

Aus dem Institut für Immunologie
(ehem. Direktor: Prof. Dr. M. Krönke)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLUß SPEZIFISCHER
HAMMERKOPF-RIBOZYME AUF DIE EXPRESSION
VON HLA-DRB-MOLEKÜLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

KJELL HEUSER

aus Wehrda / Marburg a. d. Lahn

Kiel 1999

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Krönke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Kremer

Tag der mündlichen Prüfung: 28. September 1999

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28. September 1999

gez.: Prof. Dr. Dr. H.-K. Albers
Dekan

Meinen Eltern

zum Dank für die stetige und großzügige Unterstützung meiner Ausbildung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1 Material	6
2.1.1 Biologisches Material	6
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	7
2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	9
2.1.4 Geräte und Computerprogramme	11
2.2 Zellbiologische Methoden	13
2.2.1 Kultivierung und Konservierung eukaryotischer Zellen	13
2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation	14
2.2.3 Immunfluoreszenzmessung mittels Durchflußzytometrie	15
2.2.4 Messung der MHC-Expression eukaryotischer Zellen	17
2.2.5 Messung der Tranfektionseffizienz	19
2.3 Molekularbiologische Methoden	20
2.3.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten <i>E. coli</i>	21
2.3.3 Restriktionsverdau zur Analytik isolierter DNA	22
2.3.4 Restriktionsverdau für präparative Zwecke (Vektorklonierung)	22
2.3.5 Auftrennung von DNA-Molekülen mittels AGE	22
2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.3.7 Polymerasekettenreaktion	24
2.3.8 Nachweis von Plasmid-DNA aus Kulturzellen mittels PCR	25
2.3.9 Nachweis von Ribozym-RNA aus Kulturzellen mittels RT-PCR ..	25
2.3.10 Sequenzierung von DNA	26
3. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	27
3.1 Merkmale zum Entwurf von Hammerkopf-Ribozymen	27
3.2 Auswahl der Target-Sequenzen	28
3.3 Klonierung der Ribozym-kodierenden DNAs	31
3.4 Transformation der Ribozym-DNAs	34
3.5 Sequenzierung der Ribozym-DNAs	35

3.6	Transfektionen und FACScan-Analysen	37
3.6.1	Messung der MHC-Expression untransfizierter Zellen	38
3.6.2	Messung der MHC-Expression untransfizierter COS-7-Zellen.....	38
3.6.3	Messung der MHC-Expression untransfizierter EPG 85-257P-Zellen	40
3.6.4	Messung der MHC-Expression Ribozym-transfizierter Zellen	40
3.6.5	Messung der MHC-Expression Ribozym-DNA- transfizierter COS-7-Zellen	42
3.6.6	Messung der MHC-Expression Ribozym-DNA- transfizierter EPG 85-257P-Zellen	44
3.7	Nachweis der Ribozym-kodierenden Plasmide in stabilen Transfektanten mittels PCR	48
3.8.	Nachweis der Ribozyme in stabilen Transfektanten mittels RT-PCR	49

4. Diskussion

4.1	Überblick	50
4.2	Erfolgreicher Einsatz von Ribozymen in anderen Zellkultur-Studien	51
4.3	Gründe für eine niedrige <i>in vivo</i> -Aktivität von Ribozymen	52
4.3.1	Abbau synthetischer Ribozyme in endoplasmatischen Kompartimenten	52
4.3.2	Ungünstige Stöchiometrie zwischen Ribozym und Target..	53
4.3.3	Ribozym und Target in verschiedenen Kompartimenten	53
4.3.4	Integrität der Ribozyme	54
4.3.5	Hochregulation nicht herabregulierter HLA-DRB-Allele ...	54
4.4	MHC-Expression transfizierter Zellen	55
4.4.1	MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter COS-7-Zellen	55
4.4.2	MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter EPG 85-257P-Zellen	55
4.5	Ausblick	57

5. Zusammenfassung

58

6. Literaturverzeichnis

60

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
β_2 m	β_2 -Mikroglobulin
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaare
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DRBall	Ribozym mit Wirksamkeit gegen nahezu alle bekannten HLA DRB-Allele
dsDNA	doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
EtBr	Ethidiumbromid
FACScan	Durchflußzytometer (Fluorescence Activated Cell Scanner)
FCS	Fötales Kälberserum
FDG	Fluorescein di- β -D-Galaktopyranosid
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Erdanziehungskraft (9,81 m/sec ²)
h	Stunden
Kap	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaare
LB	Lymphoblast
LS	Längenstandard
mAK	monoklonaler Antikörper
mcs	multiple Klonierungsseite (multiple cloning side)
μ F	Mikro-Farad
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

msec	Milli-Sekunden
mRNA	Boten-RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerithrin
RB	Ribozym
RB124	Ribozym mit Spezifität gegen DRB1*01-- DRB1*15--/16-- und DRB1*04--
RB4	Ribozym mit Spezifität gegen DRB1*04--
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinopigmentepithelzelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rev	revers
s	Sekunden
SCR124	Selbstspaltendes Ribozym mit Spezifität gegen DRB1*01--, DRB1*15--/16-- und DRB1*04--
SCR4	Selbstspaltendes Ribozym mit Spezifität gegen DRB1*04--
ssDNA	einzelsträngige DNA
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

Organtransplantationen sind oftmals lebensverlängernde und damit wichtige medizinische Eingriffe. Da jedoch in der weiten Mehrzahl der Fälle eine prospektive Spender-Empfänger-Auswahl nach immunologischen Kriterien nicht möglich ist, besteht für den Organempfänger die Gefahr, auf das Fremdgewebe mit einer Abstoßung zu reagieren. Einer der Hauptgründe für eine derartige Abstoßungsreaktion liegt in der Differenz der Humanen Leukozyten Antigene (HLA-Moleküle der Klasse I und II) zwischen Spender und Empfänger.

Das HLA-System des Menschen ist repräsentiert durch zentromernahe, im kurzen Arm des Chromosoms 6 gelegene allele Gene, die als Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex: MHC) bezeichnet werden (Abb. 1.1). Nach Lage ihres Genlocus werden die Gene in drei funktionelle Klassen eingeteilt, von denen die ersten beiden im folgenden genauer betrachtet werden sollen:

- 1.) Klasse I mit den wichtigsten Genloci HLA-A, HLA-B und HLA-C
- 2.) Klasse II mit den Genloci HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR

Die Gene HLA-A, -B und -C kodieren jeweils für die α -Kette des Klasse I- Moleküls. Ein weiterer Bestandteil dieses Moleküls ist das β_2 -Mikroglobulin. Sein Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 15.

Die Gene HLA- DP, -DQ und DR kodieren jeweils für eine α - und für eine β -Kette des Klasse II- Moleküls.

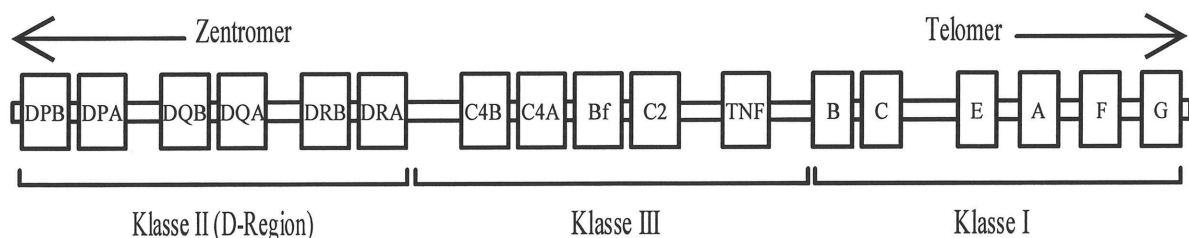


Abb. 1.1: Anordnung des humanen MHC auf dem Chromosom 6. Dargestellt sind die Positionen der wichtigsten Gene innerhalb der Subregionen.

Die HLA-Moleküle der Klasse I und II sind Glykoproteine, die auf der Oberfläche verschiedener Körperzellen lokalisiert sind und deren Aufgabe darin besteht, körperfremde Peptide im Bereich ihrer aminoterminalen Domänen zu binden und den T-Zellen zu präsentieren.

Die HLA-Klasse I-Moleküle sind die klassischen Transplantationsantigene. Sie kommen auf der Oberfläche nahezu sämtlicher kernhaltiger Organ- und Blutzellen vor. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, körperfremde Epitope dem T-Zell-Rezeptor (TCR) CD8-positiver, zytotoxischer T-Zellen zu präsentieren (Wade et al., 1993).

Jedes Klasse I-Molekül besteht aus einer glykolysierten schweren Polypeptidkette (45 kDa), die nichtkovalent mit β_2 -Mikroglobulin (12 kDa) assoziiert ist. Die schwere Kette besteht aus drei extrazellulären Domänen, gekennzeichnet als α_1 (N-terminal), α_2 und α_3 , einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Schwanzstück (Abb. 1.2) (Turner und Owen, 1995).

HLA-Klasse II- Moleküle befinden sich insbesondere auf der Oberfläche sogenannter dendritischer Zellen, wie Makrophagen und aktivierten T- und B-Lymphozyten. Ihre Zielstruktur bei der Präsentation antigenetischer Oligopeptide ist der TCR von CD4-positiven T-Helferzellen.

Klasse II-Moleküle sind Heterodimere aus nahezu gleichgroßen Glykoproteinketten (30-34 bzw. 26-29 kDa). Der extrazelluläre Anteil besteht aus je zwei Domänen (α_1 und α_2 bzw. β_1 und β_2) und ist über eine kurze Sequenz mit der Transmembranregion sowie mit der anschließenden zytoplasmatischen Domäne verbunden (Abb. 1.2) (Turner und Owen, 1995).

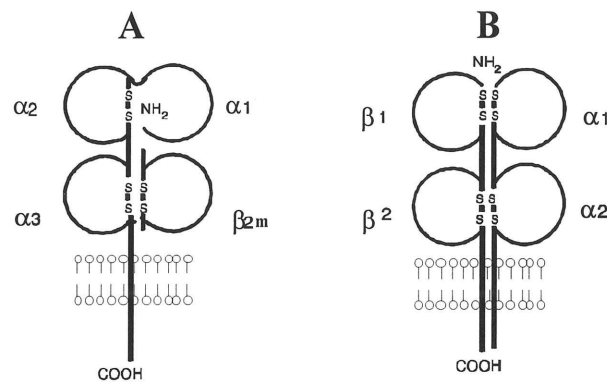


Abb.1.2: Aufbau der HLA-Moleküle:

A: HLA-Klasse I-Molekül;

B: HLA-Klasse II-Molekül

Die Erkennung fremder Peptid-HLA-Komplexe durch die antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren mündet in einer Kaskade immunologischer Reaktionen, wie Steigerung der Lymphokinproduktion von T-Zellen, Proliferation von B- und T-Zellen und Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen. Diese Vorgänge tragen in erheblichem Maße zur Abstoßung eines Transplantats bei (Wade, 1993; Hutchinson, 1995).

HLA-C,-DP- und DQ-Moleküle besitzen eine relativ geringe antigene Reaktivität und werden daher in der folgenden Betrachtung vernachlässigt. HLA-A- und HLA-B-Moleküle weisen dagegen eine starke, HLA-DRB-Moleküle die stärkste Immunogenität auf, sind also transplantationsimmunologisch von größter Bedeutung (Opelz, 1985; Mickey et al. 1985).

Stimmen die Organe von Spender und Empfänger bezüglich ihres HLA-Musters überein, so spricht man von HLA-Kompatibilität oder „Full-House“. Transplantationen haben bei dieser Ausgangslage die größte Erfolgswahrscheinlichkeit (Albert, 1984).

Das Spenderorgan ist allerdings auch dann transplantationskompetent, wenn der Empfänger eines oder mehrere Allele aufweist, welche der Spender nicht besitzt („Null-Mismatch“). Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn der Empfänger bezüglich eines der genannten Merkmale heterozygot ist, während der Spender homozygote Allele trägt. Besitzt dagegen der Spender ein HLA-A,-B- oder -DRB-Allel, welches nicht beim Empfänger vorkommt,

so spricht man von einem „Mismatch“ und das Spenderorgan gilt als immunologisch inkompetent (Abb. 1.3) (Albert, 1984).

Zur Erfassung des HLA-Musters von Spender und Empfänger wird die serologische, für HLA-Klasse II-Moleküle auch in zunehmendem Maße die molekularbiologische Typisierung durchgeführt. Bei der serologischen Methode werden Lymphozyten mit einer Auswahl zytotoxischer Antikörper exponiert, welche sich an die komplementären HLA-Antigene binden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe vermögen hinzugegebenes Komplement zu aktivieren, wodurch es zur Zellyse kommt.

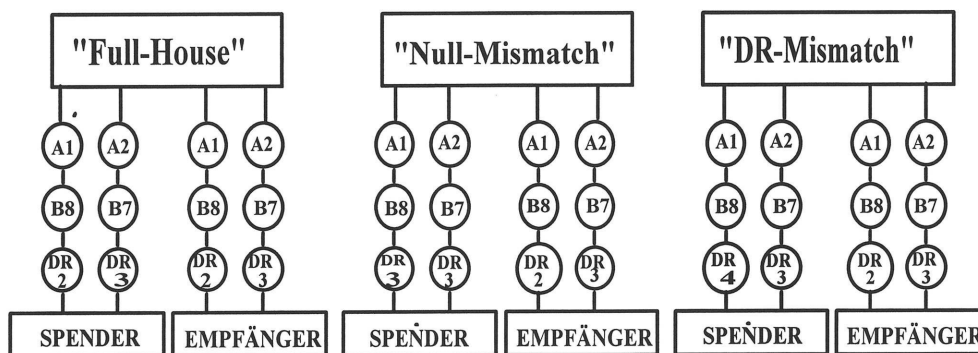


Abb. 1.3: Beispielhafte schematische Darstellung der transplantationsimmunologisch relevanten HLA-Allele von Spender und Empfänger bei den Konstellationen „Full House“, „Null-Mismatch“ und „DR-Mismatch“.

Ein besonderes und für die Transplantation bedeutsames Kennzeichen des MHC ist der hohe Gehalt an genetisch determiniertem Polymorphismus. Dieser ist allerdings nicht gleichmäßig über den gesamten MHC verteilt, sondern beschränkt sich vorwiegend auf die N-terminalen Domänen der HLA-Moleküle. So findet man beim Klasse I-Molekül die größte Variabilität der Aminosäuresequenz im Bereich der α_1 - und α_2 -Domäne, während sich die hochpolymorphen Abschnitte der Klasse II in der α_1 - und β_1 -Region der Moleküle befinden.

Die durch den genetischen Polymorphismus bedingte Diversität der exprimierten HLA-Moleküle macht es bei dem derzeit geringen Spenderpool sehr schwierig immunologisch passende Spenderorgane zu finden. Aus diesem Grunde wird heutzutage ein Großteil der

Transplantationen HLA-inkompatibel durchgeführt und die Auswahl des Spenders oftmals in erster Linie nach der Beschaffenheit seiner Blutgruppen-Antigene (AB0-System) getroffen.

Eine derart ungünstige immunologische Ausgangssituation mündet oftmals in einen *circulus vitiosus*: Verabreichung hoher Dosen an Immunsuppressiva mit konsekutiver schwerer Infektion des transplantierten Organes und dadurch wiederum forcierter HLA-Expression (Steinhoff et al., 1989; Milne et al., 1994; Keogh et al. 1995).

In besonderem Maße kommt dies bei Lungentransplantationen zum Ausdruck, da die Lunge *a priori* einen höheren physiologischen Besatz an HLA-Klasse II-Antigenen als andere Organe aufweist (Alwayn et al., 1994).

Eine mögliche Alternative zur unspezifischen medikamentösen Immunsuppression ist die Senkung der Immunogenität genetisch differenter Spenderorgane. In der vorliegenden Arbeit wird daher untersucht, inwieweit die Expression von HLA-Genen auf Transkriptionsebene inhibiert werden kann, um somit die antigene Reaktivität inkompatibler Spenderorgane zu senken. In jüngster Zeit wurden sogenannte Antisense-Techniken etabliert, die eine selektive Inhibition der Genexpression erlauben. Als geeignetes Mittel bietet sich dafür die katalytische Aktivität von Hammerkopf-Ribozymen (RB) an. Ribozyme sind RNA-Strukturen mit sequenzspezifischer Endoribonuklease-Aktivität, welche eine enzymähnliche Kinetik aufweisen. Als Bestandteile bestimmter Virusoide und Pflanzenviren besteht ihre biologische Funktion darin, bei der „rolling circle-Replikation“ entstandene genomische RNA-Multimere durch Selbstspaltung in Monomere umzuwandeln. Es ist möglich Ribozyme derart zu konstruieren, daß sie sich spezifisch an mRNA's anlagern, diese spalten und dadurch deren Translation verhindern (Abb.1.4) (Barinaga, 1993; Cech, 1994).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, inwieweit die Herabregulation von HLA-Genprodukten des DRB-Locus mit Hilfe von Hammerkopfribozymen in Zellkulturen möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Humane Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/Art	Nummer	HLA-Muster			
			A	B	Cw	DR
EPG 85-257P	humane GIT-Karzinomzellen	-----	n.b.	n.b.	n.b.	15/15
COS-7	African green monkey, NFB	# CRL 1651	n.b.	n.b.	n.b.	4/-

* NFB = Nierenfibroblasten; n.b.= nicht bestimmt

Bakterien

Escherichia Coli, Stamm XL1-Blue

Nukleinsäuren

Vektoren

Invitrogen BV, Leek, Niederlande

pcDNA3 (Amp^R ; G418^R); CMV-Promotor

pcDNA3Zeo (Zeo^R); CMV-Promotor

Nukleotide

DNA Polymerisation Mix

Pharmacia GmbH, Freiburg

Synthetische Oligodesoxynukleotide
(Synthesemaßstab: 0,02 µmol; hochgereinigt)

Tib Molbiol, Berlin

DNA Molekulargewichtsmarker

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

λ-DNAx Eco471 (36 DNA-Fragmente)

Antikörper

Maus-anti-HLA-DR IgG2bk
(mAK, PE-konjugiert; #Tü36)

Pharmingen GmbH, Hamburg

Maus-anti-HLA-A, B, C IgG1
(mAK, FITC-konjugiert)

Pharmingen GmbH, Hamburg

Simultest Control, # 340041

Becton Dickinson, Kalifornien

zwei kombinierte mAK:

1.) Maus-anti-IgG1, mAK, FITC-konjugiert;

2.) Maus-anti-IgG2a, mAK, PE-konjugiert

Enzyme

Alkalisch Phosphatase

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Restriktionsendonukleasen

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Pharmacia GmbH, Freiburg

RNase A

Boehringer Mannheim, Mannheim

T4-DNA-Ligase

Invitrogen BV, Leek, Niederlande

T4-Polynukleotidkinase

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Taq-Polymerase

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien**Chemikalien**

Acrylamid 38%ige Stammlösung
mit 2%N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1)

Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe

Agarose, Electrophoresis Grade

Gibco BRL GmbH, Eggenstein

Ampicillin Na₂ (Amp)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Bacto Agar

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Desoxynukleotidtriphosphate	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Formamid	International Biotechnologies, INC, New Haven Connecticut
Fötale Kälberserum (FCS)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Geneticin (G418-Sulfat)	Gibco BRL GmbH, Steinheim
Gentamycin	Amimed Produkte, Allschwil, Schweiz
HEPES	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
(N-(2-hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure))	
Interferon- γ (rekombinant; E.coli; # 331230)	Pharma Biotechnologie, Hannover
Lymphocyte Separation Medium	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Mineralöl (Light white oil; Lot.# 44H0126)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Biochemica GmbH&Co., Heidelberg
Penicillin	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Streptomycin	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Trypanblau; 0,4%ige Lösung	Serva Biochemica GmbH & Co., Heidelberg
Ultrapure Low Melting Point Agarose	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Zeozin	Invitrogen BV, Leek, Niederlande

Weitere Materialien

Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabst.)	Eurogentec, Searing, Belgien
Fluoreporter lacZ Cytometry Kit	MoBiTec, Göttingen
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Pharmacia Biotech., Freiburg

Plasmid Kits	Qiagen, Hilden
Qia Amp Blood Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
RNEasy-RNA-Präparations-Kit	Qiagen, Hilden
Strataclean Resin	Stratagene GmbH, Heidelberg
Taq Dye Desoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Well-Platten	Nunc GmbH, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc GmbH, Wiesbaden
Zellkulturschalen	Nunc GmbH, Wiesbaden

2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Medien

Zellkulturmedien

RPMT-Medium:

RPMT 1640 (Fertigmedium; 104,2g/10l) Amimed Produkt GmbH, Allschwill

100 mM HEPES
200 mM Natriumhydrogencarbonat
10 % v/v FCS (30 Minuten bei 56 °C inaktiviert und sterilfiltriert)
nach Angaben des Herstellers bearbeiten und alle vier Wochen im Wechsel die Antibiotika Penicillin/Streptomycin und Gentamycin hinzufügen

Bakterienmedien

LB-Medium, pH 7,0 (mit NaOH eingestellt):

10 g/l Bacto Tryptone
5 g/l Bacto Yeast
15 g/l Bacto Agar
10 g/l NaCl

LBL-Medium, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt):

10 g/l Bacto Tryptone
5 g/l Bacto Yeast
15 g/l Bacto Agar
5 g/l NaCl

SOC-Medium, pH 7,0 (mit NaOH eingestellt)

2,0 %	Bacto Tryptone
0,5 %	Bacto Yeast
10 mM	NaCl
25 mM	KCl
100 mM	MgCl ₂
100 mM	MgSO ₄
200 mM	Glucose

Puffer

PBS, pH 7,0:

20 mM	Hepes
137 mM	NaCl
5 mM	KCl
0,7mM	Na ₂ HPO ₄

TAE, pH 8,0 (mit Eisessig eingestellt):

40 mM	Tris
1 mM	EDTA

TE, pH 8,0 (mit HCl eingestellt):

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

Transformationspuffer (TB):

10 mM	Hepes [N-(2-Hydroxymethyl)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure]
15 mM	CaCl ₂
250 mM	KCl

Lösungen

Ampicillin-Stammlösung:

10mg/l Ampicillin-Na-Salz in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert

Endkonzentration für Bakterien: 50µg/ml in Flüssigmedium bzw. 100µg/ml im Agar

Zeozin-Stammlösung:

100mg/l Zeozinin Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert

Endkonzentration für Bakterien: 25µg/ml

Penicillin/Streptomycin-Lösung (100-fach):

10 I.U./ml Penicillin

10 mg/ml Streptomycin

Gentamycin-Lösung (200-fach):

5 mg/ml Gentamycin

2.1.4 Geräte und Computerprogramme

Geräte

Brutschrank Heraeus

Brutschrank Forma Scientific

DNA-Sequencer 373 A

Gene Pulser, Elektroporation

FACScan

Kühlzentrifuge 2K15

Mikroskop Olympus CK2

Polaroid-Kamera CU-5

Rotoren JA-10, JA-20

TRIO-PCR-Thermoblock

UV-Transilluminator TF-35M, 312 nm

UV-Transilluminator TFP 35L, 365 nm

UV/VIS Spectrometer Lambda 2

Zentrifuge Biofuge 13

Zentrifuge Megafuge 1.0

Zentrifuge Picofuge

Heraeus Christ GmbH, Osterode

Labortec Labortechnik, Göttingen

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Becton Dickenson Kalifornien, USA

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Olympus Optical Co., Hamburg

Bachofer GmbH, Reutlingen

Beckmann Instruments GmbH, München

Biometra GmbH, Göttingen

Renner GmbH, Dannstadt

Renner GmbH, Dannstadt

Perkin-Elmer, Weiterstadt

Heraeus Christ GmbH, Osterode

Heraeus Christ GmbH, Osterode

Stratagene GmbH, Heidelberg

Computerprogramme

Data Analysis, Version 1.2.0

für Macintosh

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Data Collection, Version 1.2.0

für Macintosh

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Excel Version 5.0 für Windows

Microsoft Corporation

Gene Jockey II, für Macintosh

Biosoft, Cambridge, USA

Oligo, Version 4.0; für DOS

MedProbe, Hanshaugen, Norwegen

SeqEd, Version 1.0.3

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

für Macintosh

Winmdi, Version 2.1.3

Joseph Trotter; [www.http facs scripps.edu](http://www.facs.scripps.edu)

für Windows

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung, Vitalitätsbestimmung und Konservierung eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C und mit 5 % CO₂-angereicherter, wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Dabei wird das für die jeweilige Zellreihe am besten geeignete Flüssigmedium zugesetzt und alle zwei bis drei Tage erneuert.

Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgt in Zellkulturschalen, die in verschiedenen Größen erhältlich sind. Nach Betrachtung der Zellen im Mikroskop wird je nach Wachstumsrate zwei- bis dreimal pro Woche subkultiviert. Dazu wird das Zellmedium verworfen, die Kultur mit PBS gründlich gewaschen und anschließend mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch (0,05 % Trypsin; 0,53 mM EDTA) zehn bis fünfzehn Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich vom Kulturschalenboden ablösen. Zur Inaktivierung des Trypsins wird PBS/3 % FCS hinzugegeben. Anschließend wird für sieben Minuten bei 500 x g und RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in einem geeignetem Volumen Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen ausgesät. Bei geringerer Zelldichte genügt allein ein Austausch des Mediums. Es gibt jedoch bestimmte Zellreihen, wie beispielsweise EPG 85-257P- Zellen, welche die Eigenschaft besitzen, bei zu engem Zellkontakt apoptotisch zu werden. Diese müssen ständig stark auf maximal ca. 100 Zellen pro cm² verdünnt werden.

Kultivierung von Suspensionszellen

Nicht-adhärente Zellen werden in Kulturflaschen gehalten, die es in drei verschiedenen Größen gibt: 175 cm² für 150 ml; 83 cm² für 25 ml und 24 cm² für 10 ml Medium. Dabei soll die Zelldichte 10⁶ Zellen pro ml möglichst nicht überschreiten. Nicht-adhärenenten Zellen werden zwei- bis dreimal wöchentlich subkultiviert. Durch Halbierung des verbrauchten und Zugabe einer entsprechenden Menge frischen Mediums wird sowohl die Zellzahl konstant gehalten als auch für ausreichend Nährsubstanz gesorgt. Zudem werden die Zellen im wöchentlichen Abstand durch Zentrifugation und Zugabe frischen Mediums gewaschen.

Vitalitätsbestimmung von Kulturzellen

Man bestimmt die Vitalität der Zellen durch Zugabe von einem Volumen Trypanblau-Lösung (Endkonzentration von Trypanblau: 0,2 %) zu einem Aliquot der Zellkultur. Trypanblau färbt tote Zellen blau an. Ein wichtiger Parameter für mögliche Kultivierungsfehler ist der Prozentwert toter Zellen in der Kultur. Diesen erhält man durch Auszählen des Verhältnisses toter (= angefärbter) gegenüber lebendiger Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Bei einer Rate von über 2 % toten Zellen ist ein vollständiger Austausch des Mediums und eine Zentrifugation nach oben beschriebenen Vorgehen vorzunehmen.

Konservierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Kulturzellen werden zur Konservierung pelletiert, in 1,5 ml FCS/5 % Dimethylsulfid auf Eis resuspendiert und unmittelbar danach auf -70 °C gekühlt. Je nach Zellart müssen sie bei dieser Temperatur zwei bis fünf Tage lagern um nachfolgend in flüssigen Stickstoff (-180 °C) zur Langzeitlagerung überführt zu werden.

2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation

Die Transfektion ist das Einbringen von DNA in eine Zelle. Dies ist auf unterschiedlichen Wegen möglich. Eine verbreitete Methode ist die Elektroporation (Shigekawa und Dower, 1988), bei der die Zellen für ein paar Sekunden einem definierten elektrischen Feld ausgesetzt werden. Dadurch entstehen reversibel mikroskopisch kleine Poren an einigen Stellen der Zellemembran. Konsequenz ist eine erhöhte Permeabilität der Zelle für exogene Moleküle, welche man sich bei dieser Methode zunutze macht.

Für jede Zellreihe müssen dabei spezifische Parameter wie DNA-Menge, elektrische Spannung und Kapazität in empirischen Meßreihen ermittelt werden.

Für die Elektroporation sind nur Zellen geeignet, die sich in der logarithmischen Phase ihres

Wachstums befinden, also einen Tag zuvor subkultiviert wurden. Zudem ist es wichtig unmittelbar vor der Elektroporation eine Vitalitätsbestimmung vorzunehmen. Liegt dabei die Vitalität unter 98 %, so sind die Zellen für die Elektroporation ungeeignet.

Bei 500g und RT werden die Zellen für fünf Minuten abzentrifugiert, gezählt, in PBS/5 % FCS oder in HeBS-Puffer gewaschen und dann in Kulturmedium vollständig resuspendiert. Die verwendete Zellzahl liegt zwischen 2×10^6 und 1×10^7 Zellen pro Elektroporation. Während des Zentrifugationsschrittes wird die auf Eis gelagerte Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand vorgelegt. Auch die DNA-Menge variiert je nach Protokoll zwischen 1 - 10 µg. Um Pipettierfehler zu vermeiden sollte das Volumen nicht zu gering sein. Es haben sich 10 - 20 µl bewährt. Daraufhin werden 450 µl der Zellsuspension in die Küvette überführt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit der DNA gemischt. Die Voltzahl, falls nicht durch bereits bestehende Elektroporationsprotokolle bekannt, muß zunächst durch einen Probeversuch mit variierender Spannung ermittelt werden. Als Richtwerte gelten eine elektrische Spannung von 220 - 280 Volt und eine Kapazität von 960 µF. Die während der Messung gewonnene Zeitkonstante sollte bei diesen Einstellungen etwa 18 bis 22 msec betragen. Nachdem die Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt worden sind, sollten sie innerhalb von 5 Minuten in Zellmedium aufgenommen werden.

2.2.3 Immunfluoreszenzmessung mittels Durchflußzytometrie

(Siehe auch Current Protocols: „Immunfluorescence and cell sorting; Kapitel 5)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur quantitativen und qualitativen Analyse von Zellen. Sie ist außerdem geeignet zur Bestimmung der Affinität von Antikörpern zu Zelloberflächenstrukturen. Die Messung wird mit Hilfe des FACScan (Fluorescence Activated Cell Scanner) durchgeführt. Dieses System verarbeitet Fluoreszenz- und Streulichtsignale einzelner Zellen und kann innerhalb kürzester Zeit neben Granularität und Zellgröße bis zu drei Fluoreszenzintensitäten für mehrere tausend Zellen ermitteln.

Die Immunfluoreszenzmessung kann in drei Phasen eingeteilt werden:

Zunächst erfolgt eine Vorbereitungsphase, in der die zu messenden Zellen präpariert und mit dem fluoreszenzgekoppelten Reagenz inkubiert werden. Am Ende dieser Phase liegt eine Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von 5×10^5 bis 2×10^7 Zellen pro Milliliter in einem 200 μ l großen Volumen vor.

Im zweiten Schritt findet die Analyse mit Hilfe des FACScan statt. Die Zellen passieren in einer Kapillare den Analysepunkt (Laserstrahl) des Gerätes. Die dabei eintretende Lichtstreuung ist abhängig von der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht = forward scatter) und Granularität (Rechtwinkelstreulicht = side scatter).

Die optischen Signale Rechtwinkelstreulicht, Vorwärtsstreulicht und Fluoreszenzen werden detektiert, verstärkt und gelangen über einen Analog-Digital-Wandler zum angeschlossenen Computer, wo sie verarbeitet werden.

Zuletzt erfolgt die Analyse der gesammelten Daten. Durch Auswahl der Darstellungsform „Dotplot“ erhält man ein anschauliches Abbild über die Streubreite der Zellen bezüglich der oben genannten Parameter. Diese erlaubt die Identifikation einzelner Subpopulationen sowie eine Abgrenzung („Gating“) lebendiger von toten Zellen und Zellfragmenten innerhalb des Analysates (Abb. 2.1). Eine andere Darstellungsform ist das Histogramm. Es wird in erster Linie zur Verdeutlichung gemessener Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern verwendet. Dabei ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen (Abb.2.2).

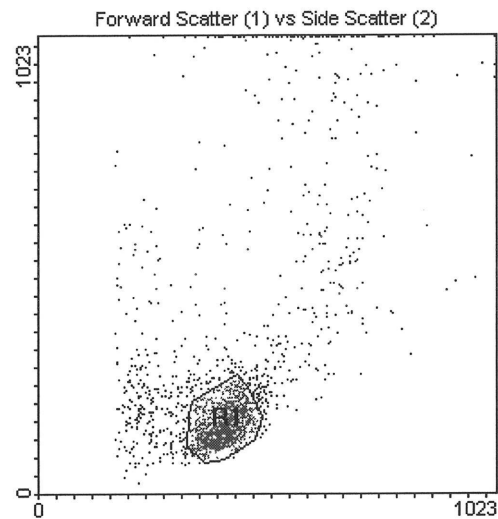


Abb. 2.1: „Gating“ der lebenden Zellen durch Bestimmung der Zellgröße und der Granularität der Zellen.

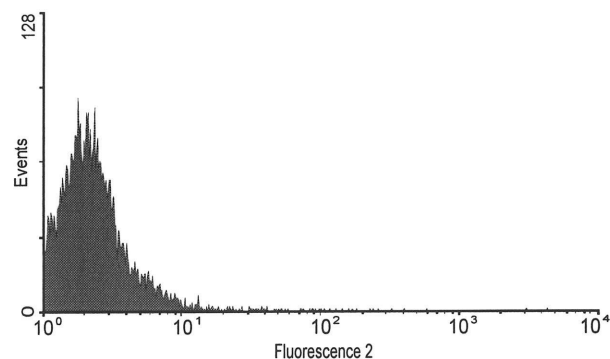


Abb.: 2.2: Darstellung der in Abb. 2.1 gegateten Zellen im FACScan-Histogramm

2.2.4 Messung der MHC-Expression eukaryotischer Zellen

Die Messung der HLA-Moleküle auf der Oberfläche von Zellen findet mit Hilfe des Durchflußzytometers statt. Dazu werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, die für die jeweilige Gruppe der zu detektierenden Oberflächenmoleküle spezifisch sind. Diese Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und können daher im FACScan nachgewiesen werden (Abb. 2.1 und 2.2).

Die zu messenden Zellen werden in einer Neubauerkammer gezählt, abzentrifugiert und mit PBS/5% FCS gewaschen. Für eine gute und zügige FACScan-Messung sind 5×10^5 Zellen vonnöten. Nach abgeschlossenem Waschvorgang werden sie in ein FACS-Röhrchen überführt und solange in PBS/3% FCS resuspendiert, bis eine Einzelzellsuspension vorliegt, deren Volumen etwa 200 μ l betragen soll. Der Resuspensionsschritt kann durch die Benutzung einer Spritze mit langer und dünner Kanüle forciert werden. Daraufhin werden die im Vorversuch austitrierten Antikörper in ihrer jeweiligen Verdünnung (Tab. 2.1) hinzugegeben. Der Ansatz wird nachfolgend für eine Stunde bei 4 °C unter Lichtausschluß inkubiert, einmal mit PBS/3% FCS gewaschen, in 200 μ l PBS-Puffer aufgenommen und bis zur FACScan-Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Antikörper reagieren während der Inkubationszeit mit dem monomorphischen Epitop der $\alpha\beta$ -Komponente des HLA-Oberflächenantigens.

Zwei wichtige Bestandteile der Messung sind folgende Negativkontrollen:

- 1.) Zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen wird eine Zellsuspension ohne Antikörperzusatz belassen und in dieser Form mitgemessen.
- 2.) Die zweite Negativkontrolle ist als Simultest Control $\gamma 1/\gamma 2$ im Handel erhältlich und besteht aus einer Kombination zweier monoklonaler Antikörper, die gegen IgG1 und IgG2a gerichtet sind (Tab. 2.1). Sie dient dazu, die Menge der nicht Antigen-spezifischen Antikörper festzustellen.

Tab. 2.1: Im FACScan verwendete fluoreszenzmarkierte Antikörper mit ihren Verdünnungen:

Antikörper:	Fluoreszenzfarbstoff:	Verdünnung:	Lot. Nr.:
Simultest Control $\gamma 1/\gamma 2$ *	FITC-/PE-konjugiert	1 : 20	# 41217
mAK gegen HLA-Klasse I *	FITC-konjugiert	1 : 20	# 6831-04
mAK gegen HLA-Klasse II *	PE-konjugiert	1 : 5	# 40992

*Alle verwendeten Antikörper wurden von der Firma Beckton Dickinson erworben

2.2.5 Messung der Transfektionseffizienz

Die Messung der Transfektionseffizienz wird als Kontrolle parallel zum eigentlichen Versuchsansatz durchgeführt. Es wird daher ein Teil der Zellen mit einem Plasmid elektroporiert, welches ein für beta-Galactosidase codierendes Reportergen enthält. Dieses Reportergen trägt den Namen *lacZ*. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit dem „Fluoreporter *lacZ* Flow Cytometry Kit“ behandelt. Dieser kennzeichnet über eine biochemische Reaktion Qualität und Quantität der Expressierung von β -Galaktosidase in den Transfektanten, die nachfolgend im FACScan gemessen werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode (Inoue et al., 1991) stellt eine Modifikation der von Hanahan 1983 publizierten Transformationstechnik dar. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transformation von *Escherichia coli* sind

- a) das Vorliegen einer Reinkultur sowie
- b) ein transformationskompetenter Zustand der Bakterien.

Zu a): Herstellung einer Bakterienreinkultur:

Eine Bakterienkultur wird auf einem Agar-Nährboden ausgestrichen und bei 37 °C ÜN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird eine weitere Agar-Platte mit einer der gewachsenen Einzelkolonien beimpft. Nach ÜN-Inkubation bei 37 °C liegt eine Reinkultur vor, die bis zu vier Wochen bei 4 °C im Kühlschrank lagern kann. Eine Langzeitlagerung ist nur in Form einer Glycerinkultur bei -80 °C möglich. Diese wird durch Mischung einer Flüssigreinkultur mit einem Volumen einer 87%igen Glycerinlösung (Endkonzentration: 30-40%) hergestellt (Sambrook et al 1989).

Zu b): Herstellung transformationskompetenter Zellen:

Nach fraktionierter Inokulation einer LB-Agarplatte mit einer Bakterienkolonie und ÜN-Inkubation bei 37 °C, werden 10-12 große Kolonien in 250 ml SOC-Medium angeimpft und bei 18 °C im Schüttelinkubator unter heftigem Schütteln (350 rpm) inkubiert. Dieser Vorgang wird solange durchgeführt, bis die photometrisch bestimmte optische Dichte des Flüssigmediums bei einer Wellenlänge von 600nm (OD_{600}) einen Betrag von 0,6 erreicht. Danach wird die Kultur zehn Minuten auf Eis gestellt, gefolgt von einem ebenfalls zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 2500 x g. Dieses Vorgehen wird nach vorsichtiger Resuspension des Pellets in 80 ml egekühltem Transformationspuffer (TB) wiederholt. Nachfolgend wird erneut in 20 ml TB resuspendiert. Im nächsten Schritt wird unter ständigem Rühren tropfenweise DMSO (Dimethylsulfoxid) bis zu einer

Endkonzentration von 7 % zugegeben. Im Anschluß an eine weitere zehnminütige Eiskubation werden 1-2 ml Aliquots in Nunc-Zellkulturröhrchen abgefüllt und unmittelbar danach in -80 bis -180 °C eingefroren.

Für die Transformation werden zunächst die kompetenten Zellen bei RT aufgetaut, in Aliquots mit einem Volumen von 200µl aufgeteilt und auf Eis gestellt. Danach wird etwa 1 ng DNA in einem Volumen von 10 bis 50 µl hinzugegeben und mit den Bakterien durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nachfolgend wird der Ansatz für exakt 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert und anschließend wieder auf Eis gestellt. Daraufhin werden 0,8 ml SOC-Medium hinzugegeben und eine einstündige Schüttelinkubation bei 37 °C vorgenommen. Zum Schluß werden die transformierten Zellen auf einem Selektionsmedium-haltigen LB-Agar (z.B. LB-Amp.: 100µg Ampicillin / ml LB-Flüssigmedium) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmid-Präparationen wurden mit Hilfe von Plasmid-Präparations-Kits der Firma Quiagen durchgeführt, die auf alkalischer Lyse der Zellen beruhen (Sambrock et al., 1989) und hochreine DNA liefern. Aus einer ÜN-Bakterienkultur wird die DNA gewonnen und in TE (für Konservierungszwecke) oder Millipore-Wasser (für Sequenzierung) gelöst. Zur Kontrolle wird mit einem Teil (1 ng) der gewonnenen DNA eine Restriktionsspaltung durchgeführt.

2.3.3 Restriktionsverdau zur Analytik isolierter DNA

Durch Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen an spezifischen Basensequenzen erhält man definierete DNA-Fragmente. Diese können in der Agarose-Gelelektrophorese (AGE) ihrer Größe nach aufgetrennt und somit charakterisiert werden.

Die handelsüblichen Restriktionsprotokolle (Sambrook et al.) basieren zumeist auf der Verwendung von 50 ng DNA (Menge ist aber abhängig von der Größe des Plasmids und des Restriktionsproduktes), 1 bis 10 U des entsprechenden Enzyms (maximal 1/10 des Volumens), 1/10 eines von der Wahl der Endonukleasen abhängigen, zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 20 µl. Manche Restriktionsansätze erfordern die Zugabe von acetyliertem BSA in einer Konzentration von 100 µg/µl.

2.3.4 Restriktionsverdau für präparative Zwecke (Vektorklonierung)

Als etablierte molekularbiologische Methode findet die Restriktionsspaltung neben analytischen auch für präparative Zwecke Gebrauch. Bei der Vektorklonierung werden nach erfolgter Spaltung die DNA-Fragmente in einem LMP-Agarosegel (LMP = Low Melting Point Agarose) elektrophoretisch aufgetrennt. Nachfolgend werden die entstandenen Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten.

2.3.5 Auftrennung von DNA-Molekülen mittels Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (AGE) ist es möglich, ein Gemisch unterschiedlich großer dsDNA-Moleküle in einer Größenordnung von 0,1 bis 20 kb zu separieren. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wird dafür ein 1 bis 3 %iges Agarosegel gegossen und noch im flüssigen Zustand mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Dieses lagert sich zwischen den beiden Einzelsträngen der dsDNA ein. Die Eigenschaft von Ethidiumbromid, bei UV-Licht-Exposition zu fluoreszieren, macht sowohl den Nachweis als auch die Trennung von DNA-Molekülen auf einem UV-Transilluminator möglich. Eine Laufzeit des Agarosegels

von etwa einer Stunde bei einer Spannung von 7 Volt pro cm ist ausreichend. Es ist wichtig zu beachten, daß bei analytischer und präparativer Elektrophorese jeweils unterschiedliche Puffersysteme sowie Agarosesorten verwendet werden müssen.

(Siehe auch Sambrook et al. in Molecular Cloning - Laboratory manual).

Tab. 2.2: Verwendete Agarose und Puffer

Elektrophoreseart:	Analytische AGE	Präparative AGE
Puffersystem:	TBE-Puffer	TAE-Puffer
Agarosesorte:	Elektrophoreses Grade-Agarose	Low Melting Point-Agarose (LMP)

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

(Siehe auch Sambrook et al. in Molecular Cloning - Laboratory manual)

Die Ligation ist ein elementarer Schritt innerhalb der molekularbiologischen Klonierung. Für die Klonierung werden zunächst sowohl die DNA-Fragmente als auch die Vektoren mit Hilfe von Restriktionsenzymen an geeigneten Sequenzen derart gespalten, daß komplementäre Basenüberhänge entstehen. An diesen sogenannten „overlaps“ findet nachfolgend mit Hilfe der T4-Ligase die Ligation zwischen linearisiertem Vektor und Insert statt. Die im Folgenden angegebenen Mengen und Verhältnisse sind für die Durchführung einer Ligation geeignet, wobei in erster Linie die unterstrichenen Angaben anzustreben sind:

a) molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert: 1 : 10 bis 1 : 50

(bei einer Insert-Größe von 50-200 Basenpaaren).

b) Gesamtvolumen des Ansatzes : 20µl bis 30 µl.

c) Gesamtmenge eingesetzter DNA : 20ng bis 80 ng.

Hinzu kommen 2 Units pro 10 µl T4-Ligase und 1/10 Volumen eines 10fach konzentrierten Ligase-Puffers. Da Vektor und Insert nach der Spaltung in fester Phase (LMP-Agarose) vorliegen, muß diese zwecks Pipettierbarkeit zunächst für 5 Minuten bei 65 °C verflüssigt werden. Die Ligationsreaktion findet bei 14°C über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden statt.

2.3.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation eines ausgewählten Abschnitts eines DNA-Moleküls.

Die PCR findet in der vorliegenden Arbeit Verwendung für:

- a) Amplifikation von DNA für Klonierungen
- b) Herstellung von dsDNA-Fragmenten für die Sequenzierung
- c) Feststellung der molekularen Nachweisgrenze für Plasmid-DNA
- d) Nachweis von DNA aus Kulturzellen
- e) Nachweis von RNA aus Kulturzellen (RT-PCR)

Zusammensetzung eines 20 µl-Ansatzes:

1/10 Vol.	10fach konzentrierter Reaktionspuffer (Boehringer, Mannheim)
200 µM	dNTP (je Nukleotid)
0,5 µM	5' Primer
0,5 µM	3' Primer
1 U	Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim)
5-10 ng	Template (zu amplifizierende DNA)

Das Gesamtvolumen beträgt normalerweise 20 µl und wird gegebenenfalls mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Als Kondensationsschutz werden schließlich zwei Tropfen (50 µl) Mineralöl auf die einzelnen Ansätze gegeben. Die Proben werden auf Eis pipettiert und bis zum Denaturierungsschritt dort belassen.

Tab.2.4: Temperatur-/Zeit-Profil der PCR:

PCR-SCHRITT:	TEMPERATUR:	ZEIT:
1.) Denaturierung der Template- DNA	95 °C	180 Sek.
2.) Denaturierung der Template-DNA	95 °C	60 Sek.
3.) Hybridisierung	5 °C unter T _m *	60 Sek.
4.) Polymerisation	72 °C	60 Sek.
5.) Herabkühlung	4 °C	bis zur Weiterverarbeitung

Der Pfeil illustriert den Verlauf der Zyklen in der PCR (Anzahl der Zyklen : 30 bis 40)

*Die Hybridisierungstemperatur wird in der Regel nach folgender Formeln errechnet:

1.) $T_m(^{\circ}\text{C}) = (\text{Summe der GC-Paare}) \times 4 + (\text{Summe der AT-Paare}) \times 2 \text{ in } ^{\circ}\text{C} \text{ minus } 5^{\circ}\text{C}.$

2.3.8 Nachweis von Plasmid-DNA aus Kulturzellen mittels PCR

Der Nachweis von Plasmid-DNA aus stabilen Transfektanten setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen. Zunächst werden 1×10^6 Kulturzellen nach gründlichem Waschvorgang lysiert und der „Zellschutt“ in einem Eppendorf-Tube abzentrifugiert, um aus der oberen Phase des Zentrifugates die DNA zu gewinnen. Im zweiten Schritt findet die PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA statt.

Bezüglich des ersten Teilschrittes werden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Methoden verwendet:

- 1.) DNA-Präparation aus den Kulturzellen mittels Qia Amp Blood Kit der Firma Qiagen, Hilden.
- 2.) Aufspaltung der Kulturzellen mittels Hitze-Kälte-Wechselinkubation und Proteinase K:
Bei diesem Verfahren werden die Kulturzellen in einminütigem Abstand alternierend 100°C und -80°C ausgesetzt. Diese Wechselbäder werden jeweils zweimal wiederholt. Nachfolgend wird der Ansatz mit 1/10 Volumen Proteinase K versetzt und für eine Stunde bei 56°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit Strataclean nach Angaben des Herstellers gereinigt und bei 18000 g Umdrehungszahl zentrifugiert.

2.3.9 Nachweis von Ribozym-RNA aus Kulturzellen mittels RT-PCR

Um den Nachweis von Ribozym-RNA in stabilen Transfektanten durchzuführen, wird zunächst mit Hilfe eines RNA-Isolations-Kits (Firma Quiagen, Hilden) für eukaryontische Zellen die gesamte RNA extrahiert. Im folgenden Schritt werden 1 bis 5 μg der gewonnenen RNA als Template für eine first-strand cDNA-Synthese eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes beträgt 20 μl und enthält neben der RNA, die vor Verwendung erhitzt werden muß, 7 μl eines Reaktionsmixes, 200 mM DTT-Lösung und 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ des cDNA-Primers pd(N)₆. Das Restvolumen wird mit Milipore-Wasser aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird nachfolgend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach abgelaufener Reaktion werden aus dem Ansatz 2 μl für die anschließende PCR entnommen. Jeder Nachweis schließt eine Positivkontrolle mit β -Aktin-Primern ein.

2.3.10 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung ist eine wichtige molekularbiologische Methode, mit der die genaue Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Abschnitt bestimmt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird die Sequenzierung zur Analyse von Nukleotidsequenzen klonierter Plasmide eingesetzt. Die hier angewendete, von der Firma ABI-Perkin Elmer entwickelte nichtradioaktive Sequenzierungsmethode (Hradetzky et al., 1992) beruht auf dem Didesoxy- bzw. Kettenabbruch-Prinzip nach Sanger et al., (1977).

Sie wird mit Hilfe des ABI PRISM Taq - Dye Terminator Cycle Sequencing Kits der Firma Perkin Elmer nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gemessenen Fluoreszenzfarben werden über einen angeschlossenen Computer in DNA-Sequenzen übersetzt und in übersichtlicher Form ausgedruckt (s. Anhang).

3 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

3.1 Merkmale zum Entwurf von Hammerkopf-Ribozymen

Die Bezeichnung „Hammerkopf-Ribozym“ ist abgeleitet von der molekularen Struktur, welche das Ribozym mit seinem Substrat ausbildet. Das Ribozym besteht aus drei über Basenpaarung verbundenen Nukleotid-Stämmen und einem Kern hochkonservierter, nicht-komplementärer Nukleotide, welcher sich aus zwei Domänen zusammensetzt. Die erste Domäne schließt sich an den ersten der drei Stämme an und besteht aus der Sequenzfolge 5'-CUGA. Die zweite Domäne bildet ein drei Basenpaare langes nicht-komplementäres Duplex. Die Stämme I und III tragen die zur Zielsequenz der mRNA komplementären Ribonukleotidabschnitte (Pley und McKay, 1994). Bei Anlagerung des Ribozyms an sein Substrat bilden sowohl die zwei komplementären Abschnitte als auch der konservierte Bereich eine Helix aus. Daraus ergibt sich eine hammerkopffähnliche Struktur (siehe Abb. 3.2) (Cech und Uhlenbeck, 1994).

Eine charakteristische Eigenschaft der Ribozyme ist deren enzymähnliche Kinetik. Sie binden sich über Basenpaarung an ihre Ziel-RNA, katalysieren deren irreversible Spaltung und dissoziieren nachfolgend ab, um wieder für weitere Zyklen dieser Art verfügbar zu sein (Abb. 3.1) (Barinaga, 1993).

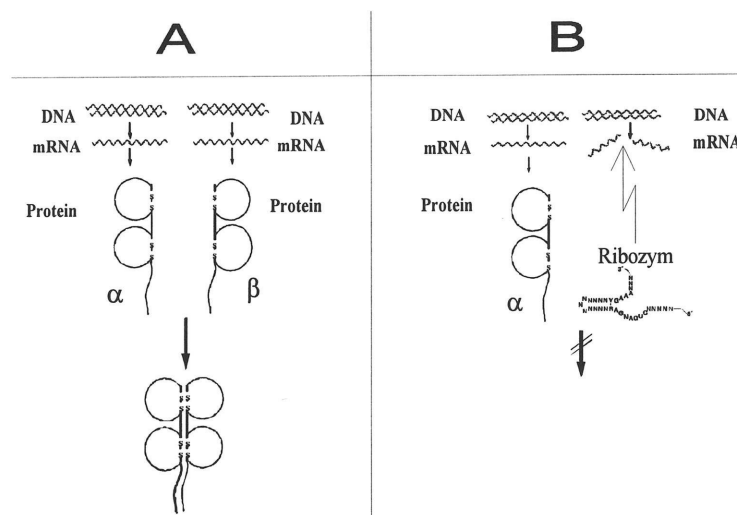


Abb.3.1: A zeigt schematisch den normalen Verlauf der Biosynthese der MHC-Klasse II-Moleküle. In B ist die Hemmung der Biosynthese durch Verwendung eines Ribozyms dargestellt: Das Ribozym spaltet spezifisch die für die β-Kette kodierende mRNA.

Basierend auf den Ergebnissen von Untersuchungen mit Hammerhead-Ribozymen konnte ein allgemein gültiges Strukturmodell definiert werden. Dabei ist die Triplettssequenz „NUM“ innerhalb der Target-RNA zwingende Voraussetzung einer effizienten Spaltung durch das Ribozym (Ruffner et al., 1990; Symons, 1992).

N steht hierbei für die Basen Guanin und Adenin, jedoch auch für Uracil und Cytosin, wobei die Effizienz der Spaltung bei Vorhandensein der beiden letztgenannten Basen geringer ist.

U steht für die Base Uracil.

M steht für Cytosin und Adenin, bei Inkaufnahme einer geringeren Spaltungseffizienz jedoch auch für Uracil.

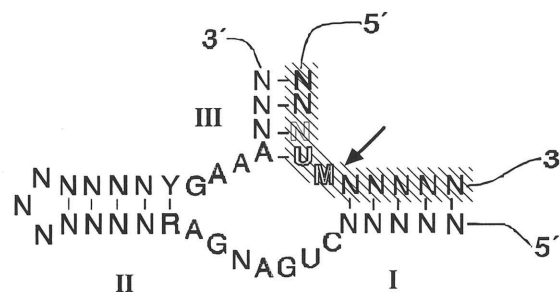


Abb. 3.2: Assoziation zwischen Ribozym und Substrat über Basenpaarung. Der Pfeil markiert die Spaltstelle innerhalb der (schraffiert unterlegten) m-RNA. Die Helices I und II des Ribozyms entstehen durch Basenpaarung mit der Zielsequenz. Die Helix III entsteht durch intramolekulare Basenpaarung des Ribozyms.

Beim Entwurf der Hammerhead-Ribozyme wurde darauf geachtet, daß die Sequenzen der etwa 6 bis 12 Nukleotide langen Stämme I und III zu ihrem Target komplementär sind.

Außerdem mußten Basenpaare zwischen dem Dinukleotid „NU“ der Ziel-RNA und dem Ribozym ausgebildet sein, während das Nukleotid „M“ in unpaarer Form vorliegen mußte.

3.2 Auswahl der Target-Sequenzen

Ribozyme können chemisch hergestellt werden. Für den Einsatz in Zellkultur eignet sich jedoch auch das Einbringen Ribozym-kodierender DNA in Kombination mit einem geeigneten Promotor in die Zelle. Hierfür erweist es sich als vorteilhaft, Plasmide zu verwenden, die neben der Ribozym-kodierenden DNA auch Antibiotika-Resistenz vermittelnde Sequenzen enthalten. Dadurch werden bei Zugabe des Antibiotikums in die

Zellkultur allein diejenigen Zellen selektiert, welche das Plasmid und damit auch das Ribozym tragen.

Es gibt eine Reihe von Gründen, weshalb die HLA-DRB-Allele zur Herabregulation ausgewählt wurden:

- 1.) Unter den für die Transplantation interessanten HLA-Allelen ist die Polymorphie der HLA-DRB-Allele am größten. So gibt es in der kaukasischen Bevölkerung 143 bekannte HLA-DRB-Allele, dagegen nur 59 HLA-A- oder 118 HLA-B-Allele (Rossi, 1995).
- 2.) Durch verschiedene Vorarbeiten sind die Sequenzen der polymorphen mRNA-Bereiche bereits bekannt. (March & Bodmer, 1991).
- 3.) Wie schon angesprochen, ist die Immunogenität der HLA-DR-Moleküle am größten.
- 4.) Allein die Allele DRB1*01--, DRB1*02-- (= DRB1*15-- und DRB1*16--), DRB1*03-- und DRB1*04-- machen einen Anteil von 70 % aller in der kaukasischen Bevölkerung vorkommenden DRB-Allele aus (siehe Tab.1.1) (March und Bodmer, 1991).
- 5.) Bei *in vitro*-Versuchen konnten bereits gezeigt werden, daß Hammerkopf-Ribozyme mit Spezifität für DRB1*01--, DRB1*15--, DRB1*16--, DRB1*03-- und DRB1*04 funktionstüchtig sind und ihr Substrat spezifisch spalten. (Krupp et al., 1995)

Tabelle 3.1: Auflistung in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommender DR-Serotypen:

HLA Allele	HLA Serologie	HLA Allele	HLA Serologie	HLA Allele	HLA Serologie
DRB1*0101	DR 1	DRB1*03012	DR 17(3)	DRB1*0411	DR 4
DRB1*0102	DR 1	DRB1*0302	DR 18(3)	DRB1*0412	DR 4
DRB1*0103	DR103	DRB1*0303	DR 18(3)	DRB1*0413	DR 4
DRB1*0104	DR 1	DRB1*0304	DR 18(3)	DRB1*0414	DR 4
DRB1*1501	DR 15(2)	DRB1*0305	DR 18(3)	DRB1*0415	DR 4
DRB1*15021	DR 15(2)	DRB1*0401	DR 4	DRB1*0416	DR 4
DRB1*15022	DR 15(2)	DRB1*0402	DR 4	DRB1*0417	DR 4
DRB1*1503	DR 15(2)	DRB1*0403	DR 4	DRB1*0418	DR 4
DRB1*1504	DR 15(2)	DRB1*0404	DR 4	DRB1*0419	DR 4
DRB1*1601	DR 16(2)	DRB1*0405	DR 4	DRB1*0420	DR 4
DRB1*1602	DR 16(2)	DRB1*0406	DR 4	DRB1*0421	DR 4
DRB1*1603	-	DRB1*0407	DR 4	DRB1*0422	DR 4
DRB1*1604	DR 16(2)	DRB1*0408	DR 4		
DRB1*1605	-	DRB1*0409	DR 4		
DRB1*1606	DR 16(2)	DRB1*0410	DR 4		

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hammerkopf-Ribozyme (RB) richten sich gegen die mRNA's, welche

- 1.) von den Allelen DRB1*04--kodierte werden. Diese Ribozyme tragen das Kürzel RB4.
- 2.) von den Allelen DRB1*01--, DRB1*02--und DRB1*04--kodierte werden. Diese Ribozyme werden RB124 abgekürzt.
- 3.) Ein weiteres verwendetes Ribozym richtet sich gegen nahezu alle kodierten mRNA's der zur Zeit bekannten DRB1*--Allele (DRB1*01--bis DRB1*09--). Diese Ribozyme tragen die Abkürzung DRBall.

Eine besondere Form der Ribozyme sind die sogenannten „self-cleaver“, d.h. selbstspaltende Hammerkopf-Ribozyme (SCR). Sie besitzen als besondere Eigenschaft am 5'-Ende ihrer Sequenz eine interne Spaltstelle, welche ihnen die thermodynamische Selbstspaltung in ein kurzes und ein langes RNA-Molekül ermöglicht. Sie sollen eine höhere Effektivität als die einfachen Hammerkopf-Ribozymen besitzen (Ventura et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit finden die selbstspaltenden Ribozyme mit der Spezifität gegen DRB1*04-- (SCR4)- und DRB1*01--,DRB1*15--,DRB1*16,DRB1*04-- (SCR124) Verwendung.

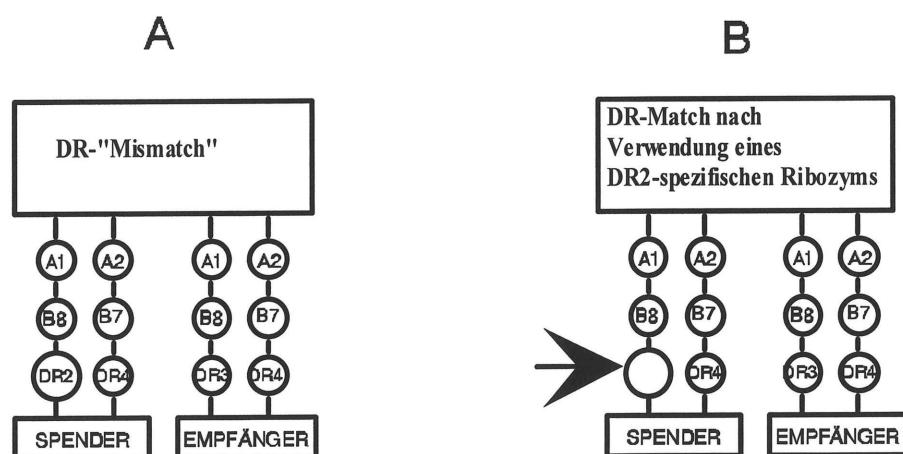


Abb. 3.3: Teil A zeigt schematisch eine Differenz der HLA DR-Genloci zwischen Spender und Empfänger (DR-Mismatch)

In Teil B kann durch Verwendung eines HLA-DR2-spezifischen Ribozyms (Pfeil) das inkompatible HLA-DR-Molekül nicht mehr gebildet werden wodurch die Immunogenität des Spenderorgans gesenkt wird.

3.3 Klonierung der Ribozym-kodierenden DNAs

Um einer möglichen, durch spezifische Herabregulation eines bestimmten HLA-DRB-Genproduktes induzierten Hochregulation der Expression anderer HLA-DRB-Allele entgegenwirken zu können, wurde ein Ribozym-kodierendes Plasmid entworfen, dessen Transkript spezifisch die mRNAs aller bekannten HLA-DRB-Allele spaltet. Dafür wurde zunächst aus allen humanen HLA-DRB-Sequenzen eine geeignete Sequenzfolge ausgewählt. Diese mußte möglichst eine sich über alle bekannten HLA-DRB-Allele erstreckende identische Sequenzfolge mit einer Länge von etwa 20 Basen und mittig das für eine NUM Sequenz der mRNA kodierende Triplet besitzen.

Ein solcher Bereich befindet sich zwischen den jeweils 237sten und 256sten Basenpaaren nahezu aller bisher bekannten humanen HLA-DRB-Allele (Abb. 3.4).

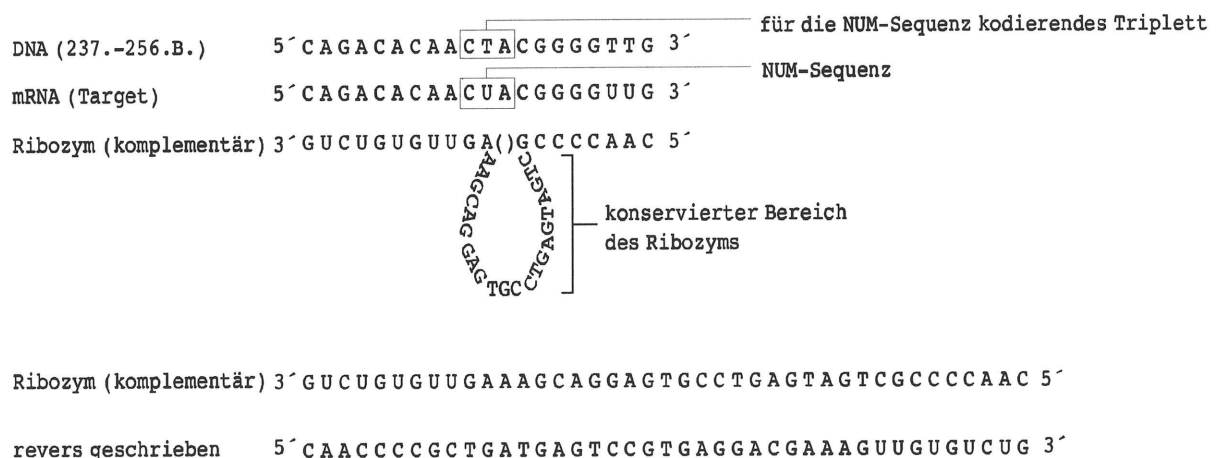


Abb. 3.4: Die Abbildung zeigt diejenige Sequenzfolge, welche als einzige bei nahezu allen humanen HLA-DRB-Genen vorkommt. Voraussetzung für eine effiziente Spaltung durch ein Hammerkopf-Ribozym ist eine mittig im Target gelegene NUM-Sequenz. Das Ribozym muß außerdem zum Target komplementär sein, um sich über Basenpaarung binden zu können.

Zur Herstellung des Ribozym-kodierenden DNA-Abschnitts wurden zwei chemisch synthetisierte Oligodesoxynukleotide verwendet, welche die Namen RBalls (= sense) bzw. RBallas (= antisense) tragen. (Sequenzen: siehe Anhang)

RBalls enthält 34 Basenpaare der zum Ribozym reversen Sequenz, während RBallas 38 Basenpaare der zum Ribozym reversen und komplementären Sequenz besitzt.

Die Oligodesoxynukleotide wurden in einer modifizierten PCR, welche einer zyklischen Auffüllreaktion entspricht, zur Synthese der Ribozym-kodierenden doppelsträngigen DNA eingesetzt. Die jeweils 17 Basenpaare am 3'-Ende der beiden Oligodesoxynukleotide sind komplementär zueinander, so daß sie in der Auffüllreaktion zum Doppelstrang komplettiert werden können (Abb.3.5).

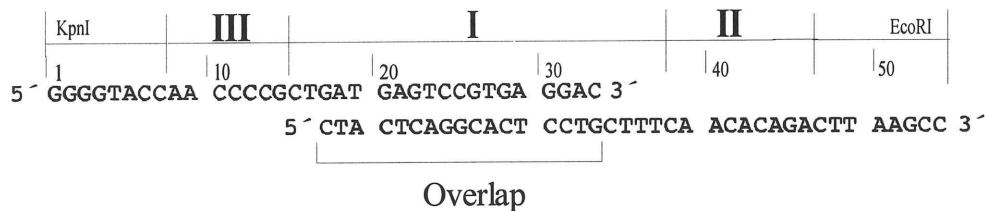


Abb 3.5: Hybridisierung der Desoxynukleotide RBalls (= sense) und RBallas (= antisense) zu einem gegen nahezu alle HLA-DRB-Allele gerichteten Ribozym-kodierenden DNA-Abschnitt. Die beiden sich überlappenden Oligodesoxynukleotide werden in einer PCR zum Doppelstrang aufgefüllt.

(I, II und III entsprechen der Beschreibung in Abb. 3.2)

Der überlappende Bereich („overlap“) der beiden Oligodesoxyribonukleotide ist besonders stabil, wenn er beidseitig mit einem Guanin-Cytosin-Paar endet. Die Annealing-Temperatur (=Tm) wurde unter Berücksichtigung der beiden folgenden Formeln berechnet:

- 1.) Tm (thermodynamisch): Bewertung der Nachbarschaftseigenschaften von Basenpaaren mit thermodynamischen Enthalpiegrößen (Breslauer et al., PNAS 83, 3746-3750, 1986)
- 2.) Tm (2°+4°)-Regel, eine empirische Formel, welche die Anzahl der A/T- und der C/G-Basen berücksichtigt: $T_m = 2\text{ °C} \times [\text{Anzahl (A,T)}] + 4\text{ °C} \times [\text{Anzahl (C,G)}]$

Für die Klonierung der dsDNA in die beiden Vektoren pcDNA3 und pcDNA3Zeo sind Spaltstellen für Restriktionsenzyme notwendig. Das Oligodesoxynukleotid RBalls besitzt aus diesem Grund am 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Kpn* I, während das Oligodesoxynukleotid RBallas am 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Eco*RI vorweist.

Die Auffüllreaktion wurde bei einer errechneten Annealingtemperatur von 49 °C mit 11 Zyklen (siehe Pfeil) durchgeführt. Der Polymerisationsschritt erfolgte dabei für 30 Sekunden.

Temperatur-/Zeit-Profil der modifizierten PCR:

PCR-SCHRITT:	TEMPERATUR:	ZEIT:
1.) Denaturierungsschritt	95 °C	180 Sekunden
2.) Denaturierungsschritt	95 °C	60 Sekunden
3.) Hybridisierung	49 °C	60 Sekunden
4.) Polymerisation	72 °C	30 Sekunden
5.) Herabkühlung	4 °C	bis zur Weiterverarbeitung

Im Anschluß an die PCR erfolgte die Reinigung der dsDNA nach Angaben des Herstellers mittels Strataclean und Ethanolpräzipitation. Daraufhin wurde eine ÜN-Spaltung sowohl der Reaktionsprodukte als auch der oben genannten Vektoren mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRI* vorgenommen. In einer präparativen Agarosegelelektrophorese wurden Vektoren und Inserts zunächst aufgetrennt und die Banden auf einem UV-Transilluminator herausgeschnitten. In der darauffolgenden Ligation wurden die Inserts in die Vektoren pcDNA 3 und pcDNA 3 Zeo kloniert (Abb.3.6 und 3.7).

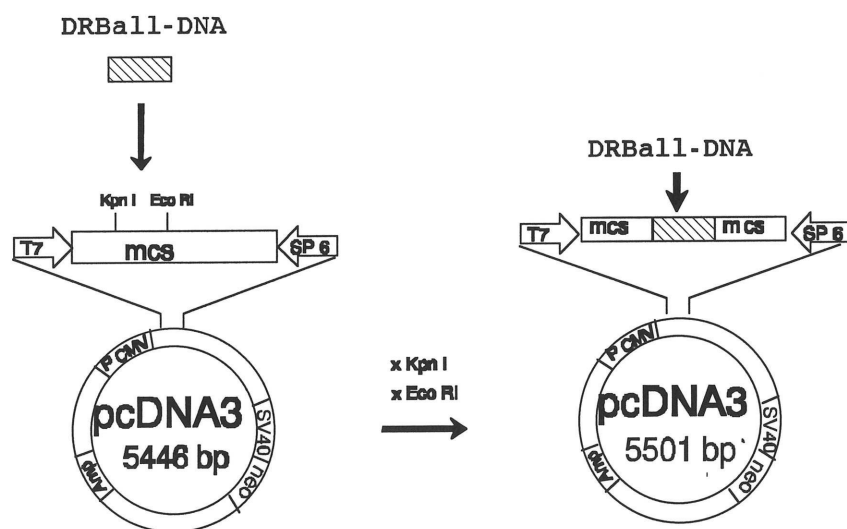


Abb. 3.6: Dargestellt ist die Klonierung der Ribozym-kodierenden DNA in den Vektor pcDNA3. Das Plasmid ist 5446 Basenpaare groß, besitzt einen CMV-Promotor und eine „multiple cloning site“ (mcs), welche die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *KpnI* enthält. Außerdem besitzt das Plasmid die Geneticin (G418)-Resistenz-vermittelnde *neo^R* Region. Zunächst werden sowohl Vektor als auch die Ribozym-kodierende DNA (= Insert) an den Restriktionsschnittstellen gespalten. Danach erfolgt die Verbindung (= Ligation). Am Ende ist die Ribozym-kodierende Sequenz Bestandteil des Plasmids.

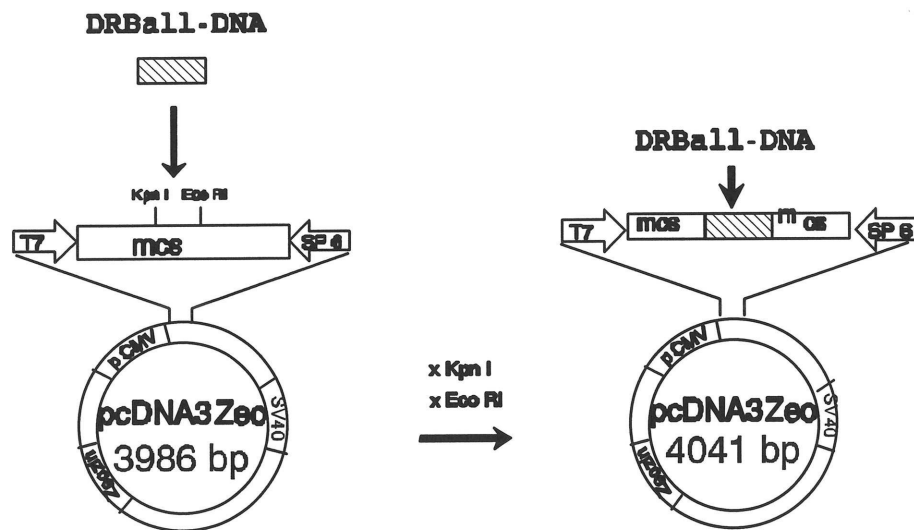


Abb.3.5: Klonierung der Ribozym-kodierenden DNA in den Vektor pcDNA3Zeo.

Der Vektor ist 3986 bp groß und besitzt ein Zeozin-Resistenz-Gen.

Die für die Klonierung benötigten Restriktionsendonukleasen sind, wie bei pcDNA3, ebenfalls *EcoRI* und *KpnI*.

In der vorliegenden Arbeit sind zusätzlich noch die Ribozyme RB4, RB124, SCR4 und SCR124 verwendet worden, welche bezüglich ihrer Spaltungseffizienz bereits *in vitro* durch Krupp et al. am Institut für Mikrobiologie der Universität Kiel erfolgreich getestet wurden. Sie sind in einer Vorarbeit in den Vektor pcDNA3 kloniert worden.

3.4 Transformation der Ribozym-DNAs

Zur Vermehrung der DNAs wurde anschließend eine Transformation durchgeführt. Die dafür verwendete Methode (Inoue et al., 1991) stellt eine Modifikation der Transformationstechnik von Hanahan (1983) dar. Zur genauen Analyse der Klonierungen wurden jeweils drei Ribozym-enthaltende Klone sequenziert.

3.5 Sequenzierung der Ribozym-DNAs

Die hier angewendete, von der Firma ABI-Perkin Elmer entwickelte nichtradioaktive Sequenzierungsmethode (Hradetzky et al., 1992) beruht auf dem Didesoxy- bzw. Kettenabbruch-Prinzip nach Sanger et al., (1977). Sie wird mit Hilfe des ABI PRISM Taq - Dye Terminator Cycle Sequencing Kits der Firma Perkin Elmer in einem ABI 373 - Sequenzer nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technik ist eine exakte Bestimmung sowohl der Nukleotidsequenzen als auch der Orientierung der Inserts in den Vektoren möglich. Diese Kontroll-Sequenzierung ist obligat, da ein einziger Basenaustausch innerhalb der Ribozym-codierenden Sequenz die Funktion der transkribierten Ribozyme beeinträchtigen würde. Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem Primer T7 bzw. Sp6 durchgeführt. (Temperatur-/Zeit-Profil, siehe Material und Methoden).

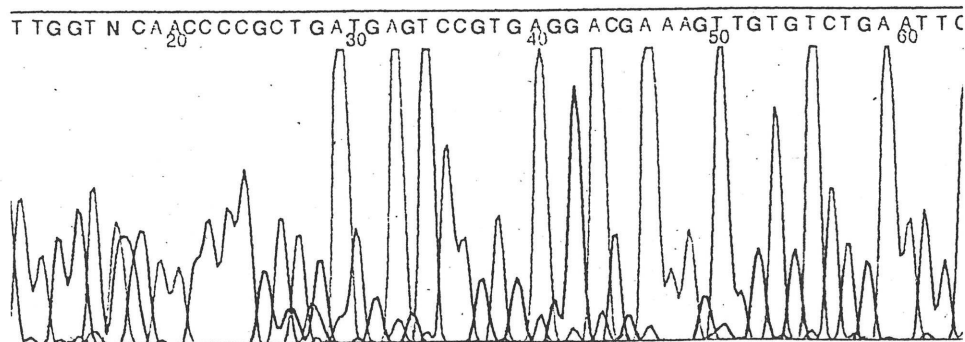
Aus der Sequenzanalyse ergab sich für jede der beiden Klonierungen mindestens ein Klon mit korrekter Sequenzfolge. Die folgende Abbildung zeigt den Ausschnitt der Ribozym-codierenden Sequenz der jeweils positiven Klone beider Klonierungen mit den Namen:

A) pcDNA3DRBall und

B) pcDNA3Zeo DRBall

(siehe auch Anhang A).

A



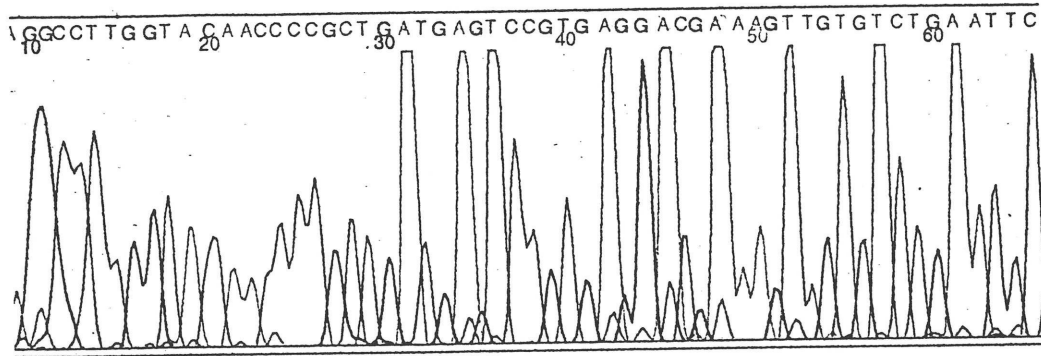
B

Abb. 3.6: Ausschnitt der Ribozym-kodierenden Sequenz der jeweils positiven Klone beider Klonierungen:

A) pcDNA3DRBall

B) pcDNA3ZeoDRBall

3.6 Transfektionen und FACScan-Analysen

In den folgenden Experimenten wurden sowohl pcDNA3DRBall und pcDNA3ZeoDRBall als auch die Vektoren pcDNA3RB4, -RB124, -SCR4, -SCR124 zur Transfektion eukaryotischer Zellen eingesetzt.

Die Transfektionen wurden mit zwei ausgewählten eukaryotischen Zell-Linien (COS-7 und EPG 85-257P) durchgeführt, welche folgende Kriterien erfüllen mußten:

- 1.) einfache Kultivierbarkeit in einem gängigen Kulturmedium
- 2.) gute Transfizierbarkeit
- 3.) natürliche oder mit γ -Interferon stimulierbare HLA-DRB-Expression, welche Voraussetzung für deren Herabregulierbarkeit ist.
- 4.) bestimmter DR-Genotyp, d.h.: HLA DRB1*01--, DRB1*02-- (= DRB1*15-- und DRB1*16--), DRB1*03-- und DRB1*04--, da die verwendeten Ribozyme RB4 und RB124 bzw. SCR4 und SCR124 gegen die mRNAs dieser Genotypen gerichtet sind.

COS-7 Zellen sind SV 40-transformierte, fibroblastenähnliche Nierenzellen des African green monkey. Sie konnten mit DR-spezifischen Primern für humane Zellen typisiert werden und sind DR4 homozygot. Eine anschließende Sequenzierung offenbarte eine der humanen entsprechende Zielsequenz für die verwendeten Ribozyme.

Die zweite verwendete Zell-Linie sind die EPG 85-257P-Zellen welche einem humanen gastrointestinalen Karzinom entstammen; (Eppendorf, 1985, Linie # 257, gastrointestinal). Sie sind homozygot HLA-DR-15 (2).

3.6.1 Messung der MHC-Expression untransfizierter Zellen

Bevor die ausgewählten Zell-Linien mit dem Ribozym-kodierenden Plasmid transfiziert und hinsichtlich des Einflusses auf die HLA-DR-Expression gemessen wurden, ist zunächst eine FACScan-Messung mit unbehandelten Zellen durchgeführt worden. Eine derartige Messung ist zum einen notwendig, um einen Vergleichswert für den später erhobenen Versuchsmeßwert zu erhalten, zum anderen ist sie wichtig, um feststellen zu können, ob die ausgewählten Zellen überhaupt eine natürliche HLA-Klasse II-Expression aufweisen.

Außerdem wurden die MHC-Klasse I-Moleküle der ausgewählten Zell-Linien gemessen, da deren Expression bei späteren Messungen von Ribozym-DNA-transfizierten Zellen als interne Kontrolle dienen sollte.

3.6.2 Messung der MHC-Expression untransfizierter COS-7-Zellen

Die Messung der untransfizierten COS-7-Zellen ergab im Vergleich zu humanen gemischten Lymphozyten eine um etwa zwei Zehnerpotenzen geringere natürliche Expression der MHC-Klasse I mit einem Median von 125. Der Median der natürlichen Expression der MHC-Klasse II betrug bei den COS-7-Zellen 208 und war damit vergleichbar hoch wie bei humanen gemischten Lymphozyten.

Die MHC-Expression der COS-7-Zellen konnte mit γ -Interferon stimuliert werden. Nach einwöchiger Exposition mit 300 U/ml ergab sich für die MHC-Klasse I ein Median von 241, für die MHC-Klasse II betrug er 316 (Abb. 3.7). Die γ -IFN-Stimulation wurde deshalb durchgeführt, weil eine Ribozym-bedingte Herabregulation der MHC-Klasse II-Moleküle dadurch deutlicher sichtbar sein könnte.

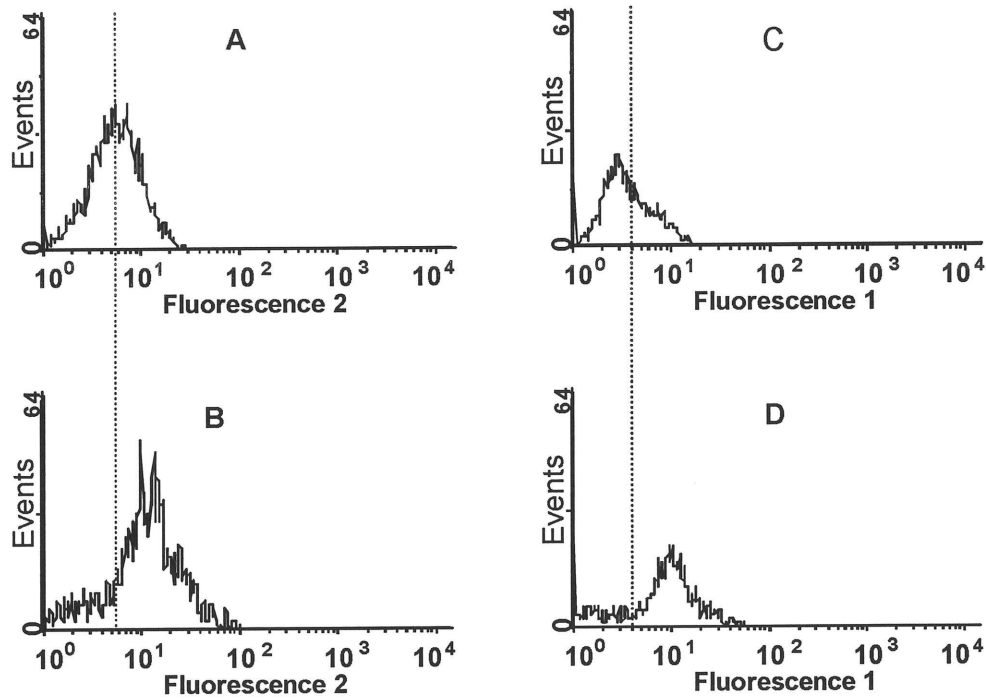


Abb. 3.7: HLA-Klasse I- und II-Expression untransfizierter COS-7-Zellen mit und ohne γ -IFN-Exposition. Die Expression beider HLA-Klassen steigt nach Behandlung mit γ -IFN deutlich an.

A: MHC-Klasse II der COS-7-Zellen ohne γ -IFN-Stimulation

B: MHC-Klasse II der COS-7-Zellen nach einwöchiger Stimulation mit 300 U/ml γ -IFN

C: MHC-Klasse I der COS-7-Zellen ohne γ -IFN-Stimulation

D: MHC-Klasse I der COS-7-Zellen nach einwöchiger Stimulation mit 300 U/ml γ -IFN

3.6.3 Messung der MHC-Expression untransfizierter EPG 85-257P-Zellen

Untransfizierte EPG 85-257P-Zellen zeigen eine von Natur aus höhere MHC I - und MHC II - Expression als die COS-7-Zellen. Nach Exposition mit γ -Interferon kam es bei den EPG 85-Zellen zu keinem meßbaren Expressionsanstieg.

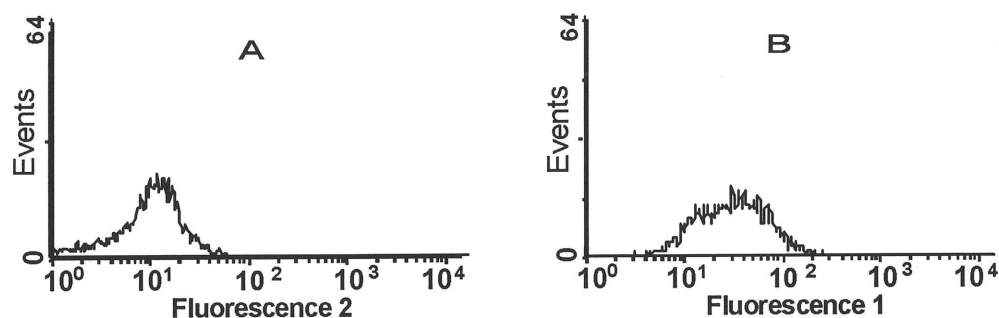


Abb. 3.8: HLA-Klasse I- und II-Expression untransfizierter EPG 85-257P-Zellen.

A: MHC-Klasse II-Expression untransfizierter EPG 85-257P-Zellen

B: MHC-Klasse I-Expression untransfizierter EPG 85-257P-Zellen

3.6.4 Messung der MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter Zellen

Alle folgenden FACScan-Messungen wurden einheitlich und mit den folgenden Kontrollen durchgeführt:

- a) untransfizierte Zellen
- b) mit pcDNA3 ohne Insert (= pcDNA3 „Mock“) -transfizierte Zellen als Negativkontrolle
- c) Transfektanten mit einem gegen deren HLA-DR-Locus gerichteten Ribozym-kodierenden Plasmid (= pcDNA3RBX).
- d) Zellen mit Ribozym-Plasmid ohne Target

Alle Messungen ergaben einen eindeutigen Anstieg der MHC-Klasse II-Expression bei Zellen, die mit pcDNA3 ohne Insert (= „Mock“) transfiziert wurden.

Die in den Transfektionen eingesetzten Vektoren mit ihren jeweiligen Ribozym-exprimierenden Inserts sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 3.1: Alle für die Transfektionen zur Verfügung stehenden Vektoren mitsamt ihren Ribozym-exprimierenden Inserts:

Vektor:	Insert:
pcDNA3	RB4
	RB124
	SCR4
	SCR124
	DRBall
pcDNA3Zeo	DRBall

3.6.5 Messung der MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter COS-7-Zellen

Die Transfektion der COS-7-Zellen wurde, wie auch alle folgenden Transfektionen, mit Hilfe der Elektroporation durchgeführt. Um stabile Transfektanten zu erhalten, wurden am nachfolgenden Tag und dann bei jeder weiteren Fütterung 1,5 mg/ml Geneticin (G 418) zum Medium hinzugegeben. Daraus ergab sich eine Selektion der Plasmid- und damit G 418-Resistenz tragenden Zellen. Nach einer Woche wurden die Zellen für eine weitere Woche mit 300 U/ml γ -Interferon stimuliert und anschließend im FACScan gemessen.

Wie oben bereits dargestellt kam es unter γ -IFN-Stimulation zu einem Anstieg der MHC-Klasse II-Expression um 67 % gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 3.7). Durch die Transfektion mit dem Plasmid pcDNA 3 ohne Insert (= „Mock“), welches die Negativkontrolle ist, kam es zu einer Expressionssteigerung um 20 % gegenüber nichttransfizierten Zellen (Abb. 3.9C). Die MHC-Klasse II- Expression stieg bei den sowohl pcDNA3- transfizierten als auch mit γ -IFN stimulierten Zellen um 103 % gegenüber den unbehandelten Zellen an (Abb. 3.9D). COS-7-Zellen, die mit dem Ribozym-tragenden Plasmid pcDNA3SCR4 transfiziert wurden zeigten eine Herabregulation der MHC-Klasse II um 7 % gegenüber der Negativkontrolle (Abb. 3.9E). Zuletzt wurden noch pcDNA3SCR4- und gleichzeitig γ -IFN-stimulierte Zellen im FACScan gemessen (Abb. 3.9F). Auch hier zeigt sich eine Herabregulation um 7 % gegenüber ihrer Negativkontrolle, nämlich den pcDNA 3-transfizierten und γ -IFN-stimulierten Zellen.

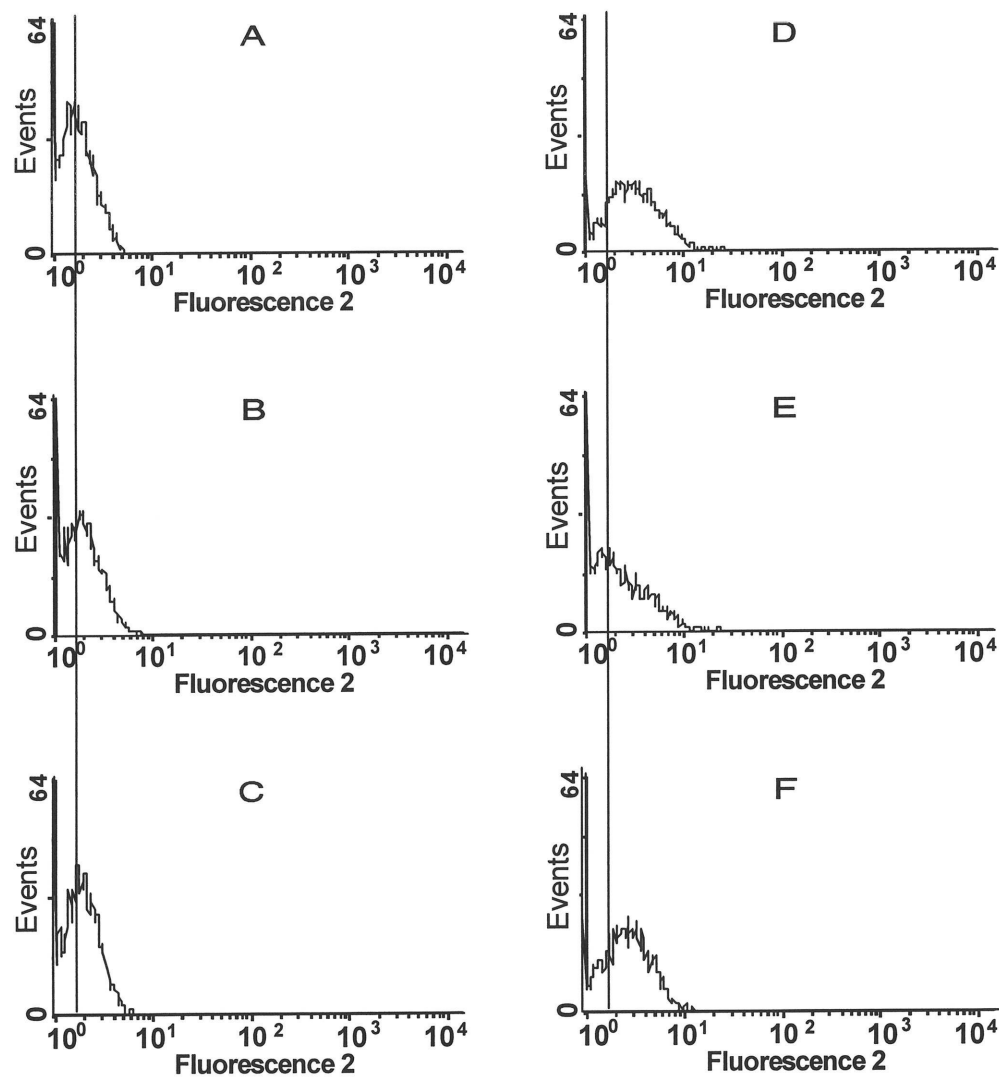


Abb. 3.9: MHC-Klasse II-Expression γ -IFN und/oder Ribozym-transfizierter COS-7-Zellen

- A: untransfiziert
- B: pcDNA3-transfiziert
- C: pcDNA3 SCR 4-transfiziert
- D: untransfiziert und mit γ -IFN stimuliert
- E: pcDNA3-transfiziert und mit γ -IFN stimuliert
- F: pcDNA3 SCR 4-transfizierte- und mit γ -IFN stimuliert

3.6.6 Messung der MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter EPG 85-257P-Zellen

MHC-Expression stabiler Transfektanten mit den Ribozym-kodierenden Plasmiden pcDNA3RB4, pcDNA3RB124, pcDNA3SCR4 und pcDNA3SCR124

Nach der Elektroporation der HLA-DRB2-homozygoten EPG 85-257P-Zellen wurden diese wie die oben beschriebenen COS-7-Zellen mit Selektionsmedium behandelt wobei eine Konzentration von 0,8 mg/ml Geneticin im Kulturmedium zur Erzeugung stabiler Transfektanten verwendet wurde.

Die Zellen wurden zunächst mit den Plasmiden pcDNA3 (=„Mock“), pcDNA3RB4, pcDNA3RB124, pcDNA3SCR4 und pcDNA3SCR124 transfiziert.

In der nachfolgenden FACScan-Messung wurde abermals deutlich, daß die MHC-Klasse II-Expression durch die Transfektion *per se* ansteigt (Abb.3.10, A und D). So ergibt sich für pcDNA3 (=„Mock“)-transfizierte EPG 85-Zellen (= Negativkontrolle), ein Anstieg um 27 % gegenüber unbehandelten Zellen. Ein ebensolcher Expressionsanstieg zeigt sich auch bei den Transfektanten, welche die Ribozyme RB4 und SCR4 enthalten (Abb.3.10, B und E). Es darf bei diesen Transfektanten auch nicht zu einer Herabregulation der MHC-Klasse II kommen, da die EPG 85-257P-Zellen HLA-DRB2 homozygot, die Ribozyme jedoch gegen HLA-DRB4 gerichtet sind. Dagegen weisen die pcDNA3SCR124- tragenden Transfektanten eine Herabregulation der MHC-Klasse II- Moleküle um 24 %, die pcDNA3RB124 enthaltenden Zellen sogar um 34 % auf (Abb.3.10, C und F).

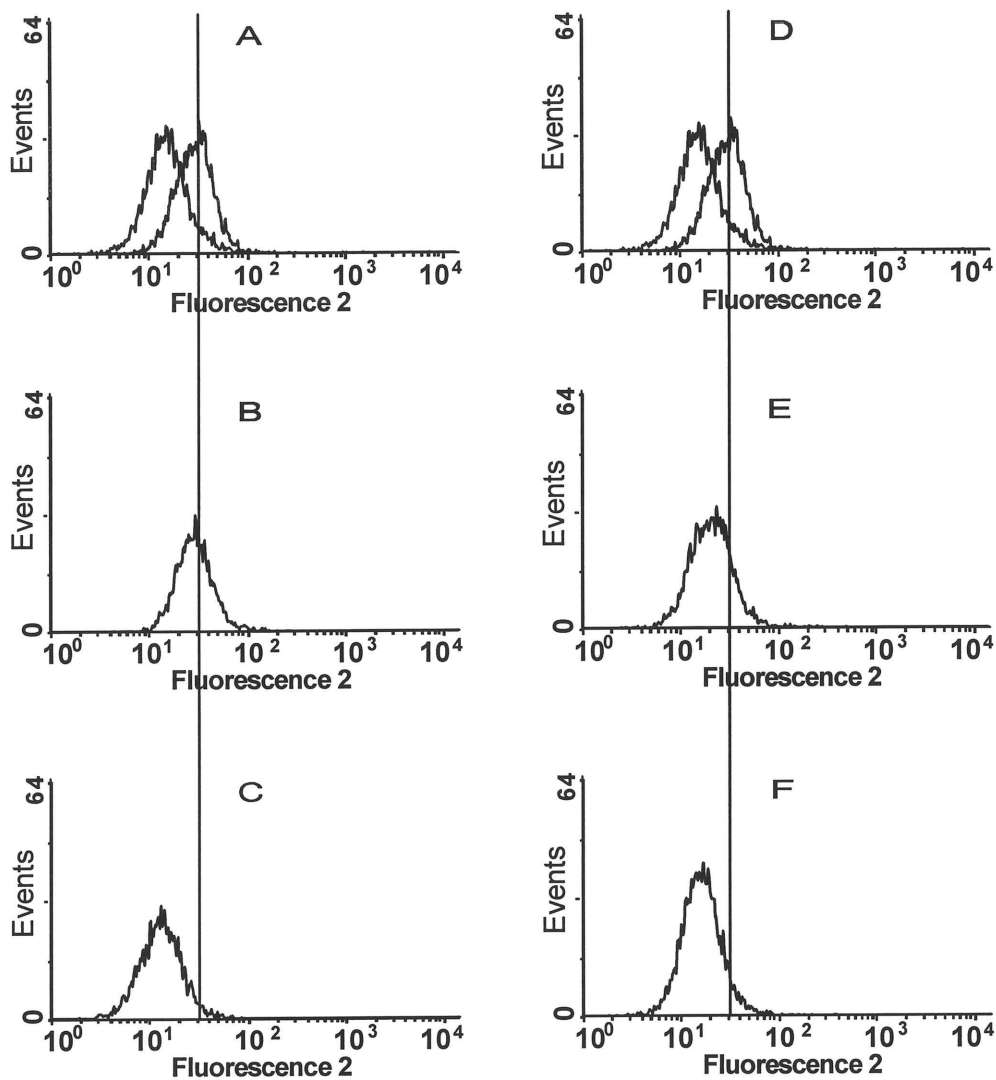


Abb. 3.10: MHC-Klasse II-Expression untransfizierter- und Ribozym-transfizierter- EPG 85-257P-Zellen

A: untransfiziert (links) und pcDNA3-transfiziert (rechts =Negativkontrolle)

B: pcDNA3RB4-transfiziert

C: pcDNA3RB124-transfiziert

D: untransfiziert (links) und pcDNA3-transfiziert (rechts =Negativkontrolle)

E: pcDNA3SCR 4-transfiziert

F: pcDNA3SCR 124-transfiziert

MHC-Expression stabiler Transfektanten mit dem Ribozym-kodierenden Plasmid

pcDNA3DRBall

Das Ribozym DRBall wurde entworfen, um einer möglichen, durch spezifische

Herabregulation eines bestimmten HLA-DRB-Genproduktes induzierten Hochregulation der

Expression anderer HLA-DRB-Allele entgegenwirken zu können, da es die Transkripte nahezu aller HLA DRB-Allele spaltet. Es wurde in die Vektoren pcDNA3 und pcDNA3Zeo kloniert (siehe Kapitel 3.1.1). Die EPG-85-Zellen wurden zunächst mit dem Plasmid pcDNA3DRBall transfiziert und anschließend im FACScan gemessen.

Die FACScan-Ergebnisse zeigen, daß mit dem Ribozym DRBall im Vektor pcDNA3 eine Herabregulation der MHC-Klasse II-Expression um 12 % gegenüber der Negativkontrolle zu erzielen ist (Abb.3.11).

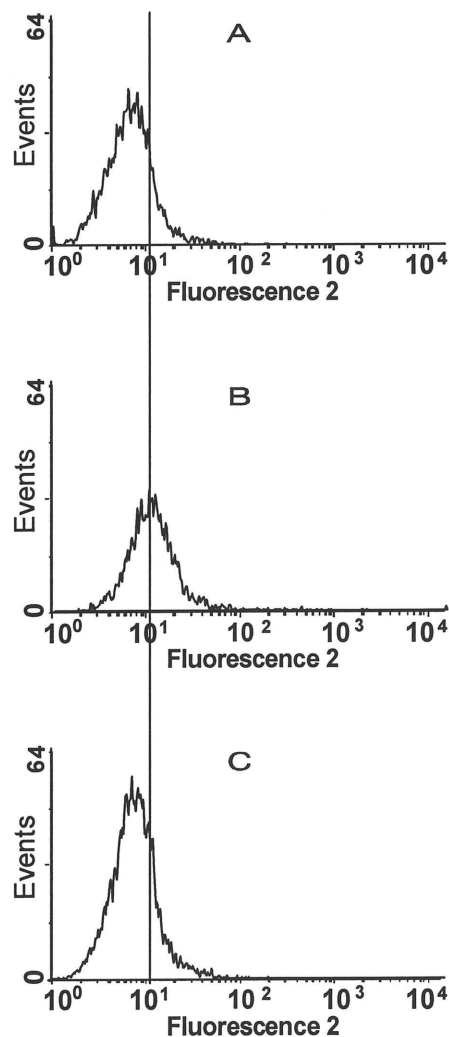


Abb.3.11: MHC-Klasse II-Expression untransfizierter- und mit pcDNA3DRBall- transfizierter EPG 85-257P-Zellen

A: Untransfizierte EPG 85-257P-Zellen

B: pcDNA3- transfizierte EPG 85-257P-Zellen (=Negativkontrolle)

C: pcDNA3- DRBall-transfizierte EPG 85-257P-Zellen

MHC-Expression stabiler Transfektanten mit dem Ribozym-kodierenden Plasmid pcDNA3DRBallZeo

Zur Überprüfung, ob ein anderer Vektor einen stärkeren Einfluß auf die Herabregulation besitzt, wurde das Ribozym DRBall in pcDNA3Zeo kloniert und nachfolgend die EPG 85-Zellen mit dem Produkt pcDNA3ZeoDRBall transfiziert. Der Vektor pcDNA3Zeo zeigte bereits bei anderen Experimenten eine höhere Expressionsrate als pcDNA3 (Genbank, Accession X90639). Die FACScan-Messung der stabilen Transfektanten ergab eine Herabregulation der MHC-Klasse II-Moleküle um 17 % gegenüber der Negativkontrolle.

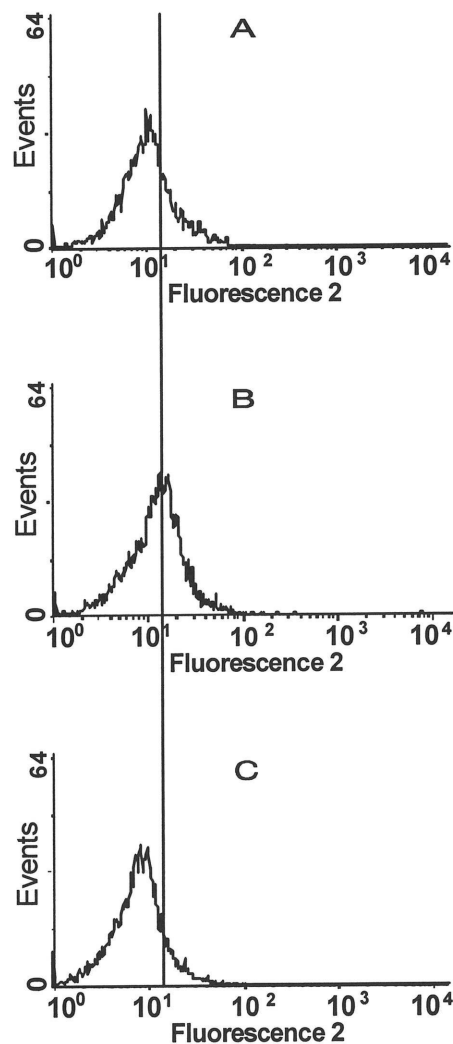


Abb.3.12: MHC-Klasse II-Expression untransfizierter- und mit pcDNA3ZeoDRBall- transfizierter EPG 85-257P-Zellen

A: Untransfizierte EPG 85-257P-Zellen; B: pcDNA3- transfizierte EPG 85-257P-Zellen
C: pcDNA3ZeoDRBall- transfizierte EPG 85-257P-Zellen

3.7 Nachweis der Ribozym-kodierenden Plasmide in stabilen Transfektanten

Um den Beweis zu erbringen, daß die Plasmide tatsächlich stabil in den Transfektanten vorhanden sind, wurde zunächst die Nachweisgrenze der DNA-Moleküle ermittelt. Dazu wurde stellvertretend für alle eingesetzten Plasmide eine Verdünnungsreihe mit dem Ribozym-codierenden Vektor pcDNA3SCR4 erstellt. Nachfolgend wurde mit allen Verdünnungsstufen eine PCR mit der Ribozym-spezifischen Primerkombination CRZR 5 / prePA durchgeführt, deren Produkt eine Größe von 226 Basenpaaren besitzt.

Mittels PCR waren 4000 Moleküle DNA noch gut nachweisbar.

Es ist davon auszugehen, daß die stabilen Transfektanten mindestens je ein Plasmid enthalten, welches Resistenz gegenüber dem Selektionsantibiotikum vermittelt und damit die Zelle vor dem Absterben bewahrt.

Für den Nachweis der Plasmide in den Transfektanten wurden 1×10^6 Zellen pelletiert und in 50 µl Milipore-Wasser suspendiert. Anschließend wurden die Zellen einem dreimaligen Temperaturwechsel von -80 und + 37 °C ausgesetzt. Nach abschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 18000 g wurden aus dem Überstand 5 µl entnommen und in der nachfolgenden PCR eingesetzt.

In allen stabilen Transfektanten konnten die jeweiligen Plasmide nachgewiesen werden.

3.8. Nachweis der Ribozyme in stabilen Transfektanten mittels RT-PCR

Der Nachweis von Ribozymen in stabilen Transfektanten wurde mit EPG 85-257P-Zellen durchgeführt, welche die Ribozyme RB4, RB124, SCR4 und SCR124 enthielten. Zu diesem Zweck wurde zunächst mit Hilfe eines RNA-Präparations-Kits für eukaryotische Zellen der Firma Quiagen (Hilden), die RNA aus jeweils 10^7 Transfektanten isoliert.

Anschließend wurden jeweils 1/10 der gewonnenen RNA für eine first-strand-cDNA-Synthese eingesetzt, die wiederum in einer nachfolgenden PCR mit ribozymspezifischen Primern nachgewiesen werden konnte. Negativkontrollen waren RNA sowohl aus untransfizierten- als auch aus pcDNA 3 (=„mock“)-transfizierten EPG-Zellen. Positivkontrolle waren für die jeweiligen Transfektanten die β -Aktin-Primerpaare. Als weitere Positivkontrolle diente der Einsatz von reinen Ribozym-kodierenden Plasmiden.

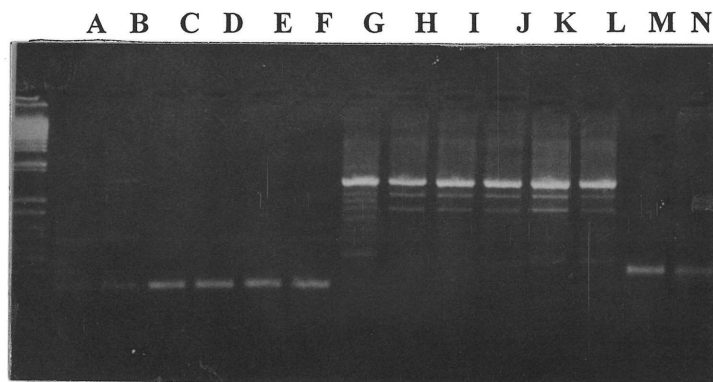


Abb. 3.13: Nachweis der Ribozyme in den stabilen Transfektanten mittels RT-PCR aus:

A: untransfizierten Zellen (Negativkontrolle); B: pcDNA3-transfizierten Zellen (Negativkontrolle);
C: pcDNA3RB4-transfizierten Zellen; D: pcDNA3RB124-transfizierten Zellen;
E: pcDNA3SCR4-transfizierten Zellen; F: pcDNA3SCR124-transfizierten Zellen
G: untransfizierten Zellen mit β -Aktin; H: pcDNA3- transfizierten Zellen mit β -Aktin
I: pcDNA3RB4-transfizierten Zellen mit β -Aktin; J: pcDNA3RB124-transfizierten Zellen mit β -Aktin;
K: pcDNA3SCR4-transfizierten Zellen mit β -Aktin; L: pcDNA3SCR124-transfizierten Zellen mit β -Aktin
M, N: pcDNA3SCR4 (Positivkontrollen)

4 Diskussion

4.1 Überblick

Der Grund dafür, daß Organtransplantationen häufig eine schlechte Prognose haben, liegt unter anderem in der Differenz der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger. Da der genetische Polymorphismus des Haupthistokompatibilitätskomplexes innerhalb der Bevölkerung sehr hoch ist, muß eine Vielzahl von Organen HLA-inkompatibel transplantiert werden, wodurch sich akute wie chronische immunologische Abstoßungsreaktionen ergeben. Diese wiederum werden mit hohen Dosen Immunsuppressiva behandelt, deren schwerwiegende Nebenwirkungen für den Patienten oftmals sehr belastend sind.

Die Ein-Jahres-Überlebensrate nach Lungen- oder kombinierten Herz-/ Lungen-transplantationen beträgt lediglich 50-60 % (Kriell und Kaye, 1990). Davon sind 40 % durch technisches Versagen verursacht, 30 % werden durch Infektionen hervorgerufen und 25 % beruhen auf akuten Abstoßungskrisen. Bis zu 50 % der überlebenden Patienten entwickeln schwerste Folgereaktionen mit schlechter Prognose.

Eine Alternative zu der unspezifischen medikamentösen Immunsuppression könnte die erst in jüngster Zeit etablierte Antisense-Technologie darstellen, mit deren Hilfe sich ganz neue Perspektiven für Organtransplantationen eröffnen können. Durch den Einsatz von Ribozymen, d.h. RNA-Molekülen mit katalytischer Aktivität, welche spezifisch gegen polymorphe Bereiche HLA-DR-kodierender mRNA gerichtet sind, sollte es möglich sein, eine Senkung der Immunogenität von Spenderorganen zu erzielen.

Aus diesem Grunde sind Ribozyme entworfen worden, welche die Expression der am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung vorkommenden HLA-Allele, nämlich DRB1*01-, DRB1*02-- (= DRB1*15-- und DRB1*16--), DRB1*03-- und DRB1*04--, verringern sollen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nachzuprüfen, ob und inwieweit eine Herabregulation der MHC-Klasse II-Expression in lebenden Zellkulturen möglich ist. Dafür wurde ein Ribozym entworfen, welches sich gegen die Expression nahezu aller bekannten humanen HLA-DRB-Allele richtet. Dieses wurde in die Vektoren pcDNA3 und pcDNA3Zeo kloniert. Die Produkte, also die Ribozym-kodierenden Plasmide, wurden mit Hilfe der Elektroporation in Kulturzellen gebracht und anschließend mittels FACScan-Analyse die Auswirkungen auf die MHC-II-Expression untersucht. Ein weiterer Bestandteil der Arbeit war der Nachweis der Plasmide in den stabilen Transfektanten, welcher mittels PCR gelang. Des weiteren galt es festzustellen, ob die Ribozyme in den Transfektanten exprimiert werden. Mit Hilfe einer RT-PCR war auch dieser Nachweis möglich.

4.2 Erfolgreicher Einsatz von Ribozymen in bisherigen Zellkultur-Studien

Es gibt bereits eine Reihe von Studien an Zellkulturen, in denen gezeigt werden konnte, daß es mit Hilfe von Ribozymen möglich ist, Ziel-mRNA spezifisch zu spalten und somit selektiv deren Translation zu inhibieren.

Diese Eigenschaft der Ribozyme konnte bereits mehrfach in der spezifischen Inhibition von HIV-Transkripten demonstriert werden. Dabei war es möglich, die Anzahl von HIV-Proteinen um mehr als 90% zu senken und gleichzeitig eine Reduktion der viralen Replikation zu erzielen (Sarver et al., 1990; Sioud et al., 1991; Dropulic et al., 1992). Auch die Genexpression des Tumornekrosefaktors (TNF) in humanen Zellen konnte mittels Ribozymen stark verringert werden (Sioud et al., 1992). Nicht zuletzt konnte die Genexpression des α -Lactalbumins in Maus-Zellen mit Hilfe von Ribozymen um 80 % gesenkt werden (Huillier et al., 1992).

Der Einsatz von Ribozymen zur Modulation der Expression von MHC-Klasse II-Molekülen war bisher noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Forschung.

Am Institut für Allgemeine Mikrobiologie in Kiel haben Guido Krupp et al. im Vorfeld *in vitro*-Tests mit den Ribozymen RB4 und RB124 durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß beide Ribozyme ihr Substrat erkennen und spezifisch zu spalten vermögen (Krupp et al., 1995).

Huillier et al. konnte 1992 bei ähnlichen *in vitro*- Ergebnissen mit anderen Ribozymen ebenfalls eine hohe *in vivo*-Aktivität in Zellkulturen feststellen, nämlich eine Herabregulation der Genexpression um 80 %. Dennoch ist es nicht möglich von der *in vitro*- auf die *in vivo*-Aktivität zu schließen, denn es konnte bereits gezeigt werden, daß Ribozyme mit hoher *in vitro*-Effizienz bei *in vivo*-Einsatz versagen (Huillier et al., 1992). Es ist also praktisch unmöglich, eine hohe *in vivo*-Spezifität und -Umsatzrate von Ribozymen vorrauszusagen.

4.3 Gründe für niedrige *in vivo*-Aktivitäten von Ribozymen

4.3.1 Abbau synthetischer Ribozyme in endoplasmatischen Kompartimenten

Mit hoher Wahrscheinlichkeit können synthetische, exogen bestimmten Zellen zugeführte Ribozyme nach ihrer Applikation in endozytotischen Kompartimenten der Zielzelle nukleolytisch abgebaut werden, so daß ein Zusammentreffen mit der Target-mRNA von vornherein unterbunden wird (Rossi, 1994). Aus diesem Grunde sind in der vorliegenden Arbeit keine synthetischen Ribozyme in die Zellen eingebracht worden. Stattdessen sind Plasmide entwickelt und transfiziert worden, welche eine Ribozym-kodierende DNA-Sequenz besitzen. Dadurch ergeben sich zwei Vorteile:

a) die Plasmide können im Gegensatz zu synthetischen Ribozymen in der Zielzelle nicht abgebaut werden. Es besteht jedoch die Gefahr, daß sie per Exozytose aus der Zelle „ausgeschleust“ werden. Um dies zu verhindern, tragen die verwendeten Ribozym-kodierenden Plasmide ein Antibiotika-Resistenzgen. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bei jeder Zellfütterung wird ein Selektionsdruck aufrechterhalten. Dadurch überleben allein diejenigen Zellen, welche das Plasmid enthalten.

b) die Plasmide sind als aktiver Bestandteil des Zellstoffwechsels der Zelle befähigt, ständig Ribozyme nachzuliefern. Verantwortlich für die Expression des Ribozyms ist vor allem der CMV-Promotor des Plasmids, unter dessen Kontrolle die Ribozym-kodierende DNA steht. Bei geeignetem Promotor kann innerhalb der Zelle ein bis zu tausendfacher Überschuß der Ribozym-Moleküle gegenüber der Target-RNA erreicht werden (Hartmann et al., 1995).

4.3.2 Ungünstige Stöchiometrie zwischen Ribozym und Target

Eine insuffiziente *in vivo*-Aktivität von Ribozymen kann auch am Verhältnis des Ribozyms zu seinem Target liegen. Einige Autoren halten einen 100-1000-fachen Ribozym-Überschuß gegenüber der Ziel-RNA für notwendig, um eine meßbare Abnahme der mRNA-Menge in der Zelle festzustellen (Cotton & Birnstil, 1989; Wang & Dolnik, 1993). Ursächlich für einen derartigen Überschuß mag unter anderem die Empfindlichkeit der Ribozyme gegenüber zellulären Nukleasen sein. Eine zu große Menge an Ribozymen kann allerdings wiederum die Gefahr eines toxischen Effektes auf die Zelle in sich bergen.

Es gibt Hinweise darauf, daß die Halbwertszeit des HLA-DR-Transkriptes relativ kurz ist (Davies et al., 1993). Eine kurze Halbwertszeit beinhaltet eine hohe Umsatzrate sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene. Ribozyme können zwar nach erfolgreicher Spaltung von ihrer Zielsequenz abdissoziieren und weitere Spaltungen vornehmen, allerdings kann die Wirksamkeit durch die möglicherweise hohe Transkriptionsrate herabgesetzt werden.

4.3.3 Ribozym und Target in verschiedenen Zellkompartimenten

Die Tatsache, daß die mRNA innerhalb der Zelle sich zumeist in Zellkompartimenten aufhält und bestimmten Routen durch den Kern und das Endoplasmatische Retikulum folgt, läßt vermuten, daß Ribozyme versagen können, weil sie sich „einfach nicht zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort befinden“ (Barinaga et al., 1993). So ist beispielsweise bekannt, daß die mRNAs von *Drosophila* und *Xenopus* spezifische Sequenzen in ihren 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) besitzen, welche richtungsweisenden Charakter besitzen und den Weg zu bestimmten zellulären Regionen vermitteln (Rossi, 1994). Es wurden daher bereits Methoden entwickelt, bei denen man Ribozyme mit einer wegweisenden Signalsequenz („tracking signal“) versieht. (Barinaga et al., 1993).

4.3.4 Integrität der Ribozyme

Bei der Transkription der Ribozym-DNA kann es vorkommen, daß die Transkripte neben den Ribozymen noch Teile (transkribierter) Vektorsequenzen enthalten, was zu einer Senkung der katalytischen Effizienz der Ribozyme aufgrund der möglichen Ausbildung von Sekundärstrukturen führen kann (Belinsky & Dinter, 1991; Denman, 1993).

Um die Wahrscheinlichkeit derartiger Ereignisse zu verringern, wurden in der Arbeit auch selbstspaltende Ribozyme (SCR = self-cleaving ribozymes) verwendet, welche zusätzlich eine interne Spaltstelle besitzen. Mit dieser können sie sich nach der Transkription am 5'-Ende selbst verkürzen. Übrig bleiben zwei RNA-Moleküle, von denen das kürzere die katalytische Domäne enthält (Ventura et al., 1993).

In der Arbeit konnte jedoch im Vergleich mit den Hammerkopf-Ribozymen ohne Selbstspaltungsmechanismus kein Unterschied bezüglich ihrer Wirksamkeit festgestellt werden.

4.3.5 Hochregulation nicht herabregulierter HLA-DRB-Allele

Die Vermutung liegt nahe, daß es bei der selektiven Herabregulation der Expression bestimmter HLA-DRB-Allele zur Überexpression anderer HLA-DRB-Allele kommt.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde im Rahmen der Arbeit ein Ribozym entworfen, welches sich gegen die Expression nahezu aller bekannten humanen HLA-DRB-Allele richtet.

4.4 MHC-Expression transfizierter Zellen

Bei allen durchgeführten FACScan-Messungen konnte festgestellt werden, daß es allein durch die Transfektion an sich schon zu einem Anstieg der MHC-Klasse II- Expression kommt. Dieser Expressionsanstieg ließe sich mit einer durch das zellfremde Plasmid hervorgerufenen Erhöhung der Stoffwechselaktivität der Transfektanten erklären.

4.4.1 MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter COS-7-Zellen

Bei den COS-7-Zellen konnte mit pcDNA3RB4, -RB124 und -SCR4 keine signifikante Herabregulation der MHC-Klasse II-Expression gegenüber der Negativkontrolle pcDNA3 erzielt werden. Dagegen war mit pcDNA3SCR124 eine Verringerung der MHC-Klasse II-Expression um 7 % möglich. Dieser Prozentwert ergab sich auch bei COS-7-Zellen, bei denen zuvor die MHC-Expression mittels γ -IFN gesteigert wurde.

4.4.2 MHC-Expression Ribozym-DNA-transfizierter EPG 85-257P-Zellen

Bei den EPG-85-257P-Zellen konnte die MHC-Klasse II-Expression deutlicher beeinflußt werden. Mit pcDNA3SCR124 war eine Verringerung der Expression um 24 %, mit pcDNA3RB124 sogar um 34 % gegenüber der Negativkontrolle pcDNA3 möglich. Mit dem Ribozym DRBall, welches sich gegen nahezu alle bekannten humanen HLA-DRB-Allele richtet, sollte eine noch stärkere Herabregulation erzielt werden. Mit diesem Ribozym sollte verhindert werden, daß es durch spezifische Herabregulation eines bestimmten HLA-DRB-Allels zu einer durch negative Rückkopplung verursachten Erhöhung der Expression anderer DRB-Allele kommt. Mit dem Ribozym DRBall kam es zu einer Herabregulation der MHC-II-Expression um 12 %.

Den Erwartungen nach müßte das Ribozym DRBall jedoch mindestens genauso wirksam sein, wie RB124 oder SCR124.

Im humanen HLA-DRB-Genom kommt nur eine einzige mögliche Sequenz vor, die bei nahezu allen bekannten humanen HLA-DRB-Genen (DRB01 bis DRB09) identisch ist und die alle Kriterien erfüllt, um ein wirksames Ribozym gegen deren Transkripte entwerfen zu können. Diese Sequenz ist 20 Basenpaare lang und befindet sich zwischen dem 237. und 256.

Basenpaar aller bekannten humanen HLA-DR-Allele. Sie trägt mittig ein Triplet, welches für eine NUM-Sequenz der mRNA, also des Ribozym-Targets, kodiert. Dies ist absolute Voraussetzung für die Wirksamkeit eines Ribozyms gegen das Transkript (siehe Kap. 3.1).

Der Grund für die geringere Wirksamkeit des Ribozyms DRBall liegt höchstwahrscheinlich darin, daß sich sein NUM-Triplett aus den Basen CUA zusammensetzt. Wie die Abb. 4.1 zeigt, ist die Spaltungseffizienz dieses Triplett nicht besonders groß. Es gibt aber keine Alternative, da es keine andere Sequenz von geeigneter Größe innerhalb des HLA-DRB-Gens gibt, die bei allen DRB-Allelen identisch ist.

Im Gegensatz dazu besitzen die Targets der Ribozyme RB124 und SCR124 die Basenfolge GUC als NUM-Triplett. Dieses Triplet verspricht eine höchstmögliche Spaltungseffizienz (Ruffner et al.,1990).

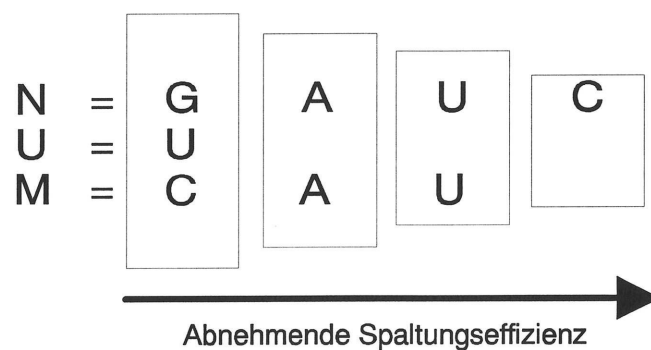


Abb.4.1: Die Darstellung verdeutlicht die bei verschiedener Basenzusammensetzung des NUM-Tripletts unterschiedliche Spaltungseffizienz einer Hammerkopfribozyms

N steht für die Basen Guanin, Adenin, Uracil und Cytosin.

U steht für die Base Uracil.

M steht für Cytosin, Adenin und Uracil.

Durch die Verwendung des Vektors pcDNA3Zeo konnte die Expression um weitere 5 % gesenkt werden. Die mit pcDNA3ZeoDRBall- transfizierten Zellen zeigten eine um 17 % verringerte MHC-II-Expression als die Negativkontrolle.

4.5 Ausblick

Die durchgeführten Messungen ergaben, daß die verwendeten Ribozyme in Zellkultur aktiv sind. Methode zur Einbringung der Ribozym-kodierenden DNA in die Zellen war dabei die Elektroporation. Da dieses Verfahren für den *in vivo*-Einsatz nicht geeignet ist, kann ein nächster Schritt der Versuch eines Gentransfers mit Hilfe von geeigneten rekombinanten Adenoviren sein, wie sie auch für die somatische Gentherapie vorgesehen sind. Auch die Liposomen-Transfektion kann als weitere Alternative für die *in vivo*-Transfektion in Betracht gezogen werden.

Die in Kapitel 4.3 dargestellten Ursachen für eine geringe Aktivität von Ribozymen lassen ein weites Feld von Möglichkeiten offen, mit denen die Wirksamkeit dieser katalytischen RNA noch weiter gesteigert werden kann. So kann zum Beispiel durch die Verwendung stärkerer Promotoren in den Ribozym-kodierenden Plasmiden möglicherweise ein günstigeres Mengenverhältnis zwischen dem Ribozym und seinem Target erlangt werden.

Vor nukleolytischem Abbau in der Zielzelle kann das Ribozym durch chemische Modifikation geschützt werden oder es kann ein sogenanntes „tracking signal“ mit dem Ribozym assoziiert werden, welches als Wegweiser zur Target-RNA fungiert (Lyngstadaas, 1995).

Das Wissen um die Wirksamkeit eines Ribozyms in stabil transfizierten Zellen bildet somit die Grundlage für weitere, auf die Verbesserung der Wirksamkeit und die *in vivo*-Verwendung ausgerichtete Versuche.

5 Zusammenfassung

Die Humanen Leukozyten Antigene (HLA-Moleküle der Klasse I und II) weisen einen hohen Polymorphismus auf. Aus diesem Grunde müssen Organtransplantationen meistens HLA-inkompatibel durchgeführt werden. Daraus ergibt sich die Gefahr, daß der Organempfänger auf das Spendergewebe mit einer Abstoßung reagiert.

Die Therapie von Abstoßungsreaktionen stützt sich in erster Linie auf die Verwendung von Immunsuppressiva. Diese besitzen eine geringe Spezifität und ein breites, den Patienten stark belastendes Nebenwirkungsspektrum.

Eine mögliche therapeutische Alternative wäre die gezielte Senkung der HLA-Expression genetisch differenter Spenderorgane mit Hilfe von enzymatisch aktiven Hammerkopf-Ribozymen, welche spezifisch die transkribierten mRNA's der HLA-Gene spalten und dadurch deren Translation verhindern.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit von Hammerkopf-Ribozymen in geeigneten Zellkulturen zu untersuchen. Dafür wurden die Kulturzellen mit Ribozym-kodierenden Plasmiden elektroporiert und später mit Hilfe der Durchflußzytometrie im FACScan (Fluorescence Activated Cell Scanner) analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ribozym entworfen, welches sich gegen nahezu alle bekannten HLA-DRB-Allele richtet (= DRBall). Dieses wurde in die Vektoren pcDNA3 und pcDNA3Zeo kloniert und anschließend sequenziert.

Auch die in einer Vorarbeit hergestellten und in den Vektor pcDNA3 klonierten Hammerkopf-Ribozyme wurden bezüglich ihrer Wirksamkeit in Zellkultur untersucht. Zwei dieser Ribozyme sind spezifisch gegen HLA-DRB1*01, DRB1*02 (= DRB1*15 und DRB1*16) und DRB1*04 gerichtet (= RB124 und das selbstspaltende SCR124), die beiden anderen sind allein HLA-DRB1*04- spezifisch (= RB4 und das selbstspaltende SCR4).

Die FACScan-Analysen zeigten für die homozygot HLA DR4-positiven COS-7-Zellen nach Transfektion mit dem Ribozym SCR124 eine Herabregulation der MHC-Klasse II-Expression um 7 % gegenüber der Negativkontrolle.

Die MHC-Klasse II-Expression von homozygoten HLA-DR2-positiven EPG 85-257P-Zellen konnte mit dem Ribozym SCR124 um 24 %, mit RB124 um 34 % gesenkt werden.

Mit dem Ribozym DRBall konnte unter Verwendung des Vektors pcDNA3 eine Herabregulation der MHC-Klasse II von EPG 85-257P-Zellen um 12 % erzielt werden, mit dem Vektor pcDNA3Zeo gelang eine Herabregulation um 17 %.

Die Ergebnisse deuten auf eine vorhandene *in vivo*-Aktivität der Ribozyme hin.

Zur Verifikation der Ergebnisse wurde ein Nachweis der Plasmide mittels PCR sowie der transkribierten Ribozyme mittels RT-PCR in den stabil transfizierten Zellen durchgeführt.

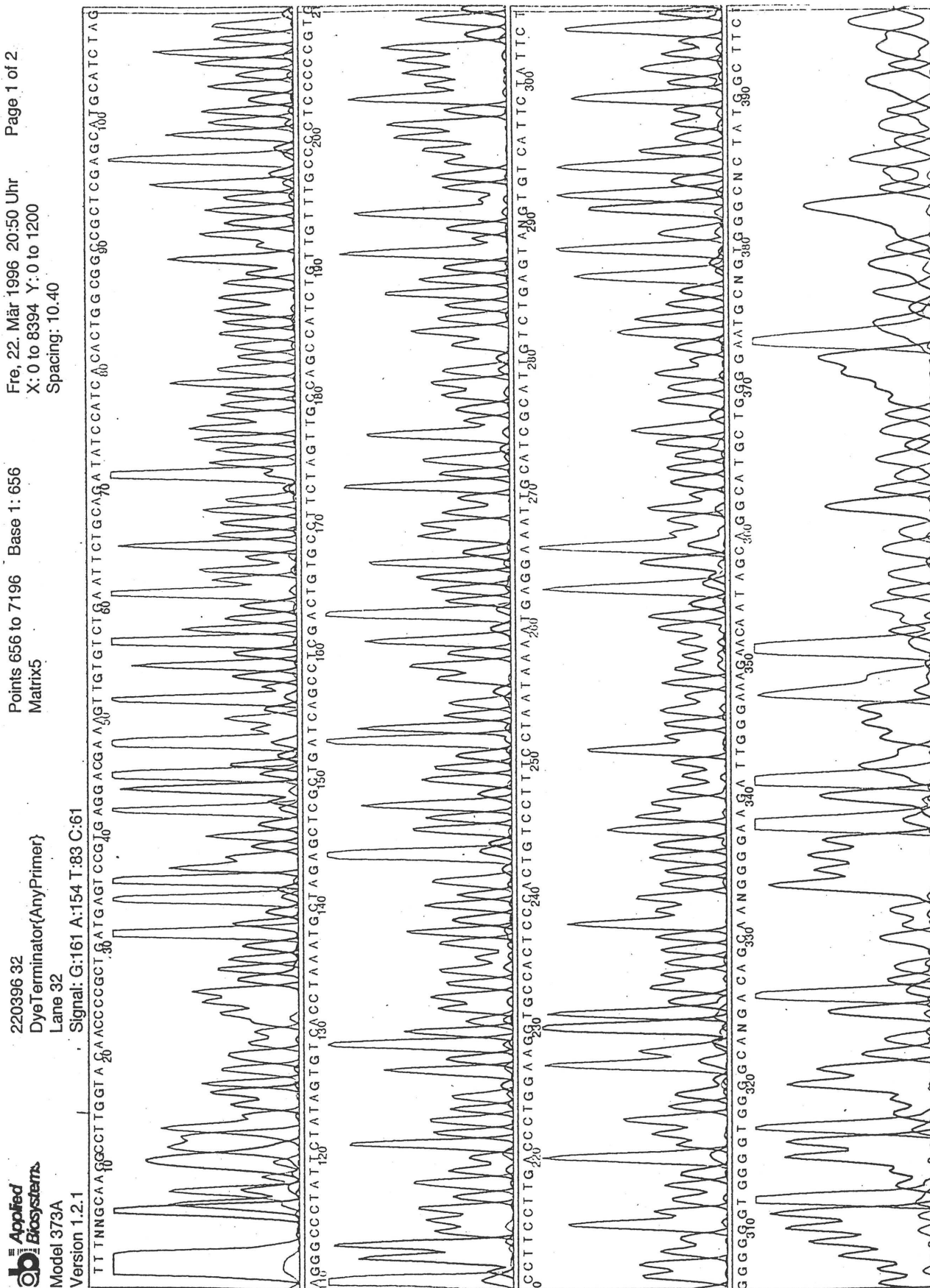
6. Literaturverzeichnis

- Albert, E.D. (1984). Histocompatibility Testing, Springer, Berlin.
- Barinaga, M. (1993). Ribozymes: killing the messenger. *Science* 262, 1512-1514.
- Belinsky, M.G. and Dinter, G. (1991). Non-ribozyme sequences enhance self-cleavage of ribozymes derived from hepatitis delta virus. *Nucleic Acids Res.* 19, 559-564.
- Bodmer, J.G., Marsh, S.G., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazun, T., Schreuder, G.M., Strominger, J.L., Svejgaard, A., and Terasaki, P.J. (1995). Nomenclature for factors of the HLA system. *Human Immun.* 43, 149-157
- Cech, T.R. and Uhlenbeck, O.C. (1994). Hammerhead nailed down. *Nature* 372, 39-40.
- Cotton, M. and Birnstiel, M.L. (1989). Ribozyme mediated destruction of RNA *in vivo*. *EMBO J.* 8, 3861-3866.
- Denman, R.B. (1993). Cleavage of full-length beta APP mRNA by hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 21, 4119-4125.
- Dropulic, B., Lin, N.H., Martin, M.A., and Jeang, K.T. (1992). Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type1 expression. *Virology* 66, 1432-1441.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hartmann, R.K., Krupp, G., and Hardt, W.-D. (1995). Towards a new concept of gene inactivation: specific RNA cleavage by endogenous ribonuclease P. *Biotechnology Annual Reviews*
- Hradetzky, D., Schimpf, A., Karn, T., Strebhardt, J., and Rübesam-Waigman, H. (1992). Taq cycle sequencing of plasmid DNA purified by various procedures. *BFE.* 9, 471-472.
- Huillier, P.J., Davis, S.R., and Bellamy, A.R. (1992). Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in α -lactalbumin mRNA levels in C127I mouse cells. *EMBO J.* 11, 4411-4418.
- Hutchinson, I. (1995). Transplantation und Abstoßung. In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. I.M. Roitt, J. Brostoff, and D. Male, Thieme, Stuttgart, pp. 321-333.

- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1991). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Keogh, A., Kaan, A., Doram, T., Macdonald, P., Bryant, D., and Spratt, P. (1995). HLA mismatching and outcome in heart, heart-lung and single lung transplantation. *Heart-Lung-Transplant* 14, 444-451.
- Krupp, G., Drinas, D. (1996) Design and preparation of sequence-specific RNase P ribozymes. In: P.C.Turner (ed.) Ribozyme protocols. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, N.J. (USA).
- Lyngstadaas, S.P., Risnes, S., Sproat, B.S., Thrane, P.S., and Prydz, H.P. (1995). Asynthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel in vivo. *EMBO* 21, 5224-5229.
- Mickey, M.R., Carnahan, B., and Terasaki, P.J. (1985). Effectiveness of zero, A, B and DR mismatch for cadaver kidneys. *Transplant Proc.* 17, 2222
- Milne, D.S., Gascoigne, A.D., Wilkes, J., Sviland, L., Ashcroft, T., Malcom, A.J., Corris, P.A. (1994). MHC class II and ICAM-1 expression and lymphocyte subsets in transbronchial biopsies from lung transplant patients. *Transplantation* 57, 1762-1766.
- Müller, H., Albrecht, J., and Schabel, A. (1987). HLA-Typisierung mit monoklonalen Antikörpern und kalibrierter Durchflußzytometrie. *Clin. Chem.* 33, 1619-1623.
- Neufeld, D., Lahat, N., Graves, P., Gillon-Peled, M., Kraiem, Z., Davied, T. (1993). HLA-DR alpha gene regulation in immortalized human thyroid cancer cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67(2), 151-156
- Opelz, G. (1985). Effect of HLA matching, blood transfusions and presensitization in cyclosporine-treated kidney transplant recipient. *Transplant Proc.* 17, 2179
- Ruffner, D.E., Stormo, G.D., and Uhlenbeck, O.C. (1990). Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleaving reaction. *Biochemistry* 29, 10695-10702.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarver, N., Cantin, E.M., Chang, P.S., Zaia, J.A., Ladne, P.A., Stephens, D.A., and Rossi, J.J. (1990). Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 247, 1222-1225.
- Shigekawa, K. and Dower, W.J. (1988). Electroporation of eucaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6, 742-750.
- Sioud, M., Natvig, J.B., and Forre, O. (1992). Preformed ribozyme destroys tumor necrosis factor mRNA in human cells. *J. Mol. Biol.* 223, 831-835.

- Sioud, M. and Drlica, K. (1991). Prevention of human immunodeficiency virus type 1 integrase expression in *Escherichia coli* by a ribozyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88, 7303-7307.
- Steinhoff, G., Wonigeit, K., Schäfers, H.-J., Haverich, A. (1989). Sequential analysis of monomorphic and polymorphic mhc antigen expression in human allograft biopsy specimens. *J. Heart. Transpl.* 8, 360-370.
- Symons, R.H. (1992). Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 641-671.
- Tuner, M. and Owen, M. (1995). Rezeptormoleküle, die Antigene binden. In: *Kurzes Lehr-buch der Immunologie*. M. Roitt, J. Brostoff, and D. Male, Thieme, Stuttgart, pp. 43-61.
- Uhlenbeck, O.C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328, 596-600.
- Ventura, M., Wang, P., Ragot, T., Perricaudet, M., and Saragosti, S. (1993). Activation of HIV-specific ribozyme activity by self-cleavage. *Nucleic. Acids. Res.* 21, 3249-3255.
- Wang, S.J. and Dolnick, B.J. (1993). Quantitative-evaluation of intracellular sense-antisense RNA hybrid duplexes. *Nucleic Acids Res.* 21, 4383-4391.

Anhang



Anhang A: Beispiel für die in der Sequenzierung gewonnenen Daten (hier Ribozymsequenzen von pcDNA3DRBall, zwischen Base 21 und Base 59).

Name	Sequenz des Oligonukleotids	Orientierung	Länge, Schmelzpunkt (T_M , nur bei Primern)	Verwendung
B 0101/13	5' GCA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TT 3'	vorwärts	26 mer, 76°C	Typisierung
B 0101/70	5' CAC CGC GGC CCG CCT CT 3'	rückwärts	17 mer, 62°C	Typisierung
B 1501/13	5' CAC GTT TCC TGT GGC AGC CTA AGA 3'	vorwärts	24 mer, 74°C	Typisierung
B 1501/67	5' CCG CGC CTG CTC CAG GAT 3'	rückwärts	18 mer, 62°C	Typisierung
B 0301/26	5' GGA CGG AGC GGG TGC GGT A 3'	vorwärts	19 mer, 66°C	Typisierung
B 0301/86	5' CGC TGC ACT GTG AAG CTC TCC A 3'	rückwärts	22 mer, 70°C	Typisierung
B 0401/13	5' GCA CGT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C 3'	vorwärts	25 mer, 74°C	Typisierung
ACTMRHV	5' GAC GAG GCC CAG AGC AAG AG 3'	vorwärts	20 mer, 56°C	RT-PCR
ACTMRHR	5' ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC 3'	rückwärts	20 mer, 56°C	RT-PCR
CR3	5' CCT CAG AAG CCA TAG A 3'	rückwärts	16 mer, 48°C	Screening
CRZR5	5' CTG ATG AGT CCG TGA G 3'	vorwärts	16 mer, 50°C	Screening, RT-PCR
DR010204	5' AAT TCA AGA GGA GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG CGT GCG CTT CGG TAC 3'	rückwärts	51 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
DR04	5' AAT TCT GGA GCA GGT TTC GTC CTC ACG GAC TCA TCA GAA ACA TGA GTG GTA C 3'	rückwärts	52 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
DRBalls	5' GGG GTA CCA ACC CCG CTG ATG AGT CCG TGA GGA 3'	vorwärts	34 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
DRBalls	5' GGG GTA CCA ACC CCG CTG ATG AGT CCG TGA GGA 3'	vorwärts	34 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
SCR124RP	5' GGG GTA CCA AGA GGA GTC CGT GCG CTT CGG TGA CGA AGC GCA CGC TGA TG 3'	vorwärts	50 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
SCR124RM	5' CCG AAT TCA AGA GGA GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG CGT GCG CTT CGT C 3'	rückwärts	52 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
SCR4RP	5' GGG GTA CCT GGA GCA GGT TAA ACA TGA GTG GTG ACA CTC ATG TTT CTG ATG 3'	vorwärts	51 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
SCR4RM	5' CCG AAT TCT GGA GCA GGT TTC GTC CTC ACG GAC TCA TCA GAA ACA TGA GTG TCA 3'	rückwärts	54 mer	Ribozym-codierende Sequenz/Klonierung
prepA	5' AGG AAA GGA CAG TGG G 3'	rückwärts	16 mer	Screening, RT-PCR
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT 3'	rückwärts	21 mer, 54°C	Screening
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	vorwärts	20 mer, 56°C	Sequenzierung, Screening

Anhang B: Tabelle der Oligodesoxynukleotide

Danksagung

Mein Dank richtet sich zuerst an Herrn Prof. Dr. Martin Krönke. Durch seine Einwilligung ermöglichte er mir die Ausführung dieser Arbeit.

Bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Matthias Marget bedanke ich mich für die ausgezeichnete Betreuung, die stets ein offenes Ohr und die geduldige Bereitschaft zur Weitergabe seines Wissens beinhaltet.

Für die ausgezeichnete technische Assistenz und den Beitrag zu einem heiteren Arbeitsklima möchte ich mich bei Kathrin Jepsen, Parvin Gholamibajestani und Monika Kunz bedanken.

Allen anderen Personen, die in irgendeiner Weise an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren, sei ebenfalls an dieser Stelle gedankt.