

Christian Josef Behr

Dr. med.

Modellversuche zur rekombinanten Expression und Expressionshemmung durch Anti-Sinn-Konstrukte

Geboren am 05.09.1971 in El Paso/Texas (USA)

Reifeprüfung am 04.06.1991 in Worms

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis SS 2000

Physikum am 24.08.1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Mannheim

Praktisches Jahr in Mannheim und Paris

Staatsexamen am 10.05.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. D. Werner

Tumorzellen und normale Zellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht. Diese Unterscheidungen, z.B. in Morphologie und Teilungshäufigkeit, beruhen zum Teil auf verschiedenen Expressionsmuster ihrer Gene. Daraus ergibt sich ein möglicher Ansatzpunkt zur Bekämpfung von Tumorzellen. Dieser sieht vor, daß die Expression von Genen durch spezielle RNA-Moleküle gehemmt werden kann. Dabei werden durch Einschleusen von Anti-Sinn RNA Expressionskonstrukten in den Zellen RNA-Moleküle gebildet, die komplementär zur mRNA bestimmter Gene sind. Es bilden sich RNA-Duplexmoleküle. In den Zellen existieren allerdings Mechanismen, die die Wirksamkeit der Anti-Sinn RNA limitieren können. Dazu zählt das Vorhandensein von zellulären RNA-Helikasen, die in der Lage sind, die RNA-Duplexmoleküle wieder zu trennen. Aus diesem Grund wurden neuartige Expressionsvektoren entwickelt, die in der transfizierten Zelle für Anti-Sinn RNA-Moleküle sorgen sollen, die dem RNA-Duplexmolekül eine gewisse Resistenz verleihen. Der Hauptgegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung, ob und wie sich dieser vermutete protektive Effekt bei verschiedenen, mit diesen Anti-Sinn Expressionskonstrukten transfizierten Zellen bemerkbar macht.

Zunächst wurde untersucht, welche der zur Verfügung stehenden Kolontumor-zelllinien DLD 1, SW 48 und HT 29 sich durch die Methode der Elektroporation am besten transfizieren ließen. Dazu wurden die Zellen jeweils mit 5 µg Expressionsvektor pcDNA3CAT transfiziert. Der Transfektionserfolg wurde durch Messung der Aktivität des Enzyms Chloramphenicol-Acetyl-Transferase in den Zellysaten bestimmt. Die Zellen der Linie DLD 1 zeigten die besten Ergebnisse, HT 29 Zellen ließen sich, auch nach mehrmaligen Wiederholungen, nicht transfizieren. Außerdem stellte sich heraus, daß der Transfektionserfolg nicht nur von den Zellen abhängig war, sondern daß auch steigende Stromspannungen die Transfektionsergebnisse verbesserten.

Anschließend wurden die Effektivität der Transfektionen durch Lipofektion (DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz, Boehringer Mannheim) und Elektroporation verglichen. Die Zellen der Linie DLD 1 wurden dazu mit jeweils 5 µg Expressionsvektor pcDNA3CAT und Lipofektionsmischung gemäß den Angaben des Herstellers unterschiedlich lange inkubiert. In den Lysaten dieser Zellen wurden wieder die Aktivitäten der CAT ermittelt und mit denen aus der Elektroporation verglichen. Es zeigte sich, daß die CAT-Aktivitäten in den Lysaten von der Inkubationslänge der Transfektionsmischung mit den Zellen abhängig war. Insgesamt ergaben die Transfektionen mit Hilfe der Elektroporation immer die höheren Enzymaktivitäten.

Die möglichen Effekte einer Transfektion mit verschiedenen Anti-Sinn Expressionskonstrukten wurden nach den Pilotexperimenten an den Kolonkarzinomzellen DLD 1 und zusätzlich an EAT-Zellen studiert. Die DLD 1 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pcDNA3-CAT und mit 1-, 2- und 3-facher Menge des Anti-Sinn Expressionsvektors pcDNA3-TAC bzw. des neuentwickelten Vektor pcDNA3-TAC(GC)₂ kotransfiziert. Die Analyse der CAT-Aktivitäten in den Zellysaten zeigte, daß die Hemmungen von den Mengen der kotransfizierten Anti-Sinn Expressionsvektoren abhängig waren, d.h. die größten Hemmwirkungen wurden in den Lysaten gemessen, die die größten Mengen der verschiedenen Anti-Sinn Expressionsvektoren erhielten. Die Lysate der Zellen, die mit dem Expressionsvektor pcDNA3-TAC(GC)₂ transfiziert wurden, zeigten die insgesamt niedrigsten CAT-Aktivitäten. Damit wurde gezeigt, daß der neuartige Vektor pcDNA3(GC)₂ die Hemmwirkung durch Anti-Sinn RNA verstärkt. Nach der Hemmung eines eingeführten Gens sollte ein zelleigenes Gen durch Anti-Sinn RNA gehemmt werden und ein potentieller Hemmeffekt durch den Einsatz der neuentwickelten Anti-Sinn Expressionsvektoren verstärkt werden. Dazu wurden zwei Teilsequenzen aus dem zu hemmenden Gen, einer Sequenz kodierend für eine Untereinheit des humanen

Replikationsfaktors C, durch PCR vervielfältigt, geschnitten und in reverser Orientierung in die Expressionsvektoren pcDNA3 und pcDNA3(GC)₂ eingesetzt. Diese Expressionsvektoren wurden durch Elektroporation in EAT-Zellen transferiert und mögliche Effekte wurden durch Zellzählungen in bestimmten Zeitabständen ermittelt. Es konnte bei beiden Arten transfizierten Vektors keine Anti-Sinn vermittelten Hemmeffekte der Zellproliferation ermittelt werden. Dieses Ergebnis war vermutlich auf die Länge der in die Vektoren eingefügten DNA-Stücke zurückzuführen.

Die neuartigen Expressionskonstrukte könnten, trotz Versagen bei der Anti-Sinn RNA vermittelten Hemmung des Zellwachstums von EAT-Zellen, helfen, die Hemmeffekte der Anti-Sinn RNA-Moleküle zu verstärken. Die bei der CAT-Hemmung durch Anti-Sinn RNA-Moleküle festgestellten verstärkten Effekte sind auf die Wirkung der Sekundärstruktur zurückzuführen, die in den Zellen nach Transfektion gebildet wird. Diese Wirkung kann sich aber nur dann bemerkbar machen, wenn RNA und Anti-Sinn RNA in ihrer Länge korrelieren. Es bilden sich sonst RNA-Duplexmoleküle, die nicht durch die Sekundärstruktur der neuartigen Anti-Sinn Expressionsvektoren geschützt sind.