

Ulrich Gerhard Steidl
Dr. med.

Verbesserung der Aufnahme und Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden in primären humanen Leukozyten durch kationische Lipide

Geboren am 02.03.1973 in Stuttgart
Reifeprüfung am 19.06.1992 in Bielefeld
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993/1994 bis WS 1999/2000
Physikum am 24.08.1995 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Oxford(GB) und Heidelberg
Staatsexamen am 16.05.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Haas

Durch Antisense-Oligonukleotide (ODN) kann die Expression von definierten Genen spezifisch gehemmt werden. Die geringe zelluläre Aufnahme von ODN ist jedoch ein limitierender Faktor, der die mangelnde Wirksamkeit von Antisense-ODN zum Teil erklären könnte. In dieser Arbeit wurden die kationischen Lipide DOTAP und DOSPER verwendet, um die ODN-Aufnahme und -Wirkung in primären humanen Leukozyten zu verbessern. Die Aufnahme eines radioaktiv markierten ODN in mononukleäre Zellen aus Leukaphereseprodukten konnte verglichen mit der Applikation von ODN alleine durch DOTAP 40- bis 90-fach und durch DOSPER 440- bis 1025-fach erhöht werden. DOTAP war außerdem nicht nur unter definierten Zellkulturbedingungen sondern auch in Vollblut wirksam und ist daher möglicherweise auch für eine systemische in vivo Applikation geeignet. Wie durch Transfektion von Fluoreszeinisothiocyanat-konjugierten ODN gezeigt wurde, führten sowohl DOTAP als auch DOSPER zu einer Akkumulation von ODN im Zytoplasma und im Zellkern. Die lipidvermittelte ODN-Aufnahme in verschiedene Subpopulationen hämatopoetischer Zellen wurde mittels Zwei-Farben-Immunfluoreszenz-Analyse mit zelltypspezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht. Die größte Aufnahme fand sich in Monozyten, die geringste Aufnahme in T-Zellen. Die Werte für CD34+ hämatopoetische Stammzellen, B-Zellen und Granulozyten lagen dazwischen. Die ODN-Aufnahme in immunmagnetisch isolierte CD34+ hämatopoetische Stammzellen konnte durch DOTAP und DOSPER verglichen mit der Anwendung von ODN alleine 100- bis 240-fach gesteigert werden. Durch kinetische Analysen wurde eine Halbwertszeit von intrazellulärem ODN in CD34+ Zellen von 10 Stunden bestimmt.

Nach lipidvermittelter Transfektion von gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) gerichteten Antisense-ODN wurde auf mononukleären Zellen im Gegensatz zur Transfektion ohne kationische Lipide eine spezifische 50%ige Hemmung der ICAM-1-Expression beobachtet. Da ICAM-1 auf Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration im Rahmen entzündlicher Prozesse spielt, aber nur wenig über die Funktion von ICAM-1 auf Leukozyten bekannt ist, untersuchten wir die Bedeutung von ICAM-1 auf Monozyten und Lymphozyten für Adhäsion und transendotheliale Migration mithilfe ICAM-1 gerichteter Antisense-ODN. Entsprechend der Hemmung der ICAM-1-Expression auf den mit Antisense-ODN transfizierten Leukozyten beobachteten wir eine Verminderung der Adhäsion an eine Schicht IL-1 β -stimulierter Endothelzellen von 36% sowie eine Verringerung der transendothelialen Migration von 40%. Nach Untersuchung verschiedener Leukozyten-Subpopulationen konnten wir sowohl die Hemmung der ICAM-1-

Expression als auch die funktionellen Effekte den Monozyten zuordnen, während bei den Lymphozyten keine signifikante Hemmung zu beobachten war. Neben ICAM-1 auf Endothelzellen vermittelt ICAM-1 also auch auf Monozyten Adhäsion und transendotheliale Migration.

Zusammenfassend ist das erarbeitete Transfektionsprotokoll mit DOTAP ein wirksames Verfahren, um primäre humane Blutzellen mit ODN zu transfizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als Grundlage für ex vivo Studien zum Purgung von hämatopoetischen Stammzellen zur autologen Transplantation von Patienten mit CML und bieten darüberhinaus eine Basis für die systemische Behandlung von hämatologischen Neoplasien, viralen Infektionen und entzündlichen Erkrankungen mit Antisense-ODN. Da der Einsatz von kationischen Lipiden erforderlich ist, um eine Aktivität von Antisense-ODN in der Zellkultur zu erreichen, könnte die Entwicklung von in-vivo-Aufnahme-Systemen die therapeutische Wirksamkeit der gegenwärtig in klinischen Studien eingesetzten Antisense-ODN verbessern, um damit dem Ziel einer spezifischen molekularen Therapie näher zu kommen.