

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

**Bedeutung von Interleukin-1 Rezeptorantagonist im Hinblick auf die
Entwicklung einer lokalen Genterapie zur Hemmung der
Neointimahyperplasie**

Viola Felicitas Wetzstein

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. M. Neumann, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
	2. Univ.-Prof. Dr. A. Schömig

Die Dissertation wurde am 13.05.2002 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003
angenommen.

**Bedeutung von Interleukin-1 Rezeptorantagonist im Hinblick auf
die Entwicklung einer lokalen Gentherapie zur Hemmung der
Neointimahyperplasie**

Viola Felicitas Wetzstein

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1.	Pathologie der Restenose	10
1.2.	Bedeutung von IL-1 bei der Entwicklung der Restenose	13
1.3	Interleukin-1 Rezeptorantagonist: Kompetitive Hemmung von IL-1	15
2.	Zielsetzung	19
3.	Methoden	20
3.1.	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	20
3.1.1.	Sequenzierreaktion	21
3.1.2.	Automatische Gelelektrophorese und Sequenzanalyse	22
3.2.	Subklonierung der IL-1ra Isoformen in pcDNA3.1(+)	23
3.2.1.	Präparation der pcDNA3.1(+)	24
3.2.1.1.	Transformation E.coli JM109 kompetenter Zellen	24
3.2.1.2.	Vektorvermehrung (Maxi-Präparation)	26
3.2.1.3.	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	27
3.2.1.4.	Restriktion und SAP-Behandlung	28
3.2.1.5.	Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation	28
3.2.2.	Präparation der Inserts	29

3.2.2.1.	Restriktion	29
3.2.2.2.	Gelelektrophorese	30
3.2.2.3.	Glasmilchelution	30
3.2.3.	Plasmidkonstruktion	32
3.2.3.1.	Ligation	32
3.2.3.2.	Transformation und Plasmidvermehrung	32
3.2.3.3.	Asymmetrischer Kontrollverdau	33
3.3.	Zellkultur	34
3.3.1.	Zellarten, Zellzüchtung	34
3.4.	Liposomale Transfektion, X-Gal Färbung	35
3.4.1.	Transfektionsverfahren	37
3.5.	Prinzip des ELISA und Meßmethode	38
3.6.	Hemmversuche	39
3.7.	Statistische Datenverarbeitung	41
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Sequenzen der IL-1ra Isoformen	42
4.2.	Restriktion Vektor pLXSN	46
4.3.	Gelanalyse der Subklonierung in p3.1(+)	47
4.4.	Ergebnisse der asymmetrischen Kontrollrestriktionen	49
4.5.	Effektivität der liposomalen Transfektion	55
4.6.	Ergebnisse der IL-1ra ELISA	56
4.6.1.	IL-1ra Produktion in ECV-304 Zellen	56
4.6.2.	IL-1ra Produktion in 293-T Zellen	57

4.6.3.	Vergleich der sekretorischen IL-1ra Produktion stimulierter transfizierter, und nicht-stimulierter transfizierter ECV-304 Zellen	58
4.7.	Hemmversuche	59
4.7.1.	IL-6 Konzentration in Modell 1	59
4.7.2.	IL-6 Konzentration in Modell 2	60
5.	Diskussion	62
5.1.	IL-1ra Produktion in ECV-304 Zellen und in 293-T Zellen	62
5.2.	Hemmung der IL-6 Produktion als Modell für die Entwicklung einer vaskulären Gentherapie	64
5.3.	Unterschiede der zwei Modelle zur Hemmung von IL-6 durch IL- 1ra	66
5.4.	Zusammenfassung	68
6.	Anhang	70
6.1.	Literaturverzeichnis	70
6.2.	Abbildungsverzeichnis	83

Verwendete Abkürzungen:

A.	Arteria
bFGF	basic fibroblast growth factor
cDNA	complementary Desoxyribonucleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
ddNTPs	Didesoxynukleotid-Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EDRF	endothelium-derived-growth-factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-1	Interleukin-1
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein a
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived-growth-factor
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
SAP	calf-intestine-alkaline-phosphatase

TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF-β	tissue-growth-factor- β
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	vascular-cell-adhesion-molecule-1
VLA-4	very-late-antigen-4

1. Einleitung

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) ist eine etablierte Methode zur Revaskularisierung des Myokards bei Patienten mit koronarem Gefäßverschluß. Limitiert wird die Effektivität der PTCA durch die biologische Reaktion des Gefäßes auf die Gefäßwandverletzung. Eine Restenose tritt bei ca. einem Drittel aller initial erfolgreich behandelten Patienten innerhalb von drei bis sechs Monaten auf (48). Nach jeder perkutanen koronaren Revaskularisation kommt es, als Folge der verursachten Gefäßverletzung, zu einem Verlust des initial erreichten Lumengewinns, der in Abhängigkeit von der PTCA-Technik - z.B. Ballondilatation, Laserbehandlung, Atherektomie - den Sonden-, Stenose- und Patientencharakteristiken, klinisch bedeutsame Ausmaße annehmen kann (48). Für den langfristigen Erfolg einer Therapie ist daher die Inhibition dieser biologischen Reaktion der Intima maßgeblich entscheidend.

Die Restenose wird im wesentlichen durch drei interagierende Komponenten verursacht (48):

1. Elastische Rückstellkräfte nach Dilatation (recoil) und Gefäßremodelling
2. Thrombusbildung und -organisation
3. Neointimabildung (Gefäßwandhyperplasie)

Der Lumenverlust nach koronarer Stentimplantation zeigt praktisch kein Remodelling, hier ist die Restenosierung fast ausschließlich Folge der Neointimabildung (18).

Hervorgerufen wird die Neointimahyperplasie durch die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (18). Durch Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) und andere mitogene Substanzen initiiert, erfahren die glatten Muskelzellen eine Transformation vom kontraktilen zum sekretorischen

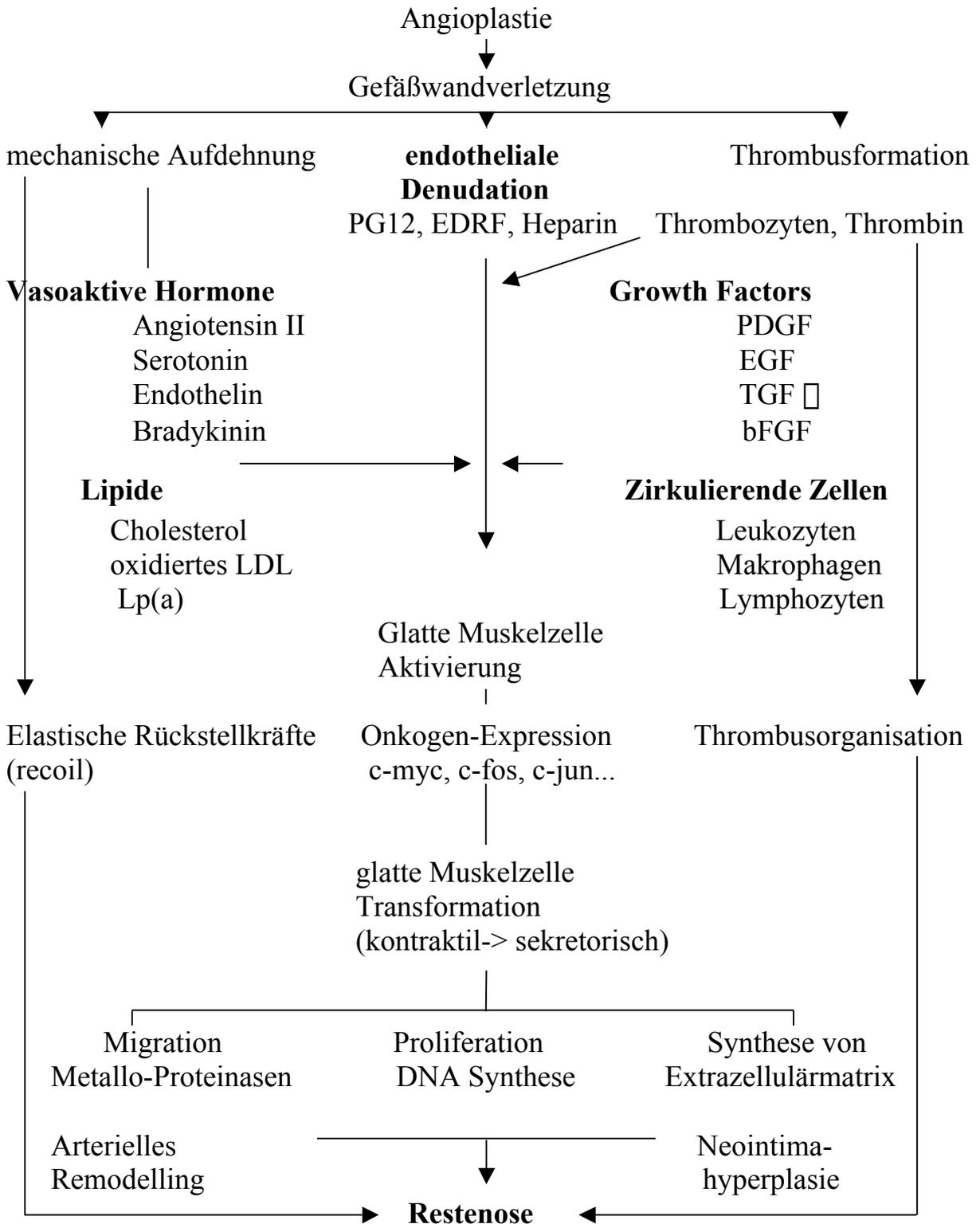
Phänotyp und beginnen in der Intima vermehrt Matrixsubstanzen zu sezernieren (50). Der zentrale Mechanismus für die Aktivierung der glatten Muskelzellen besteht in der dilatationsbedingten Verletzung von Endothel, Intima, Media und Adventitia des Gefäßes mit einer darauffolgenden Entzündungsreaktion (19). Bei der Initiierung dieses Entzündungsprozesses spielt Interleukin-1 (IL-1) eine wesentliche Rolle (9). Als natürlicher Gegenspieler des IL-1 existiert Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) (7).

1.1. Pathologie der Restenose

Während der letzten Jahre haben viele Arbeiten den Prozess der Neointimahyperplasie, welche als Reaktion auf eine Gefäßwandverletzung durch Ballonkatheter auftritt, beschrieben. Die Bildung der Neointima umfaßt mehrere Schritte: Aktivierung, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, und die Produktion von extrazellulärer Matrix (42, 13, 9, 54, 36, 35, 54, 55, 46). Die Neointimabildung kann hierbei als reparativer Prozess nach Trauma verstanden werden. Einmal beschädigt ist das Endothel nicht mehr in der Lage, Thrombusformation zu verhindern, das Eindringen von, durch Thrombozyten freigesetzte vasoaktive Substanzen und Mitogene, zu blockieren, oder „endothelium derived relaxation factor (EDRF), bzw. Heparinsulfat zu bilden. Beiden Substanzen konnte ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation glatter Muskelzellen nachgewiesen werden (10, 24). Innerhalb von Minuten bis Stunden nach dem Endothelschaden haften Thrombozyten an der Gefäßwand, und setzen Mitogene - u.a. platelet derived growth factor (PDGF), tissue growth factor- β (TGF- β), und Interleukin-1 (IL-1) - frei, die zur Vasokonstriktion,

Chemotaxis, Mitogenese, und Aktivierung weiterer benachbarter Thrombozyten führen (23, 31, 37, 41, 61). Diese Mediatoren aktivieren desweiteren Oberflächenrezeptoren ruhender glatter Muskelzellen in der Gefäßmedia, und induzieren die Produktion von Proto-Onkogenen, die wiederum die Proliferation glatter Muskelzellen bewirken (22, 60, 13). Letztlich erfolgt eine Konsolidierung der Neointima durch Migration glatter Muskelzellen und durch die Bildung extrazellulärer Matrix, die nach 4-6 Monaten durch Kollagen und Elastin ersetzt wird.

Abb. 1 Entstehung von Restenose:



1.2 Bedeutung von IL-1 bei der Entwicklung der Restenose

Es existieren zwei verschiedene Genprodukte von IL-1, das vorwiegend membranständige IL-1 α und die hauptsächlich sezernierte Form IL-1 β . Beide Formen besitzen das gleiche Spektrum an biologischer Aktivität und binden an die gleichen Oberflächenrezeptoren (3). Die Transkription erfolgt durch alternative erste Exons (3). Interleukin-1 ist das einzige Zytokin für das ein physiologischerweise vorkommender Rezeptorantagonist beschrieben wurde.

Die proinflammatorischen Eigenschaften des Interleukin-1 spielen eine zentrale Rolle im Auftreten der für die Neointimahyperplasie relevanten Entzündungsprozesse. IL-1 wird sowohl vom Endothel, wie auch von Monozyten und Makrophagen freigesetzt (14). Nach Thrombozytenadhäsion an das verletzte Endothel kommt es, über thrombozytäres Interleukin-1, zu einer gesteigerten Expression prokoagulatorischer Faktoren, Fibrinolyseinhibitoren, und zur Induktion von Chemokinen wie Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin-6 (IL-6). Die endotheliale Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, welche die Anlagerung von Entzündungszellen und lymphatischen Zellen an das verletzte Endothel erleichtern, ist ebenfalls gesteigert (72). So führt die Adhäsion von Monozyten an aktiviertes Endothel über IL-1 β zu einer gesteigerten endothelialen Oberflächenexpression von VCAM-1, sowie zur Biosynthese und Freisetzung von IL-6 (72).

Die beschriebenen pathogenetischen Mechanismen der Neointimabildung sind vermutlich Teil einer Entzündungsreaktion als Antwort auf die Gefäßwandverletzung. Inflammatorische Zytokine modulieren die Transkription und Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in Endothelzellen

(39, 40). Deren gesteigerte Expression ist ein wichtiges pathologisches Attribut bei der Entwicklung von Arteriosklerose, sowie der Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (9). Leukozyten und glatte Muskelzellen exprimieren Gene für Zytokine und Wachstumsfaktoren, die mononukleäre Phagozyten stimulieren. Diese Zytokine und Wachstumsfaktoren stimulieren ihre eigene Genexpression und induzieren sich gegenseitig (39). Kaskaden von autokrinen und parakrinen Mediatoren, deren Expression durch Verletzungen der Gefäßwand getriggert werden, tragen zur unkontrollierten Proliferation der glatten Muskelzellen im Rahmen der Restenose bei. TNF und IL-1 β regulieren die Expression von ICAM-1, E-Selectin und VCAM-1 in glatten Muskelzellen, und führen dadurch zu einer gesteigerten Adhäsion von Neutrophilen und Lymphozyten an das Endothel (70, 69). In einem Tiermodell zeigen immunhistochemische Nachweise eine starke IL-1 β Induktion in der A. Carotis von Schweinen nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie, insbesondere in Gefäßabschnitten, mit aktiv proliferierenden und migrierenden glatten Muskelzellen (71). Die Expression und Freisetzung von IL-1 β in Endothel,- und Entzündungszellen, aber auch in der Adventitia der betroffenen Gefäße, erfolgt in einem frühen Stadium nach PTCA (innerhalb von 3 Tagen), zu späteren Zeitpunkten konnte eine Abnahme der IL-1 β Konzentration nachgewiesen werden (11).

1.3 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra): Kompetitive Hemmung von IL-1

Unterstrichen wird die zentrale Bedeutung von IL-1 bei der Regulation von Entzündungsprozessen durch die Existenz mehrerer natürlicher Mechanismen, die die Wirkung von IL-1 *in-vivo* kontrollieren (14):

1. Die Freisetzung nicht membranständiger, zirkulierender Rezeptoren, welche IL- α , IL- β , und IL-1ra binden können, und damit zu einer Hemmung der IL-1 Wirkung führen,
2. Die Oberflächenexpression eines nicht gekoppelten „Decoy“-Rezeptors, welcher IL-1 bindet, aber keine Signaltransduktion bewirkt, und somit eine Bindung am signaltransduzierenden Typ I Rezeptor verhindert,
3. Das Vorkommen des natürlichen Antagonisten IL-1ra, ein bisher nur im IL-1 System beschriebenes Phänomen (15).

Der nicht spezies-spezifische natürliche Antagonist IL-1ra weist große Homologie mit IL-1 β auf. Der Wirkungsmechanismus von IL-1ra besteht in einer Konkurrenz mit IL-1 um die Bindung an den Typ-I wie auch Typ-II Interleukin-1-Rezeptor, ohne eine nachweisbare agonistische Funktion (16, 17, 58). Der Typ I Rezeptor transduziert ein Signal, der Typ II Rezeptor hingegen bindet zwar IL-1, transduziert aber kein Signal (15).

Von diesem natürlicherweise vorkommenden IL-1 Inhibitor existieren drei Isoformen, die durch alternatives Splicing einer mRNA entstehen. Eine Form wird sezerniert, die zwei anderen Formen sind intrazellulär (3). Von der 177 Aminosäuren langen sezernierten Form, wird vor der Sekretion eine Leader

Sequenz von 25 Aminosäuren abgespalten. Die längere intrazelluläre Form unterscheidet sich von der kürzeren intrazellulären Form in einem 21 Aminosäuren langen Insert. Bislang wurde zu dieser mRNA kein zweites Protein gefunden, das sich in der Sequenz von der kürzeren Form unterscheidet (3). Die Kontrolle IL-1 vermittelter Effekte in der zellulären Mikroumgebung scheint die biologische Hauptfunktion der extrazellulär vorkommenden sekretorischen Form zu sein. Die Funktionen der beiden intrazellulären Formen sind weiterhin nicht ganz klar - eine Interferenz mit dem autokrinen IL-1 Mechanismus ist möglich (3). Alle Zellen, die IL-1 produzieren, produzieren auch IL-1ra, insbesondere Monozyten und epitheliale Zellen, wahrscheinlich mit Ausnahme von Endothelzellen (3). Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten scheinen nur die sezernierte Form zu bilden, Keratinozyten und andere epitheliale Zellen, Monozyten und Fibroblasten bilden die lange intrazelluläre Form. Die kurze intrazelluläre Form wird von Neutrophilen und Monozyten, aber auch von hepatischen Zellen produziert (3).

Das Gen für die drei Strukturvarianten des IL-1ra liegt auf Chromosom 2 (q14 - q21) und enthält vier Exons (62, 52). IL-1ra bindet an den IL-1 Rezeptor mit gleicher Affinität ohne agonistische Aktivität, das heißt, es liegt eine kompetitive Hemmung zwischen beiden vor. Alle Wirkungen von IL-1 werden gehemmt, einschließlich der Induktion der Proliferation glatter Muskelzellen (53). IL-1ra ist nicht spezies-spezifisch.

Der lösliche IL-1 Rezeptor, Typ I, bindet IL-1ra im Gegensatz zu Typ II fast selektiv. Mit löslichem Typ I-Rezeptor kann die antiinflammatorische Wirkung von IL-1ra neutralisiert werden (4, 65, 8, 64).

Bei systemischer Applikation von rekombinantem IL-1ra konnte *in-vivo* gezeigt werden, daß eine Antagonisierung der IL-1 Aktivität im Tiermodell nur bei

einem 100-1000 fachen Überschuß von IL-1ra möglich ist (5). Das Potential dieses natürlicherweise vorkommenden Antagonisten des proinflammatorisch wirkenden IL-1 bei der Abwehr von Sepsis und räumlich begrenzten entzündlichen Prozessen ist in verschiedenen Tiermodellen lokaler Gentherapie *in-vivo* gezeigt worden (2, 38, 15, 56, 57). Eine erhebliche Besserung der Symptome konnte in allen diesen Fällen nachgewiesen werden. Eine weitere konstante Beobachtung war eine Reduktion der infiltrierenden Neutrophilen und der damit verbundenen Entzündungsreaktion. Auch mit *ex-vivo* retroviral transfizierten Synoviazellen konnte im Arthritismodell am Kaninchen nach Reimplantation eine Hemmung Interleukin-1 induzierter Effekte gezeigt werden (29, 56, 57). Es konnten bei einer Vielzahl von entzündlichen Veränderungen erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem IL-1ra nachgewiesen werden (21, 47). Die Kinetik der Endotoxin-vermittelten Induktion von IL-1 und die gleichzeitige Hochregulation von IL-1ra zeigen, daß IL-1ra und IL-1 einem Feedback-Mechanismus unterliegen. Aufgrund dieser Funde ist es wahrscheinlich, daß IL-1ra auch bei entzündlichen Gefäßwandprozessen, wie sie nach perkutaner transluminaler Angioplastie und Stenting auftreten, eine Bedeutung hat.

Rekombinantes IL-1ra blockiert IL-1 Funktionen *in-vitro* und *in-vivo* (27). Es hemmt alle Wirkungen von IL-1, einschließlich der Induktion der Proliferation glatter Muskelzellen (53).

Um Hemmversuche mit rekombinantem IL-1ra durchzuführen, subklonierten wir IL-1ra in ein Plasmid, in dem die Expression des Gens unter der Kontrolle des eukaryonten humanen „immediate-early“ Cytomegalievirus Promoter (CMV) liegt. Die Ampicillinresistenz des Plasmids ermöglicht die Selektion

gegenüber Kontaminationen auf ampicillinhaltigen Nährböden. Mit diesem Konstrukt ist eine hohe Expression in eukaryonten Zellen möglich, so daß es, im Gegensatz zu den erreichten Konzentrationen im Rahmen einer natürlichen Hochregulation von IL-1ra, zu einer erhöhten lokalen Proteinkonzentration des Rezeptorantagonisten kommt, wie sie bei der Inhibierung IL-1 spezifischer Effekte benötigt wird.

2. Zielsetzung

Die Arbeiten zu vorliegender Dissertation fanden im Rahmen der Entwicklung einer somatischen Gentherapie mit *ex-vivo* Transfektion autologer Endothelvorläuferzellen zur Inhibierung der Neointimahyperplasie nach koronarer Stentimplantation statt.

Zentrale Mechanismen der Entstehung von Neointima nach Gefäßwandverletzung sind IL-1 induziert.

Die Grundlage dieser Dissertation ist die Hypothese, daß eine Hemmung der IL-1 vermittelten Entzündungsreaktion durch lokale Überexpression von IL-1ra, die Neointimabildung verhindern kann.

In dieser Arbeit sollte die *in-vitro* Funktionalität von subkloniertem IL-1ra in der Hemmung IL-1 vermittelter Entzündungsreaktionen gezeigt werden.

Um IL-1ra in Säugerzellen zur Expression zu bringen, wurden alle drei bekannten Isoformen des IL-1ra, mit ihren Antisense-Konstrukten als Negativkontrollen, zunächst in einen eukaryontischen Plasmidvektor pcDNA3.1(+) (Firma Invitrogen) subkloniert.

Die Genexpression wurde durch Nachweis des Proteins im ELISA überprüft, und dessen Funktionalität durch eine Hemmung der IL-1 vermittelten IL-6 Bildung untersucht.

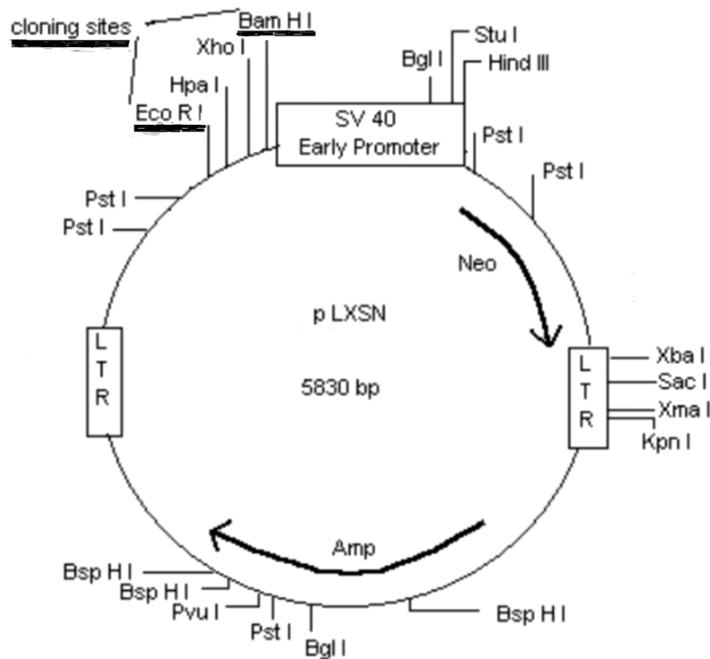
3. Methoden

3.1. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die cDNA, die die sekretorische, die kurze intrazelluläre, und die lange intrazelluläre Form des menschlichen IL-1ra kodiert, wurde in der „multiple-cloning-site“ des Vektors pLXSN von Dr. M. Muzio (Istituto di Ricerche Farmacologiche, Mailand) zur Verfügung gestellt.

Abb. 2 Genkarte Vektor pLXSN:

Multiple cloning site markiert



Die Sequenzanalyse zur Identifizierung der drei Isoformen, die durch alternatives splicing der mRNA entstehen, erfolgt nach der Didesoxy-Methode von Sanger et al. (59), mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide als Primer (Firma MWG Biotech AG, Ebersberg) und einem automatischen DNA-Sequenziergerät (Model 4000; LI-COR, Lincoln, NE).

Sequenz und Bezeichnung der Primer (unter Angabe der Orientierung):

SI101 5'-GGT ACC CAT TGA GCC TCA TGC-3'

SI102 3'-CCA CTA CTC TGG TCT GAG GTC -5'

3.1.1. Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wird nach dem „Cycle-sequencing“ Protokoll des Herstellers durchgeführt (Amersham, UK).

Der Ansatz setzt sich hierbei aus 1,8 bzw. 3,6 µg DNA, 2 pmol Primer, 1 µl Dimethylsulfoxid (Sigma), und H₂O ad 25 µl zusammen. Zu diesem Ansatz werden 2 µl des jeweiligen Nukleotides (A, T, C, G) pipetiert, und zur Amplifikation in einen Thermocycler (Firma MWG Biotech AG, Ebersberg) gestellt.

In der Sequenzierreaktion verbindet sich der fluoreszenzmarkierte Primer mit der hitzedenaturierten, d.h. Einzelstrang-DNA. Der Komplex inkubiert mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase unter Anwesenheit von Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) und Didesoxynukleotid-Triphosphaten (ddNTPs).

Die ddNTPs, die neben den dNTPs vorliegen, führen in den vier Ansätzen jeweils zum Strangabbruch nach dem Einbau, was statistisch verteilt zu

Fragmenten jeder Länge führt. In jedem Sequenzierzyklus wird die Reaktion für 2 _ Minuten auf 95°C erhitzt, die doppelsträngige DNA wird zur Einzelstrang-DNA denaturiert. Zur Anlagerung des Primers wird die Temperatur für 15 Sekunden auf 60°C gesenkt, und für die Elongation durch die DNA-Polymerase für 15 Sekunden auf 72°C erhöht. Dieser Prozeß wird über 30 Zyklen wiederholt.

Die DNA-Fragmente werden unter denaturierenden Bedingungen in vertikalen Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenzgelen nach ihrer Größe aufgetrennt, und deren Lage im Sequenzgel mittels Laserdetektion des fluoreszierenden Anteils im unteren Abschnitt des Gels sichtbar gemacht.

3.1.2. Automatische Gelelektrophorese und Sequenzanalyse

Ein automatisches DNA-Gelelektrophoresesystem (Model 4000; LI-COR, Lincoln, NE) mit einer bei 785 nm emittierenden Laserdiode und einer Fluoreszenzdetektion zwischen 815 und 835 nm wurde zur Detektion und Analyse der Sequenzfragmente verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem 25 cm x 32 cm x 0,4 mm vertikalen Gel. Dieses setzt sich zusammen aus 30 ml „Sequagel XR“, 7,5 ml „Sequagel complete buffer“ (beides „national diagnostics“, USA), 400 µl Dimethylsulfoxid (Sigma) und 300 µl Ammoniumpersulfat (10%). Der Laufpuffer besteht aus einfach konzentriertem TBE (Tris-Borat-EDTA, Gibco).

Vor Auftragung der Probe wird für 30 Minuten eine Spannung von 1500 Volt angelegt, die eine gleichmäßige Temperatur im Gel erzeugen soll. Außerdem

wird damit die Fokussierung des Lasers verifiziert und eine Kontrolle der Elektrophoreseparameter ermöglicht.

Von den Sequenzierreaktionen werden jeweils 2,4 μ l der Probe in die Geltasche aufgetragen und anschließend die Elektrophorese konstant bei 1000 Volt und 50°C über Nacht durchgeführt.

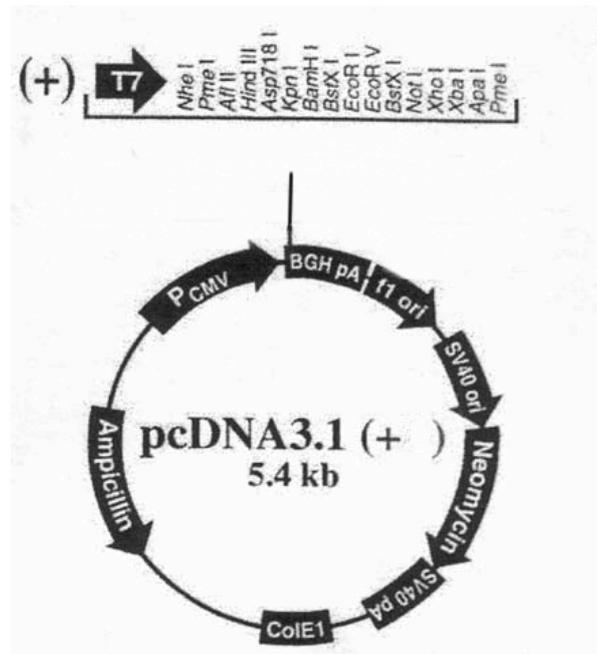
Zur Auswertung wird ein Computer der Firma Peacock und die dem DNA-Sequencer Model 4000 beigelegte Software verwendet. Zur Überprüfung der Sequenzen erfolgt ein Vergleich mit den vorliegenden Gensequenzen der Datenbank des Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Im Anschluß an die Sequenzierung wurde ein Restriktionsverdau der drei Plasmide durchgeführt.

3.2. Subklonierung der IL-1ra Isoformen in pcDNA3.1(+)

Nach Identifizierung der drei Isoformen des IL-1ra werden sie in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA 3.1(+) (Invitrogen), in welchem die Genexpression unter der Kontrolle des „immediate early“-Promotors des menschlichen Cytomegalievirus erfolgt, subkloniert. Der Vektor enthält neben der „multiple-cloning-site“ eine zusätzliche Sequenz, welche zu einer Resistenz gegen Ampicillin führt. Dadurch wird bei der späteren Transformation von Bakterien mit diesem Plasmid eine Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien gegenüber solchen, die nicht resistent sind, möglich.

Abb. 3 Genkarte Vektor pcDNA 3.1(+):



3.2.1. Präparation der pcDNA3.1(+)

3.2.1.1. Transformation E.coli JM 109 kompetenter Zellen

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in vorbehandelte Bakterienzellen eingebracht, mit dem Ziel des späteren Wachstums der Bakterien auf ampicillinhaltigen Agarplatten. Durch den Zusatz des Antibiotikums findet eine Selektion der transformierten Bakterien, welche eine in der Plasmid-DNA eingebaute Resistenz gegen Ampicillin enthalten, gegenüber nicht transformierten Bakterien statt. Einzelne Klone können auf Nährböden identifiziert, und in einem weiteren Arbeitsschritt vermehrt werden. Die damit

vervielfältigte DNA steht nach Extraktion und Reinigung für weitere Anwendungen zur Verfügung.

Der Expressionsvektor pcDNA3.1(+) wird in E.coli JM 109 kompetente Zellen (Promega) eingebracht.

JM 109 Zellen werden im Eisbad aufgetaut, und jeweils 50 μ l der Bakterien pro Transformationsansatz in sterile, vorgekühlte, 15 ml Polypropylenröhrchen (Falcon) pipettiert. In einem Volumen von 5 μ l wurden 20 ng des Vektors pro Ansatz hinzugefügt, und der Ansatz anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Es erfolgte eine einminütige Inkubation der Zellen im 42°C warmen Wasserbad, bei der sich die Poren der Zellmembran kurzzeitig öffnen, und das Plasmid aufgenommen wird. Anschließend werden die Ansätze für 2 min auf Eis gestellt, und mit 250 μ l raumtemperiertem S.O.C.-Medium (2 g Bacto-Trypton, 0,5 g Bacto-Yeast Extrakt, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl, 1 ml 2M, filtersterilisierte Glukose ad 100 ml destilliertes H₂O) versetzt. Es erfolgt eine Inkubation von 60 min bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler. Anschließend wird der gesamte Ansatz auf bei 37°C vorgewärmte, ampicillinhaltige (100 μ g/ml) Agarplatten mäanderförmig aufgetragen, und die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Als Kontrollvektor wurde ein dem Kit beigefügtes Plasmid (pGEM-3Z) eingesetzt, welches kein Wachstum auf Nährmedien aufweist.

Präparation der Agar-Platten:

7,5 g Bacto-Agar ad 500 ml LB-Medium.

Nach Autoklavierung und Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 μ g/ml) bei 42 °C werden die Platten (Cellstar, Greiner Labortechnik) gegossen.

Zusammensetzung des LB-Mediums:

10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Yeast Extakt; 10 g NaCl; ad 1000 ml Wasser (Millipore).

Nach Lösung der Ingredienzen wird das Medium autoklaviert, und auf 42 °C abgekühlt, um Ampicillin hinzuzufügen (100 µg/ml).

3.2.1.2. Vektorvermehrung (Maxi-Präparation)

Die gewonnenen Klone werden mit Hilfe des „Qiagen plasmid purification kits“ einer DNA Vermehrung und Reinigung unterzogen.

Einzelne Klone werden in 5 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium aufgenommen, und in sterilen 15 ml Polypropylenröhrchen (Falcon) bei 37 °C und 225 rpm über 8 h im Schüttler inkubiert. Anschließend werden die jeweiligen Ausgangskulturen mit selektivem LB-Medium 1/300 verdünnt, und in autoklavierten 500 ml Glasflaschen bei gleichen Bedingungen über Nacht erneut inkubiert.

Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min werden die Bakterien geerntet, in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris·Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert, und in 50 ml Polypropylen Röhrchen (Falcon) überführt.

Nach Hinzufügen von 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), zur Lyse der Zellen, und vorsichtigem Mischen durch mehrmaliges Umkippen der Röhrchen, erfolgt eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur.

Zur Ausfällung der Proteine wird 10 ml eisgekühlter Puffer P3 (3,0 M Kaliumazetat, pH 5,5) zugegeben, und für 20 min auf Eis inkubiert.

Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C, wird der DNA-haltige Überstand abgenommen, und erneut für 15 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Nach Äquilibration einer „Qiagen“-Säule mit DNA-Bindungskapazität durch 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol; 0,15% Triton X-100) wird die DNA appliziert, und anschließend mit 30 ml Puffer QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol) zweimal gewaschen.

Zur DNA-Elution werden 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris, Tris·Cl, pH 8,5; 15% Isopropanol) eingesetzt, und das Eluat in 10 ml Glasröhrchen (Borex) gesammelt.

Zur Präzipitation der DNA werden 10,5 ml raumtemperiertes Isopropanol hinzugefügt, gemischt, und bei 8000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wird das Pellet zur Ausfällung der Salze mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, und unter gleichen Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, und die DNA für 10 min vom leicht flüchtigen Alkohol getrocknet, um anschließend in 100 µl TE Puffer (10 mM Tris·Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst zu werden.

3.2.1.3. Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

5 µl der in TE gelösten DNA werden in 495 µl aqua dest aufgenommen, und die Extinktion bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm mit einem Spektralphotometer (Uvikon 930 Spectrophotometer, Kontron instruments) bestimmt. Eine in Wasser gelöste DNA, deren optische Dichte $260 = 1$ ist,

enthält 50 µg DNA pro ml. Der Quotient OD 260 /OD 280 läßt Aussagen über die Reinheit der Präparation zu. Liegt der Wert < 2 sind noch Proteine, liegt er > 2, ist noch Phenol in der Verdünnung enthalten.

3.2.1.4. Restriktion und SAP-Behandlung

Die pcDNA3.1(+) wird sowohl mit EcoRI, als auch in einem weiteren Ansatz mit BamHI, an der „multiple-cloning-site“ geschnitten. Das jeweils linearisierte Plasmid wird mit „calf-intestine-alkaline-phosphatase“ (SAP) (Boehringer-Mannheim) behandelt, um endständige Phosphatreste abzuspalten, und damit eine Religation zur Ringform zu verhindern. Dabei werden 5 µl des Enzyms und 6 µl eines 10x Dephosphorylierungspuffers zu 50 µl Restriktionsansatz gegeben, gevortext und das Gemisch zunächst für eine Stunde bei 37 °C, und anschließend für eine weitere halbe Stunde bei 65 °C im Thermoblock inkubiert.

3.2.1.5. Phenolextraktion und Ethanolprecipitation

Zur Säuberung des Produktes von Enzymresten schließt sich eine Phenolextraktion an, bei der mit TE gesättigtes Phenol in wässriger Lösung in gleichem Volumen wie die vorliegende DNA dem Ansatz zugefügt wird. Die obere Phase, mit der in Wasser gelösten DNA, wird nach 20 s vortexen und 1 min zentrifugieren in einer Tischzentrifuge (Biofuge Fresco, Heraeus instruments) bei 14.000 rpm abgenommen.

Es folgt eine Ethanolprecipitation mit 10x ACE (Acetat/EDTA, Gesamt-pH 5; 1/10 des Gesamtansatzes) und 100% Ethanol (3-fache Menge des Gesamtansatzes).

Der Ansatz wird gemischt, und die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt.

Die DNA wird durch 10 min. zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C pelletiert, und anschließend mit 500 μ l 100% bzw. 70% Ethanol gereinigt und getrocknet.

Das Pellet wird in TE-Puffer (10 mM Tris·Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA; Qiagen) aufgelöst.

3.2.2. Präparation der Inserts

3.2.2.1. Restriktion

Die pcDNA LXSN mit den integrierten Isoformen des IL-1ra wird mit BamHI (Boehringer-Mannheim) bzw. EcoRI (Amersham Pharmacia) so geschnitten, daß jeweils ein ca. 600 Basenpaare Fragment der entsprechenden IL-1ra Isoform mit sogenannten „glatten“ Schnittstellen im DNA-Molekül (blunt-ended) freigesetzt wird. Hierfür wird 100 IE Enzym/ μ g DNA eingesetzt. Ein Zehntel des Ansatzes besteht aus Puffer. H₂O wird ad 10 μ l Gesamtvolumen hinzugefügt. Anschließend wird die Reaktion über 2 Stunden bei 37°C inkubiert, und zur Elektrophorese mit 3 μ l 4x Ficoll als Probenpuffer versetzt.

Enzymeinsatz:

Sekretorische Form: BamHI

Intrazelluläre kurze Form: EcoRI

Intrazelluläre lange Form: EcoRI

3.2.2.2. Gelelektrophorese:

Es folgt die elektrophoretische Separation des Gens vom ursprünglichen Vektor in einem Agarosegel. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente werden 0.8% ethidiumbromidhaltige, horizontale Gele verwendet, mit einfach konzentriertem TBE als Laufpuffer (Gibco). Die Elektrophorese wird bei konstant 100 Volt durchgeführt. Die optisch gut identifizierbaren IL-1ra Banden werden, nach Lokalisierung unter Ultraviolett-Strahlung, ausgeschnitten, und mittels einer Glasmilchelution (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Boehringer-Mannheim) isoliert.

3.2.2.3. Glasmilchelution

Nukleinsäuren werden spezifisch in Gegenwart eines chaotropen Salzes an Glas- oder Silica-Oberflächen gebunden (68).

Aufgrund der hohen Spezifität dieses Vorgangs kann die DNA, nach der Durchführung eines Waschvorgangs, frei von Verunreinigungen, wie z.B. Salzen, freien Nukleotiden oder Proteinen, extrahiert werden.

Zur Lösung der Agarose werden 300 μ l Puffer pro 100 mg Gel zugegeben, und zusätzliche 10 μ l einer Silica-Suspension hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation über 10 min bei 56 °C, unter wiederholtem Schütteln der Suspension.

Nach einem 30-sekündigen Zentrifugationsschritt bei 40000 rpm in einer Tischzentrifuge und Verwerfen des Überstandes, werden dem die DNA enthaltenden Pellet, 500 μ l Nukleinsäurebindungspuffer zugesetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Es folgen zwei Schritte mit je 500 μ l Waschpuffer, nach denen sich ebenfalls je eine Zentrifugation für 30 sek bei höchster Stufe anschließt, und der Überstand verworfen wird. Die so entstandene Matrix wird daraufhin ca. 15 min luftgetrocknet, und zur Elution der DNA mit 20 μ l TE-Puffer (10 mM Tris·Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA) versetzt. Nach vortexen und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, während der die Lösung immer wieder gemischt wird, folgt eine weitere Zentrifugation. Der das DNA-Fragment enthaltene Überstand wird nun in ein Eppendorf Gefäß überführt.

Es schließt sich eine zweite Reinigung über eine Säule (Centricon, Millipore Corporation) an, in der der gewonnene Überstand mit 2 ml TE-Puffer (s.o.) versetzt, und für 30 min bei 8000 rpm (20°C) zentrifugiert wird, um anschließend mit 50 μ l TE-Puffer für 2 min bei 3500 rpm (20°C) aus der Membran ausgewaschen zu werden. Das so gewonnene, gereinigte Insert steht nun für weitere Anwendungen zur Verfügung.

3.2.3. Plasmidkonstruktion

Die cDNA für die sekretorische Form des IL-1ra wird über BamHI-Enden mit dem durch BamHI linearisierten Vektor fusioniert. Die cDNA für die beiden intrazellulären Formen wird über EcoRI-Enden in den mit EcoRI linearisierten Vektor integriert.

Es kommt zum Einbau der cDNA in beiden möglichen Orientierungen: In der Sense-Orientierung erfolgt die Expression des IL-1ra Gens; das Antisense-Plasmid liefert kein funktionsfähiges Genprodukt, dient aber als spezifische Negativ-Kontrolle von Effekten, die durch IL-1ra erzeugt werden.

3.2.3.1. Ligation

Im Ligationsansatz liegt das Insert (ca. 600 Bp) im 5-fachen Überschuß zum Vektor (ca. 6000 Bp) vor (100 ng : 20 ng). Die Fusion erfolgt mit Hilfe einer T4-Ligase (Boehringer-Mannheim) und entsprechendem Puffer über Nacht bei 4°C.

3.2.3.2. Transformation und Plasmidvermehrung

Zur Amplifikation werden die rekombinanten Plasmide in transformationskompetente E.coli JM109-Zellen (Promega) nach Herstellervorschrift (3.2.1.1.) eingeschleust, und auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) Agarplatten angezüchtet.

Es werden fünf Ansätze durchgeführt: Die drei IL-1ra Formen (sekretorische, lange und kurze intrazelluläre Form), der Vektor 3.1(+) ohne funktionelles Gen zur Kontrolle (kein Wachstum auf Nährmedien), und ein weiterer Kontrollvektor pGEM-3Z, der dem Kit beigelegt ist.

Die DNA wird mit Hilfe eines Reinigungs-kits (Qiagen), gemäß Angaben des Herstellers (3.2.1.2.), gereinigt und vervielfältigt.

3.2.3.3. Asymmetrischer Kontrollverdau

Die Identifikation der Sense-, und Antisense-Orientierung, erfolgt durch Restriktionsenzymanalyse der Plasmide mit HpaI (Boehringer-Manheim), ein Enzym, das zwei Schnittstellen im Insert besitzt, und ApaI (Boehringer-Manheim), welches ein weiteres Mal im Vektor schneidet.

Die dabei entstehenden, unterschiedlich langen, DNA-Fragmente (jeweils drei) werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, und unter Ultraviolett-Strahlung fotografiert. Die unterschiedlichen Bandenmuster von Sense und Antisense können so identifiziert werden.

3.3. Zellkultur

3.3.1. Zellarten, Zellzüchtung

Für die nachfolgenden Transfektions- und Hemmversuche werden ECV-304 Zellen, eine endotheliale Zelllinie aus humanen Blasenkarzinomzellen, und klonale Isolate von transformierten, embryonalen, menschlichen Nierenzellen (293T-Zellen, Gibco BRL), verwendet.

Die Vermehrung der Zellen erfolgt in Gewebekulturflaschen (Cellstar, Greiner Labortechnik) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank .

ECV-Medium:

Das Medium M-199 (Sigma) für die Kultivierung der ECV-304 Zellen enthält zusätzlich 20 ml fetales Kälberserum (FCS, Gibco), bei 56°C für eine halbe Stunde hitzeinaktiviert, 10 ml Penicillin/Streptomycin (Sigma), und 1,3 ml L-Glutamin (Sigma).

293T-Medium:

293T Dulbecco's Mod Eagle Medium (Gibco, BRL) wird zusätzlich mit 50 ml hitzeinaktiviertem FCS, 10 ml Penicillin/Streptomycin, und 1,5 ml L-Glutamin versetzt.

Zum Waschen der Zellen wird jeweils PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM NaH₂PO₄; 1,47 mM KH₂ PO₄; pH 7,4; Sigma), zum Ablösen der Zellen Trypsin EDTA (Sigma) verwendet.

3.4. Liposomale Transfektion, X-Gal Färbung

Zur transienten Expression des IL-1ra Gens werden die Plasmide mit Hilfe eines Lipofektionsverfahrens in eukaryonte Zellen eingeschleust. Liposomen bilden mit Plasmid-DNA in serumfreier Lösung Komplexe, die mit Zellmembranen fusionieren, und mittels Endozytose eine Freisetzung der DNA in das Zellinnere ermöglichen (Felgner et al., 1987).

Zur Optimierung der Effizienz des Gentransfers wird eine Doppeltransfektion mit dem Reportergen LacZ, unter der Kontrolle eines CMV-Promotors in dem Expressionsvektor (pCMV β), durchgeführt. Bei erfolgter Genexpression des β -Galactosidaseenzym färbt sich die entsprechende Zelle nach Angebot des Substrates 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranocid (X-Gal) blau an. Nach einem Waschvorgang mit 500 μ l PBS werden die Zellen mit 600 μ l einer Fixationslösung behandelt (2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd; 1/10 mit PBS verdünnt), erneut gewaschen, und 800 μ l X-Gal Substratlösung aufgetragen. Es folgt die lichtgeschützte Inkubation bei 37°C über Nacht.

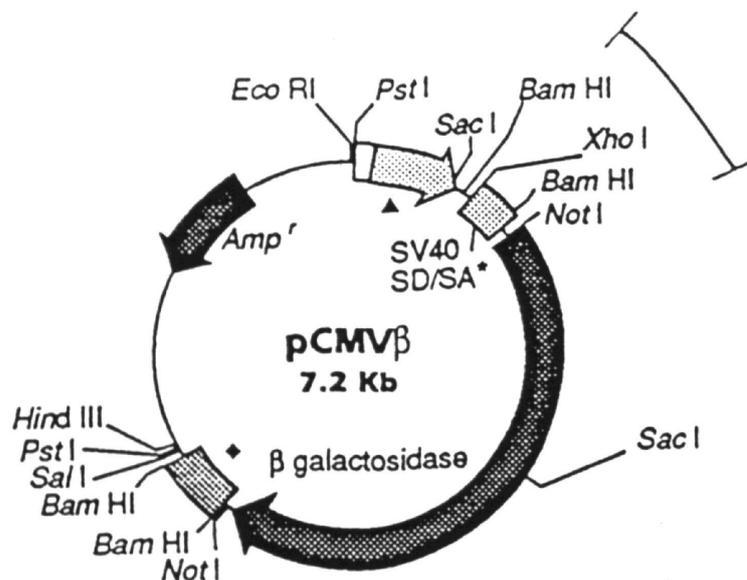
Die Transfektion erfolgt in ECV-304, und 293T-Zellen, wobei jeweils ca. 80.000 Zellen pro Vertiefung über Nacht auf 6-Well-Platten (Cellstar, Greiner Labortechnik) ausgelegt werden, und am nächsten Tag, bei ca. 60% Konfluenz, mittels des "superfect transfection reagent" (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers (s.u.) transient transfiziert werden. Dabei werden 5 μ l Liposomen für den Transfer von 2 μ g DNA verwendet.

Substratlösung X-Gal (10 ml):

9,35 ml PBS, 200 μ l 0,1M Magnesiumchlorid, 100 μ l 0,5M Kaliumferrocyanid,
100 μ l 0,5M Kalium, 250 μ l X-Gal Lösung (0,02g X-Gal ad 1 ml DMSO).

Abb. 4 Genkarte Vektor pCMV β :

◀ CMV Promotor



3.4.1. Transfektionsverfahren

Die in TE-Puffer vorliegende DNA wird mit 100 μ l serumfreien Medium versetzt, und das Transfektionsreagenz zugefügt. Nach kurzem Durchmischen folgt eine Inkubation für 5-10 min bei Raumtemperatur, in der die Komplexbildung stattfindet. Während dieser Zeit wird das alte Medium von den Zellen aspiriert, und diese mit 1 ml PBS (s.o.) gewaschen.

Nach Inkubation werden dem Reaktionsgemisch 600 μ l serumhaltiges Medium zugesetzt, gemischt, und dieses auf die 6-Well-Platten transferiert (pro Vertiefung ein gesonderter Transfektionsansatz). Es folgt eine Inkubation der Zellen mit dem Liposomen-DNA-Komplex für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Dann wird das Medium abgenommen, die Zellen erneut mit 1 ml PBS (s.o.) gewaschen, und über Nacht mit 1 ml Vollmedium unter gleichen Bedingungen im Brutschrank in Kultur gehalten.

Die β -Galactosidase positiven Zellen werden für den direkten Effizienzvergleich zwischen den beiden Zelltypen mittels einer Kamera (EOS 500 N, Canon) unter dem Auflichtmikroskop (Axiovert, Zeiss) fotografiert (Kodak, Ektachrome 64T). Es zeigte sich eine ca. 5% Transfektionsrate in den ECV-304 Zellen, und eine ca. 50% Effizienz in 293T-Zellen.

Zur Prüfung des Vorliegens eines funktionsfähigen IL-1ra Proteins wird anschließend ein ELISA (Quantikine, R&D Systems) durchgeführt, bei dem alle drei Isoformen erkannt werden.

3.5. Prinzip des ELISA und Meßmethode

Die Meßtechnik des ELISA beruht auf einer quantitativen Enzym-Antikörper-Bindung (Sandwich-Technik). Eine 96-Well Mikrotiterplatte ist mit einem (z.B für IL-1ra oder IL-6) spezifischen, monoklonalen Antikörper beschichtet. Standards und Proben werden aufpipettiert, und vorhandenes Protein (IL-1ra oder IL-6) an den fest mit der Platte verankerten Antikörper gebunden. Es folgt ein mehrmaliges Waschen der Vertiefungen um alle ungebundenen Reste zu entfernen. Danach wird ein, spezifisch für das zu messende Protein, enzymgebundener polyklonaler Antikörper aufgetragen, und abermals gewaschen, um ungebundene Substanz zu entfernen. Schließlich pipettiert man ein chromogenes Substrat auf die Vertiefungen, welches einen Farbumschlag katalysiert. Die Intensität des Farbumschlags im letzten Reaktionsschritt korreliert mit der Menge an initial gebundenem Protein und wird durch Messung der optischen Dichte an einem Photometer (Uvikon 930 Spectrophotometer, Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Standards, Proben und Kontrollen, werden jeweils im Doppelansatz aufgetragen. Die mit den intrazellulären Formen des IL-1ra transfizierten Zellen werden vor der Messung lysiert, und das von Zelldedritus gereinigte Lysat für die Bewertung der Proteinproduktion herangezogen. Bei der sekretorischen Form wird die Proteinkonzentration im Medium des Überstandes gemessen. Für die Berechnung der Ergebnisse werden die Werte gemittelt, und die durchschnittliche optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt. Um optische Unreinheiten der Platte zu korrigieren, werden außerdem Messungen bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt, und diese von den

Werten bei 450 nm subtrahiert. Mittels der beigefügten Photometer-Software wird eine Standardkurve berechnet.

Sensitivität: Gemäß Herstellerangaben liegt das Minimum der noch meßbaren Proteindosis unter 14 pg/ml.

Spezifität: Die benutzten „Immunoassay-Kits“ erkannten sowohl natürliche, als auch rekombinante Proteine. Kreuzreaktionen waren ausgeschlossen, Interferenzen wurden bei Konzentrationen >1000 pg/ml beobachtet.

3.6. Hemmversuche

Die biologische Funktion des nach Gentransfer exprimierten Proteins wird ebenfalls in einem ELISA (Milenia, DPC Biermann) geprüft. Die IL-1 vermittelte IL-6 Expression von Endothelzellen soll durch IL-1ra gehemmt werden. Für eine bessere quantitative Beurteilung der Hemmung werden die Versuche nur in ECV-304 Zellen durchgeführt, da sich die 293T-Zellen aufgrund überschießender Stimulation (außerhalb des Meßbereiches) hier als ungeeignet erweisen.

Zwei verschiedene Modelle werden gewählt. Im ersten Modell werden ECV-304 Zellen initial mit IL-1ra transfiziert, und nach 3-stündiger Stimulation mit IL-1 β (50 pg/ml), die IL-6 Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen. Verglichen werden alle drei Isoformen mit ihren Antisense-Konstrukten als Negativkontrollen.

Zur Bestätigung der Hemmergebnisse folgen in einem zweiten Modell weitere Versuche nach einem modifizierten Schema des ersten Ansatzes - die Gabe von IL-1 β und IL-1ra erfolgt nun gleichzeitig, nicht zeitlich versetzt.

Die Versuche werden ausschließlich mit der sekretorischen Form des IL-1ra durchgeführt, da dieses Genprodukt für den Einsatz in der somatischen Gentherapie von Bedeutung wäre. Sekretorisches IL-1ra war zuvor nach Gentransfer in Zellkultur (siehe oben) exprimiert, und die Konzentration im ELISA bestimmt worden. IL-1 β (50 pg/ml) und IL-1ra (50 ng/ml) werden im Verhältnis 1:1000 gemischt, und mit serumhaltigem Nährmedium gleichzeitig auf die mit PBS gewaschenen Endothelzellen gegeben. Nach einer 6-stündigen Inkubation (Stimulation maximal, danach keine weitere Steigerung der IL-6 Produktion mehr möglich), erfolgt die Abnahme der Überstände, und deren Messung in einem ELISA. Die Versuche werden jeweils mit der Antisense-Form des Plasmids und dem Insertlosen Vektorplasmid 3.1(+) kontrolliert, und zusätzlich Messungen mit unstimulierten Zellen, d.h ohne die Zugabe von IL-1 β , durchgeführt. Außerdem wird ein Zellüberstand ohne jeglichen Zusatz und ein Überstand nach alleiniger IL-1 β Stimulation, das heißt, in beiden Ansätzen ohne IL-1ra, zur Kontrolle gemessen. Spezifische IL-1 β Antikörper (R&D Systems) hemmen die IL-1 induzierte IL-6 Produktion ebenfalls, und werden daher zusätzlich als Kontrolle in einem weiteren Ansatz eingesetzt.

Zusammenfassend erfolgt die Prüfung der Funktionalität des Genproduktes p3.1(+)/ sekretorisches IL-1ra, durch Hemmversuche, in denen die Interleukin-1 β vermittelte Produktion des Entzündungsindikators Interleukin-6 durch die

Zugabe der sekretorischen Form von Interleukin-1ra gehemmt wird, bzw. durch Hemmung direkt mit IL-1ra transfizierter ECV-304 Zellen.

Zwei verschiedene Modelle werden gewählt:

Modell 1: Hemmung der Interleukin-6 Produktion durch mit IL-1ra transfizierte ECV-304 Zellen nach Stimulation mit IL-1 β .

Modell 2: Hemmung der Interleukin-6 Produktion in ECV-304 Zellen durch gleichzeitige Inkubation mit IL-1 β und sekretorischem IL-1ra.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte durch jeweils spezifische „ELISA-Immunoassay-Kits“, gemäß den Angaben der Hersteller (s.o.).

3.6. Statistische Datenverarbeitung

Die statistische Auswertung der im ELISA gemessenen Daten erfolgte mit einem üblichen Statistikprogramm (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS ©, SPSS GmbH München, BRD), wobei ein signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) angenommen wurde. Zur Überprüfung von statistisch nachweisbaren Unterschieden zwischen den Messwerten kam der t-Test für verbundene Stichproben zur Anwendung.

4. Ergebnisse

4.1. Sequenzen der IL-1ra Isoformen

Die cDNA-Sequenzierung der sekretorischen, der kurzen-, und der langen intrazellulären Form des menschlichen IL-1ra, in der „multiple-cloning-site“ des Vektors pLXSN von Dr. M. Mucio (Istituto di Ricerche Farmacologiche, Mailand) zur Verfügung gestellt, ergab neben der spezifischen Gensequenz die jeweiligen Klonierungsstellen im Vektor, sowie die Sequenzorientierung. Für die sekretorische Form konnten wir BamHI als Klonierungsstelle bestimmen, für die beiden intrazellulären Formen EcoRI. Alle drei Isoformen des IL-1ra liegen in 5' → 3' Orientierung vor, d.h. es handelt sich jeweils um die Sense-Form, welche die Expression des IL-1ra Gens erlaubt. Die Isoformen entstehen durch alternatives Splicing einer mRNA - ihnen ist eine 473 Aminosäure lange Sequenz gemeinsam. Die spezifische Proteinsequenz der sekretorischen Form umfaßt weitere 83 Basenpaare, die der kurzen intrazellulären Form weitere 42 Basenpaare, und die der langen intrazellulären Form weitere 106 Basenpaare. Der für die jeweilige IL-1ra Isoform spezifische Sequenzabschnitt ist dabei der gemeinsamen Sequenz vorangestellt. Die Sequenzanalyse erfolgte unter Vergleich mit den vorliegenden IL-1ra Sequenzen der Datenbank des Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Abb. 5 Sekretorische Form des IL-1ra:

GAATTCGTTAACTCGAGGATCCGATTGAATTCGGGCTGCAGTCAC
AGAATGGAAATCTGCAGAGGCCTCCGCAGTCACCTAATCACTCT
CCTCCTCTTCCTGTTCCATTgemeinsame SequenzCGAGACGATCTGCCGACCCTCTGGG
AGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCA
GAAGACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGC
AAGGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATT
GAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCATGGAGGGAAGATGTGCCT
GTCCTGTGTCAAGTDTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGCAG
TTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTT
CGCCTTCATCCGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGC
CGCCTGCCCCGGTTGGTTCCTCTGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGC
CCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAAA
TTCTACTTCCAGGAGGACGAGTAGTACGGATCCGGCTG → weiter
Vektor pLXSN

Abb. 6 Kurze intrazelluläre Form des IL-1ra:

Eco RI kurzes, intrazelluläres IL-1-Ra
GAATTCGGCTTCAGAAGACCTCCTGTCCCTATGAGGCCCTCCCAT
gemeinsame Sequenz
GGCTTTAGAGACGATCTGCCGACCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAG
ATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCT
GAGGAAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCA
ATTTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTG
TTCTTGGGAATCCATGGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTD
TGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGCAGTTAACATCACTGACC
TGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCCTTCATCCGCTCA
GACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTG
GTTCTCTGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCA
ATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGAG
Sequenzende Eco RI
GACGAGTAGTACCCGAATTCGTTAACTCGAG → weiter Vektor pLXSN.

Abb. 7 Lange intrazelluläre Form des IL-1ra:

Eco RI langes, intrazelluläres IL-1-Ra →
GAATTCGGCTCAGAAAGACCTCCTGTCTATGAGGCCCTCCCCATG
GCTTTAGCTGACTTGTATGAAGAAGGAGGTGGAGGAGGAGGAGA
AGGTGAAGACAATGCTGACTCAAAGGAGACGATCTGCCGACCCTC
TGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTA
ACCAGAAGACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCTGGATAC
TTGCAAGGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACC
CATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCATGGAGGGAAGATGT
GCCTGTCCTGTGTCAAGTDTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAG
GCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGC
GCTTCGCCTTCATCCGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGT
CTGCCGCTGCCCCGGTTGGTTCCTCTGCACAGCGATGGAAGCTGAC
CAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCAC
CAAATTCTACTCCAGGAGGACGAGTAGTACCCGAATTCGTAACTC
Sequenzende Eco RI
GAG → weiter Vektor pLXSN

4.2. Restriktion Vektor pLXSN

Alle drei Formen des IL-1ra waren „blunt-ended“ in den Vektor pLXSN subkloniert worden, und wurden daher jeweils mit nur einem Restriktionsenzym isoliert. Die sekretorische Form wurde mit dem Enzym BamHI herausgeschnitten, und sowohl die lange, als auch die kurze intrazelluläre Form mit EcoRI.

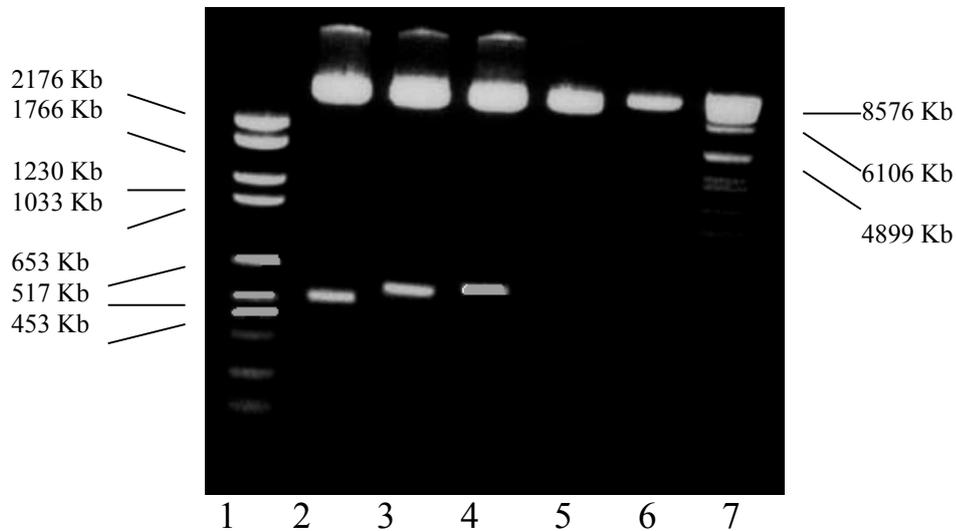


Abb. 8 Verdau des Vektors pLXSN für kurzes intrazelluläres, langes intrazelluläres und sekretorisches IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2: isoliertes kurzes intrazelluläres IL-1ra (515 Kb); Spur 3: isoliertes sekretorisches IL-1ra (556 Kb); Spur 4: isoliertes langes intrazelluläres IL-1ra (579 Kb); Spur 5: mit EcoRI linearisiertes Plasmid; Spur 6: mit BamHI linearisiertes Plasmid; Spur 7: Marker VII.

4.3. Gelanalyse der Subklonierung in p3.1(+)

Die drei IL-1ra Isoformen wurden in die „multiple-cloning-site“ des Vektors p3.1(+) kloniert. Hierbei wurden beide intrazellulären Formen wie im Vektor pLXSN an der EcoRI Schnittstelle eingefügt. Die sekretorische Sequenz wurde mit der BamHI Schnittstelle ligiert.

Folgende rekombinanten Plasmide wurden kloniert:

Nomenklatur	Gen des IL-1ra
p3.1(+) _{ics-s}	intrazelluläre kurze Form, Sense Orientierung
p3.1(+) _{ics-as}	intrazelluläre kurze Form, Antisense Orientierung
p3.1(+) _{icl-s}	intrazelluläre lange Form, Sense Orientierung
p3.1(+) _{icl-as}	intrazelluläre lange Form, Antisense Orientierung
p3.1(+) _{s-s}	sekretorische Form, Sense Orientierung
p3.1(+) _{s-as}	sekretorische Form, Antisense Orientierung

Der Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen zeigt die unterschiedlich langen IL-1ra Fragmente, und den ungeschnittenen Vektor p3.1(+) mit Insert.

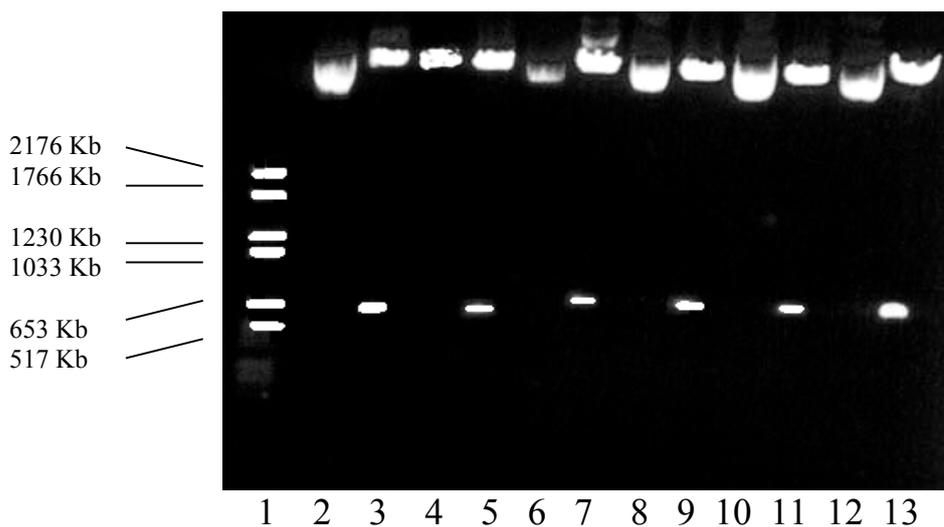


Abb. 9 Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für kurzes intrazelluläres, langes intrazelluläres, und sekretorisches Sense und Antisense IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2-5: kurze intrazelluläre Form; Spur 6-9: lange intrazelluläre Form; Spur 10-13: sekretorische Form.

Spur 2: linearisiertes Sense-Plasmid p3.1(+)*ics-s*; Spur 3: isoliertes *ics-s*; Spur 4: linearisiertes Antisense-Plasmid p3.1(+)*ics-as*; Spur 5: isoliertes *ics-as*; Spur 6: linearisiertes Sense-Plasmid p3.1(+)*icl-s*; Spur 7: isoliertes *icl-s*; Spur 8: linearisiertes Antisense-Plasmid p3.1(+)*icl-as*; Spur 9: isoliertes *icl-as*; Spur 10: linearisiertes Sense-Plasmid p3.1(+)*s-s*; Spur 11: isoliertes *s-s*; Spur 12: linearisiertes Antisense-Plasmid p3.1(+)*s-as*; Spur 13: isoliertes *s-as*.

4.4. Ergebnisse der asymmetrischen Kontrollrestriktionen

Nach Subklonierung der drei Formen des IL-1ra und Erhalt verschiedener Konstrukte, ergibt die asymmetrische Restriktionsanalyse mit HpaI und ApaI deren Orientierung im Vektor p3.1(+). Durch das unterschiedliche Bandenmuster können Sense-, und Antisense-Form identifiziert werden. HpaI hat zwei Restriktionsstellen im IL-1ra Insert, ApaI hat eine Restriktionsstelle im Vektor. Es resultieren folgende Fragmente:

Fragmente p3.1(+)-s-s:

HpaI → HpaI : 194 Basenpaare
HpaI → ApaI : 312 Basenpaare
ApaI → HpaI : 5496 Basenpaare

Fragmente p3.1(+)-s-as:

HpaI → HpaI : 194 Basenpaare
HpaI → ApaI : 208 Basenpaare
ApaI → HpaI : 5600 Basenpaare

Fragmente p3.1(+)-ics-s:

HpaI → HpaI : 194 Basenpaare
HpaI → ApaI : 256 Basenpaare
ApaI → HpaI : 5506 Basenpaare

Fragmente p3.1(+)-ics-as:

HpaI → HpaI : 194 Basenpaare
HpaI → ApaI : 152 Basenpaare
ApaI → HpaI : 5610 Basenpaare

Fragmente p3.1(+)-icl-s:

HpaI → HpaI : 194 Basenpaare
HpaI → ApaI : 256 Basenpaare
ApaI → HpaI : 5568 Basenpaare

Fragmente p3.1(+)-icl-as:

HpaI → HpaI : 194 Basenpaare
HpaI → ApaI : 214 Basenpaare
ApaI → HpaI : 5610 Basenpaare

1. Konstrukt:

Sekretorische Form IL-1ra im Vektor p3.1(+):

Gesamtlänge des Plasmides:

5432 Bp (Vektor) + 597 Bp (Insert) → 6029 Basenpaare

5' → 3' Orientierung (Sense-Konstrukt):

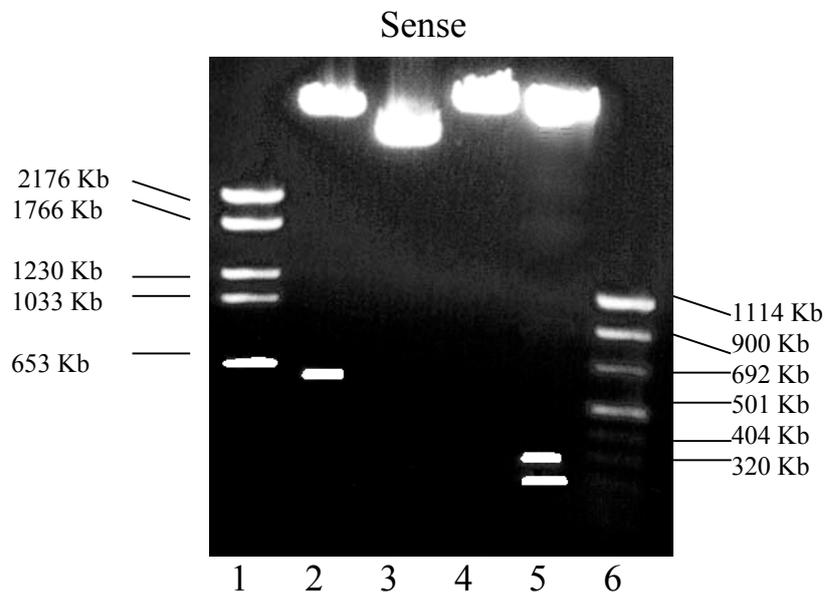
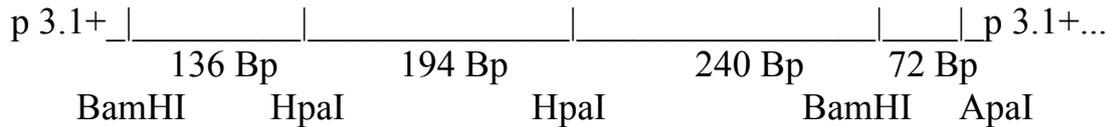


Abb. 10 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für sekretorisches Sense IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2: isoliertes s-s (556 Kb); Spur 3: ungeschnittenes Plasmid p3.1(+)-s-s; Spur 4: mit HindIII linearisiertes Plasmid p3.1(+)-s-s; Spur 5: Darstellung der Orientierung p3.1(+)-s-s durch Restriktion mit HpaI/ApaI (194 Kb, 312 Kb); Spur 6: Marker VIII

3' → 5' Orientierung (Antisense-Konstrukt):

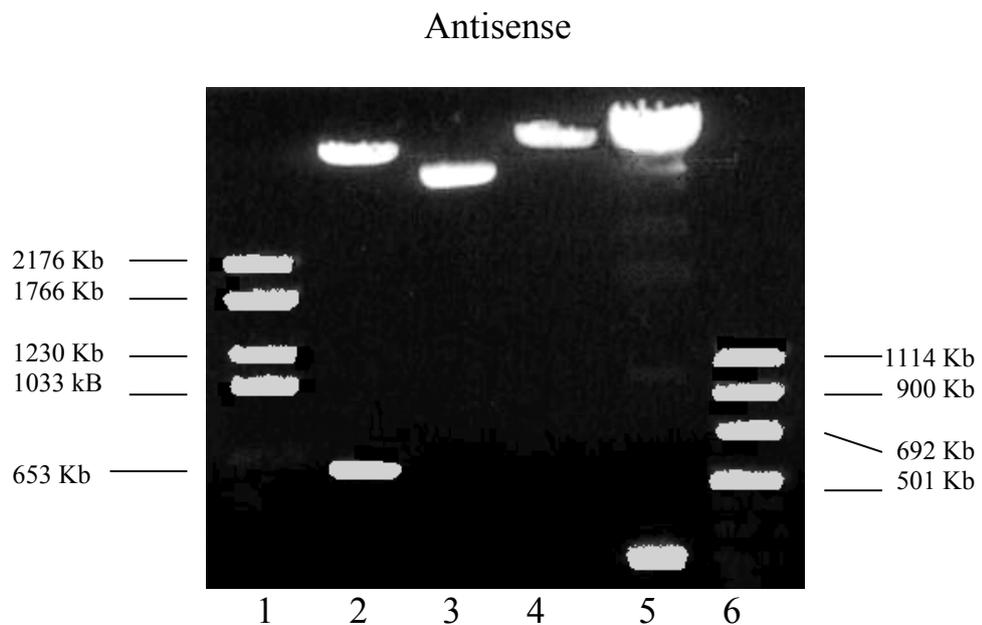
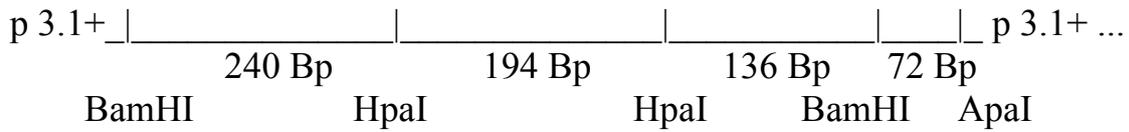


Abb. 11 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für sekretorisches Antisense IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2: isoliertes s-as (556 Kb); Spur 3: ungeschnittenes Plasmid p3.1(+)s-as; Spur 4: mit HindIII linearisiertes Plasmid p3.1(+)s-as; Spur 5: Darstellung der Orientierung p3.1(+)s-as durch Restriktion mit HpaI/ApaI (194 Kb, 208 Kb); Spur 6: Marker VIII

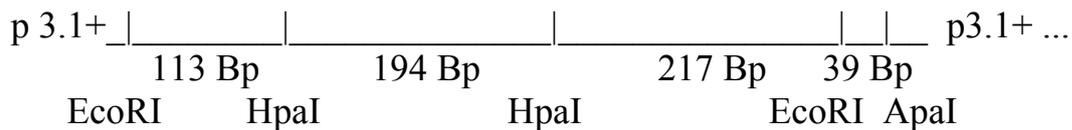
2. Konstrukt:

Kurze intrazelluläre Form IL-1ra im Vektor p3.1(+):

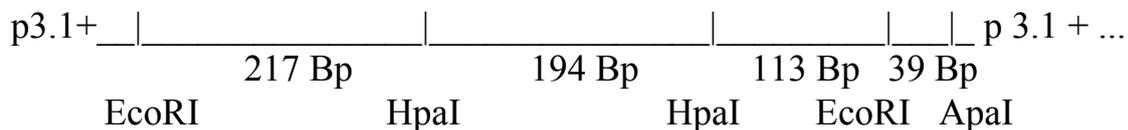
Gesamtlänge des Plasmides:

5432 Bp (Vektor) + 545 Bp (Insert) → 5977 Basenpaare

5' → 3' Orientierung (Sense-Konstrukt):



3' → 5' Orientierung (Antisense-Konstrukt):



Sense/ Antisense

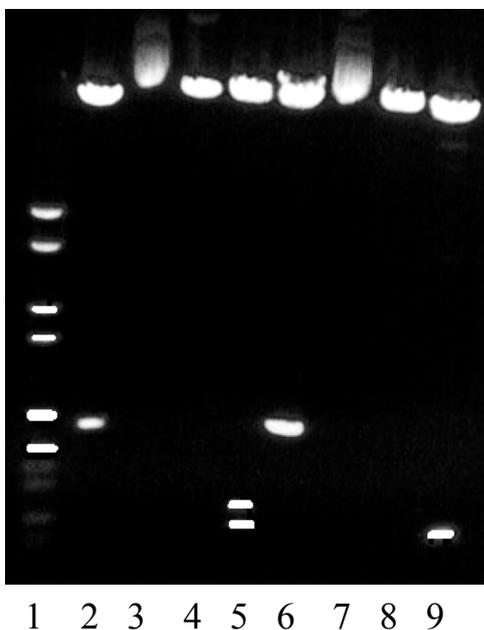


Abb. 12 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für kurzes intrazelluläres Sense und Antisense IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2: isoliertes ics-s (515 Kb); Spur 3: ungeschnittenes Plasmid p3.1(+); Spur 4: mit HindIII linearisiertes Plasmid p3.1(+); Spur 5: Darstellung der Orientierung p3.1(+).s durch Restriktion mit HpaI/ApaI (194 Kb, 256 Kb); Spur 6: isoliertes ics-as (515 Kb); Spur 7: ungeschnittenes Plasmid p3.1(+).as; Spur 8: mit HindIII linearisiertes Plasmid p3.1(+).as; Spur 9: Darstellung der Orientierung p3.1(+).as durch Restriktion mit HpaI/ApaI (194 Kb, 152 Kb)

3. Konstrukt:

Lange intrazelluläre Form IL-1ra im Vektor p3.1(+):

Gesamtlänge des Plasmides:

5432 Bp (Vektor) + 607 Bp (Insert) → 6039 Basenpaare

5' → 3' Orientierung (Sense-Konstrukt):

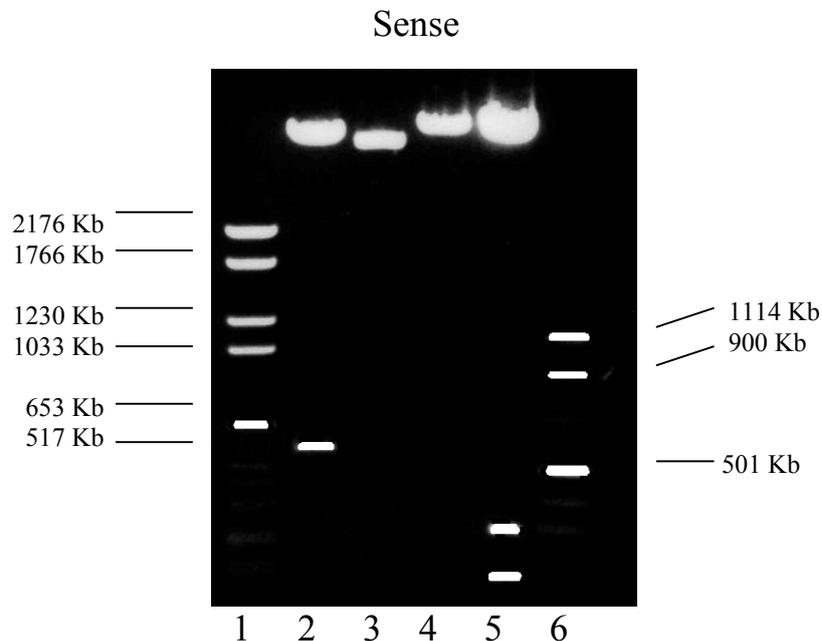
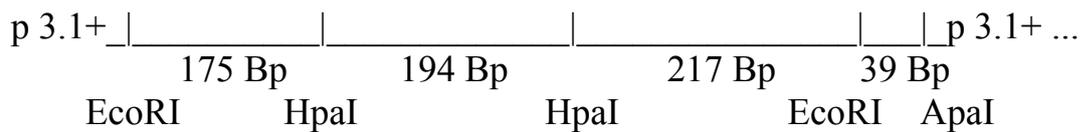


Abb. 13 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für langes intrazelluläres Sense IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2: isoliertes icl-s (579 Kb); Spur 3: ungeschnittenes Plasmid p3.1(+)icl-s; Spur 4: mit HindIII linearisiertes Plasmid p3.1(+)icl-s; Spur 5: Darstellung der Orientierung p3.1(+)icl-s durch Restriktion mit HpaI/ApaI (194 Kb, 256 Kb); Spur 6: Marker VIII

3' → 5' Orientierung (Antisense-Konstrukt):

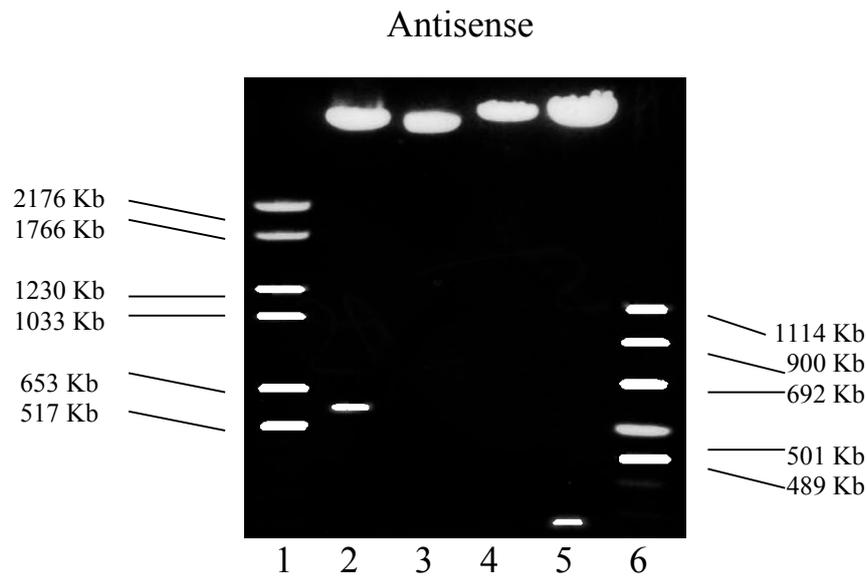
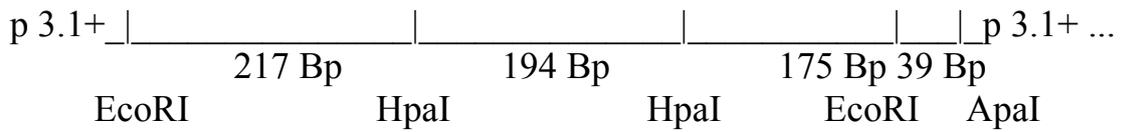


Abb. 14 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für langes intrazelluläres Antisense IL-1ra.

Spur 1: Marker VI; Spur 2: isoliertes icl-as (579 Kb); Spur 3: ungeschnittenes Plasmid p3.1(+); Spur 4: mit HindIII linearisiertes Plasmid p3.1(+); Spur 5: Darstellung der Orientierung p3.1(+)-icl-as durch Restriktion mit HpaI/ApaI (194 Kb, 214 Kb); Spur 6: Marker VIII

4.5. Effektivität der liposomalen Transfektion

Zur Kontrolle des IL-1ra Gentransfers dient LacZ als Reporteragen, welches neben IL-1ra kotransfiziert wird.

Die Transfektion in ECV-304 Zellen zeigte eine ca. 5% Effizienzrate, wohingegen sich bis zu 50% der 293T-Zellen transfizieren ließen.

Abb. 15 Kotransfektion IL-1ra/ Lac-Z in ECV-304 Zellen

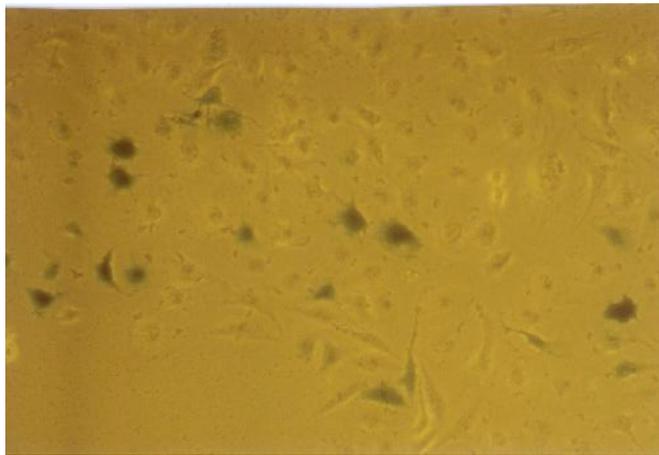
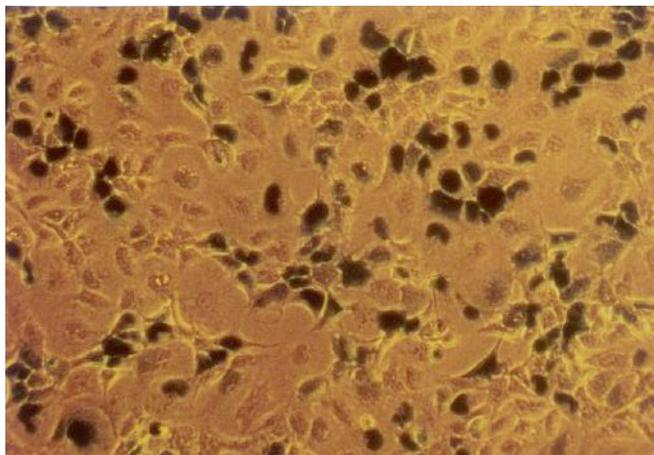


Abb. 16 Kotransfektion IL-1ra/ Lac-Z in 293-T Zellen



4.6 Ergebnisse der IL-1ra ELISA

4.6.1 IL-1ra Produktion in ECV-304 Zellen

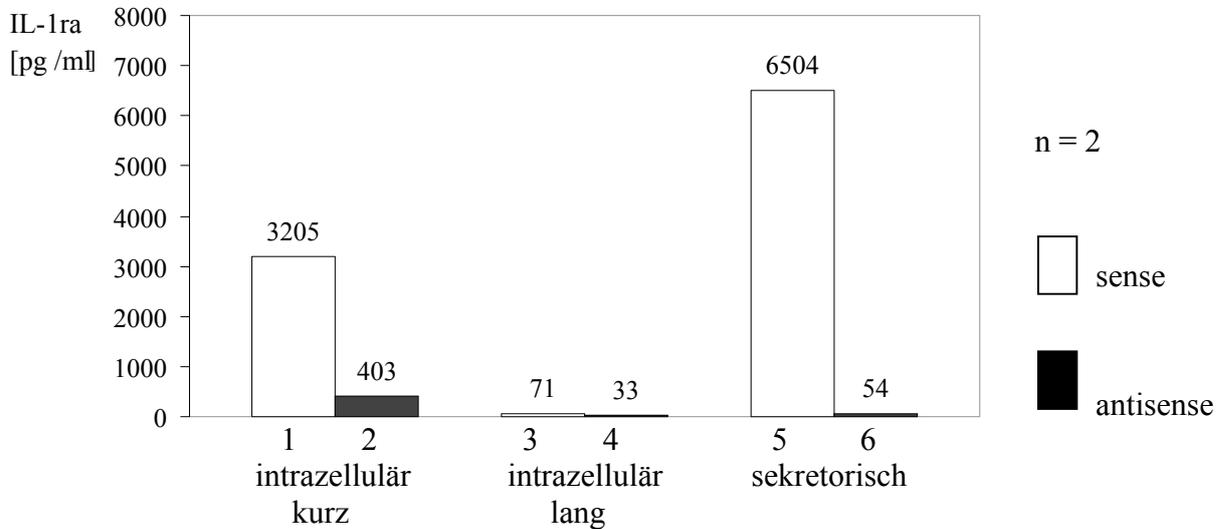


Abb. 17 IL-1ra Produktion in ECV-304 Zellen nach Stimulation mit IL-1 β (100 pg/ml). Angabe der Mittelwerte.

Mit Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) transfizierte ECV-304 Zellen wurden für 6h mit 100 pg/ml Interleukin-1 β (IL-1 β) inkubiert, und anschließend die IL-1ra Konzentrationen gemessen. Nach 20h ließ sich im Überstand (sekretorische Form) bzw. im gereinigten Lysat (intrazelluläre Formen), der mit dem Sense-Konstrukt des Proteins transfizierten Zellen, IL-1ra nachweisen (Säule 1 und 3: 3205 pg/ml und 71 pg/ml). Die Transfektion des Antisense-Konstruktes ergab erwartungsgemäß keine Proteinproduktion. Die IL-1ra Produktion war in den Zellen, die mit der sekretorischen Form des IL-1ra transfiziert worden sind, am höchsten (Säule 5: 6504 pg/ml).

4.6.2 IL-1ra Produktion in 293T-Zellen

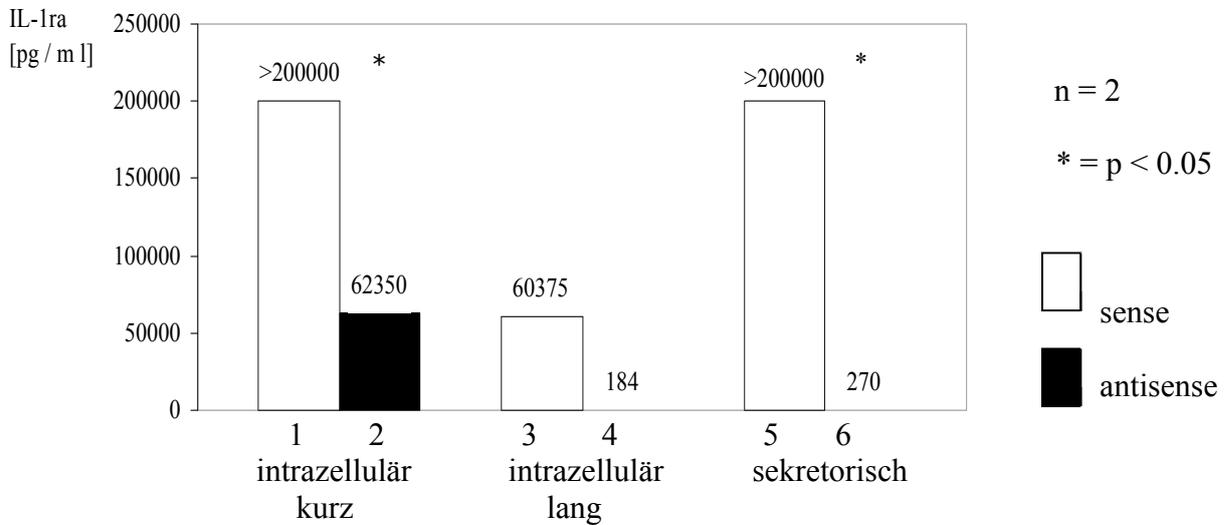


Abb. 18 IL-1ra Produktion in 293T-Zellen nach Stimulation mit IL-1 β (100 pg/ml). Angabe der Mittelwerte.

Mit Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) transfizierte 293T-Zellen wurden für 6h mit 100 pg/ml Interleukin-1 β (IL-1 β) inkubiert, und anschließend die IL-1ra Konzentration gemessen. Nach 20h ließ sich im Überstand (sekretorische Form) bzw. im gereinigten Lysat (intrazelluläre Formen) der mit der Sense Form transfizierten Zellen IL-1ra nachweisen, die Transfektion des Antisense-Konstruktes ergab keine Proteinproduktion.

Der Anstieg der IL-1ra Produktion nach Transfektion der Sense-Form gegenüber der Transfektion der Antisense-Form zeigt bei der kurzen intrazellulären und der sekretorischen Isoform einen signifikanten Messunterschied. Der Vergleich der Werte der langen intrazellulären Form des IL-1ra zeigt eine eindeutige Tendenz zur Mehrproduktion von IL-1ra durch Transfektion des Sense-Konstruktes.

4.6.3. Vergleich der sekretorischen IL-1ra Produktion stimulierter transfizierter, und nicht-stimulierter transfizierter ECV-304 Zellen

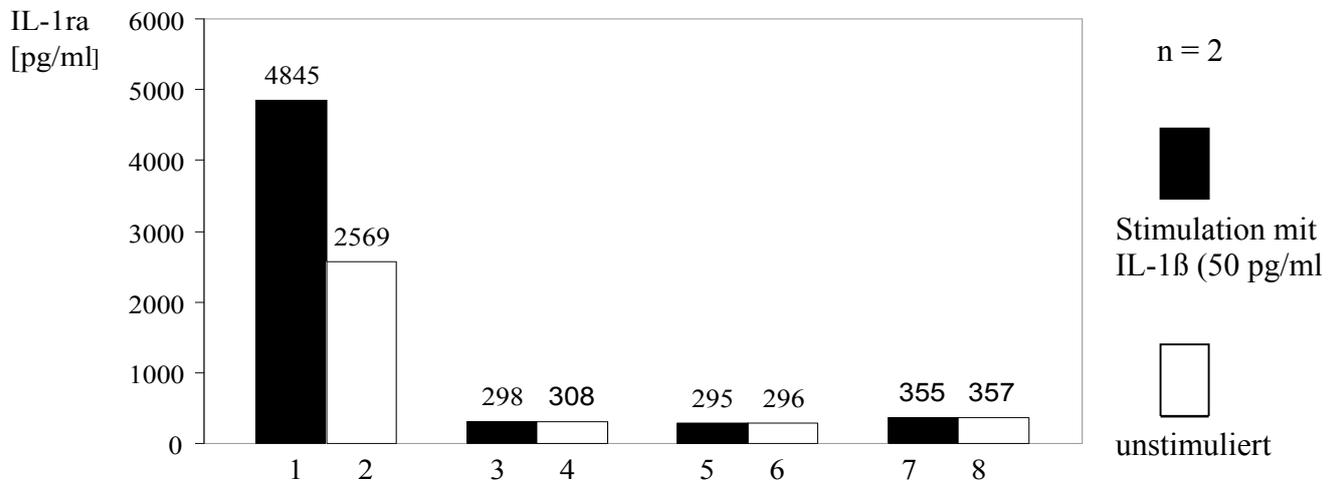


Abb. 19 Produktion der sekretorischen Form des IL-1ra in stimulierten und nicht stimulierten ECV-304 Zellen. Angabe der Mittelwerte.

Säule 1 und 2: transfiziert mit IL-1ra s-s

Säule 3 und 4: transfiziert mit IL-1ra s-as

Säule 5 und 6: transfiziert mit p3.1(+) ohne Insert IL-1ra

Säule 7 und 8: Überstand nicht transfizierter ECV-304 Zellen

Mit der sekretorischen Form des Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) transfizierte, und nicht-transfizierte ECV-304 Zellen wurden für 6h mit und ohne 50 pg/ml Interleukin-1β (IL-1β) inkubiert, und anschließend die IL-1ra Konzentration im Überstand gemessen. Nach 20h ließ sich im Überstand der mit IL-1β stimulierten Zellen ca. das Doppelte der Konzentration an IL-1ra nachweisen (4845 pg/ml), im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen (2570 pg/ml). Die Transfektion des Antisense-Konstruktes hingegen ergab in beiden Ansätzen, wie erwartet, keine Proteinproduktion (Säulen 3 und 4, ohne IL-1β Stimulation und nach Stimulation mit IL-1β: 298 pg/ml und 308 pg/ml) wie auch die Transfektion des Vektors p3.1(+) ohne IL-1ra Insert zu keiner IL-1ra Produktion führte (Säulen 5 und 6, ohne IL-1β Stimulation und nach Stimulation mit IL-1β: 295 pg/ml und 296 pg/ml). Die Konzentrationen gleichen den Werten, die im Überstand nicht-transfizierter Zellen gemessen werden konnte (Säulen 7 und 8: 355 pg/ml und 357 pg/ml).

4.7. Hemmversuche

4.7.1. IL-6 Konzentration in Modell 1

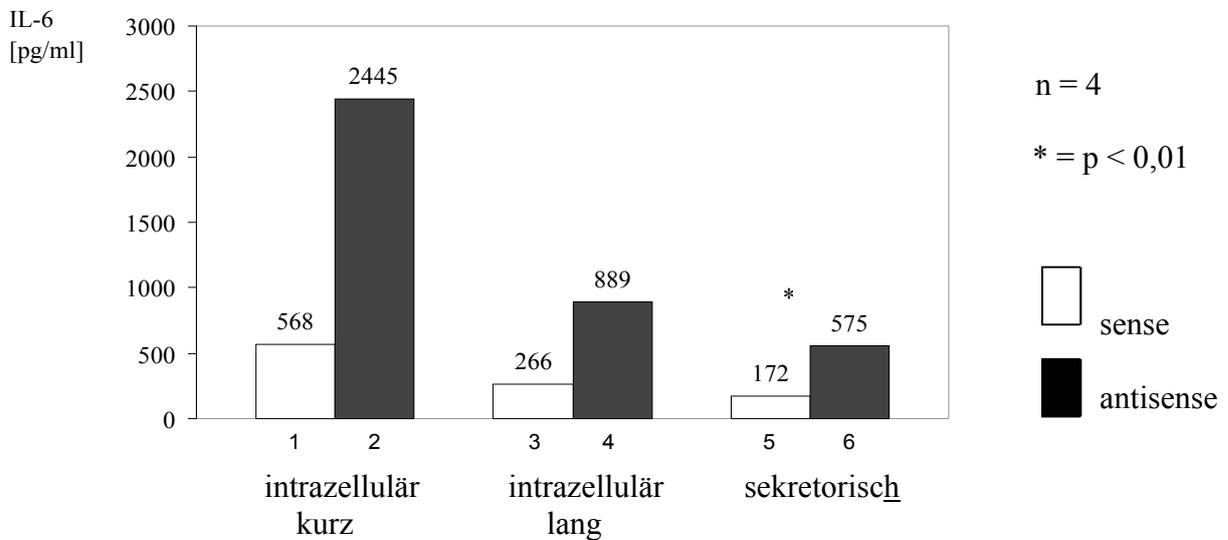


Abb. 20 Hemmung der IL-6 Produktion nach Stimulation von IL-1ra transfizierten ECV-304 Zellen mit IL-1 β (50 pg/ml). Angabe der Mittelwerte.

In Modell 1 wurden ECV-304 Zellen, welche zuvor mit der jeweiligen Isoform des IL-1ra transfiziert worden waren, für 6h mit Interleukin-1 β (IL-1 β) inkubiert, und anschließend die Interleukin-6 (IL-6) Konzentration im Überstand gemessen. Nach 20h ließ sich im Überstand der mit den jeweiligen Isoformen des Sense-Konstruktes transfizierten Zellen eine deutliche Hemmung der IL-6 Produktion nachweisen (Säulen 1, 3, 5: 568 pg/ml; 266 pg/ml; 172 pg/ml), die Transfektion der Antisense-Konstrukte zeigte in allen drei Isoformen keinen Effekt hinsichtlich einer Inhibierung der IL-1 β stimulierten IL-6 Produktion (Säulen 2, 4, 6: 2445 pg/ml, 889 pg/ml, 575 pg/ml). Bei den intrazellulären Formen der IL-1ra Antisense-Konstrukte wurde im Vergleich zu den mit dem sekretorischen Antisense-Konstrukt transfizierten ECV-304 Zellen, eine höhere IL-6 Produktion gemessen (2445 pg/ml, 889 pg/ml und 575 pg/ml). Es besteht eine hochsignifikante Hemmung von IL-6 durch die Sense-Form des sekretorischen IL-1ra gegenüber dem Effekt der Negativkontrolle (Antisense Form des sekretorischen IL-1ra).

4.7.2. IL-6 Konzentration in Modell 2

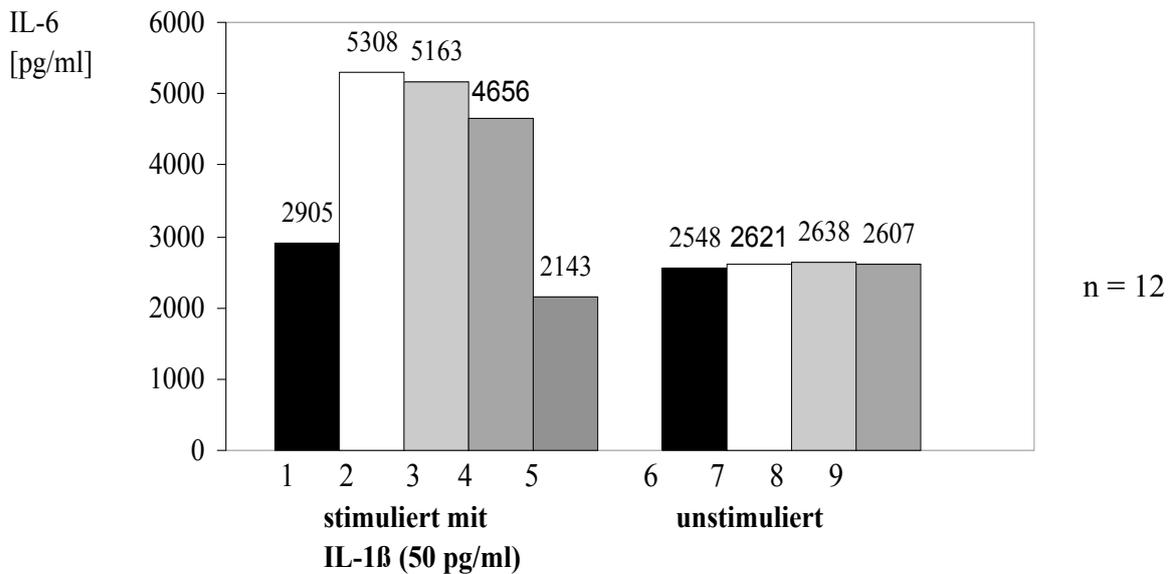


Abb. 21 Kompetitive Hemmung von IL-1β durch IL-1ra: Produktion von IL-6 vermindert. Angabe der Mittelwerte.

Säule 1 und 6: Zugabe von IL-1ra s-s

Säule 2 und 7: Zugabe von IL-1ra s-as

Säule 3 und 8: Zugabe von Vektor p3.1(+) ohne Insert IL-1ra

Säule 4 und 9: keine Zugabe eines IL-1ra Konstruktes oder des leeren Vektors

Säule 5 : Zugabe von IL-1β AK (5 µg/ml)

Säule 1 vs. Säule 2: $p < 0,01$

Säule 1 vs. Säule 3: $p < 0,01$

Säule 1 vs. Säule 4: $p < 0,01$

Säule 1 vs. Säule 6: $p > 0,05$

Säule 2 vs. Säule 3: $p > 0,05$

Säule 2 vs. Säule 4: $p > 0,05$

Säule 3 vs. Säule 4: $p > 0,05$

Säule 5 vs. Säule 2: $p < 0,01$

Säule 5 vs. Säule 3: $p < 0,01$

Säule 5 vs. Säule 4: $p < 0,01$

Säule 6 vs. Säule 7: $p > 0,05$

Säule 6 vs. Säule 8: $p > 0,05$

Säule 6 vs. Säule 9: $p > 0,05$

Säule 7 vs. Säule 8: $p > 0,05$

Säule 7 vs. Säule 9: $p > 0,05$

Säule 8 vs. Säule 9: $p > 0,05$

Für Modell 2 wurde zunächst Sense und Antisense sekretorisches IL-1ra in 293T-Zellen produziert (vgl. Abb. 18).

Anschließend wurden ECV-304 Zellen für 6h gleichzeitig mit 50 pg/ml IL-1 β und dem IL-1ra Sense-, bzw. dem Antisense-Konstrukt (IL-1ra Konzentration im Ansatz 50 ng/ml), bzw. einem leeren Vektor, bzw. ohne weitere Zugaben, bzw. mit IL-1 β Antikörpern inkubiert, und nachfolgend die IL-6 Konzentration im Überstand gemessen (Säulen 1-5). Da die Produktion von IL-6 durch die Gabe von IL-1 β gesteigert wird, wurde der gleiche Versuchsaufbau ohne Zugabe von IL-1 β im Sinne einer Negativkontrolle wiederholt (Säulen 6-9). Die IL-1 β stimulierte Freisetzung von IL-6 ließ sich durch die Zugabe des Proteins IL-1ra s-s in der stimulierten Gruppe um ca. die Hälfte der entsprechenden Werte der Negativkontrollen reduzieren (Säule 1: 2905 pg/ml gegenüber Säulen 2, 3 und 4). Diese Konzentration kommt den Messwerten in der unstimulierten Gruppe (Säulen 6-9 je ca. 2600 pg/ml) sehr nahe. Durch die Gabe von IL-1 β Antikörpern konnte ebenfalls eine deutliche Hemmung der IL-6 Produktion erzielt werden.

Bei der statistischen Auswertung der Messwerte zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich der Hemmung der IL-1 β stimulierten IL-6 Produktion durch das Sense-Konstrukt der sekretorischen IL-1ra Form und den jeweiligen Negativkontrollen. Ebenso bestand auch ein hochsignifikanter Unterschied der durch IL-1 β Antikörper hervorgerufenen IL-6 Hemmung (in diesem Versuchsaufbau als Positivkontrolle verwendet) gegenüber den Negativkontrollen. Ein Vergleich der Negativkontrollen untereinander erbrachte keinen signifikanten Unterschied.

Die Auswertung der Messdaten in der unstimulierten Gruppe erbrachte keine signifikanten Unterschiede, hier liegen die p-Werte so hoch, dass eine statistische Gleichheit der Werte (Baseline) postuliert werden muss. Vergleicht man nun zwischen einer IL-6 Hemmung durch IL-1ra (Sense-Konstrukt) in der stimulierten Gruppe, und dem Baseline-Messwert in der unstimulierten Gruppe (Säule 1 vs. Säule 6) ergibt sich kein signifikanter Unterschied mehr.

5. Diskussion

Lokaler Gentransfer ist ein attraktiver Therapieansatz zur Behandlung des nach wie vor ungelösten Problems der Restenose.

Die Arbeiten zu vorliegender Dissertation fanden im Rahmen der Entwicklung eines geeigneten Genproduktes statt. Es sollen in der Zukunft Mechanismen der Biologie der Neointimahyperplasie beeinflusst werden. Die Neointimahyperplasie, der zentrale Mechanismus der Restenose nach perkutaner koronarer Revaskularisation, wird durch Entzündungsvorgänge an der durch Katheterintervention deendothelialisierten Gefäßwand induziert. Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) ist einer der stärksten natürlichen Entzündungsinhibitoren, und antagonisiert die proinflammatorischen Effekte des Interleukin-1. In dieser Arbeit wurde die Überexpression von IL-1ra zur Hemmung der Neointimahyperplasie entwickelt. Die Wirksamkeit des überexprimierten IL-1ra wurde anhand der Hemmung der IL-1 induzierten Freisetzung von IL-6 aus Endothelzellen nachgewiesen.

5.1. IL-1ra Produktion in ECV-304 Zellen und in 293-T Zellen

Bei der Messung der Proteinproduktion in ECV-304 Zellen, und in 293-T Zellen mittels ELISA, zeigte sich eine deutliche Mehrproduktion von IL-1ra in der 293-T Zelllinie im Vergleich mit den ECV-304 Zellen (vgl. Abb.7 und Abb.8).

Wir führen diese Mehrproduktion auf die effizientere Transfektionsrate bei den 293-T Zellen zurück, bei denen sich bis zu 50% der Zellen transfizieren ließen,

wohingegen nur ca. 5% der ECV-304 Zellen transfiziert werden konnten (vgl. Abb.6). Wie bereits in anderen Publikationen beschrieben, lassen sich humane Endothelzellen, und endothel-ähnliche Zellen, wie z.B die ECV-304 Zelllinie, welche endotheliale Oberflächengene besitzt, und aus humanen Blasenkarzinomzellen gewonnen wird, nur relativ ineffektiv transfizieren, und sind für den Einsatz in Studien mit transienter Genexpression verhältnismäßig schlecht geeignet (66). Für eine effizientere Transfektion ist die Adaptation des Transfektionsprotokolles an die Zelllinie notwendig (66). Bei liposomaler Transfektion werden Liposomen mit unterschiedlichen Kompositionen an neutralen und kationischen Lipiden zur Einschleusung des DNA-Liposomen-Komplexes in das Zellinnere, und zur erleichterten endosomalen Freisetzung, verwendet (20). Da die Komposition von Zellmembranen heterogen ist, muß die Wahl der Lipid-Komponenten für jede Zelllinie optimiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß Variation im kationischen Lipid in einer effizienteren Transfektionsrate resultiert (20). Eine wesentlich bessere Effizienz konnten wir, ebenfalls mit dem Einsatz liposomalen Gentransfers, unter der Verwendung von 293-T Zellen, einer Zelllinie aus transformierten, humanen, embryonalen Nierenzellen, erzielen. Wir vermuten daher, daß die Lipidzusammensetzung der eingesetzten Liposomen für die Transfektion in ECV-304 Zellen weniger geeignet ist.

5.2. Hemmung der IL-6 Produktion als Modell für die Entwicklung einer vaskulären Gentherapie

Bei den Versuchen zu vorliegender Arbeit haben wir die Hemmung der durch IL-1 β stimulierten IL-6 Produktion zur Prüfung der Funktionalität des IL-1ra Proteins aus unseren subklonierten Plasmiden herangezogen. Wir gehen davon aus, daß sich eine Hemmung des Entzündungsindikators IL-6 als Modell für die Entwicklung einer vaskulären Gentherapie zur Inhibierung der Neointimahyperplasie nach Stenting eignet, da IL-6 zum einen, eine bedeutende Rolle bei der Regulation systemischer Entzündungsreaktionen spielt, zum anderen, einer Stimulation durch IL-1 β unterliegt. IL-6 wurde in dieser Arbeit exemplarisch für durch IL-1 β stimulierbare Entzündungsproteine in verschiedenen Hemmversuchen eingesetzt, unter der Annahme, daß die Antagonisierung der IL-6 Produktion durch IL-1ra auch auf die Produktion anderer IL-1 β induzierter Entzündungsproteine übertragbar ist. IL-6 dient also in vorliegender Dissertation als Modell für ein durch IL-1 β induzierbares Protein, dessen Produktion durch den IL-1 Rezeptorantagonisten kompetetiv gehemmt werden kann.

Interleukin-6 spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation systemischer Entzündungsreaktionen. Es ist der wichtigste Induktor der hepatischen Synthese von C-reaktivem Protein (CRP), Fibrinogen, und anderen akute Phase Proteinen (1), und interagiert mit verschiedenen hämatopoetischen Zytokinen bei der Erhöhung von Leukozyten- und Thrombozytenzahlen (32, 34). Die systemische IL-6 Konzentration ist beträchtlich erhöht bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris und, in geringeren Umfang, bei stabiler Angina pectoris (6, 49, 43, 28). Die Messung bzw. Hemmung von IL-6

scheint daher ein gutes Modell für aktivierte Gefäßwandprozesse zu sein (72), wie sie auch nach Angioplastie und Stenting im Rahmen der Restenose auftreten.

Adhäsion des Very-Late-Antigen-4 (VLA-4) an Vascular-Cell-Adhesion-Molecule-1 (VCAM-1) induziert die Freisetzung von IL-1 β aus Monozyten (72). Dies wiederum stößt zentrale Mechanismen der endothelialen Entzündungsregulation an, und führt unter anderem auch zur Transkription, Translation und Freisetzung von IL-6 aus Endothelzellen (72). Patienten, die zur Entwicklung einer Restenose neigen, zeigten bereits eine Stunde nach Angioplastie bis zu 4-fache systemische IL-6 Konzentrationen im Vergleich zu Patienten, die nach dem Eingriff keine Restenose entwickelten. Auch nach 6 Stunden übertrafen die bei diesen Patienten gemessenen IL-6 Konzentration normale Referenzwerte um ein Vielfaches, obwohl sich die Ausgangswerte vor Angioplastie in beiden Gruppen nicht unterschieden (6, 63, 44). Diese Befunde lassen vermuten, daß IL-6 ein sensibler Marker für die initiale Entzündungsreaktion infolge des therapeutischen Eingriff sein könnte. Ebenso wäre es denkbar, anhand von IL-6 Konzentrationen nach PTCA eine prädiktive Aussage über eine spätere Restenose treffen zu können (30), und somit eventuell die Möglichkeit besteht, Patienten, die wegen voraussichtlicher Neointimebildung nicht von einer PTCA profitieren würden, herauszuselektieren.

Die Ergebnisse dieser Studien deuteten daraufhin, daß durch eine effektive Hemmung der IL-6 Produktion im Rahmen einer generellen Inhibierung der inflammatorischen Reaktion, durch die Antagonisierung des Entzündungsmediators IL-1 mittels IL-1ra, der Prozeß der Neointimahyperplasie verhindert werden könnte.

5.3. Unterschiede der zwei Modelle zur Hemmung von IL-6 durch IL-1ra

In Modell 1, in denen die Synthese des Antagonisten durch Transfektion mit IL-1ra schon vor der IL-6 stimulierenden Zugabe von IL-1 β stattfand, konnte eine deutliche Hemmung der Produktion von IL-6 nachgewiesen werden. In diesem Ansatz werden die Rezeptoren bei Zugabe des Agonisten durch das gleichzeitig exprimierte IL-1ra blockiert, so daß die Zugabe von IL-1 β keinerlei Effekt hinsichtlich der Produktion von IL-6 zeigte. Das Sense-Konstrukt des IL-1ra Plasmides konnte, wie erwartet, die Proteinproduktion hemmen, das Antisense-Konstrukt, als Kontrollplasmid ebenfalls eingesetzt, hatte keinen Einfluß auf die Produktion von IL-6, es konnten hier, wie auch in den weiteren Kontrollen, vergleichbar hohe Konzentrationen des exprimierten Proteins gemessen werden (vgl. Modell 1, Abb.11). Die drei verschiedenen Isoformen des rekombinanten IL-1ra zeigten keinerlei Unterschied hinsichtlich der Stärke der Inhibierung - anscheinend spielt intrazelluläres IL-1ra eine ebenso wichtige Rolle im Zellstoffwechsel wie die sekretorische Isoform.

In Modell 2, in dem IL-1 β und IL-1ra gleichzeitig, in einem Verhältnis von 1:1000, zugegeben wird, und daher gleichfalls einen kompetitiven Mechanismus am Rezeptor zuläßt - ohne daß die IL-1ra Produktion in der Zelle selbst stattfindet - zeigt ebenfalls eine signifikante Hemmung der IL-6 Produktion (vgl. Modell 2, Abb.12). Auch ohne vorzeitige Blockade der Rezeptoren durch IL-1ra scheint bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1000 die stimulierende Wirkung des IL-1 auf die Produktion von IL-6 in ausreichendem Maße durch das Sense-Konstrukt des Antagonisten inhibiert zu

werden. Es wird eine Hemmung der Proteinproduktion erreicht, die mit den gemessenen IL-6 Konzentrationen bei Einsatz blockierender IL-1 β Antikörper vergleichbar ist. Bei Einsatz des Kontrollplasmids, mit der in Antisense Richtung eingebauten Gensequenz des IL-1ra, zeigt sich kein hemmender Effekt. Die Kontrollmessungen von IL-6 in Zellüberständen ohne vorherige Zugabe von IL-1 β , verdeutlichen, daß die Zugabe von IL-1ra keinerlei Einfluß auf die in unstimulierten Zellen auftretende Konzentration von IL-6 hat. Es zeigt sich kein Konzentrationsunterschied nach Zugabe des Sense-, bzw. Antisense-Konstruktes. Nur eine durch IL-1 β angeregte IL-6 Produktion kann durch IL-1ra inhibiert werden. Die Ergebnisse der Hemmversuche zu vorliegender Arbeit bestätigen den kompetitiven Charakter von IL-1ra am IL-1Rezeptor (16, 17, 58).

Modell 2 entspräche der nach vaskulärem Gentransfer *in-vivo* erfolgenden Hemmung einer durch IL-1 β Ausschüttung stimulierten IL-6 Produktion, wie sie im Rahmen des Restenoseprozesses nach Ballondilatation auftritt. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, gehen wir davon aus, daß IL-1ra ein geeignetes Transgen zur lokalen Überexpression in der nach Stenting verletzen Gefäßwand ist, und eine Inhibierung der Neointimahyperplasie ermöglicht.

Aufgrund der hier vorgestellten Arbeiten läßt sich diese Hypothese nun im Tierversuch, wie dem „Carotis-injury“-Modell der Ratte, überprüfen.

5.4. Zusammenfassung

Zusammenfassend ergab die vorliegende Arbeit folgende Ergebnisse :

1. Die Gene der drei Isoformen des IL-1ra (sekretorische-, intrazellulär lange-, intrazellulär kurze Form) konnten in Sense-, und Antisense-Orientierung in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert werden. Es erfolgte eine Sequenzkontrolle durch PCR-Sequenzierung.
2. Eine hohe Proteinexpression an funktionellen IL-1ra Isoformen war mit dem Genkonstrukt möglich, und wurde in einem ELISA nach Expression in verschiedenen Zelltypen untersucht. Die unterschiedliche Transfektionseffizienz der Zellen korrelierte mit den erreichten Proteinkonzentrationen an IL-1ra.
3. Eine kompetitive Hemmung der IL-1 β induzierten zellulären IL-6 Produktion als *in-vitro* Modell einer inflammatorischen Reaktion ist durch das in dieser Arbeit hergestellte Genkonstrukt möglich.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation konnten wir die Wirksamkeit eines möglichen Behandlungsprinzips, Kontrolle der IL-1 Wirkung durch Überexpression von IL-1ra, in einer Hemmung der IL-1 induzierten Freisetzung von IL-6 aus Endothelzellen *in-vitro* nachweisen. Zusammen mit den experimentellen Daten anderer Forschergruppen erlauben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, daß eine lokale Überexpression von IL-1ra

ein wirksamer Ansatz zur Inhibierung der Neointimahyperplasie nach Angioplastie und Stenting sein könnte.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- 1 Akira S, Hirano T, Taga T KT. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J.* 1990; 4:2860-2867.
- 2 Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993; 54:167-227.
- 3 Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16:27-55.
- 4 Arend WP, Malyak M, Smith MF Jr, Whisenaud TD, Slack JL, Sims JE, Giri JG, Dower SK, 1994. Binding of IL-1 α , IL-1 β , and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J. Immunol.* 153:4766-74
- 5 Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. 1990. Biological properties of recombinant human monocyte derived interleukin 1 receptor antagonist. *J.clin.Invest.* 85:1694-97

- 6 Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circ.* 1996; 94:874-877.
- 7 Beasley D, McGuiggin ME, Dinarello CA. Human vascular smooth muscle cells produce an intracellular interleukin-1 receptor antagonist. *Am J Physiol.* 1995; Oct 269(4 Pt 1):C961-8
- 8 Burger D, Chicheportiche R, Giri Jg, Dayer J-M. 1995. The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor. *J. Clin. Invest.* 96:38-41
- 9 Casseells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells: Critical events in restenosis. *Circulation.* 1993; 86:723-729.
- 10 Castelott JJ, Wright TC, Karnovsky MJ. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by heparin and heparin sulphates. *Semin Thromb Hemost.* 1987; 13:489-503.
- 11 Chamberlain J, Gunn J, Francis S, Holt C, Crossman D. Temporal and spatial distribution of interleukin-1 beta in balloon injured porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 1999; 44(1):156-65

- 12 Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated overexpression of the cyclin /cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.* 1995, 96:2260-2268.
- 13 Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 1983; 49:327-333.
- 14 Dinarello CA. Interleukin-1, Interleukin-1 receptors and Interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* 1998; 16:457-99.
- 15 Dinarello CA. Biologic Basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87:2095-147.
- 16 Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem.* 1991; 266:10331.
- 17 Dripps DJ, Verderber E, Ng RK, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 receptor antagonist binds to the type II interleukin-1 receptor on B-cells and neutrophils. *J Biol Chem.* 1991; 266:20311. 49

- 18 Edelman ER, Rogers C. Hoop dreams. Stents without restenosis. *Circulation*. 1996; 94:1199-1202.
- 19 Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*. 1999; 99:44-52.
- 20 Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulation. *J Biol Chem* 1994 Jan 28; 269(4):2250-2561
- 21 Fischer E, Van Zee KJ, Marano MA, Rock CS, Kenny JS, Poutsika DD, Dinarello CA, Lowry SF, Moldawer LL. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood*. 1992; 79:2196.
- 22 Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 17:758-769.
- 23 Fukami MH, Salganicoff L. Human platelet storage organelles. *Thromb Haemost*. 1977; 38:963-970.

- 24 Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83:1774-1777.
- 25 Guzman RJ, Hirschowitz EA, Brody SL, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:10732-10736.
- 26 Harrell RL, Rajanayagam Sharmini MA, Masharn Doanes A, Guzman RJ, Hirschowitz EA, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal accumulation by adenovirus-mediated gene transfer of cytosine deaminase. *Circulation.* 1997; 96:621-627.
- 27 Haskill S, Martin G, Van Lee L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, Arend WP, Ralph P. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin-1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:3681.
- 28 Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risks of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet.* 1997; 349:462-466.

- 29 Henderson B, Thompson RC, Hardingham T, Lewthwaite J. 1991. Inhibition of interleukin-1 induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Cytokine*. 3:246-249
- 30 Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Kukatawa H, Kurosaki K, Fujikawa H, Shimada K. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Heart* 2000; 84:83-87.
- 31 Holmsen H. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med*. 1979; 30:119-134.
- 32 Ikebuchi K, Wong GC, Clark SC, Ihle J, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multifunctional hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84:9035-9039.
- 33 Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Feliciello A, Mele E, Giuliano P, Condorelli G. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat Med*. 1995; 1:541-545.
- 34 Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA. Human interleukin-6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 1989; 86:5953-5957.

- 35 Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, et al. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation*. 1994; 89:2809-2815.
- 36 Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, et al. Restenosis after experimental angioplasty: Intimal, medial and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res*. 1995; 76:996-1002.
- 37 Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28:1643-1651.
- 38 Lennard AC. Interleukin-1 receptor antagonist. *Crit Rev Immunol*. 1995; 15:77-105.
- 39 Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circ*. 1992 Dec; 86 (6 Suppl): III47-52.
- 40 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*. 1988 Feb; 81(2):487-98.#

- 41 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.* 1993; 73:589-595.
- 42 Liu MW, Roubin GS, King SB III. Restenosis after coronary angioplasty: Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation.* 1989; 79:1374-1387.
- 43 Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med.* 1994; 331:417-424.
- 44 Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, et al. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation.* 1998; 98:2370-6.
- 45 Majesky MW, Schwartz SM, Clowes MM, Clowes Aw. Heparin regulates smooth muscle S phase entry in the injured-rat carotid artery. *Circ Res.* 1987; 61:296-300.
- 46 McNamara DB, Bedi B, Aurora H, et al. L-arginine inhibits balloon Catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 193:291-296.

- 47 Miller LC, Lynch EA, Isa S, Logan JW, Dinarello CA, Steere AC. Balance of synovial fluid IL-1 β and IL-1 receptor antagonist and recovery from Lyme arthritis. *Lancet*. 1993; 341:146.
- 48 Moliterno DJ, Topol EJ. Restenosis: Epidemiology and Treatment. In: Topol EJ (Ed.), Califf RM, Isner JM, Prystowski EN, Serruys PW, Swain JL, Thomas JD, Thompson PD, Young JB. *Textbook of Cardiovascular Medicine*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York 1998: 2065
- 49 Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995, 15; 92(4):748-55
- 50 Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: Pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1992; 17:433-439.
- 51 Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*. 1994, 265:781-784.
- 52 Patterson D, Jones C, Hart I, Bleskan J, Berger R, Geyer D, Eisenberg SP, Smith MF Jr, Arend WP. 1993. The human interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics*. 15:173-76.

- 53 Porreca E, Di Febbo C, Barbacane RC, Panara MR, Cuccurullo F, Conti P. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on vascular smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis*. 1993; 99:71-8.
- 54 Reidy Ma, Clowes AW, Schwartz SM. Endothelial regeneration: V. Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab Invest*. 1983; 49:569-575.
- 55 Reidy MA, Standaert D, Schwartz SM. Inhibition of endothelial cell regrowth: Cessation of aortic endothelial cell replication after balloon catheter denudation. *Arteriosclerosis*.1982; 2:216-220.
- 56 Roessler BJ, Allen ED, Wilson JM, Hartman JW, Davidson BL. 1993. Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo. *J. Clin. Invest*. 92:1085-92
- 57 Roessler BJ, Hartman JW, Vallance DK, Latta JM, Janicho SL, Davidson BL. 1995. Inhibition of interleukin-1-induced effects in synoviocytes transduced with the human IL-1 receptor antagonist cDNA using an adenoviral vector. *Hum. Gene Ther*. 6:307-16

- 58 Ruggiero P, Bossu P, Macchia G, Del Grosso E., sabbatini V, Bertini R, Calagrande A, Bizzari C, Maurizi G, Di Cioccio V, D'Andrea G, Di Giulio A, Frigerio F, Grifantini R, garndi G, Tagliabue A, Boraschi D. 1997. Inhibitory activity of IL-1 receptor antagonist depends on the balance between binding capacity for IL-1 receptor type I and IL-1 receptor type II. *J. Immunol.* 158:3881-87
- 59 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 Dec; 74(12):5463-7
- 60 Schwartz RS, Holmes Jr DR, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 20:1284-1293.
- 61 Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, et al. Chronic treatment with interleukin-1b induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. *J Clin Invest.* 1996; 97:769-776.
- 62 Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. 1992. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 α and IL-1 β loci. *Genomics.* 13:654- 57.

- 63 Suzuki T, Ishiwata S, Hasegawa K, Yamamoto K, Yamazaki T. Raised interleukin-6 concentrations as a predictor of postangioplasty restenosis. *Heart*. 2000 May; 83 (5):578.
- 64 Svenson M, Nedergaard S, Heegaard PMH, Whisenaud TD, Arend WP, Bendtzen K. 1995. Differential binding of human interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist to natural and recombinant soluble and cellular IL-1 type I receptor. *Eur. J. Immunol.* 25:2842-50
- 65 Symons JA, Young PR, Duff JW. 1995. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1714-18
- 66 Teifel M, Heine LT, Milbredt S, Friedl P. Optimization of transfection of human endothelial cells. *Endothelium* 1997; 5(1):21-35
- 67 Ueno H, Yamamoto H, Ito S, Li JJ, Takeshita A. Adenovirus-mediated transfer of a dominant-negative H-ras suppresses neointimal formation in balloon-injured arteries in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:898-904.
- 68 Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1979 Feb; 76(2):615-619

- 69 Wang X, Feuerstein GZ, Clark RK, Yue TL. Enhanced leukocyte adhesion to interleukin-1 beta stimulated vascular smooth muscle cells is mainly through intercellular adhesion molecule-1. *Cardiovasc Res.* 1994 Dec; 28 (12):1808-14.
- 70 Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1995 May; 115 (1):89-98.
- 71 Wang X, Romanic AM, Yue TL, Feuerstein GZ, Ohlstein EH. Expression of interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor, and interleukin-1 receptor antagonist mRNA in rat carotid artery after balloon angioplasty. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 29; 271 (1):138-43.
- 72 Zohlnhöfer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Neumann F-J. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1 β -dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Feb; 20 (2):353-9.

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Entstehung von Restenose

Abb. 2 Genkarte Vektor pLXSN

Abb. 3 Genkarte Vektor pcDNA3.1(+)

Abb. 4 Genkarte Vektor pCMV β

Abb. 5 sekretorische Form des IL-1ra

Abb. 6 kurze intrazelluläre Form des IL-1ra

Abb. 7 lange intrazelluläre Form des IL-1ra

Abb. 8 Verdau des Vektors pLXSN für kurzes intrazelluläres, langes intrazelluläres, und sekretorisches IL-1ra

Abb. 9 Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für kurzes intrazelluläres, langes intrazelluläres, und sekretorisches Sense und Antisense IL-1ra

Abb. 10 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für sekretorisches Sense IL-1ra

Abb. 11 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für sekretorisches Antisense IL-1ra

Abb. 12 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für kurzes intrazelluläres Sense und Antisense IL-1ra

Abb. 13 Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für langes intrazelluläres Sense IL-1ra

- Abb. 14** Asymmetrischer Verdau des Expressionsvektors p3.1(+) für langes intrazelluläres Antisense IL-1ra
- Abb. 15** Kotransfektion IL-1ra/ Lac-Z in ECV-304 Zellen
- Abb. 16** Kotransfektion IL-1ra/ Lac-Z in 293-T Zellen
- Abb. 17** IL-1ra Produktion in ECV-304 Zellen nach Stimulation mit IL-1 β (100 pg/ml)
- Abb. 18** IL-1ra Produktion in 293-T Zellen nach Stimulation mit IL-1 β (100 pg/ml)
- Abb. 19** Produktion der sekretorischen Form des IL-1ra in stimulierten, und nicht-stimulierten ECV-304 Zellen
- Abb. 20** Hemmung der IL-6 Produktion nach Stimulation von IL-1ra transfizierten ECV-304 Zellen mit IL-1 β (50 pg/ml)
- Abb. 21** Kompetitive Hemmung von IL-1 β durch IL-1ra: Produktion von IL-6 vermindert

Dank

Meinem Doktorvater Prof. Neumann möchte ich für die Überlassung der Arbeit danken.

Frau Dr. Sandler danke ich für die Einweisung und die hervorragende Betreuung während der Laborarbeiten und der Fertigstellung der Dissertation.

Weiterhin danke ich meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben.

Meiner Freundin Nicole möchte ich für die Hilfsbereitschaft und Anteilnahme während der Laborarbeiten danken, ohne die die vielen Stunden im Labor weniger amüsant gewesen wären.