

6 ZUSAMMENFASSUNG

Für Untersuchungen zur Wirkung von Zytokinen auf das Immunsystem des Pferdes wurden bisher vor allem humane kreuzreaktive Zytokine verwendet. Da Zytokinwirkungen jedoch zum Teil speziesspezifisch sind, müssen so ermittelte Daten nicht unbedingt die vollständige Wirkungsweise des entsprechenden equinen Zytokins widerspiegeln. Mit der Klonierung des equinen IL2 durch die Arbeitsgruppen von TAVERNOR und VANDERGRIFFT (1993) und vom equinen IL4 durch die Gruppe von VANDERGRIFFT (1994) wurde die Grundlage für diese Arbeit geschaffen, deren Ziel es war, rekombinantes equines IL2 und IL4 über ein eukaryotisches Expressionssystem herzustellen, biochemisch zu charakterisieren und die biologische Wirksamkeit der exprimierten Zytokine nachzuweisen.

Die cDNA der equinen Zytokine IL2 und IL4 wurde dazu in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-)/Myc-His kloniert. Mit den hergestellten Vektoren pIL2/Myc-His und pIL4/Myc-His wurden CHO-Zellen transient transfiziert. In diesen Zellen konnte 24 Stunden nach der Transfektion die Expression von Zytokin-mRNA und intrazytoplasmatischem IL2 oder IL4 mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, daß 20 - 65 % der transfizierten Zellen das gewünschte Zytokin produzierten.

Beide Zytokine, IL2 und IL4, wurden sowohl aus Zelllysaten transfizierter Zellen als auch aus 24 Stunden Zellkulturüberständen aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Westernblot biochemisch charakterisiert. Für das equine IL2 ergab sich eine molekulare Masse von 17,1 kDa. Für equines IL4 konnten drei Proteine mit 17,1, sowie 19,6 und 22,1 kDa nachgewiesen werden. Diese unterschiedlichen molekularen Massen beim equinen IL4 resultierten vermutlich aus verschiedenen Glykosylierungsformen des Proteins.

Mit Hilfe eines Proliferationsassays mit LAG-vorstimulierte equinen PBMC konnte die biologische Wirksamkeit der beiden equinen Zytokine nachgewiesen werden. Sowohl IL2 als auch IL4 verstärkten die Proliferation equiner mononukleärer Zellen. Zusätzlich hatte IL2 eine proliferative Wirkung auf Ig-positive Lymphozyten, die für das IL4 unter der LAG-Vorstimulation nicht zu beobachten war. Dagegen konnte für equines IL4 gezeigt werden, daß die Zunahme der absoluten Lymphozytenzahl im wesentlichen auf einer Proliferation von CD4⁺- und CD8⁻-T-Lymphozyten beruhte.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die equinen Zytokine IL2 und IL4 als biologisch wirksame Proteine exprimiert werden. Die bislang identifizierten proliferativen Wirkungen in den hier gewählten Ansätzen decken sich mit entsprechenden Beobachtungen im murinen und humanen System. Mit dem hier dokumentierten Vorgehen können equines IL2 und IL4 für weitere funktionelle Untersuchungen hergestellt werden. Von besonderem Interesse wäre ihre Wirkung auf den Immunglobulinklassenwechsel und dabei insbesondere ihre Fähigkeit zur Induktion der IgE-Expression. Sie können ferner dazu genutzt werden, um weitere Einblicke in die immunregulatorischen Mechanismen equiner Zytokine zu gewinnen.

7 SUMMARY

K. B. Dohmann: Expression, biochemical characterisation and biological activity of the equine cytokines interleukin 2 and interleukin 4.

For functional analysis of cytokine effects in the equine immune system cross-reactive cytokines especially those from humans have been used due to the lack of corresponding equine cytokines. As actions of some cytokines are species-specific, results of such investigations may not reflect the real function of the equivalent equine cytokines. Thus, the aim of the present study was the production of recombinant equine IL2 and IL4 by the use of an eucaryotic expression system, their biochemical characterisation and some proof of the biological activity of both of the expressed cytokines. It is based on the cloning of equine IL2 by the groups of TAVERNOR and VANDERGRIFT (1993) and of IL4 by VANDERGRIFT (1994).

CDNAs of equine IL2 and IL4 (kindly provided by Dr. D. Horohov, Los Angeles, USA) were cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1(-)/Myc-His. The resulting vectors were named pIL2/Myc-His and pIL4/Myc-His, respectively. CHO-cells were transiently transfected with these vectors. The expression of the cytokines could be detected within 24 hours post transfection by the detection of cytokine-mRNA via RT-PCR and by intracellular staining of expressed IL2 and IL4 applying indirect immunofluorescence to the Myc-residues. Approximately 20 - 65 % of the transfected cells expressed the equine IL2 or IL4.

Both cytokines, IL2 and IL4, were isolated from cell lysates as well as from cell culture supernatants of transfected CHO-cells and could be characterised biochemically by SDS-PAGE and Western blotting. Equine IL2 was expressed as a single protein with a molecular mass of 17.1 kDa. Equine IL4 was produced in three different sizes of 17.1, 19.6 and 22.1 kDa. This heterogeneity in size of equine IL4 might represent different glycosylation forms of the same recombinant protein.

Biological activity of both expressed cytokines was demonstrated in proliferation assays using LAG-prestimulated equine PBMC. Both, IL2 and IL4, enhanced the proliferation of equine mononuclear cells. In addition, equine IL2 exerted a proliferative effect on Ig-positive lymphocytes, which was not seen in the presence of equine IL4. On the other hand it could be

shown for equine IL4 that proliferative equine PBMC were mainly CD4-positive and to a lesser extent CD8-positive T-lymphocytes.

In conclusion, equine IL2 and IL4 were transiently expressed as proteins with biological activity. The identified proliferative effects of both cytokines observed in the used assays agree with corresponding studies in the murine and human system. The procedures reported in this study may be useful for generation of recombinant equine IL2 and IL4 in amounts permitting initial investigations on the effects of IL2 and IL4 on the switch of immunoglobulin isotypes or those on the ability of IL2 and IL4 to induce expression of IgE. Furthermore, they can be used to study other immunoregulatory mechanisms of equine cytokines.