

Der Morbus Castleman, auch als angiofollikuläre Lymphknotenhyperplasie bekannt, wurde erstmals 1956 von Benjamin Castleman [96] beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Lymphadenopathie die durch eine angiofollikuläre Hyperplasie sowie eine Endothelhyperplasie gekennzeichnet ist. Histologisch unterscheidet man zwischen der hyalin-vaskulären (80–90%) und der plasmazellulären (10–20%) Form. Klinisch erfolgt die Differenzierung in eine lokalisierte und eine multizentrische Erkrankung. Letztere ist durch eine Infiltration mit Plasmazellen, Fieber, Anämie, Hypergammaglobulinämie und einen Anstieg der Akute-Phase-Proteine gekennzeichnet [97]. Sie resultiert aus einer abnormalen Proliferation von B-Lymphozyten sowie Plasmazellen in lymphatischen Organen.

Eine Infektion mit HHV-8 konnte bei 100% der HIV assoziierten und 50% der nicht HIV assoziierten Fälle des Morbus Castleman nachgewiesen werden [84]. Zellen, die beim Morbus Castleman mit HHV-8 infiziert sind, liegen in der Mantelzone der Lymphknoten, sind größer als die sie umgebenden Lymphozyten und stammen von der B-Zelllinie ab.

Verschiedene Gruppen haben dem hIL-6 eine pathophysiologische Bedeutung für den Morbus Castleman zugeschrieben [98, 99].

1.5 Virales Interleukin-6

Virales IL-6 wird vom offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) K2 des HHV-8 Genoms codiert und besitzt 24,7 % Homologie zum humanen IL-6 (hIL-6) [19, 20, 75]. Die Kristallstruktur des vIL-6 im Komplex mit den extrazellulären Domänen D1D2D3 des gp130 zeigt, dass es die typische Faltung der Vier-Helix-Bündel-Zytokine besitzt [100].

Wie hIL-6 benutzt auch vIL-6 gp130 für die Signaltransduktion [101-103]. Sowohl für hIL-6 als auch für vIL-6 wurden die Bindungsepitope mit den Rezeptoren bestimmt. Humanes IL-6 bindet an seine Rezeptoren über drei Bindungsepitope, die als *Site I*, *Site II* und *Site III* bezeichnet werden [104, 105]. Die *Site I* wird durch den C-terminalen Teil der Helix D und der C-terminalen Region des AB-Loops gebildet und interagiert mit dem IL-6R. Die *Sites II* und *III*, die sich aus einigen AS-Resten aus dem Anfang der Helix A und der Helix C bzw. dem Anfang der Helix D, sowie dem ersten Teil des AB-Loops zusammensetzen, binden an

gp130 [106]. Die Kristallstruktur von vIL-6 gebunden an die extrazellulären Domänen D1, D2 und D3 von humanem gp130 (Abb. 4) zeigt, dass auch vIL-6 über die *Sites II* und *III* an gp130 bindet. Die *Site I* bleibt unbesetzt und sterisch zugänglich für andere Moleküle [100]. Eine Beteiligung des IL-6R wird jedoch nach wie vor diskutiert [101-103, 107, 108].

Unabhängig davon, ob der IL-6R an einer Signaltransduktion beteiligt ist, konnte jedoch gezeigt werden, dass auch ohne den IL-6R eine Signaltransduktion über gp130 erfolgen kann [101-103]. Somit besitzt vIL-6 gegenüber dem humanen IL-6 ein deutlich erweitertes Wirkungsspektrum, da gp130 im Gegensatz zum IL-6R von nahezu allen Körperzellen exprimiert wird.

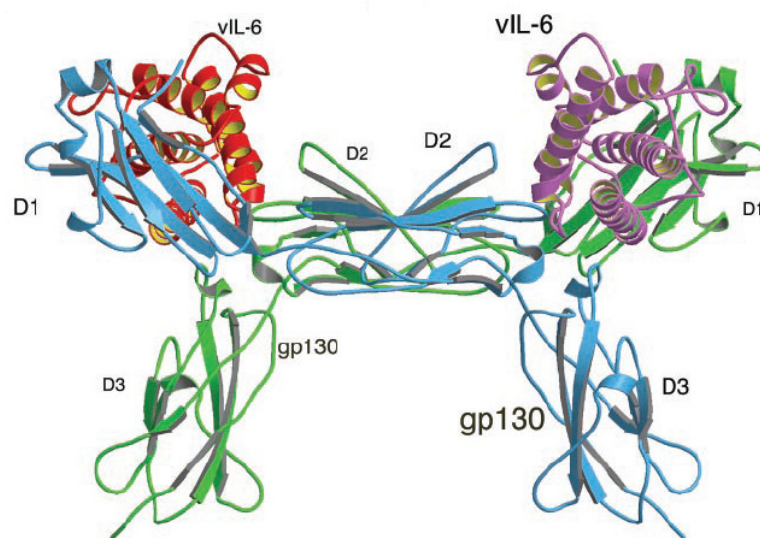


Abb. 4 Struktur des tetrameren Komplexes aus vIL-6 und gp130:
Bändermodell des vIL-6 im Komplex mit den Domänen D1D2D3 des gp130.
Die gp130 Moleküle sind blau und grün, vIL-6 ist pink und rot dargestellt.
Nach Chow *et al.* [100]

In einigen B-Zell Tumorklinen, die in ihrem Wachstum von IL-6 abhängig sind, kann IL-6 durch vIL-6 ersetzt werden. So ist rekombinantes vIL-6 in der Lage die IL-6 abhängige Maus Hybridomzelllinie B9 zur Proliferation anzuregen und deren Apoptose zu verhindern [20]. Gleiches gilt für die humane Myelom-Zelllinie INA-6 [107]. Im Vergleich zu hIL-6 sind jedoch 1.000 x höhere Konzentrationen von vIL-6 erforderlich.

In der Biologie des HHV-8 besitzt vIL-6 eine vielfältige Rolle für die Zellproliferation, die onkogene Transformation und die Immunantwort des Wirtes.

Die Bedeutung von vIL-6 für die Proliferation HHV-8 assoziierter B-Zell Lymphome wurde für PEL-Zelllinien gezeigt, die im Wachstum autokrin von vIL-6 und IL-10 aber nicht von hIL-6 abhängig sind [91]. Weiterhin besitzt vIL-6 die Fähigkeit Zellen direkt zu

transformieren, wodurch es auch potentiell zu einer HHV-8 vermittelten Onkogenese beitragen kann. Dies konnte von Aoki *et al.* [109] mittels Tumorformationsassays in Mäusen gezeigt werden. vIL-6 exprimierende NIH/3T3 Zellen wurden hierbei subkutan in die rechte Flanke von Nacktmäusen injiziert. Das exprimierte vIL-6 führte hierbei zu einer verstärkten Hämatopoese, Angiogenese und Hochregulation der Expression des Angiogenesefaktors VEGF (*vascular epidermal growth faktor*) [109], sowie zu einer verstärkten Tumorgenese. Ferner verursacht das rekombinante vIL-6 in den Mäusen eine deutliche Plasmazytose, die in ihrer Morphologie der Plasmazytose bei der plasmazellulären Variante des multizentrischen Morbus Castleman ähnelt.

Die Expression von vIL-6 in HHV-8 infizierten Zellen variiert sehr stark. So wurden in Zellen des Kaposi-Sarkoms deutlich weniger Kopien der vIL-6-mRNA ermittelt (im Mittel 40 Kopien pro Zelle) als in Zellen der MCD und des PEL (1790 bzw. 555 Kopien pro Zelle) [110]. Staskus *et al.* stellen daher die Hypothese auf, dass u.a. eine unterschiedlich starke Expression von vIL-6 für die Ausbildung der verschiedenen Krankheiten verantwortlich ist.

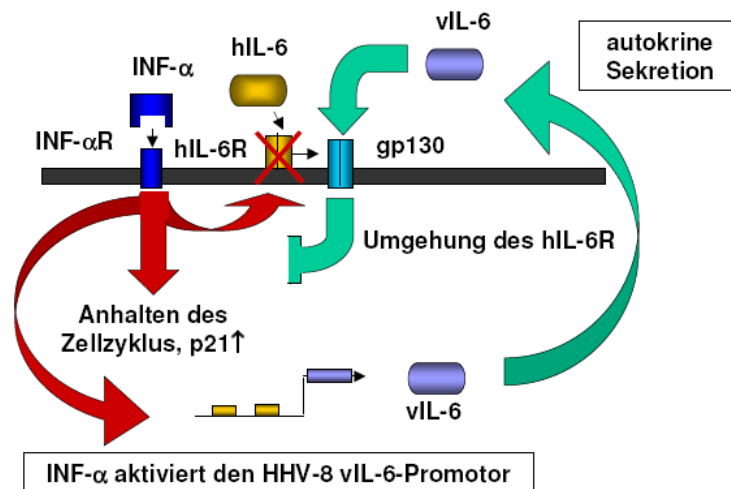


Abb. 5 Modell für eine von vIL-6 ausgelöste Inhibition der Signaltransduktion durch IFN- α , die in einer autokrinen Abhängigkeit der Zellen von vIL-6 resultiert.

Nach Chatterjee *et al.* [111]

vIL-6 besitzt jedoch nicht nur onkogenes Potential, sondern hilft dem Virus darüber hinaus die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen. Eine virale Infektion führt zur Expression von IFN- α , das die Expression von p21, einem Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDK), hochreguliert. Die Inhibition der CDKs führt zum Anhalten des Zellzyklus. Gleichzeitig wird die Expression des IL-6R herunterreguliert. Beide Effekte sind an einer Inhibition der Zellproliferation beteiligt. vIL6 umgeht diesen Mechanismus, indem es

die p21 Transkription blockiert und die Herabregulation des IL-6R umgeht, indem es direkt an die signaltransduzierende Einheit gp130 bindet (s. Abb. 5). Zusätzlich wird eine verstärkte Expression von vIL-6 sichergestellt, da der vIL-6 Promotor zwei durch IFN stimulierbare Promotorsequenzen besitzt [111].

1.6 Ziel und Konzept der Arbeit

Im Verlauf der zunehmenden Verbreitung des HI-Virus wurde ein vermehrtes Auftreten des bis dato sehr seltenen Kaposi-Sarkoms beobachtet und es konnte ein direkter Zusammenhang mit einer HHV-8-Infektion gezeigt werden. Weiterhin steht eine Infektion mit HHV-8 auch im Zusammenhang mit dem Primären Effusions-Lymphom sowie mit vielen Fällen der multizentrischen Form des Morbus Castleman.

Das vom HHV-8 codierte Zytokin vIL-6 besitzt Eigenschaften, die darauf hindeuten, dass es für die Pathophysiologie der genannten Krankheiten eine bedeutende Rolle spielt. Hierzu zählt seine Fähigkeit Zellen der humanen Myelom-Zelllinie INA-6 zur Proliferation anzuregen und ihre Apoptose zu verhindern. Weiterhin kann es Zellen direkt transformieren und besitzt die Fähigkeit, in Mäusen eine verstärkte Hämatopoese, Angiogenese sowie die Hochregulation der VEGF-Expression zu induzieren.

Durch die Überexpression von vIL-6 in transgenen Mäusen wird es möglich, die pathophysiologische Bedeutung des Zytokins ohne die Einflüsse der anderen ca. 60 viralen Gene zu untersuchen. Vorstellbar wäre ein durch vIL-6 bedingtes Auftreten von Symptomen, die an Morbus Castleman, Primäres Effusions-Lymphom oder Multiples Myelom erinnern. Im Fall des Auftretens solcher Symptome können die Tiere als Modell bei der Entwicklung von Therapieansätzen dienen.

Eine wichtige Rolle für die pathophysiologischen Eigenschaften des vIL-6 spielt wahrscheinlich auch das Bindungsverhalten des Zytokins an seinen Rezeptors gp130. So ist vIL-6 im Gegensatz zu IL-6 in der Lage ohne die Beteiligung des IL-6R an gp130 zu binden. Die durch vIL-6 vermittelte Signaltransduktion entspricht in dieser Hinsicht der des IL-6 *Transsignallings*, also der durch IL-6 und den sIL-6R vermittelten Signaltransduktion. Diese Eigenschaft des vIL-6 ermöglicht es dem HHV-8 die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen.

Eine weitere erst kürzlich erkannte Besonderheit des vIL-6 ist, dass es bereits innerhalb der Zelle an gp130 binden und hierbei eine Signaltransduktion auslösen kann. Im Gegensatz hierzu wurde für das humane IL-6 gezeigt, dass die Signaltransduktion durch seine

intrazelluläre Retention verhindert wird [112]. Dieser Unterschied zwischen IL-6 und vIL-6 könnte somit auch von pathophysiologischer Bedeutung sein.

In einem weiteren Projekt sollten daher vIL-6, IL-6 und Hyper-IL-6 (ein Designerzytokin, das sich aus hIL-6 und sIL-6R verbunden über einen flexiblen *Linker* zusammensetzt [113]) bezüglich ihrer Fähigkeit zur intrazellulären Bindung an gp130 und einer so vermittelten Signaltransduktion direkt miteinander verglichen werden. Hierzu wurde vIL-6, hIL-6 bzw. Hyper-IL-6 auf cDNA Ebene mit einem c-myc-Affinitäts-tag allein bzw. mit einem c-myc-Affinitäts-tag und der ER-Retentionssequenz KDEL fusioniert. Die zugrundeliegende Idee besteht darin, dass die Zytokine durch die KDEL-Sequenz in den Zellen zurückgehalten werden. Tritt in Zellen eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges auf, obwohl die Zytokine nicht mehr sezerniert werden, würde dies bedeuten, dass die Zytokine in der Tat bereits innerhalb der Zelle eine Signaltransduktion auslösen können. Die Klärung dieser Frage könnte große Bedeutung im Hinblick auf mögliche Therapieansätze haben. Die intrazellulär wirkenden Zytokine wären nicht für Therapien zugänglich, die gegen im Serum befindliche Zytokine gerichtet sind.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Es wurden, soweit erhältlich, ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades pro analysi der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen/Schnelldorf), Sigma Diagnostics, Inc. (St.Louis, USA), Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) und Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG (Heidelberg) verwendet.

2.2 Plasmide und Vektoren

pEGFP-N1	Takara Bio Europe/Clontech, 78100 Saint-Germain-en-Laye Frankreich
shIL-6R/PEPCK/ β glob.intron	Peters <i>et al.</i> [114]
pPEN-vIL-6*	kloniert in unserem Labor von Karl-Josef Kallen
pESL	ein in unserem Labor für die Verwendung des Gateway TM Systems veränderter Vektor.
pDCC	ein in unserem Labor für die Verwendung des Gateway TM Systems veränderter pCDNA3.1/Zeo Vektor (Invitrogen, Karlsruhe).
pESL-MAV-KDEL	Kovaleva <i>et al.</i> [115]
pBR322 hu Haptoglobin	Jostock <i>et al.</i> [116]
p163/7	Woodrooffe <i>et al.</i> [117]
050226pPCR-Script	GENEART GmbH, Regensburg
p409-vIL-6-His	Till Geib, Diplomarbeit zum Thema "Expression, Reinigung und Charakterisierung Interleukin-6-artiger Proteine" im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg- Universität Mainz 1999
pUC19-IL-6-PDI/KDEL	Rose-John <i>et al.</i> [112]

2.3 Bakterienstämme

Für Transformationen wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli* DH5 α von Invitrogen (Karlsruhe) und XL1-Blue von Stratagene (La Jolla, CA 92037 USA) verwendet.

2.4 Zytokine

Die Klonierung und Expression des Designerzytokins Hyper-IL-6 wurde von Fischer *et al.* [113] beschrieben.

Die Produktion des verwendeten IL-6 wurde von van Dam *et al.* [118] beschrieben.

Rekombinantes vIL-6 wurde in der EBNA1-293 epithelialen Nieren-Zelllinie (Invitrogen Life Technologies) produziert. Diese waren stabil mit dem episomalen Vector pCEP-Pu-flag-vIL-6-his transfiziert, der vIL-6 als ein His-tag Fusionsprotein codiert. Das virale IL-6 wurde anschließend über eine Ni-NTA-Agarose Säule gefolgt durch eine Elution mit 0,5 M Imidazol gereinigt [119].

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

- Anti-vIL-6 Kaninchenserum [102], 1:10.000
- Anti-c-myc monoklonaler Antikörper 9E10 (Forschungsgruppe Phytoantikörper, IPK, Gatersleben), 1:50
- Anti-STAT3 (124H6) Maus mAb (New England BioLabs, Frankfurt), 1:1.000
- Anti-Phospho-STAT3 (Tyr705) (58E12) Kaninchen mAb (New England BioLabs, Frankfurt), 1:2.000
- Anti-vIL-6 monoklonaler Antikörper v6m 12.1.1 [120]

2.5.2 Sekundärantikörper

- Anti-Kaninchen IgG (H+L) Peroxidase-konjugiert (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)
- Anti-Maus IgG (H+L) Peroxidase-konjugiert (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)
- Polyklonaler Anti-vIL-6 Antikörper [121]

2.6 Nukleinsäure- und Proteinstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

Prestained Protein Molecular Weight Marker 20 kDa bis 120kDa (Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

2.7 Radiochemikalien

Deoxyadenosin-5'-triphosphat, [α - 32 P], 3.000 Ci/mmol (MP Biomedicals GmbH, Eschwege)

2.8 Enzyme und Kits

Restriktionsendonukleasen, Alkalische Phosphatase (CIAP), T4-DNA-Polymerase, Polynukleotidkinase, *Taq*-Polymerase, *Pfu*-Polymerase und Klenow-Fragment wurden, sofern nicht anders angegeben, von MBI Fermentas Molecular Biology (St. Leon-Rot) bezogen. Die verwendete Omniskript Reverse Transkriptase stammt von Qiagen (Hilden).

2.9 Oligonukleotide (Primer)

AB101: 5'-GGG AAT TCC ATA TGT GCT GGT TCA AGT TGT TG-3'

AB402: 5'-GCA TCA GCA ACA GTC ACG GT-3'

AB601: 5'-CGA ATT CCC GGG TTA CTT ATC GTG GAC GTC AGG AGT C-3'

vIL-6-sense-*Xho*I: 5'-TAC TAC TCG AGG CCA CCA TGT GCT GGT TCA AGT-3'

vIL-6-rev-*Not*I: 5'-TAT TGC GGC CGC CTT ATC GTG GAC GTC AGG-3'

c-myc-rev-*Bam*HI: 5'-CGC GGA TCC CTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT-3'

SAA2-Forward: 5'-TCA CCA GCC TGG TCT TCT G-3'

SAA2-Reverse: 5'-CTG AGC TAA TAG GAG GAC G-3'

Oligo-dT: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden über die Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.10 Geräte und sonstige Materialien

Geräte	Hersteller
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Gelaire BSB 3A Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Gel-Blotting-Papiere (Whatman 3MM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Hera Cell Incubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Power Pack 300	BioRad, Laboratories GmbH, München
Robocycler Gradient 96	Stratagene GmbH, Heidelberg
SDS-PAGE und DNA-Gelkammern	BioRad, Laboratories GmbH, München
Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Televal 31 (Mikroskop)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, Laboratories GmbH, München
Injekt-F - Feindosierungsspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterikan Einmal-Injektions-Kanülen 0,40 x 20 / 27G x 3/4	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgte durch Restriktionendonukleasen. Diese bakteriellen Enzyme erkennen bestimmte Basensequenzen in einer doppelsträngigen DNA und schneiden beide Stränge an spezifischen Stellen. Häufig erkennen

Restriktionsendonukleasen Sequenzen aus vier bis acht Basenpaaren, die zumeist eine zweifache Rotationssymmetrie besitzen und spalten in dieser Region in beiden Strängen jeweils eine Phosphodiesterbindung.

Alle Restriktionsreaktionen erfolgten mit Restriktionsendonukleasen der Firma MBI Fermentas Molecular Biology, unter Verwendung des MBI Fermentas-Puffersystems, bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen.

Die Beendigung eines Restriktionsverdau wurde durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (10-30 min bei 65 °C) erreicht.

2.11.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um zu verhindern, dass ein Plasmid während der Ligation religiert, wurden die 5'-Enden des Vektors vor der Ligation dephosphoryliert. Dies erfolgte mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP), der Firma MBI Fermentas Molecular Biology. Da die während der enzymatischen Spaltung von DNA verwendeten Puffer nach Angabe des Herstellers auch für die Dephosphorylierung verwendet werden können, wurde dem Ansatz nach der Hitzeinaktivierung der Enzyme 1 U CIAP zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Es ist notwendig das Enzym vollständig zu inaktivieren oder zu entfernen, da es bei der folgenden Ligation auch das in den Vektor zu ligierende *Insert* dephosphorylieren würde. Hierzu wurden die DNA-Fragmente des gespaltenen Vektors auf einem Agarosegel elektrophoretisch voneinander getrennt und das entsprechende Fragment aus dem Gel über das QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.11.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Molekülen erfolgt durch Schließen der Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe durch eine DNA-Ligase. Für diese Reaktion benötigt die verwendete T4-DNA Ligase ATP als Kofaktor (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot). Wurde das Plasmid dephosphoryliert, können nur zwei Phosphodiesterbindungen, zwischen dem Plasmid und der inserierenden DNA, gebildet werden. Das Hybridmolekül besitzt somit zwei Einzelstrangbrüche, die erst nach der Transformation durch bakterielle Reparaturmechanismen geschlossen werden.

Ligationen erfolgten stets in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Der Gesamt-DNA-Gehalt lag bei ca. 0,2 µg, wobei das Verhältnis von Vektor zu inserierender DNA bei 1:3 liegen sollte.

Für einen Ligationsansatz wurden 1 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas Molecular Biology, St Leon-Rot) und 1 µl des mitgelieferten T4-DNA-Ligasepuffers eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT.

Bei Ligationen wurden verschiedene Kontrollen mit angesetzt: Zur Überprüfung der vollständigen Dephosphorylierung des Vektors wurde ein Ansatz mit Ligase und ohne *Insert* durchgeführt. Wegen der fehlenden 5'-Phosphatgruppe, können vollständig dephosphorylierte Vektoren nicht religieren. Durch einen Ansatz mit *Insert* aber ohne Ligase kann überprüft werden, ob der Vektor vollständig gespalten wurde. Nur ein ungespaltener, zirkulärer Vektor kann nach einer Transformation in Bakterien Kolonien bilden.

2.11.4 Klonierung mit dem Gateway-System

Die “Gateway™ Cloning Technology” ist ein System der Firma Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zur Klonierung und Subklonierung von DNA-Sequenzen. Es verwendet statt Restriktionsenzymen und Ligase eine ortsspezifische Rekombination, die auf der des Phagen λ basiert.

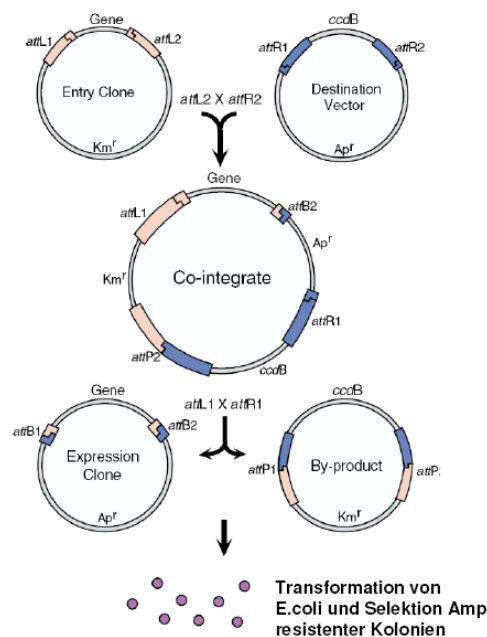


Abb. 6 Schematische Darstellung der Klonierung mit dem Gateway-System (Invitrogen).

Die gewünschte cDNA wird zunächst zwischen zwei Rekombinationssequenzen, die „attL-Sites“ (att, *attachment sites*), in einen „Eingangs-Vektor“ (*Entry Vector*, pESL) kloniert.

In einer anschließenden Rekombinationsreaktion (LR-Reaktion) schneiden Rekombinationsproteine rechts und links der cDNA, innerhalb der „attL-sites“, des „Entry Vectors“ und ligieren sie in die korrespondierenden „attR-sites“ im Ziel-Vektor (*Destination Vektor*, pDCC). Dabei entsteht das entsprechende Expressionsplasmid sowie ein Nebenprodukt. Über die Antibiotikum-Resistenz der Vektoren kann auf rekombinante Klone selektiert werden. Bakterien, die mit einem nicht-rekombinanten Entry Vector oder dem als Nebenprodukt entstandenen Plasmid transformiert werden, sind nicht lebensfähig, da diese Plasmide das *ccdB*-Gen enthalten, dessen Genprodukt die DNA Gyrase inhibiert. Gyrasehemmer beeinträchtigen die Replikation und damit die Bakterienvermehrung. Das Prinzip des Gateway-Systems ist in der Abbildung 6 schematisch dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.11.5 Transformation kompetenter Bakterien

Bakterien sind in der Lage fremde DNA aus dem Medium aufzunehmen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transformation. Diese DNA wird in den Bakterienzellen repliziert, sofern sie einen Replikationsursprung besitzt, der von der Bakterienzelle erkannt wird. Um *E. coli*-Bakterien aufnahmefähig (kompetent) zu machen müssen sie vorbehandelt werden. Dies erfolgte mit der Calciumchlorid-Methode. Hierbei wurde eine 400 ml Bakterienkultur bis zu einer OD_{595nm} von 0,6 herangezogen. Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C: Die Kultur wurde auf 4 °C abgekühlt und dann bei 3.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Bakterien in steriler $CaCl_2$ -Lösung (60 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerin und 10 mM PIPES pH 7,0) resuspendiert. Nach einer weiteren zweimaligen Zentrifugation und Resuspension in $CaCl_2$ -Lösung wurden die Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für eine Transformation wurden zu je 50 µl der, auf Eis aufgetauten, chemokompetenten Zellen 5 µl eines Ligationsansatzes bzw. 10 ng Plasmid-DNA pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C durchgeführt. In dieser Zeit nehmen die Bakterien die fremde DNA auf. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Ob ein Plasmid aufgenommen wurde zeigt sich anhand der Expression von einem auf dem Plasmid liegenden Antibiotikaresistenzgen. Wird dieses Gen exprimiert, so verleiht es den Wirtszellen eine entsprechende Resistenz. Während der Inkubation der Bakterien in LB-Medium beginnt die Replikation des Plasmids und die Expression des Resistenzgens. Im Anschluss hieran

wurden die Bakterien kurz zentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten, die mit geeigneten Antibiotika angereichert waren, ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Zur Expansion der über Nacht gewachsenen Kolonien wurden sie mit einer sterilen Pipettenspitze einzeln von der Platte gepickt und in antibiotikumhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnte die nun stark vermehrte Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert werden.

„Luria Bertani“-Bakterienmedium (LB):

10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 10 g Trypton
 ad 1 L Aqua dest.

LB-Agar-Platten:

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurden 15 g Agar-Agar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 1 Liter LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Nach Abkühlung des Agars auf ca. 60°C wurde dieser mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in sterile 10 cm Ø Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Tab. 1 Für LB-Agarplatten und LB-Flüssigmedium eingesetzte Antibiotikumkonzentrationen

2.11.6 Plasmid-DNA-Minipräparation

Die Plasmid-DNA wurde aus Bakterienkulturen über die Methode der alkalischen Lyse gewonnen. 1 ml der Übernacht-Kultur wurde bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Das hierin enthaltene EDTA komplexiert Magnesiumionen und schwächt hierdurch die Zellwand.

Durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer, der das anionische Detergens SDS enthält, und zweimaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes, wurden die Bakterienzellen lysiert. Die Neutralisierung der Lösung durch Zugabe von 150 µl des sauren Kaliumacetats führt zur Renaturierung der Plasmid-DNA. Die genomische DNA verklebt jedoch mit den Proteinen und kann durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm von der Plasmid-DNA getrennt werden. Die in der Präparation nach wie vor vorhandene RNA wurde durch Zugabe von 2 µl RNase (10 µg/ml, Boehringer, Mannheim) für 1 h bei RT entfernt. Abschließend erfolgte eine Reinigung der Plasmid-DNA durch Ausschütteln mit 450 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe). Die organischen Lösungsmittel fällen Proteine, während die Nucleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wurde die wässrige Phase mit der Nucleinsäure vorsichtig abgenommen und die DNA durch Zugabe von 900 µl Ethanol (96 %) präzipitiert. Die gefällte DNA wurde abschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Aqua dest. resuspendiert.

Resuspensionspuffer:

50 mM	Glucose
10 mM	EDTA (pH 8,0)
25 mM	Tris-HCl pH 8,0
4 mg/ml	Lysozym

Neuralisierungspuffer:

60 ml	5 M Kaliumacetat
11,5 ml	Eisessig
28,5 ml	Aqua dest.

Lysis-Puffer :

0,2 N	NaOH
1 %	SDS

2.11.7 Plasmid-DNA-Midi-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in größerer Menge und mit höherer Reinheit wurde das Nucleobond®AX-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurden 100 ml Kulturen angesetzt und für die folgenden Schritte jeweils die doppelte Menge an Puffern verwendet. Während der alkalischen Lyse der Bakterien denaturiert sowohl die Plasmid-DNA als auch die chromosomale DNA. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird der pH-Wert neutralisiert und die Plasmid-DNA renaturiert. Die genomische DNA verklebt mit den gefällten Proteinen. Die Isolierung der Plasmid-DNA

erfolgt bei diesem Kit mit Hilfe eines Anionenaustauscherharzes. Als Matrix dienen großporige Siliciumkügelchen, die an Methyl-Ethylamin-Gruppen gekoppelt sind. An diese funktionellen Gruppen binden die Nukleinsäuren mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen. Durch mehrere Waschschrte wird die DNA von Proteinen, Kohlenhydraten etc. gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mittels 1 M KCl.

2.11.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei von ihrer Größe, ihrer Konformation, sowie der Zusammensetzung des Gels ab. Kleine, lineare Fragmente durchlaufen die Gelmatrix schneller als größere, zirkularisierte Fragmente. Die DNA wurde abhängig von ihrer Größe auf Agarosegelen (0,7–1,5 %) getrennt. Für die Gele wurde die entsprechende Menge Agarose (Eurogentec s.a., Seraing, Belgien) in 0,5 x TBE Puffer gelöst. Die DNA wurde mit 1/6 ihres Volumens 6 x DNA-Ladepuffer gemischt. Dieser enthält Glycerol, durch das die Dichte der DNA-Suspension erhöht wird. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 Volt über einen Zeitraum von 50 min durchgeführt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde der Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) verwendet. Zur Detektion der DNA wurde dem Gel 3,8-diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridium Bromid (Ethidiumbromid), in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, zugefügt. Ethidiumbromid interkaliert spezifisch in doppelsträngige DNA und fluoresziert wenn es UV-Licht von ≥ 300 nm ausgesetzt wird.

5 x TBE-Puffer:

0,45 M	Tris
0,44 M	Borsäure
0,01 M	0,5 M EDTA, pH 8,0

6 x DNA-Ladepuffer:

10 mM	Tris/HCl (pH 7.6)
0,03 %	Bromophenol Blau
0,03 %	Xylencyanol FF
60 %	Glycerol
60mM	EDTA

2.11.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz zwischen zwei

Oligonukleotiden (Primern). Voraussetzung hierfür ist die Information über die Basensequenz beiderseits des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Eine PCR untergliedert sich in drei sich zyklisch wiederholende Reaktionsschritte [122]:

- Denaturierung (Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA)
- Hybridisierung (Anlagerung der Primer an die DNA)
- DNA-Synthese (Synthese der komplementären DNA-Stränge)

Die Denaturierung der DNA ermöglicht die Anlagerung von zur DNA-Sequenz komplementären Primern. Diese dienen als Startpunkte für die Synthese der komplementären DNA-Stränge entlang der Matrize durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Durch zyklische Wiederholung dieser Schritte wird die Sequenz zwischen den Primern exponentiell amplifiziert.

Abhängig von der weiteren Verwendung der PCR-Produkte wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Diente die PCR zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen, wurde die *Taq* DNA-Polymerase (rekombinant) (5 U/μl) (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) verwendet. Diese thermostabile DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Sie besitzt eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität, eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, jedoch keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Sollte das PCR-Fragment kloniert werden, wurde *Pfu*-Polymerase (2,5 U/μl) (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) verwendet. Diese Polymerase wurde aus *Pyrococcus furiosus* isoliert und besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine Korrekturaktivität erlaubt. Ihre Fehlerrate/Base liegt bei ca. 10^{-6} und ist somit um den Faktor 100 niedriger als die der *Taq*-Polymerase.

Standard-Reaktionsansatz (50μl Endvolumen):

5 μl	10 x PCR-Puffer
1 μl	dNTP-Mix (10 mM)
1 μl	<i>Sense</i> -Primer (50 pM)
1 μl	<i>Reverse</i> -Primer (50 pM)
50-100 ng	DNA
1 U	DNA-Polymerase
ad 50 μl	Aqua dest.

Das Profil der PCR-Reaktion wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes und der Stringenz, mit der die Primer an die DNA-Matrize binden, individuell angepasst. Hierbei geht man von einer DNA-Syntheserate von ca. 2.800 Nukleotiden pro min bei der *Taq*-Polymerase und ca. 550 Nukleotiden pro min bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase aus. Die Stringenz, mit der die Primer an die DNA binden, steigt mit Zunahme der Temperatur im zweiten Schritt der PCR.

PCR-Profil:

95 °C 5 min	50-62 °C 1 min	72 °C 60-120 s	1 Zyklus
94°C 1 min	50-62 °C 1 min	72 °C 60-120 s	28-35 Zyklen
95 °C 1 min	50-62 °C 1 min	72 °C 10 min	1 Zyklus

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA 92037 USA) durchgeführt.

2.11.10 RT-PCR

In einer Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) wird zunächst aus mRNA eine cDNA (*complementary*-DNA) mit Hilfe einer Reversen Transkriptase geschrieben und dann der gewünschte Abschnitt mit einer PCR amplifiziert. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen aus Retroviren. Wie andere DNA-Polymerasen auch, transkribiert die Reverse Transkriptase DNA in 5'→3'-Richtung und kann die Kettensynthese nicht *de novo* beginnen. Als Primer für die reverse Transkription dient daher ein oligo(dT)-Primer, der mit der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle paart. Durch die reverse Transkription entstehen einzelsträngige DNA-Moleküle. In einer anschließenden PCR kann ein gewünschter Abschnitt einer cDNA amplifiziert werden. Die reverse Transkription von mRNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) und oligo(dT)-Primern (0,4 µg/µl). Zum Nachweis einer

spezifischen Amplifikation von cDNA in der PCR wurde jeweils ein Ansatz mit und einer ohne RNA Reverse Transkriptase durchgeführt. Die RNA wurde wie unter 2.11.12 beschrieben isoliert.

Die PCR erfolgte nach dem unter 2.11.9 beschriebenen Standardprotokoll, wobei 1 µl der cDNA eingesetzt wurde.

2.11.11 Southern-Blot

Die Methode des Southern-Blots wurde verwendet, um ein Transgen in der genomischen DNA transgener Mäuse nachzuweisen. Außerdem diente er zur Unterscheidung heterozygoter und homozygoter transgener Tiere.

Der Southern-Blot ermöglicht es, DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren. Einzelne DNA-Fragmente können im Anschluss mittels Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch nachgewiesen werden.

2.11.11.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von Mäusen

Für die Isolierung genomischer DNA wurden zunächst Schwanzbiopsien genommen. Hierzu wurden die Mäuse kurzzeitig mit Halothan narkotisiert und mit einer Schere ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten. Die Schwanzbiopsien wurden über Nacht bei 55°C in 600 µl „Tailpuffer“ (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl₂) mit 30 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml → 30 ≥ U/mg) auf einem Schüttler verdaut. Unverdautes Material wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde mit 600 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und für 10 min bei 4°C über Kopf geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 600 µl Chloroform versetzt und erneut für 10 min bei 4°C über Kopf geschüttelt. Für die abschließende Fällung der DNA wurde der Ansatz zunächst für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen. Die Fällung der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 100 µl 5 M NaCl₂ und 800 µl Ethanol (96 %). Nach 30 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm wurde die DNA mit 800 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Ethanol wurde abgenommen, die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 30-40 µl sterilem Aqua dest. gelöst.

2.11.11.2 Enzymatische Spaltung und elektrophoretische Trennung genomischer DNA-Fragmente

5 oder 10 µg genomischer DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 60 U Enzym (*Nco*I) über Nacht bei 37°C verdaut und die dabei entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel (0,7 %) voneinander getrennt.

2.11.11.3 Vorbereitung des Gels und Blotten genomischer DNA

Vor dem Blotten ist es notwendig das Gel vorzubehandeln. Hierbei wurde es zunächst für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Bei diesem Schritt wird die DNA teilweise depuriniert und zerbricht in kleinere Fragmente, wodurch das Blotten größerer DNA-Fragmente erleichtert wird. Im Folgenden wurde das Gel zweimal für 15 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl) inkubiert, was zur Trennung des DNA Doppelstranges führt. Abschließend erfolgte eine 10minütige Inkubation in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl, pH 8 / 1,5 M NaCl) sowie in 10 x SSC (1,5 M NaCl / 0,15 M NaCitrat, pH 7,0).

Der Transfer der DNA aus dem Gel auf eine Nylon-Membran (Hybond-N, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) erfolgte mittels eines Kapillar-Blots. Hierbei wird ein Hochsalzpuffer (10 x SSC, s.o.) unter Ausnutzung der Kapillarkräfte durch das Gel in einen Stapel Zellstoff gesogen. Die DNA wandert hierbei mit und bindet über ihre negativ geladenen Phosphatgruppen an die positiv geladene Membran. Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran 5 min in 5 x SSC gewaschen und bei 65°C getrocknet. Zur endgültigen Fixierung der DNA auf der Membran wurde sie mit 120 mJ UV-Licht bestrahlt. Bei diesem Prozess, der auch als *UV-cross-linking* bezeichnet wird, werden kovalente Bindungen zwischen der DNA und der Membran gebildet.

2.11.11.4 Hybridisierung der Membran

Die Sonden für den Southern-Blot wurden mit dem Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene, La Jolla, CA 92037 USA) synthetisiert. Hierzu wurden 50 ng der Matrizen-DNA mit 10 µl der im Kit enthaltenen Zufallsprimern versetzt, mit Aqua dest. auf 34 µl aufgefüllt, 5 min gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierbei binden die Primer an die DNA und liefern somit die Startpunkte für die später folgende DNA-Synthese. Nachdem der Ansatz abgekühlt war wurde er kurz zentrifugiert und mit 10 µl 5 x dATP-Puffer versetzt. Durch Zugabe von 5 µl radioaktiv markierter Nukleotide [α -³²P]-dATP (3.000 Ci/mmol) (MP Biomedicals GmbH, Eschwege) und 1 µl Exo(-) Klenow-Enzym (5 U/µl) wurde die Synthese

der Sonden gestartet. Nach einer Synthesedauer von 10 min bei 37°C wurde die Reaktion mit dem Stop-Mix beendet. Um freie Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen, wurden die Sonden über ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Um eine unspezifische Bindung der Sonde an die Membran zu verhindern, wurde sie zunächst eine Stunde mit *Churchbuffer* [123] bei 65°C blockiert. Dieser Vorgang wird auch als Prähybridisierung bezeichnet. Nach der Prähybridisierung wurde der *Churchbuffer* verworfen. Die Sonde wurde 5 min auf 95°C erwärmt um einzelsträngige Sonden zu erhalten und dann 5 min auf Eis inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 20 ml *Churchbuffer* in einem Hybridisierungsofen mit drehendem Rotor bei 65°C über Nacht.

Nach der Hybridisierung ist es notwendig unspezifisch gebundene Sonden durch Waschen der Membran zu entfernen. Diese Stringenzwaschungen erfolgten zunächst mit 2 x SSC + 0,1 % SDS für je 15 min bei 65°C und im Anschluss zweimal mit 0,1 x SSC + 0,1 % SDS für je 10 min bei 65°C. Nach den Stringenzwaschungen wurde die Membran auf Kodak BioMax MS Röntgenfilmen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) exponiert.

Die Entwicklung der Filme erfolgte mit der Entwicklerlösung G150 sowie der Fixierlösung G354 der Firma Agfa (Agfa, Köln).

20 x SSC:

3 M NaCl
0,3 M tri-Natriumzitat-Dihydrat, pH 7,0

Churchbuffer:

500 mM NaP_i pH 7,2
7 % SDS
1 % BSA
1 mM EDTA

1M Na P_i: a) 0,99 M NaH₂PO₄ x 2 H₂O
b) 1,12 M Na₂PO₄ x H₂O
⇒ 20 ml a) + 85 ml b) pH auf 7,2 einstellen

2.11.12 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben oder Zellen wurde das NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet. Um eine Degradierung der RNA zu verhindern, erfolgt die Lyse der Zellen bzw. der Gewebe in Puffern mit einem hohen Gehalt an chaotropen Ionen. Hierdurch werden RNasen inaktiviert und gleichzeitig

Bedingungen geschaffen, die eine Bindung der RNA an Silica-Membranen ermöglichen. Um DNA in der Präparation zu eliminieren, wurde sie mit DNase I behandelt.

Gewebe wurden vor der Lyse gemäß Protokoll in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zerrieben. 30 mg des Gewebes wurde dann in 350 µl Puffer (RA1) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol lysiert, durch Zentrifugation durch NucleoSpin® Filter homogenisiert und mit 350 µl Ethanol (70 %) versetzt.

2.11.13 Northern-Blot

Die Methode des Northern-Blots wurde dazu verwendet, die Expression des Transgens vIL-6 oder aber von den Akute-Phase-Proteinen, SAA2 und Haptoglobin auf Ebene der Transkription, also der mRNA nachzuweisen. Das Prinzip ist hierbei das gleiche wie beim Southern-Blot. Die RNA-Moleküle werden durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt, auf eine Nylon-Membran übertragen und die entsprechenden Transkripte mittels radioaktiv markierter Sonden detektiert. Die Isolierung von RNA erfolgte wie unter 2.11.12 beschrieben. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden alle Lösungen, sowie das verwendete Wasser, über Nacht bei 37°C mit 1/200 Volumen Diethylpyrokarbonat (DEPC) (Fluka, Buchs, Schweiz) behandelt. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität von RNasen zerstört wird. Abschließend wurden die Lösungen autoklaviert. Hierbei zerfällt DEPC in CO₂ und Ethanol.

2.11.13.1 Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Trennung der RNA-Moleküle erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, da RNA zur Bildung von Sekundärstrukturen neigt, welche die Laufeigenschaften sowie die Hybridisierung mit den Sonden beeinflusst.

Für das Agarosegel wurde 1 g Agarose in 62 ml mit DEPC behandeltem Aqua dest. gelöst, auf ca. 60°C abgekühlt, und dann mit 20 ml 5 x MOPS-Puffer, 18 ml Formaldehyd (37%) und 1 µl Ethidiumbromid versetzt.

Die RNA, 5 µg in einem Volumen von 5 µl, wurde vor der Trennung mit 15,5 µl RNA Probenpuffer versetzt, 15 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Vor dem Beladen des Gels wurden zu den Proben 2 µl RNA Ladepuffer gegeben.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 75 V (ca. 5 V pro cm Elektrodenabstand) in 1 x MOPS-Puffer.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in DEPC-Aqua dest. gewaschen bis kein Formaldehyd mehr unter UV-Licht sichtbar ist und dann für 45 min mit 20 x SSC inkubiert. Das Blotten und Hybridisieren der RNA erfolgte wie für den Southern-Blot (2.11.11) beschrieben. Auch die Auswertung der Blots erfolgte wie unter 2.11.11 beschrieben.

5 x Formaldehyd Gel-Laufpuffer (MOPS-Puffer):

0,1 M MOPS pH 7,0
 40 mM Natriumacetat
 5 mM EDTA, pH 8,0

RNA Probenpuffer:

2 µl 5 x MOPS-Puffer
 3,5 µl Formaldehyd, 37 %
 10 µl Formamid

RNA Ladepuffer:

50 % Glycerin
 1 mM EDTA pH 8,0
 0,4 % Bromphenolblau

2.12 Zellbiologische Methoden

2.12.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in DMEM (1 x) High Glucose (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 10 % FCS, 60 mg/l Penicillin, sowie 100 mg/l Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Entsprechend ihres Wachstums wurden die Zellen alle 3-5 Tage kokultiviert. Adherente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mittels Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) von den Kulturplatten abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Medium verworfen, die Zellen in einer geeigneten Menge resuspendiert und auf neue Kulturschalen ausgesät.

Für die Kultivierung der Zellen wurden die Zellkulturplatten „Cell⁺ TC dishes“ (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verwendet. Sollten HepG2-Zellen transfiziert werden, wurden sie zuvor auf CELLSTAR[®] Zellkulturplatten (Greiner Bio-One GmbH, Essen) ausgesät.

Für eine längere Lagerung von Zellen wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden ca. 5 x 10⁶ Zellen in Einfriermedium (50 % FCS, 10 % DMSO, 40 % Standardmedium) aufgenommen und in einer isolierten Box mehrere Stunden bei -20°C vorgekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und

dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden sie mit 37°C warmen Medium versetzt und in 10 ml Standardmedium ausgesät.

2.12.2 Zelllinien

COS-7: Grüne Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), Nebennierenrinde

HepG2: human (*Homo sapiens*), hepatozelluläres Karzinom

NIH/3T3: murin (*Mus musculus*), Embryo

Alle Zelllinien wurden von ATCC (American Type Culture Collection) über die LGC Promochem GmbH (Wesel) bezogen.

2.12.3 Transfektion von Säugerzellen

2.12.3.1 Transiente Transfektion von COS-7- und HepG2-Zellen mit DEAE-Dextran

Die Transfektion mit dem Dextranderivat Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran beruht darauf, dass DNA an Polykationen gebunden wird und diese Dextran-DNA-Komplexe von Zellen per Endozytose aufgenommen werden.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag so *gesplittet*, dass sie am Tag der Transfektion zu 80% konfluent waren. Das Kulturmedium wurde entfernt und durch Standardmedium mit 75 mM Chloroquin ersetzt. Zu der zu transfizierenden Plasmid-DNA (5 µg in 435 µl Standardmedium (DMEM) plus 75 µM Chloroquin) wurden unter leichtem Schütteln tropfenweise 65 µl DEAE-Dextran (4 mg/ml in PBS) zugefügt. Nach Zugabe der DNA-Dextran-Komplexe zu den Zellen wurden diese für 4-6 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen, für 7 min bei RT durch DMEM mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) ersetzt und einmal mit PBS gewaschen bevor die Zellen in DMEM weiter kultiviert wurden.

2.12.3.2 Transiente Transfektion von NIH/3T3-Zellen mit LipofectamineTM2000

Für die transiente Transfektion von NIH/3T3-Zellen wurde das Transfektionsreagenz LipofectamineTM2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Das Prinzip dieser Transfektionsmethode liegt darin, dass das Lipofectamin mit seinen positiv geladenen Komponenten DOSPA (ein polykationisches Lipid) und DOPE (ein Phospholipid)

eine Komplexbildung mit der negativ geladenen DNA eingeht (DNA-Lipidkomplex). Der hydrophobe Anteil des Komplexes ist in der Lage, mit der Zellmembran zu fusionieren, und es kommt zur Freisetzung der DNA in der Zelle.

2.12.3.3 Stimulation von HepG2-Zellen in Kultur mit Zytokinen

Eine Stimulation von HepG2-Zellen erfolgte mit den Zytokinen hIL-6, Hyper-IL-6 und vIL-6. Um Hintergrundsignale durch Faktoren im Standardkulturmedium zu unterdrücken, wurden die zu stimulierenden Zellen 4 h vor der Stimulation 3 x mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden sie in Medium ohne FCS kultiviert. Für die Stimulation wurden die Zytokine in auf 37°C vorgewärmtem Standardmedium ohne FCS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und für 10 min zu den Zellen gegeben (37°C). Nach der Stimulation wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, das PBS abgesogen und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 4°C und 1.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die Zellen entweder in einer geeigneten Menge Laemmli-Puffer resuspendiert und 5 min auf 95°C erwärmt oder für eine spätere RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Neben der Stimulation von außen sollte auch eine Stimulation von Zellen durch Zytokine nachgewiesen werden, die von ihnen selbst exprimiert wurden. In diesem Fall wurden die Zellen statt für 4 Stunden für 24 Stunden ohne FCS kultiviert. In dieser Zeit wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt.

2.13 Biochemische Methoden

2.13.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) -Gelelektrophorese dient der Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die meisten Proteine binden das anionische Detergens SDS und bilden mit ihm Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein), wodurch ihre Ladung maskiert wird. Die Mobilität der Proteine im SDS-Gel ist hierdurch linear mit dem Logarithmus ihrer molaren Masse korreliert. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine mit 2 x Laemmli-Puffer [124] versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Das Mercaptoethanol im Laemmli-Puffer führt zu einer Reduktion von Disulfidbrücken und bewirkt zusammen mit dem SDS eine Denaturierung der Proteine. Ein SDS-Gel besteht aus den folgenden Komponenten:

Polyacrylamid (30 % Acrylamid (w/v) und 0,8 % Bisacrylamid (w/v)) und Tetramethylethlendiamin (TEMED), einem organischen Amin, das die Radikalbildung initiiert. Weiterhin enthält es Ammoniumpersulfat (APS), welches die Startradikale, die für die Polymerisation nötig sind, liefert und SDS. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurde der Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) 20-118 kDa verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 Volt für ca. 1 h in 1x Elektrophoresepuffer.

10 x SDS-PAGE –Puffer:

1,92 M Glycin

0,25 M Tris

1 % SDS

2 x SDS Ladepuffer (Laemmli-Puffer)

100 mM Tris/HCl, pH 6,8

4 % SDS

0,002 % Bromphenolblau

20 % Glycerin

4 % 2-Mercaptoethanol

Sammelgel 5%

5,7 ml

2,5 ml

1,7 ml

100 µl

100 µl

10 µl

Sammelgel 7,5%:

4,9 ml

2,5 ml

2,5 ml

100 µl

100 µl

10 µl

Aqua dest.

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Polyacrylamid

10 % SDS

10 % APS

TEMED

Trenngel 7,5%

4,9 ml

2,5 ml

2,5 ml

100 ml

100 ml

10 ml

Trenngel 12,5%

3,75 ml

3 ml

5 ml

120 µl

120 µl

6 µl

Aqua dest.

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Polyacrylamid

10 % SDS

10 % APS

TEMED

2.13.2 Western-Blot

Ein Western-Blot dient dazu zuvor elektrophoretisch voneinander getrennte Proteine auf eine Membran zu transferieren. Die auf der Membran gebundenen Proteine sind dann für hochmolekulare Liganden wie z.B. Antikörper frei zugänglich. Als Membran wurde die Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran Hybond-P (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet. Vor dem Blotten wurde sie auf die Größe der Gele zugeschnitten und für je zwei Minuten in Methanol, Aqua dest. und Transferpuffer inkubiert. Auf die Blot-Apparatur wurden vier Lagen mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere, die Membran, das Gel sowie nochmals vier Lagen Filterpapier blasenfrei übereinander gelegt. Das Blotten erfolgte mit 15 Volt für 90 min.

10 x Transferpuffer:

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

Der 1 x Transferpuffer wurde vor Gebrauch mit 20 % Methanol versetzt.

2.13.3 Indirekte Immunfärbung

Die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine können mittels der indirekten Immunfärbung nachgewiesen werden. Hierbei werden Antikörper eingesetzt, die Proteine spezifisch binden. Bei der indirekten Immunfärbung wird noch ein zweiter Antikörper eingesetzt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und außerdem an eine Peroxidase gekoppelt ist. Zum Nachweis der Peroxidase wurde das Chemilumineszenz Detektionskit ECL PlusTM (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran möglichst auszuschließen, müssen die nach dem Proteintransfer verbleibenden Bindungsstellen blockiert werden. Hierzu wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran 2 x 5 min mit Antikörperpuffer gewaschen und dann mit in Antikörperpuffer verdünntem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran 1 x 15 min und 3 x 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde für eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Nachdem die Membran abschließend dreimal für 15 min mit TBS-Tween und fünfmal für

5 min mit TBS gewaschen wurde, erfolgte die Entwicklung des Blots mit dem „ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents“ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Hierzu wurde die Membran 5 min mit ECL-Lösung überschichtet und dann zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Hyperfilm™ ECL™ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

TBS:

50 mM Tris/HCl, pH 7,6
200 mM NaCl

TBS-Tween:

50 mM Tris/HCl, pH 7,6
200 mM NaCl
0,05 % Tween-20

Blockierlösung:

50 mM Tris/HCl pH 7,6
200 mM NaCl
6 % Milchpulver oder BSA

Antikörperpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,6
200 mM NaCl
0,05 % Tween-20
1 % Milchpulver oder BSA

2.13.4 Gewinnung von Serum aus Mäuseblut

Zur Gewinnung von Serum aus Mäuseblut wurden die Mäuse mittels Halothan getötet und direkt nach Eintritt des Todes eine Herzpunktion durchgeführt. Das so gewonnene Blut wurde nachdem es über Nacht bei 4°C geronnen war 5 min bei 4°C und 5.000 rpm zentrifugiert. Das Serum konnte danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.13.5 ELISA

In einem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wird eine Antigen-Antikörperreaktion mit einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen und wurde in dieser Arbeit für den Nachweis und die Quantifizierung von vIL-6 im Blutserum von transgenen Mäusen

verwendet. Es werden drei verschiedene Varianten des ELISAs unterschieden, wobei die sogenannte Sandwich-Variante durchgeführt wurde. Es werden hierbei zwei Antikörper verwendet, die an zwei unterschiedliche Epitope eines Antigens binden. Der Nachweis erfolgt schließlich mit einem Antikörper, der gegen den Fc-Teil des zweiten Antikörpers gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt ist.

2.13.6 vIL-6-ELISA

Der vIL-6 ELISA wurde nach Aoki *et al.* [121] durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der monoklonale Antikörper v6m 12.1.1 in einer Verdünnung von 4 µg/ml auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Mikrolon, Greiner Bio-One GmbH, Essen) gegeben (je 200 µl) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung erfolgte mit dem sogenannten „Coatingbuffer“. Anschließend wurde die Platte 1x mit Waschpuffer gewaschen und freie Bindungsstellen mit „Superblock Blocking Buffer/PBS“ (Kat# 37515, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) abgesättigt (30 min bei RT). Im folgenden Schritt wurden die Serumproben auf die Platte gegeben, wobei das Serum zunächst auf 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt wurde. Als Konzentrationsstandard wurde mit Verdünnungspuffer verdünntes, rekombinantes vIL-6 verwendet. Die Inkubation mit Serum erfolgte über Nacht bei RT. Als sekundärer Antikörper wurde ein aus Kaninchen gewonnener polyklonaler anti-vIL-6 Antikörper verwendet, der mit Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml eingestellt wurde. Als Nachweisantikörper wurde ein aus Ziegen gewonnener gegen Kaninchen gerichteter Antikörper verwendet, der an eine Peroxidase gekoppelt ist (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn). Die Inkubation erfolgte mit einem 1:400 verdünnten Antikörper für 2 h bei RT. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurde die Mikrotiterplatte 4x mit Waschpuffer gewaschen. Der Farbnachweis erfolgte mit dem chromogenen Peroxidasesubstrat BM blue (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Reaktion wurde nach 2 min durch Zugabe von 1,8 M H₂SO₄ gestoppt und anschließend die OD bei 450 nm bestimmt.

Coatingpuffer: 0,1 M NaHCO₃, pH 9,0

Waschpuffer: PBS, pH 7,4
0,05 % Tween 20

Verdünnungspuffer: PBS, pH 7,4
0,5 % BSA
0,05 % Tween 20

2.14 Generierung von vIL-6 transgenen Mäusen

2.14.1 Isolation und Reinigung der Expressionskassette aus dem Plasmid pEPCK-vIL6* Δ BamHI

Das Plasmid pEPCK-vIL6* Δ BamHI wurde für zwei Stunden mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI bei 37°C geschnitten und die Bande für das zu injizierende Konstrukt (ca. 2.600 bp) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Elution der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem GeneClean-Kit (Bio101). Das gereinigte Konstrukt wurde über Nacht gegen sterilfiltrierten Mikroinjektionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4 und 0,1 mM EDTA) dialysiert.

Für die Injektion wurde das fertige Konstrukt auf eine Konzentration von 2 ng/ μ l eingestellt.

2.14.2 Pronukleusinjektion von DNA

Die Pronukleusinjektion erfolgte in CB6F2 (zweite Generation eines Hybridstamms der durch die Verpaarung von weiblichen BALB/c- mit männlichen C57BL/6-Mäusen generiert wurde) Zygoten, wobei die DNA in einer Konzentration von 2 ng/ μ l injiziert wurde. Die überlebenden, injizierten Zygoten wurden nach einer Stunde Inkubation in Tag 0,5 pseudoträchtige CB6F1 (erste Generation eines Hybridstamms, generiert durch die Verpaarung von weiblichen BALB/c- mit männlichen C57BL/6-Mäusen) *Foster*-Mäuse (Ammen) retransferiert. Die Mikroinjektion der DNA erfolgte bei der genOway Germany GmbH (Hamburg).

2.14.3 Nachweis des Transgens in genomischer DNA durch PCR

Zum Nachweis des Transgens in genomischer DNA durch PCR wurde diese auf eine Konzentration von 25 ng/ μ l verdünnt. Als Startoligonukleotide wurden die Primer AB402 und AB601 verwendet, so dass in der PCR ein 1.015 bp langes Fragment amplifiziert wurde (vergl. Abb. 7).

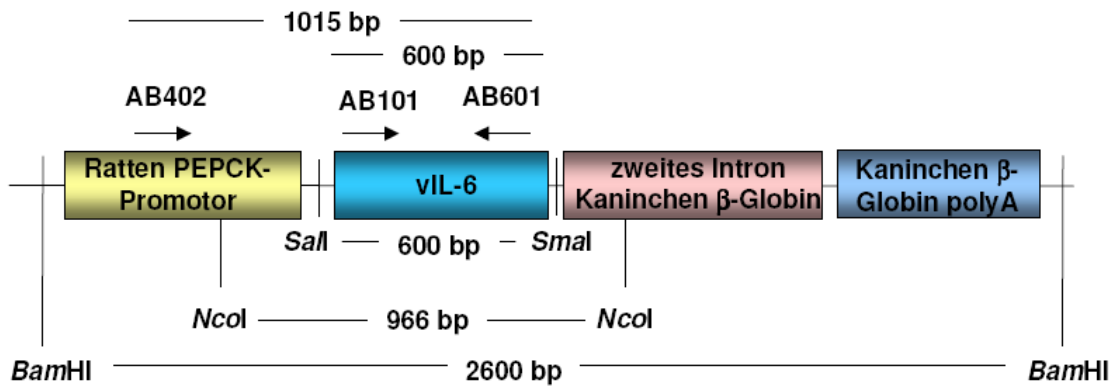


Abb. 7 Bindungsstellen von Primern und Restriktionsstellen des für die Generierung transgener Tiere verwendeten Konstrukts.

Reaktionsansatz:

2 µl	DNA
5 µl	10x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄
2 µl	Taq-Polymerase (rekombinant, 5 U/µl)
1 µl	AB402 (50 pM)
1 µl	AB601 (50 pM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
38 µl	Aqua dest.

PCR-Protokoll:

95°C	65°C	72°C	
5 min	1 min	1 min	1 Zyklus
1 min	1 min	1 min	30 Zyklen
1 min	1 min	10 min	1 Zyklus

2.14.4 Nachweis des Transgens in genomischer DNA durch Southern-Blot

Für den Nachweis des vIL-6 Transgens durch einen Southern-Blot wurden 5 oder 10 µg genomischer DNA mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* verdaut, mit DNA-Ladepuffer versetzt und komplett auf einem Agarosegel (0,7 %) aufgetrennt. Die getrennten DNA-Fragmente wurden auf eine Nylon-Membran übertragen und mittels einer ³²P markierten Sonde nachgewiesen. Zur Herstellung der Sonde wurde das pEPCk-vIL-6 Konstrukt mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *SalI* verdaut, das ca. 600 bp lange für vIL-6 kodierende Fragment aus einem Agarosegel isoliert und anschließend für die Synthese der Sonden eingesetzt. Durch die Spaltung der genomischen DNA mit *NcoI* entsteht bei transgenen Mäusen ein 966 bp großes Fragment, das durch die Sonde im Southern-Blot detektiert wird (vergl. Abb. 7). Weitere Einzelheiten zur Durchführung eines Southern-Blots sind unter 2.11.11 gegeben.

Restriktionsansatz für genomische DNA:

5 oder 10 µg	genomischer DNA in max. 30 µl Aqua dest.
4 µl	10x Tango™ Puffer
3 µl	<i>NcoI</i> (10 U/µl)
ad. 40 µl	Aqua dest.

2.14.4.1 Bestimmung der ins Genom integrierten Kopien eines Transgens

Die Anzahl der ins Genom integrierten Kopien des Transgens lässt sich anhand parallel zur genomischer DNA aufgetragener Plasmid-DNA in einem Southern-Blot abschätzen. Hierzu ist es notwendig zu wissen wie groß die Masse der ins Genom integrierten Transgen-DNA in einer bestimmten Menge genomischer DNA ist, wenn eine Kopie pro Chromosomensatz integriert wurde. Dies lässt sich anhand der folgenden Rechnung bestimmen.

$$\frac{\text{Masse Transgen}}{(\text{X}) \text{ Masse genomischer DNA}} = \frac{\text{A x bp Transgen}}{\text{B x bp Chromosomensatz}}$$

Masse Transgen-DNA: Masse der in X µg genomischer DNA enthaltenen Transgen-DNA, wenn eine Kopie pro Chromosomensatz integriert ist.

A: Anzahl der Kopien des Transgens in X µg genomischer DNA

B: Anzahl der in X µg genomischer DNA enthaltenen Chromosomensätze

Sofern eine Kopie des Transgens ins Genom integriert wurde, ist die in einer bestimmten Menge genomischer DNA vorhandene Anzahl (A) der Kopien des Transgens genauso groß wie die Anzahl (B) der Chromosomensätze ($A = B$). Es ergibt sich die folgende Gleichung:

$$\frac{\text{Masse Transgen - DNA}}{(\text{X}) \text{ Masse genomischer DNA}} = \frac{\text{bp Transgen}}{\text{bp Chromosomensatz}}$$

Masse Transgen-DNA = Masse der in X µg genomischer DNA enthaltenen Transgen-DNA, wenn eine Kopie pro Genom integriert ist.

Das diploide Genom der Maus besitzt eine Größe von 5×10^9 bp [125] und das Transgen setzt sich aus 2.600 bp zusammen. Dies bedeutet, dass 10 µg genomischer DNA 5,2 pg Transgen-DNA enthalten.

Im durchgeführten Versuch wurden 100 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Diese besitzt 8.200 bp wovon 2.600 bp durch das Transgen gestellt werden. Somit hat die Masse des Transgens im Plasmid einen Anteil von $2.600/8200 = 0,317$. Hieraus lässt sich berechnen, dass 31,70 pg des Transgens aufgetragen wurden ($100 \text{ pg} \times 0,317 = 31,70 \text{ pg}$). Dies entspricht bezogen auf 10 µg genomischer DNA ca. 6 pro Chromosomensatz integrierter Kopien ($31,70 \text{ pg} / 5,2 \text{ pg} = 6,1$).

In einem Southern-Blot lässt sich durch Vergleich der Bandenstärken hiermit, anhand parallel zur genomischen DNA aufgetragener Plasmid-DNA, die Anzahl der ins Genom integrierten Kopien des Transgens abschätzen. 100 pg Plasmid-DNA entsprechen ca. 6 in ein Genom integrierten Kopien sofern 10 µg genomische DNA aufgetragen werden. Gleiche Bandenstärken bedeuten somit, dass ca. 6 Kopien des Transgens ins Genom einer transgenen Maus integriert wurden.

2.14.5 Tierhaltung

Die transgenen und die für Rückkreuzungen benötigten Wildtyp-Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVC) im Viktor-Hensen-Haus der Vorklinischen Institute der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gehalten. Die Gruppengröße in den Käfigen betrug 2-5 Tiere. Ein 12 h hell/dunkel Zyklus über Kunstlicht ersetzte den normalen Tag/Nacht-Zyklus. Die Raumtemperatur betrug $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit lag bei $60 \% \pm 5 \%$. Pelletiertes und sterilisiertes Alleinfutter

(R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Leitungswasser stand den Tieren *ad Libitum* zur Verfügung (Zusammensetzung des Futters s. Anhang 9.1). Die Einstreu der Käfige bestand aus Fichten-/Tannen-Granulat (S 8-15-bedding, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und wurde einmal pro Woche gewechselt.

Der Tierraum wurde ausschließlich mit Schutzkleidung, bestehend aus Kittel, Haube, Überschuhen, Mundschutz und Handschuhen, betreten.

2.14.6 Zucht der transgenen Mäuse

Zum Aufbau einer Zucht wurden die heterozygoten transgenen *Founder* (erste transgene Mäuse, die eine transgene Linie begründen) mit C57BL/6-Mäusen (Charles River WIGA Deutschland GmbH, Sulzfeld) verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden genotypisiert und Mäuse, die das Transgen in ihrem Genom trugen für die Aufrechterhaltung der Zucht bzw. für weitere Versuche verwendet.

2.14.7 Zucht und Test auf homozygote transgene Mäuse

Zur Generierung homozygoter transgener Tiere wurden von den einzelnen transgenen Linien heterozygote Tiere miteinander verpaart. Die Nachkommen aus diesen Verpaarungen wurden nicht nur darauf getestet ob das Transgen ins Genom integriert ist, sondern auch, ob die Tiere homo- oder heterozygot für das Transgen sind. Für eine erste Überprüfung wurde ein Southern-Blot mit exakt gleichen Mengen genomischer DNA durchgeführt. Homozygote und heterozygote Tiere können hierbei durch die Signalstärke im Blot unterschieden werden. Da homozygote Tiere das Transgen auf beiden homologen Chromosomen integriert haben, während heterozygote das Transgen nur auf einem Chromosom tragen, ist das durch das Transgen hervorgerufene Signal bei homozygoten Tieren doppelt so stark wie bei heterozygoten. Tiere, die im Southern-Blot als homozygot identifiziert worden waren, wurden mit C57BL/6-Mäusen verpaart, d.h. rückgekreuzt. Nach Mendel wird jeweils eines der Chromosomen an ein Nachkommen weitergegeben. Im Falle von homozygoten Tieren bedeutet dies, dass alle Nachkommen einer Verpaarung zwischen einem homozygoten transgenen Tier und einem Wildtyp-Tier heterozygot für das Transgen sind. Ob alle Nachkommen heterozygot und damit transgen waren, wurde durch einen Southern-Blot überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 vIL-6-transgene Mäuse

Für eine nähere Untersuchung des pathophysiologischen Potentials von vIL-6 wurden transgene Mäuse generiert, die vIL-6 in der Leber exprimieren.

3.1.1 Expressionsvektor für die Expression von vIL-6 in transgenen Mäusen

Das verwendete Expressionsplasmid pEPCK-vIL-6* Δ BamHI beruht auf dem für die Generierung sIL-6R transgener Mäuse von Peters *et al.* verwendeten Plasmid [114]. Bei diesem wurde die cDNA des sIL-6R durch die Spaltung mit *SalI* entfernt. Zur Eliminierung der im Plasmid pEN-vIL-6* enthaltenen *BamHI* Restriktionsstelle wurde das Plasmid durch Spaltung mit *BamHI* geöffnet, die Überhänge durch die T4-Polymerase aufgefüllt und religiert. Dies war notwendig, da die *BamHI*-Restriktionsstelle bei der Isolierung der Expressionskassette verwendet werden sollte. Anschließend wurde das *SalI/XhoI*-Fragment des Plasmids pEN-vIL-6*, das die cDNA des vIL-6* beinhaltet, in das geöffnete Plasmid kloniert. Die Bezeichnung vIL-6* beruht darauf, dass im vIL-6 die *EcoRI*-Restriktionsstelle durch eine Mutation des Codons GAA zu GAG zerstört wurde. Durch die Mutation blieb die Aminosäuresequenz unverändert, da beide Codons für die Aminosäure Glutamat (E 103 im vIL-6) codieren. Die cDNA des vIL-6 wurde von PD Dr. F. Neipel und Prof. Dr. B. Fleckenstein (Uni Erlangen) zur Verfügung gestellt.

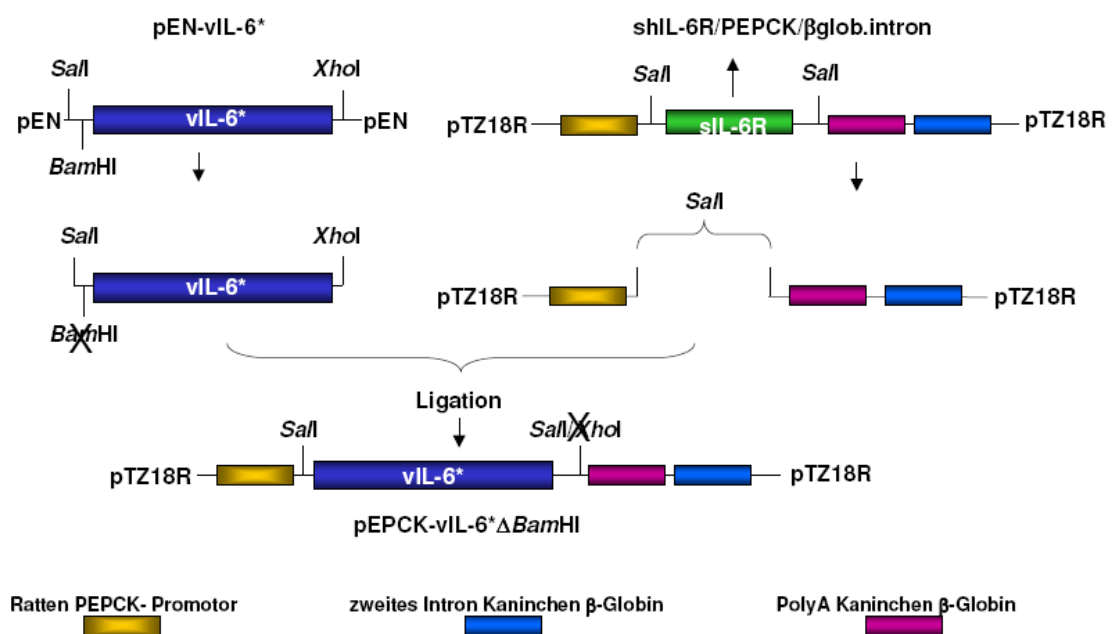


Abb. 8 Klonierungsschema des Vektors pEPCK-vIL-6* Δ BamHI

Die transkriptionelle Kontrolle der Expression des vIL-6 erfolgt in diesem Vektor durch den Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase- (PEPCK-) Promotor der Ratte. Als zentrales Enzym der Gluconeogenese katalysiert die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Oxalacetat. Da der PEPCK-Promotor erst neonatal aktiv ist, können Einflüsse des Transgens erst nach der Geburt auftreten [126].

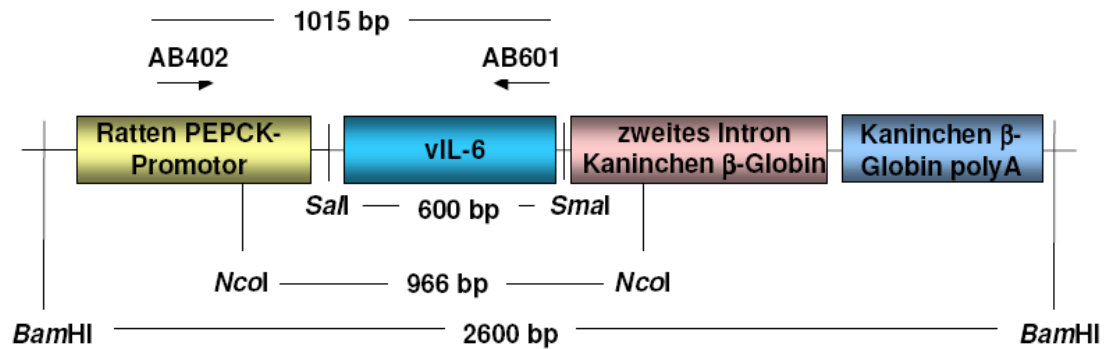


Abb. 9 Aufbau des für die Generierung transgener Mäuse verwendeten BamHI-Fragments des Plasmids pEPCK-vIL-6*ΔBamHI:

PEPCK-Promotor der Ratte (gelb), vIL-6 (blau), zweites Intron des Kaninchen β-Globingens (rot), polyA-Signal des Kaninchen β-Globingens (dunkelblau), AB402 und AB601 sind für die Genotypisierung verwendete Primer.

Die Expression über den PEPCK-Promotor erfolgt spezifisch in der Leber und in der Niere [127]. Hierbei war es das Ziel eine systemische Akkumulation des vIL-6 zu erreichen. Eine solche Akkumulation wurde von Peters *et al.* [128] für den löslichen IL-6 Rezeptor bei Verwendung des gleichen Expressionsvektors gezeigt.

Abb. 9 zeigt den Aufbau und die für die Expression relevanten Bereiche des Expressionsplasmids. Das vIL-6 steht unter der transkriptionellen Kontrolle des PEPCK-Promotors der Ratte (rat PEPCK-Promotor). Weiterhin beinhaltet das Transgen das zweite Intron des Kaninchen β-Globin-Gens sowie das Polyadenylierungs-Signal des Kaninchen β-Globin-Gens. Eine Polyadenylierung erhöht die Stabilität der mRNA [129] und stimuliert die Proteinexpression. Auch die Integration eines Introns in ein Transgen führt in vielen Fällen zu einer Verstärkung der Expression [130-132].

3.1.2 Expression des vIL-6 in Zellkultur

Vor der Verwendung des Expressionsvektors pEPCK-vIL-6*ΔBamHI für die Generierung transgener Mäuse sollte seine Funktion in Säugerzellen überprüft werden. Dazu wurden HepG2-Zellen transient mit dem Plasmid pEPCK-vIL-6*ΔBamHI transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1 ml Laemmli-Puffer lysiert. Die Proteine

der Zelllysate wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt und mit dem Gel ein Western-Blot durchgeführt. Der Nachweis des vIL-6 erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper v6m 12.1.1 [120].

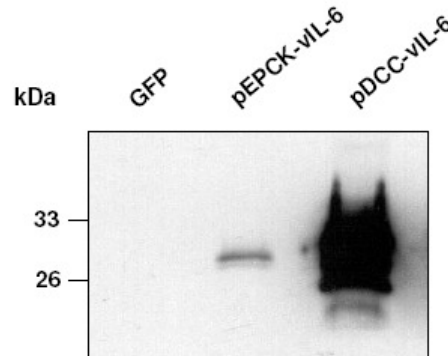


Abb. 10 Nachweis der Expression von vIL-6 in HepG2-Zellen: Western-Blot mit Lysaten von HepG2-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden pEGFP-N1 (GFP), pDCC-vIL-6-c-myc (pDCC-vIL-6) und pEPCK-vIL-6* Δ BamHI (pEPCK-vIL-6) transfiziert wurden.

Als Kontrolle wurden HepG2-Zellen mit pEGFP-N1 und pDCC-vIL-6-c-myc (s. 3.2) transfiziert. Der Expressionsvektor pDCC verfügt über einen CMV- (Cytomegalievirus) Promotor, der in HepG2-Zellen für eine starke Proteinexpression verantwortlich ist.

Sowohl in Zellen, die mit dem Plasmid pDCC-vIL-6-c-myc, als auch in solchen, die mit dem Plasmid pEPCK-vIL-6* Δ BamHI transfiziert wurden, lässt sich vIL-6 nachweisen (s. Abb. 10). Das virale Zytokin ist als eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa im Western-Blot nachweisbar. Es handelt sich um eine spezifische Bande da in GFP transfizierten Zellen keine entsprechende Protein-Bande nachweisbar ist. In der Positivkontrolle (pDCC-vIL-6-c-myc) sind drei spezifische Banden zu sehen. Hierbei handelt es sich um verschiedene Glykosylierungsformen des vIL-6 [133].

Es konnte gezeigt werden, dass vIL-6 über das verwendete Expressionsplasmid pEPCK-vIL-6* Δ BamHI in Säugerzellen exprimiert wird. Somit wurde das entsprechende Fragment des Plasmids für die Generierung transgener Mäuse verwendet.

3.1.3 Mikroinjektion des Transgens in Vorkerne

Nachdem das Transgen wie unter 2.14.1 beschrieben gereinigt worden war, wurde es in 247 CB6F2 (zweite Generation eines Hybridstamms generiert durch die Verpaarung von weiblichen BALB/c- mit männlichen C57BL/6-Mäusen) Zygoten injiziert. Von diesen

Zygoten überlebten 148. 133 überlebende Zygoten, in die das Transgen injiziert worden war, wurden nach einer Stunde Inkubation in pseudoträchtige CB6F1 (erste Generation eines Hybridstamms generiert durch die Verpaarung von weiblichen BALB/c- mit männlichen C57BL/6-Mäusen) Ammen (*Foster-Mäuse*) retransferiert. 33 der als *Offspring* bezeichneten Nachkommen wurden anschließend auf die Integration des Transgens in ihr Genom getestet (Genotypisierung).

3.1.4 Genotypisierung transgener Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte zunächst durch eine PCR. Hierfür wurde die genomische DNA aus einer Schwanzbiopsie isoliert und 50 ng der DNA für die PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer (Ab402 und AB601) binden im Bereich des Promotors und dem 3'-Ende des vIL-6 (vergl. Abb. 9). In der PCR wird somit bei transgenen Tieren ein Bereich mit einer Länge von 1.015 bp aus der genomischen DNA amplifiziert. Es wurden 33 Tiere auf die genomische Integration des Transgens getestet. Vier der getesteten Tiere wurden als transgen identifiziert. Unter den Tieren 1-10 wurden keine transgenen Tiere identifiziert (keine Abb.). Von den getesteten Tieren 11-19 wurde das Tier Nummer 11 als ein transgenes Tier identifiziert. Wie in Abb. 11 zu sehen, wurde in der mit 11 gekennzeichneten Spur ein DNA-Fragment in der erwarteten Größe von 1.015 bp detektiert.

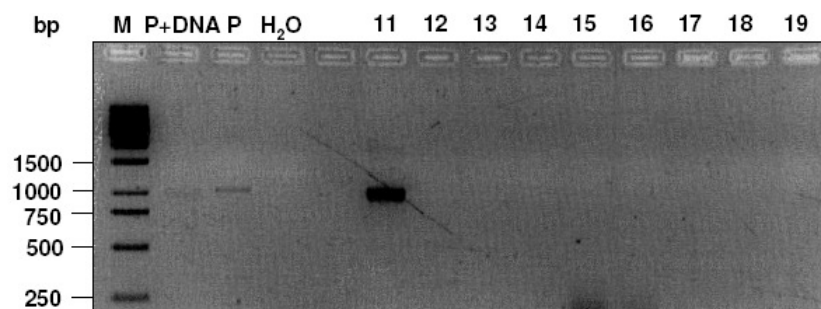


Abb. 11 Identifizierung der *Founder*:

PCR mit 50 ng genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie. Die PCR erfolgte mit den Primern AB402 und AB601.

M: Marker, P: Plasmid (pEPCK-vIL-6* Δ BamHI), P+DNA: Plasmid + 50 ng genomische Wildtyp-DNA, 11-19: Nach Pronukleusinjektion geborene Nachkommen.

Von den Tieren 20-33 wurden die Tiere 24, 25 und 26 als transgen getestet. So waren in den mit 24, 25 und 26 bezeichneten Spuren DNA-Fragmente der erwarteten Größe zu detektieren (Abb. 12). Eine zusätzliche Bestätigung der Integration des Transgens durch einen Southern-Blot wird im Abschnitt 3.1.5 gezeigt.

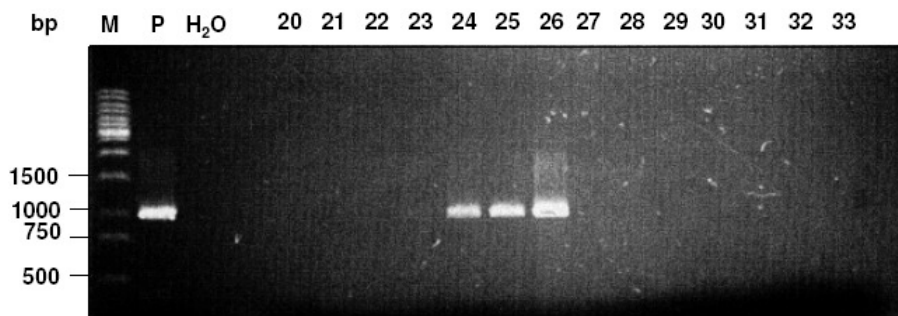


Abb. 12 Identifizierung der *Founder*:

PCR mit 50 ng genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie. Die PCR erfolgte mit den Primern AB402 und AB601.

M: Marker, P: Plasmid (pEPCK-vIL-6* Δ BamHI), 20-33: Nach Pronucleus-injektion geborene Nachkommen.

Nach der Identifizierung der *Founder* wurde bei ihnen eine Infektion mit Nematoden der Ordnung Oxyurida festgestellt. Diese machte eine Sanierung der Mäuse durch einen Embryonentransfer notwendig. Bei einem Embryonentransfer werden einem trächtigen Weibchen unter steriler Atmosphäre die Embryonen entnommen und in scheinträchtige Ammen implantiert. Hierdurch ist es möglich, einen Tierstamm bezüglich seines momentanen pathogenen Erregerrepertoires zu sanieren. Nach der Sanierung konnten drei transgene Linien etabliert werden, die entsprechend der Nummer der *Founder* als Linie 11, 25 und 26 bezeichnet wurden. Aus der Verpaarung der Maus Nummer 24 mit C57BL/6-Mäusen gingen keine transgenen Nachkommen hervor.

3.1.5 Vergleich der Kopienzahl des Transgens in den vIL-6 transgenen Linien 11, 25 und 26

Bei der Generierung transgener Mäuse wird die mikroinjizierte DNA meist nur an einer Stelle ins Genom integriert. Dabei kann die Anzahl der integrierten Kopien jedoch stark variieren. Wenn mehrere Kopien integriert werden, liegen diese in der Regel in einer Tandemanordnung vor. Hierbei sind die Kopien über ihre 3' und 5'-Enden miteinander verknüpft [134, 135]. Wird die genomische DNA mit einem Restriktionsenzym, das innerhalb des Transgens schneidet (z.B. *NcoI* s. Abb. 9) gespalten, erhält man abhängig von der Anzahl der integrierten Kopien eine unterschiedliche Anzahl von Transgenfragmenten. Jedes dieser Fragmente kann im Southern-Blot mit den für das Transgen spezifischen Sonden hybridisieren, wodurch das Signal umso stärker wird, je mehr Kopien integriert wurden.

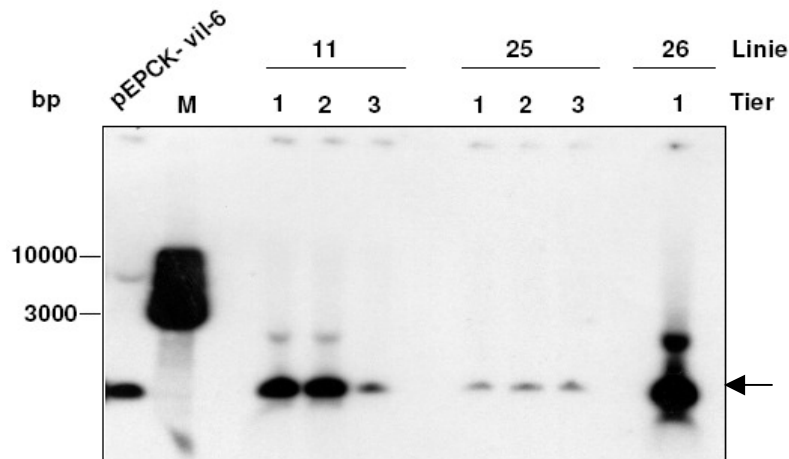


Abb. 13 Vergleich der Anzahl von Kopien des Transgens im Genom vIL-6 transgener Mäuse: Southern-Blot mit 10 µg genomischer DNA heterozygoter transgener Tiere der Linien 11, 25 und 26. Die DNA wurde mit *NcoI* gespalten. Die Detektion erfolgte mit dem 600 bp großen ³²P-markierten *Sall/SmaI* Fragment des Plasmids pEPCK-vIL-6* Δ *BamHI*.
M: Marker; PEPCK-vIL-6: 100 pg Plasmid (pEPCK-vIL-6* Δ *BamHI*); 1, 2, 3: einzelne Tiere der Linien

Zum Vergleich der Anzahl der ins Genom integrierten Kopien des Transgens zwischen den drei Linien wurde ein Southern-Blot mit genomischer DNA durchgeführt. In diesem wurden jeweils 10 µg der mit dem Restriktionsenzym *NcoI* gespaltenen DNA geblottet. Die verwendeten Tiere waren heterozygot für das Transgen. Jede Spur auf dem Blot entspricht der DNA eines Tieres der darüber gekennzeichneten transgenen Mauslinie. Bei den Signalen, die in den Spuren oberhalb des Pfeils (Abb. 13), sowie in der Spur des Markers detektiert wurden, handelt es sich um unspezifisch detektierte Banden.

In der Abb. 13 ist zu sehen, dass die Banden in den Spuren 25-1, 25-2 und 25-3 im Vergleich zu denen der anderen Linien am schwächsten ist. Die Spuren 11-1 und 11-2 zeigen ein stärkeres Signal als in den Spuren der Linie 25, das Signal ist jedoch schwächer als das in der Spur des Tieres 26-1. Das Signal der Spur 11-3 ist deutlich schwächer als die in den übrigen Spuren der Linie 11. Anhand der aufgetragenen Menge Plasmid-DNA lässt sich die Anzahl der integrierten Kopien, wie unter 2.14.4.1 beschrieben, abschätzen. Die aufgetragene Plasmidmenge entspricht, bezogen auf die 10 µg aufgetragene genomische DNA, pro Chromosomensatz ca. 6 integrierten Kopien. Aus dem Vergleich der Bandenstärken ergibt sich, dass bei der Linie 25 ca. 1-2 Kopien ins Genom integriert wurden, bei Linie 11 ca. 10 und bei Linie 26 ca. 20.

3.1.6 Überprüfung der Expression von vIL-6 auf Ebene der mRNA in der Leber

Nachdem erfolgreich vIL-6 transgene Mäuse generiert worden waren, folgte als nächster Schritt die Überprüfung der Expression des Transgens. Da der erste Schritt der Genexpression

die Transkription der DNA in eine mRNA ist, sollte die Gegenwart von vIL-6-mRNA in heterozygoten und homozygoten Tieren mittels RT-PCR überprüft werden. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Lebern präpariert und die isolierte RNA für die RT-PCR eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass in der RT-PCR keine vIL-6-mRNA nachweisbar war, obwohl in Ansätzen mit RNA aus mit p409-vIL-6-His transfizierten COS-7-Zellen vIL-6-mRNA nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet, dass die Expression der vIL-6-mRNA in den Mäusen unterhalb des Detektionsminimums der RT-PCR liegt.

Da der verwendete PEPCK-Promotor während der Gluconeogenese aktiviert und somit die Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase unter Kohlenhydratmangel verstärkt wird [127], wurden die Mäuse für zehn Tage mit einer kohlenhydratfreien Diät gefüttert. Die Zusammensetzung des Futters erfolgte nach McGrane *et al.* [127] und wurde von der ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest) geliefert.

Zusammensetzung der kohlenhydratfreien Diät:

64 % Casein, 22 % Fasern, 11 % Pflanzenöl, 2 % Bierhefe, 1 % Mineral-Mix mit Vitaminen

Nach einer zehntägigen Fütterung der Tiere mit der kohlenhydratfreien Diät war es möglich in einer RT-PCR mit RNA aus Lebern homozygoter Mäuse der transgenen Linie 11 und heterozygoten Mäusen der Linie 26 vIL-6-mRNA nachzuweisen, jedoch nicht in Tieren der Linie 25 (Abb. 14). Um auszuschließen, dass eine Amplifikation aus einer Kontamination mit genomischer DNA erfolgt war, wurde parallel jeweils ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne reverse Transkriptase durchgeführt.

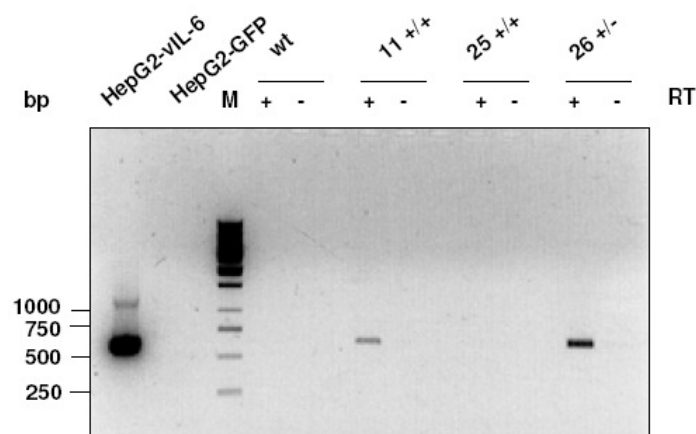


Abb. 14 RT-PCR zum Nachweis der vIL-6-mRNA in den Lebern von Mäusen der Linien 11, 25 und 26:

Die Tiere wurden 10 Tage mit einer kohlenhydratlosen Diät gefüttert. Für die RT-PCR (32 Zyklen) wurde RNA aus der Leber verwendet.

HepG2-vIL-6/HepG2-GFP: mit p409-vIL-6-His bzw. pEGFP-N1 transfizierte HepG2-Zellen; M: Marker; 11, 25 und 26: RNA aus der Leber von Mäusen der drei transgenen Linien; +/-: heterozygot; +/+: homozygot; RT: reverse Transkriptase.

Im Gegensatz zur RT-PCR war ein Nachweis der vIL-6-mRNA in einem Northern-Blot nicht möglich. Für den Northern-Blot wurden 10 µg der bereits für die RT-PCR isolierten RNA eingesetzt. Abb. 15 zeigt den mit homozygoten Tieren der Linien 11 und 25 sowie heterozygoten Tieren der Linie 26 durchgeführten Northern-Blot. Auf diesem ist nur ein Signal in der Spur der Positivkontrolle zu sehen, d.h. bei Verwendung von RNA aus COS-7-Zellen. Diese waren zuvor mit p409-vIL-6-His transfiziert worden. Bei den Signalen in der Spur des Markers handelt es sich um unspezifische Signale, die durch Bindung der Sonde an die DNA-Fragmente des Markers hervorgerufen wurden.

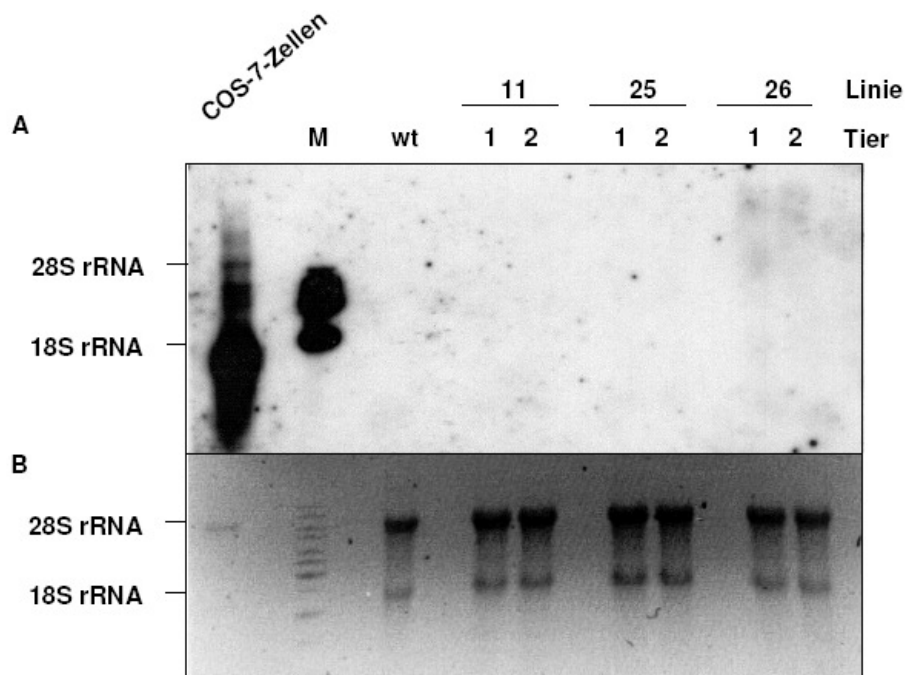


Abb. 15 Northern-Blot zum Nachweis der vIL-6-mRNA in den Lebern von Tieren der Linien 11, 25 und 26:

A: Membran nach Hybridisierung mit dem 600 bp großen ^{32}P -markierten *SalI/SmaI* Fragment des Plasmids pEPCK-vIL-6* ΔBamHI . Es wurden je 10 µg RNA eingesetzt. B: EtBr gefärbtes RNA-Gel vor dem Blotten

M: Marker; wt: Wildtyp-Maus; 11, 25 und 26: RNA aus der Leber von Mäusen der drei transgenen Linien. 1 und 2 steht für einzelne Tiere der darüber genannten Linien. Als Positivkontrolle wurden für den Northern-Blot 1,5 µg RNA aus mit p409-vIL-6-His transfizierten COS-7 Zellen verwendet.

3.1.7 Northern-Blot mit RNA aus Nieren

Die Expression der PEPCK erfolgt außer in der Leber auch in der Niere, wenn auch in geringerem Maße. Somit könnte auch eine Expression von vIL-6 bei den transgenen Mäusen in der Niere erfolgen. Durch einen Northern-Blot sollte überprüft werden, ob die mRNA des vIL-6 in den Nieren der transgenen Mäuse nachweisbar ist. Hierzu wurde nach zehntägiger

Fütterung der Tiere mit einer kohlenhydratfreien Diät die RNA aus den Nieren isoliert. Als Matrize für die Synthese der Sonden diente das beim Spalten des Plasmids pEPCK-vIL-6* Δ BamHI mit *SalI/SmaI* entstehende 600 bp große Fragment (s. Abb. 9).

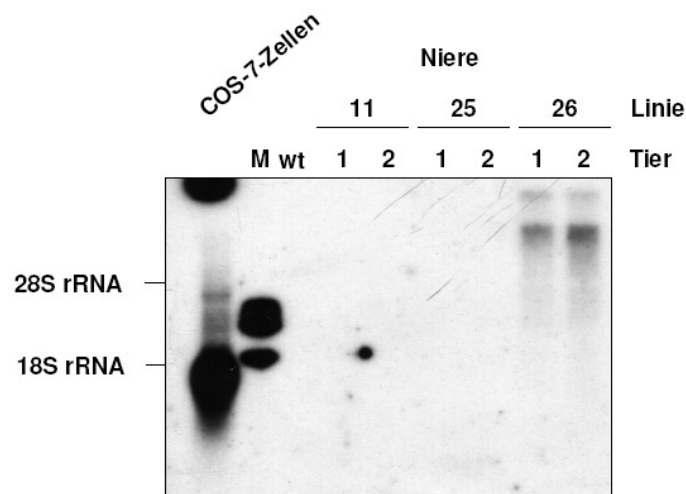


Abb. 16 Northern-Blot zum Nachweis der vIL-6-mRNA in der Niere von Tieren der Linien 11, 25 und 26:

M: Marker; wt: Wildtyp-Maus; 11, 25 und 26: Mäuse der drei transgenen Linien. 1 und 2 bezeichnet RNA aus unterschiedlichen Tieren der darüber genannten Linien. Als Positivkontrolle wurden 1,5 μ g RNA aus mit p409-vIL-6-His transfizierten COS-7 Zellen verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem 600 bp großen 32 P-markierten *SalI/SmaI* Fragment des Plasmids pEPCK-vIL-6* Δ BamHI.

Die Abb. 16 zeigt das Ergebnis eines Northern-Blots in dem die mRNA des vIL-6 nachgewiesen wurde. Es wurden 10 μ g RNA aus Nieren von jeweils zwei Tieren der transgenen Linien eingesetzt. In den Nieren von Tieren der Line 11 (11-1 und 11-2) und 25 (25-1 und 25-2) ist keine vIL-6-mRNA nachweisbar. Wurde RNA aus Nieren von Tieren der Linie 26 (Spur 26-1 und 26-2) im Northern-Blot verwendet, so lassen sich spezifische Signale nachweisen. Die detektierten Banden liegen weit oberhalb der 28S rRNA und korrespondieren mit mRNA die eine Größe von $\gg 10$ kb besitzt. vIL-6 mRNA aus mit p409-vIL-6-His transfizierten COS7-Zellen besitzt eine Länge die unterhalb der 18S rRNA liegt. Ein Unterschied in der Länge der mRNA kann durch unterschiedlich lange 5'- und 3'-untranslatierte Regionen hervorgerufen werden. Die Länge dieser Regionen hängt von der Entfernung des Promotors bzw. des 3'-Polyadenylierungssignals zur kodierenden Sequenz ab.

3.1.8 Nachweis von vIL-6 auf Proteinebene

Nachdem eine Expression von vIL-6 auf mRNA-Ebene nach Fütterung einer kohlenhydratfreien Diät in Tieren der Linien 11 und 26 nachgewiesen worden war, wurde die Expression auf Proteinebene überprüft. Die Expression des vIL-6 sollte zu einer systemischen

Akkumulation des Zytokins in den Mäusen führen. Aus diesem Grund wurde mittels eines ELISAs die vIL-6-Konzentration im Serum von Mäusen der drei transgenen Linien bestimmt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte wie unter 2.13.5 beschrieben. Im ELISA konnte in einzelnen transgenen Mäusen eine vIL-6 Expression nachgewiesen werden. Beispielhaft ist in Abb. 17 das Ergebnis eines ELISAs mit je einem Tier der Mauslinien dargestellt. In diesem ELISA ließ sich im Tier der Linie 11 eine Serumkonzentration von ca. 14 ng/ml vIL-6 nachweisen. Das Tier der Linie 25 zeigte eine Konzentration von 1-2 ng/ml und das der Linie 26 von 8-9 ng/ml vIL-6.

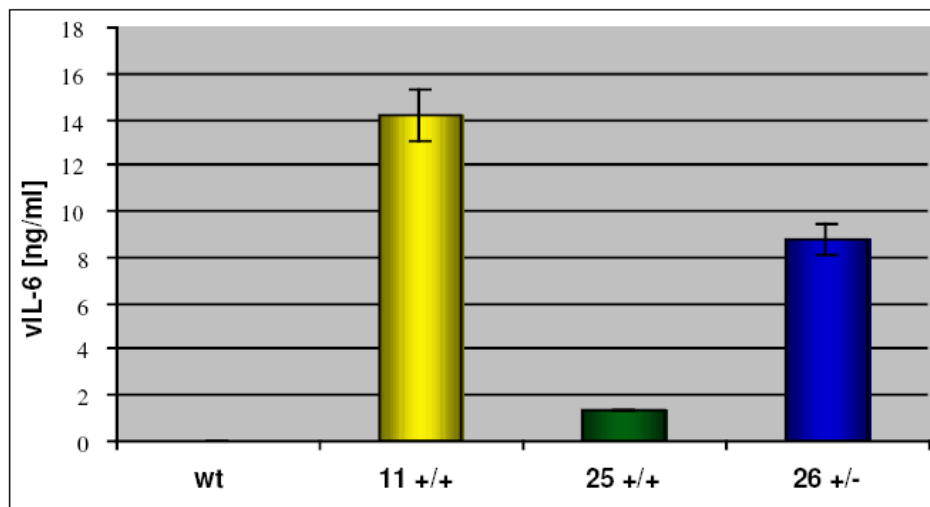


Abb. 17 Nachweis von vIL-6 im Serum transgener Mäuse:
ELISA mit Serum von Wildtyp-Mäusen (wt) und Mäusen der Linien 11, 25 und 26.
+/-: heterozygot; +/+:homozygot.

3.1.9 Akute-Phase-Reaktion durch vIL-6 in transgenen Mäusen

IL-6 ist ein Induktor der hepatischen Akute-Phase-Reaktion [60] und führt zu einer Modulation der Expression der sogenannten Akute-Phase-Proteine, zu denen sowohl in Mäusen als auch im Menschen beispielsweise Haptoglobin und Serum-Amyloid-A2 (SAA2) zählen [136, 137].

Es sollte geklärt werden, ob vIL-6 in HepG2-Zellen eine Akute-Phase-Reaktion auslösen kann. Sofern dies erfolgreich war, sollte in vIL-6 transgenen Mäusen überprüft werden, ob die vIL-6 Expression in transgenen Mäusen stark genug ist, um auch hier eine Akute-Phase-Reaktion auszulösen. Dies wäre gleichzeitig ein indirekter Nachweis für die Expression von vIL-6 in den Mäusen.

3.1.9.1 Akute-Phase-Reaktion in HepG2-Zellen nach Stimulation mit IL-6, Hyper-IL-6 oder vIL-6

Sofern vIL-6 eine Akute-Phase-Reaktion in HepG2-Zellen auslöst, sollte nach Stimulation der Zellen mit vIL-6 die mRNA von Haptoglobin in einem Northern-Blot nachweisbar sein. HepG2-Zellen wurden mit drei Konzentrationen (50, 100 und 500 ng/ml) rekombinantem vIL-6 stimuliert. Der Nachweis einer Akute-Phase-Antwort erfolgte durch einen Northern-Blot mit 5 µg RNA aus HepG2-Zellen. Die Detektion erfolgte mit einer für humanes Haptoglobin spezifischen Sonde. Als Matrize für die Synthese der Sonde wurde die cDNA des humanen Haptoglobins verwendet. Diese wurde aus dem Plasmid pBR322-hu-Haptoglobin isoliert. Bei der Spaltung des Plasmids mit *HinfI* entstehen zehn Fragmente. Die cDNA des Haptoglobins befindet sich im 900 bp Fragment.

Abb. 18 zeigt eine von der Dosis des vIL-6 abhängige Zunahme der im Northern-Blot detektierten Haptoglobin-mRNA. Als Kontrolle wurden HepG2-Zellen verwendet, die mit PBS ohne Zytokin (Negativkontrolle), bzw. mit jeweils 50 ng/ml hIL-6 bzw. Hyper-IL-6 stimuliert worden waren.

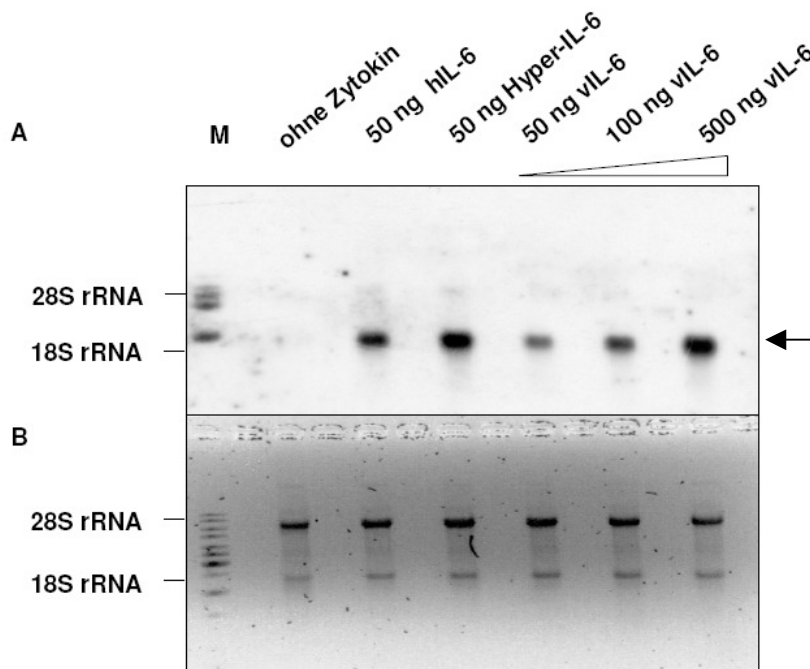


Abb. 18 Northern-Blot zum Nachweis der Induktion der Akute-Phase-Reaktion in HepG2-Zellen durch vIL-6:

HepG2-Zellen wurden ohne Zytokin (nur PBS), mit 50 ng/ml hIL-6, 50 ng/ml Hyper-IL-6 bzw. 50, 100 und 500 ng/ml vIL-6 für 10 min stimuliert. Die Detektion erfolgte mit der ³²P-markierten cDNA des humanen Haptoglobins A: Membran nach Hybridisierung mit der ³²P-markierten Sonde B: EtBr gefärbtes RNA-Gel vor dem Blotten (Ladekontrolle).

In mit PBS stimulierten Zellen konnte keine Haptoglobin-mRNA nachgewiesen werden. Zellen die mit hIL-6 bzw. Hyper-IL-6 stimuliert wurden dienten als Positivkontrolle. Sowohl durch IL-6 als auch durch Hyper-IL-6 wurde die Expression von Haptoglobin induziert.

Um durch Stimulation mit vIL-6 gleiche Signalstärken im Vergleich mit IL-6 und Hyper-IL-6 zu erreichen, sind jedoch höhere vIL-6-Konzentrationen erforderlich.

Zellen die mit 100 ng vIL-6 stimuliert wurden zeigen die gleiche Signalstärke wie Zellen die mit 50 ng IL-6 stimuliert wurden. Im Vergleich zu Zellen die mit Hyper-IL-6 stimuliert wurden, war eine zehnfach größere Menge an vIL-6 notwendig um eine vergleichbare Signalstärke zu erreichen.

3.1.9.2 Untersuchung der Akute-Phase-Reaktion durch vIL-6 in transgenen Mäusen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass vIL-6 in Leberzellen eine Akute-Phase-Reaktion auslösen kann. Es wurden erste Versuche mit Mäusen der Linie 11 durchgeführt. Nachdem die Mäuse 10 Tage lang mit kohlenhydratfreier Diät gefüttert worden waren, wurde durch eine RT-PCR die Expression von vIL-6-mRNA sowie die Stimulation der Haptoglobin-Synthese durch einen Northern-Blot überprüft. Für beide Versuche wurde RNA aus den Lebern der Tiere verwendet.

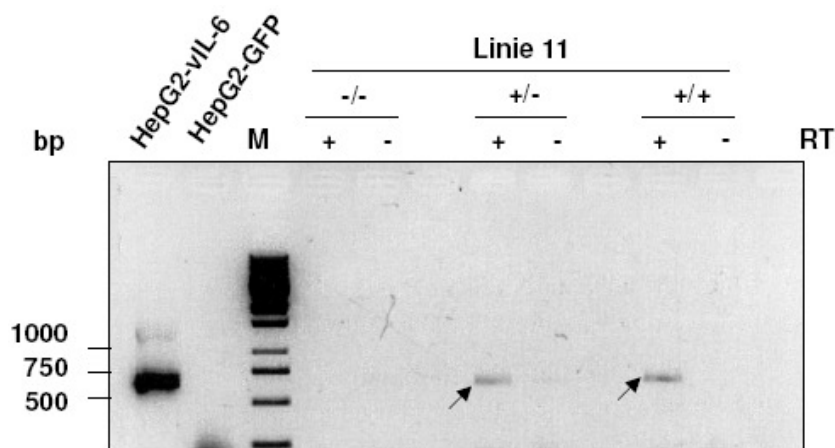


Abb. 19 Nachweis der vIL-6-mRNA in den Lebern transgener Tieren der Linie 11:
 RT-PCR (32 Zyklen) mit RNA aus der Leber von Tieren der Linie 11.
 -/- Wildtyp; +/- heterozygot; +/+ homozygot; HepG2-vIL-6/-GFP: RNA aus mit p409-vIL-6-His bzw. pEGFP-N1 transfizierten HepG2-Zellen, M: Marker, RT: reverse Transkriptase.

In der in Abb. 19 dargestellten RT-PCR wurde je ein heterozygotes, ein homozygotes und ein Wildtyp-Tier verwendet. In den Lebern beider transgener Tiere (+/- und +/+) war vIL-6-mRNA nachweisbar. In der RT-PCR sind Banden mit einer Größe von ca. 600 bp zu sehen.

Diese Banden sind nur in den Spuren nachzuweisen, in denen PCR-Produkte aufgetragen wurden, die aus einer PCR stammen, bei der cDNA als Matrize (+RT) verwendet wurde. Da kein PCR-Produkt nachweisbar ist sofern RNA als Matrize (-RT) verwendet wurde, konnte sichergestellt werden, dass keine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA vorlag. Im Wildtyp-Tier (-/-) ist ebenfalls kein vIL-6 nachweisbar.

Es konnte weder in einem Northern-Blot, noch auf Proteinebene eine Expression von vIL-6 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass sowohl in heterozygoten als auch in homozygoten Tieren der Linie 11 in diesem Versuch eine vIL-6-mRNA Expression nachweisbar ist. Diese lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze eines Northern-Blots.

Die gleiche RNA, die zuvor für die RT-PCR verwendet worden war, wurde nun in einem Northern-Blot eingesetzt in dem die Haptoglobin-mRNA nachgewiesen wird.

Da die gegen humane Haptoglobin-mRNA gerichtete Sonde, wie von Peters *et al.* [128] gezeigt, auch Haptoglobin-mRNA der Maus bindet, wurde die gleiche Sonde wie in Abschnitt 3.1.9.1 angegeben verwendet.

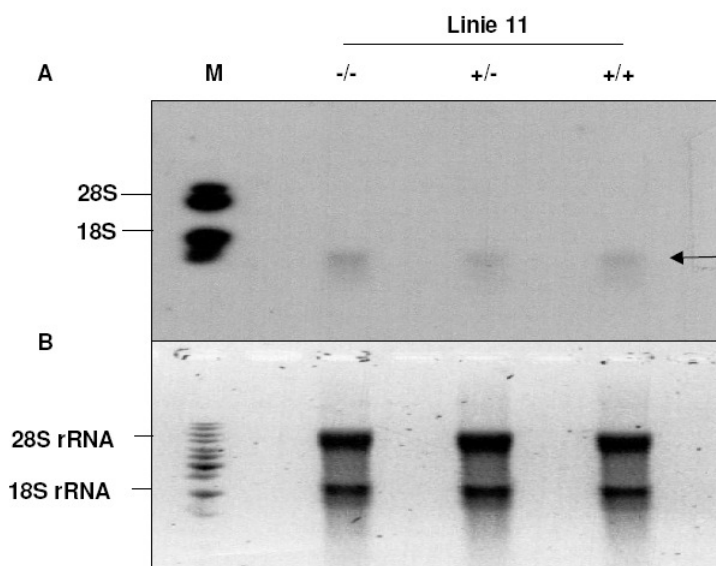


Abb. 20 Northern-Blot zum Nachweis von Haptoglobin-mRNA in Mäusen der Linie 11: Ein Wildtyp (-/-), ein heterozygoter (+/-) und ein homozygoter (+/+) Tier der Linie 11 wurden 10 Tage mit einer kohlenhydratfreien Diät gefüttert. Mit der RNA aus den Lebern wurde ein Northern-Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem ^{32}P -markierten 0,9 kb *Hinf*I Restriktionsfragment des humanen Haptoglobins. A: Nachweis von Haptoglobin im Northern-Blot B: EtBr gefärbtes RNA-Gel. M: Marker, 18S und 28S: rRNA

In allen drei Tieren ist eine basale Expression von Haptoglobin nachweisbar. Es ist jedoch keine durch vIL-6 hervorgerufene Verstärkung der Haptoglobinsynthese zu beobachten. (s.

Abb. 20A). Die Expression in den transgenen Tieren (heterozygot und homozygot) ist genauso stark wie im Wildtyp-Tier. In Abb. 20B ist das mit EtBr gefärbte RNA-Gel vor dem Blotten zu sehen. Es zeigt, dass in allen Spuren gleiche RNA-Mengen aufgetragen wurden, so dass eventuell vorhandene Unterschiede in der Haptoglobin-Expression im Northern-Blot nachweisbar sein müssten.

In weiteren Versuchen, auch mit Tieren der anderen Linien, konnte entweder keine vIL-6-Expression nachgewiesen werden oder die basale Expression des Haptoglobins lag zu hoch, um Unterschiede in den transgenen Tieren nachweisen zu können.

3.1.9.3 Akute-Phase-Antwort in Wildtyp-Mäusen nach intraperitonealer Injektion von IL-6 oder vIL-6

Da in transgenen Mäusen keine durch vIL-6 induzierte Akute-Phase-Reaktion nachweisbar war, wurde überprüft, ob durch eine intraperitoneale Injektion von vIL-6 in Mäusen eine Akute-Phase-Reaktion hervorgerufen werden kann. Hierzu wurde jeweils drei Mäusen 5 bzw. 50 µg mit 500 µl Ringerlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verdünntes rekombinantes vIL-6 intraperitoneal injiziert. Nach 6 h wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Lebern präpariert und die RNA isoliert. Für den Northern-Blot wurde eine SAA2 spezifische Sonde verwendet, da die Serumkonzentration von SAA2 im Vergleich zur Haptoglobinkonzentration in Mäusen einen deutlicheren Anstieg im Verlauf einer Akute-Phase-Reaktion aufweist (SAA2: 1.000 x, Haptoglobin 30 x) [138, 139]. Als Matrize für die Synthese der SAA2-Sonde diente das PCR-Fragment aus einer mit SAA2 spezifischen Primern (SAA2-Forward und -Reverse) durchgeführten RT-PCR. Die für die RT-PCR verwendete RNA wurde aus der Leber einer Maus isoliert, der zuvor 10 µg Hyper-IL-6 intraperitoneal injiziert worden war.

Als Kontrolle wurde je drei Tieren Ringerlösung (500 µl) bzw. 10 µg rekombinantes hIL-6 (in 500 µl Ringerlösung) injiziert. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zwischen den Tieren zu gewährleisten, wurden für den Versuch acht Wochen alte männliche Tiere verwendet.

Der in Abb. 21A dargestellte Northern-Blot zeigt, dass in zwei Tieren denen Ringerlösung injiziert wurde (1 und 3) keine SAA2 mRNA nachweisbar ist. Beim dritten Tier (2) wurde ein schwaches Signal detektiert. IL-6 löst in allen drei Tieren (1-3) die Expression von SAA2-mRNA in vergleichbarer Stärke aus. Auch durch Injektion von vIL-6 wurde eine Induktion der Expression SAA2-mRNA hervorgerufen. Sowohl bei Tieren, die 5 µg vIL-6 (1-3) injiziert bekamen, als auch bei Tieren, denen 50 µg vIL-6 (1-3) injiziert worden war, ist SAA2-mRNA

nachweisbar. Die Signale für SAA2 sind mit Ausnahme des Signals bei einem Tier, dem 5 µg vIL-6 injiziert wurde (2), bei allen Tieren stärker als bei Tieren, denen Ringerlösung injiziert wurde. Die Signale, die durch vIL-6 ausgelöst wurden, sind jedoch im Mittel schwächer als die Signale, die durch IL-6 hervorgerufen wurden.

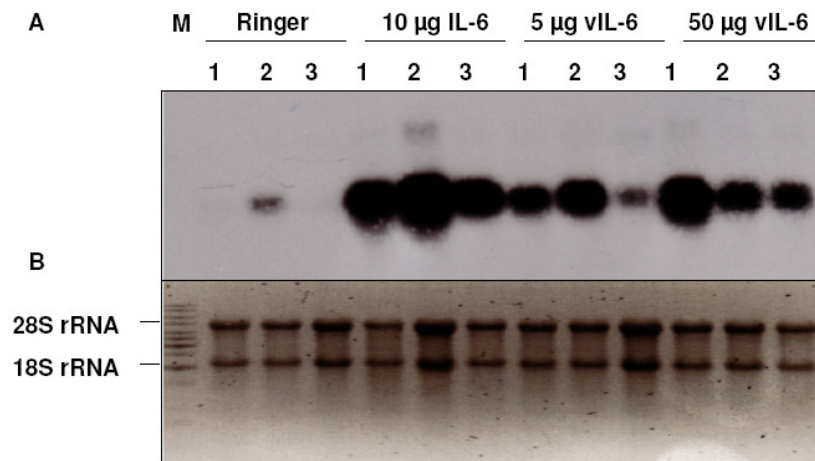


Abb. 21 Induktion der SAA2-Transkription durch vIL-6 in Wildtyp-Mäusen: C57BL/6 Mäusen wurde Ringerlösung (Ringer), 10 µg hIL-6 bzw. 5 und 50 µg vIL-6 intraperitoneal injiziert. 6 h nach der Injektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und ein Northern-Blot zum Nachweis von SAA2-mRNA mit RNA aus den Lebern der Tiere durchgeführt. M: Marker
A: Detektion der SAA2-mRNA in Gesamt-RNA durch einen Northern-Blot. B: EtBr gefärbtes RNA-Gel vor dem Blotten (Ladekontrolle).

3.1.9.4 Nachweis von SAA2 in vIL-6 transgenen Mäusen

Wie im vorangegangenen Versuch gezeigt wurde induziert rekombinantes vIL-6 in Mäusen die Expression von SAA2. Bei einer ausreichenden Expression des vIL-6 müsste somit auch in vIL-6 transgenen Mäusen eine Induktion der SAA2-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachweisbar sein. Je drei Tiere der transgenen Linien (11, 25 und 26) sowie drei Wildtyp-Tiere wurden vier Wochen mit einer kohlenhydratfreien Diät gefüttert. Für einen Northern-Blot wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die RNA aus der Leber isoliert. Für die Detektion wurde die gleiche Sonde verwendet, die im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde. In dem in Abb. 22A dargestellten Northern-Blot konnte in zwei Spuren (11-1 und 25-2) der transgenen Tiere SAA2-mRNA detektiert werden. Beim Vergleich der im Northern-Blot eingesetzten RNA-Mengen (Abb. 22B), ist zu sehen, dass in den Spuren 11-1 und 25-2 mehr RNA auf das Gel aufgetragen wurde als in den anderen Spuren. Hierauf sind wahrscheinlich auch die im Northern-Blot detektierten Signale zurückzuführen.

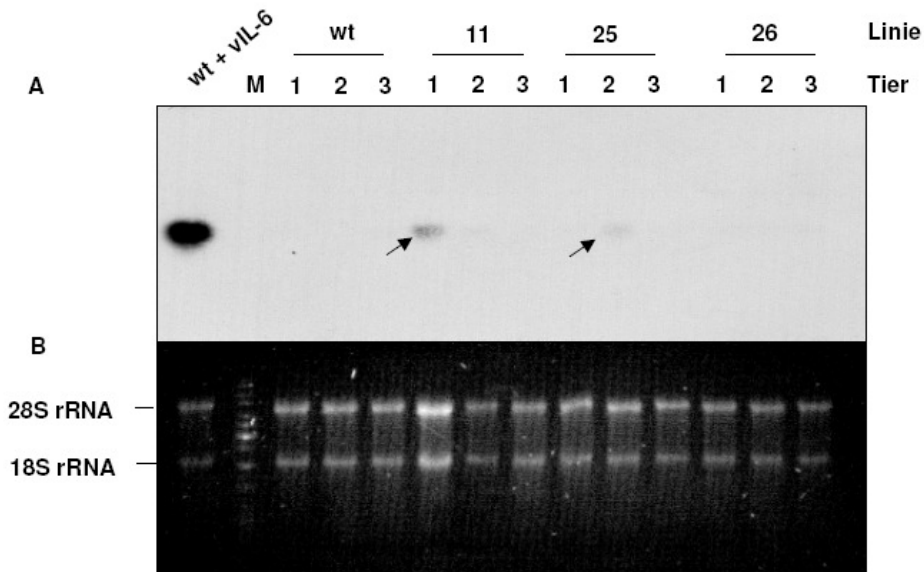


Abb. 22 Induktion der SAA2-Transkription in transgenen Mäusen der Linien 11, 25 und 26:

A: Detektion von SAA2-mRNA in Gesamt-RNA der Leber mittels eines Northern-Blots. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere und eine Maus der zuvor 50 µg rekombinantes vIL-6 intraperitoneal injiziert worden war (wt + vIL-6) verwendet. B: Mit EtBr gefärbtes RNA-Gel vor dem Blotten. M: Marker

3.1.9.5 Pathologische Untersuchung transgener Tiere

Zur Untersuchung möglicher durch vIL-6 hervorgerufener pathologischer Veränderungen der Leber, wurden je drei Tiere der transgenen Linien, sowie drei Wildtyp-Tiere über einen Zeitraum von einem Monat mit einer kohlenhydratfreien Diät gefüttert. Die anschließende Untersuchung der Lebern erfolgte im Zentrum für Pathologie der Georg-August-Universität Göttingen durch PD Dr. Hemmerlein. Die histologischen Befunde ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen Tieren und Wildtyp-Tieren.

3.2 Signaltransduktion durch vIL-6 von innerhalb der Zelle

Es wurde gezeigt, dass vIL-6 die Fähigkeit besitzt, eine Signalkaskade von innerhalb der Zelle zu induzieren [133]. In der zitierten Quelle wurde vermutet, dass nur ein geringer Teil des exprimierten vIL-6 sezerniert wird und eine Signalkaskade über den vIL-6-gp130-Komplex bereits im Endoplasmatischen-Retikulum (ER) induziert wird.

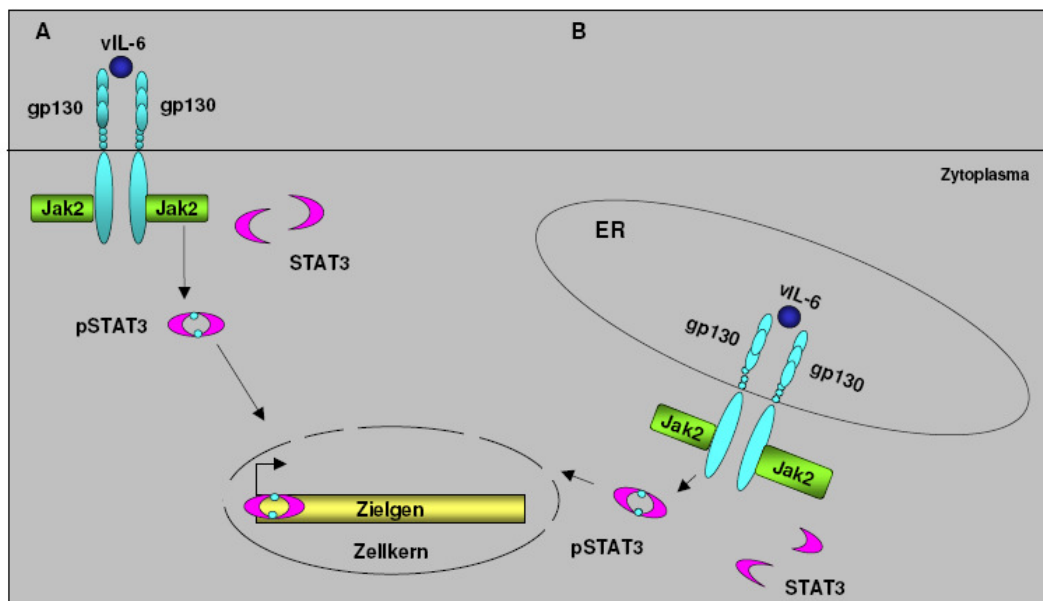


Abb. 23 Signaltransduktion durch vIL-6:

A: Klassische Signaltransduktion von vIL-6. B: Modell einer Signaltransduktion durch vIL-6 von innerhalb der Zelle.

ER: Endoplasmatisches Retikulum.

Zur Überprüfung, ob vIL-6 in der Lage ist bereits im ER an gp130 zu binden und hierdurch den JAK/STAT Signalweg zu aktivieren, sollte es in der Zelle zurückgehalten werden. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid kloniert, in dem vIL-6 mit der ER-Retentionssequenz KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) fusioniert ist. Proteine mit dieser Sequenz am carboxyterminalen Ende werden zwar nicht am Austritt aus dem ER gehindert, aber immer wieder dorthin zurücktransportiert. Dies ist möglich, da sie, sobald sie den Golgi-Komplex erreichen, über die KDEL-Sequenz an den transmembranen KDEL-Rezeptor binden. Die Membranrezeptorkomplexe werden dann in Vesikeln zum ER zurücktransportiert. Über diesen Mechanismus sollte eine vollständige Retention des vIL-6 in der Zelle erreicht werden. Sofern vIL-6 auch innerhalb der Zelle durch Bindung an gp130 den JAK/STAT Signalweg aktivieren kann, müsste eine Phosphorylierung von STAT3 nachweisbar sein.

3.2.1 Klonierung der Konstrukte für die Überprüfung einer intrazellulär durch vIL-6 induzierten Signaltransduktion

Für die Klonierung eines vIL6-KDEL Expressionsplasmids wurde vIL-6 zunächst mit den Primern vIL-6-sense-*XhoI* und vIL-6-rev-*NotI* durch eine PCR aus dem Plasmid p409-vIL-6-His amplifiziert und in das Plasmid pESL-MAV-KDEL kloniert. Dieses wurde zuvor mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* gespalten. Da vor der Sequenz, die für KDEL codiert, noch die Sequenz eines c-myc-Affinitäts-tags liegt, entstand hierdurch das Plasmid pESL-vIL-6-c-myc-KDEL.

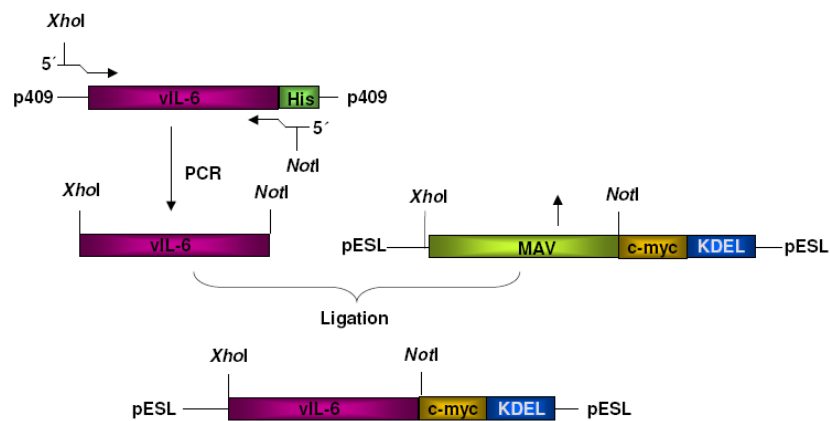


Abb. 24 Klonierungsschema des Vektors pESL-vIL-6-c-myc-KDEL.

Zusätzlich wurde ein Plasmid ohne die cDNA des KDEL kloniert. Hierzu wurde vIL-6-c-myc mit den Primern vIL-6-sense-*XhoI* und c-myc-rev-*BamHI* aus dem Plasmid pESL-vIL6-c-myc-KDEL amplifiziert und in das Plasmid pESL-MAV-KDEL kloniert. In diesem Fall wurde das Plasmid pESL-Mav-KDEL mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BamHI* geöffnet. Es entstand das Plasmid pESL-vIL-6-c-myc.

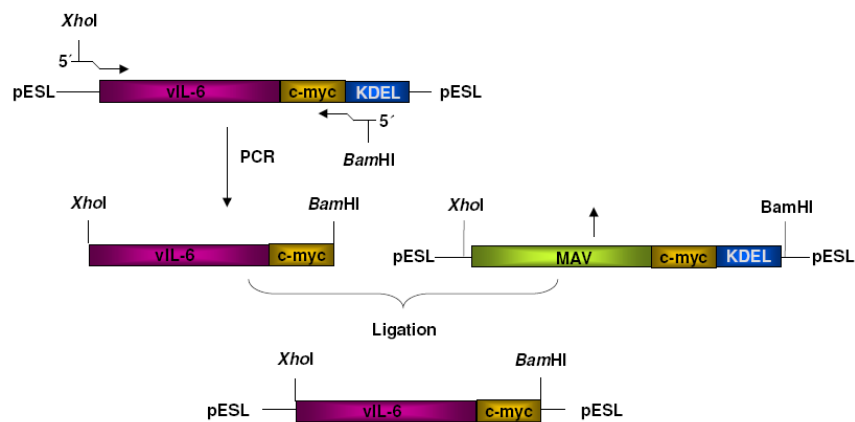


Abb. 25 Klonierungsschema des Vektors pESL-vIL-6-c-myc.

Durch eine ortsspezifische Rekombination (s. 2.11.4) zwischen den Plasmiden pESL-vIL6-c-myc bzw. pESL-vIL6-c-myc-KDEL und dem Zielvektor pDCC entstanden die Expressionsplasmide pDCC-vIL-6-c-myc und pDCC-vIL-6-c-myc-KDEL.

3.2.2 Signaltransduktion durch vIL-6 von innerhalb der Zelle

Es sollte nun geprüft werden, ob vIL-6 auch innerhalb der Zelle an gp130 binden und hierdurch eine Phosphorylierung von STAT3 induzieren kann.

Für die folgenden Versuche wurden transient mit pDCC-vIL-6-KDEL, pDCC-vIL-6 und pEGFP-N1 transfizierte HepG2-Zellen verwendet. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und dann in Standardmedium ohne FCS bis zum nächsten Tag kultiviert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen nochmals zweimal mit PBS gewaschen und in Standardmedium ohne FCS einmal für 6 h und einmal für 4 h kultiviert. Nach Ablauf der 4 h wurde von den Platten das Medium abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen, von der Kulturplatte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml 2x Laemmli-Puffer lysiert. Mit den Zelllysaten wurden Western-Blots gegen das c-myc-tag des vIL-6 bzw. des vIL-6-KDEL sowie gegen STAT3 und phosphoryliertes STAT3 durchgeführt.

Mit dem Überstand der Zellen wurden untransfizierte HepG2-Zellen stimuliert. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und für 5 h in Medium ohne FCS kultiviert. Im Anschluss wurden sie mit den auf 37°C vorgewärmten Überständen für 10 min stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml 2 x Laemmli-Puffer lysiert. Mit den Lysaten wurden Western-Blots gegen STAT3 und phosphoryliertes STAT3 durchgeführt.

Das vIL-6 konnte sowohl in den Lysaten der mit der cDNA vIL-6-c-myc als auch in denen mit der cDNA vIL-6-c-myc-KDEL transient transfizierten HepG2-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26A). Es konnten jedoch größere Mengen des mit der KDEL-Sequenz fusionierten vIL-6 nachgewiesen werden als vom vIL-6 ohne KDEL-Sequenz. Die unterschiedlichen Größen der Proteine ergeben sich durch die um 7 Aminosäuren (NPRKDEL) längere Sequenz des vIL-6-KDEL (s. Anhang 9.3). Die Menge an vIL-6 lag in allen Kulturüberständen unterhalb der Nachweisgrenze des Western-Blots. Dies ist vermutlich auf die kurze Akkumulationszeit von 4 h zurückzuführen.

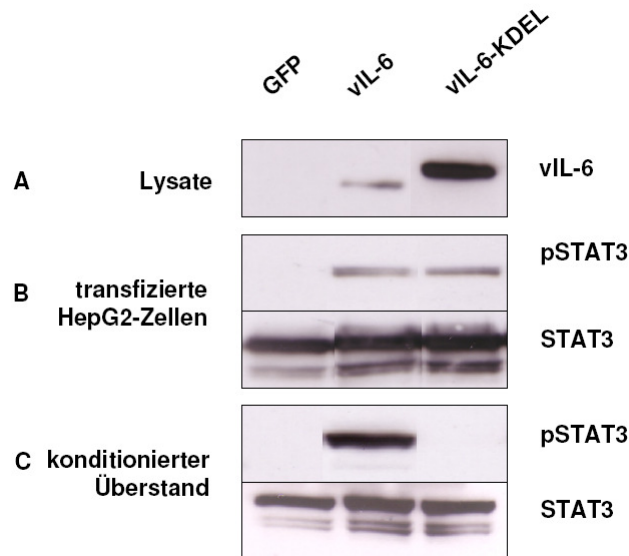


Abb. 26 Signaltransduktion durch vIL-6 von innerhalb der Zelle: HepG2-Zellen wurden transient mit pDCC-vIL-6-c-myc und pDCC-vIL-6-c-myc-KDEL transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. A: Nachweis von vIL-6 durch c-myc spezifischen Antikörper 9E10 B: STAT3-Phosphorylierung in den transfizierten Zellen C: untransfizierte HepG2-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit den für 4 h konditionierten Überständen der transfizierten Zellen stimuliert. Die STAT3-Phosphorylierung wurde mit einem gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) gerichteten Antikörper detektiert.

Interessanterweise konnte in Zellen die mit der cDNA von vIL-6 oder vIL-6-KDEL transfiziert worden waren gleichstarke Signale für pSTAT3 nachgewiesen werden (Abb. 26B). Dies weist darauf hin, dass sowohl intrazelluläres als auch sezerniertes vIL-6 eine Signaltransduktion durch gp130 induzieren kann. Eine endgültige Aussage darüber, ob ein pSTAT3-Signal tatsächlich durch eine Bindung von vIL-6 an gp130 innerhalb der Zelle induziert wurde, kann anhand dieses Ergebnisses jedoch nicht getroffen werden. Hierzu ist es notwendig zu zeigen, dass in den Überständen der transfizierten Zellen keine ausreichende Menge an vIL-6 für eine Stimulation von außen vorhanden ist. Um dies zu untersuchen wurden untransfizierte HepG2-Zellen mit den Überständen der transfizierten Zellen stimuliert.

Abb. 26C zeigt einen Western-Blot mit den Lysaten der stimulierten Zellen, in dem zur Detektion ein Antikörper gegen pSTAT3 verwendet wurde. Ein Signal für pSTAT3 ist nur im Lysat der Zellen nachweisbar, die mit dem Überstand der mit der cDNA pDCC-vIL-6-c-myc transfizierten Zellen stimuliert worden waren. In Lysaten von Zellen, die mit dem Überstand von pDCC-vIL-6-c-myc-KDEL transfizierten Zellen stimuliert worden waren, konnte keine STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Da nicht genug vIL-6 im Überstand pDCC-vIL-6-c-myc-KDEL transfizierter Zellen vorhanden ist, um Zellen von außen zu stimulieren, muss die Phosphorylierung von STAT3 in vIL-6-c-myc-KDEL transfizierten Zellen durch vIL-6 im ER hervorgerufen worden sein. Es hatte also bereits in der Zelle durch die Bindung an gp130 eine Signaltransduktion ausgelöst.

3.3 Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6 von innerhalb der Zelle

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass vIL-6 in der Lage ist bereits in der Zelle gp130 zu binden und eine Phosphorylierung von STAT3 hervorzurufen.

Es sollte nun geklärt werden, ob nur vIL-6 hierzu in der Lage ist, oder ob auch IL-6 und Hyper-IL-6 eine Signaltransduktion von innerhalb der Zelle auslösen können. Um dies zu überprüfen, wurden Expressionsvektoren kloniert, in denen die für IL-6 und für Hyper-IL-6 codierenden cDNAs mit der für c-myc bzw. c-myc-KDEL codierenden cDNA fusioniert wurden.

IL-6 kann nur an gp130 binden, wenn es zuvor an seinen α -Rezeptor, den IL-6R, gebunden hat. Da HepG2-Zellen den IL-6R exprimieren wurde diese Zelllinie verwendet.

3.3.1 Klonierung der Konstrukte für die Überprüfung einer intrazellulär induzierten Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6

pDCC-IL-6-c-myc-KDEL und pDCC-IL-6-His-c-myc:

Das IL-6-Expressionsplasmid, in dem die IL-6-cDNA mit denen des c-myc-tags und der cDNA der KDEL-Sequenz fusioniert ist, wurde kloniert, indem IL-6-cDNA mit den Primern IL-6-sense-SpeI und IL-6-rev- NotI in einer PCR aus pUC19-IL-6-PDI/KDEL amplifiziert und in das Plasmid pESL-MAV-KDEL kloniert wurde. Dieses war zuvor mit den Enzymen SpeI und NotI geöffnet worden. Es entstand so zunächst das Plasmid pESL-IL-6-c-myc-KDEL.

Für das Expressionsplasmid, in dem die IL-6-cDNA ohne die der KDEL-Sequenz vorliegt, wurde IL-6-c-myc mit den Primern IL-6-sense-SpeI und c-myc-rev-BamHI in einer PCR aus pESL-IL-6-c-myc-KDEL amplifiziert und in das zuvor mit den Restriktionsenzymen SpeI und BamHI gespaltene Plasmid pESL-MAV-KDEL kloniert. Hierdurch entstand das Plasmid pESL-IL-6-c-myc. Da nach der Subklonierung des IL-6-c-myc in den Expressionvektor pDCC kein IL-6-c-myc in einer Testexpression nachgewiesen werden konnte, wurde mir freundlicherweise von Björn Rabe (Biochemisches Institut der Universität Kiel) das Plasmid pESL-IL-6-His-c-myc zur Verfügung gestellt.

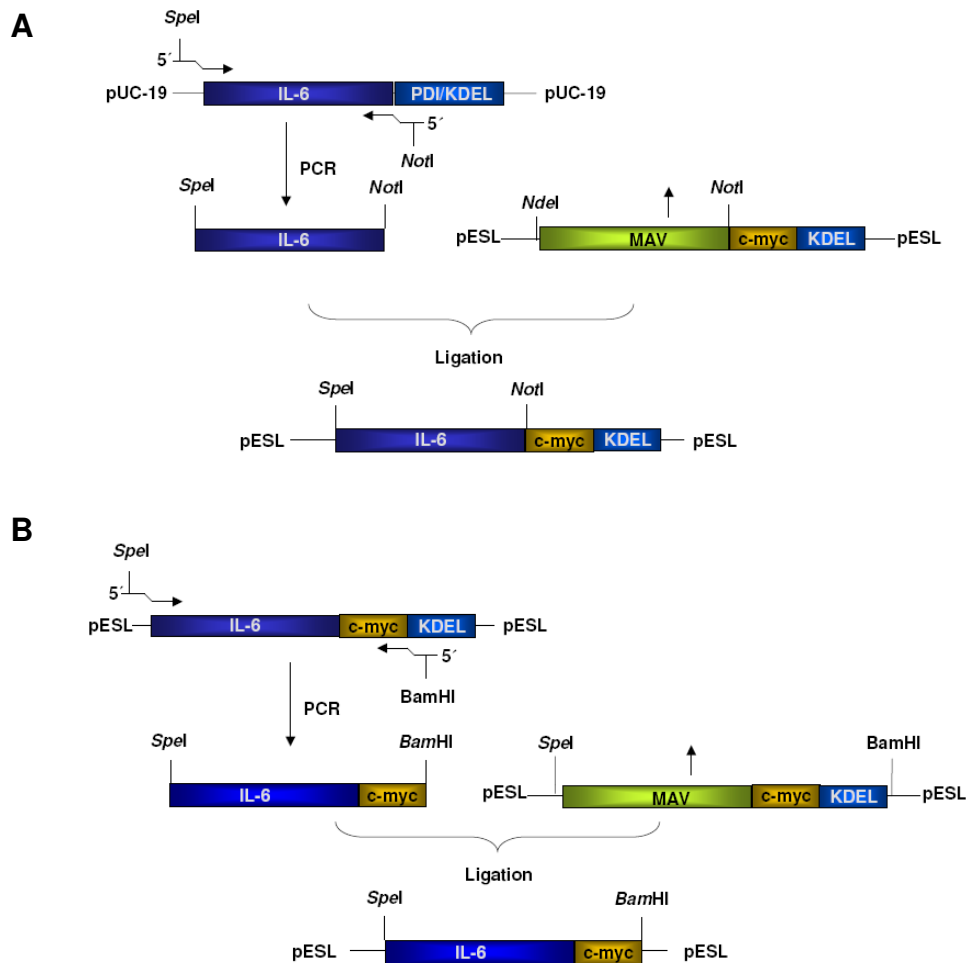


Abb. 27 Klonierungsschemata der Vektoren A: pESL-IL-6-c-myc-KDEL und B: pESL-IL-6-c-myc.

Durch Rekombination zwischen den Plasmiden pESL-IL-6-His-c-myc und pESL-IL-6-c-myc-KDEL und dem Zielvektor pDCC (s. 2.11.4) entstanden die Expressionsvektoren pDCC-IL-6-c-myc-His und pDCC-IL-6-c-myc-KDEL.

pDCC-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL und pDCC-Hyper-IL-6-c-myc:

Das Plasmid pDCC-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL wurde kloniert, indem der Vektor pCDM8-Hyper-IL-6 zunächst mit dem Enzym *HindIII* geöffnet, und der dabei entstandene Nukleotidüberhang durch die T4-Polymerase aufgefüllt worden war. Im Anschluss wurde der Vektor mit *XbaI* gespalten. *XbaI* schneidet im Bereich der cDNA des IL-6 innerhalb des Hyper-IL-6. Das isolierte cDNA-Fragment wurde anschließend in den Vektor pESL-IL-6-c-myc-KDEL kloniert, der mit *SpeI* und *XbaI* geöffnet worden war. Vor der Spaltung mit *XbaI* wurde der durch die Spaltung mit *SpeI* entstandene Nukleotidüberhang mit Hilfe der T4-

Polymerase aufgefüllt. Durch diese Klonierungsschritte entstand das Plasmid pESL-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL.

Für das Expressionsplasmid pDCC-Hyper-IL-6-c-myc wurde zunächst der Vektor pESL-IL-6-c-myc mit den Enzymen *Xba*I und *Bam*HI verdaut. Das hierbei entstandene cDNA-Fragment wurde dann in den mit *Xba*I und *Bam*HI verdauten Vektor pESL-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL kloniert wodurch das Plasmid pESL-Hyper-IL-6-c-myc entstand.

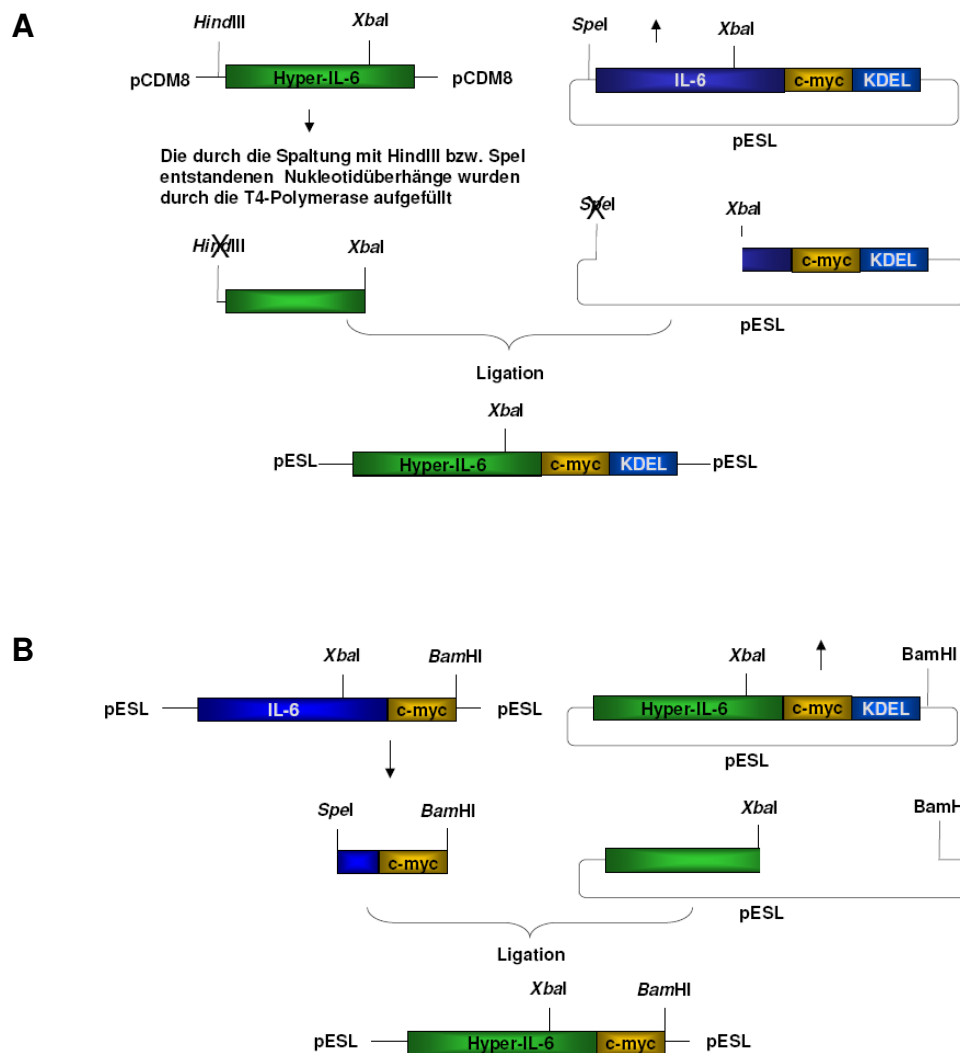


Abb. 28 Klonierungsschemata der Vektoren **A**: pESL-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL und **B**: pESL-Hyper-IL-6-c-myc.

Durch eine ortsspezifische Rekombination (s. 2.11.4) zwischen den Plasmiden pESL-Hyper-IL-6-c-myc und pESL-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL und dem Zielvektor pDCC entstanden die Expressionsplasmide pDCC-Hyper-IL-6-c-myc und pDCC-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL.

3.3.2 Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6 von innerhalb der Zelle

Zur Überprüfung, ob die entsprechenden Proteine über die wie unter 3.3.1 beschrieben klonierten Plasmide in HepG2-Zellen exprimiert werden, wurden Western-Blot-Analysen mit Lysaten und Zellkulturüberständen transient transfizierter HepG2-Zellen durchgeführt. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die mit pEGFP-N1 und den oben genannten Plasmiden pDCC-vIL-6-c-myc bzw. -c-myc-KDEL transfiziert worden waren. Zum Nachweis der Proteine wurde der anti-c-myc-Antikörper 9E10 verwendet.

Abb. 29A zeigt die Lysate der transfizierten Zellen. Die Lysate der mit GFP transfizierten Zellen dienen als Kontrolle. Das GFP trägt keine c-myc Markierung und ist somit in den durchgeführten Western-Blots nicht nachweisbar. Die Banden in der Spur der mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen kommen somit durch unspezifische Bindung des Antikörpers mit Proteinen in den Lysaten zustande.

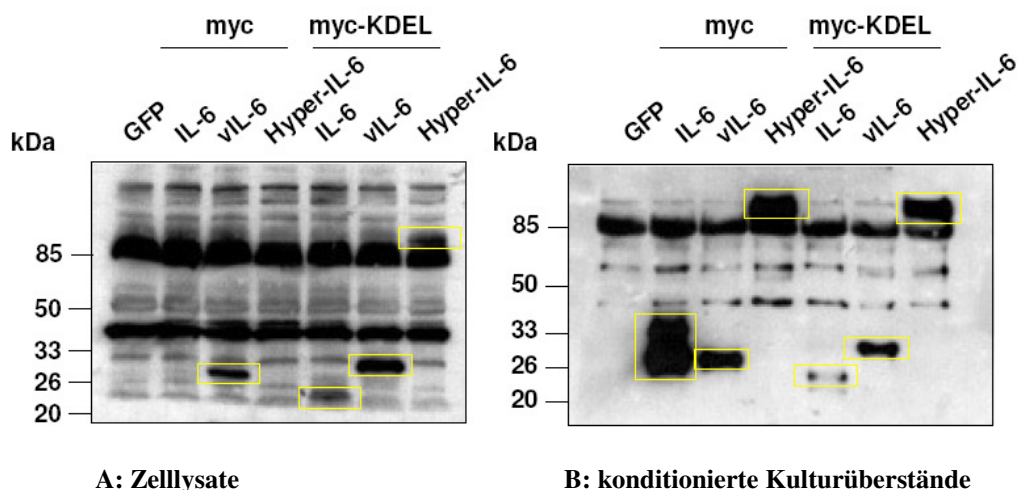


Abb. 29 Expression von IL-6-, vIL-6- und Hyper-IL-6-c-myc /-c-myc-KDEL in HepG2-Zellen:

HepG2-Zellen wurden transient mit pDCC-IL-6-c-myc-His, -vIL-6-c-myc und -Hyper-IL-6-c-myc bzw. -c-myc-KDEL transfiziert. Am ersten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen jeweils auf zwei Kulturschalen verteilt. Am zweiten Tag wurden die Zellen der einen Schale lysiert. Die Kulturüberstände der zweiten Schale wurden nach einer 48 h Konditionierung verwendet. Der Western-Blot wurde mit einem c-myc spezifischen AK durchgeführt. A: Lysate der transfizierten Zellen B: Kulturüberstände der transfizierten Zellen nach 48 h Konditionierung, spezifisch detektierte Banden sind gelb umrandet.

Die Zytokine IL-6 und Hyper-IL-6 lassen sich nur im Lysat nachweisen sofern sie eine C-terminale KDEL-Sequenz tragen (Abb. 29A). Ohne KDEL-Sequenz können sie in den Lysaten nicht detektiert werden. vIL-6 ist hingegen unabhängig von der KDEL-Sequenz in den Lysaten nachweisbar. Hierbei ist jedoch zu sehen, dass größere Mengen vIL-6-c-myc-KDEL als vIL-6-c-myc im Lysat vorhanden sind. Dies bedeutet, dass alle drei Zytokine durch die KDEL-Sequenz in den Zellen zurückgehalten werden. vIL-6 ist im Gegensatz zu IL-6 und Hyper-IL-6 auch ohne KDEL-Sequenz in den Zelllysaten nachzuweisen. Hieraus lässt sich

schließen, dass vIL-6 schlechter als die beiden anderen Zytokine sezerniert wird. Die unterschiedlichen Größen des vIL-6 erklären sich dadurch, dass das vIL-6-c-myc-KDEL um die sieben Aminosäuren N, P, R, K, D, E und L größer ist als das vIL-6-c-myc (s. Anhang 9.3).

Um zu überprüfen, ob auch IL-6-c-myc und Hyper-IL-6-c-myc exprimiert werden, wurde ein Western-Blot mit den für 48 Stunden konditionierten Überständen der transfizierten Zellen durchgeführt. In Abb. 29B ist zu sehen, dass alle Zytokine, unabhängig davon, ob sie die KDEL-Sequenz tragen, in den Überständen nachzuweisen sind und somit exprimiert werden. Im Fall von IL-6 sind jedoch deutlich größere Mengen IL-6-c-myc als IL-6-c-myc-KDEL nachzuweisen. Auch die Bande des vIL-6-c-myc ist etwas stärker als die des vIL-6-c-myc-KDEL. Die Menge des im Überstand detektierten Hyper-IL-6 ist hingegen unabhängig von der KDEL-Sequenz annähernd gleich. Eine Aussage über die Retention des Hyper-IL-6 durch die KDEL-Sequenz kann durch diesen Blot also nicht getroffen werden. Die unterschiedlichen Größen der Zytokine IL-6-c-myc und IL-6-c-myc-KDEL ergeben sich daraus, dass dem IL-6-c-myc zwar die KDEL-Sequenz fehlt, es jedoch einen zusätzlichen His-tag trägt. Dieser hat eine Länge von 6 Aminosäuren. Weiterhin sind vom IL-6-c-myc verschiedene Glykolysierungsformen nachzuweisen.

Für IL-6 und vIL-6 bestätigt dieses Ergebnis die Retention der Zytokine in den Zellen durch die C-terminale KDEL-Sequenz. Über einen Zeitraum von 48 Stunden ist die Retention jedoch unvollständig. Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Versuchen mit deutlich kürzeren Akkumulationszeiten gearbeitet.

3.3.3 Intrazelluläre Signaltransduktion durch IL-6 und HIL-6?

Zur Überprüfung einer durch IL-6, vIL-6 und Hyper-IL-6 von innerhalb der Zelle vermittelten Signalkaskade wurde der Phosphorylierungsstatus von STAT3 im Western-Blot untersucht.

HepG2-Zellen wurden transient mit den unter 3.3.1 genannten Plasmiden transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und im Anschluss in Standardmedium ohne FCS kultiviert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen nochmals zweimal mit PBS gewaschen und einmal für 6 h und einmal für 4 h in Standardmedium ohne FCS kultiviert. Nach Ablauf der 4 h wurde das Medium abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und in 1 ml 2 x Laemmli-Puffer lysiert. In allen Lysaten der mit der cDNA der Zytokine transfizierten Zellen ist im Western-Blot phosphoryliertes STAT3 nachzuweisen (Abb. 30A).

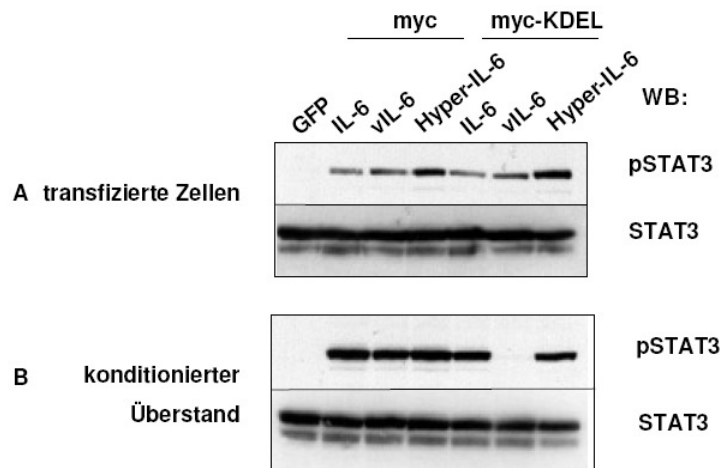


Abb. 30 Intrazelluläre Signaltransduktion von IL-6, vIL-6 und Hyper-IL-6

HepG2-Zellen wurden mit pDCC-IL-6-c-myc, -vIL-6-c-myc und -Hyper-IL-6-c-myc und -c-myc-KDEL transient transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. A: STAT3-Phosphorylierung in den transfizierten Zellen B: untransfizierte HepG2-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit den für 4 h konditionierten Überständen der transfizierten Zellen stimuliert. Die STAT3-Phosphorylierung wurde mit einem gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) gerichteten Antikörper detektiert.

Durch alle sechs Zytokine (IL-6, vIL-6 und Hyper-IL-6 mit und ohne C-terminale KDEL-Sequenz konnte in den mit der entsprechenden cDNA transfizierten HepG2-Zellen eine Aktivierung von STAT3 induziert werden (Abb. 30A).

Eine Aussage darüber, ob die Phosphorylierung von STAT3 durch eine Bindung der Zytokine an gp130 innerhalb oder außerhalb der Zelle hervorgerufen worden war, kann aber nicht getroffen werden. Hierfür wurde überprüft, ob die in den Überständen der transfizierten Zellen vorhandenen Konzentrationen der Zytokine ausreichen, um Zellen von außen zu stimulieren. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit den Kulturüberständen der transfizierten Zellen stimuliert.

Abb. 30B zeigt, dass nur mit dem Überstand der vIL-6-KDEL exprimierenden Zellen keine Stimulation von HepG2-Zellen möglich war. Wenn im Überstand der Zellen kein biologisch aktives vIL-6 vorhanden war, bedeutet dies, dass die in den vIL-6 exprimierenden Zellen nachgewiesene Phosphorylierung von STAT3 durch eine intrazelluläre Bindung des vIL-6-KDEL an gp130 induziert worden sein muss. Dieses Ergebnis bestätigt das in 3.2.2 gezeigte Resultat.

Wie weiterhin in Abb. 30B zu sehen ist, gelangen unabhängig von der KDEL-Sequenz ausreichende Mengen der Zytokine IL-6 und Hyper-IL-6 aus den transfizierten Zellen hinaus, um eine Stimulation von außen bewirken zu können. Da somit auch eine Stimulation von außen möglich war, kann keine Aussage über eine intrazellulär induzierte Signaltransduktion getroffen werden. Hierzu müsste eine Bindung der Zytokine an membranständiges gp130

außerhalb der Zelle vollständig inhibiert werden. Im Fall von Hyper-IL-6 ist dies beispielsweise durch sgp130Fc möglich. sgp130Fc ist ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären Teil des gp130 und dem Fc-Teil eines humanen IgG-Antikörpers [53].

Hyper-IL-6 ist ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem sIL-6R [113]. Die durch Hyper-IL-6 hervorgerufene Signaltransduktion entspricht somit der des IL-6 *Transsignallings* (s. 1.3.3). Dieses kann durch sgp130Fc selektiv inhibiert werden. Da auch vIL-6 direkt an gp130 binden kann ohne den IL-6R zu benötigen, kann auch eine Bindung von vIL-6 an gp130 durch sgp130Fc inhibiert werden. Eine Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R und gp130 bleibt unbeeinflusst, da sgp130Fc IL-6 nicht ohne den IL-6R binden kann.

Wie im vorangegangenen Versuch (Abb. 30A) wird auch bei Zugabe von sgp130Fc zum Kulturüberstand in den Zytokin-exprimierenden Zellen eine Phosphorylierung von STAT3 induziert (Abb. 31A).

Erneut wurde überprüft, ob das in den Lysaten der transfizierten Zellen detektierte pSTAT3-Signal durch eine intrazellulär induzierte Signaltransduktion hervorgerufen wurde. Um ein Signal von außen auszuschließen wurden untransfizierte HepG2-Zellen mit den für 4 Stunden konditionierten Überständen der transfizierten Zellen, die nach wie vor sgp130Fc enthielten, stimuliert.

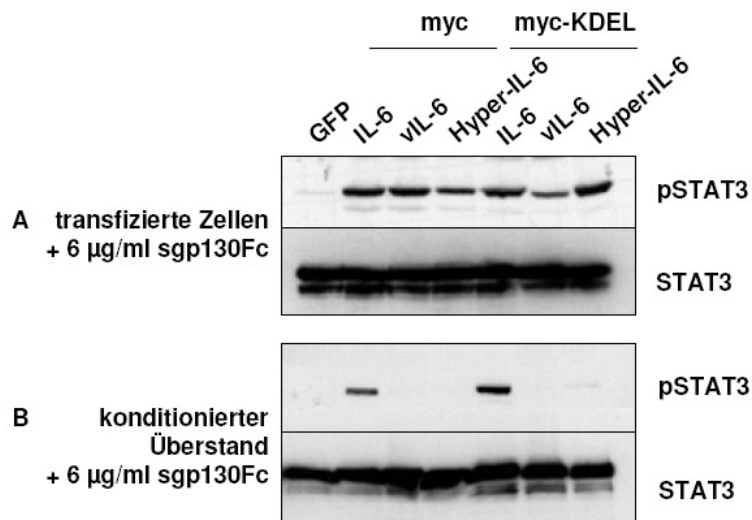


Abb. 31 Intrazelluläre Signaltransduktion durch IL-6, vIL-6 und Hyper-IL-6:

HepG2-Zellen wurden mit pDCC-IL-6-c-myc-His, -vIL-6-c-myc und -Hyper-IL-6-c-myc bzw. -c-myc-KDEL transient transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. A: STAT3-Phosphorylierung in transfizierten Zellen deren Medium 4 h vor der Lyse 6 µg/ml sgp130Fc zugefügt worden war. B: untransfizierte HepG2-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit den für 4 h konditionierten Überständen der transfizierten Zellen, die zusätzlich mit 6 µg/ml sgp130Fc versetzt worden waren, stimuliert. Die STAT3-Phosphorylierung wurde mit einem gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) gerichteten Antikörper detektiert.

Sowohl mit den Überständen der IL-6 exprimierenden Zellen als auch mit denen der IL-6-KDEL exprimierenden Zellen konnten HepG2-Zellen stimuliert und ein pSTAT3-Signal nachgewiesen werden (Abb. 31B). Es sind also ausreichende Mengen der Zytokine in den Überständen der transfizierten Zellen vorhanden, um sie von außen stimulieren zu können. sgp130Fc hat keinen Einfluss auf die Stimulation der Zellen von außen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da sgp130Fc ausschließlich das IL-6-*Transsignalling*, also die Signaltransduktion von IL-6 und sIL-6R inhibiert. Die Signaltransduktion von IL-6 über den membranständigen IL-6R bleibt hiervon unbeeinflusst. Da HepG2-Zellen den membranständigen IL-6R exprimieren, kann sgp130Fc somit die Signaltransduktion durch IL-6 nicht inhibieren.

Im Gegensatz zu IL-6 konnten weder mit den Überständen der Hyper-IL-6 exprimierenden Zellen noch mit den Überständen der vIL-6 exprimierenden Zellen, unabhängig von der KDEL-Sequenz, Zellen von außen stimuliert werden. Eine Induktion der Signaltransduktion wurde durch das sgp130Fc vollständig inhibiert. Da mit den Überständen keine Stimulation von außen induziert werden konnte, muss die in den Lysaten der vIL-6 bzw. Hyper-IL-6 exprimierenden Zellen beobachtete STAT3-Phosphorylierung (Abb. 31A) durch eine intrazellulär vermittelte Signaltransduktion hervorgerufen worden sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl vIL-6 als auch Hyper-IL-6 bereits in Zellen an gp130 binden können und die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs auslösen können. Eine Aussage zu IL-6 kann diesbezüglich noch nicht getroffen werden.

3.4 Generierung transgener Mäuse mit vIL-6 unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen H2-Promotors

In den unter 3.1 beschriebenen vIL-6-transgenen Mäusen konnte nur eine schwache vIL-6-Expression und keine durch das vIL-6 hervorgerufenen Effekte nachgewiesen werden. Zudem wurden neue Erkenntnisse bezüglich der Signaltransduktion des vIL-6 gewonnen. Aus diesem Grund wurde ein neues Konstrukt hergestellt mit dem Ziel neue transgene Tiere zu generieren.

In den zuvor verwendeten transgenen Mäusen erfolgte die Kontrolle der Expression durch den PEPCK-Promotor der Ratte. Dieser führt nur in der Leber und in der Niere zu einer Expression des Transgens. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Signaltransduktion von vIL-6 bereits innerhalb der Zelle ausgelöst werden kann. Weiterhin wurde von Meads und Medveczky [133] gezeigt, dass vIL-6 nur eingeschränkt sezerniert wird, worauf auch Ergebnisse dieser Arbeit hindeuten.

Für die Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von vIL-6 im Hinblick auf HHV-8 assoziierte Erkrankungen in neuen transgenen Mäusen wurde daher ein Promotor verwendet, der die Expression in Zellen hervorruft, die auch von Infektionen mit dem HHV-8 betroffen sind.

Für Generierung neuer transgener Mäuse wurde der Promotor des Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I (*major histocompatibility complex*-, MHC-Klasse-I), der als H2-Promotor bezeichnet wird, verwendet. MHC-Klasse-I Moleküle werden von fast allen Zellen exprimiert, die einen Zellkern besitzen. Der Umfang ihrer konstitutiven Expression variiert jedoch sehr. Zellen des Immunsystems tragen z.B. sehr viele MHC-Klasse-I-Moleküle an ihrer Oberfläche, während Leberzellen (Hepatozyten) verhältnismäßig geringe Mengen exprimieren. In transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass der H2-Promotor zu einer starken Genexpression in der Milz und im Thymus, sowie zu einer mittleren Expression in einigen anderen Organen wie z.B. Leber, Niere und Herz führt [117, 140].

Die Abb. 32 zeigt den Aufbau des für eine spätere Mikroinjektion verwendeten Konstrukts. Wie bereits erwähnt, steht die Expression des vIL-6 unter der transkriptionellen Kontrolle des H2-Promotors. Ein weiterer Unterschied zu dem zuvor verwendeten Konstrukt pEPCK-vIL-6* Δ BamHI besteht darin, dass das zweite Intron des Kaninchen β -Globin-Gens zwischen dem Promotor und dem vIL-6 liegt. Die Integration eines Introns zwischen dem Promotor und der

codierenden Sequenz verstärkt die Expression gegenüber einer Integration eines Intron hinter der codierenden Sequenz [130].

Eine weitere Veränderung ist, dass die cDNA des vIL-6 codonoptimiert wurde. Bei der Codonoptimierung werden die Codeons, soweit es der degenerierte genetische Code zulässt, so gewählt, dass beispielsweise eine verfrühte Polyadenylierung und die Bildung stabiler Sekundärstrukturen der mRNA ausgeschlossen wird. Weiterhin werden Codons bevorzugt, die für häufig auftretende tRNAs kodieren. Die Aminosäuresequenz bleibt hierbei unverändert. Für eine solche Optimierung konnte gezeigt werden, dass sie zu einer deutlich verbesserten Genexpression führt. Die Codonoptimierung erfolgte durch die Firma GENEART GmbH (Regensburg). Eine Gegenüberstellung der optimierten Sequenz und der Originalsequenz des vIL-6 ist im Anhang 9.4 dargestellt. Für die Codonoptimierung wurde die vIL-6-Sequenz ohne die unter 3.1.1 genannte Mutation des Codons GAA zu GAG verwendet. Um einen einfacheren Nachweis des vIL-6 zu ermöglichen, wurde auf cDNA-Ebene ein C-terminaler c-myc-tag an das vIL-6 angefügt. Wie der zuvor verwendete Vektor besitzt auch das neue Konstrukt das Polyadenylierungssignal des Kaninchen β -Globin-Gens.

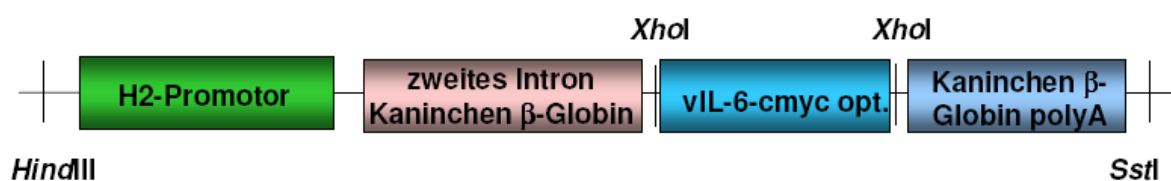


Abb. 32 Aufbau des für die Generierung transgener Mäuse zu verwendenden HindIII/SstI Fragments des H2-vIL-6-c-myc-opt Plasmids:

Das Fragment setzt sich aus dem H2-Promotor (grün), dem zweiten Intron des Kaninchen β -Globin-Gens (rosa), der codonoptimierten und mit einem c-myc-Tag versehenen cDNA des vIL-6 (blau) und der Polyadenylierungssequenz des Kaninchen β -Globin-Gens (dunkelblau) zusammen.

3.4.1 Klonierung des Expressionsvektors für die Generierung transgener Mäuse

Die im Vektor pPCR-Script gelieferte cDNA die für ein mit einem C-terminalen c-myc-tag fusioniertes und codonoptimiertes vIL-6 (vIL-6 opt) codiert wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* aus dem Plasmid 050266pPCR-Script herausgeschnitten und in den zuvor mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* geöffneten Vektor p163/7 kloniert. Der hierdurch entstandene Vektor wurde H2-vIL-6-c-myc-opt. genannt. Der Vektor p162/7 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Rütter (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

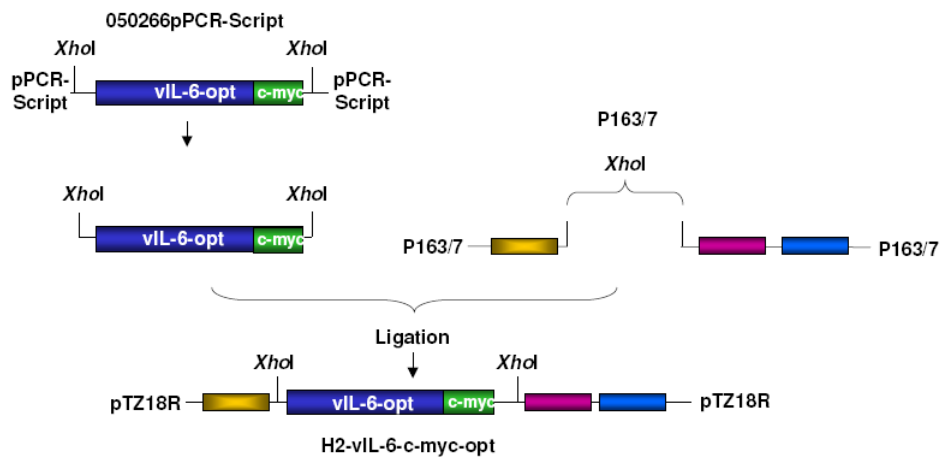


Abb. 33 Klonierungsschema des Vektors H2-vil-6-c-myc-opt.

3.4.2 Vergleich der Expression von vIL-6 nach Transfektion von HepG2-Zellen mit codonoptimierter und nicht optimierter cDNA

Zur Überprüfung des Einflusses der Codonoptimierung bezüglich der Expression wurde die codonoptimierte cDNA in den Expressionsvektor pDCC kloniert und parallel mit dem zuvor klonierten pDCC-vIL-6-c-myc transient in HepG2-Zellen transfiziert. Für die Klonierung der codonoptimierten vIL-6 cDNA in den Vektor pDCC wurde zunächst die cDNA des vIL-6 mit Hilfe des Enzyms *XhoI* aus 050266PCR-Script isoliert. Anschließend wurde sie in den zuvor ebenfalls mit *XhoI* geöffneten Vektor pESL kloniert. Hierdurch entstand das Plasmid pESL-vIL-6-c-myc-opt. Durch eine ortsspezifische Rekombination (s. Abschnitt 2.11.4) des Plasmids pESL-vIL-6-c-myc-opt. mit dem Zielvektor pDCC entstand das Plasmid pDCC-vIL-6-c-myc-opt.

HepG2-Zellen wurden transient mit pDCC-vIL-6-c-myc-opt. und mit pDCC-vIL-6-c-myc (s.3.2.1) transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1 ml 2 x Laemmlipuffer lysiert und ein Western-Blot mit dem Lysat durchgeführt. Der Nachweis des vIL-6 erfolgte mit dem gegen das c-myc-tag gerichteten Antikörper 9E10. vIL-6 war in HepG2-Zellen unabhängig davon nachweisbar ob codonoptimierte oder nicht optimierte cDNA transfiziert wurde (Abb. 34). In Zellen, die mit der codonoptimierten cDNA des vIL-6 transfiziert worden waren, wurden jedoch deutlich größere Mengen des Zytokins nachgewiesen.

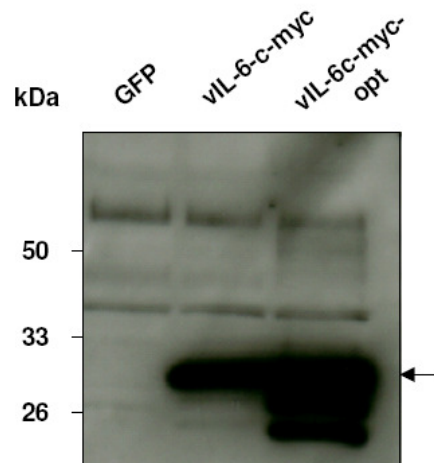


Abb. 34 Vergleich der vIL-6-Expression über codonoptimierte und nicht optimierte cDNA:
HepG2-Zellen wurden transient mit pDCC-vIL-6-c-myc-opt und pDCC-vIL-6-c-myc transfiziert. Der Nachweis des vIL-6 erfolgte mit dem c-myc spezifischen Antikörper 9E10.

In der Spur vIL-6 myc opt. sind zudem unterhalb der 29 kDa Bande zwei weitere Banden zu erkennen. Diese entsprechen weiteren Glykolysierungsformen des vIL-6. Auch in der Spur vIL-6-c-myc sind diese beiden Banden zu erkennen. Sie sind jedoch deutlich schwächer. Die Codonoptimierung führt somit zu einer verstärkten Expression des vIL-6 in HepG2-Zellen.

3.4.3 Expression von vIL-6 über das Expressionskonstrukt H2-vIL6-c-myc-opt.

Zur Überprüfung der vIL-6 Expression über den Vektor H2-vIL-6-c-myc-opt wurden NIH/3T3-Zellen mit dem Vektor transfiziert und die Expression von vIL-6 in einem Western-Blot getestet. NIH/3T3-Zellen wurden verwendet, da es Zellen einer murinen Fibroblasten-Zelllinie sind und bei der Analyse des Maus H2-Promotors Maus-Fibroblasten für transiente Expressionsanalysen verwendet worden waren [141]. Der Nachweis des vIL-6-c-myc erfolgte mit dem c-myc spezifischen Antikörper 9E10. Als Kontrolle wurden NIH/3T3-Zellen mit pEGFP-N1 transfiziert. Wie Abb. 35 zeigt, wurde vIL-6 nach Transfektion mit dem Plasmid H2-vIL-6-c-myc-opt in NIH/3T3-Zellen exprimiert. Das vIL-6 ist als eine Bande mit einer Größe von ca. 29 kDa im Western-Blot nachweisbar (s. Abb. 35, Spur H2-vIL-6 opt-c-myc). In der Spur der mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen ist keine Bande auf Höhe der des vIL-6 zu beobachten.

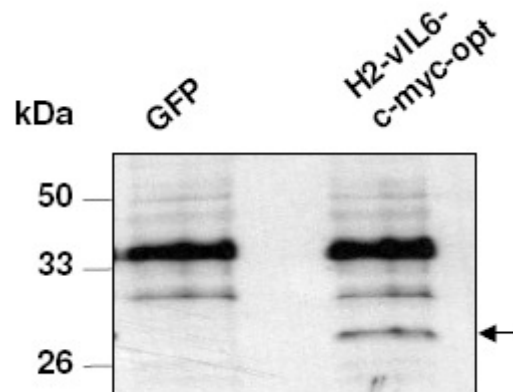


Abb. 35 Expression von vIL-6 über das Konstrukt H2-vIL-6-c-myc-opt *in vitro*:
NIH3T3-Zellen wurden mit H2-vIL-6-c-myc-opt und pEGFP-N1 transient transfiziert. Der Nachweis von vIL-6-c-myc erfolgte mit dem c-myc spezifischen Antikörper 9E10.

Da nach der Transfektion mit dem Konstrukt H2-vIL-6-c-myc-opt die Expression des vIL-6 in einem Western-Blot nachgewiesen werden konnte, wurde das Konstrukt für eine Mikroinjektion zur Generierung transgener Mäuse verwendet.

4 Diskussion

4.1 vIL-6 transgene Mäuse

Eine Infektion mit HHV-8 steht im direkten Zusammenhang mit den Erkrankungen Kaposi-Sarkom und PEL sowie einem großen Teil der Fälle von MCD. Ein Zusammenhang mit dem Multiplen Myelom wird diskutiert.

Für vIL-6 wurden verschiedene Eigenschaften beschrieben, die darauf hindeuten, dass es in der Pathophysiologie dieser Krankheiten eine ursächliche Bedeutung hat. Hierzu zählt, dass es humane Myelomzellen zum Wachstum anregt [107] und eine Überexpression von vIL-6 in hämatopoetischen Zellen einen dem Morbus Castleman ähnlichen Phänotyp verursacht [142]. Weiterhin wird diskutiert, dass es an der Initiation und Perpetuierung des Wachstums maligner Plasmazellen beteiligt ist [143]. Von Aoki *et al.* [109] wurde gezeigt, dass die subkutane Injektion von vIL-6 exprimierenden Zellen bei Mäusen eine Plasmazytose hervorruft. Diese ähnelt der in der plasmazellulären Variante des Morbus Castleman auftretenden Plasmazytose. Im Verlauf einer Infektion mit HHV-8 ist vIL-6 in der Lage infizierte Zellen vor der Immunabwehr zu schützen. Es erhält die Proliferation der infizierten Zellen aufrecht, da es die INF- α -induzierte Herabregulation des IL-6R durch seine direkte Bindung an gp130 umgehen kann [111].

Bislang wurden die Eigenschaften von vIL-6 in Zellkultur bzw. in Mäusen, denen vIL-6 exprimierende Zellen injiziert wurden, untersucht. vIL-6 transgene Mäuse würden es erstmals ermöglichen, die Einflüsse von vIL-6 *in vivo* ohne Nebeneffekte durch die anderen viralen Proteine zu untersuchen. Weiterhin würden sie die Möglichkeit eröffnen, neue Therapieansätze zu testen.

Um den Einfluss von vIL-6 in verschiedenen Organen zu untersuchen, wurde für die Generierung der vIL-6 transgenen Mäuse der PEPCK-Promotor der Ratte verwendet. Dieser ist vornehmlich in der Leber aktiv [127, 144]. Die Leber besitzt eine große Syntheseleistung und eine hohe sekretorische Kapazität. Aus diesem Grund kann die Überexpression eines sezernierten Transgens in der Leber die Möglichkeit eröffnen systemische Einflüsse des Transgens zu untersuchen. Für den PEPCK-Promotor wurde mehrfach gezeigt, dass er die

starke Expression eines Transgens bewirkt und hierdurch zu einer systemischen Akkumulation von Proteinen führen kann [114, 127, 145, 146].

Vor der Verwendung des Konstrukts für die Herstellung transgener Mäuse wurde seine Funktion in Zellkultur überprüft. Da *in vitro* eine vIL-6-Expression über das Konstrukt pEPCK-vIL-6* Δ BamHI nachweisbar war, wurde es für die Generierung transgener Mäuse verwendet.

Es wurden drei transgene Linien (11, 25 und 26) etabliert (s. Abschnitt 3.1.4). Die Generierung mehrerer transgener Linien ist notwendig, da die Integration eines Transgens nicht ortsspezifisch erfolgt. Somit kann ein auftretender Phänotyp auch durch die Zerstörung eines Gens aufgrund der Integration des Transgens hervorgerufen werden [135]. Dies lässt sich jedoch ausschließen, sofern ein Phänotyp in transgenen Tieren unterschiedlicher Linien auftritt, da bei unterschiedlichen Linien eine unabhängige Integration des Transgens erfolgt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die DNA des Transgens in Heterochromatinabschnitte der genomischen DNA integriert wird. Diese sind weitgehend transkriptionsinaktiv, so dass eine Genexpression verhindert werden könnte [147-149].

Bei den generierten transgenen Mäusen wurde durch Southern-Blot-Analysen gezeigt, dass bei den drei Linien eine unterschiedliche Kopienzahl des Transgens in die genomische DNA integriert wurde (s. Abschnitt 3.1.5). Von Linie 25 (ca. 1-2 Kopien), über Linie 11 (ca. 10 Kopien) zu Linie 26 (ca. 20 Kopien) wurde eine zunehmende Anzahl von Kopien im Genom der Tiere nachgewiesen. Dies könnte die Möglichkeit eröffnen auch einen Dosiseffekt der Expression nachzuweisen, sofern die Expression mit der Anzahl der Kopien des Transgens korreliert.

Nachdem die drei transgenen Linien etabliert worden waren, wurden die Tiere auf die Expression des vIL-6 getestet. Hierbei konnte zunächst keine Expression, weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.1.6). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Peters *et al.* [114]. Hier war die Expression des sIL-6R, bei Verwendung des gleichen Vektors bereits bei heterozygoten Tieren sowohl im Northern-Blot als auch im Western-Blot nachzuweisen.

Während längerer Hungerphasen erfolgt die Neubildung von Glucose aus Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen wie Aminosäuren, Lactat und Glycerol. Dieser Prozess wird als Gluconeogenese bezeichnet. Ebenso erfolgt die Glucosebildung bei einem Mangel an über die Nahrung aufgenommenen Kohlenhydraten durch die Gluconeogenese. Aus diesem Grund wird im Verlauf einer kohlenhydratfreien Diät die Expression der für die Gluconeogenese erforderlichen Enzyme verstärkt. Somit wird auch die Expression der PEPCCK, ein

Schlüsselenzym der Gluconeogenese, das die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert, heraufreguliert.

Ebenso wie die Expression der endogenen PEPCK wird auch die Expression eines Transgens, das unter der transkriptionellen Kontrolle des PEPCK-Promotors steht, durch eine kohlenhydratfreie Diät stimuliert [127]. Wie erwartet führte die Fütterung der transgenen Mäuse mit dieser Diät zu einer verstärkten Expression des vIL-6 in den Mäusen. So konnte in Tieren der Linie 11 und 26 die vIL-6-mRNA in einer RT-PCR nachgewiesen werden. Die Expression lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze des Northern-Blots (s. Abschnitt 3.1.6). Auch auf Proteinebene konnte in verschiedenen Tieren vIL-6 im Serum nachgewiesen werden. In diesen Tieren lag die vIL-6-Konzentration in einem Bereich von 14 ng/ml bzw. 1 ng/ml bei homozygoten Tieren der Linien 11 und 25 sowie im Bereich von 9 ng/ml bei heterozygoten Tieren der Linie 26 (s. Abschnitt 3.1.8). Insgesamt lagen die Konzentrationen weit unter den von anderen Gruppen ermittelten Konzentrationen, die den gleichen Promotor verwendet hatten [114, 127, 146]. Hier lagen die Konzentrationen im niedrigen µg/ml Bereich.

Im Verlauf eines Entzündungsprozesses wird u.a. durch IL-6 die hepatische Akute-Phase-Reaktion induziert. Diese führt zu einer Veränderung der Expression der sogenannten Akute-Phase-Proteine. Hierzu zählt z.B. eine erhöhte Expression des Haptoglobins sowie des Serum-Amyloids-A2 (SAA2).

Zur Überprüfung, ob die ermittelte Expression des vIL-6 ausreicht, um in den transgenen Mäusen einen Effekt auszulösen, sollten die Tiere auf die Induktion der Akute-Phase-Antwort untersucht werden.

Zum Nachweis, dass vIL-6 eine Akute-Phase-Reaktion auslösen kann wurde ein Versuch durchgeführt, in dem HepG2-Zellen mit rekombinantem vIL-6 stimuliert wurden. Die Zellen wurden mit drei Konzentrationen vIL-6 sowie zur Kontrolle mit IL-6 und Hyper-IL-6 stimuliert. Es zeigte sich im Northern-Blot, dass vIL-6 eine dosisabhängige Verstärkung der Haptoglobin-Expression hervorruft (s. Abschnitt 3.1.9.1). Beim Vergleich der Signalstärken zwischen den mit IL-6 bzw. Hyper-IL-6 stimulierten Zellen und den mit vIL-6 stimulierten Zellen wurde beobachtet, dass für die Induktion einer vergleichbaren Expression durch IL-6 und vIL-6 ca. die doppelte Konzentration vIL-6 benötigt wird. Im Vergleich zu Hyper-IL-6 wird ca. die zehnfache Konzentration benötigt, um eine vergleichbare Induktion der Haptoglobin-Expression zu induzieren.

Da gezeigt werden konnte, dass vIL-6 eine Akute-Phase-Reaktion in Zellen induziert, wurden entsprechende Versuche mit transgenen Tieren durchgeführt. Durch eine RT-PCR, jedoch

nicht durch einen Northern-Blot, war es möglich sowohl im heterozygoten als auch im homozygoten Tier der Linie 11 nach Fütterung der Tiere mit einer kohlenhydratlosen Diät eine Expression von vIL-6 nachzuweisen (s. Abschnitt 3.1.9.2). Mit der gleichen RNA wurde ein Northern-Blot zum Nachweis der Haptoglobin-mRNA durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Menge des exprimierten vIL-6 in der Leber groß genug ist um eine Akute-Phase-Reaktion zu induzieren. Hierbei war lediglich eine basale Expression von Haptoglobin zu beobachten, die zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren jedoch keinen Unterschied aufwies (s. Abschnitt 3.1.9.2). Dies deutet darauf hin, dass die in der Leber vorhandene Expression nicht ausreicht, um eine Induktion der Haptoglobinexpression zu verursachen.

Die Induktion der Akute-Phase-Reaktion durch vIL-6 wurde im Rahmen dieser Arbeit in HepG2-Zellen gezeigt. Darüber hinaus wurde sie bislang in humanen Hep-3B-Zellen (humanes hepatozelluläres Karzinom) in Form einer verstärkten Haptoglobin-Expression [150] und in Kaposi-Sarkom-Zellen in Form einer Regulation der PTX3-Expression [151] beschrieben. Bei PTX3 handelt es sich um ein extrahepatisch exprimiertes in vaskulären endothelialen Zellen und in Fibroblasten entdecktes Akute-Phase-Protein [152, 153]. Ob vIL-6 auch in Mäusen eine Akute-Phase-Reaktion induzieren kann wurde bisher noch nicht gezeigt.

Zum Nachweis, dass vIL-6 in der Lage ist in Mäusen eine Akute-Phase-Reaktion auszulösen, wurde Wildtyp-Mäusen vIL-6 intraperitoneal injiziert. Um eine Akute-Phase-Reaktion nachzuweisen, wurde ein SAA2 Northern-Blot durchgeführt. Der Wechsel beim Nachweis einer Akute-Phase-Reaktion von der Detektion der Haptoglobin-mRNA auf die Detektion der SAA2-mRNA erfolgte, da die Expression von SAA2 im Vergleich zu der von Haptoglobin nach einer Stimulation deutlich stärker induziert wird [138, 139]. Dies ist insbesondere beim Nachweis einer relativ schwachen Induktion, wie sie hier erwartet wurde, von Vorteil. Nach einer Induktion steigt die Serumkonzentration von Haptoglobin in Mäusen ca. um das dreißigfache an, während die SAA2-Serumkonzentration nach einer Induktion ca. 1.000 mal höher liegt als ohne Induktion. [138, 139]. Im Northern-Blot konnte gezeigt werden, dass bei den verwendeten Mengen vIL-6 (5 und 50 µg) eine deutliche Zunahme der SAA2-mRNA im Vergleich zu Kontroll-Tieren, denen nur Ringerlösung injiziert wurde, eintritt (s. Abschnitt 3.1.9.3). Das schwache Signal, das beim Tier Nummer 2, welchem Ringerlösung injiziert wurde zu sehen ist, könnte auf eine schwache Infektion des Tieres z.B. durch eine bei der Injektion verursachte Verletzung zurückzuführen sein. Das im Vergleich schwache SAA2-Signal beim dritten Tier dem 5 µg vIL-6 injiziert worden war könnte durch einen Fehler bei der Injektion bedingt sein, z.B. in dem nicht die vollständige Menge des vIL-6 ins Peritoneum

gelangt ist. Im Vergleich zu Mäusen, denen als Positivkontrolle 10 µg hIL-6 injiziert wurde, waren die durch 5 bzw. 50 µg vIL-6 hervorgerufenen Signale schwächer. Dies spricht dafür, das hIL-6 im Vergleich zu vIL-6 in den Lebern der Mäuse eine größere Aktivität besitzt oder langsamer abgebaut wird.

Es konnte also gezeigt werden, dass vIL-6 in Mäusen eine Akute-Phase-Reaktion hervorruft, die durch einen Northern-Blot nachweisbar ist in welchem SAA-2-mRNA detektiert wird. Daher müsste auch in den transgenen Mäusen eine Akute-Phase-Reaktion durch vIL-6 hervorgerufen werden können sofern die Expression des vIL-6 stark genug ist. Dies wurde durch den Nachweis von SAA2-mRNA in einem Northern-Blot überprüft. (s. Abschnitt 3.1.9.4) Lediglich in den Lebern von zwei Tieren, die zuvor mit einer kohlenhydratfreien Diät gefüttert worden waren, konnte ein schwaches Signal nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um die Tiere 11-1 und 25-2 (Abb. 22A, 3.1.9.4). Vergleicht man jedoch die Menge der auf das Gel aufgetragenen RNA (Abb. 22B, 3.1.9.4), so ist zu sehen, dass in der Spur 11-1 und 25-2 mehr RNA aufgetragen wurde als in den anderen Spuren. Somit sind die nachgewiesenen Signale wahrscheinlich auf unterschiedliche Mengen RNA zurückzuführen. Sie spiegeln mit großer Wahrscheinlichkeit die basale Expression des SAA2 wieder, die beim Einsatz gleicher Menge RNA auch in den Wildtyp-Tieren hätte nachgewiesen werden können. Die Menge des exprimierten vIL-6 reicht somit nicht aus um eine Akute-Phase-Reaktion in den transgenen Tieren auszulösen.

Zur Überprüfung, ob das vIL-6 über einen längeren Zeitraum in den Lebern pathologische Veränderungen hervorruft, wurden je drei Mäuse über einen Monat mit einer kohlenhydratfreien Diät gefüttert und die Lebern durch einen Pathologen untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren festgestellt werden (s. Abschnitt 3.1.9.5).

Somit konnten keine durch vIL-6 hervorgerufenen pathophysiologischen Effekte in den transgenen Mäusen nachgewiesen werden.

Eine Expression des vIL-6 war in transgenen Mäusen ohne zusätzliche Stimulation des Promotors nicht nachweisbar. Auch nach Fütterung der Tiere mit einer kohlenhydratfreien Diät konnte die Expression lediglich durch eine RT-PCR, bei der es sich um eine sehr sensitive Methode handelt, gezeigt werden. In einem Northern-Blot war keine Expression nachweisbar. Die Serumkonzentration des vIL-6 lag bei den transgenen Linien in einem Bereich von ca. 1-15 ng/ml. Dies liegt deutlich unterhalb der Konzentration, die von rekombinantem vIL-6 benötigt wird, um eine Aktivität nachweisen zu können [120]. Selbst in

der Leber, also dem Hauptsyntheseort der PEPCK, war kein durch vIL-6 hervorgerufener Effekt zu beobachten.

Die Gründe für die schwache Expression eines Transgens können vielfältig sein. So kann eine schwache Expression z.B. durch die Integration des Transgens in Heterochromatin-Bereiche [147-149], durch *Repeat-Induced Gene Silencing* (RIGS) [154, 155] oder durch Methylierung der Cytosin-Reste der Dinukleotide CpG [156] hervorgerufen werden.

Bei Heterochromatin handelt es sich um eine dicht kondensierte Form des Chromatins, die transkriptionell weitgehend inaktiv ist. So sind Gene die normalerweise im Euchromatin liegen und ins Heterochromatin integriert werden normalerweise transkriptionsinaktiv. Man spricht davon, dass ein Gen „ruhiggestellt“ („silenced“) ist. Der Unterschied in der Genexpression wird als Positionseffekt bezeichnet. Das heißt, dass die Genexpression von der Lage des Gens innerhalb des Genoms abhängt. Auch die Integration eines Transgens in das Heterochromatin der Maus-DNA bewirkt eine „Ruhigstellung“ des Transgens, so dass keine Expression mehr erfolgt [147-149]. Da drei voneinander unabhängige Linien generiert wurden, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die Integration des Transgens bei allen drei Linien im Heterochromatin erfolgt ist.

Eine weitere Ursache für eine schwache Expression des Transgens kann durch die Integration als Concatemere begründet sein. Diese Integration in Form von Tandem-Wiederholungen kann zu einem „silencing“ des Transgens führen, das auch als *Repeat-Induced Gene Silencing* (RIGS) bezeichnet wird [154, 155]. So wurde nachgewiesen, dass eine Verringerung der Anzahl der ins Genom integrierten Kopien bei transgenen Mäusen zu einer deutlichen Verstärkung der Genexpression führen kann [154]. Ein solcher Effekt kann für die hier verwendeten transgenen Tiere jedoch nahezu ausgeschlossen werden, da eher eine positive Korrelation zwischen Kopienzahl und Genexpression nachgewiesen wurde. So ist in der Linie 25, welche die niedrigste Anzahl des Transgens trägt, keine Expression des vIL-6 nachzuweisen. Bei den Tieren der Linien 11 und 26, die eine größere Anzahl des Transgens in ihrem Genom tragen, ist ein Nachweis der vIL-6-mRNA hingegen möglich. Die Menge der detektierten mRNA nimmt auch von Linie 11 zu 26 mit der weiteren Erhöhung der Kopienzahl zu (vergl. hierzu 3.1.5 Abb. 13 und 3.1.6 Abb. 14).

Sowohl Positionseffekte als auch *Repeat-Induced Gene Silencing* (RIGS) können zudem zur sogenannten *Variegation* führen. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass ein Transgen lediglich in einem Teil der Zellen, in denen der Promotor normalerweise aktiviert wird, exprimiert wird [154, 155].

Als dritte mögliche Ursache für eine verminderte Expression soll hier die Methylierung der Cytosinreste in CpG Dinukleotiden genannt werden. Die Methylierung der genannten Cytosinreste bildet die Basis für die epigenetische Kontrolle der Genexpression in Vertebraten [157, 158] und ist von großer Bedeutung in der Entwicklung, der Tumorgenese sowie für die genomische Prägung [159, 160]. Die Methylierung führt zu einer Veränderung der Wechselwirkungen zwischen der DNA und DNA-bindenden Proteinen, wodurch Veränderungen in der Chromatinstruktur hervorgerufen werden [157]. Diese können zu einer Inhibition der Transkription führen. Hierbei ist wahrscheinlich nicht nur eine Methylierung im Bereich des Promotors oder anderer regulatorischer DNA-Elemente von Bedeutung. Auch die Dichte der Methylierung innerhalb eines Transgens kann für eine Hemmung der Transkription verantwortlich sein [156].

Unabhängig von der Ursache der festgestellten schwachen Expression ist es notwendig neue transgene Mäuse zu generieren. Zudem sprechen auch die im folgenden Abschnitt diskutierten Ergebnisse für die Generierung neuer transgener Mäuse.

4.2 Signaltransduktion durch vIL-6 von innerhalb der Zelle

vIL-6 besitzt gegenüber IL-6 die Eigenschaft, dass es gp130 auch ohne Beteiligung des IL-6R binden kann. Vor kurzem wurde zudem gezeigt, dass vIL-6 deutlich schlechter als hIL-6 sezerniert wird. Seine Sekretion dauert ca. achtmal länger als die des hIL-6. Darüberhinaus wurde beobachtet, dass vIL-6 von BAF-B03-Zellen die kein gp130 exprimieren nicht sezerniert wird. Erst eine Expression von gp130 in diesen Zellen ermöglichte die Sekretion von vIL-6. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass vIL-6 bereits in der Zelle an gp130 bindet und eine Signaltransduktion auslöst [133].

Das Modell einer intrazellulär vermittelten Signaltransduktion durch vIL-6 konnte durch eigene Versuche bestätigt werden.

Für die Überprüfung des Modells wurden Versuche durchgeführt, in denen das vIL-6 durch die Fusion mit dem ER-Retentionssignal KDEL in den Zellen zurückgehalten wird. Beim Nachweis von vIL-6, mit und ohne KDEL-Sequenz, im Lysat transfizierter Zellen fällt auf, dass vIL-6 auch ohne das ER-Retentionssignal in verhältnismäßig großen Mengen detektiert werden konnte (vergl. 3.2.2 Abb. 26A). Dies spricht dafür, dass vIL-6 nur schlecht sezerniert wird und bestätigt die durch Meads und Medveczky [133] gezeigte langsame Sekretion des vIL-6.

Für den Nachweis einer intrazellulär induzierten Signaltransduktion durch vIL-6 wurde das pSTAT3-Signal in transfizierten Zellen, sowie in Zellen, die mit den Überständen der transfizierten Zellen stimuliert worden waren, überprüft.

Hierbei war in den vIL-6 exprimierenden Zellen unabhängig von der KDEL-Sequenz eine etwa gleich starke STAT3-Phosphorylierung nachzuweisen (vergl. 3.2.2 Abb. 26B). Dies ist auffällig, da bei einer gleich starken Expression von vIL-6 mit und ohne KDEL-Sequenz, aufgrund der ER-Retention des vIL-6-KDEL unterschiedliche Mengen der Zytokine im Kulturüberstand zu erwarten sind. Dieses Ergebnis könnte daher ein erster Hinweis auf eine intrazellulär vermittelte Signaltransduktion sein.

Für den Nachweis einer intrazellulär induzierten Zell-Stimulation durch vIL-6 war es notwendig zu zeigen, dass in den Überständen der transfizierten Zellen keine für eine Stimulation von außen ausreichende Konzentration des vIL-6 vorlag.

Bei einer Stimulation von HepG2-Zellen mit den Überständen der transfizierten Zellen konnte kein pSTAT3-Signal nach Stimulation mit dem Überstand der vIL-6-KDEL exprimierenden

Zellen nachgewiesen werden (vergl. 3.2.2 Abb. 26C). Dies bedeutet, dass das vIL-6-KDEL so weit in den transfizierten Zellen zurückgehalten wurde, dass keine Stimulation der Zellen von außen erfolgen konnte.

Da in den transfizierten Zellen dennoch pSTAT3 detektiert werden konnte, muss dies durch eine Bindung von vIL-6-KDEL an gp130 innerhalb der Zellen hervorgerufen worden sein. Im Überstand der vIL-6 exprimierenden Zellen reichte die vIL-6-Konzentration aus, um Zellen von außen zu stimulieren. Dennoch war die Sekretion auch hier so schwach, dass in einem Western-Blot kein vIL-6 im Überstand nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung einer relativ schwachen Sekretion von vIL-6 wie sie von Meads und Medveczky [133] beschrieben wurde und zeigen, dass vIL-6 bereits in der Zelle eine Signaltransduktion hervorrufen kann. Im Hinblick auf mögliche gegen vIL-6 gerichtete Therapieansätze bedeutet dies, dass eine Neutralisation von vIL-6 bereits in Zellen erfolgen müsste.

Eine intrazelluläre Inhibition der Signaltransduktion durch vIL-6 konnte durch den monoklonalen humanen gegen vIL-6 gerichteten Antikörper MAV gezeigt werden. Dieser Antikörper besteht aus einer variablen Domäne der schweren Kette und einer variablen Domäne der leichten Kette des humanen IgG, die durch eine kurze *Linker*-Sequenz miteinander verbunden sind. Diese Art Antikörper wird „single chain variable fragment“ (scFv) genannt. MAV wurde mittels einer humanen Phagen-Oberflächenpräsentations-Bibliothek selektiert [115].

Für den Nachweis einer intrazellulären Inhibition von vIL-6 waren COS-7-Zellen mit der cDNA des Antikörpers, die zuvor mit der ER-Retentionssequenz KDEL fusioniert worden war, und mit der cDNA des vIL-6 kotransfiziert worden. In diesen Zellen wurde eine deutliche Abnahme der STAT3-Phosphorylierung beobachtet [115]. Somit könnte der anti-vIL-6 Antikörper, fusioniert mit der ER-Retentionssequenz KDEL (MAV-KDEL), für eine gezielte gentherapeutische Behandlung HHV-8-assoziiierter Krankheiten verwendet werden. Hierzu müsste ein Expressionsplasmid, das für MAV-KDEL codiert, in HHV-8-infizierte Zellen eingebracht werden.

Eine weitere mögliche Strategie zum Einbringen von Proteinen in Zellen wurde von Cohen-Saidon beschrieben. Hier wurde die direkte Einschleusung eines Fusionsproteins aus einem einzelkettigen Antikörper und dem TAT-Protein des HIV-1 in lebende Zellen gezeigt. Das TAT-Protein kann durch einen noch nicht genau geklärten Mechanismus in Zellen gelangen [161] und ist daher ein nützliches molekularbiologisches Werkzeug, um Proteine in lebende Zellen einzuschleusen.

4.3 Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6 von innerhalb der Zelle

Im Gegensatz zur intrazellulär vermittelten Signaltransduktion durch vIL6 wurde für die Retention von hIL-6 in der Zelle gezeigt, dass sie zur vollständigen Inhibition der durch hIL-6 induzierten Signaltransduktion führt [112]. In einem eigenen Versuch wurde das Potential von vIL-6 und hIL-6 bezüglich einer intrazellulär vermittelten Signaltransduktion direkt miteinander verglichen.

IL-6 benötigt für die Bindung an gp130 den IL-6R. Eine Bindung von IL-6 an gp130 innerhalb der Zelle bedingt somit auch die Gegenwart des IL-6R bzw. des sIL-6R in der Zelle. Aus diesem Grund wurden für die im Abschnitt 3.3 durchgeführten Versuche HepG2-Zellen verwendet. Diese exprimieren sowohl gp130 als auch den IL-6R.

Hyper-IL-6, ein Designerzytokin, das sich aus hIL-6 und sIL-6R verbunden über einen flexiblen *Linker* zusammensetzt, wurde in die Versuche mit einbezogen, da es ebenso wie vIL-6 direkt an gp130 bindet. Zudem besitzt es eine deutlich höhere Aktivität als der Komplex aus hIL-6 und sIL-6R.

Entsprechend den Ergebnissen mit vIL-6 allein konnte eine STAT3-Phosphorylierung in allen Zellen, die mit der cDNA der entsprechenden Zytokine transfiziert worden waren, beobachtet werden. Eine Differenzierung zwischen einer intrazellulär und einer von außen vermittelten Signaltransduktion durch IL-6 und Hyper-IL-6 war jedoch nicht möglich. Hierfür wäre es notwendig gewesen, dass die Konzentration der Zytokine im Kulturüberstand der Zellen die IL-6 und Hyper-IL-6 (beide fusioniert mit der KDEL-Sequenz) exprimieren nicht ausreicht, um Zellen von außen zu stimulieren. Dies war jedoch nicht der Fall (vergl. 3.3.3, Abb. 30B). Die Ursache hierfür lag wahrscheinlich in der unvollständigen Retention des IL-6-KDEL und des Hyper-IL-6-KDEL.

Das Ergebnis einer intrazellulär vermittelten Signaltransduktion durch vIL-6 konnte hingegen bestätigt werden (s. Abschnitt 3.3.3). Mit dem Kulturüberstand der vIL-6-KDEL exprimierenden Zellen war keine Zellstimulation von außen möglich. Somit konnten auch die vIL-6-KDEL exprimierenden Zellen nicht von außen stimuliert worden sein. Die in den mit vIL-6-cDNA transfizierten Zellen nachgewiesene STAT3-Phosphorylierung wurde daher durch eine bereits in der Zelle induzierte Signaltransduktion hervorgerufen.

Der Grund dafür, dass mit dem Überstand der vIL-6-KDEL exprimierenden Zellen im Gegensatz zu dem der IL-6-/Hyper-IL-6-KDEL exprimierenden Zellen keine Stimulation von Zellen möglich war, liegt wahrscheinlich in der schlechten Sekretion des vIL-6. So wurde in Abschnitt 3.3.2 beobachtet, dass vIL-6 im Gegensatz zu IL-6 und Hyper-IL-6 auch ohne

KDEL-Sequenz in Zelllysaten transfizierter Zellen nachzuweisen ist. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur. Hier wurde die schlechte Sekretion von vIL-6 auf sein Signalpeptid zurückgeführt, da ein mit dem Signalpeptid des IL-6 fusioniertes vIL-6 deutlich besser sezerniert wurde [133]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde ausschließlich vIL-6 mit dem natürlichen Signalpeptid verwendet.

Wie oben beschrieben war aufgrund der unvollständigen Retention der Zytokine IL-6 und Hyper-IL-6 keine Differenzierung zwischen einer intrazellulär und einer extrazellulär induzierten Signaltransduktion möglich. Hierzu war es erforderlich die von außerhalb der Zelle induzierte Signaltransduktion vollständig zu verhindern. Dies ist im Fall von Hyper-IL-6 und vIL-6 durch sgp130Fc möglich.

Weder Hyper-IL-6 noch vIL-6 benötigen für die Bindung an gp130 den membranständigen IL-6R. Somit konkurriert sgp130Fc mit dem membranständigen gp130 um die Bindung dieser Zytokine.

Tatsächlich ermöglichte es die Zugabe von sgp130Fc zum Kulturmedium der transfizierten Zellen eine intrazelluläre Signaltransduktion von Hyper-IL-6 nachzuweisen (s. Abschnitt 3.3.3).

Nach Zugabe von sgp130Fc zum Medium konnte in den mit der cDNA des Hyper-IL6 transfizierten Zellen eine STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in den Überständen der Hyper-IL-6-KDEL exprimierenden Zellen kein freies Hyper-IL-6 vorhanden war, durch das die Zellen von außen hätten stimuliert werden können, da keine Stimulation in Form eines pSTAT3-Signal nachweisbar war. Auch mit den Überständen der Zellen, die Hyper-IL-6 ohne KDEL-Sequenz oder vIL-6 ohne KDEL-Sequenz exprimierten, war keine Stimulation von Zellen möglich. Es wurde folglich auch das durch Sekretion freigesetzte Hyper-IL-6 bzw. vIL-6 vollständig durch sgp130Fc gebunden und eine durch sie induzierte Signaltransduktion inhibiert.

Da Hyper-IL-6 ein Fusionsprotein aus hIL-6 und sIL-6R ist deuten die für Hyper-IL-6 gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass auch IL-6 in der Lage sein müsste bereits innerhalb von Zellen eine Signaltransduktion hervorzurufen. Mit den bisher durchgeführten Ergebnissen lässt sich hierzu jedoch keine Aussage treffen. Ein mögliches Problem für eine intrazellulär durch IL-6 vermittelte Signaltransduktion könnte in der erforderlichen Rekrutierung von zwei Rezeptorkomponenten, dem IL-6R und gp130, bestehen. Eine Möglichkeit die Signaltransduktion durch IL-6 von außerhalb der Zellen zu inhibieren, wäre die Verwendung eines inhibitorischen Antikörpers der gegen IL-6 oder den IL-6R gerichtet ist. Hierdurch

könnte die Bildung des Zytokin-Rezeptor-Komplexes aus IL-6, IL6R und gp130 und somit auch eine Signaltransduktion verhindert werden.

4.4 Generierung transgener Mäuse mit vIL-6 unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen H2-Promotors

vIL-6 ist wie unter 4.3 diskutiert wurde in der Lage intrazellulär eine Signaltransduktion zu vermitteln. Zudem wurde gezeigt, dass es nur langsam sezerniert wird [133]. Im Hinblick auf die PEPCK-vIL-6-transgenen Mäuse lässt sich hieraus schließen, dass auch unabhängig von der Stärke der Genexpression keine hohen Serumkonzentrationen zu erwarten sind, da vIL-6 nur langsam sezerniert wird. Weiterhin legen diese Ergebnisse nahe, dass vIL-6 im Gegensatz zur bisherigen Annahme in erster Linie eine autokrine Wirkung besitzt. Um ein realistisches Modell von der Bedeutung des vIL-6 für HHV-8 bedingte Krankheiten zu erlangen, wäre es daher notwendig, die Expression des vIL-6 bevorzugt in Zellen zu induzieren, in denen auch eine Infektion mit HHV-8 nachgewiesen werden konnte.

Dies sind Gründe die für die Generierung neuer transgener Mäuse sprechen.

Zellen, in denen eine Infektion mit HHV-8 nachgewiesen wurde, haben abhängig von der Erkrankung eine unterschiedliche Herkunft. In Kaposi-Sarkom-Läsionen besitzen die charakteristischen Spindel-Zellen in erster Linie eine endotheliale Herkunft [94]. Manche tragen aber auch Oberflächenmarker für glatte Muskelzellen, Makrophagen und dendritische Zellen [162-164]. Zudem wurde HHV-8 auch in B-Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen [88-90]. Bei Patienten mit MCD konnte HHV-8 in der Milz und in Lymphknoten nachgewiesen werden [165]. Bei den infizierten Zellen handelt es sich um Zellen die morphologisch Immunoblasten ähneln und von B-Zellen abstammen. Auch die Zellen des PEL besitzen eine B-Zell Abstammung, wobei einige Eigenschaften der Zellen es nahe legen, dass sie ein präterminales Stadium der B-Zell-Differenzierung darstellen [166-168].

Für die Kontrolle der Expression in neuen transgenen Mäusen wurde der murine H2- (MHC-I-) Promotor gewählt. Die Expression von MHC-I erfolgt in allen kernhaltigen Zellen, wobei sie stark variiert. Am stärksten wird MHC-I in T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert. Hingegen ist die Expression in Hepatozyten, in der Niere und im Gehirn nur schwach. Ein entsprechendes Expressionsmuster wurde für verschiedene Transgene gezeigt, die unter der Kontrolle des H2-Promotors stehen. In diesen Mäusen wurde eine starke Expression in der Milz und dem Thymus und eine mittlere Expression in Organen

wie dem Herz, der Leber oder im Muskel beschrieben. Im Gehirn und im Pankreas erfolgte keine Expression [117, 140]. Hierdurch wird ein breites Expressionsspektrum des vIL-6 mit einer starken Expression in Zellen, für die auch eine Infektion mit HHV-8 beschrieben wurde, ermöglicht.

Um eine starke Expression zu gewährleisten wurde die DNA des Transgens optimiert.

Hierfür wurde unter anderem die Lage des zweiten Introns des Kaninchen β -Globin-Gens verändert. Im neuen Konstrukt, das als H2-vIL-6-c-myc-opt bezeichnet wurde, liegt es zwischen dem Promotor und vIL-6 und nicht wie zuvor zwischen vIL-6 und dem Polyadenylierungssignal. Es wurde gezeigt, dass die Integration eines Introns zwischen Promotor und Gen zu einer deutlich stärkeren Genexpression führt als bei einer Integration des Introns hinter der kodierenden Sequenz [130].

Ein weiterer Faktor, der eine starke Expression einer cDNA sowohl in Zellkultur als auch in transgenen Mäusen begünstigen kann ist die „Codonoptimierung“ einer cDNA. Hierunter versteht man, dass, soweit es der degenerierte Code der DNA zulässt, die Auswahl der verwendeten Codons optimiert wurde. Die Aminosäuresequenz wird hierbei nicht verändert.

Kriterien für die Auswahl der Codons sind z.B. eine Anpassung des G/C-Gehaltes, die Verhinderung einer vorzeitigen Polyadenylierung, die Bildung von stabilen RNA-Sekundärstrukturen, sowie das Einfügen bzw. die Vermeidung von immunregulatorischen CpG-Motiven. Nähere Informationen hierzu sind auf der Internetseite der Firma GENEART GmbH (www.geneart.com) erhältlich. Für das neue Konstrukt wurde eine für die Expression in Mäusen optimierte cDNA des vIL-6 verwendet.

Der Einfluss der Codonoptimierung auf die Expression konnte *in vitro* gezeigt werden. In HepG2-Zellen, die mit der codonoptimierten cDNA transfiziert worden waren, konnte deutlich mehr vIL-6 nachgewiesen werden als in HepG2-Zellen, die mit der nicht optimierten cDNA transfiziert worden waren (s. Abschnitt 3.4.2).

Vor der Verwendung in transgenen Mäusen wurde das neue Konstrukt (H2-vIL-6-c-myc-opt.) in Zellkultur getestet. Nach der Transfektion von NIH/3T3-Zellen konnte vIL-6 in den Lysaten der Zellen durch einen Western-Blot nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.4.3). Da die Testexpression mit dem neuen Konstrukt erfolgreich war, wurde es für eine Mikroinjektion verwendet.

Mit dem neuen Konstrukt konnten 8 transgene Mäuse generiert werden. Erste, noch vorläufige Daten deuten auf einen durch vIL-6 induzierten Phänotyp hin, da bei verschiedenen transgenen Tieren massiv vergrößerte Lymphknoten beobachtet werden konnten.

Sollten sich diese Ergebnisse bestätigen, können die Tiere für eine detaillierte Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von vIL-6 verwendet werden und eröffnen die Möglichkeit gegen vIL-6 gerichtete Therapieansätze auf ihre Wirkung zu testen.

5 Zusammenfassung

Infektionen mit dem humanen Herpesvirus-8 (HHV-8) stehen im ursächlichen Zusammenhang mit den Erkrankungen Kaposi Sarkom, Primäres Effusions-Lymphom (PEL) und der multizentrischen Form des Morbus Castleman (MCD).

Das Genom des HHV-8 codiert für mehrere potentiell onkogene Proteine. Eines dieser Proteine ist das virale IL-6 (vIL-6), das 24,7 % Homologie zu humanem IL-6 aufweist. Wie hIL-6 aktiviert auch vIL-6 den JAK/STAT3 Signalweg durch Bindung an das Glycoprotein 130 (gp130). Im Gegensatz zu hIL-6, das zunächst den IL-6R binden muss bevor es mit gp130 interagieren kann, ist vIL-6 jedoch in der Lage direkt an gp130 zu binden und kann somit Zellen stimulieren, die keinen IL-6R exprimieren. vIL-6 wird eine große Bedeutung in HHV-8-assoziierten Erkrankungen zugeschrieben.

Um die pathophysiologische Bedeutung von vIL-6 unabhängig von den Einflüssen der anderen viralen Proteine zu untersuchen, wurden vIL-6-transgene Mäuse generiert, die vIL-6 leberspezifisch exprimieren. In Tieren von zwei der drei unabhängig etablierten transgenen Linien konnte eine Expression des Transgens nach einer zusätzlichen Stimulation des PEPCK-Promotors nachgewiesen werden. Sowohl in Zellkultur als auch in Mäusen konnte gezeigt werden, dass rekombinantes vIL-6 eine Akute-Phase-Reaktion hervorrufen kann. In den transgenen Mäusen reichte die vIL-6 Expression hierzu jedoch nicht aus. Ein durch vIL-6 induzierter Phänotyp wurde nicht beobachtet.

Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass vIL-6 im Vergleich zu hIL-6 deutlich langsamer sezerniert wird, und wahrscheinlich bereits innerhalb der Zelle eine Signaltransduktion hervorrufen kann. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Ein mit der ER-Retentionssequenz KDEL fusioniertes vIL-6, welches in der Zelle zurückgehalten wird, konnte durch eine intrazellulär vermittelte Signaltransduktion eine Stimulation von Zellen hervorrufen.

Neben dem vIL-6 konnte auch für das Designerzytokin Hyper-IL-6, einem Fusionsprotein aus hIL-6 und dem löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R), eine intrazellulär vermittelte Signaltransduktion gezeigt werden.

Die neuen Erkenntnisse deuten auf eine vorwiegend autokrine Wirkung des vIL-6 hin. Für ein realistisches Modell der Wirkung von vIL-6 *in vivo* ist es daher notwendig, die Expression in Zellen hervorzurufen, die vom HHV-8 infiziert werden. Für die Generierung neuer transgener

Mäuse wurde daher der Promotor des Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) Klasse-I verwendet. Dieser führt zu einer starken Expression in Zellen des Immunsystems. Zudem wurde eine codonoptimierte cDNA des vIL-6 verwendet. Da das neue Konstrukt *in vitro* zu einer vIL-6-Expression führte, wurde es für die Generierung transgener Mäuse eingesetzt. Erste Ergebnisse zeigen stark vergrößerte Lymphknoten bei diesen transgenen Mäusen. Dies deutet auf einen vIL-6 induzierten Phänotyp hin.

Diese vIL-6-transgenen Mäuse können als Modell für die pathologischen Eigenschaften von vIL-6 bei Infektionen mit HHV-8 dienen und die Möglichkeit eröffnen, neue, gegen vIL-6 gerichtete Therapieansätze zu testen.

6 Summary

Infections with the human herpes-virus-8 play a causal role in diseases like Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma and multicentric Castleman disease.

The genome of HHV-8 codes for several putative oncogenes. One of these is the viral-IL-6 (vIL-6), which exhibits 24,7 % homology to human IL-6 (hIL-6). Both cytokines activate the JAK/STAT3 signalling pathway by binding to the glycoprotein 130 (gp130). In contrast to hIL-6, vIL-6 is able to bind directly to gp130 without the need for IL-6R. Therefore it is able to stimulate cells which lack the IL-6R. It is believed that vIL-6 plays a major role in HHV-8-associated diseases.

In order to investigate the pathophysiological relevance of vIL-6 in the absence of other viral proteins, transgenic mice were generated expressing vIL-6 under a liver specific promoter. In animals of two of the three independently established transgenic lines the expression of the transgene was detected after an additional stimulation of the applied PEPCK promoter. It was shown that recombinant vIL-6 is able to induce an acute-phase-response in cell culture as well as in mice. Nevertheless the vIL-6 expression was too weak to induce an acute-phase-response in the transgenic animals. No vIL-6-induced phenotype could be detected.

Recently it was shown that vIL-6 is secreted more slowly than hIL-6 and we could show that vIL-6 signals via an autocrine mechanism. Even when vIL-6 was retained within the cell due to its fusion to the ER-retention signal KDEL, a stimulation of the cells was detected. In addition to vIL-6 it was also shown for the designer-cytokine Hyper-IL-6, a fusion-protein of hIL-6 and the soluble human IL-6R (sIL-6R), that it is able to induce a signaltransduction from within the cell.

These new findings suggest a mainly autocrine signalling pathway of vIL-6. Thus, it is necessary to induce the expression of the transgene in cells which are targeted by infections by HHV-8 to get a realistic model of the impact of vIL-6 in HHV-8-associated diseases. For this reason the major histocompatibility complex- (MHC-) class-I promoter was used to generate new transgenic mice. This promoter leads to a strong expression in cells of the immune system. Furthermore, a codon-optimised vIL-6-cDNA was used. As the new construct was functional *in vitro* it was used to generate new vIL-6 transgenic mice.

Preliminary data indicate that these mice show a vIL-6-induced phenotype, since some of them show marked enlarged lymph nodes.

The transgenic animals can serve as a model to investigate the pathophysiological features of vIL-6. Furthermore they might offer the chance to investigate new therapeutic principles directed against vIL-6.

7 Literaturverzeichnis

1. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. (1990) Proc Natl Acad Sci U S A, **87** (18), 6934-8.
2. Grotzinger, J., *Molecular mechanisms of cytokine receptor activation*. (2002) Biochim Biophys Acta, **1592** (3), 215-23.
3. Boulanger, M.J. und K.C. Garcia, *Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system*. (2004) Adv Protein Chem, **68**, 107-46.
4. Peters, M., E. Roeb, D. Pennica, K.H. Meyer zum Buschenfelde und S. Rose-John, *A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1)*. (1995) FEBS Lett, **372** (2-3), 177-80.
5. Malik, N., H.S. Haugen, B. Modrell, M. Shoyab und C.H. Clegg, *Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M*. (1995) Mol Cell Biol, **15** (5), 2349-58.
6. Clegg, C.H., J.T. Rulffes, P.M. Wallace und H.S. Haugen, *Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M*. (1996) Nature, **384** (6606), 261-3.
7. Hilton, D.J., *LIF: lots of interesting functions*. (1992) Trends Biochem Sci, **17** (2), 72-6.
8. Pennica, D., K.L. King, K.J. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S.M. Luoh, W.C. Darbonne, D.S. Knutzon, R. Yen, K.R. Chien, J.B. Baker und W.I. Wood, *Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy*. (1995) Proc Natl Acad Sci U S A, **92** (4), 1142-6.
9. Wallace, P.M., J.F. MacMaster, J.R. Rillema, J. Peng, S.A. Burstein und M. Shoyab, *Thrombopoietic properties of oncostatin M*. (1995) Blood, **86** (4), 1310-5.
10. Bernad, A., M. Kopf, R. Kulbacki, N. Weich, G. Koehler und J.C. Gutierrez-Ramos, *Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system*. (1994) Immunity, **1** (9), 725-31.
11. Peters, M., A.M. Muller und S. Rose-John, *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis*. (1998) Blood, **92** (10), 3495-504.
12. Elson, G.C., E. Lelievre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A.B. de Coignac, Y. Delneste, J.Y. Bonnefoy, J.F. Gauchat und H. Gascan, *CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex*. (2000) Nat Neurosci, **3** (9), 867-72.
13. Sendtner, M., R. Gotz, B. Holtmann, J.L. Escary, Y. Masu, P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, P. Brulet und H. Thoenen, *Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF*. (1996) Curr Biol, **6** (6), 686-94.
14. Li, M., M. Sendtner und A. Smith, *Essential function of LIF receptor in motor neurons*. (1995) Nature, **378** (6558), 724-7.
15. Dillon, S.R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Billsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, H.S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J.L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D.L. Dong, M. Dasovich, F.J. Grant, L. Lockwood, S.D. Levin, C. LeCiel, K. Waggle, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak und J.A. Gross, *Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice*. (2004) Nat Immunol, **5** (7), 752-60.
16. Taga, T. und T. Kishimoto, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. (1997) Annu Rev Immunol, **15**, 797-819.

17. Derouet, D., F. Rousseau, F. Alfonsi, J. Froger, J. Hermann, F. Barbier, D. Perret, C. Diveu, C. Guillet, L. Preisser, A. Dumont, M. Barbado, A. Morel, O. deLapeyriere, H. Gascan und S. Chevalier, *Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor*. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A, **101** (14), 4827-32.
18. Pflanz, S., J.C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, J.L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T.K. McClanahan, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick und R.A. Kastelein, *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells*. (2002) Immunity, **16** (6), 779-90.
19. Neipel, F., J.C. Albrecht, A. Ensser, Y.Q. Huang, J.J. Li, A.E. Friedman-Kien und B. Fleckenstein, *Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6*. (1997) J Virol, **71** (1), 839-42.
20. Moore, P.S., C. Boshoff, R.A. Weiss und Y. Chang, *Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV*. (1996) Science, **274** (5293), 1739-44.
21. Dreuw, A., S. Radtke, S. Pflanz, B.E. Lippok, P.C. Heinrich und H.M. Hermanns, *Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor*. (2004) J Biol Chem, **279** (34), 36112-20.
22. Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J.F. Bazan, J.H. Phillips, T.K. McClanahan, R. de Waal Malefyt und R.A. Kastelein, *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*. (2004) J Immunol, **172** (4), 2225-31.
23. Robledo, O., M. Fourcin, S. Chevalier, C. Guillet, P. Auguste, A. Pouplard-Barthelaix, D. Pennica und H. Gascan, *Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component*. (1997) J Biol Chem, **272** (8), 4855-63.
24. Guillet, C., E. Lelievre, H. Plun-Favreau, J. Froger, M. Chabbert, J. Hermann, A. Benoit de Coignac, J.Y. Bonnefoy, H. Gascan, J.F. Gauchat und G. Elson, *Functionally active fusion protein of the novel composite cytokine CLC/soluble CNTF receptor*. (2002) Eur J Biochem, **269** (7), 1932-41.
25. Lelievre, E., H. Plun-Favreau, S. Chevalier, J. Froger, C. Guillet, G.C. Elson, J.F. Gauchat und H. Gascan, *Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component*. (2001) J Biol Chem, **276** (25), 22476-84.
26. Plun-Favreau, H., G. Elson, M. Chabbert, J. Froger, O. deLapeyriere, E. Lelievre, C. Guillet, J. Hermann, J.F. Gauchat, H. Gascan und S. Chevalier, *The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine*. (2001) Embo J, **20** (7), 1692-703.
27. Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga und T. Kishimoto, *IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase*. (1993) Science, **260** (5115), 1808-10.
28. Baumann, H., A.J. Symes, M.R. Comeau, K.K. Morella, Y. Wang, D. Friend, S.F. Ziegler, J.S. Fink und D.P. Gearing, *Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells*. (1994) Mol Cell Biol, **14** (1), 138-46.
29. Hibi, M., K. Nakajima und T. Hirano, *IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system*. (1996) J Mol Med, **74** (1), 1-12.

30. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. (1997) *Science*, **277** (5332), 1630-5.
31. Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue, X.J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto und T. Kishimoto, *Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway*. (1994) *Cell*, **77** (1), 63-71.
32. Luticken, C., U.M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A.G. Harpur, A.F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, G. Barbieri, S. Pellegrini, M. Sendtner, P.C. Heinrich und F. Horn, *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. (1994) *Science*, **263** (5143), 89-92.
33. Stahl, N. und G.D. Yancopoulos, *The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines*. (1994) *J Neurobiol*, **25** (11), 1454-66.
34. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. (2001) *Curr Opin Cell Biol*, **13** (2), 211-7.
35. O'Shea, J.J., *Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet?* (1997) *Immunity*, **7** (1), 1-11.
36. Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen und F. Schaper, *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. (2003) *Biochem J*, **374** (Pt 1), 1-20.
37. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach und M. Rubinstein, *Soluble cytokine receptors are present in normal human urine*. (1989) *J Exp Med*, **170** (4), 1409-14.
38. Rose-John, S. und P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. (1994) *Biochem J*, **300** (Pt 2), 281-90.
39. Lust, J.A., D.F. Jelinek, K.A. Donovan, L.A. Frederick, B.K. Huntley, J.K. Braaten und N.J. Mairhle, *Sequence, expression and function of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor (sIL-6R)*. (1995) *Curr Top Microbiol Immunol*, **194**, 199-206.
40. Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga und T. Kishimoto, *Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection*. (1992) *J Immunol*, **148** (7), 2175-80.
41. Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P.C. Heinrich und S. Rose-John, *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. (1993) *Eur J Immunol*, **23** (2), 473-80.
42. Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John und J. Mullberg, *Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins*. (2000) *Eur J Biochem*, **267** (9), 2624-31.
43. Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.J. Kallen und S. Rose-John, *Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)*. (2003) *J Biol Chem*, **278** (40), 38829-39.
44. Mackiewicz, A., H. Schooltink, P.C. Heinrich und S. Rose-John, *Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins*. (1992) *J Immunol*, **149** (6), 2021-7.
45. Peters, M., P. Schirmacher, J. Goldschmitt, M. Odenthal, C. Peschel, E. Fattori, G. Ciliberto, H.P. Dienes, K.H. Meyer zum Buschenfelde und S. Rose-John, *Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice*. (1997) *J Exp Med*, **185** (4), 755-66.

46. Oberg, H.H., D. Wesch, S. Grussel, S. Rose-John und D. Kabelitz, *Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells.* (2006) *Int Immunol*, **18** (4), 555-63.
47. Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto und A. Mantovani, *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment.* (1997) *Immunity*, **6** (3), 315-25.
48. Udagawa, N., N. Takahashi, T. Katagiri, T. Tamura, S. Wada, D.M. Findlay, T.J. Martin, H. Hirota, T. Taga, T. Kishimoto und T. Suda, *Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors.* (1995) *J Exp Med*, **182** (5), 1461-8.
49. Klouche, M., S. Bhakdi, M. Hemmes und S. Rose-John, *Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor.* (1999) *J Immunol*, **163** (8), 4583-9.
50. Marz, P., J.G. Cheng, R.A. Gadiant, P.H. Patterson, T. Stoyan, U. Otten und S. Rose-John, *Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6.* (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (6), 3251-6.
51. Marz, P., K. Heese, B. Dimitriades-Schmutz, S. Rose-John und U. Otten, *Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression.* (1999) *Glia*, **26** (3), 191-200.
52. Muller-Newen, G., A. Kuster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes und P.C. Heinrich, *Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses.* (1998) *J Immunol*, **161** (11), 6347-55.
53. Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M.F. Neurath und S. Rose-John, *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses.* (2001) *Eur J Biochem*, **268** (1), 160-7.
54. Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi und T. Kishimoto, *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.* (1986) *Nature*, **324** (6092), 73-6.
55. Hirano, T., T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K. Shimizu, K. Nakajima, K.H. Pyun und T. Kishimoto, *Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2).* (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82** (16), 5490-4.
56. Nicola, N.A., D. Metcalf, M. Matsumoto und G.R. Johnson, *Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor.* (1983) *J Biol Chem*, **258** (14), 9017-23.
57. Ishibashi, T., H. Kimura, T. Uchida, S. Kariyone, P. Friese und S.A. Burstein, *Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro.* (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86** (15), 5953-7.
58. Tamura, T., N. Udagawa, N. Takahashi, C. Miyaura, S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Koishihara, Y. Ohsugi, K. Kumaki, T. Taga, T. Kishimoto und T. Suda, *Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6.* (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (24), 11924-8.
59. Castell, J.V., M.J. Gomez-Lechon, M. David, T. Hirano, T. Kishimoto und P.C. Heinrich, *Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes.* (1988) *FEBS Lett*, **232** (2), 347-50.

60. Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp und H. Baumann, *Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.* (1987) Proc Natl Acad Sci U S A, **84** (20), 7251-5.
61. Yoshizaki, K., N. Nishimoto, K. Matsumoto, H. Tagoh, T. Taga, Y. Deguchi, T. Kuritani, T. Hirano, K. Hashimoto, N. Okada und T. Kishimoto, *Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes.* (1990) Cytokine, **2** (5), 381-7.
62. Grossman, R.M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal und A.B. Gottlieb, *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes.* (1989) Proc Natl Acad Sci U S A, **86** (16), 6367-71.
63. Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka, A. Kuramoto und T. Kishimoto, *Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas.* (1988) Nature, **332** (6159), 83-5.
64. Miles, S.A., A.R. Rezai, J.F. Salazar-Gonzalez, M. Vander Meyden, R.H. Stevens, D.M. Logan, R.T. Mitsuyasu, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto und O. Martinez-Maza, *AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6.* (1990) Proc Natl Acad Sci U S A, **87** (11), 4068-72.
65. Becker, C., M.C. Fantini, C. Schramm, H.A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P.R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John und M.F. Neurath, *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling.* (2004) Immunity, **21** (4), 491-501.
66. Doganci, A., K. Sauer, R. Karwot und S. Finotto, *Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice.* (2005) Clin Rev Allergy Immunol, **28** (3), 257-70.
67. Richards, P.J., M.A. Nowell, S. Horiuchi, R.M. McLoughlin, C.A. Fielding, S. Grau, N. Yamamoto, M. Ehrmann, S. Rose-John, A.S. Williams, N. Topley und S.A. Jones, *Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis.* (2006) Arthritis Rheum, **54** (5), 1662-72.
68. Nowell, M.A., P.J. Richards, C.A. Fielding, S. Ognjanovic, N. Topley, A.S. Williams, G. Bryant-Greenwood und S.A. Jones, *Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* (2006) Arthritis Rheum, **54** (7), 2084-95.
69. Hurst, S.M., R.M. McLoughlin, J. Monslow, S. Owens, L. Morgan, G.M. Fuller, N. Topley und S.A. Jones, *Secretion of oncostatin M by infiltrating neutrophils: regulation of IL-6 and chemokine expression in human mesothelial cells.* (2002) J Immunol, **169** (9), 5244-51.
70. Atreya, R. und M.F. Neurath, *Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer.* (2005) Clin Rev Allergy Immunol, **28** (3), 187-96.
71. Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles und P.S. Moore, *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.* (1994) Science, **266** (5192), 1865-9.
72. Russo, J.J., R.A. Bohenzky, M.C. Chien, J. Chen, M. Yan, D. Maddalena, J.P. Parry, D. Peruzzi, I.S. Edelman, Y. Chang und P.S. Moore, *Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8).* (1996) Proc Natl Acad Sci U S A, **93** (25), 14862-7.

73. Cathomas, G., *Human herpes virus 8: a new virus discloses its face.* (2000) *Virchows Arch*, **436** (3), 195-206.
74. Renne, R., M. Lagunoff, W. Zhong und D. Ganem, *The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions.* (1996) *J Virol*, **70** (11), 8151-4.
75. Nicholas, J., V.R. Ruvolo, W.H. Burns, G. Sandford, X. Wan, D. Ciufo, S.B. Hendrickson, H.G. Guo, G.S. Hayward und M.S. Reitz, *Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6.* (1997) *Nat Med*, **3** (3), 287-92.
76. Vieira, J., P. O'Hearn, L. Kimball, B. Chandran und L. Corey, *Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus.* (2001) *J Virol*, **75** (3), 1378-86.
77. Cerimele, F., F. Curreli, S. Ely, A.E. Friedman-Kien, E. Cesarman und O. Flore, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus can productively infect primary human keratinocytes and alter their growth properties.* (2001) *J Virol*, **75** (5), 2435-43.
78. Bechtel, J.T., Y. Liang, J. Hvidding und D. Ganem, *Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells.* (2003) *J Virol*, **77** (11), 6474-81.
79. Kaposi, M., *Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin*, in *Archiv für Dermatologie und Syphilis*. 1872. p. 265-273.
80. Ziegler, J.L. und E. Katongole-Mbidde, *Kaposi's sarcoma in childhood: an analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection.* (1996) *Int J Cancer*, **65** (2), 200-3.
81. Civati, G., G. Busnach, B. Brando, M.L. Broggi, C. Brunati, G.P. Casadei und L. Minetti, *Occurrence of Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients treated with low doses of cyclosporine.* (1988) *Transplant Proc*, **20** (3 Suppl 3), 924-8.
82. Friedman-Kien, A.E., *Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men.* (1981) *J Am Acad Dermatol*, **5** (4), 468-71.
83. Cesarman, E., Y. Chang, P.S. Moore, J.W. Said und D.M. Knowles, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas.* (1995) *N Engl J Med*, **332** (18), 1186-91.
84. Soulier, J., L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, M.F. d'Agay, J.P. Clauvel, M. Raphael und L. Degos, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease.* (1995) *Blood*, **86** (4), 1276-80.
85. Edelman, D.C., *Human herpesvirus 8--a novel human pathogen.* (2005) *Virology*, **2**, 78.
86. Schulz, T.F., *The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus.* (2006) *J Pathol*, **208** (2), 187-98.
87. Roth, W.K., H. Brandstetter und M. Sturzl, *Cellular and molecular features of HIV-associated Kaposi's sarcoma.* (1992) *Aids*, **6** (9), 895-913.
88. Ambroziak, J.A., D.J. Blackbourn, B.G. Herndier, R.G. Glogau, J.H. Gullett, A.R. McDonald, E.T. Lennette und J.A. Levy, *Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients.* (1995) *Science*, **268** (5210), 582-3.
89. Hong, Y.K., K. Foreman, J.W. Shin, S. Hirakawa, C.L. Curry, D.R. Sage, T. Libermann, B.J. Dezube, J.D. Fingerroth und M. Detmar, *Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus.* (2004) *Nat Genet*, **36** (7), 683-5.
90. Carroll, P.A., E. Brazeau und M. Lagunoff, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of blood endothelial cells induces lymphatic differentiation.* (2004) *Virology*, **328** (1), 7-18.

91. Jones, K.D., Y. Aoki, Y. Chang, P.S. Moore, R. Yarchoan und G. Tosato, *Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells.* (1999) *Blood*, **94** (8), 2871-9.
92. Suscovich, T.J., M. Paulose-Murphy, J.D. Harlow, Y. Chen, S.Y. Thomas, T.J. Mellott, B.D. Walker, D.T. Scadden, S. Zeichner und C. Brander, *Defective immune function of primary effusion lymphoma cells is associated with distinct KSHV gene expression profiles.* (2004) *Leuk Lymphoma*, **45** (6), 1223-38.
93. Jenner, R.G., K. Maillard, N. Cattini, R.A. Weiss, C. Boshoff, R. Wooster und P. Kellam, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile.* (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100** (18), 10399-404.
94. Dupin, N., C. Fisher, P. Kellam, S. Ariad, M. Tulliez, N. Franck, E. van Marck, D. Salmon, I. Gorin, J.P. Escande, R.A. Weiss, K. Alitalo und C. Boshoff, *Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma.* (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (8), 4546-51.
95. Ichinohasama, R., I. Miura, N. Kobayashi, Y. Saitoh, J.F. DeCoteau, Y. Saiki, S. Mori, M.E. Kadin und K. Ooya, *Herpes virus type 8-negative primary effusion lymphoma associated with PAX-5 gene rearrangement and hepatitis C virus: a case report and review of the literature.* (1998) *Am J Surg Pathol*, **22** (12), 1528-37.
96. Castleman, B., L. Iverson und V.P. Menendez, *Localized mediastinal lymphnode hyperplasia resembling thymoma.* (1956) *Cancer*, **9** (4), 822-30.
97. Keller, A.R., L. Hochholzer und B. Castleman, *Hyaline-vascular and plasma-cell types of giant lymph node hyperplasia of the mediastinum and other locations.* (1972) *Cancer*, **29** (3), 670-83.
98. Burger, R., J. Wendler, K. Antoni, G. Helm, J.R. Kalden und M. Gramatzki, *Interleukin-6 production in B-cell neoplasias and Castleman's disease: evidence for an additional paracrine loop.* (1994) *Ann Hematol*, **69** (1), 25-31.
99. Yoshizaki, K., T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh und T. Komori, *Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease.* (1989) *Blood*, **74** (4), 1360-7.
100. Chow, D., X. He, A.L. Snow, S. Rose-John und K.C. Garcia, *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex.* (2001) *Science*, **291** (5511), 2150-5.
101. Mullberg, J., T. Geib, T. Jostock, S.H. Hoischen, P. Vollmer, N. Voltz, D. Heinz, P.R. Galle, M. Klouche und S. Rose-John, *IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6.* (2000) *J Immunol*, **164** (9), 4672-7.
102. Hoischen, S.H., P. Vollmer, P. Marz, S. Ozbek, K.S. Gotze, C. Peschel, T. Jostock, T. Geib, J. Mullberg, S. Mechtersheimer, M. Fischer, J. Grotzinger, P.R. Galle und S. Rose-John, *Human herpes virus 8 interleukin-6 homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells.* (2000) *Eur J Biochem*, **267** (12), 3604-12.
103. Molden, J., Y. Chang, Y. You, P.S. Moore und M.A. Goldsmith, *A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit.* (1997) *J Biol Chem*, **272** (31), 19625-31.
104. Kalai, M., F.A. Montero-Julian, J. Grotzinger, V. Fontaine, P. Vandebussche, R. Deschuyteneer, A. Wollmer, H. Brailly und J. Content, *Analysis of the human interleukin-6/human interleukin-6 receptor binding interface at the amino acid level: proposed mechanism of interaction.* (1997) *Blood*, **89** (4), 1319-33.

105. Grotzinger, J., T. Kernebeck, K.J. Kallen und S. Rose-John, *IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?* (1999) *Biol Chem*, **380** (7-8), 803-13.
106. Somers, W., M. Stahl und J.S. Seehra, *1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling.* (1997) *Embo J*, **16** (5), 989-97.
107. Burger, R., F. Neipel, B. Fleckenstein, R. Savino, G. Ciliberto, J.R. Kalden und M. Gramatzki, *Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells.* (1998) *Blood*, **91** (6), 1858-63.
108. Li, H. und J. Nicholas, *Identification of amino acid residues of gp130 signal transducer and gp80 alpha receptor subunit that are involved in ligand binding and signaling by human herpesvirus 8-encoded interleukin-6.* (2002) *J Virol*, **76** (11), 5627-36.
109. Aoki, Y., E.S. Jaffe, Y. Chang, K. Jones, J. Teruya-Feldstein, P.S. Moore und G. Tosato, *Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6.* (1999) *Blood*, **93** (12), 4034-43.
110. Staskus, K.A., R. Sun, G. Miller, P. Racz, A. Jaslowski, C. Metroka, H. Brett-Smith und A.T. Haase, *Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease.* (1999) *J Virol*, **73** (5), 4181-7.
111. Chatterjee, M., J. Osborne, G. Bestetti, Y. Chang und P.S. Moore, *Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity.* (2002) *Science*, **298** (5597), 1432-5.
112. Rose-John, S., H. Schooltink, H. Schmitz-Van de Leur, J. Mullberg, P.C. Heinrich und L. Graeve, *Intracellular retention of interleukin-6 abrogates signaling.* (1993) *J Biol Chem*, **268** (29), 22084-91.
113. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger und S. Rose-John, *A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion.* (1997) *Nat Biotechnol*, **15** (2), 142-5.
114. Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Mullberg, E. Wolf, G. Brem, K.H. Meyer zum Buschenfelde und S. Rose-John, *The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6.* (1996) *J Exp Med*, **183** (4), 1399-406.
115. Kovaleva, M., I. Bussmeyer, B. Rabe, J. Grotzinger, E. Sudarman, J. Eichler, U. Conrad, S. Rose-John und J. Scheller, *Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display.* (2006) *J Virol*, **80** (17), 8510-20.
116. Jostock, T., G. Blinn, C. Renne, K.J. Kallen, S. Rose-John und J. Mullberg, *Immunoadhesins of interleukin-6 and the IL-6/soluble IL-6R fusion protein hyper-IL-6.* (1999) *J Immunol Methods*, **223** (2), 171-83.
117. Woodroffe, C., W. Muller und U. Ruther, *Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice.* (1992) *DNA Cell Biol*, **11** (8), 587-92.
118. van Dam, M., J. Mullberg, H. Schooltink, T. Stoyan, J.P. Brakenhoff, L. Graeve, P.C. Heinrich und S. Rose-John, *Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding.* (1993) *J Biol Chem*, **268** (20), 15285-90.

119. Fielding, C.A., R.M. McLoughlin, C.S. Colmont, M. Kovaleva, D.A. Harris, S. Rose-John, N. Topley und S.A. Jones, *Viral IL-6 blocks neutrophil infiltration during acute inflammation*. (2005) *J Immunol*, **175** (6), 4024-9.
120. Aoki, Y., M. Narazaki, T. Kishimoto und G. Tosato, *Receptor engagement by viral interleukin-6 encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. (2001) *Blood*, **98** (10), 3042-9.
121. Aoki, Y., R. Yarchoan, J. Braun, A. Iwamoto und G. Tosato, *Viral and cellular cytokines in AIDS-related malignant lymphomatous effusions*. (2000) *Blood*, **96** (4), 1599-601.
122. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. (1986) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-73.
123. Church, G.M. und W. Gilbert, *Genomic sequencing*. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81** (7), 1991-5.
124. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. (1970) *Nature*, **227** (5259), 680-5.
125. Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri, E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Esvara, E. Eyraas, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W.N. Frankel, L.A. Fulton, R.S. Fulton, T.S. Furey, D. Gage, R.A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T.A. Graves, E.D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W.J. Kent, A. Kirby, D.L. Kolbe, I. Korf, R.S. Kucherlapati, E.J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J.P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D.R. Maglott, E.R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J.H. Mayer, M. McCarthy, W.R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J.D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J.P. Mesirov, W. Miller, T.L. Miner, E. Mongin, K.T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J.C. Mullikin, D.M. Muzny, W.E. Nash, J.O. Nelson, M.N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M.J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K.H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C.S. Pohl, A. Poliakov, T.C. Ponce, C.P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B.A. Roe, K.M. Roskin, E.M. Rubin, A.G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M.S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J.B. Singer, G. Slater, A. Smit, D.R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J.P. Vinson, A.C. Von Niederhausern, C.M. Wade, M. Wall, R.J. Weber, R.B. Weiss, M.C. Wendl, A.P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R.K. Wilson, E. Winter, K.C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S.P. Yang, E.M. Zdobnov, M.C. Zody und E.S. Lander, *Initial*

- sequencing and comparative analysis of the mouse genome.* (2002) *Nature*, **420** (6915), 520-62.
126. Hatzoglou, M., W. Lamers, F. Bosch, A. Wynshaw-Boris, D.W. Clapp und R.W. Hanson, *Hepatic gene transfer in animals using retroviruses containing the promoter from the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase.* (1990) *J Biol Chem*, **265** (28), 17285-93.
127. McGrane, M.M., J. de Vente, J. Yun, J. Bloom, E. Park, A. Wynshaw-Boris, T. Wagner, F.M. Rottman und R.W. Hanson, *Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice.* (1988) *J Biol Chem*, **263** (23), 11443-51.
128. Peters, M., M. Odenthal, P. Schirmacher, M. Blessing, E. Fattori, G. Ciliberto, K.H. Meyer zum Buschenfelde und S. Rose-John, *Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice.* (1997) *J Immunol*, **159** (3), 1474-81.
129. Sachs, A. und E. Wahle, *Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes.* (1993) *J Biol Chem*, **268** (31), 22955-8.
130. Palmiter, R.D., E.P. Sandgren, M.R. Avarbock, D.D. Allen und R.L. Brinster, *Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice.* (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** (2), 478-82.
131. Gruss, P., C.J. Lai, R. Dhar und G. Khoury, *Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40.* (1979) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76** (9), 4317-21.
132. Hamer, D.H. und P. Leder, *Splicing and the formation of stable RNA.* (1979) *Cell*, **18** (4), 1299-302.
133. Meads, M.B. und P.G. Medveczky, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral interleukin-6 is secreted and modified differently than human interleukin-6: evidence for a unique autocrine signaling mechanism.* (2004) *J Biol Chem*, **279** (50), 51793-803.
134. Brinster, R.L., H.Y. Chen, M. Trumbauer, A.W. Senear, R. Warren und R.D. Palmiter, *Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs.* (1981) *Cell*, **27** (1 Pt 2), 223-31.
135. Palmiter, R.D. und R.L. Brinster, *Germ-line transformation of mice.* (1986) *Annu Rev Genet*, **20**, 465-99.
136. McAdam, K.P. und J.D. Sipe, *Murine model for human secondary amyloidosis: genetic variability of the acute-phase serum protein SAA response to endotoxins and casein.* (1976) *J Exp Med*, **144** (4), 1121-7.
137. Kushner, I. und A. Mackiewicz, *Acute phase proteins as disease markers.* (1987) *Dis Markers*, **5** (1), 1-11.
138. Pajovic, S., V.E. Jones, K.R. Prowse, F.G. Berger und H. Baumann, *Species-specific changes in regulatory elements of mouse haptoglobin genes.* (1994) *J Biol Chem*, **269** (3), 2215-24.
139. Steel, D.M. und A.S. Whitehead, *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein.* (1994) *Immunol Today*, **15** (2), 81-8.
140. Ruther, U., W. Muller, T. Sumida, T. Tokuhisa, K. Rajewsky und E.F. Wagner, *c-fos expression interferes with thymus development in transgenic mice.* (1988) *Cell*, **53** (6), 847-56.
141. Kimura, A., A. Israel, O. Le Bail und P. Kourilsky, *Detailed analysis of the mouse H-2Kb promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression.* (1986) *Cell*, **44** (2), 261-72.

142. Brandt, S.J., D.M. Bodine, C.E. Dunbar und A.W. Nienhuis, *Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice.* (1990) *J Clin Invest*, **86** (2), 592-9.
143. Rettig, M.B., H.J. Ma, R.A. Vescio, M. Pold, G. Schiller, D. Belson, A. Savage, C. Nishikubo, C. Wu, J. Fraser, J.W. Said und J.R. Berenson, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients.* (1997) *Science*, **276** (5320), 1851-4.
144. Bartels, H., H. Herbolt und K. Jungermann, *Predominant periportal expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase genes in rat liver. Dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle demonstrated by in situ hybridization.* (1990) *Histochemistry*, **94** (6), 637-44.
145. Schirmacher, P., M. Peters, G. Ciliberto, M. Blessing, J. Lotz, K.H. Meyer zum Buschenfelde und S. Rose-John, *Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice.* (1998) *Am J Pathol*, **153** (2), 639-48.
146. Xia, D. und D. Samols, *Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia.* (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (6), 2575-80.
147. Festenstein, R., M. Tolaini, P. Corbella, C. Mamalaki, J. Parrington, M. Fox, A. Miliou, M. Jones und D. Kioussis, *Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation.* (1996) *Science*, **271** (5252), 1123-5.
148. Dobie, K.W., M. Lee, J.A. Fantes, E. Graham, A.J. Clark, A. Springbett, R. Lathe und M. McClenaghan, *Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus.* (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (13), 6659-64.
149. Milot, E., J. Strouboulis, T. Trimborn, M. Wijgerde, E. de Boer, A. Langeveld, K. Tan-Un, W. Vergeer, N. Yannoutsos, F. Grosveld und P. Fraser, *Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription.* (1996) *Cell*, **87** (1), 105-14.
150. Wan, X., H. Wang und J. Nicholas, *Human herpesvirus 8 interleukin-6 (vIL-6) signals through gp130 but has structural and receptor-binding properties distinct from those of human IL-6.* (1999) *J Virol*, **73** (10), 8268-78.
151. Klouche, M., N. Brockmeyer, C. Knabbe und S. Rose-John, *Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells.* (2002) *Aids*, **16** (8), F9-18.
152. Breviario, F., E.M. d'Aniello, J. Golay, G. Peri, B. Bottazzi, A. Bairoch, S. Saccone, R. Marzella, V. Predazzi und M. Rocchi, *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component.* (1992) *J Biol Chem*, **267** (31), 22190-7.
153. Lee, T.H., G.W. Lee, E.B. Ziff und J. Vilcek, *Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts.* (1990) *Mol Cell Biol*, **10** (5), 1982-8.
154. Garrick, D., S. Fiering, D.I. Martin und E. Whitelaw, *Repeat-induced gene silencing in mammals.* (1998) *Nat Genet*, **18** (1), 56-9.
155. McBurney, M.W., T. Mai, X. Yang und K. Jardine, *Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured Mammalian cells: inactivation of tandem repeats of transfected genes.* (2002) *Exp Cell Res*, **274** (1), 1-8.
156. Chevalier-Mariette, C., I. Henry, L. Montfort, S. Capgras, S. Forlani, J. Muschler und J.F. Nicolas, *CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes.* (2003) *Genome Biol*, **4** (9), R53.

157. Jones, P.A. und D. Takai, *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics*. (2001) *Science*, **293** (5532), 1068-70.
158. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. (2002) *Genes Dev*, **16** (1), 6-21.
159. Li, E., C. Beard und R. Jaenisch, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. (1993) *Nature*, **366** (6453), 362-5.
160. Jones, P.A. und P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. (1999) *Nat Genet*, **21** (2), 163-7.
161. Cohen-Saidon, C., H. Nechushtan, S. Kahlon, N. Livni, A. Nissim und E. Razin, *A novel strategy using single-chain antibody to show the importance of Bcl-2 in mast cell survival*. (2003) *Blood*, **102** (7), 2506-12.
162. Weich, H.A., S.Z. Salahuddin, P. Gill, S. Nakamura, R.C. Gallo und J. Folkmann, *AIDS-associated Kaposi's sarcoma-derived cells in long-term culture express and synthesize smooth muscle alpha-actin*. (1991) *Am J Pathol*, **139** (6), 1251-8.
163. Nickoloff, B.J. und C.E. Griffiths, *Factor XIIIa-expressing dermal dendrocytes in AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcomas*. (1989) *Science*, **243** (4899), 1736-7.
164. Huang, Y.Q., A.E. Friedman-Kien, J.J. Li und B.J. Nickoloff, *Cultured Kaposi's sarcoma cell lines express factor XIIIa, CD14, and VCAM-1, but not factor VIII or ELAM-1*. (1993) *Arch Dermatol*, **129** (10), 1291-6.
165. Dupin, N., T.L. Diss, P. Kellam, M. Tulliez, M.Q. Du, D. Sicard, R.A. Weiss, P.G. Isaacson und C. Boshoff, *HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma*. (2000) *Blood*, **95** (4), 1406-12.
166. Gaidano, G. und A. Carbone, *Primary effusion lymphoma: a liquid phase lymphoma of fluid-filled body cavities*. (2001) *Adv Cancer Res*, **80**, 115-46.
167. Carbone, A., A.M. Cilia, A. Gloghini, D. Capello, M. Todesco, S. Quattrone, R. Volpe und G. Gaidano, *Establishment and characterization of EBV-positive and EBV-negative primary effusion lymphoma cell lines harbouring human herpesvirus type-8*. (1998) *Br J Haematol*, **102** (4), 1081-9.
168. Gaidano, G., A. Gloghini, V. Gattei, M.F. Rossi, A.M. Cilia, C. Godeas, M. Degan, T. Perin, V. Canzonieri, D. Aldinucci, G. Saglio, A. Carbone und A. Pinto, *Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/syndecan-1 antigen*. (1997) *Blood*, **90** (12), 4894-900.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, die auf Empfehlung der IFDC (International Federation for Clinical Chemistry) und IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) beruhen, werden nicht gesondert aufgeführt. Die übrigen, hier nicht aufgeführten Abkürzungen sind im Text erläutert.

A	Adenin
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampecillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
b	Basen
bp	Basenpaare
BCSF	<i>B-cell stimulating factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci	Curie
CLC	<i>cardiotrophin-like Cytokine</i>
CMV	Cytomegalievirus
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNTF-R	<i>ciliary neurotrophic factor receptor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
D	Aspartat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

DEAE	Diethyaminethyl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxynuklosidtriphosphat
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethydiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid (Homidiumbromid, 3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-Bromid)
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , Antikörperfragment das leicht kristallisierbar ist
G	Guanin
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
gp	Glykoprotein
gp130	Glykoprotein 130
h	human
His	Histidin
Hyper-IL-6	Hyper-Interleukin-6, Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ip	intra peritoneal
JAK	Janus Tyrosinkinase
K	Lysin
kb	Kilobasen

kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
L	Lysin
LB	<i>Luria Bertani Broth</i> (Bakterienmedium)
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIF-R	<i>leukemia inhibitory factor</i> Rezeptor
mAB	monoklonaler Antikörper
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
myc	Myelocytomatosis Onkogen
NF	<i>nuclear factor</i>
NNT-1	<i>novel neurotrophin-1</i>
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecy sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sIL-6R	<i>soluble interleukin-6 receptor</i> , löslicher IL-6-Rezeptor
SSC	Standard Salz Citrat

T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UV	ultraviolett
vIL-6	virales Interleukin-6
WB	Western-Blot
WSX-1	IL-27 Rezeptor
WT	Wildtyp

9 Anhang

9.1 Zusammensetzung des Alleinfutters ssniff R/M-H

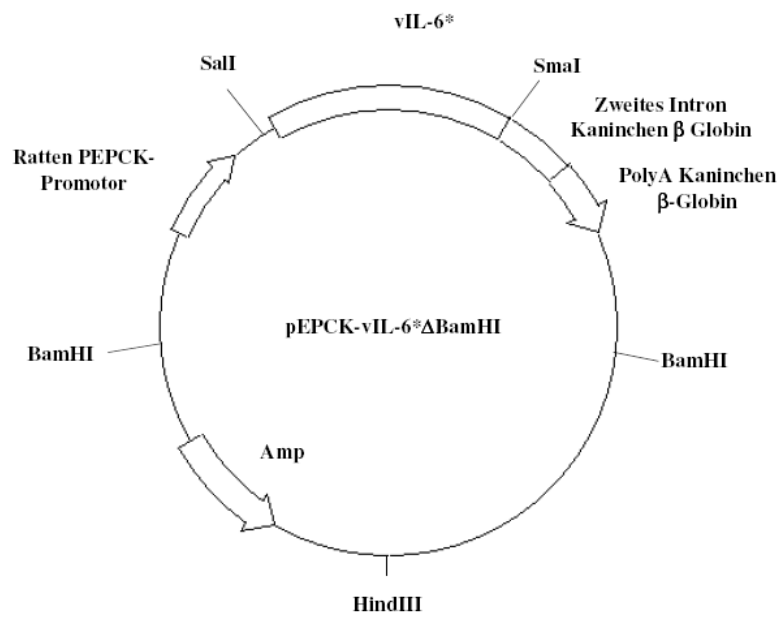
Rohprotein	19 %
Rohfett	3,30 %
Rohfaser	4,90 %
Rohasche	6,70 %

Zusatzstoffe: Vitamin A: 15.000 IE/kg; Vitamin D3: 1.000 IE/kg; Vitamin E: 100 mg/kg;
Cu 5 mg/kg

9.2 Vektor- / Plasmidkarten

pEPCK-vIL-6* Δ BamHI:

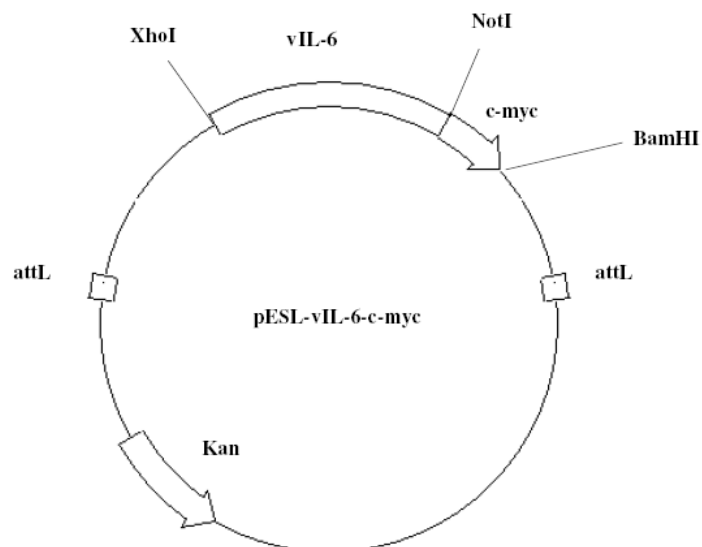
Resistenz: Ampicillin



pESL-vIL-6-c-myc:

Größe: 3.300 bp

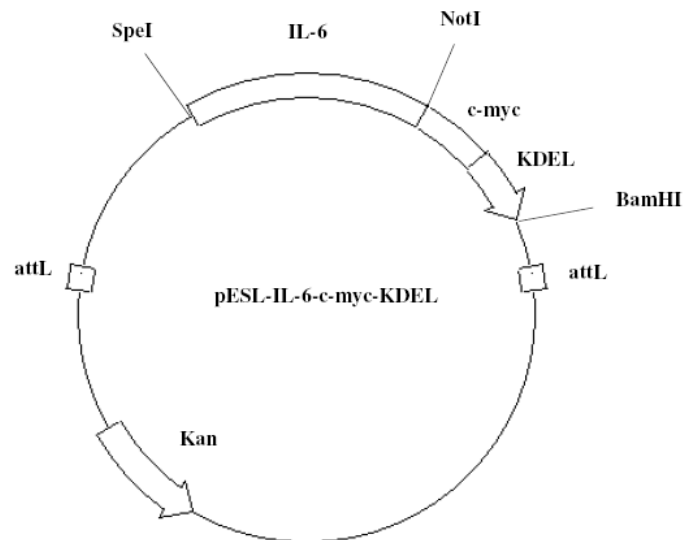
Resistenz: Kanamycin



pESL-vIL-6-c-myc-KDEL:

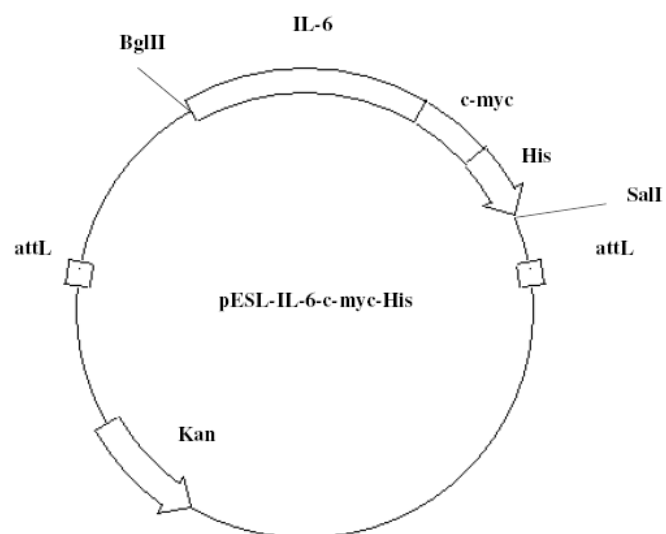
Größe: 3.300 bp

Resistenz: Kanamycin

**pESL-IL-6-c-myc-His:**

Größe: 3.300 bp

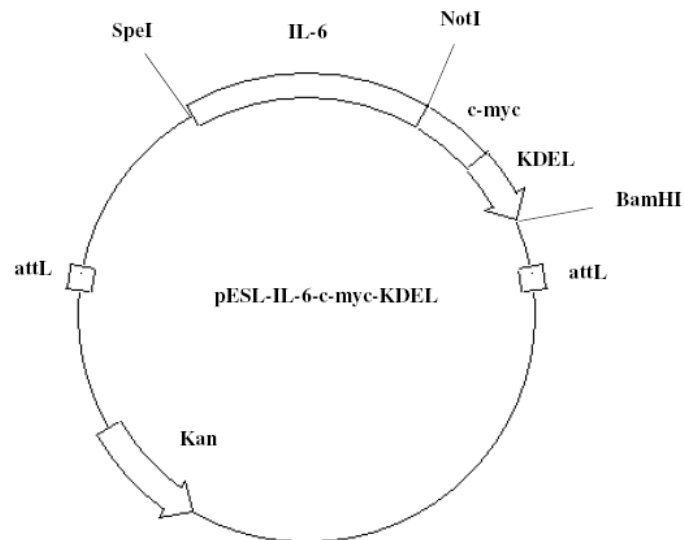
Resistenz: Kanamycin



pESL-IL-6-c-myc-KDEL:

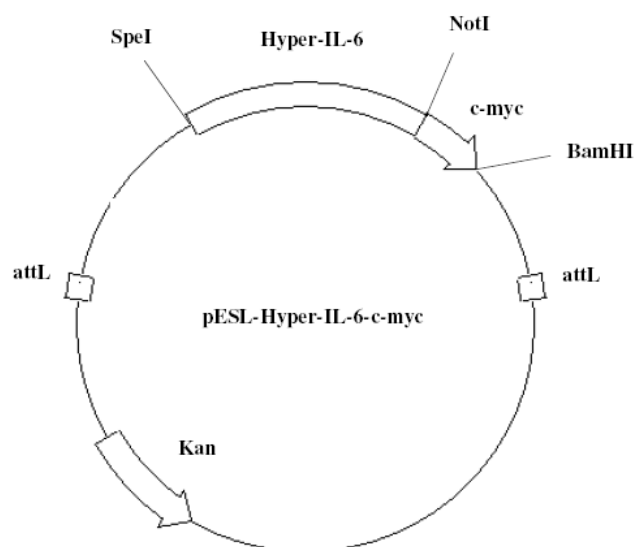
Größe: 3.300

Resistenz: Kanamycin

**pESL-Hyper-IL-6-c-myc**

Größe: 4.100 bp

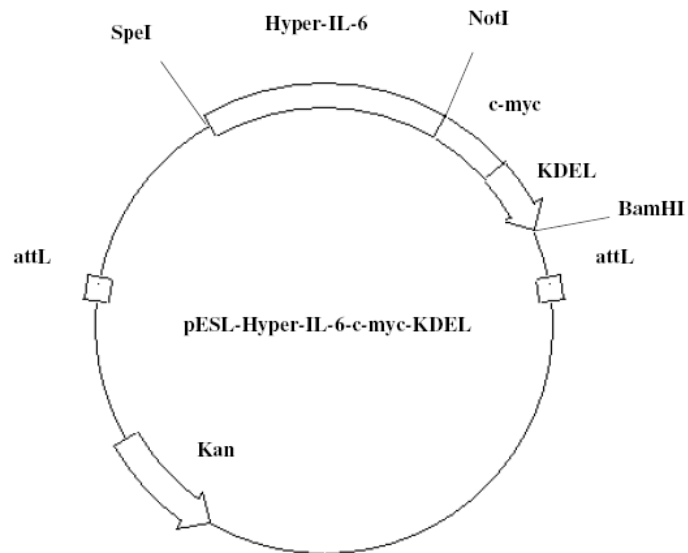
Resistenz: Kanamycin



pESL-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL

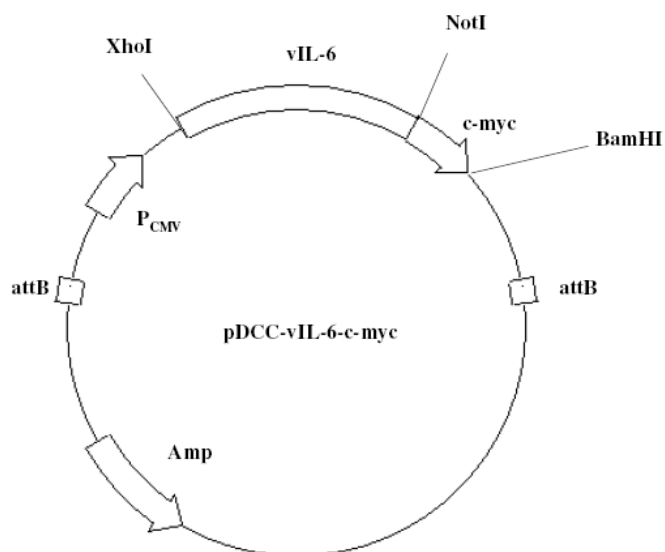
Größe: 4.100 bp

Resistenz: Kanamycin

**pDCC-vIL-6-c-myc**

Größe: 5.700 bp

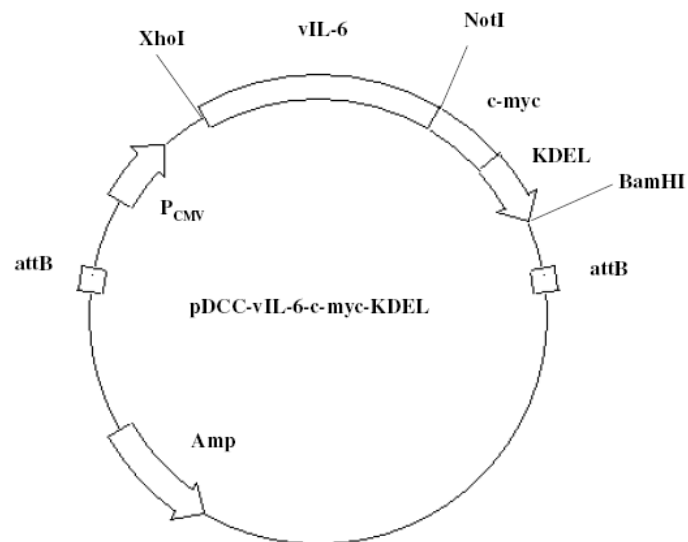
Resistenz: Ampicillin



pDCC-vIL-6-c-myc-KDEL

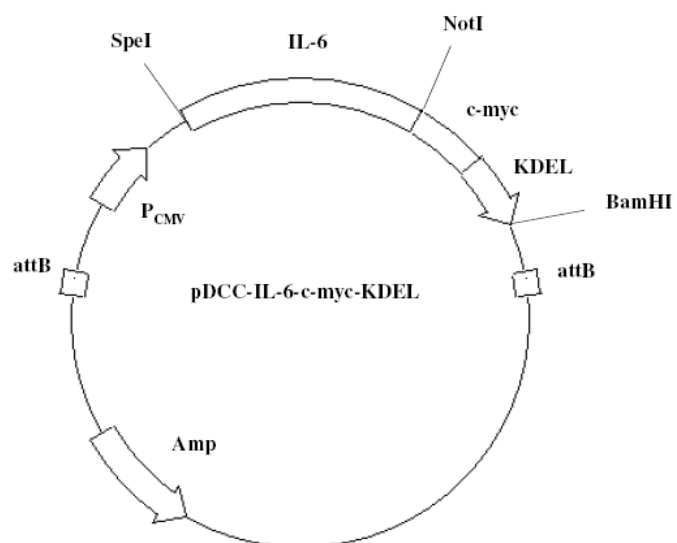
Größe: 5.700 bp

Resistenz: Ampicillin

**pDCC-IL-6-c-myc-His**

Größe: 5.700 bp

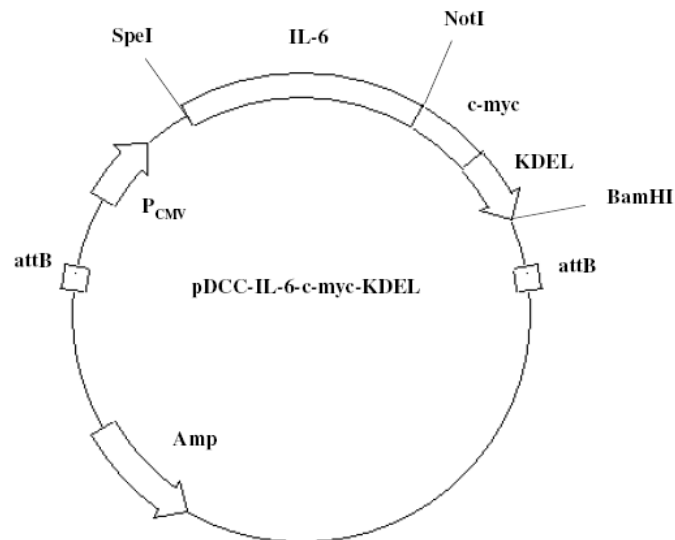
Resistenz: Ampicillin



pDCC- IL-6-c-myc-KDEL

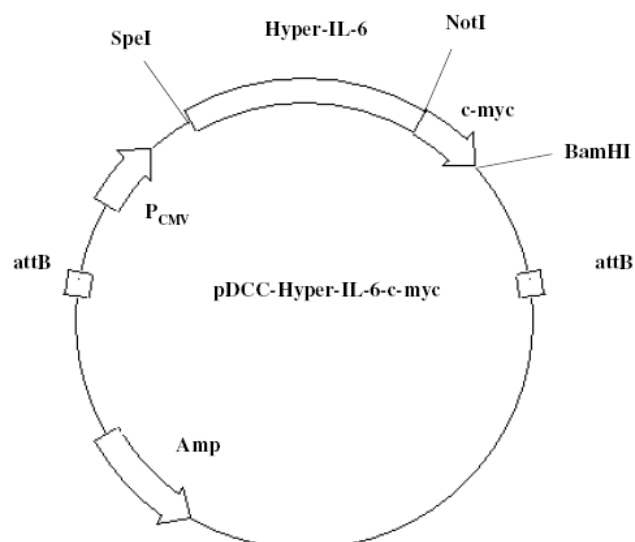
Größe: 5.700 bp

Resistenz: Ampicillin

**pDCC-Hyper-IL-6-c-myc**

Größe: 6.600 bp

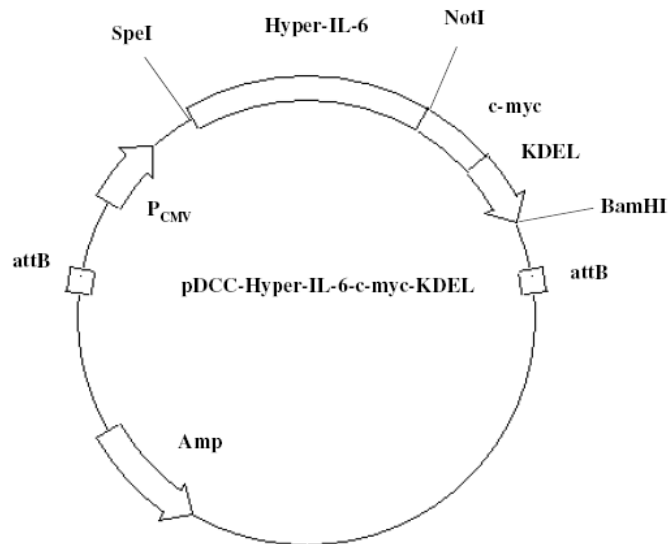
Resistenz: Ampicillin



pDCC-Hyper-IL-6-c-myc-KDEL

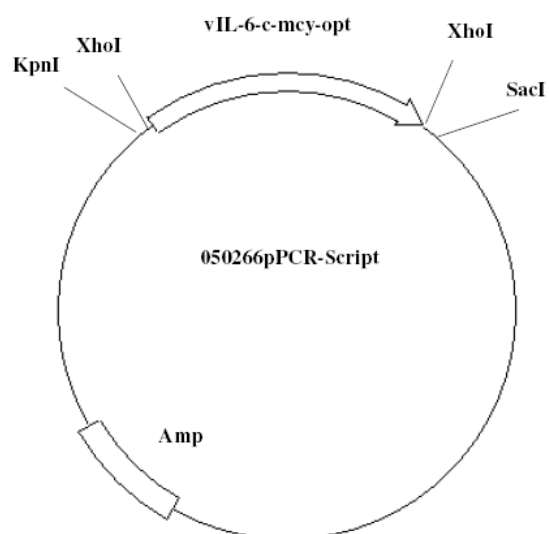
Größe: 6.600 bp

Resistenz: Ampicillin

**050266pPCR-Script:**

Größe: 3.500 bp

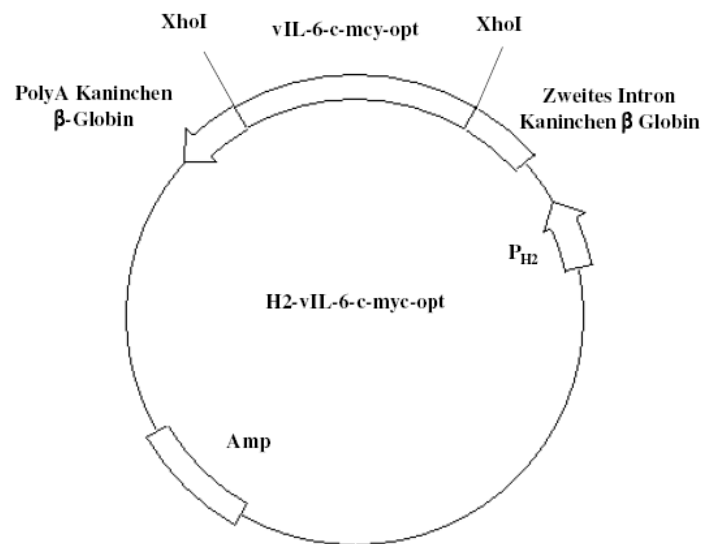
Resistenz: Ampicillin



H2-vIL-6-c-myc-opt:

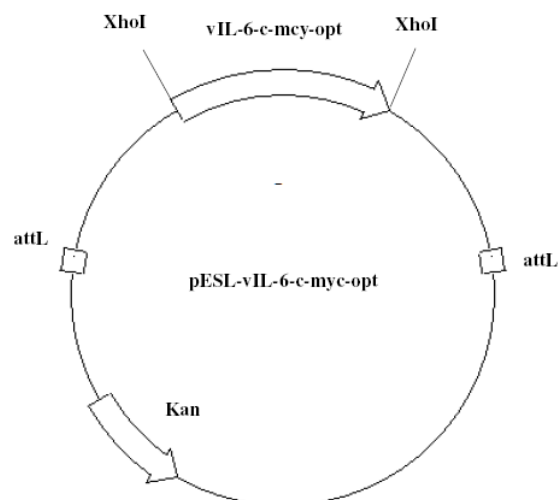
Größe: ca. 7.400 bp

Resistenz: Ampicillin

**pESL-vIL-6-c-myc-opt:**

Größe: ca. 3.300 bp

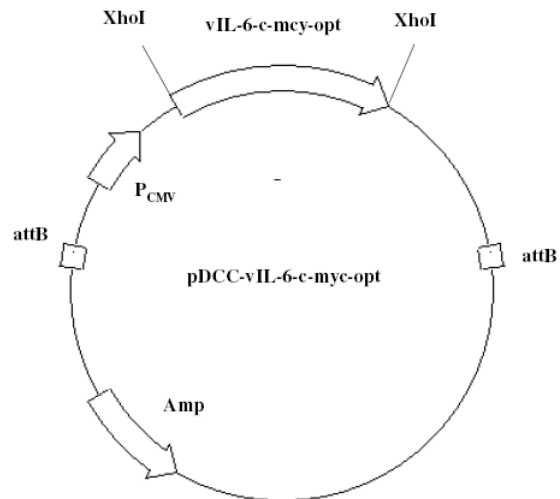
Resistenz: Kanamycin



pESL-vIL-6-c-myc-opt:

Größe: ca. 5.700 bp

Resistenz: Ampicillin



9.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von vIL-6* in PEPCK-vIL-6* Δ BamHI

```

1 ATGTGCTGGT TCAAGTTGTG GTCTATCTTG CTGGTAGGTT CACTGCTGGT
  M C W F   K L W   S I L   L V G S   L L V

51 ATCTGGAACG CGGGGCAAGT TGCCGGACGC CCCCAGATTT GAAAAGGATC
  S G T   R G K L   P D A   P E F   E K D L

101 TTCTCATTCA GAGACTCAAT TGGATGCTAT GGGTGATCGA TGAATGCTTC
  L I Q   R L N   W M L W   V I D   E C F

151 CGCGACCTCT GTTACCGTAC CGGCATCTGC AAGGGTATTC TAGAGCCCGC
  R D L C   Y R T   G I C   K G I L   E P A

201 TGCTATTTTT CATCTGAAAC TACCAGCCAT CAACGATACT GATCACTGCG
  A I F   H L K L   P A I   N D T   D H C G

251 GGTAAATAGG ATTTAATGAG ACTAGCTGCC TTAAAAAGCT CGCCGATGGC
  L I G   F N E   T S C L   K K L   A D G

301 TTTTTTCGAGT TCGAGGTGTT GTTTAAGTTT TTAACGACGG AGTTTGGAAA
  F F E F   E V L   F K F   L T T E   F G K

351 ATCAGTGATA AACGTGGACG TCATGGAGCT TCTGACGAAG ACCTTAGGAT
  S V I   N V D V   M E L   L T K   T L G W

401 GGGACATACA GGAAGAGCTC AATAAGCTGA CTAAGACGCA CTACAGTCCA
  D I Q   E E L   N K L T   K T H   Y S P

451 CCCAAATTTG ACCGCGGTCT ATTAGGGAGG CTTCAGGGAC TTAAGTATTG
  P K F D   R G L   L G R   L Q G L   K Y W

501 GGTGAGACAC TTTGCTTCGT TTTATGTTCT GAGTGCAATG GAAAAGTTTG
  V R H   F A S F   Y V L   S A M   E K F A

551 CAGGTCAAGC GGTGCGTGTT TTGAACTCTA TCCCAGACGT GACTCCTGAC
  G Q A   V R V   L N S I   P D V   T P D

601 GTCCACGATA AGTAG
  V H D K   *

```

blau: stille Mutation vom GAA (E) des original vIL-6 zu GAG (E) im vIL-6*

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von vIL-6-c-myc

XhoI

1 TACTACTCGA GGCCACCATG TGCTGGTTCA AGTTGTGGTC TATCTTGCTG
M C W F K L W S I L L

51 GTAGGTTAC TGCTGGTATC TGGAACGCGG GGCAAGTTGC CGGACGCCCC
V G S L L V S G T R G K L P D A P

101 CGAGTTTGAA AAGGATCTTC TCATTTCAGAG ACTCAATTGG ATGCTATGGG
E F E K D L L I Q R L N W M L W V

151 TGATCGATGA ATGCTTCCGC GACCTCTGTT ACCGTACCGG CATCTGCAAG
I D E C F R D L C Y R T G I C K

201 GGTATTCTAG AGCCCGCTGC TATTTTTCAT CTGAAACTAC CAGCCATCAA
G I L E P A A I F H L K L P A I N

251 CGATACTGAT CACTGCGGGT TAATAGGATT TAATGAGACT AGCTGCCTTA
D T D H C G L I G F N E T S C L K

301 AAAAGCTCGC CGATGGCTTT TTCGAATTCG AGGTGTTGTT TAAGTTTTTA
K L A D G F F E F E V L F K F L

351 ACGACGGAGT TTGGAAAATC AGTGATAAAC GTGGACGTCA TGGAGCTTCT
T T E F G K S V I N V D V M E L L

401 GACGAAGACC TTAGGATGGG ACATACAGGA AGAGCTCAAT AAGCTGACTA
T K T L G W D I Q E E L N K L T K

451 AGACGCACTA CAGTCCACCC AAATTTGACC GCGGTCTATT AGGGAGGCTT
T H Y S P P K F D R G L L G R L

501 CAGGGACTTA AGTATTGGGT GAGACACTTT GCTTCGTTTT ATGTTCTGAG
Q G L K Y W V R H F A S F Y V L S

551 TGCAATGGAA AAGTTTGCAG GTCAAGCGGT GCGTGTGTTG AACTCTATCC
A M E K F A G Q A V R V L N S I P

NotI

601 CAGACGTGAC TCCTGACGTC CACGATAAGG CGGCCGCAGA **ACAAAAACTC**
D V T P D V H D K A A A E Q K L

BamHI

651 **ATCTCAGAAG** **AGGATCTGTA** GGGATCCGCG
I S E E D L *

blau: c-myc-tag

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von vIL-6-c-myc-KDEL

*Xho*I

1 TACTACTCGA GGCCACCATG TGCTGGTTCA AGTTGTGGTC TATCTTGCTG
M C W F K L W S I L L

51 GTAGGTTAC TGCTGGTATC TGGAACGCGG GGCAAGTTGC CGGACGCCCC
V G S L L V S G T R G K L P D A P

101 CGAGTTTGAA AAGGATCTTC TCATTCAGAG ACTCAATTGG ATGCTATGGG
E F E K D L L I Q R L N W M L W V

151 TGATCGATGA ATGCTTCCGC GACCTCTGTT ACCGTACCGG CATCTGCAAG
I D E C F R D L C Y R T G I C K

201 GGTATTCTAG AGCCCGCTGC TATTTTTTCAT CTGAAACTAC CAGCCATCAA
G I L E P A A I F H L K L P A I N

251 CGATACTGAT CACTGCGGGT TAATAGGATT TAATGAGACT AGCTGCCTTA
D T D H C G L I G F N E T S C L K

301 AAAAGCTCGC CGATGGCTTT TTCGAATTCG AGGTGTTGTT TAAGTTTTTTA
K L A D G F F E F E V L F K F L

351 ACGACGGAGT TTGGAAAATC AGTGATAAAC GTGGACGTCA TGGAGCTTCT
T T E F G K S V I N V D V M E L L

401 GACGAAGACC TTAGGATGGG ACATACAGGA AGAGCTCAAT AAGCTGACTA
T K T L G W D I Q E E L N K L T K

451 AGACGCACTA CAGTCCACCC AAATTTGACC GCGGTCTATT AGGGAGGCTT
T H Y S P P K F D R G L L G R L

501 CAGGGACTTA AGTATTGGGT GAGACACTTT GCTTCGTTTT ATGTTCTGAG
Q G L K Y W V R H F A S F Y V L S

551 TGCAATGGAA AAGTTTGCAG GTCAAGCGGT GCGTGTTTTG AACTCTATCC
A M E K F A G Q A V R V L N S I P

*Not*I

601 CAGACGTGAC TCCTGACGTC CACGATAAGG CGGCCGAGA **ACAAAACTC**
D V T P D V H D K A A A E Q K L

651 **ATCTCAGAAG** **AGGATCTGAA** TCCGCGG**AAA** **GACGAACTCT** AG
I S E E D L N P R **K** **D E L** *

blau: c-myc-tag

rot: ER-Retentionssequenz (KDEL)

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von IL-6-c-myc- His

BglIII

1 GGCTACTAGT ATCGATCGCG CGCAGATCTG CCACCATGAA CTCCTTCTCC
M N S F S

51 ACAAGCGCCT TCGGTCCAGT TGCCTTCTCC CTGGGGCTGC TCCTGGTGTT
T S A F G P V A F S L G L L L V L

101 GCCTGCTGCC TTCCCTGCCC CAGTACACGT GCATATGCCA GTACCCCAG
P A A F P A P V H V H M P V P P G

151 GAGAAGATTC CAAAGATGTA GCCGCCCCAC ACAGACAGCC ACTCACCTCT
E D S K D V A A P H R Q P L T S

201 TCAGAACGAA TTGACAAACA AATTCGGTAC ATCCTCGACG GCATCTCAGC
S E R I D K Q I R Y I L D G I S A

251 CCTGAGAAAG GAGACATGTA ACAAGAGTAA CATGTGTGAA AGCAGCAAAG
L R K E T C N K S N M C E S S K E

301 AGGCACTGGC AGAAAACAAC CTGAACCTTC CAAAGATGGC TGAAAAAGAT
A L A E N N L N L P K M A E K D

351 GGATGCTTCC AATCTGGATT CAATGAGGAG ACTTGCCTGG TGAAAATCAT
G C F Q S G F N E E T C L V K I I

401 CACTGGTCTT TTGGAGTTTG AGGTATACCT AGAGTACCTC CAGAACAGAT
T G L L E F E V Y L E Y L Q N R F

451 TTGAGAGTAG TGAGGAACAA GCCAGAGCTG TGCAGATGAG TACAAAAGTC
E S S E E Q A R A V Q M S T K V

XbaI

501 XBACTGATCC AGTTCCTGCA GAAAAAGGCA AAGAATCTAG ATGCAATAAC
? L I Q F L Q K K A K N L D A I T

551 CACCCCTGAC CCAACCACAA ATGCCAGCCT GCTGACGAAG CTGCAGGCAC
T P D P T T N A S L L T K L Q A Q

601 AGAACCAGTG GCTGCAGGAC ATGACAACCTC ATCTCATTCT GCGCAGCTTT
N Q W L Q D M T T H L I L R S F

651 AAGGAGTTCC TGCAGTCCAG CCTGAGGGCT CTTCGGCAAA TGGGATCCGC
K E F L Q S S L R A L R Q M G S A

701 GGCCGCAGAA CAAAACTCA TCTCAGAAGA GGATCTGAAT GGGGCCGTCG
A A E Q K L I S E E D L N G A V E

751 AGCSAACCAC CACCACCACC ACTGAGATCC GGCTGCTAGT CGACGTCCCA
? T T T T T T E I R L L V D V P

blau: c-myc-tag

grün: His-tag

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von IL-6-c-myc-KDEL

SpeI

1 GACTAGTCGC CACCATGAAC TCCTTCTCCA CAAGCGCCTT CGGTCCAGTT
M N S F S T S A F G P V

51 GCCTTCTCCC TGGGGCTGCT CCTGGTGTTG CCTGCTGCCT TCCCTGCCCC
A F S L G L L L V L P A A F P A P

101 AGTACCCCA GGAGAAGATT CCAAAGATGT AGCCGCCCA CACAGACAGC
V P P G E D S K D V A A P H R Q P

151 CACTCACCTC TTCAGAACGA ATTGACAAAC AAATTCGGTA CATCCTCGAC
L T S S E R I D K Q I R Y I L D

201 GGCATCTCAG CCCTGAGAAA GGAGACATGT AACAAGAGTA ACATGTGTGA
G I S A L R K E T C N K S N M C E

251 AAGCAGCAA GAGGCACTGG CAGAAAACAA CCTGAACCTT CCAAAGATGG
S S K E A L A E N N L N L P K M A

301 CTGAAAAAGA TGGATGCTTC CAATCTGGAT TCAATGAGGA GACTTGCCTG
E K D G C F Q S G F N E E T C L

351 GTGAAAATCA TCACTGGTCT TTTGGAGTTT GAGGTATAACC TAGAGTACCT
V K I I T G L L E F E V Y L E Y L

401 CCAGAACAGA TTTGAGAGTA GTGAGGAACA AGCCAGAGCT GTGCAGATGA
Q N R F E S S E E Q A R A V Q M S

XbaI

451 GTACAAAAGT CCTGATCCAG TTCCTGCAGA AAAAGGCAAA GAATCTAGAT
T K V L I Q F L Q K K A K N L D

501 GCAATAACCA CCCCTGACCC AACCACAAAT GCCAGCCTGC TGACGAAGCT
A I T T P D P T T N A S L L T K L

551 GCAGGCACAG AACCAGTGGC TGCAGGACAT GACAACTCAT CTCATTCTGC
Q A Q N Q W L Q D M T T H L I L R

601 GCAGCTTTAA GGAGTTCCTG CAGTCCAGCC TGAGGGCTCT TCGGCAAATG
S F K E F L Q S S L R A L R Q M

NotI

651 GCGGCCGCGAG AACAAAAACT CATCTCAGAA GAGGATCTGA ATCCGCGGAA
A A A E Q K L I S E E D L N P R K

701 AGACGAACTC TAG
D E L *

blau: c-myc-tag

rot: ER-Retentionssequenz (KDEL)

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Hyper-IL-6-c-myc:

SpeI

1 GACTAGTCGC CACCATGCTG GCCGTCGGCT GCGCGCTGCT GGCTGCCCTG
M L A V G C A L L A A L

51 CTGGCCGCGC CGGGAGCGGC GCTGGCCCCA AGGCGCTGCC CTGCGCAGGA
L A A P G A A L A P R R C P A Q E

101 GGTGGCAAGA GGCCTGCTGA CCAGTCTGCC AGGAGACAGC GTGACTCTGA
V A R G V L T S L P G D S V T L T

151 CCTGCCCGGG GGTAGAGCCG GAAGACAATG CCACTGTTCA CTGGGTGCTC
C P G V E P E D N A T V H W V L

201 AGGAAGCCGG CTGCAGGCTC CCACCCAGC AGATGGGCTG GCATGGGAAG
R K P A A G S H P S R W A G M G R

251 GAGGCTGCTG CTGAGGTCGG TGCAGCTCCA CGACTCTGGA AACTATTTCAT
R L L L R S V Q L H D S G N Y S C

301 GCTACCGGGC CGGCCGCCCA GCTGGGACTG TGCACCTGCT GGTGGATGTT
Y R A G R P A G T V H L L V D V

351 CCCCCGAGG AGCCCCAGCT CTCCTGCTTC CGGAAGAGCC CCCTCAGCAA
P P E E P Q L S C F R K S P L S N

401 TGTTGTTTTGT GAGTGGGGTC CTCGGAGCAC CCCATCCCTG ACGACAAAGG
V V C E W G P R S T P S L T T K A

451 CTGTGCTCTT GGTGAGGAAG TTTCAGAACA GTCCGGCCGA AGACTTCCAG
V L L V R K F Q N S P A E D F Q

501 GAGCCGTGCC AGTATTCCCA GGAGTCCCAG AAGTTCTCCT GCCAGTTAGC
E P C Q Y S Q E S Q K F S C Q L A

551 AGTCCCGGAG GGAGACAGCT CTTTCTACAT AGTGTCCATG TCGTGCCCA
V P E G D S S F Y I V S M C V A S

601 GTAGTGTCGG GAGCAAGTTC AGCAAACTC AAACCTTTCA GGGTTGTGGA
S V G S K F S K T Q T F Q G C G

651 ATCTTGCAGC CTGATCCGCC TGCCAACATC ACAGTCACTG CCGTGGCCAG
I L Q P D P P A N I T V T A V A R

701 AAACCCCGC TGGCTCAGTG TCACCTGGCA AGACCCCCAC TCCTGGAAC
N P R W L S V T W Q D P H S W N S

751 CATCTTTCTA CAGACTACGG TTTGAGCTCA GATATCGGGC TGAACGGTCA
S F Y R L R F E L R Y R A E R S

801 AAGACATTCA CAACATGGAT GGTCAAGGAC CTCCAGCATC ACTGTGTCAT
K T F T T W M V K D L Q H H C V I

851 CCACGACGCC TGGAGCGGCC TGAGGCACGT GGTGCAGCTT CGTGCCAGG
H D A W S G L R H V V Q L R A Q E

901 AGGAGTTCCG GCAAGCGGAG TGGAGCGAGT GGAGCCCGGA GGCCATGGGC
E F G Q G E W S E W S P E A M G

951 ACGCCTTGGA CAGAATCCAG GAGTCCTCCA GCTCGAGGAG GTGGAGGTTTC
 T P W T E S R S P P A R G G G G S

1001 TGGAGGTGGA GGTTCCTGGAG GTGGAGGTTTC TGTCGAGCCA GTACCCCCAG
 G G G G S G G G G S V E P V P P G

1051 GAGAAGATTC CAAAGATGTA GCCGCCCCAC ACAGACAGCC ACTCACCTCT
 E D S K D V A A P H R Q P L T S

1101 TCAGAACGAA TTGACAAACA AATTCGGTAC ATCCTCGACG GCATCTCAGC
 S E R I D K Q I R Y I L D G I S A

1151 CCTGAGAAAG GAGACATGTA ACAAGAGTAA CATGTGTGAA AGCAGCAAAG
 L R K E T C N K S N M C E S S K E

1201 AGGCACTGGC AGAAAACAAC CTGAACCTTC CAAAGATGGC TGAAAAAGAT
 A L A E N N L N L P K M A E K D

1251 GGATGCTTCC AATCTGGATT CAATGAGGAG ACTTGCCTGG TGAAAATCAT
 G C F Q S G F N E E T C L V K I I

1301 CACTGGTCTT TTGGAGTTTG AGGTATACCT AGAGTACCTC CAGAACAGAT
 T G L L E F E V Y L E Y L Q N R F

1351 TTGAGAGTAG TGAGGAACAA GCCAGAGCTG TGCAGATGAG TACAAAAGTC
 E S S E E Q A R A V Q M S T K V

XbaI

1401 CTGATCCAGT TCCTGCAGAA AAAGGCAAAG AATCTAGATG CAATAACCAC
 L I Q F L Q K K A K N L D A I T T

1451 CCCTGACCCA ACCACAAATG CCAGCCTGCT GACGAAGCTG CAGGCACAGA
 P D P T T N A S L L T K L Q A Q N

1501 ACCAGTGGCT GCAGGACATG ACAACTCATC TCATTCTGCG CAGCTTTAAG
 Q W L Q D M T T H L I L R S F K

NotI

1551 GAGTTCCTGC AGTCCAGCCT GAGGGCTCTT CGGCAAATGG CGGCCGCAGA
 E F L Q S S L R A L R Q M A A A E

BamHI

1601 ACAAAAATC ATCTCAGAAG TAGGGATCCG CG
 Q K L I S E E *

blau: c-myc-tag

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Hyper-IL-6-c-myc-KDEL

SpeI

1 GACTAGTCGC CACCATGCTG GCCGTCGGCT GCGCGCTGCT GGCTGCCCTG
M L A V G C A L L A A L

51 CTGGCCGCGC CGGGAGCGGC GCTGGCCCCA AGGCGCTGCC CTGCGCAGGA
L A A P G A A L A P R R C P A Q E

101 GGTGGCAAGA GGCCTGCTGA CCAGTCTGCC AGGAGACAGC GTGACTCTGA
V A R G V L T S L P G D S V T L T

151 CCTGCCCGGG GGTAGAGCCG GAAGACAATG CCACTGTTCA CTGGGTGCTC
C P G V E P E D N A T V H W V L

201 AGGAAGCCGG CTGCAGGCTC CCACCCAGC AGATGGGCTG GCATGGGAAG
R K P A A G S H P S R W A G M G R

251 GAGGCTGCTG CTGAGGTCGG TGCAGCTCCA CGACTCTGGA AACTATTCAT
R L L L R S V Q L H D S G N Y S C

301 GCTACCGGGC CGGCCGCCCA GCTGGGACTG TGCACTTGCT GGTGGATGTT
Y R A G R P A G T V H L L V D V

351 CCCCCGAGG AGCCCCAGCT CTCCTGCTTC CGGAAGAGCC CCCTCAGCAA
P P E E P Q L S C F R K S P L S N

401 TGTGTTTTGT GAGTGGGGTC CTCGGAGCAC CCCATCCCTG ACGACAAAGG
V V C E W G P R S T P S L T T K A

451 CTGTGCTCTT GGTGAGGAAG TTTCAGAACA GTCCGGCCGA AGACTTCCAG
V L L V R K F Q N S P A E D F Q

501 GAGCCGTGCC AGTATTCCCA GGAGTCCCAG AAGTTCTCCT GCCAGTTAGC
E P C Q Y S Q E S Q K F S C Q L A

551 AGTCCCGGAG GGAGACAGCT CTTTCTACAT AGTGTCCATG TGGTTCGCCA
V P E G D S S F Y I V S M C V A S

601 GTAGTGTCCG GAGCAAGTTC AGCAAAACTC AAACCTTTCA GGGTTGTGGA
S V G S K F S K T Q T F Q G C G

651 ATCTTGCGC CTGATCCGCC TGCCAACATC ACAGTCACTG CCGTGGCCAG
I L Q P D P P A N I T V T A V A R

701 AAACCCCGC TGGCTCAGTG TCACCTGGCA AGACCCCCAC TCCTGGAAGT
N P R W L S V T W Q D P H S W N S

751 CATCTTTCTA CAGACTACGG TTTGAGCTCA GATATCGGGC TGAACGGTCA
S F Y R L R F E L R Y R A E R S

801 AAGACATTCA CAACATGGAT GGTCAAGGAC CTCCAGCATC ACTGTGTCAT
K T F T T W M V K D L Q H H C V I

851 CCACGACGCC TGGAGCGGCC TGAGGCACGT GGTGCAGCTT CGTGCCAGG
H D A W S G L R H V V Q L R A Q E

901 AGGAGTTCCG GCAAGGCGAG TGGAGCGAGT GGAGCCCGGA GGCCATGGGC
E F G Q G E W S E W S P E A M G

951 ACGCCTTGGA CAGAATCCAG GAGTCCTCCA GCTCGAGGAG GTGGAGGTTC
 T P W T E S R S P P A R G G G G S

1001 TGGAGGTGGA GGTTCCTGGAG GTGGAGGTTC TGTCGAGCCA GTACCCCCAG
 G G G G S G G G G S V E P V P P G

1051 GAGAAGATTC CAAAGATGTA GCCGCCCCAC ACAGACAGCC ACTCACCTCT
 E D S K D V A A P H R Q P L T S

1101 TCAGAACGAA TTGACAAACA AATTCGGTAC ATCCTCGACG GCATCTCAGC
 S E R I D K Q I R Y I L D G I S A

1151 CCTGAGAAAG GAGACATGTA ACAAGAGTAA CATGTGTGAA AGCAGCAAAG
 L R K E T C N K S N M C E S S K E

1201 AGGCACTGGC AGAAAACAAC CTGAACCTTC CAAAGATGGC TGAAAAAGAT
 A L A E N N L N L P K M A E K D

1251 GGATGCTTCC AATCTGGATT CAATGAGGAG ACTTGCCTGG TGAAAATCAT
 G C F Q S G F N E E T C L V K I I

1301 CACTGGTCTT TTGGAGTTTG AGGTATACCT AGAGTACCTC CAGAACAGAT
 T G L L E F E V Y L E Y L Q N R F

1351 TTGAGAGTAG TGAGGAACAA GCCAGAGCTG TGCAGATGAG TACAAAAGTC
 E S S E E Q A R A V Q M S T K V

XbaI

1401 CTGATCCAGT TCCTGCAGAA AAAGGCAAAG AATCTAGATG CAATAACCAC
 L I Q F L Q K K A K N L D A I T T

1451 CCCTGACCCA ACCACAAATG CCAGCCTGCT GACGAAGCTG CAGGCACAGA
 P D P T T N A S L L T K L Q A Q N

1501 ACCAGTGGCT GCAGGACATG ACAACTCATC TCATTCTGCG CAGCTTTAAG
 Q W L Q D M T T H L I L R S F K

NotI

1551 GAGTTCCTGC AGTCCAGCCT GAGGGCTCTT CGGCAAATGG CGGCCGCAGA
 E F L Q S S L R A L R Q M A A A E

1601 ACAAAAATC ATCTCAGAAG AGGATCTGAA TCCGCGAAA GACGAACTCT
 Q K L I S E E D L N P R K D E L *

1651 AG

blau: c-myc-tag

rot: ER-Retentionssequenz (KDEL)

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von vIL-6-c-myc-opt

*Xho*I

1 CTCGAGGCCA CCATGTGCTG GTTCAAGCTG TGGAGCCTGC TGCTGGTGGG
M C W F K L W S L L L V G

51 CTCCCTGCTG GTGTCCGGAA CCAGAGGCAA GCTGCCTGAC GCCCCTGAGT
S L L V S G T R G K L P D A P E F

101 TCGAGAAGGA CCTGCTGATC CAGAGGCTGA ACTGGATGCT GTGGGTGATC
E K D L L I Q R L N W M L W V I

151 GACGAGTGCT TCAGGGACCT GTGCTACAGA ACCGGCATCT GCAAGGGCAT
D E C F R D L C Y R T G I C K G I

201 CCTGGAGCCT GCCGCCATCT TCCACCTGAA GCTGCCCCGCC ATCAACGACA
L E P A A I F H L K L P A I N D T

251 CCGACCACTG CGGCCTGATC GGCTTCAACG AGACCAGCTG CCTGAAGAAG
D H C G L I G F N E T S C L K K

301 CTGGCCGACG GCTTCTTCGA GTTCGAGGTG CTGTTCAAGT TCCTGACCAC
L A D G F F E F E V L F K F L T T

351 CGAGTTCGGC AAGAGCGTGA TCAACGTGGA CGTGATGGAG CTGCTGACCA
E F G K S V I N V D V M E L L T K

401 AGACCCTGGG CTGGGACATC CAGGAGGAGC TGAACAAGCT GACAAAGACC
T L G W D I Q E E L N K L T K T

451 CACTACAGCC CCCCCAAGTT CGACAGAGGC CTGCTGGGCA GACTGCAGGG
H Y S P P K F D R G L L G R L Q G

501 CCTGAAGTAC TGGGTGAGGC ACTTCGCCAG CTTCTACGTG CTGAGCGCCA
L K Y W V R H F A S F Y V L S A M

551 TGGAGAAGTT CGCCGGCCAG GCTGTGAGAG TGCTGGACAG CATCCCTGAC
E K F A G Q A V R V L D S I P D

601 GTGACCCCTG ACGTGCACGA CAAGGAGCAG AAGCTGATCA GCGAGGAGGA
V T P D V H D K E Q K L I S E E D

651 CCTGTGATGA CTCGAG
L * * *Xho*I

blau: c-myc-tag

9.4 Gegenüberstellung der Originalsequenz und der codonoptimierten Sequenz des vIL-6

vIL-6

```

ATGTGCTGGTTCAAGTTGTGGTCTCTCTTGCTGGTCGGTTCCTGCTGGTATCTGGAACG 60
|||||
ATGTGCTGGTTCAAGCTGTGGAGCCTGCTGCTGGTGGGCTCCCTGCTGGTGTCCGGAACC 60

```

vIL-6-c-myc-opt

```

CGGGGCAAGTTGCCGGACGCCCCGAGTTTGAAAAGGATCTTCTCATTGAGAGACTCAAT 120
| |||||
AGAGGCAAGCTGCCTGACGCCCTGAGTTCGAGAAGGACCTGCTGATCCAGAGGCTGAAC 120

TGGATGCTATGGGTGATCGATGAATGCTTCCGCGACCTCTGTTACCGTACCGGCATCTGC 180
|||||
TGGATGCTGTGGGTGATCGACGAGTGCTTCAGGGACCTGTGCTACAGAACCGGCATCTGC 180

AAGGGTATTCTAGAGCCCCTGCTATTTTTTCATCTGAAACTACCAGCCATCAACGATACT 240
|||||
AAGGGCATCCTGGAGCCTGCCGCCATCTCCACCTGAAGCTGCCCGCCATCAACGACACC 240

GATCACTGCGGGTTAATAGGATTTAATGAGACTAGCTGCCTTAAAAAGCTCGCCGATGGC 300
|| |||||
GACCACTGCGGCCCTGATCGGCTTCAACGAGACCAGCTGCCTGAAGAAGCTGGCCGACGGC 300

TTTTTTGAATTCGAGGTGTTGTTTAAAGTTTTTAAACGACGGAGTTTGAAAATCAGTGATA 360
|| |||||
TTCTTCGAGTTCGAGGTGCTGTTCAAGTTCCTGACCACCGAGTTCGGCAAGAGCGTGATC 360

AACGTGGACGTCATGGAGCTTCTGACGAAGACCTTAGGATGGGACATACAGGAAGAGCTC 420
|||||
AACGTGGACGTGATGGAGCTGCTGACCAAGACCCTGGGCTGGGACATCCAGGAGGAGCTG 420

AATAAGCTGACTAAGACGCACTACAGTCCACCCAAATTTGACCGCGGTCTATTAGGGAGG 480
|| |||||
AACAAGCTGACAAAGACCCACTACAGCCCCCAAGTTCGACAGAGGCCTGCTGGGCAGA 480

CTTCAGGGACTTAAGTATTGGGTGAGACACTTTGCTTCGTTTTATGTTCTGAGTGCAATG 540
|| |||||
CTGCAGGGCCTGAAGTACTGGGTGAGGCACTTCGCCAGCTTCTACGTGCTGAGCGCCATG 540

GAAAAGTTTGCAGGTCAAGCGGTGCGTGTTTTGGACTCTATCCCAGACGTGACTCCTGAC 600
|| |||||
GAGAAGTTCGCCGGCCAGGCTGTGAGAGTGCTGGACAGCATCCCTGACGTGACCCCTGAC 600

GTCCACGATAAGTAA 615
|| |||||
GTGCACGACAAGACAAGGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGTGATGA 653

```

9.5 Veröffentlichungen

Matthews V, Schuster B, Schutze S, **Bussmeyer I**, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S

Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE).

J Biol Chem. 2003 Oct 3;278(40):38829-39.

Roeder T, Schramm G, Marquardt H, **Bussmeyer I**, Franz O

Differential transcription in defined parts of the insect brain: comparative study utilizing *Drosophila melanogaster* and *Schistocerca gregaria*.

Invert Neurosci. 2004 Oct;5(2):77-83.

Kovaleva M*, **Bussmeyer I***, Rabe B, Grötzinger J, Sudarman E, Eichler J, Conrad U, Rose-John S, Scheller J

Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display.

J Virol. 2006 Sep;80(17):8510-20.

* Die Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei.

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Arbeit danken.

Weiterhin danke ich Dr. Jürgen Scheller und PD Dr. Dr. Karl-Josef Kallen für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie für ihre Hilfe durch ihr Fachwissen.

Herrn PD Dr. Radek Sedlacek danke ich für seine Tipps und Tricks bei der „Mausarbeit“.

Danke sagen möchte ich auch allen Kollegen aus dem „Altbau“ der Biochemie. Hierbei gilt mein besonderer Dank meinen Kollegen Dr. Marina Kovaleva, Dr. Björn Schuster, Dr. Vance Matthews, Dr. Petra Regenhard, Björn Rabe, Athena Chalaris, Steffi Schnell, Dr. Krzysztof Paliga, Dr. Stephanie Tenhumberg, Renate Thun, Ulrike May und Jan Suthaus aus dem Labor 137 für die freundschaftliche Labor und Arbeitsatmosphäre.

Bei Dr. Jürgen Scheller sowie Agnes Nolting möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Sigrid und Klaus Bußmeyer, meiner Schwester Uta und Oma Hesseln, sowie Agnes Noting die mich, besonders in diesem Jahr, immer unterstützt haben und in jeder Situation für mich da waren.

11 Lebenslauf

Name: Ingo Bußmeyer

Geburtsdatum: 13.01.1973

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule: 1979-1983 Gorchfock Grundschule in Schenefeld

1983-1993 Gymnasium Schenefeld

Studium:

1993-1994 Studium der Physik an der Universität Hamburg

1994-2001 Studium der Biologie an der Universität Hamburg

2001 Diplomarbeit zum Thema: „Das Centrosomin-Homologe und eine Gluthation-S-Transferase im Nervensystem der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* Forskål“

2002-2006 Anfertigung der vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. Rose-John an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Ingo Bußmeyer, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 14.12.2006

Ingo Bußmeyer

