

**I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität
München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)**

**IL-1ra hemmt die IL-1-induzierte IL-6-Produktion
Vergleich der Genkonstrukte p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra**

Luise Masami Schmidt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Honorar-Prof. Dr. F.-J. Neumann, Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 21.11.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

1	Einleitung	8
2	Grundlagen	10
2.1	Restenose	10
2.2	Zytokine und Wachstumsfaktoren	11
3	Material und Methoden	14
3.1	Zellkultur	14
3.2	Genkonstrukte	16
3.3	In-vitro Liposomale Transfektion	18
3.4	Transfektionsversuche	19
3.4.1	Vektoren im Vergleich	19
3.4.2	Transfektionsreagenzien im Vergleich	19
3.4.3	Optimierung der Transfektion mit FuGENE 6	20
3.5	DNA-Präparation	20
3.5.1	Transformation	20
3.5.2	Präparation von DNA (Maxi-Präp)	21
3.5.3	Kontrollverdau und Gelelektrophorese	21
3.6	ELISA	22
3.7	Gewinnung des Proteins IL-1ra	23
3.8	Hemmversuche	23

3.8.1	Expression von IL-6 in 293T-Zellen nach Inkubation mit IL-1 β und IL-1ra	23
3.8.2	Expression von IL-6 in 293T-Zellen in Abhängigkeit von der IL-1ra-Konzentration.....	24
4	Ergebnisse	26
4.1	Transfektion verschiedener Zellen mit p-Track-IL-1ra und p-IRES-IL-1ra: Expression von GFP und IL-1ra.....	26
4.2	Vergleich von Promega mit FuGENE 6 durch Transfektion von p-Track-IL-1ra in pEC und 293T-Zellen.....	31
4.3	Konzentrationsabhängige Hemmung von IL-6 durch IL-1ra in 293T-Zellen.....	33
5	Diskussion	35
5.1	p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra	35
5.2	Konzentrationsabhängige Hemmung der IL-6-Expression durch IL-1ra.....	36
5.3	Therapeutischer Einsatz von p-Track-IL-1ra?.....	37
6	Zusammenfassung.....	40
7	Literaturverzeichnis.....	41
8	Danksagung.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zahl der Interventionen in USA und Europa [Topol, 1998 #81].....	8
Abbildung 2: Die Effekte von IL-1 und IL-1ra [Dinarello, 2000 #21].....	12
Abbildung 3: p-IRES2-EGFP	17
Abbildung 4: pAdTrack –CMV	17
Abbildung 5: Vergleich zwischen p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra.....	19
Abbildung 6: Bestimmung der IL-6-Expression nach Inkubation mit IL-1ra und IL-1 β	24
Abbildung 7: IL-6-Expression in Abhängigkeit der IL-1ra-Konzentration.....	25
Abbildung 8: GFP-Expression in 293T-Zellen nach Transfektion mit p-IRES-IL- 1ra.....	26
Abbildung 9: IL-1ra-Expression mit und ohne Transfektion mit p-IRES-IL-1ra .	27
Abbildung 10: GFP-Expression in 293T-Zellen nach Transfektion von p-Track- IL-1ra.....	28
Abbildung 11: IL-1ra-Expression mit und ohne Transfektion mit p-Track-IL-1ra	28
Abbildung 12: Vergleich der IL-1ra-Expression nach Trnsfektion mit p-IRES-IL- 1ra bzw. p-Track-IL-1ra.....	30
Abbildung 13: IL-1ra-Expression: Promega – FuGENE 6.....	31
Abbildung 14: DNA-FuGENE 6-Verhältnis: IL-1ra-Expression	32
Abbildung 15: IL-6-Expression: Inkubation von 293T-Zellen mit IL-1 β und IL- 1ra.....	34

Abbildung 16: IL-6-Expression in Abhängigkeit von der IL-1ra-Konzentration:

Koinkubation von IL-1 β und IL-1ra34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verhältnis von DNA zu FuGENE 6	20
Tabelle 2: IL-1ra-Expression mit und ohne Transfektion mit p-Track-IL-1ra	29
Tabelle 3: IL-1ra-Expression nach Transfektion mit p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra.....	30
Tabelle 4: Vergleich Promega - FuGENE 6	31

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
CDK	cyklin-dependent kinase
CIP-1	CDK-interacting protein-1 (p21)
CRP	C-reaktives Protein
CSF	colony stimulation factor
EDRF	endothelial derived relaxation factor
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GFP	green fluorescent protein
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-6	Interleukin-6
KDa	kilo Dalton
LBP	Lipoprotein-bindendes Protein
LDL-R	Low density lipoprotein-receptor
LPS	Lipopolysacharide
NF-kappaB	nuclear factor-kappaB
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
pEC	porcine Endothelzellen
PF4	platelet factor 4

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pSMC	porcine glatte Muskelzellen
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RB	Riboblastomprotein
SDI-1	senescent cell-derived inhibitor-1 (p21)
TGF-β	transforming growth factor-β
TLR	Toll-like-Receptor
TNF	Tumornekrose Faktor
WAF-1	wild-type p53 activated fragment 1 (p21)

1 Einleitung

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) hat sich seit ihrer Einführung 1978 zu einem sicheren Verfahren zur Revaskularisierung von Koronarstenosen entwickelt. Vor allem die Entwicklung und Modifikation von Ballon- und Schaftmaterialien sowie die Entwicklung neuer Verfahren, wie die Stentimplantation, führten zu der enormen Indikationserweiterung. Gegenwärtig werden jedes Jahr ca. eine Million PTCA auf der gesamten Welt durchgeführt^{11,55}. In den USA und in Europa hat sich die Zahl der Interventionen in den letzten fünf bis sechs Jahren verdoppelt⁸¹(siehe Abb.1).

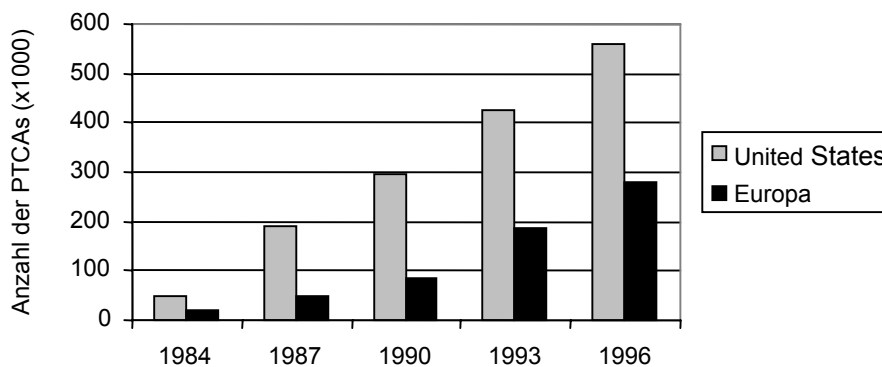


Abbildung 1: Zahl der Interventionen in USA und Europa [Topol, 1998 #81]

Eine häufige Komplikation dieser Methode ist jedoch die Restenose. Etwa jeder dritte Patient entwickelt innerhalb von sechs Monaten nach Angioplastie eine Wiedereinengung des Gefäßlumens im Bereich der Intervention, die eine erneute Dilatation erforderlich macht^{8,24,41,43}. Inzwischen handelt es sich bei ca. einem Viertel aller PTCA um Reinterventionen⁸¹. Allein für die Behandlungen dieser Komplikation ergeben sich in den USA jährlich Kosten von über 3 Milliarden Dollar⁸⁰.

Durch die Einführung der Stent-Technik konnte die Häufigkeit der Restenose nur um etwa 10% gesenkt werden. Der Versuch, den lokalen restenosierenden Prozeß mittels systemischer Pharmakotherapie zu supprimieren, war nicht erfolgreich.

Diese Beobachtungen führten zu dem Konzept der lokalen Therapie der Restenose. Der lokal-vaskuläre Gentransfer bietet die Möglichkeit, therapeutisch wichtige Proteine, wie IL-1ra, Vascular endothelial growth factor (VEGF) und fibroblast growth factor (FGF) ⁸⁵ zu überexprimieren.

Interleukin-1 (IL-1) ist über vielseitige Effekte ^{9,10,12,18,44,45,57,71,75} in die Entstehung der Restenose verwickelt. Seine kompetitive Hemmung durch den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) könnte zur Bekämpfung der Restenose beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die in unserer Arbeitsgruppe klonierten Genkonstrukte p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra getestet. Beide Konstrukte tragen den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) als Zielgen und GFP als Reportergen. Insbesondere wurde die Funktionstüchtigkeit der Genkonstrukte mittels Fluoreszenzmikroskopie und ELISA geprüft. Des Weiteren wurde die Wirkung von IL-1ra auf Interleukin-6 (IL-6) und PDGF (platelet derived growth factor) in 293T-Zellen untersucht.

Diese Untersuchungen erfolgten in Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von IL-1ra zur Hemmung neointimaler Proliferation nach vaskulärem Trauma.

2 Grundlagen

2.1 Restenose

Bei der Restenose handelt es sich um eine Wiedereinengung eines dilatierten Gefäßabschnittes von 50% oder mehr innerhalb der ersten sechs Monate nach perkutaner Revaskularisierung. Heute werden vor allem drei Prozesse (Phasen) für die Entstehung der Restenose verantwortlich gemacht²⁵. In der Phase I kommt es durch die elastische Rückstellkraft der Gefäßwand innerhalb von Minuten bis Stunden zu einer Wiedereinengung des dilatierten Gefäßabschnittes, genannt „early recoil“^{20,63,65,68-70}. Patienten, die innerhalb von 24 Stunden einen Lumenverlust von 10% oder mehr aufwiesen („early recoil“), zeigten nach sechs Monaten eine Restenoserate von 74%. Patienten ohne einen „early recoil“ entwickelten nur in 10% der Fälle eine manifeste Restenose⁶⁸. Die Phase II wird von der Thrombusentstehung und -organisation bestimmt. Sie werden durch die Verletzung der Arterienwand ausgelöst. Einrisse in der Endothelschicht führen zur Exposition von subendothelialen Bestandteilen, wie Kollagen, von Willebrand Faktor, Fibronectin und Vitronectin⁸¹ und zu einer Induktion prokoagulatorischer Faktoren⁶⁴. Diese Matrixbestandteile werden von Oberflächenrezeptoren (v.a. Glykoprotein Ib und Integrine) der Thrombozyten erkannt, und vermitteln die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand. Aktivierte Thrombozyten stimulieren die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Tissue Growth Factor Beta (TGF- β), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Interleukin-1^{40,46,48,72}. In der Phase III führen diese Faktoren zu einer Aktivierung glatter Muskelzellen und zur Synthese extrazellulärer Matrix^{64,81}. Es kommt zur Vermehrung glatter Muskelzellen in der Tunica media mit anschließender Migration in die Tunica intima (neointimale Hyperplasie)¹⁷.

2.2 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Interleukin-1 (IL-1)

Interleukin-1 (IL-1) ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin. IL-1 ist beteiligt an Prozessen der Immunabwehr, Entzündungsreaktion und der Wundheilung (siehe Abb.2)^{9,10,12,18,44,45,57,71,75}.

Die Bedeutung von IL-1 bei der Entwicklung der Restenose Schon seit einiger Zeit wurde vermutet, dass die Entzündungsreaktion einen wesentlichen Mechanismus zur Entstehung der Restenose darstellt^{42,77}. Kornowski konnte 1998 die positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Entzündungsreaktion und der Dicke des neointimalen Gewebes zeigen³⁶. Als proinflammatorisches Zytokin induziert IL-1 die Expression einer Vielzahl weiterer Zytokine (**Interleukin-6**, Interleukin-8, Akute-Phase-Proteine) und Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und Prostaglandinen (PGE₂)^{19,21,62}. IL-1 stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen der Gefäßwand (VSMCs)^{12,44,45} und die Produktion extrazellulärer Matrix⁵⁷. Es fördert die Gerinnung^{9,75} und die Anheftung von Leukozyten an das Endothel^{10,18,71}, also die Invasion von Leukozyten in das Entzündungsgebiet^{51,73,74}. Desweiteren nimmt IL-1 Einfluß auf den Metabolismus von low density Lipoproteinen (LDL)^{37,67}, steigert die Gefäßpermeabilität⁵³ und unterdrückt die Gefäßkontraktilität⁵⁴.

Interleukin-1 existiert in zwei funktionell nahezu identischen Formen, Interleukin-1 α (17 kDa, 159 AS) und Interleukin-1 β (17 kDa, 153 AS), und wird von zwei separaten Genen auf dem Chromosom 2 kodiert.

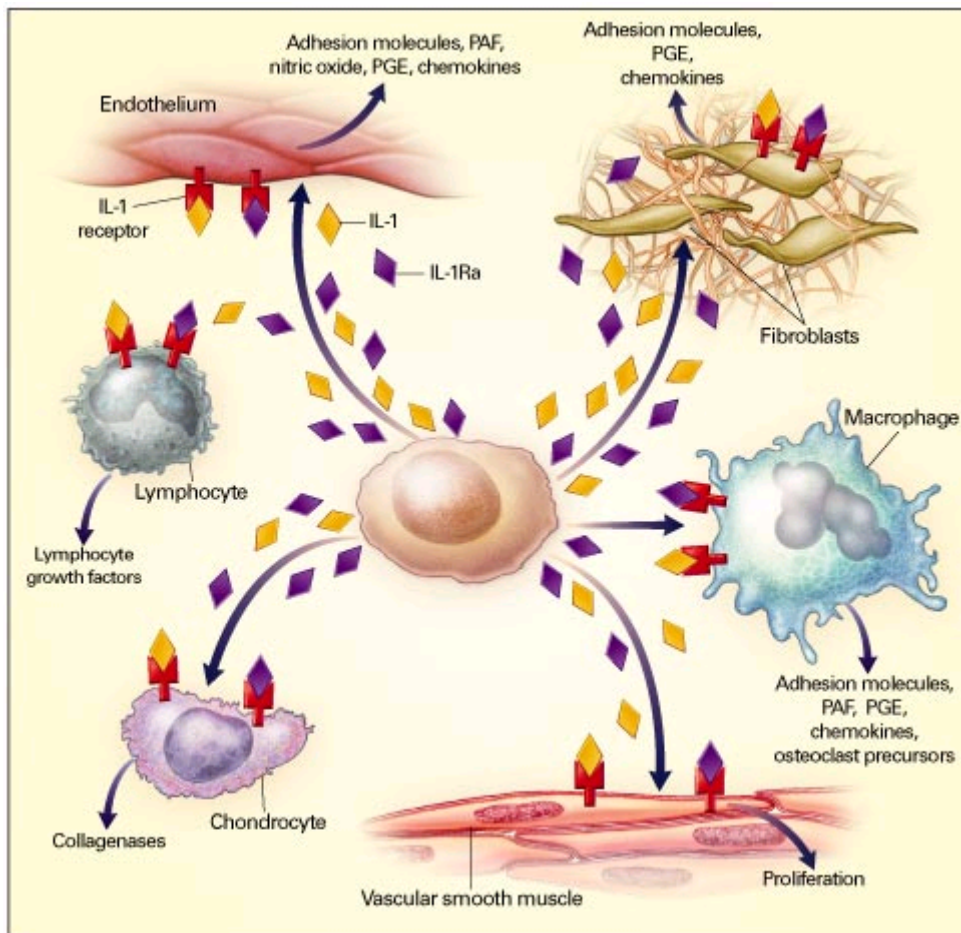


Abbildung 2: Die Effekte von IL-1 und IL-1ra [Dinarello, 2000 #21]

Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra)

Der Interleukin-1 Rezeptorantagonist steht in kompetitiver Hemmung zu IL-1. IL-1ra bindet an den IL-1-Rezeptor ohne intrazelluläre Reaktionen hervorzurufen. Auf diese Weise hemmt IL-1ra die Wirkungen IL-1 vermittelter Prozesse^{1,22}. Proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1⁷ und Interleukin-6⁷⁹, induzieren die Produktion des sekretorischen IL-1ra (sIL-1ra) in Hepatozyten. IL-1ra wird deshalb als eine Art Akute-Phase-Proteins betrachtet^{4,26}.

IL-1ra existiert in drei gut charakterisierten Isoformen. Das 17-kDa *sekretorische* IL-1ra (sIL-1ra) und das 18-kDa *intrazelluläre* IL-1ra (icIL-1raI) entstehen durch

alternative Transkription des IL-1ra-Gens. Dieses befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 2⁴. Das kürzlich beschriebene 16-kDa IL-1ra (icIL-1raII) entsteht durch alternative Translationsinitiation der sIL-1ra-mRNA. Es befindet sich intrazellulär^{4,52}.

Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin-6 besitzt ein breites Wirkspektrum. Es ist ein zentrales Regulatormolekül für Immun- und Entzündungsprozesse. Als proinflammatorisches Zytokin zählt es zu den Hauptinduktoren der Akute-Phase-Reaktion. Interleukin-6 führt zu einer Vermehrung der Thymozyten, und steigert die Differenzierung von B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und von T-Lymphozyten zu zytotoxischen Effektorzellen. In der Onkologie dient IL-6 bislang zur Graduierung der Aktivität von Myelomen.

Der Serumspiegel von IL-6 ist ein starker Prädiktor für die Prognose von herzinsuffizienten Patienten. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß es nach perkutaner Revaskularisierung zu einem Anstieg der Interleukin-6-Konzentration im Koronar-Sinusblut kommt. Die IL-6-Konzentrationen waren bei Patienten, die im Verlauf eine Restenose entwickelten, höher, als bei denjenigen ohne Restenosierung. Es wird vermutet, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der späten Restenose spielt, indem es die Entzündungsreaktion in den verletzten Gefäßarealen fördert³¹.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

ECV-304 (ECV)

Die Zelllinie ECV-304 ^{32,76} wurde 1984 aus der Nabelschnurvene eines neugeborenen japanischen Jungen gewonnen. Die Zellen wurden lange Zeit für Endothelzellen gehalten, genauere Analysen haben jedoch gezeigt, daß es sich hierbei eigentlich um ein Derivat der humanen Harnblasen-Carcinom-Zelllinie T-24 handelt ^{16,23}. ECV- Zellen haben ein hohes proliferatives Potential auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Es handelt sich um adhärenente Zellen mit einem pflastersteinartigen einschichtigen Wachstum. Das Medium setzte sich zusammen aus 90% Medium-199 (Sigma), 5-10% FCS (Gibco), 2% Penicillin/Streptomycin (Sigma) und ca. 0,3% L-Glutamin (Sigma).

293T-Zellen

Die 293T-Zelllinie stellt eine Variante der 293 Zellen dar, in die ein temperatursensitives SV 40 langes T-Antigen eingefügt wurde⁴⁹. 293-Zellen, oder auch 293 HEK-Zellen, sind humane embryonale Nierenzellen, die primär aus einer humanen Niere gewonnen wurden ²⁷. Morphologisch handelt es sich um adhärenente fibroblastische Zellen, welche als Monolayer wachsen. Das Medium setzte sich zusammen aus 90% Dulbecco`s MEM mit Glutamax-I (Gibco BRL, Life Technologies), 10% FBS (Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma).

Primäre Endothelzellen vom Schwein (pEC)

Primäre Endothelzellen wurden aus frisch resezierten Aorten von Schweinen gewonnen. Der resezierte Teil der Aorta (Aorta ascendens, Aortenbogen, Aorta descendens und Aorta abdominalis) wurde zum Transport in eine Flasche mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gegeben. Auf einer sterilen Unterlage

wurden perivaskuläres Bindegewebe und anhaftendes Blut entfernt. Anschließend wurde die Aorta der Länge nach, entlang der abgehenden Gefäße, gespalten und mit der Gefäßseite nach oben in einer Petrischale aufgespannt. Eine Mischung aus Trypsin (10 ml), CaCl₂ (100 µl) und Kollagenase (10 mg) wurde auf die Aorta gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation im Brutschrank (37°C und 5% CO₂) wurde das Trypsin-Gemisch samt gelöster Endothelzellen in ein 50-ml-Falkon überführt. Die Aorta wurde zweimal mit je 10 ml Vollmedium gespült, um eventuell anhaftende Endothelzellen zu lösen. Dieses Medium wurde in dasselbe Falkon pipettiert, und anschließend für zehn Minuten bei 1300 Umdrehungen pro Sekunde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml Vollmedium aufgenommen. Je 10 ml davon wurden schließlich in Kulturflaschen überführt und über Nacht kultiviert. Vitale Zellen waren am nächsten Tag bereits adhärent, tote Zellen wurden mit dem Mediumwechsel entfernt. Für folgende Versuche wurden Zellen der zweiten Passage verwendet. Das Medium setzte sich zusammen aus M199 (500 ml, Sigma), FCS (20 ml, Gibco), Penicillin/Streptomycin (10 ml, Sigma) und L-Glutamin (1,3 ml, Sigma).

Primäre glatte Muskelzellen vom Schwein (pSMC)

Primäre glatte Muskelzellen wurden aus frisch explantierten Aorten vom Schwein gewonnen. Der Transport und die Vorbereitung der Aorta wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt (s.o.). Nachdem die Aorta aufgespannt in der Petrischale lag, wurde steriles PBS hinzugefügt, um die Aorta vor dem Austrocknen zu schützen. Die Endothelzellen wurden mit einem sterilen Skalpell abgeschabt, anschließend wurde das PBS samt Endothelzellen abgesaugt. Um Endothelzellreste zu entfernen, wurde die Aorta zweimal mit sterilem PBS abgespült und anschließend in kleine Stückchen (0,5 cm x 0,5 cm) geschnitten. Fünf bis sechs dieser Stückchen wurden zum Auswachsen glatter Muskelzellen mit der luminalen Seite nach unten in Kulturflaschen (75mm²) unter Zugabe von 2 ml Vollmedium plziert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂

wurden weitere 8 ml Vollmedium pro Flasche hinzugefügt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig gewechselt, ohne dabei die Position der Aortenstückchen zu verändern. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert. Nach ca. einer Woche konnte man im Lichtmikroskop das Auswachsen glatter Muskelzellen vom Rand der Aortenstückchen beobachten.

Die Identifikation der glatten Muskelzellen erfolgte immunzytochemisch mit Antikörpern gegen *smooth muscle myosin* (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Zellen der zweiten bis fünften Passage wurden für unsere Versuche eingesetzt. Das Medium setzte sich zusammen aus 1/3 SmBN (+Zusätze, Clonetics), 2/3 DMEM+ 25mM Hepes (Gibco BRL), 50ml FCS (Gibco BRL, Live Technologies), Penicillin/Streptomycin (5 ml, Sigma) und L-Glutamin(5 ml, Sigma).

3.2 Genkonstrukte

Die Genkonstrukte *p-IRES-IL-1ra* und *p-Track-IL-1ra* wurden in unserer Arbeitsgruppe kloniert. Sie enthalten jeweils IL-1ra als Zielgen und green fluorescent protein (GFP) als Reporter gen. IL-1ra wurde aus dem 3.1+Vektor herausgeschnitten und in die Vektoren pAdTrack-CMV (9220 bp) und p-IRES2-EGFP (5300 bp) subkloniert. Schnittstellen für pAdTrack-CMV waren ECO RV und HIND III, für pIRES2-EGFP NHE I und ECO RI. (siehe Abb.3+4)

p-IRES2-EGFP enthält die interne Zugangsstelle (internal ribosome entry site: IRES; 1,2) des Encephalomyocarditis Virus (ECMC) zwischen der MCS (multiple cloning site) und der Region, die das GFP (green fluorescent protein) kodiert. Das Zielgen und das Reporter gen (GFP) werden von einer bicistronischen mRNA translatiert ⁸⁴ (siehe Abb.3).

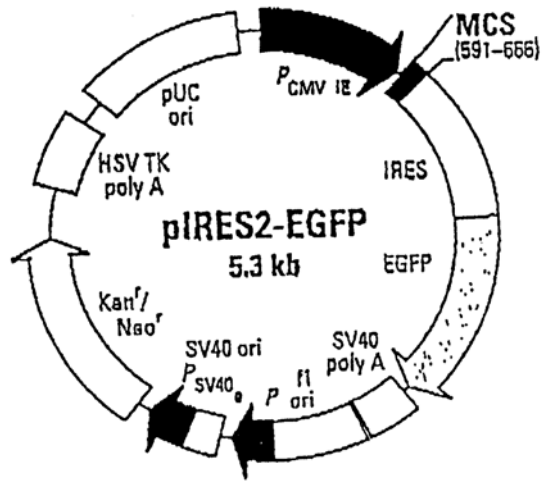


Abbildung 3: p-IRES2-EGFP

pAd-Track-CMV ein adenoviraler Shuttle Vektor, der jeweils vor dem Zielgen und dem Reporter gen GFP einen Promotor enthält³⁰ (siehe Abb.4).

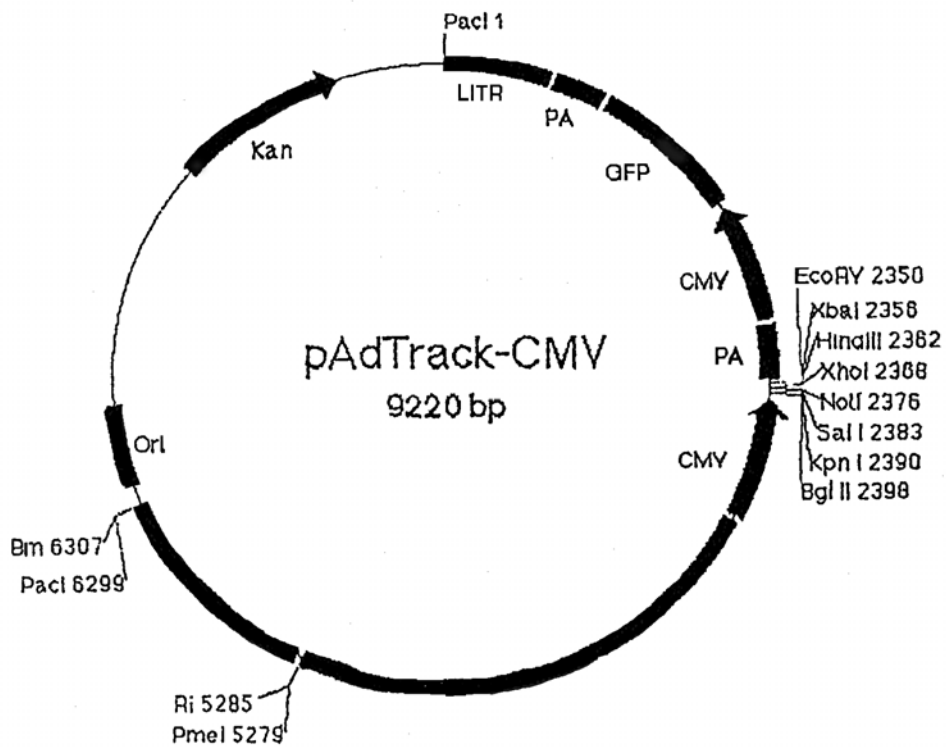


Abbildung 4: pAdTrack –CMV

3.3 In-vitro Liposomale Transfektion

Die liposomale Transfektion dient der nicht-viralen Einschleusung heterologer DNA in Eukaryontenzellen. Zu den gängigen Verfahren dieses Gentransfers gehört die Methode mit Calcium-Phosphat, DEAE-Dextran, die Elektroporation und die Fusion mit DNA-haltigen Liposomen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Gentransfer durch liposomale Transfektion mit Hilfe zweier Transfektionsreagenzien (Promega, FuGENE 6). Hierzu wurden ECV-Zellen, 293T-Zellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen vom Schwein (pEC) in 6-Loch-Platten ausgesät, und bei einer Konfluenz von 70-80% entsprechend der handelsüblichen Protokolle mit p-IRES-IL-1ra oder p-Track-IL-1ra transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis von exprimierten GFP (green fluorescent protein) kontrolliert und mittels ELISA quantifiziert.

Promega Für die Transfektion der genannten Zellen wurde das Transfectam® Reagent for the Transfection of Eukaryotic Cells (Promega Corporation) verwendet. Serumhaltiges Medium wurde aus der jeweiligen Vertiefung entfernt und durch 250 µl serumfreies Medium ersetzt. Eine Mischung aus serumfreiem Medium, 2-3 µg DNA und 4 µl des Transfectam Reagent wurde hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation wurden 1,4 ml Vollmedium hinzugegeben. Die Transfektionseffizienz wurde nach 48 Stunden beurteilt.

FuGENE 6 Das FuGENE 6- Transfektionsreagenz (Roche) besteht aus einer Mischung aus Lipiden und Lipoproteinen. Als lipidisches Transfektionsreagenz hilft es DNA in Zellen einzuschleusen. Es bildet im Gegensatz zu dem Transfectam® Reagent von Promega keine Liposomen im eigentlichen Sinne. Es wird jedoch wie ein liposomales Transfektionsreagenz verwendet. Für die Transfektion mit FuGENE 6 wurde ein Komplex aus 3-6 µl des FuGENE-Reagent, 1-2 µg der DNA und 1 ml Vollmedium in jede Vertiefung gegeben.

3.4 Transfektionsversuche

3.4.1 Vektoren im Vergleich

Der Vergleich der Vektoren wurde unter Verwendung von FuGENE 6 als Transfektionsreagenz durchgeführt. Porcine Endothelzellen, porcine glatte Muskelzellen, ECV-Zellen und 293T-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät, und mit p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra transfiziert. Ein well diente als Negativkontrolle und wurde nicht manipuliert (\emptyset) (siehe Abb.5). Die Transfektionseffizienz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und ELISA gemessen.

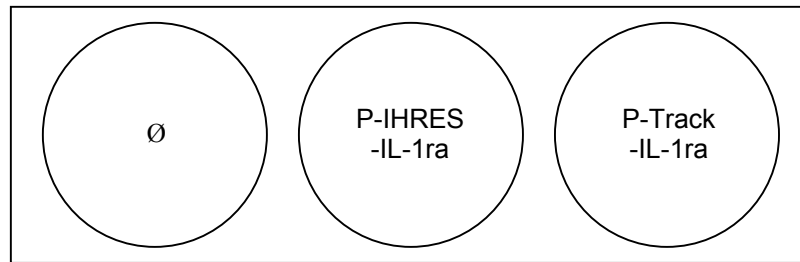


Abbildung 5: Vergleich zwischen p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra

3.4.2 Transfektionsreagenzien im Vergleich

Die beiden Transfektionsreagenzien wurden unter Verwendung von p-Track IL-1ra in verschiedenen Zelllinien (pEC, ECV, pSMC, 293T-Zellen) verglichen. Die Beurteilung der Transfereffizienzen erfolgte durch direkten Vergleich der Transferraten im Fluoreszenzmikroskop und der mittels ELISA gemessenen IL-1ra-Konzentrationen.

3.4.3 Optimierung der Transfektion mit FuGENE 6

293T-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und mit p-Track-IL-1ra transfiziert. Es wurden verschiedene DNA/ FuGENE-Reagent-Ratios getestet (siehe Tabelle1). Das Ergebnis wurde 48 Stunden nach Transfektion im Fluoreszenzmikroskop beurteilt, und mittels ELISA quantifiziert.

Tabelle 1: Verhältnis von DNA zu FuGENE 6

DNA (μg)	FuGENE-Reagent (μl)
2	3
1	3
1	6

3.5 DNA-Präparation

3.5.1 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen. Fast alle Bakterienarten können DNA-Moleküle aus ihrem Kulturmedium aufnehmen. Die meisten von ihnen, darunter auch E.coli, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Unter solchen Umständen muß man die Zellen einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterziehen, die ihre Fähigkeit, DNA in ihr Inneres aufzunehmen, verstärkt.

Kompetente E.coli-Zellen (50 μl) wurden mit DNA (50ng) versetzt, und zehn Minuten auf Eis gekühlt. Darauf folgte eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C, bei der die eigentliche Wanderung der DNA, in die Zellen hinein, erfolgte. Die Zellen wurden für zwei weitere Minuten mit auf Eis gestellt, und mit kaltem SOC-Medium (250 μl) versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C im Shaker wurden je 250 μl der Lösung auf einer Agarplatte ausgestrichen, und über

Nacht im Brutschrank (37°C) kultiviert. Für eine anschließende Präparation der DNA wurden Klone gepickt und in 200 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) überführt.

3.5.2 Präparation von DNA (Maxi-Präp)

Die Methode der Präparation von DNA aus einer Kultur läßt sich in vier Schritte unterteilen:

- 1.) Bakterien werden vermehrt
- 2.) Zellen werden desintegriert und die DNA freigesetzt
- 3.) Zellbestandteile außer der DNA werden aus dem Zellextrakt entfernt
- 4.) DNA-Lösung wird angereichert

Für die Reinigung der DNA (p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra) wurde das *EndoFree™ Plasmid Maxi-Kid* von Quiagen verwendet. Die Präparation wurde entsprechend des Protokolls durchgeführt.

3.5.3 Kontrollverdau und Gelelektrophorese

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche DNA an bestimmten Erkennungssequenzen, spalten. Jedes Restriktionsenzym schneidet DNA an *seiner* spezifischen Erkennungssequenz. So ergeben sich durch den Verdau charakteristische Genfragmente, die in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Die DNA trägt eine negative elektrische Ladung, die sie in einem elektrischen Feld dazu bringt, in Richtung des positiven Pols zu wandern. Zudem enthält das Gel ein kompliziertes System von Poren, das kleinere DNA-Fragmente schneller durch das Gel laufen läßt. So werden in der Gelelektrophorese DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Sichtbarmachen des Ergebnisses erfolgt durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid, welches sich in die DNA einlagert. Die fluoreszierenden Banden im ultravioletten Licht entsprechen den verschiedenen Größenklassen der DNA-Fragmente. Zur Größenabschätzung dienen Restriktionsfragmente bekannter Größe (Gen Molekular Weight Marker).

p-IRES-IL-1ra wurde durch das Restriktionsenzym *Bam HI* (BioLabs) linearisiert. 1 µg DNA, 100 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumine), 1 µl NE-

Puffer, 6 µl sterilisiertes Wasser und 100 units/ml des Restriktionsenzym wurden zusammen bei 37°C sechs Stunden inkubiert.

p-Track-IL-1ra wurde durch das Restriktionsenzym *Pac I* (BioLabs) geschnitten. 1 µg DNA, 100 µg/ml BSA, 10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol und 100 units/ml wurden bei 37°C sechs Stunden inkubiert.

Die Größenabschätzung beider Genkonstrukte erfolgte mit Hilfe des DNA Molekular Weight Marker VII (Roche Molecular Biochemicals). Dieser Marker besteht aus 17 Fragmenten, von denen das kleinste 81 bp und das größte 8576 bp lang ist. Eine Gelelektrophorese (1% Agarose Gel) wurde angeschlossen.

3.6 ELISA

Im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) können Proteine und andere Substanzen nachgewiesen werden. Spezifische Antikörper gegen die zu messende Substanz (Antigene) sind an die Wand des Probengefäßes gebunden. An sie lagern sich Antigene aus der Probenlösung an. Enzym-tragende Antikörper werden zugesetzt, die an jedes, im ersten Schritt fixierte, Antigenmolekül binden. Die Enzymaktivität des über Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich-Technik) mit der Röhrenwand verbundenen Enzyms wird nach Zugabe des entsprechenden Substrates photometrisch gemessen. Dabei ist die Substratumsetzung dem Enzymgehalt und somit auch dem Antigengehalt direkt proportional.

Konzentrationen des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, Interleukin-6 und PDGF mittels ELISA gemessen. Für den Nachweis des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten wurde der human-IL-1ra-ELISA-Kit von Quantikine (R&D Systems) verwendet. Interleukin-6 wurde mit Hilfe des IL-6-ELISA-Kits von Milenia (DPC), PDGF mit dem human-PDGF-AB-ELISA-Kit von Quantikine (R&D Systems) nachgewiesen.

3.7 Gewinnung des Proteins IL-1ra

293T-Zellen wurden mit dem Genkonstrukt p-Track-IL-1ra transfiziert. 293T-Zellen wurden in 75mm²-Kulturflaschen ausgesät, und bei einer Konfluenz von 80-90% mit Hilfe von FuGENE 6 transfiziert. Dabei wurden 4 µg DNA und 18µl FuGENE-Reagent pro 75mm²-Kulturflasche eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde der Überstand (12 ml) in ein 15-ml-Falcon überführt, und mittels ELISA die IL-1ra-Konzentration darin bestimmt.

3.8 Hemmversuche

3.8.1 Expression von IL-6 in 293T-Zellen nach Inkubation mit IL-1β und IL-1ra

293T-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70-90%, wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch je 1 ml serumfreies Medium ersetzt. IL-1ra (5000 pg/ml), IL-1β (50 pg/ml) (Calbiochem®) und/oder „Medium“ (500 µl) wurden hinzugegeben (s.Abb). Die Zugabe des „Mediums“ (Medium nach 24-stündiger Inkubation mit 293T-Zellen) sollte klären, ob Stoffwechselprodukte der Zellen zu einer Änderung der Expression von IL-6 führten. Der Einfluss des „Mediums“ musste untersucht werden, da das durch die Transfektion von 293T-Zellen mit p-Track-IL-1ra gewonnene IL-1ra im Medium von 293T-Zellen gelöst vorlag (siehe 3.7). Nach 24-stündiger Inkubation (37°C 5% CO₂-Anteil der Luft) der 293T-Zellen mit dem jeweiligem Zusatz wurden die Überstände in Reaktionsgefäße (1,5 ml, *Eppendorf*) überführt. Im Anschluss wurde die Konzentration von Interleukin-6 in den Überständen mittels ELISA gemessen.

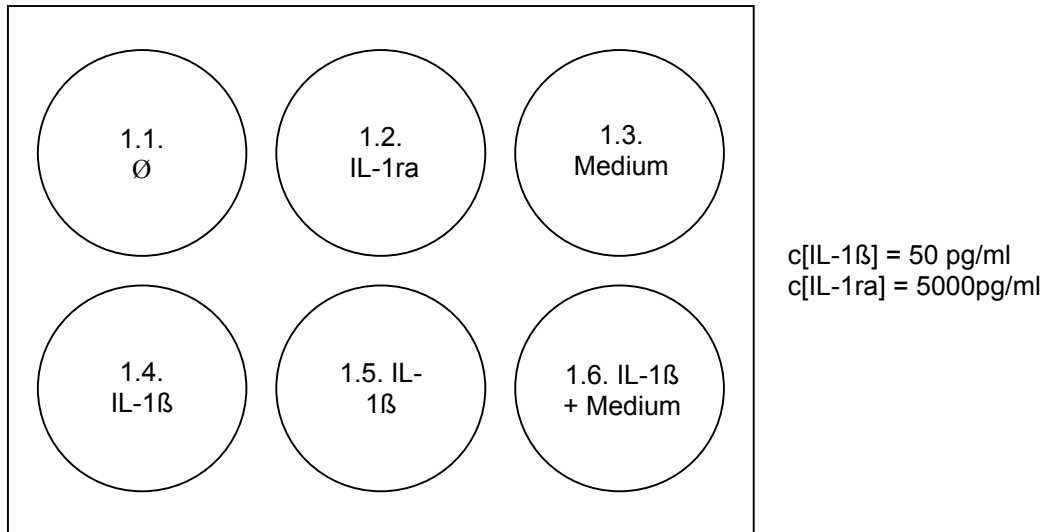


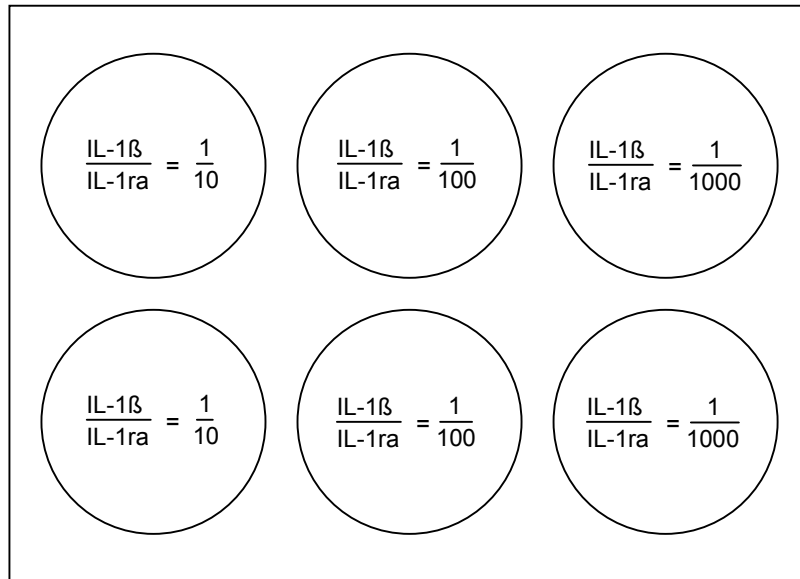
Abbildung 6: Bestimmung der IL-6-Expression nach Inkubation mit IL-1ra und IL-1β

- 1.1 Kein Zusatz
- 1.2 Zugabe von IL-1ra
- 1.3 Zugabe von „gebrauchtem“ Medium
- 1.4 Zugabe von IL-1β
- 1.5 Zugabe von IL-1β und IL-1ra im Verhältnis 1:100
- 1.6 Zugabe von IL-1β und „gebrauchtem“ Medium

3.8.2 Expression von IL-6 in 293T-Zellen in Abhängigkeit von der IL-1ra-Konzentration

293T-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70-90%, wurde des Kulturmedium abgesaugt und durch je 1 ml serumfreies Medium pro Vertiefung ersetzt. Durch Zugabe von je 10 µl einer IL-1β-Lösung

($c = 5 \mu\text{g/ml}$) betrug die IL-1 β -Konzentration in jeder Vertiefung 50 pg/ml. Gleichzeitig wurde IL-1ra hinzugefügt. Es wurden drei verschiedene IL-1ra-Konzentration (500 pg/ml, 5000 pg/ml 50000 pg/ml) hergestellt. So ergaben sich Verhältnisse von IL-1 β zu IL-1ra von 1:10, 1:100 und 1:1000 (siehe Abb.7).



$c[\text{IL-1}\beta] = 50 \text{ pg/ml}$
 $c_1[\text{IL-1ra}] = 500 \text{ pg/ml}$
 $c_2[\text{IL-1ra}] = 5000 \text{ pg/ml}$
 $c_3[\text{IL-1ra}] = 50000 \text{ pg/ml}$

Abbildung 7: IL-6-Expression in Abhängigkeit der IL-1ra-Konzentration

4 Ergebnisse

4.1 Transfektion verschiedener Zellen mit p-Track-IL-1ra und p-IRES-IL-1ra: Expression von GFP und IL-1ra

p-IRES-IL1ra Die Transfektion der Zellen mit unserem Genkonstrukt p-IRES-IL-1ra führte weder zur Induktion des Reportergens GFP noch zu der des Zielgens IL-1ra. Die Abbildung 8 zeigt das fluoreszenzmikroskopische Bild von 293T-Zellen nach der liposomalen Transfektion mit p-IRES-IL-1ra. Es ist keine spezifische Expression des GFP erkennbar. Die Transfektion führte also zu keiner Induktion der GFP-Expression.

Abbildung 8: GFP-Expression in 293T-Zellen nach Transfektion mit p-IRES-IL-1ra

Die Abbildung 9 zeigt die IL-1ra-Konzentrationen gemessen mittels ELISA mit und ohne Transfektion mit p-IRES-IL-1ra. Alle Messungen ergaben Werte unter 80 pg/ml. Die Transfektion führte zu keiner gesteigerten IL-1ra-Expression. In keiner Zellart fand sich eine signifikante IL-1ra-Freisetzung.

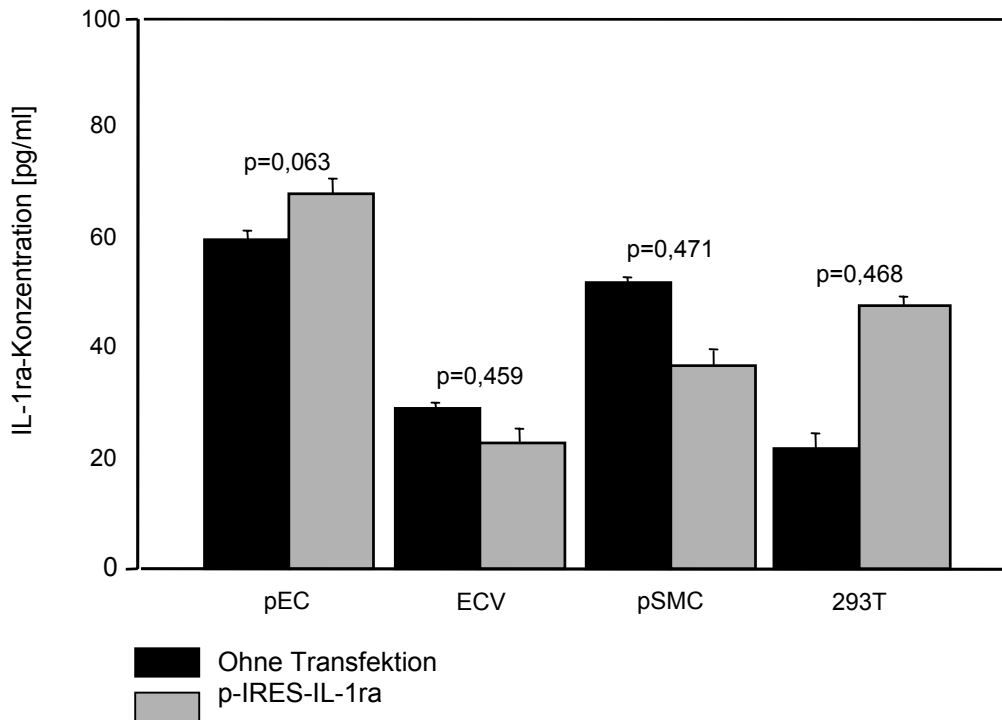


Abbildung 9: IL-1ra-Expression mit und ohne Transfektion mit p-IRES-IL-1ra

p-Track-IL-1ra Die Transfektion des spezifischen Genkonstrukts p-Track-IL-1ra hatte eine Induktion sowohl der GFP- als auch der IL-1ra-Expression zur Folge. Im Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 10) zeigte sich intrazellulär gespeichertes GFP. Etwa 80% der Zellen wiesen diese spezifische Fluoreszenz auf. Die Messungen der IL-1ra-Konzentrationen in den Überständen der transfizierten Zellen sind im Diagramm 2 dargestellt. Die Transfektion mit p-Track-IL-1ra führte zu einer signifikanten Induktion der IL-1ra-Expression. Der Vergleich transfizierter und nicht transfizierter Zellen zeigt eine Steigerung der IL-1ra-Konzentration von Faktor 6 in pECs, bis Faktor 180 in 293T-Zellen (siehe Tabelle 2).

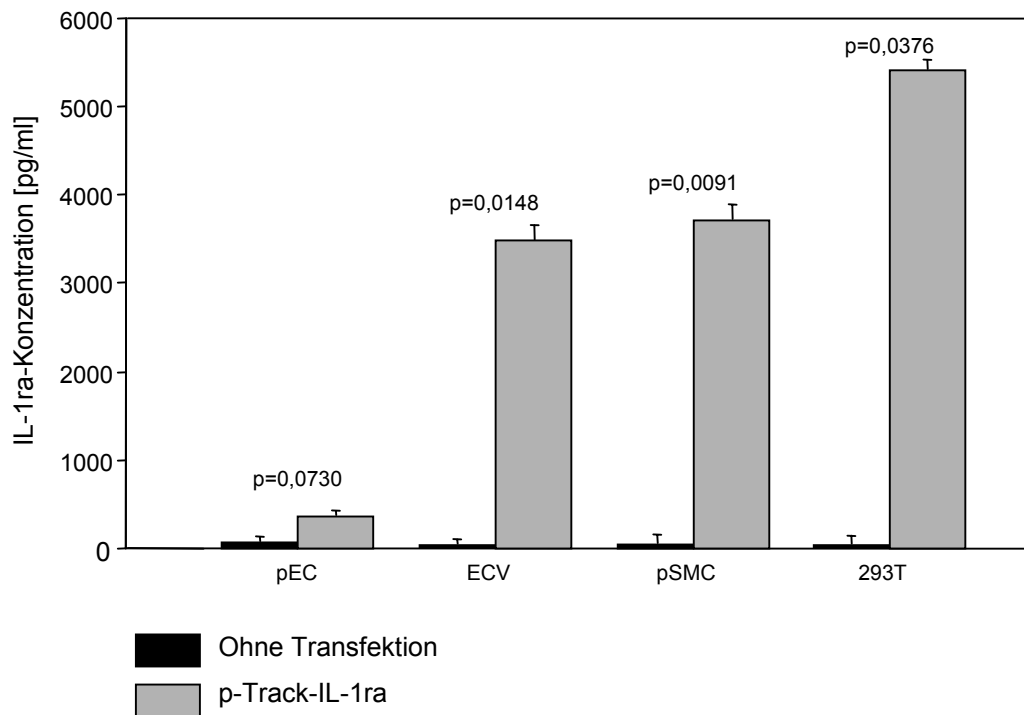


Abbildung 10: GFP-Expression in 293T-Zellen nach Transfektion von p-Track-IL-1ra

Abbildung 11: IL-1ra-Expression mit und ohne Transfektion mit p-Track-IL-1ra

Tabelle 2: IL-1ra-Expression mit und ohne Transfektion mit p-Track-IL-1ra

	IL-1ra- Expression: Ø Transfektion	IL-1ra- Expression: p- Track-IL-1ra	Faktor
pEC	60 pg/ml	368 pg/ml	6
ECV	30 pg/ml	3478 pg/ml	116
pSMC	34 pg/ml	3722 pg/ml	109
293T	30 pg/ml	5406 pg/ml	180

Die Abbildung 12 zeigt die IL-1ra-Expression in 293T-Zellen nach Transfektion mit p-IRES-IL-1ra bzw. p-Track-IL-1ra im direkten Vergleich. Die IL-1ra-Konzentration in den Überständen war nach Transfektion mit p-Track-IL-1ra um den Faktor 5 (pEC) bis 151 (ECV) (siehe Tabelle 3) höher als nach Transfektion mit p-IRES-IL-1ra.

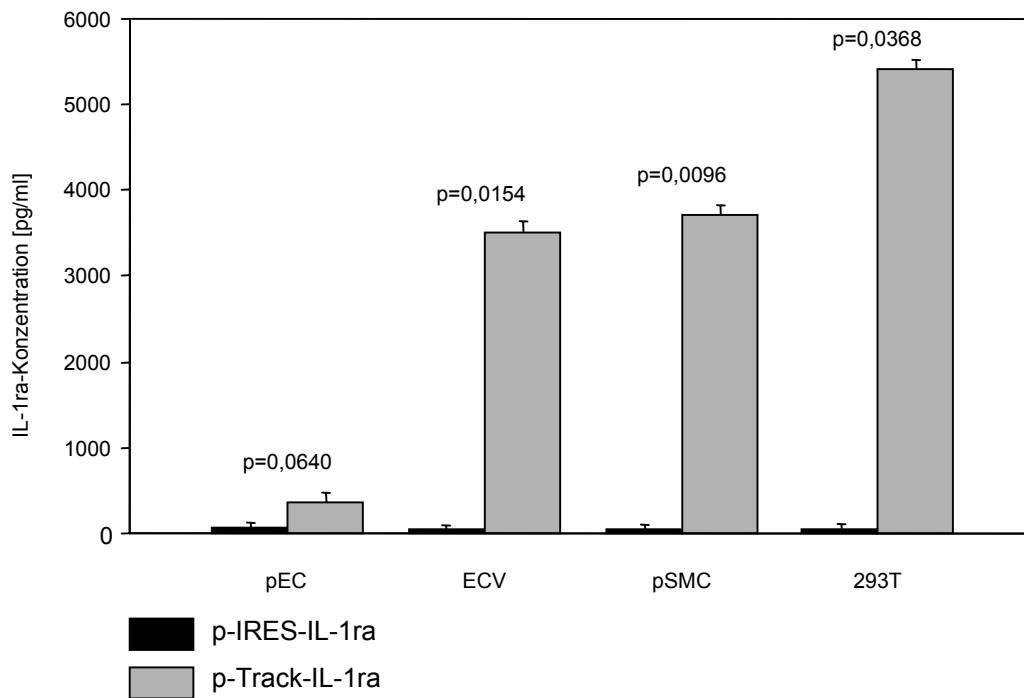


Abbildung 12: Vergleich der IL-1ra-Expression nach Transfektion mit p-IRES-IL-1ra bzw. p-Track-IL-1ra

Tabelle 3: IL-1ra-Expression nach Transfektion mit p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra

	IL-1ra-Expression: p-IRES-IL-1ra	IL-1ra-Expression: p-Track-IL-1ra	Faktor
pEC	68 pg/ml	368 pg/ml	5
ECV	23 pg/ml	3478 pg/ml	151
pSMC	37 pg/ml	3722 pg/ml	101
293T	48 pg/ml	5406 pg/ml	113

Höchste IL-1ra- Konzentrationen (5406 pg/ml) wurden in den Überständen mit p-Track-IL-1ra transfizierter 293T-Zellen gemessen. ECV-304-Zellen und primäre glatte Muskelzellen (pSMCs) exprimierten etwa die selbe Menge an IL-1ra (3478-3722 pg/ml). Im Überstand primärer porciner Endothelzellen (pEC) wurde der geringste Anstieg der IL-1ra-Konzentration beobachtet (368 pg/ml) (siehe Abb.10-12).

4.2 Vergleich von Promega mit FuGENE 6 durch Transfektion von p-Track-IL-1ra in pEC und 293T-Zellen

Die Abbildung 13 zeigt die IL-1ra-Konzentrationen in den Zellüberständen gemessen nach Transfektion mit p-Track-IL-1ra in pEC, ECV, pSMC und 293T-Zellen. In allen Zellarten wurden unter Verwendung von FuGENE 6 bessere Ergebnissen erzielt. FuGENE 6 führte stets zu statistisch signifikant höheren IL-1ra-Konzentrationen.

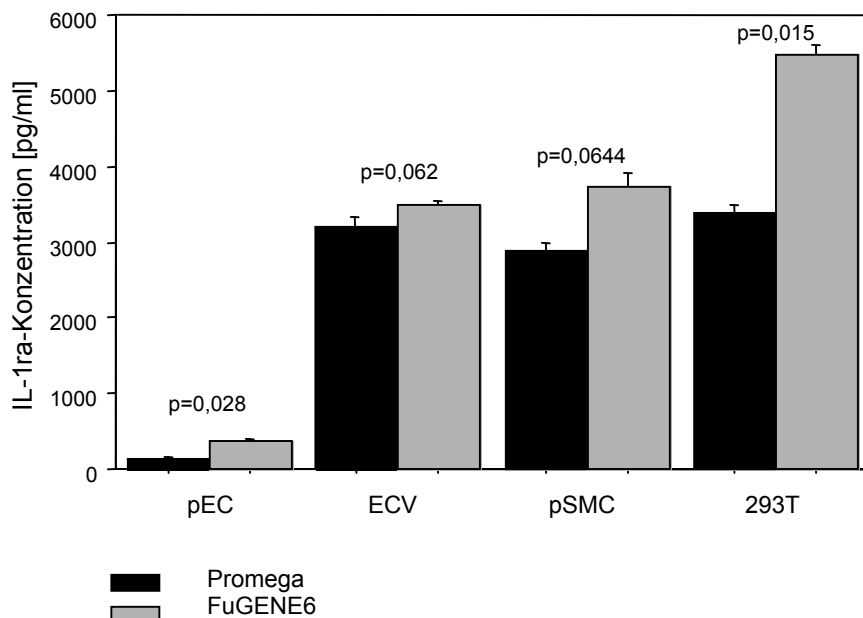


Abbildung 13: IL-1ra-Expression: Promega – FuGENE 6

Tabelle 4: Vergleich Promega - FuGENE 6

	IL-1ra- Expression: Promega	IL-1ra- Expression: FuGENE 6	Faktor
pEC	136 pg/ml	368 pg/ml	2,7
ECV	3220 pg/ml	3478 pg/ml	1,1
pSMC	2850 pg/ml	3722 pg/ml	1,3
293T	3440 pg/ml	5406 pg/ml	1,6

Beste Transferraten mit FuGENE 6 wurden bei dem Verhältnis von DNA zu FuGENE 6 von 1:6 erreicht. Je mehr sich das Verhältnis zu Gunsten des Transfektionsreagenz verschob, desto mehr IL-1ra wurde von den Zellen exprimiert (siehe Abb.14).

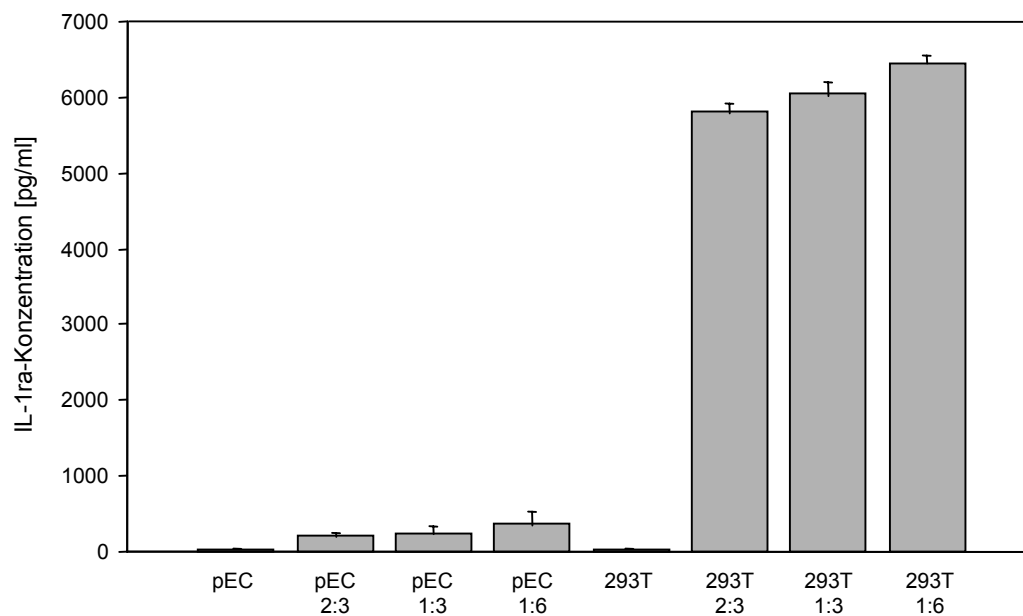


Abbildung 14: DNA-FuGENE 6-Verhältnis: IL-1ra-Expression

4.3 Konzentrationsabhängige Hemmung von IL-6 durch IL-1ra in 293T-Zellen

Die basale Expression von IL-6 in untransfizierten 293T-Zellen führte zu einer IL-6-Konzentration im Überstand von 10,31 µg/ml (Basiswert). Dieser Basiswert wurde durch singuläre Zugabe von IL-1ra (5000 pg/ml) auf die Hälfte reduziert (5268 pg/ml). Medium (Kulturmedium nach 24-stündiger Inkubation mit 293T-Zellen) zeigte keinen Einfluss auf die IL-6-Expression. Die Hinzugabe von IL-1β (50 pg/ml) führte zu einer Verzehnfachung der basalen Expression von IL-6 (96990). Die gemeinsame Inkubation von 293T-Zellen mit IL-1β und IL-1ra im Verhältnis 1:100 führte zu einer Senkung der IL-6-Induktion um etwa die Hälfte (siehe Abb.15).

Die Abbildung 16 veranschaulicht die Hemmung des IL-1 durch IL-1ra in Abhängigkeit von der IL-1ra-Konzentration. Nach alleiniger Gabe von IL-1β wurde eine IL-6-Konzentration von 96990 pg/ml im Überstand gemessen. Die Koinkubation von IL-1β und IL-1ra im Verhältnis 1:10 senkte die IL-6-Konzentration um 7% gegenüber der singulären Gabe des IL-1. Ein Überschuss an IL-1ra um den Faktor 100 reduzierte die IL-6-Konzentration auf etwa die Hälfte (58%). Bei einem Verhältnis von IL-1β zu IL-1ra von 1:1000 konnte die IL-6-Induktion auf Einfüntel (19%) gesenkt werden. Es besteht eine positive Korrelation zwischen IL-1ra-Konzentration (bei konstanter IL-1β-Konzentration) und hemmender Wirkung des IL-1ra. Die IL-1ra-Konzentration muss gegenüber der des IL-1 verhältnismäßig deutlich höher sein, um die Wirkung des IL-1 zu unterdrücken.

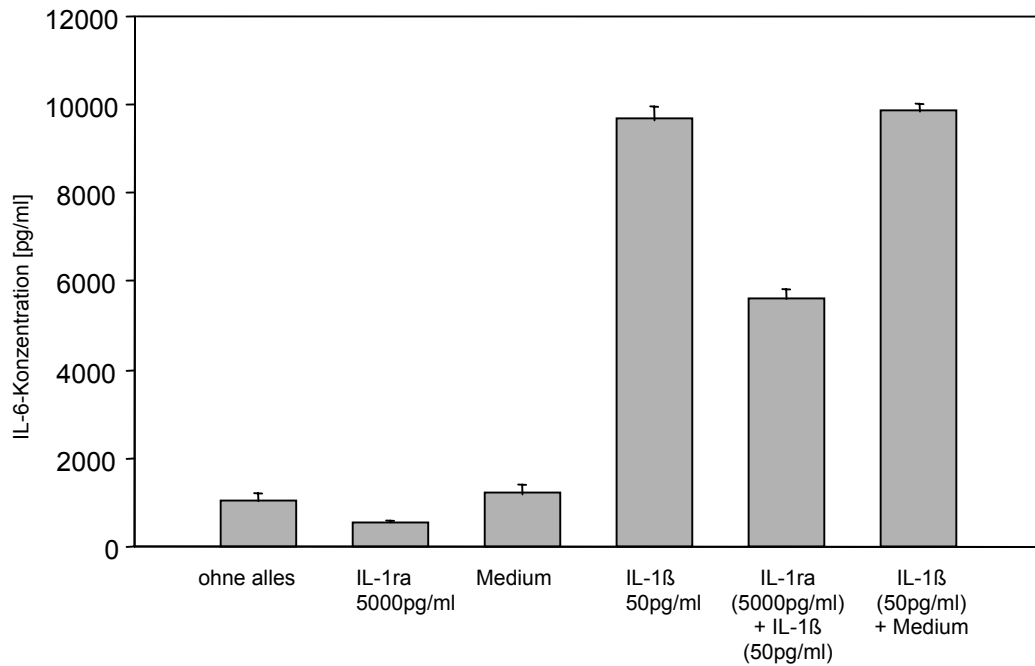


Abbildung 15: IL-6-Expression: Inkubation von 293T-Zellen mit IL-1β und IL-1ra

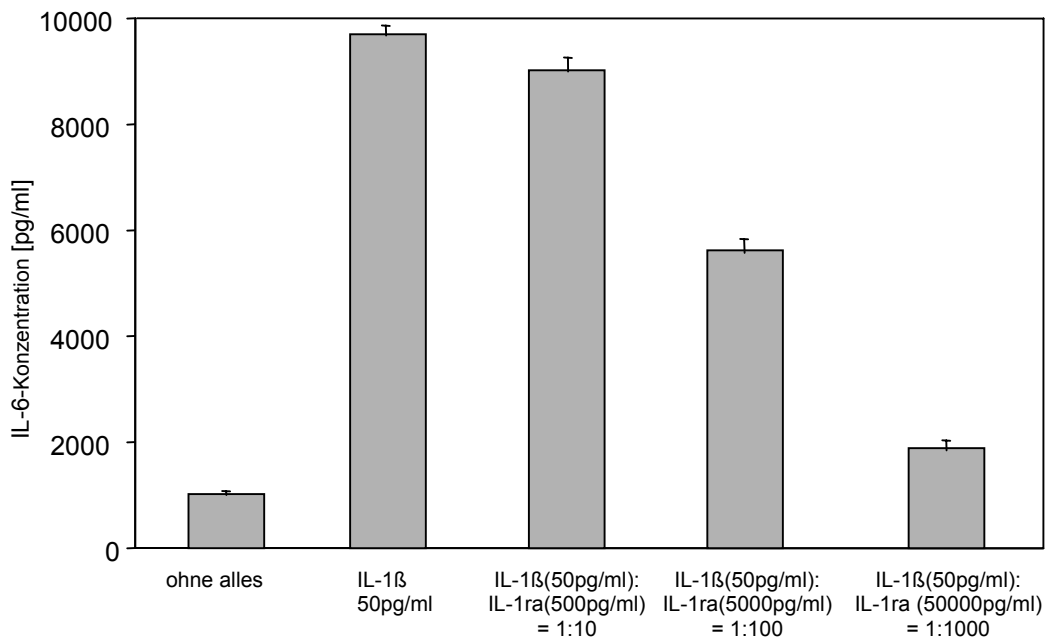


Abbildung 16: IL-6-Expression in Abhängigkeit von der IL-1ra-Konzentration: Koinkubation von IL-1β und IL-1ra

5 Diskussion

5.1 p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra

Das in unserer Arbeitsgruppe klonierte Genkonstrukt p-IRES-IL-1ra führte weder zu einer nennenswerten GFP- noch zu einer IL-1ra-Expression. Die Transfektion des spezifischen Konstrukts p-Track-IL-1ra führte sowohl zu hohen Expressionen des Reporter- als auch des Zielgens. Dem Konstrukt p-Track-IL-1ra ist im Gegensatz zum p-IRES-IL-1ra beiden Genen (IL-1ra, GFP) jeweils ein CMV-Promotor vorgeschaltet³⁰. Bei p-IRES-IL-1ra werden Zielgen (IL-1ra) und Reporter-gen(GFP) von nur einem Promotor translatiert. Zwischen beiden Genen befindet sich die spezifische Sequenz IRES (internal ribosome entry site), welche die Translation des zweiten Cistrons ermöglicht⁶. Es ist bekannt, dass die Expression der Gene stark von der Insertionsstelle innerhalb des Vektors abhängt⁴⁷. Die Expression des Gens kann je nach Position Schwankungen um den Faktor 100 aufweisen. In unseren Versuchen kam es jedoch weder zur Expression des Ziel- noch der des Reporter-gens. Es ist davon auszugehen, dass entweder die Klonierung des Genkonstrukts nicht erfolgreich war, oder aber der Vektor seine Funktionsfähigkeit während der Aufbewahrung verloren hat.

5.2 FuGENE 6 und Transfectam Reagent

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Transfereffizienz von den verwendeten Liposomen, vom DNA/Liposomen-Verhältnis und der zu transfizierenden Zellart abhängt. Dabei scheinen die Fähigkeit der Komplexierung der Liposomen mit der zu transfizierenden DNA, die Größe der entstehenden DNA/Liposomen-Komplexe sowie die Aufnahmebereitschaft der Zellen beteiligt zu sein. Zudem konnte der Einfluß der proliferativen Aktivität der Zellen beobachtet werden. Dabei ließen sich replizierende Zellen leichter transfizieren als stationäre Zellen. Liposomen sind in der Lage DANN in die Zelle einzuschießen. Die im Zytoplasma freigesetzte DNA muß nun die Kernmembran als erhebliches

Hindernis überwinden. Während der Replikation löst sich die Kernmembran auf, welches erklärt, dass die Transfereffizienz mit der proliferativen Aktivität steigt. Zur Optimierung der Bedingungen werden höhere Liposomen-Konzentrationen bei gleicher DNA-Konzentration verwendet. Es wird davon ausgegangen, dass freie Liposomen in Lösung mit Membranlipiden assoziieren und somit die Aufnahme in die Zelle und die Freisetzung aus den Endosomen erleichtern können. Man muss jedoch berücksichtigen, dass freie Liposomen auch zu einer erhöhten Toxizität beitragen.

5.3 Konzentrationsabhängige Hemmung der IL-6-Expression durch IL-1ra

In der vorliegenden Arbeit konnte die konzentrationsabhängige Hemmung der IL-1-induzierten IL-6-Produktion demonstriert werden. Dieses Ergebnis lässt sich mit den Beobachtungen von Arend vereinbaren^{2,3,5}. Er beschrieb die konzentrationsabhängige Hemmung der IL-1-induzierten PGE₂-Produktion in adhärennten humanen Synovial-Zellen⁵. Es stellt sich nun die Frage, in wieweit sich die Induktion von IL-6 mit der des PGE₂ vergleichen lässt. Die Induktion von IL-6 wird durch das Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktionswege vermittelt. Unter anderem sind die Aktivierung von NF-κB (nuclear factor), JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) und p38 (Protein 38) daran beteiligt³⁵. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass p38 an der Induktion von COX-2, und somit an der Freisetzung von PGE₂ beteiligt ist³⁹. Es ist davon auszugehen, dass durch Bindung von IL-1ra an den IL-1-Rezeptor die Aktivierung der genannten Transduktionswege verhindert wird.

Des Weiteren haben unsere Versuche gezeigt, dass ein großer Überschuss an IL-1ra gegenüber IL-1β nötig war, um IL-1-induzierte IL-6-Expression zu unterdrücken. Ein 100-facher Überschuss an IL-1ra führte zu einer Halbierung der IL-6-Expression. Bei 1000-fachen Überschuss konnte die IL-6-Expression um

80% gesenkt werden. Auch diese Beobachtung stimmt mit der von Arend überein. Um eine Hemmung der IL-1-induzierten PGE₂-Produktion von 50% erreichen, benötigte er ebenfalls einen 100-fachen Überschuss an IL-1ra. Er nannte diese Beobachtung „spare receptor effect“: Zielzellen können 2000 und mehr IL-1-Rezeptoren pro Zelle exprimieren. Jedoch bedarf es nur einiger weniger IL-1-besetzter Rezeptoren, um die volle biologische Wirkung auszulösen. Die Zielzellen reagieren also extrem sensitiv auf kleine Mengen an IL-1. Obwohl IL-1ra mit gleicher Avidität wie IL-1 an den IL-1-Rezeptor Typ I bindet, bedarf es eines großen Überschusses an IL-1ra, um die Besetzung einiger weniger IL-1-Rezeptoren mit IL-1 zu verhindern².

5.4 Therapeutischer Einsatz von p-Track-IL-1ra?

Die therapeutische Eignung von IL-1ra zur Prävention der Restenose ist hier nicht abschließend zu klären. Die Hemmung IL-1-induzierter Prozesse durch IL-1ra könnte auf folgende an der Entstehung der Restenose beteiligten Prozesse einen positiven Einfluss nehmen:

Entzündungsreaktion Kornowski konnte 1998 die positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Entzündungsreaktion und der Dicke des neointimalen Gewebes (also der Restenose) zeigen³⁶. Über verschiedene Mechanismen könnte IL-1ra das Ausmaß der Entzündungsreaktion senken. IL-1ra könnte die IL-1-vermittelte Anheftung von Leukozyten an das Endothel^{10,18,71} reduzieren, und die Induktion einer Vielzahl von Zytokinen (**IL-6**, IL-8, Akute-Phase-Proteine) und Wachstumsfaktoren hemmen.

Prokoagulatorische Effekte Die Förderung thrombotischer Prozesse des IL-1^{9,75} könnte bei Besetzung der IL-1-Rezeptoren durch IL-1ra unterdrückt werden.

Der Einsatz des IL-1ra würde einen großen Überschuss von IL-1ra gegenüber IL-1 voraussetzen. Zur Senkung der IL-6- bzw. der PGE₂-Produktion ² auf die Hälfte ist die 100-fache Menge an IL-1ra gegenüber IL-1 erforderlich. Obwohl IL-1ra bis zu einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht bedenkenlos verabreicht werden kann ²⁸, muss für den Einsatz von IL-1ra in-vivo stets an diese Gegebenheit gedacht werden.

Es ist auch fraglich, in wieweit sich die Ergebnisse der In-vitro-Versuche auf die Verhältnisse in-vivo übertragen lassen. Die Proliferation humaner T-Zellen durch Mitogene, lösliche Antigene und Allergene konnte in-vivo durch IL-1ra nicht gehemmt werden, obwohl IL-1ra in-vitro durchaus zu einer Hemmung exogen-zugeführter IL-1- Reaktionen führte ⁶⁰. Bei der Aufnahme von IL-1ra sind große Unterschiede in verschiedenen Spezies beobachtet worden. In Mäusen war die IL-1ra-Aufnahme in Entzündungsgebiete zehnmal schwächer als die seines Agonisten IL-1 ⁸². Eine vergleichbare Studie in Hasen (mit lokalen E.coli-Infektionen) konnte jedoch zeigen, dass die Aufnahme von radiojod-markiertem IL-1ra und IL-1 in das Infektionsgebiet etwa gleich hoch war ⁸³.

Die lokale Applikation von IL-1ra stellt eine Möglichkeit zur Steigerung der IL-1ra-Konzentration in traumatisierten Gefäßen dar. Diese Methode würde auch die Applikation deutlich höherer Dosen an IL-1ra erlauben, ohne systemische Nebenwirkungen zu verursachen. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Versuchen am Schwein zeigen, dass die lokale Applikation transfizierter Zellen mittels geeigneter Katheter zu einer Aufnahme der Zellen in die Gefäßwand führte. Die Möglichkeit des vaskulären Gentransfers konnte bereits in verschiedenen Geweben in-vitro und in-vivo mehrfach gezeigt werden ^{58,59,61,85}.

Zu diesem Zweck könnten z.B. (autologe) Zellen ex-vivo mit p-Track-IL-1ra liposomal transfiziert (z.B. unter Verwendung von FuGENE 6) und durch lokale Verabreichung mittels Katheter reimplantiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre die lokale Applikation rekombinanter Viren. Die auf dieser Arbeit aufbauenden Studien untersuchen im Carotis Injury Modell der Ratte die

Hemmung der Neointimabildung durch lokale adenovirale Überexpression von IL-1ra und durch Implantation transfizierter IL-1ra-überexprimierender Endothelzellen.

6 Zusammenfassung

Der vaskuläre Gentransfer eröffnet neue Möglichkeiten zur Bekämpfung der koronaren Herzerkrankung. Mit dieser Methode können therapeutisch wichtige Proteine, wie IL-1ra, Vascular endothelial growth factor (VEGF) und fibroblast growth factor (FGF) ⁸⁵, überexprimiert, bzw. genetische Defekte korrigiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genkonstrukte p-IRES-IL-1ra und p-Track-IL-1ra in Hinblick auf ihre Funktionsfähigkeit miteinander verglichen. Das bicistronische Genkonstrukt p-IRES-IL-1ra führte zu keiner Änderung in der Expression der Proteine IL-1ra und GFP. Die Transfektion von p-Track-IL-1ra hingegen hatte einen hohen Anstieg der IL-1ra- und GFP-Expression zur Folge.

Es konnte gezeigt werden, dass das exprimierte IL-1ra hemmend auf die Zytokinproduktion (wie anhand der IL-6-Expression gezeigt werden konnte) wirkte.

Diese Ergebnisse sprechen für die Möglichkeit einer therapeutischen, lokalen Applikation des IL-1ra zur Steigerung der IL-1ra-Konzentration in traumatisierten Gefäßen. Auch unsere Versuche am Schwein haben gezeigt, dass diese Methode zu einer Aufnahme transfizierter Zellen in die Gefäßwand führte. Weitere Versuche zum vaskulären Gentransfer und seiner Wirkungen am Menschen stehen noch aus.

Literaturverzeichnis

1. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist: discovery, structure and properties. *Prog Growth Factor Res.* 21990;:193-205.
2. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 541993;:167-227.
3. Arend WP. Inhibiting the effects of cytokines in human diseases. *Adv-Intern-Med.* 1995;:365-94.
4. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol.* 161998;:27-55.
5. Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J-Clin-Invest.* 41990;:1694-7.
6. Attal J, Theron MC, Puissant C, Houdebine LM. Effect of intercistronic length on internal ribosome entry site (IRES) efficiency in bicistronic mRNA. *Gene Expr.* 81999;:299-309.
7. Bargetzi MJ, Lantz M, Smith CG, Torti FM, Olsson I, Eisenberg SP, Starnes HF. Interleukin-1 beta induces interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein in humans. *Cancer Res.* 531993;:4010-3.
8. Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 401997;:107-16.
9. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 831986;:4533-7.

10. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest.* 761985;:2003-11.
11. Bittl JA. Advances in coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 3351996;:1290-302.
12. Bonin PD, Fici GJ, Singh JP. Interleukin-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells in coordination with PDGF or a monocyte derived growth factor. *Exp Cell Res.* 1811989;:475-82.
13. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest.* 931994;:1266-74.
14. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol.* 1141991;:1285-94.
15. Brewitt B, Clark JI. Growth and transparency in the lens, an epithelial tissue, stimulated by pulses of PDGF. *Science.* 2421988;:777-9.
16. Bubenik J, Baresova M, Viklicky V, Jakoubkova J, Sainerova H, Donner J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer.* 111973;:765-73.
17. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation.* 861992;:723-9.

18. Cavender DE, Haskard DO, Joseph B, Ziff M. Interleukin 1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. *J Immunol.* 1361986;:203-7.
19. Clinton SK, Libby P. Cytokines and growth factors in atherogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 1161992;:1292-300.
20. Daniel WC, Pirwitz MJ, Willard JE, Lange RA, Hillis LD, Landau C. Incidence and treatment of elastic recoil occurring in the 15 minutes following successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 781996;:253-9.
21. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 871996;:2095-147.
22. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med.* 3432000;:732-4.
23. Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 351999;:558-9.
24. Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis.* 401997;:129-40.
25. Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb Haemost.* 741995;:552-9.
26. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein [see comments]. *J Clin Invest.* 991997;:2930-40.

27. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 361977;:59-74.
28. Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Pribble JP, Stiles DM, Bloedow DC, Catalano MA, Wolff SM, Dinarello CA. Pharmacokinetics, safety and immunomodulatory effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in healthy humans. *Cytokine.* 41992;:353-60.
29. Guerne PA, Sublet A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1581994;:476-84.
30. He X, Liu S, Perry KL. Identification of epitopes in cucumber mosaic virus using a phage-displayed random peptide library. *J Gen Virol.* 791998;:3145-53.
31. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Kurosaki K, Fujikawa H, Shimada K. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis [see comments]. *Heart.* 842000;:83-7.
32. Hughes SE. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis. *Exp Cell Res.* 2251996;:171-85.
33. Inui H, Kitami Y, Tani M, Kondo T, Inagami T. Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) alpha and beta receptors in vascular smooth muscle cells. PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis. *J Biol Chem.* 2691994;:30546-52.

34. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.* 891992;;507-11.
35. Kanakaraj P, Schafer PH, Cavender DE, Wu Y, Ngo K, Grealish PF, Wadsworth SA, Peterson PA, Siekierka JJ, Harris CA, Fung-Leung WP. Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J Exp Med.* 1871998;;2073-9.
36. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol.* 311998;;224-30.
37. Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem.* 2671992;;14183-8.
38. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 921995;;4606-10.
39. Laporte JD, Moore PE, Lahiri T, Schwartzman IN, Panettieri RA, Shore SA. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2792000;;L932-41.

40. Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 281996;:1643-51.
41. Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Prog Cardiovasc Dis.* 401997;:141-58.
42. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation.* 861992;:III47-52.
43. Libby P, Tanaka H. The molecular bases of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 401997;:97-106.
44. Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest.* 811988;:487-98.
45. Libby P, Wyler DJ, Janicka MW, Dinarello CA. Differential effects of human interleukin-1 on growth of human fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis.* 51985;:186-91.
46. Lindner V, Reidy MA. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries. An en face study. *Circ Res.* 731993;:589-95.
47. Liu X, Constantinescu SN, Sun Y, Bogan JS, Hirsch D, Weinberg RA, Lodish HF. Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. *Anal Biochem.* 2802000;:20-8.
48. Loppnow H, Bil R, Hirt S, Schonbeck U, Herzberg M, Werdan K, Rietschel ET, Brandt E, Flad HD. Platelet-derived interleukin-1 induces

cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood*. 911998;:134-41.

49. Lu DL, Menon KM. 3' untranslated region-mediated regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression. *Biochemistry*. 351996;:12347-53.
50. Lubinus M, Meier KE, Smith EA, Gause KC, LeRoy EC, Trojanowska M. Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 2691994;:9822-5.
51. Luscinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *Faseb J*. 81994;:929-38.
52. Malyak M, Guthridge JM, Hance KR, Dower SK, Freed JH, Arend WP. Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*. 1611998;:1997-2003.
53. Martin S, Maruta K, Burkart V, Gillis S, Kolb H. IL-1 and IFN-gamma increase vascular permeability. *Immunology*. 641988;:301-5.
54. McKenna TM, Reusch DW, Simpkins CO. Macrophage-conditioned medium and interleukin 1 suppress vascular contractility. *Circ Shock*. 251988;:187-96.
55. Meyer BJ, Meier B, Bonzel T, Fabian J, Heyndrickx G, Morice MC, Muhlberger V, Piscione F, Rothman M, Wijns W, van den Brand M. Interventional cardiology in Europe 1993. Working Group on Coronary Circulation of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 171996;:1318-28.
56. Meyer-Ingold W, Eichner W. Platelet-derived growth factor. *Cell Biol Int*. 191995;:389-98.

57. Montesano R, Mossaz A, Ryser JE, Orci L, Vassalli P. Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. *J Cell Biol.* 991984;:1706-15.
58. Morgan RA, Anderson WF. Human gene therapy. *Annu Rev Biochem.* 621993;:191-217.
59. Nabel EG, Nabel GJ. Complex models for the study of gene function in cardiovascular biology. *Annu Rev Physiol.* 561994;:741-61.
60. Nicod LP, el Habre F, Dayer JM. Natural and recombinant interleukin 1 receptor antagonist does not inhibit human T-cell proliferation induced by mitogens, soluble antigens or allogeneic determinants. *Cytokine.* 41992;:29-35.
61. Nikol S, Huehns TY. Preclinical and clinical experience in vascular gene therapy: advantages over conservative/standard therapy. *J Invasive Cardiol.* 132001;:333-8.
62. Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 271993;:1184-90.
63. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* 121988;:616-23.
64. Oemar BS. Is interleukin-1 beta a triggering factor for restenosis? [editorial]. *Cardiovasc Res.* 441999;:17-9.
65. Preisack MB, Athanasiadis A, Voelker W, Karsch KR. Early luminal deterioration following successful percutaneous transluminal coronary

- angioplasty. Frequency, prediction and clinical implications. *Eur Heart J.* 151994;:739-46.
66. Raines EW. In: *Book Biology of Platelet-Derived Growth Factor.* Westermarck BaCS. Basel: 1993.
67. Rasmussen LT, Seljelid R. The modulatory effect of lipoproteins on the release of interleukin 1 by human peritoneal macrophages stimulated with beta-1,3-D-polyglucose derivatives. *Scand J Immunol.* 291989;:477-84.
68. Rodriguez A, Santaera O, Larribeau M, Sosa MI, Palacios IF. Early decrease in minimal luminal diameter after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty predicts late restenosis. *Am J Cardiol.* 711993;:1391-5.
69. Rodriguez AE, Santaera O, Larribau M, Fernandez M, Sarmiento R, Perez B, Newell JB, Roubin GS, Palacios IF. Coronary stenting decreases restenosis in lesions with early loss in luminal diameter 24 hours after successful PTCA. *Circulation.* 911995;:1397-402.
70. Sanders M. Angiographic changes thirty minutes following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Angiology.* 361985;:419-24.
71. Schleimer RP, Rutledge BK. Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. *J Immunol.* 1361986;:649-54.
72. Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami T, Nakaike R, Sakata M, Takayanagi T, Egashira K, Takeshita A. Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest.* 971996;:769-76.

73. Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC. Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest.* 821988;:1746-56.
74. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 761994;:301-14.
75. Stern DM, Bank I, Nawroth PP, Cassimeris J, Kisiel W, Fenton JWd, Dinarello C, Chess L, Jaffe EA. Self-regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface. *J Exp Med.* 1621985;:1223-35.
76. Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 261990;:265-74.
77. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation.* 881993;:1788-803.
78. Tesch GH, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Role of interleukin-1 in mesangial cell proliferation and matrix deposition in experimental mesangioproliferative nephritis. *Am J Pathol.* 1511997;:141-50.
79. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 831994;:113-8.
80. Topol EJ, Ellis SG, Cosgrove DM, Bates ER, Muller DW, Schork NJ, Schork MA, Loop FD. Analysis of coronary angioplasty practice in the United States with an insurance-claims data base. *Circulation.* 871993;:1489-97.

81. Topol EJ, Moliterno DJ. Restenosis. In: *Book Textbook of Cardiovascular Medicine*. Califf RM, Isner JM, Prystowsky EN, Serruys PW, Swain JL, Thomas JD, Thompson PD, Young JB:Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia: 1998:2065-2100.
82. van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, van de Ven MT, Claessens RA, van der Meer JW, Corstens FH. Different behaviour of radioiodinated human recombinant interleukin-1 and its receptor antagonist in an animal model of infection. *Eur J Nucl Med*. 231996;:1531-5.
83. van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, van de Ven MT, van der Meer JW, Corstens FH. Imaging of infection in rabbits with radioiodinated interleukin-1 (alpha and beta), its receptor antagonist and a chemotactic peptide: a comparative study. *Eur J Nucl Med*. 251998;:347-52.
84. Venkatesan A, Dasgupta A. Novel fluorescence-based screen to identify small synthetic internal ribosome entry site elements. *Mol Cell Biol*. 212001;:2826-37.
85. Yla-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet*. 3552000;:213-22.

7 Danksagung

Meinem verehrten Doktorvater Herrn Professor Neumann möchte ich danken für die Überlassung der Arbeit. Frau Dr. Sandler danke ich für die Einweisung und Betreuung.

Meinem Vater danke ich dafür, dass es ihn gibt. Als mein schärfster Kritiker hat er stets versucht, mir die Freude an der Medizin und der Wissenschaft zu vermitteln.

Herrn Dipl. Ing. (FH) Raphael Schneider danke ich für seine unentbehrliche Hilfe. Ohne ihn hätte diese Arbeit nie Form angenommen. Es ist ihm tatsächlich gelungen alle Computer wieder in Gang zu setzen.

Außerdem danke ich Frau Dr. Petra Barthel und meinem Freund Axel für die liebevolle Unterstützung.