

**Entwicklung eines Gentherapieansatzes bei Hereditärer Amyloidose  
durch spezifische Spaltung der Transthyretin-Met30 mRNA mit  
chemisch modifizierten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozymen**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemiker Marcus Johannes Pröpsting  
geboren am 23. Juli 1969 in Hildesheim

1999

Diese Arbeit wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Schmidt in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung: Prof. Dr. M.P. Manns).

Sie wurde durch ein Graduiertenförderungsstipendium der Medizinischen Hochschule Hannover gefördert.

Referat: PD Dr. W. Müller

Korreferat: PD Dr. H. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 2. November 1999

**Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:**

Genschel, J., Haas, R., Pröpsting, M. J. und Schmidt, H. H. (1998). Apolipoprotein A-I induced amyloidosis. *Febs Letters* 430:145-9.

Schmidt, H. H.-J., Nashan, B., Pröpsting, M. J., Nakazato, M., Flemming, P., Kubicka, S., Böker, K., Pichlmayr, R. und Manns, M. P. (1998). Familial amyloid polyneuropathy: domino liver transplantation. *J Hepatol* 30:293-298.

Schmidt, H. H., Pröpsting, M. J. und Manns, M. P. (1999). Die Hereditäre Amyloidose. *Internist* 40:493-501.

Pröpsting, M. J., Blaschke, M., Haas, R. E., Genschel, J., Hedrich, H. J., Manns, M. P. und Schmidt, H. H. (1999). Inosine(15.1) hammerhead ribozymes for targeting the transthyretin-30 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 260:313-7.

Für Steffi und Marie

## Zusammenfassung

Die Hereditäre Amyloidose (HA) wird am häufigsten durch eine spezifische Mutation des Proteins Transthyretin (TTR) an der Position 30 (TTR-Met30) bzw. 173 der cDNA Sequenz des TTR-Gens verursacht. Die Lebertransplantation (LTX) im Sinne eines gentherapeutischen Organersatzes zum Zeitpunkt des Auftretens erster klinischer pathologischer Symptome stellt zur Zeit die einzige Therapiemöglichkeit dar. Die Etablierung neuer gentherapeutischer Verfahren ist somit eine vielversprechende Therapieoption. Diese Arbeit fasst sowohl die Entwicklung eines neuen gentherapeutischen Verfahrens zur spezifischen Targetierung dieser häufigsten Mutation als Ursache der Hereditären Amyloidose in der präklinischen Phase als auch die biochemische Charakterisierung betroffener Patienten vor und nach Lebertransplantation zusammen.

Die biochemische Charakterisierung der Gesamt-Transthyretin- und der Transthyretin-Met30-Konzentration vor und nach LTX ergab, dass die TTR-Met30-Konzentration bei HA-Patienten nach der Transplantation nicht mehr nachweisbar war. Die Halbwertszeit des TTR-Met30 konnte auf 2,25 Tage bestimmt werden.

Eine mögliche neue Therapieform ist der hier gezeigte Ansatz einer Gentherapie durch den Einsatz von TTR-Met30-spezifischen chemisch modifizierten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozymen. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig bei diesem Krankheitsmodell, dass die TTR-Met30 mRNA sowohl *in vitro* als auch in Zellkultur spezifisch spaltbar, d.h. targetierbar ist. Im Zellkulturexperiment hatte diese Spaltung der mRNA zur Folge, dass die Translation des TTR-Met30 Proteins verlangsamt bzw. teilweise unterbunden wurde, so dass die Zellen weniger TTR-Met30 synthetisieren konnten. Die *in vivo* Experimente am Mausmodell zeigten, dass eine Applikation von Ribozymen keine wesentlichen Nebenwirkungen mit sich bringt. Eine relevante therapeutische Wirkung konnte jedoch an diesem Tiermodell (humanTTR-Met30-transgene Maus) noch nicht herausgearbeitet werden. Ein neueres Mausmodell (mausTTR *knock out* humanTTR-Met30-transgene Maus) erscheint vielversprechender und wird deshalb für die zukünftig geplanten *in vivo* Versuche verwendet werden. Weitere Faktoren werden diskutiert, die mögliche Verbesserungen dieser Therapiestrategie darstellen können.

Diese Arbeit stellt somit erstmalig einen gentherapeutischen Ansatz mittels chemisch modifizierter Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme dar, die spezifisch die Mutation dieser Erkrankung targetieren können, zumindest im Stadium der hier beschriebenen *in vitro* Versuche.

### Stichworte

Amyloidose

Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme

Gentherapie

Lebertransplantation (LTX)

Transthyretin (TTR)

## Conclusion

The most frequent cause for hereditary amyloidosis (HA) is a specific mutation of the protein transthyretin (TTR) at position 30 (TTR-Met30) and position 173 of the cDNA sequence, respectively. At present liver transplantation at the time of occurrence of first clinical pathological symptoms is the only therapeutic option. Therefore, the establishment of new gene therapeutic concepts will be a promising option. This study includes the development of new gene therapeutic strategies to target specifically this most frequent mutation in the pre-clinical phase as well as the biochemical characterisation of affected patients before and after liver transplantation.

The determination of the concentration of total transthyretin and transthyretin-Met30 (TTR-Met30) before and after liver transplantation revealed that after transplantation TTR-Met30 concentration in HA patients was no longer evident. We were able to determine the half life time of 2,25 days for TTR-Met30.

The initial steps of a gene therapy with application of TTR-Met30-specific chemically modified Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead ribozymes described in this study is likely to present a new therapeutic approach. The results of this study demonstrate for the first time in this disease model, that TTR-Met30 mRNA is specifically cleavable; it can be targeted, *in vitro* as well as in cell culture. In cell culture experiments the observed cleavage of mRNA resulted in reduced translation of the TTR-Met30 protein, thus cells were synthesizing less TTR-Met30.

The *in vivo* experiments in a mouse model showed that application of ribozymes produces no fundamental side effects. However, a relevant therapeutic effect could not be demonstrated in the animal model (human TTR-Met30 transgenic mouse) so far. A newer mouse model (mouseTTR knock out human TTR30 transgenic mouse) seems more promising to study for this therapeutic approach. Therefore, the latter mouse model will be used in *in vivo* experiments planned for the future. Further factors which may improve this therapy strategy will be discussed.

In summary, this study describes for the first time preclinical experiments to target the TTR-Met30 as a model for hereditary amyloidosis using chemically modified Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead ribozymes. The reported *in vitro* experiments demonstrate the successful establishment of this therapeutic strategy. The significance of this approach has to be proven in animal experiments in the future.

## Keywords

amyloidosis

Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead ribozyme

gene therapy

livertransplantation (LTX)

transthyretin (TTR)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hereditäre Amyloidose .....	1
1.1.1 Ursachen der Erkrankung .....	1
1.1.2 Transthyretin .....	3
1.1.3 Pathogenese .....	4
1.1.4 Klinisches Bild .....	5
1.1.5 Diagnostik .....	6
1.1.6 Therapie .....	6
1.1.6.1 Lebertransplantation .....	6
1.1.6.2 Domino-Lebertransplantation .....	7
1.2 Gentherapie .....	7
1.2.1 Gentherapie-Strategie .....	7
1.2.2 Antisense-Technik .....	8
1.2.3 Ribozyme .....	8
1.2.4 Einsatz von Ribozymen .....	9
1.2.5 Aufbau und Funktion von Hammerhead-Ribozymen .....	10
1.2.6 Gentherapieansätze mit Hammerhead-Ribozymen .....	11
1.2.7 Chemisch modifizierte Ribozyme .....	12
1.2.8 Inosin <sup>15.1</sup> -Hammerhead-Ribozyme .....	14
1.3 <i>In Vitro</i> , Zellkultur und <i>In Vivo</i> Modell .....	14
1.4 Aufgabenstellung .....	15
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Material .....	16
2.1.1 Geräte .....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.3 Chemikalien .....	17
2.1.4 Materialien für <i>in vitro</i> -Transkription .....	18
2.1.5 Enzyme .....	19
2.1.6 Transfektionsreagenzien .....	19
2.1.6.1 DOTAP .....	19
2.1.6.2 Effecten .....	20
2.1.7 Antikörper .....	20

2.1.8 Zellkultur-Medium und Zusätze .....	20
2.1.9 Puffer .....	20
2.1.10 Medien zur Anzucht von Bakterien .....	22
2.1.11 Zellen, Bakterienstamm .....	22
2.1.12 Plasmide .....	22
2.1.12.1 pPA1-TTR-Met30/hnTTR-Klonierungsvektor .....	22
2.1.12.1 pLXIN-Vektor .....	23
2.1.12.2 pBK-CMV-Vektor .....	23
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Nephelometer .....	24
2.2.2 Immunpräzipitation.....	25
2.2.3 Immunspezifischer Nachweis der Proteine mittels Westernblot.....	26
2.2.4 Radioimmunoassay .....	28
2.2.5 TTR-Met30-RIA.....	29
2.2.6 Analytische SDS-Polyacrylamid-PAAGE .....	30
2.2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	31
2.2.7.1 Präparation und Aufreinigung von DNA .....	31
2.2.7.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	31
2.2.7.1.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.7.1.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	33
2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.7.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	34
2.2.7.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	35
2.2.7.5 Anhängen neuer Schnittstellen an DNA mittels PCR.....	35
2.2.7.6 Anhängen von RNA-Polymeraseprimersequenzen an DNA mittels PCR	36
2.2.7.7 Ligation.....	36
2.2.7.8 Amplifikation von DNA in Bakterien.....	37
2.2.7.8.1 Herstellen kompetenter Zellen .....	37
2.2.7.8.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	37
2.2.7.9 Sequenzierung von DNA.....	37
2.2.7.9.1 Cyclesequencing .....	37
2.2.8 Ribozym-synthese.....	40
2.2.9 RNA-Synthese .....	41
2.2.9.1 RNA-Arbeiten, RNase-freies Arbeiten .....	41
2.2.9.2 <i>In vitro</i> Transkription.....	41
2.2.10 Spaltungsassays .....	42

2.2.10.1 Kurze Fragmente - 21mer RNA-Oligoribonukleotide .....	42
2.2.10.2 Full length und 300mer-Oligoribonukleotide .....	43
2.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA .....	44
2.2.11.1 Gelanalyse nach SYBRGold-Anfärbung .....	44
2.2.12 Zellkultur .....	45
2.2.12.1 Zellkultur der Humanen Zelllinien HepG2 und 293 .....	45
2.2.12.1.1 Kultur der Zellen .....	45
2.2.12.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	45
2.2.12.2 Transfektion von Zellen mit DOTAP und Effecten .....	46
2.2.12.2.1 Vorbereitung der Zellen .....	46
2.2.12.2.2 DOTAP .....	46
2.2.12.2.3 Effecten .....	47
2.2.12.3 Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie - Retrovirus .....	47
2.2.12.3.1 Retroviraler Gentransfer .....	48
2.2.13 Tierversuch .....	49
2.2.13.1 Transgene TTR-Met30 C57/Bl6-Mäuse .....	49
2.2.13.2 Tierversuchsprotokoll .....	49
2.2.13.3 Injektion der Ribozyme .....	50
2.2.13.4 Blutentnahmen .....	51
2.2.13.5 Serumanalyse .....	51
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1 Domino-Lebertransplantation .....	52
3.1.1 Klinische Charakterisierung der Domino-lebertransplantierten Patienten ...	52
3.1.2 Konzentration von TTR-Met30 vor und nach Domino-LTX .....	53
3.1.3 Bestimmung der Halbwertszeit von TTR-Met30 nach Domino-LTX .....	54
3.1.4 Konzentration von Gesamt-TTR vor und nach Domino-LTX .....	55
3.1.5 Kontrollbestimmung des leberspezifischen Proteins Lp(a) .....	56
3.2 Molekularbiologische Arbeiten .....	57
3.2.1 Erstellung des Expressionsvektors pBK-CMVtr .....	57
3.2.2 Erstellung des Retrovirusvektors pLXINtr .....	59
3.2.3 Stabile Transfektion .....	60
3.3 Ribozymsspaltungen - <i>in vitro</i> Spaltungen .....	60
3.3.1 Spaltung von 21mer Oligoribonukleotiden .....	61
3.3.2 Spaltung von <i>in vitro</i> transkribierter full length TTR RNA .....	65

3.3.3	Spaltung einer TTR 300mer RNA - Spaltungsvergleich der verschieden langen TTR RNA-Substrate (21mer - 300mer - full length).....	69
3.3.4	Berechnung der RNA-Sekundärstruktur .....	71
3.4	Ribozyme - in Zellkultur.....	74
3.4.1	Herabregulation der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand bei HepG2- Zellen .....	74
3.4.1.1	Nephelometrische Bestimmung der TTR-Konzentration .....	74
3.4.1.2	TTR-Nachweis über Westernblot .....	76
3.4.2	Herabregulation der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand bei stabil transfizierten TTR-Met30 exprimierenden 293-Zellen.....	77
3.4.2.1	Nephelometrische Bestimmung der TTR-Met30-Konzentration .....	77
3.4.2.2	TTR-Nachweis über Westernblot .....	79
3.5	Ribozyme - <i>in vivo</i> Mausmodell.....	83
3.5.1	Proteinkonzentration im Serum.....	83
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

293	Humane Nierenzelllinie
APS	Ammoniumpersulfat (10%)
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaar
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
cDNA	Komplementäre DNA
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-Methylsulfat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetales Kälberserum
HegG2	Humane Leberzelllinie
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HuH-7	Humane Hepatomzelllinie
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LTR	Long Terminal Repeat
LTX	Lebertransplantation
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan
TTR	Transthyretin
TTR-Met30	Transthyretin mit der Mutation an Position 30
v/v	Volumenprozent (Vol./Vol.)
w/v	Gewichtsprozent (Masse/Vol.)

Es gelten die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementsymbole

# 1 Einleitung

## 1.1 Hereditäre Amyloidose

Die Hereditäre Amyloidose (HA), auch als Familiäre Amyloid Polyneuropathie (FAP) bezeichnet, ist eine Proteinablagerungskrankheit, die auf einem genetischen Defekt beruht. HA wird autosomal-dominant vererbt und im wesentlichen durch Punktmutationen im Bereich der Präalbumin (Transthyretin)-Genregion auf Chromosom 18 verursacht. Das synthetisierte Protein ist ein strukturverändertes Transthyretin. Es wird zu über 90% in der Leber synthetisiert, ist im Plasma nachweisbar und führt zu progredienten Ablagerungen von Amyloidfibrillen in peripheren Nervenbahnen sowie inneren Organen. Die daraus resultierenden histomorphologischen und funktionellen Veränderungen der betreffenden Gewebe führen ab dem mittleren Lebensabschnitt (ca. 35 Jahre) zu den klinischen Leitsymptomen einer peripheren und autonomen Neuropathie, Kardiomyopathie und Niereninsuffizienz. Die einzige erfolgversprechende therapeutische Option ist zur Zeit die Lebertransplantation (LTX). Die Häufigkeit der Erkrankung wird auf 1 zu 100.000 in den USA geschätzt und kann endemisch häufiger auftreten (z.B. 1 zu 70 im nördlichen Schweden). Für ganz Europa gibt es jedoch zur Zeit keine statistischen Daten über das Auftreten von Mutationen, die HA verursachen.

Amyloidosen, durch Protein bzw. Amyloidablagerungen bedingt, treten auch im natürlichen Alterungsprozess des Menschen auf. Ebenso führen bestimmte Erkrankungen wie die Alzheimer- und die Jakob-Creutzfeldt-Krankheit zu frühzeitigen Proteinablagerungen im zentralen bzw. peripheren Nervensystem. Zahlreiche weitere Erkrankungen wie die chronische Hämodialyse niereninsuffizienter Patienten verursachen ebenfalls lebenslimitierende Amyloidablagerungen. Die Charakterisierung des Mechanismus der Proteinablagerungen stellt eine medizinische und wissenschaftliche Herausforderung dar.

### 1.1.1 Ursachen der Erkrankung

Die häufigste autosomal-dominant vererbte Amyloidose wird durch das strukturveränderte Protein Transthyretin, TTR (früher Präalbumin) verursacht. Diese Form der Hereditären Amyloidose wurde 1952 erstmals von Andrade *et al.* (Andrade, 1952) beschrieben. Allein im Transthyretin (TTR)-Gen konnten bisher mehr als 70 Mutationen identifiziert werden, die zu einer Amyloidose führen können [The 4<sup>th</sup> International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders &

The 3<sup>th</sup> International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy, Umeå, Schweden, June 3-5, 1999]. Zusätzlich wurden sieben Mutationen im Apolipoprotein A-I, zwei Mutationen im Plasma-Gelsolin-Protein, eine Mutation im Cystatin C, drei Mutationen im Fibrinogen-Protein und einige Mutationen im Amyloid  $\beta$  A4 Precursor-Protein gefunden, die zur Ablagerung von Amyloidfibrillen führen (Benson, 1995; Genschel et al., 1998; Schmidt et al., 1999) (Tabelle 1). Bei allen diesen Proteinen kommt es nach einer strukturellen Veränderung des Proteins zur Ablagerung in Proteinfibrillen. Diese Fibrillen sind inert und können vom Organismus nur schwer abgebaut werden (Bellotti et al., 1999).

Protein	Anzahl Mutationen	Genlocus
Transthyretin	> 70	18q11.2-q12.1
Apolipoprotein A-I	7	11q23
Gelsolin	2	9q34
Cystatin C	1	
Fibrinogen	4	4q28
Amyloid $\beta$	1	21q21.3-q22.05

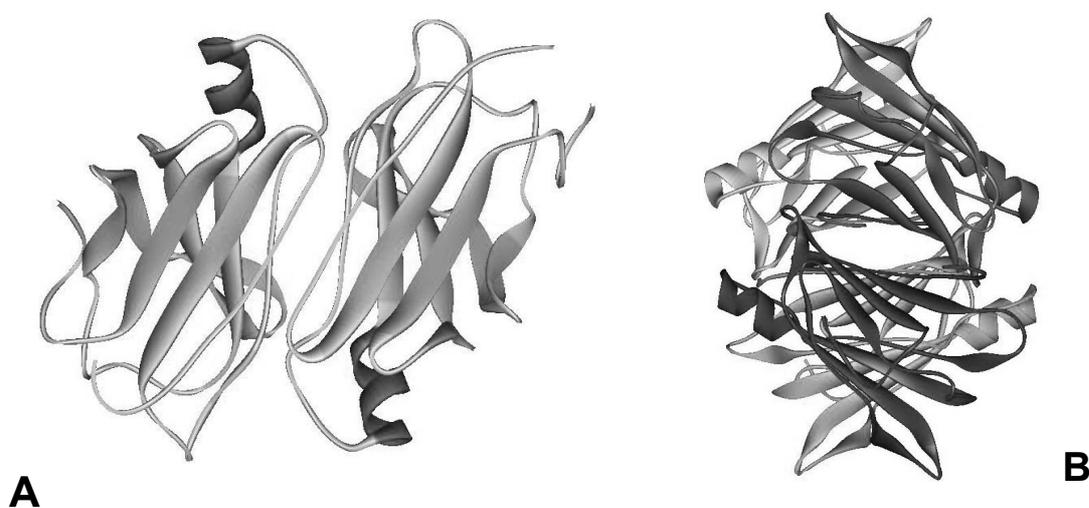
**Tabelle 1:** Proteine, die Hereditäre Amyloidose verursachen können, Anzahl der bekannten Mutationen, Lage der Gene auf den Chromosom.

Im Transthyretin-Gen ist die häufigste Mutation, die zur Amyloidose führt, der Austausch der Base Guanin gegen Adenin an der Stelle 173 in der cDNA-Sequenz, wodurch es bei der Translation an Position 30 zum Austausch der Aminosäure Valin durch Methionin kommt (Benson und Uemichi, 1996; Reilly et al., 1995; Sipe, 1994). Diese TTR-Met30 Variante kommt vorwiegend in Portugal (Saraiva et al., 1983), Japan (Holmgren et al., 1993b) und Schweden (Holmgren et al., 1994) und weltweit in mindestens drei verschiedenen Haplotypen vor (Reilly et al., 1995; Saraiva et al., 1983).

### 1.1.2 Transthyretin

Ursprünglich hatte das Transthyretin die Bezeichnung Präalbumin oder Thyroxin-bindendes-Präalbumin (Branch et al., 1972). Der Name Transthyretin wurde aufgrund seiner Transportfunktion für Thyroxin ( $T_4$ ) und Retinol-bindendes-Protein (RBP) gewählt (NC-IUB, 1981).

Die genetischen Defekte im Transthyretin liegen als Einzelkopie auf dem Chromosom 18q11.2-q12.1 (Sparkes et al., 1987; Wallace et al., 1985). Das Gen hat eine Größe von annähernd 7 Kb, es besteht aus 4 Exonen mit jeweils ca. 200 Basen (Sasaki et al., 1985; Tsuzuki et al., 1985). Das physiologisch intakte Transthyretin ist ein Tetramer und hat eine Masse von 55 KDa ( $M_r = 55.000$ ). Das Monomer besteht aus 127 Aminosäuren. Die Primärstruktur ist seit 1974 bekannt (Kanda et al., 1974). Die Sekundärstruktur besteht aus 8 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit einer charakteristischen Struktur (Blake et al., 1978; Blake et al., 1974; Kanda et al., 1974; Terry et al., 1993). Die Monomere sind nicht-kovalent zu stabilen Dimeren verbunden (Abbildung 1A), diese wiederum assoziieren zu einem zweifach symmetrischen Tetramer (Abbildung 1B) (Lai et al., 1996; Oatley et al., 1984; Terry et al., 1993). Das Transthyretin dient als Transportprotein für Thyroxin ( $T_4$ ), Triiodthyronin ( $T_3$ ) und für das Retinol-bindende-Protein (RBP) ( $M_r=21.000$ ) (Benson, 1995; Duan et al., 1995a; Sipe, 1994). Im zentralen Kanal des TTR-Tetramers können 2 Moleküle Thyroxin sowie an je einem peripheren *Loop* der vier Monomere ein RBP angelagert werden. RBP muss mit Retinol beladen sein, um an das TTR binden zu können.

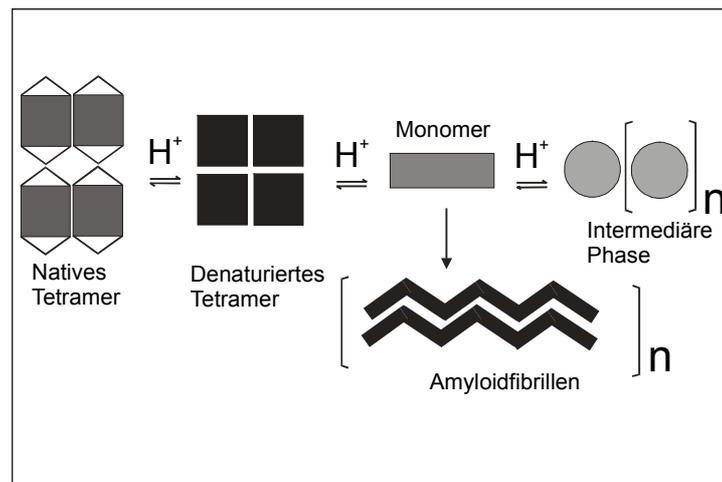


**Abbildung 1:** A: Bändermodell eines TTR-Dimers. B: Bändermodell eines TTR-Tetramer (erstellt mit dem Programm WebLab VieverPro 3.11 (<http://www.msi.com>) und mit den Daten 1ttr.pdb der Brookhaven-Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

Die Synthese des Transthyretin findet zunächst als Einzelstrangpolypeptid mit 127 Aminosäuren zu ca. 90% in der Leber statt (Benson und Uemichi, 1996; Kanda et al., 1974). Weitere Syntheseorte stellen der Plexus Choroideus (Duan et al., 1995b), die Netzhaut des Auges, Speicheldrüsen sowie Bauchspeicheldrüse dar (Dickson et al., 1985; Martone et al., 1988; Soprano et al., 1985). Die Konzentration von normalem TTR im Blut beträgt zwischen 20 und 40 mg/dl, bei Unterernährung oder bei eingeschränkter Leberfunktion kommt es zu einem deutlichen Abfall dieser Werte. Die Plasmakonzentration des TTR sinkt ebenso bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen. Transthyretin wird deshalb auch als Negativ-Akut-Phase-Protein bezeichnet. Es zeigt sich, dass für die Herabregulation der TTR-Synthese Cytokine wie IL1 und IL6 verantwortlich sein können (Costa et al., 1986). Auch bei Patienten mit TTR-Amyloidose sind die TTR-Werte im Plasma erniedrigt (Benson und Dwulet, 1983). Die Ursache hierfür ist unklar (Skinner et al., 1985; Westermarck et al., 1985). Der Stoffwechsel des Transthyretin ist derzeit größtenteils unbekannt. Die heterozygoten Erbmalträger besitzen entsprechend ein Allel für normales Transthyretin und ein verändertes Allel, deren Expression jeweils gleich ist, so dass beide Formen im Blut vorkommen (Benson, 1995; Sipe, 1994). Einige Studien konnten jedoch zeigen, dass mehr normales als verändertes Genprodukt im Plasma vorliegt (Benson und Dwulet, 1985; Dwulet und Benson, 1984).

### 1.1.3 Pathogenese

Jede TTR-Mutation, die zu Amyloidablagerungen führt, verursacht eine Veränderung der Oberflächenstruktur des Moleküls (Hamilton et al., 1993). Die Mutationen scheinen die strukturelle Stabilität des Tetramers zu verändern (Goldsteins et al., 1999; Lashuel et al., 1998; McCutchen et al., 1995). Es wird vermutet, dass diese Veränderungen extravasal eine Aggregation der Moleküle mit anschließender Ablagerung als Proteinfibrillen begünstigen (Kelly, 1998b). Auch scheint T<sub>4</sub> und seine Affinität zur Bindungsstelle eine wichtige Funktion in der Stabilität des Tetramers zu spielen (Miroy et al., 1996). Jedoch gibt es auch einige Mutationen mit Strukturveränderung des Proteins, die keine Amyloidablagerungen hervorrufen (Harrison et al., 1991; Moses et al., 1990). Der Mechanismus der Proteinablagerung ist im Detail noch nicht geklärt. Eine mögliche Ursache liegt in der Stabilität der Monomere gegenüber niedrigen pH-Werten (Kelly et al., 1997). Bei leicht erniedrigten pH-Werten (Kelly et al., 1997; Lai et al., 1996; McCutchen et al., 1995) sowie anderen denaturierenden Bedingungen (Lai et al., 1997) fallen die veränderten TTR-Monomere im Vergleich zu normalem TTR schneller in eine inerte Amyloidform (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Bei sinkendem pH-Wert wandelt sich das native Tetramer reversibel in eine denaturierte Form um. Sinkt der pH weiter, so zerfällt das Tetramer in seine Monomere, die entweder irreversibel in die Amyloidform übergehen oder reversibel in eine Intermediärphase übergehen können. Modell nach McCutchen (Lai et al., 1997; McCutchen et al., 1995).

Die Amyloidfibrillen bei der Transthyretin-induzierten Amyloidose bestehen aus 127-Aminosäuren-langen normalen und veränderten Monomeren sowie aus TTR-Fragmenten (Felding et al., 1985). Die Fibrillen haben einen Durchmesser von 130Å und bestehen aus 4 Protofilamenten (Blake und Serpell, 1996; Serpell et al., 1995). Sie aggregieren aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften miteinander und sind vermutlich relativ stabil gegenüber Proteasen. Außerdem zeigen sie in Bezug auf verschiedene Gewebearten eine unterschiedliche Affinität, die beim Nervengewebe am größten zu sein scheint (Heim und Ulrich, 1993).

#### 1.1.4 Klinisches Bild

Die von der Hereditären Amyloidose betroffenen Personen entwickeln meist zwischen dem 30. und 70. Lebensjahr eine sensomotorische und autonome Neuropathie. Die unterschiedlichen Mutationen zeigen eine hohe Variabilität des klinischen Phänotyps. Trotz identischer Mutationen gibt es teils deutlich variierende Erstmanifestationsalter. Dieses kann sowohl Folge weiterer beeinflussender genetischer Faktoren als auch äußerer Einflussfaktoren wie Ernährung sein. Die Amyloidose führt nach Einsetzen der ersten Krankheitssymptome innerhalb von ca. 5 bis 15 Jahren zum Versterben. Die Todesursachen stehen häufig im Zusammenhang mit Herzversagen, Nierenversagen, Mangelernährung, Bewegungseinschränkung, Orthostase und neurogenen Ulcera (Andrade, 1952; Varga und Wohlgethan, 1988).

### **1.1.5 Diagnostik**

Amyloid-Ablagerungen werden durch eine Biopsie des betroffenen Organs oder des Gewebes diagnostiziert. Diese werden mit Kongorot gefärbt. Im Lichtmikroskop sind Amyloidablagerungen dann rot angefärbt und mit polarisiertem Licht deutet eine grüne Farbe auf Amyloidfibrillen hin (Linke, 1987). Diese können mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch weiter untersucht und genauer charakterisiert werden (Costa et al., 1993; Linke, 1996). Außerdem können diese Proteinablagerungen durch Elektronenmikroskopie, Röntgenbeugung und Szintigraphie nachgewiesen werden.

Mit molekularbiologischen Methoden lassen sich DNA-Mutationen durch Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP) oder Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) sowie durch ASO Hybridisierung und die aufwendigere direkte DNA-Sequenzierung nachweisen.

Mittels immunologischer Methoden wie ELISA (Costa et al., 1993) und RIA (Nakazato et al., 1984) kann im Zusammenhang mit spezifischen Antikörpern neben der Bestimmung des Gesamt-Transthyretins im Serum auch die Konzentration des mutierten Transthyretin im Serum bestimmt werden (Nakazato et al., 1984; Vatassery et al., 1991).

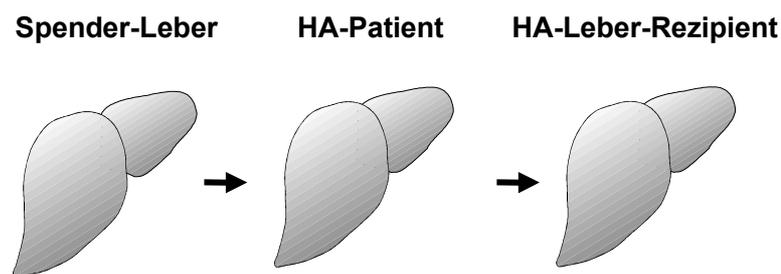
### **1.1.6 Therapie**

#### **1.1.6.1 Lebertransplantation**

Die einzige zur Zeit mögliche Therapie der Hereditären Amyloidose besteht in der orthotopen Lebertransplantation. Die Leber als Hauptsyntheseort für Transthyretin wird gegen eine gesunde Spenderleber ausgetauscht (Ando et al., 1995; Furtado et al., 1997; Holmgren et al., 1993a; Lewis et al., 1994; Pomfret et al., 1998). Die mutierte Form des Transthyretin ist im Serum nach erfolgter LTX nicht mehr nachweisbar (Andrade, 1952; Benson, 1995; Costa et al., 1978). Die Lebertransplantation führt bei der Hereditären Amyloidose gesichert zu einer Verlangsamung der Progression der Proteinablagerungen.

### 1.1.6.2 Domino-Lebertransplantation

Eine wissenschaftlich interessante Möglichkeit bei der bestehenden Organknappheit in der Transplantationsmedizin stellt die Domino-Lebertransplantation (Domino-LTX) dar. Diese Form der Lebertransplantation wurde bisher nur bei Patienten mit einer Hereditären Amyloidose durchgeführt. Die Leber eines Patienten mit Hereditärer Amyloidose, der therapeutisch lebertransplantiert wird, wird zur Transplantation sequentiell weiterverwendet. Die vom Amyloidose-Patienten explantierte Leber wird somit zur Lebertransplantation für einen geeigneten Kandidaten wiederverwendet (Abbildung 3). Da die Amyloid-Leber weiterhin das defekte Transthyretin produziert, entstehen bei dem Empfänger Amyloidablagerungen. Diese Ablagerungen führen dann zeitversetzt (ca. 25-40 Jahre) wiederum zur klinischen Symptomatik der Hereditären Amyloidose. Deshalb ist ein Kriterium der Wahl dieser Amyloid-Leber-Empfänger ein Alter von mehr als 50 Jahren (Ando et al., 1997; Schmidt et al., 1998; Stangou et al., 1998).



**Abbildung 3:** Prinzip einer Domino-Leber Transplantation. Während eine Spenderleber einem HA-Patienten implantiert wird, erhält zur gleichen Zeit ein zweiter Patient, der beispielsweise an HCC erkrankt ist, die explantierte HA-Leber.

## 1.2 Gentherapie

Eine Alternative zur LTX könnte möglicherweise die Entwicklung einer Gentherapie-Strategie sein. Über molekularbiologische Techniken soll versucht werden den genetischen Defekt zu korrigieren bzw. die Expression des mutierten Genprodukts zu unterdrücken.

### 1.2.1 Gentherapie-Strategie

Als Gentherapie-Strategie bei der monogenen Erbkrankheit HA wurde die Antisense- bzw. Ribozymtechnik gewählt, um die Synthese des strukturveränderten Genprodukts Transthyretin-Met30 durch mRNA-Spaltung zu unterbinden. Hierbei muss speziell eine Punktmutation targetiert werden.

Ein Problem stellt wie bei allen Gentherapieansätzen die Einschleusung der therapeutischen Nukleinsäure in die Zellen dar. So auch bei den Ribozymen, die katalytische Ribonukleinsäureketten sind. Verschiedene Möglichkeiten bieten sich an. So können Ribozyme endogen durch Retroviren (Smith, 1995; Sun et al., 1996; Zhou et al., 1996) oder Adenoviren (Ali et al., 1994; Feng et al., 1995; Lieber und Kay, 1996) direkt in das Genom integriert werden und dadurch nach der Transkription direkt vor Ort wirken. Ribozyme können aber auch exogen durch Lipofektion in bzw. mit Liposomen verpackt (Jarvis et al., 1996a; Usman und Stinchcomb, 1996) oder direkt von den Zellen aufgenommen werden (Sioud et al., 1992; Sioud et al., 1994).

### **1.2.2 Antisense-Technik**

Bei der Antisense-Technik werden kurze Antisense-RNA-Moleküle eingesetzt. Diese bilden mit dem entsprechenden komplementären Gegenstrang eines Gen-Transkriptes aufgrund der Basenkomplementarität einen RNA-Doppelstrang, so dass eine Translation nicht mehr erfolgen kann. Es kommt zu einer Blockade bei der Bildung bestimmter Proteine (Izant und Weintraub, 1984; Zamecnik und Stephenson, 1978).

### **1.2.3 Ribozyme**

Zu der Klasse der Antisense-Moleküle gehören auch die Ribozyme. Sie sind RNA-Moleküle, die katalytisch eine Spaltung oder auch Ligation von RNA bewirken können. Ribozyme sind in ihrer Funktion als sequenzspezifische Endoribonukleasen zu bezeichnen (Lee et al., 1997). Die Bezeichnung Ribozym setzt sich aus den Begriffen Ribonukleinsäure und Enzym zusammen. Entdeckt wurden die Ribozyme 1981 von der Arbeitsgruppe von Thomas Cech (Cech et al., 1981) und Sidney Altman (Guerrier-Takada et al., 1983).

Ribozyme lassen sich folgendermaßen einteilen (James und Gibson, 1998):

Klasse	Ribozym
1	Gruppe I Intron
2	Gruppe II Intron
3	RNAse P
4	Hammerhead Hairpin Hepatitis- $\delta$ -Ribozym <i>Neurospora</i> VS RNA

**Tabelle 2:** Bekannte natürlich vorkommende Ribozymtypen.

Das Intron der Gruppe I aus *Tetrahymena thermophila* und RNAse P katalysieren die Spaltung der RNA, so dass ein 5'-Phosphat- und eine 3'-Hydroxygruppe entsteht. Bei Hammerhead-, Hairpin- und Hepatitis- $\delta$ -Ribozymen entsteht eine 5'-Hydroxy- und eine 2', 3'-Cyclophosphatgruppe (James und Gibson, 1998).

#### 1.2.4 Einsatz von Ribozymen

Ribozyme werden als therapeutische Agentien und als genetisches Werkzeug eingesetzt. Aufgrund ihrer einfachen chemischen und biochemischen Synthese eignen sie sich sehr gut zum therapeutischen Einsatz bei HIV (Humanes Immunodefizienz-Virus; Erreger, der zum Krankheitsbild AIDS führt) (Heidenreich et al., 1994; Ojwang et al., 1992; Sarver et al., 1990; Ventura et al., 1994), Multiplerdrug-Resistenz (MDR) (Mehrfachresistenz bei Tumoren; das Membranprotein P-Glykoprotein, P-170 transportiert Zellgifte wieder aus der Zelle heraus) (Kobayashi et al., 1994; Masuda et al., 1998), Tumorerkrankungen (Scherr et al., 1997; Snyder et al., 1993) und genetischen Erkrankungen (Grassi et al., 1997; Lan et al., 1998).

### 1.2.5 Aufbau und Funktion von Hammerhead-Ribozymen

Hammerhead-Ribozyme kommen natürlich in Viroiden und deren Satelliten-RNA vor (Sheldon et al., 1990; Symons, 1992). Sie spielen eine Rolle bei der RNA Replikation während des Zellzyklus. Sie haben eine ungefähre Länge von 50 Nukleotiden und spalten eine komplementäre RNA hinter einem Triplett mit der Sequenz NUH (N = A, G, C, U; H = A, C, U) (Shimayama et al., 1995; Zoumadakis und Tabler, 1995). Hammerhead-Ribozyme wurden erstmals von Haseloff und Gerlach (Haseloff und Gerlach, 1988) so entwickelt, dass sie auch in *trans*, d.h. intermolekular spalten können. Aufgrund des Aussehens der Sekundärstruktur der katalytischen Domäne, die aus 13 konservierten Basen aufgebaut ist (Pley et al., 1994; Sheldon et al., 1990; Symons, 1989), werden sie Hammerkopf- bzw. Hammerhead-Ribozyme genannt (Abbildung 4).

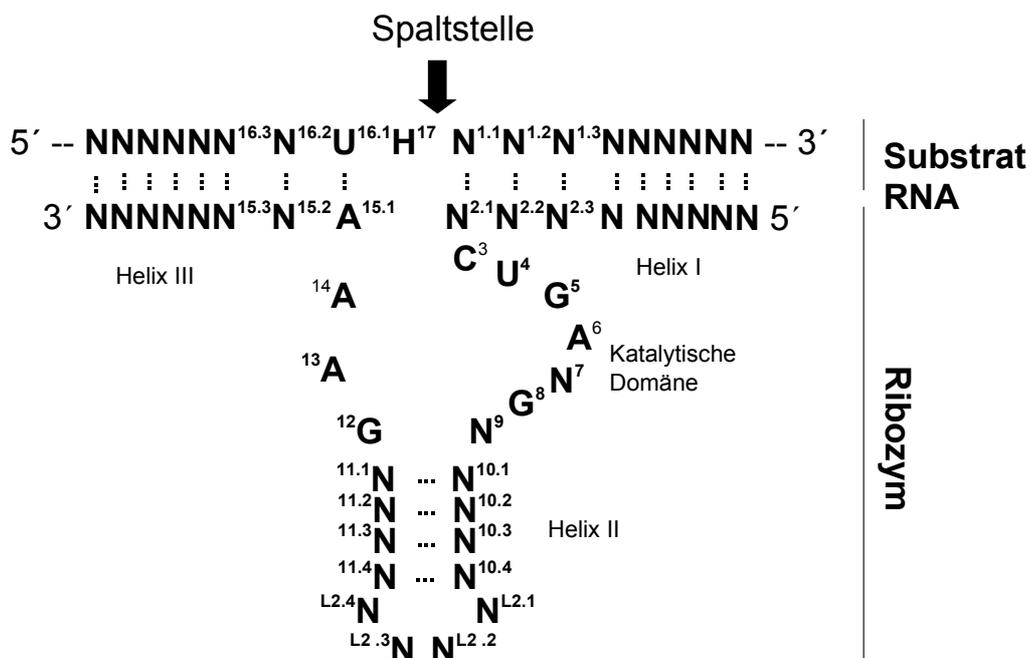


Abbildung 4: Wildtyp Hammerhead-Ribozym.

Für die Spaltreaktion sind zweiwertige Metallionen wie Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup> notwendig (Long et al., 1995; Scott und Klug, 1996; Suga et al., 1998; Uhlenbeck, 1987). Die Reaktion verläuft nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus (van Tol et al., 1990) bzw. einem bimolekularen Reaktionsmechanismus (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998; Uhlenbeck, 1987) (Abbildung 5). Der Mechanismus der Spaltreaktion, für die zweiwertige Metallkationen (Lott et al., 1998; Pontius et al., 1997) wichtig sind, ist in Abbildung 6 dargestellt (Hendry et al., 1997).



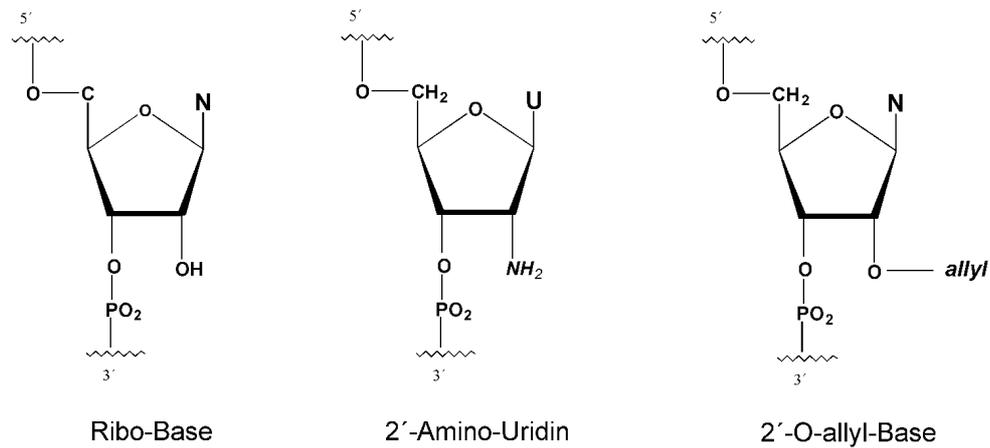
testet werden, bevor sie dann im Zellkulturexperiment und anschließend im *in vivo* Modell eingesetzt werden sollten.

Die Funktionalität der Hammerhead-Ribozyme hängt stark davon ab, wie zugänglich die Zielsequenz aufgrund ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur ist. Ein weiterer Punkt, der die Effektivität von Ribozymen beeinträchtigt, ist die geringe Stabilität von RNA gegenüber RNAsen.

### 1.2.7 Chemisch modifizierte Ribozyme

Für den Abbau der RNA durch RNAsen ist die 2'-Hydroxygruppe der Ribonukleotidbasen (Ribobase) für diese Enzyme essentiell. Somit kann RNA durch die 2'-Modifizierung der Ribonukleotidbase stabilisiert werden (Lamond und Sproat, 1993; Paoletta et al., 1992; Pieken et al., 1991; Sproat et al., 1991). Die Stabilität von Hammerhead-Ribozymen gegenüber RNAsen kann durch den Einbau von 2'-Amino-, 2'-Fluor-, 2'-Desoxynukleotiden, 2'-O-Methyl- oder 2'-O-Allylnukleotiden erhöht werden (Pieken et al., 1991). Durch diese chemischen Modifikationen werden jedoch die katalytischen Eigenschaften der Ribozyme beeinträchtigt (Perreault et al., 1990; Sproat, 1996; Thomson, 1996). Die Spaltungsgeschwindigkeit nimmt je nach Modifikation in unterschiedlichem Ausmaß ab (Olsen et al., 1991; Pieken et al., 1991). Paoletta et al. (Paoletta et al., 1992) konnten zeigen, dass das Vorhandensein von Ribonukleotidbasen an den Positionen G5, A6, G8, G12 und A15.1 (siehe Abbildung 4) für eine effektive Spaltfähigkeit der Ribozyme notwendig ist.

Die Erhöhung der Stabilität gegenüber RNAsen durch chemische Modifikationen an den Basen bewirkt somit auch eine Verlängerung der Halbwertszeit der Ribozyme im Serum und im Zellmedium (Beigelman et al., 1995; Heidenreich et al., 1994; Heidenreich et al., 1996). Eine besonders kritische Position für die Stabilität im Serum ist die Position U4. Eine chemische Modifikation an dieser Position bringt eine weitere Stabilisierung mit sich, die jedoch mit einer Abnahme der katalytischen Spaltungsaktivität einhergeht (Leirdal und Sioud, 1998).

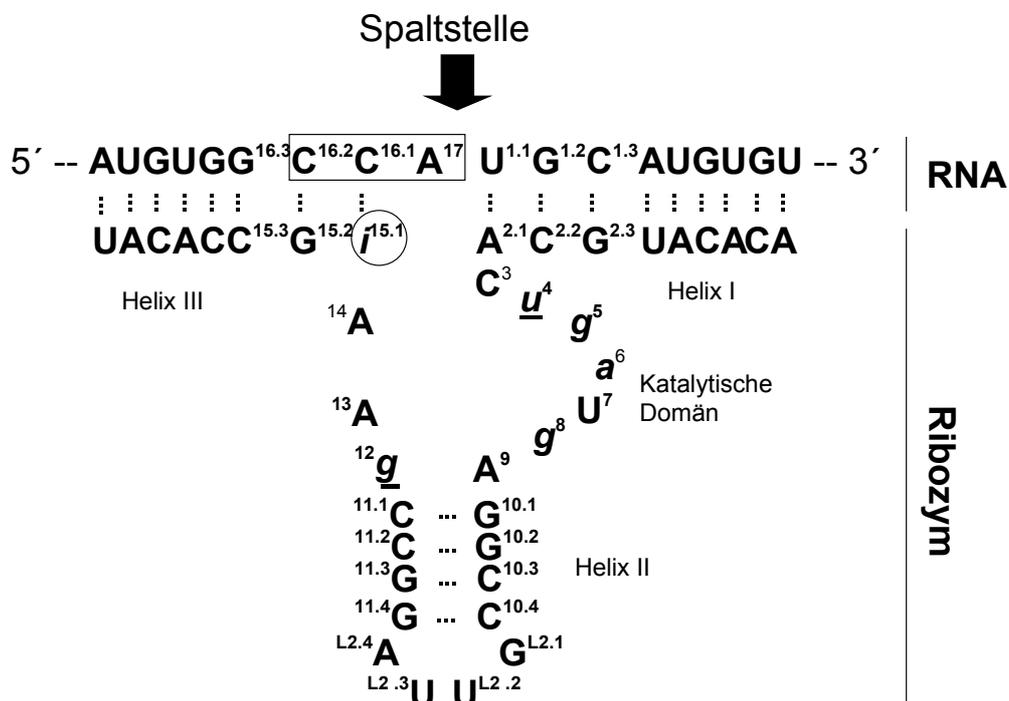


**Abbildung 7:** Nukleinsäurebasen der eingesetzten Hammerhead-Ribozyme.

Diese chemisch modifizierten Hammerhead-Ribozyme können jedoch alle nur ein NUH-Triplett erkennen und dahinter schneiden (Beigelman et al., 1995). Bei der TTR-Met30-Mutation führt der Basenaustausch zu einem NCH-Triplett (gCC Gug wird zu gCC Aug). Wildtyp-Ribozyme können dieses Triplett nicht spezifisch targetieren. Ein Ausschalten der TTR-Met30-mRNA ist mit Wildtyp-Ribozymen somit nicht möglich.

### 1.2.8 Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme

Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme haben im Gegensatz zu Wildtyp-Hammerhead-Ribozymen an Position 15.1 ein Inosin anstelle eines Adenosin. Durch diesen Basenaustausch kann die Base Inosin an Position 15.1 komplementär mit der Base Cytosin an Position 16.1 binden. Damit wird eine Targetierung des Triplets NCH (Ludwig et al., 1998) und eine spezifische Spaltung der TTR-Met30-mRNA nach der Sequenz „gCC Aug“ möglich (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Die Zielsequenz in der TTR-Met30 mRNA des abgebildeten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyms ist durch ein Rechteck markiert. Die Spaltstelle ist durch den schwarzen Pfeil und die Inosinribonukleotidbase an Position 15.1 durch einen Kreis markiert. Die kursiven Kleinbuchstaben an Position g5, a6, g8 und i15.1 sind Ribonukleotidbasen (Ribo-Base) und die unterstrichenen Kleinbuchstaben an Position u4 und g12 stellen modifizierte Basen dar (vgl. Tabelle 3). Die Großbuchstaben des Ribozyms sind Basen, die 2'-O-allyl modifiziert sind.

### 1.3 In vitro, Zellkultur und in vivo Modell

Die Funktionalität und Spezifität der Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme mussten sowohl *in vitro*, in Zellkultur und im *in vivo* Modell gezeigt werden. Diese Abfolge von Schritten hat sich bei der Entwicklung eines erfolgreichen Gentherapieansatzes auch mit Ribozymen durchgesetzt (Amarzguioui und Prydz, 1998; Birikh et al., 1997b).

In zahlreichen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Ribozyme grundsätzlich auch *in vivo* funktionieren (Cameron und Jennings, 1989; Flory et al., 1996; L'Huillier et al., 1996; Lyngstadaas et al., 1995). Die Ribozyme wurden dabei sowohl erfolgreich

nach nackter Injektion d.h. ohne Transportersystem (Lyngstadaas et al., 1995) als auch mit Liposomen als Carrier verpackt (Malone et al., 1989; Sioud, 1996) eingesetzt.

## 1.4 Aufgabenstellung

Aufgabe dieser Arbeit war die Entwicklung eines gentherapeutischen Verfahrens beim Krankheitsbild HA. Die Ursache dieser Krankheit ist eine Punktmutation im Bereich des Transthyretin-Gens. Durch den Einsatz von Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozymen sollte eine Spaltung von TTR-Met30-spezifischer mRNA *in vitro* und in Zellkultur nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Durchführung dieser Schritte sollten die Ribozyme *in vivo* am transgenen Mausmodell getestet werden.

Zuvor sollte an Seren betroffener Patienten durch biochemische Charakterisierung der Einfluss der zur Zeit angewandten klinischen Therapie der Domino Lebertransplantation auf die Transthyretin-Konzentration gezeigt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammer, Modell Horizon 58 (Life Technologies)

Brutschrank (Heraeus)

Eismaschine, Modell AF 20 (Scotsman)

Elektrophoresekammern (Mini, Biometra)

Film, Diafilm 35 mm EC 135-36 (Kodak)

Heizblock (Eppendorf Thermomixer 5436)

Kryogefäß, 1 ml (Nunc)

Magnetrührer (Ikamat RCT; Modell MR 2002, Heidolph)

Mikrowellenherd, Modell Electronic M 708 (Miele)

Nephelometer, Modell Behring Nephelometer BN II (Date-Behring)

Neubauer-Zählkammer

pH-Meter, Modell Digital pH-Meter (Merck)

Power-Stations, Modell Elektrophoresis Power Supply PS 3002 (Life Technologies)

Pipetten (Professional, Eppendorf)

Schüttelinkubator Certomat<sup>®</sup>H (Braun, Melsungen)

Schüttelwasserbad (Köttermann, Häningsen)

Semi-Dry-Blotapparatur (BioRad)

Sequenzierer, ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Spektralphotometer, Modell U-2000 (Hitachi)

Speedvak, (Savant, Egelsbach)

Sterilbank (Modell LaminAir HB 2472, Heraeus Instruments; Modell BSB 6A, Gelaire Flow Laboratories)

Thermocycler (T3, Biometra)

Ultraschallgerät, Modell Sonorex Super RK 510 H (Bandelin)

UV-Transilluminator (Geldoc 1000, Biorad)

Vortexer (Jürgens, Hannover)

Waagen (Mettler, Sartorius)

Wippe, Modell Rokomat (Tecnomara)

Zentrifugen

Tischzentrifuge 1 12 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode)

Eppendorfszentrifuge Modell 5415

Heraeus Megafuge 1.0R

Heraeus Digifuge

Kühlzentrifuge C5 6R Centrifuge (Beckmann)

Rotor GH 3.8 (Beckmann)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe	Ansell Medical
Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml	Greiner, Falcon
Zellkultur-Petrischalen, 6 cm, 10 cm	Greiner, Falcon
Plastikröhrchen klein (10 ml)	Greiner, Falcon
Pipettenspitzen	2,5µl, 20µl, 100µl, 1000µl Biosafe Eppendorf
Reaktionsgefäße	0,5µl, 1 ml Ambion 1,5 ml Eppendorf 1,5 ml Ambion
Filterpapier 2589 C	Schleicher & Schüll
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher & Schüll
Spinfilter	Millipore, Eschborn
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schüll

### 2.1.3 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Substanzen und Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von verschiedenen Herstellern (insbesondere Baker / Groß-Gerau, Sigma / Deisenhofen, Merck / Darmstadt, Ambion (AMS) / Frankfurt, Riedel-de Haën / Seelze und Quantum-Appligene / Heidelberg) bezogen.

Name der Chemikalie	Abkürzung, chem. Bezeichnung
Acrylamid	
Adenosintriphosphat	ATP
Agar	
Agarose	
Ammoniumbicarbonat	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
6-Aminohexansäure	
Ammoniumpersulfat (10%)	APS
Ampicillin	
Bromphenolblau	
Kalziumphosphat	CaPO <sub>4</sub>
Desoxycholat	
Diethylpyrocarbonat	DEPC
Dimethylsulfoxid	DMSO
Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Ethylendiamintetraacetat	EDTA

Ethanol	
Ethidiumbromid	
Glycerol	
(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])	HEPES
Harnstoff	
Isopropanol (2-Propanol)	
Kaliumbromid	KBr
Kaliumhydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Kanamycin	
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>
β-Mercaptoethanol	
Methanol	
Natriumchlorid	NaCl
Natriumdodecylsulfat	SDS
Natriumacetat	NaAc
Polybrene	
Polyethylenglycol	PEG
Rinder Serum Albumin	BSA
RNAseZap	
Sucrose	
SYBRGold	
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	TEMED
Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan	Tris/HCl
Trypanblau	
Triton X-100	
Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Wasser (Ampuwa)	H <sub>2</sub> O

#### 2.1.4 Materialien für *in vitro*-Transkription

Es wurde für alle *in vitro*-Transkriptionen der MAXIscript Kit der Firma Ambion, Austin USA eingesetzt. Dieses garantierte einen größtmöglichen Schutz vor der Verunreinigung mit RNAsen.

### 2.1.5 Enzyme

T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Pwo-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Tfu-DNA-Polymerase	Quantum-Appligene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Alkalische Phosphatase (SAP)	Amershan, Freiburg
RNA-Polymerasen (T3,T7,SP6)	Ambion, Austin USA
DNase I	Ambion
RNase A	Ambion
AmpliQ DNA- Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt

### 2.1.6 Transfektionsreagenzien

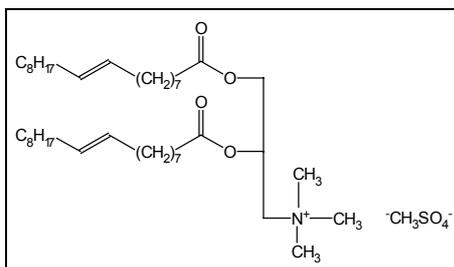
#### 2.1.6.1 DOTAP

DOTAP ist ein kationisches Lipid, das positiv geladene Liposomen bildet. Diese bilden mit den vorwiegend negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe, die von Zellen aufgenommen werden.

DOTAP = N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat

Boehringer Mannheim

Strukturformel:



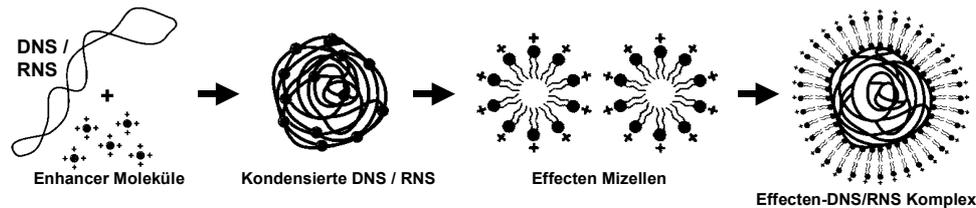
Summenformel:  $C_{43}H_{83}NO_8S$

$M_r$ : 774,21 [g/mol]

(Boehringer, Roche Product Manual DOTAP, Mannheim)

### 2.1.6.2 Effecten

Effecten ist ein nichtliposomales Lipid. Zusammen mit einem DNA-kondensierenden Enhancer wird die zu transfizierende DNA in einen Effectenkomplex verpackt. Effecten bildet mit der kondensierten DNA spontan Mizellen, die im Gegensatz zu Liposomen keine Größenunterschiede aufweisen.



**Abbildung 9:** Transfektionsprinzip von Effecten® (QIAGEN - Transfection Manual, Mannheim)

### 2.1.7 Antikörper

Maus-Anti-Mensch TTR:	ICN, Eschwege
	Date-Beehring, Marburg
biotinylierter Anti-Maus Antikörper	Amersham, Freiburg
Peroxidase gekoppeltes Streptavidin	Amersham, Freiburg

### 2.1.8 Zellkultur-Medium und Zusätze

DMEM - Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium, mit „Glutamax“, 4500 mg/l D-Glukose, Natriumpyruvat (Gibco, Eggenstein)

FCS - Fetal Calv Serum / Fötales Kälber Serum (Gibco, Eggenstein)

Penicillin-Streptomycin-Antibiotika-Gemisch (Gibco, Eggenstein)

Geneticin (G418) (Gibco, Eggenstein)

### 2.1.9 Puffer

10x TBE Gel Puffer:

- 109 g Tris Base (0,89 M Tris)
- 55 g Borsäure (0,89 M)
- 40 ml 0,5 M EDTA pH 8 (20 mM EDTA)
- Zugabe von RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 1000 ml

## TAE:

0,04 M Tris-Acetat pH 8,0  
0,001 M EDTA

## Probenpuffer (6-fach konzentriert) [DNA-Elektrophorese]:

0,25% Bromphenolblau  
40% Sucrose  
in H<sub>2</sub>O (bei 4°C aufbewahren)

## Probenpuffer [Protein-Elektrophorese]:

2 mol 0,125 M Tris/HCl, pH 6,5  
2% SDS (w/v)  
10% Glycerol (v/v)  
3% β-Mercaptoethanol (v/v)  
0,0025% Bromphenolblau

## LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton  
5 g Bacto-Hefe-Extrakt  
5 g NaCl  
in 1000 ml bidest H<sub>2</sub>O lösen

## TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA

## PBS (Phosphat-Buffered-Saline):

120 mM NaCl pH 7,4  
2,7 mM KCl  
10 mM Phosphatsalze

## STET-Lyse-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
50 mM EDTA  
0,5% Triton X-100  
8% Sucrose

## RIPA-Puffer:

10 mM Tris  
150 mM NaCl  
pH 7,5 mit HCl einstellen  
1% Triton X (v/v)  
1% Desoxycholat (w/v)  
0,1% SDS (w/v)

## TSA-Puffer:

10 mM Tris  
150 mM NaCl  
pH 7,5 mit HCl einstellen

Weitere Puffer werden bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

### 2.1.10 Medien zur Anzucht von Bakterien

Bakterien-Medien:

LB-Agar - Trockensubstanz (Gibco, Eggenstein)

LB-Medium - Trockensubstanz (Gibco, Eggenstein).

LB-Medium:

20 g Trockensubstanz wurden in 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Zur Selektion auf Ampicillinresistenz-positive Kolonien wurde Ampicillin (Sigma) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Agarplatten:

Zur Bakterienanzucht wurde den oben angeführten Medien LB-Agar in einer Endkonzentration von 1,5% zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50°C wurde der Agar in kleine (20ml) Petrischalen gegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor die Platten bei 4°C gelagert wurden.

### 2.1.11 Zellen, Bakterienstamm

Eukaryotische Zellen: HepG2-Zellen (Humane Hepatomzelllinie)

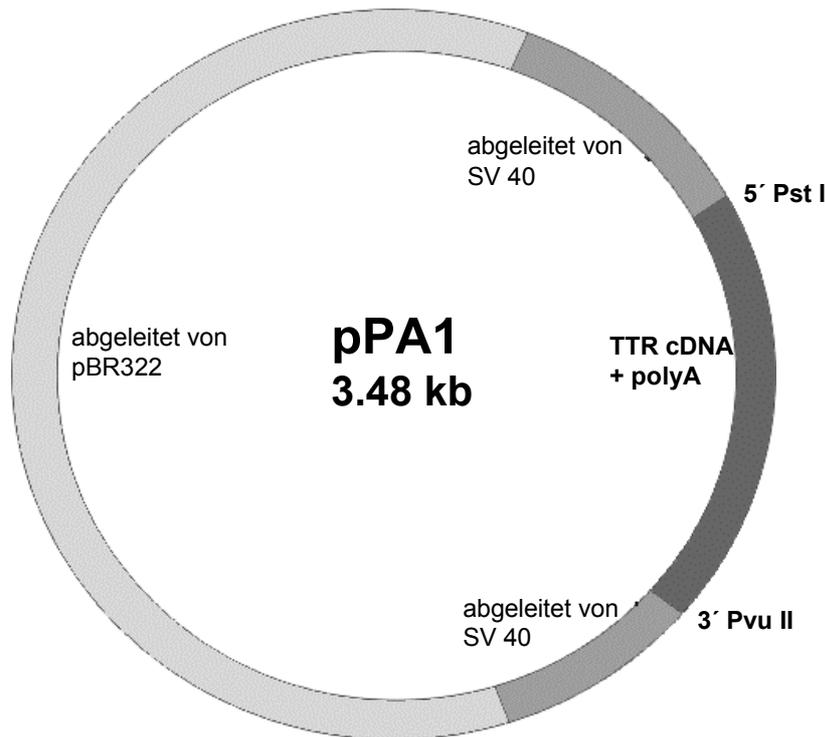
293-Zellen (Humane Nierenzelllinie)

Bakterienstamm: *Escherichia coli*, Stamm JM 109

### 2.1.12 Plasmide

#### 2.1.12.1 pPA1-TTR-Met30/hnTTR-Klonierungsvektor

Es handelt sich bei dem Vektor um einen Okayama-Berg Vektor. Er wurde durch eine spezielle Klonierungstechnik (von Okayama und Berg) aus dem Vektor pBR322 und einem Teil des SV40 Vektors kloniert (Mita et al., 1984). Zwischen 5' *Pst I* und 3' *Pvu II* liegt die TTR(Met30/hn)cDNA mit polyA-Sequenz. Die TTR-Sequenz ist 614 Basen lang.



**Abbildung 10:** pPA1-Klonierungsplasmid bzw. -vektor mit der cDNA von TTR-Met30 und hnTTR, (Mita et al., 1984).

### 2.1.12.1 pLXIN-Vektor

Der Retrovirusvektor pLXIN (Clonetech, Heidelberg) leitet sich von *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMuLV) ab. Er ist ein bicistronischer Vektor für retrovirale Genübertragung und Expression und enthält eine *Internal-Ribosome-Entry-Site* (IRES) zwischen der *Multi-Cloning-Site* und dem Neomycin-Resistenz (Neo)-Gen. Somit kontrolliert in diesem Vektor der 5'-virale LTR-Promotor sowohl die Expression des einklonierten Gens und des Neo-Gens. pLXIN besitzt auch einen pBR322 Replikationsursprung und ein *E. coli* Ampicillin (Amp)-Gen für Vermehrung und Antibiotika-Selektion in Bakterien [Clonetech Handbook pLXIN, Heidelberg].

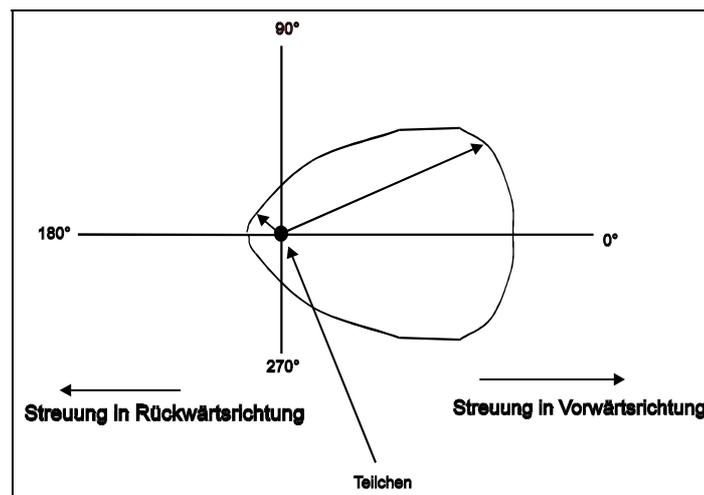
### 2.1.12.2 pBK-CMV-Vektor

Das pBK-CMV-Plasmid (Stratagene, La Jolla, USA) ist ein Phagemid-Klonierungsvektor, der sich vom *High-Copy-Number ColE1*-Plasmid ableitet. Dieser Vektor ermöglicht eine Expression im eukaryotischen und im prokaryotischen System. Die Expression im Eukaryoten wird vom Cytomegalovirus-Promotor (CMV) kontrolliert. Die Selektion stabiler Klone ist aufgrund des Neomycin- und des Kanamycin-Gens möglich. Der Polylinker ist flankiert von einem T3- und T7-RNA-Polymerase-Promotor (Abbildung 23, 3.2.1).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Nephelometer

Prinzip dieser Messtechnik ist es, dass Moleküle bzw. Antigen-Antikörper-Komplexe Licht streuen. Für Teilchen, die kleiner als  $1/20$  der Wellenlänge des Lichts sind, fand Rayleigh, dass danach in den bestrahlten Partikeln oszillierende Dipole erzeugt werden. Diese Teilchen senden als sekundäre Emissionsquelle Licht aus. Licht mit kürzerer Wellenlänge wird stärker gestreut als das mit längerer Wellenlänge. Wenn das streuende Teilchen größer als  $1/20$  der Wellenlänge ist, so ist zu beobachten, dass die Streuung nicht mehr symmetrisch (sog. Rayleigh-Streuung), sondern asymmetrisch um das Teilchen herum erfolgt, wobei mehr Licht in die Vorwärtsrichtung gestreut wird (Rayleigh-Debye- und Mie-Streuung, vgl. Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Winkelverteilung des gestreuten Lichts bei der Rayleigh-Debye-Streuung eines Partikels.

In der Nephelometrie werden Messungen des Streulichts in verdünnten Lösungen durchgeführt, in denen kaum Reflexionen und Selbst-Absorption auftritt.

Bei der Bildung des streuenden Antigen-Antikörper-Komplexes ist das Verhältnis der beiden Bestandteile des Komplexes wichtig. Die reversiblen Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte) zwischen Antigen und Antikörper führen bei Überangebot des Antikörpers zu quervernetzten Komplexen, bei einem Mangel entstehen kaum Querverbindungen. Messungen am Nephelometer müssen in einem Bereich stattfinden, in dem ein proportionales Verhältnis bei Antikörperüberschuss zur Größe der Komplexe herrscht.

In dem in diesen Versuchen benutzten Behring-Nephelometer BN II wurden die antigenhaltige Probe und der korrespondierende Antikörper in eine Messküvette gegeben und 30 Minuten inkubiert, bis sich in der Antikörper-Antigen-Reaktion ein Gleichgewicht eingestellt hatte. Das durch die Messküvette gestrahlte Licht wurde an den gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexen hauptsächlich in Vorwärtsrichtung gestreut. Das Streulicht wurde in einem Raumwinkel von  $13^\circ$  -  $24^\circ$  unter Ausblendung des Primärstrahls mit einem Detektor gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt, das der Konzentration der Streuteilchen und damit der Konzentration des Antigens proportional ist. Die Signale wurden digitalisiert, mit den entsprechenden Messwerten der Referenzkurve verglichen und in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

### 2.2.2 Immunpräzipitation

Bei dieser Präzipitationsreaktion kommt es zur Bildung eines Komplexes aus löslichen Antikörpern und löslichen Antigenen. Erreicht diese Latex-Struktur eine kritische Größe, wird sie unlöslich und fällt aus. Mit Hilfe dieser quantitativen Präzipitationsmethode lässt sich die Antigenmenge in Lösungen bestimmen.

Die Immunpräzipitation wurde hier an Zellkulturüberständen vorgenommen. Das Zellkulturmedium wurde nach 48 Stunden von den Protein-synthetisierenden Zellen abgesaugt und über Ultrazentrifugation mit 30.000 MW Microcon (Millipore, Eschborn) Spinfiltern 1:5 aufkonzentriert. 1 ml Probenkonzentrat wurde mit 20  $\mu$ l Antiserum (TTR-Antikörper anti human aus Kaninchen, Behring) über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 100  $\mu$ l Protein G 10%ig (Sigma) hinzugegeben und für 60 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert.

Der gebildete Komplex aus Antigen, Antikörper und Protein G wurde durch Zentrifugation bei  $10.000 \times g$  für 2 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun in folgenden Schritten gewaschen:

- a: 1 ml RIPA-Puffer (eiskalt), resuspendieren, 3 Minuten bei  $13.000 \times g$  zentrifugieren  
– diesen Waschschrift dreimal wiederholen –
- b: 1 ml TSA-Puffer (eiskalt), resuspendieren, 5 Minuten bei  $13.000 \times g$  zentrifugieren
- c: 1 ml Tris-Puffer (eiskalt), resuspendieren, 5 Minuten bei  $14.000 \times g$  zentrifugieren.

Der aufgereinigte Komplex wurde nun mit 15  $\mu$ l Probenpuffer 2 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und dann zur Elektrophorese auf ein 15%iges PA-Gel aufgetragen.

### 2.2.3 Immunspezifischer Nachweis der Proteine mittels Westernblot

Lösungen:

Anode-II-Puffer:

300 mM Tris-Base  
40 mM 6-Aminohexansäure  
20% Methanol (v/v)

Anode-I-Puffer:

30 mM Tris-Base  
20% Methanol (v/v)

Kathoden-Puffer:

5 mM Tris-Base  
40 mM 6-Aminohexansäure  
20% Methanol (v/v)

PBS (Phosphat-Buffered-Saline):

120 mM NaCl                      pH 7,4  
2,7 mM KCl  
10 mM Phosphatsalze

Blocking-Puffer:

3% Rinderserumalbumin in PBS gelöst (w/v)

Phosphat-Puffer (10-fach-konzentriert):

1,4 M NaCl                              pH 7,4  
30 mM KCl  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Eine sehr empfindliche Methode ist der Nachweis von Proteinen mit Antikörpern, die gegen das gewünschte Protein gerichtet sind. Bei der Methode des Westernblots werden Proteine von einem festen oder halbfesten Medium auf ein anderes, gewöhnlich auf ein spezielles Filterpapier transferiert.

Die durch die SDS-PAAGE aufgetrennten Proteine sollten im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet werden. Hierzu wurden wie in der Abbildung 12 dargestellt Filterpapiere, Gel und Nitrozellulosemembran vorher im jeweiligen Puffer 15 Minuten getränkt bzw. äquilibriert und zwischen den Elektroden der Blotapparatur aufeinandergeschichtet.

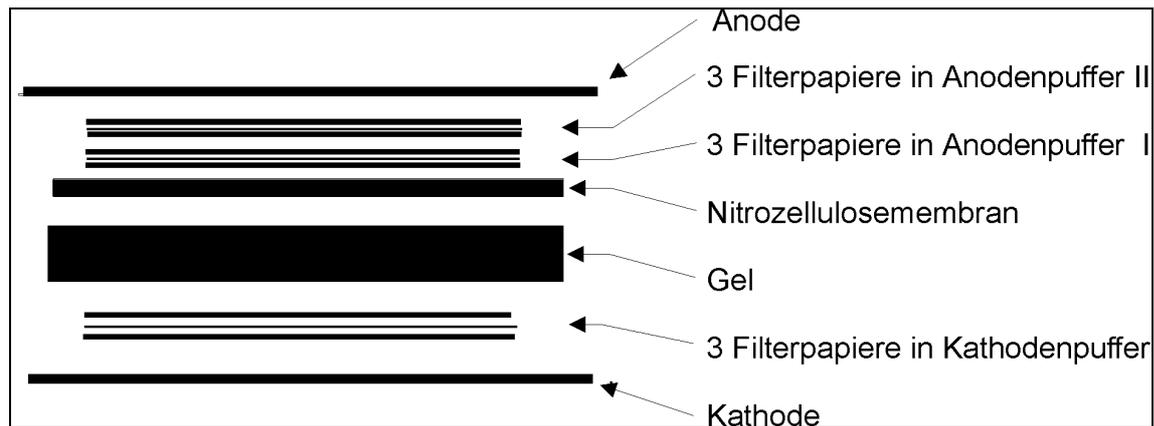


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Westernblot, Semi-Dry-Verfahren

Der Transfer der Proteine erfolgte 1 Stunde mit  $1 \text{ mA/cm}^2$  bei Raumtemperatur.

Der antikörpervermittelte Nachweis verlief in folgenden Schritten:

**Blockieren:** 1 Stunde im Blocking-Puffer

**Waschen:** 3 x 5 Minuten in PBS

**Bindung des ersten Antikörpers (Maus-Anti-human-TTR):**

über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ ; Maus-Anti-human-TTR, 1:1000 in 3% BSA verdünnt

**Waschen:** 3 x 5 Minuten in PBS

**Bindung des zweiten Antikörpers (Anti-Maus-Antikörper):**

1 Stunde bei Raumtemperatur, biotinylierter Anti-Maus-Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt

**Waschen:** 3 x 5 Minuten in PBS

**Bindung des biotinylierten-Peroxidase-gekoppelten Streptavidin:**

1 Stunde bei Raumtemperatur, biotinyliertes-Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin, 1:400 in PBS verdünnt

Bei diesem Avidin-Biotin-Immunoassay wird die sehr starke Bindung zwischen Biotin und (Strept-)Avidin ausgenutzt. Die Avidinmoleküle sind mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Das Biotin ist am Immunoglobulinmolekül gebunden, das als zweiter Antikörper in diesem indirekten Bindungsassay verwendet wird.

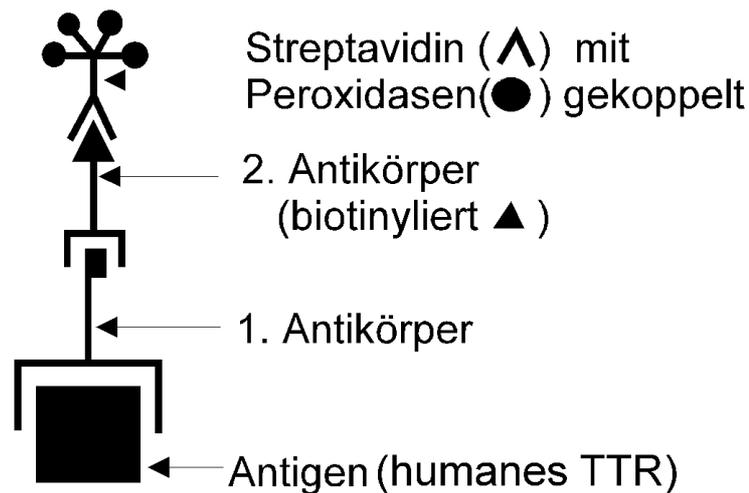


Abbildung 13: Prinzip des Avidin-Biotin-Markierungs-Systems.

Zum Färben der Proteine auf der Nitrozellulose wurden 30 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 10 ml Methanol gelöst und zu 50 ml PBS gegeben. Nach der Zugabe von 10 µl 30%iger Wasserstoffperoxidlösung wurde die Membran in dieser Färbelösung entwickelt. Es erfolgte eine Blaufärbung der spezifischen Banden, die bei ausreichender Intensität durch das Spülen mit Wasser gestoppt wurde. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran zwischen 2 Filterpapieren getrocknet und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

#### 2.2.4 Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay (RIA) ist eine wichtige Methode für die quantitative Analyse von Hormonen, Steroiden, Medikamenten und anderen biologischen Substanzen wie z.B. Proteine oder Peptide. Er verbindet die Spezifität der Immunreaktion mit der Empfindlichkeit der Verfahren über Radioisotope.

Bei der Bestimmung konkurrieren unmarkiertes Antigen (unbekannte Menge) und radioaktiv markiertes Antigen (bekannte Menge) um eine begrenzte Zahl von Antikörper-Bindungsstellen in einer vorgegeben Menge des Antiserums. Im Gleichgewichtszustand liegt das Antigen, da es im Überschuss ist, sowohl gebunden als auch frei gelöst vor. Wenn nun in einer Serie von Reaktionen die Menge des radioaktiv markierten Antigens gleich ist, so wird der an den Antikörper gebundene Anteil in dem Maße abnehmen, wie in den einzelnen Proben mehr und mehr nichtmarkiertes Antigen zugesetzt wird.

In einer Versuchsreihe setzt man nun zuerst bekannte Mengen des nichtmarkierten Antigens, die für den Versuch vorgesehenen Mengen des markierten Antigens und gleichbleibende Mengen des Antikörpers ein. Man erhält so eine Eichkurve, mit der man



### 2.2.6 Analytische SDS-Polyacrylamid-PAAGE

Lösungen:

Lösung A:

3 M Tris-Base                      pH 8,5

Lösung C:

28,38% Acrylamid (w/v)  
1,62% Bisacrylamid (w/v)

Lösung D:

1 M Tris-HCl                      pH 7,0  
0,8% SDS (w/v)

SDS-Lösung:

20% SDS (w/v)

Ammoniumpersulfatlösung (APS):

10 % Ammoniumpersulfat (w/v)

Laufpuffer:

25 mM Tris-Base  
160 mM Glycerin  
1% SDS (w/v)

Probenpuffer:

63 mM Tris/HCl                      pH 6,8  
10% Glycerol (w/v)  
2% SDS (w/v)  
0,0025% Bromphenolblau (w/v)  
Vor Gebrauch wurden noch 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

Zur TTR-Analyse wurde das Proteingemisch durch eine denaturierende SDS-PAAGE aufgetrennt. Hierbei werden die Proteine durch Natriumdodecylsulfat, einem Detergenz, das nichtkovalente Wechselwirkungen im nativen Protein unterbindet, denaturiert und erhalten eine negative Ladung, die proportional zum Molekulargewicht ist. Diese Ladung bewirkt, dass die Proteine im elektrischen Feld unterschiedlich weit im Gel zur Anode wandern und somit voneinander getrennt werden.

Es wurden 15%ige Minipolyacrylamidgele für eine Minigel-Elektrophoreseapparatur (Biometra) gegossen und hierfür die Lösungen folgendermaßen zusammenpipettiert (20 ml):

Lösung A:	2,5	ml
Lösung C:	10,8	ml
SDS 20%:	0,1	ml
bidest. H <sub>2</sub> O:	6,55	ml
TEMED:	0,025	ml
APS:	0,05	ml

Auf das Trenngel wurde ein 3,5%iges Sammelgel gegossen. Die Proben wurden bei 95°C 3 Minuten denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Low Range Markergemisch (BioRad) verwendet. Nach dem Start der Polymerisation des Gels durch die Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung zwischen die Gelplatten gegossen. Um eine glatte Gelkante zu erhalten, wurde die Lösung mit Wasser überschichtet. Zur Verbesserung der Auflösung der einzelnen Proteinbanden wurde auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Ein Unterschied in der Acrylamidkonzentration und im pH-Wert beider Gele führt dazu, dass die Proteine gesammelt werden und annähernd gleichzeitig das Trenngel erreichen, so dass sich scharfe Banden ergeben. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels konnte das 3,5%ige Sammelgel gegossen werden.

Die Probe wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 95°C erhitzt, was zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine führte.

## **2.2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

Die folgenden Methoden und Vorschriften wurden dem Laborhandbuch von Maniatis et al. (Maniatis et al., 1989) entnommen.

### **2.2.7.1 Präparation und Aufreinigung von DNA**

#### **2.2.7.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde von der Agar-Platte mit einer Pipettenspitze gepickt, in ein steriles 12 ml Röhrchen überführt und mit 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden bei 12.000 x g und 4°C 1 Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde gelockert und 300 µl STET-Lyse-Puffer sowie 10 µl Lysozym hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 Minute bei 100°C erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation der Lösung bei 15.300 U/min. Die benötigten Plasmide befanden sich im Überstand. Das schleimige Pellet, das die cDNA enthielt, wurde entfernt. Nach der Zugabe von 400 µl Isopropanol folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wieder bei 15.300 U/min zentrifugiert. Das Pellet, das nun die Plasmide enthielt, wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst. Es hatte eine ungefähre DNA-Konzentration von 1 µg DNA/µl.

### 2.2.7.1.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

(Kit und Protokoll nach QIAGEN Product Manual)

Lösungen:

P1-Puffer:

50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
10 mM	EDTA	
100 µg/ml	RNAse A	

P2-Puffer:

200 mM	NaOH
1%	SDS

P3-Puffer:

3,0 M	Kaliumacetat	pH 5,5
-------	--------------	--------

QBT-Puffer:

750 mM	NaCl	pH 7,0
50 mM	MOPS	
15 %	Ethanol (v/v)	

QC-Puffer:

1,25 M	NaCl	pH 8,5
50 mM	Tris/HCl	
15 %	Ethanol (v/v)	

400 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Über-Nacht-Kultur angeimpft. Unter Schütteln wurde bei 37°C bis zu 16 Stunden inkubiert. Hatte die Zellsuspension eine OD<sub>600</sub> von 1,0-1,5, wurden die Zellen 15 Minuten bei 4°C und 5.000 x g abzentrifugiert. Zur Resuspendierung des Pellets wurden 10 ml P1-Puffer hinzugegeben, anschließend 10 ml P2-Puffer, gründlich mit einer Glaspipette gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 10 ml eiskaltem P3-Puffer wurde das Reaktionsgefäß fünf- bis sechsmal leicht geschüttelt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe 30 Minuten bei 4°C und 20.000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein Gefäß pipettiert. Die Säule des QIAGEN Kits (QIAGEN-tip 500) wurde mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert, der Überstand aufgetragen und die Säule zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Mit 15 ml QF-Puffer wurde die DNA eluiert und mit 70% des Probenvolumens Isopropanol (Raumtemperatur) gefällt. Sie wurde bei 15.000 x g und 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert und das DNA-Pellet in 70%igem eiskaltem Ethanol resuspendiert, erneut abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das

Pellet wurde in bidestilliertem Wasser resuspendiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Die chromatographische Aufreinigung der Plasmid-DNA mit der QIAGEN-Säule funktioniert durch Anionenaustausch. Die Austauscherguppen der Säulenmatrix sind Diethylaminoethanol = DEAE (Abbildung 15).

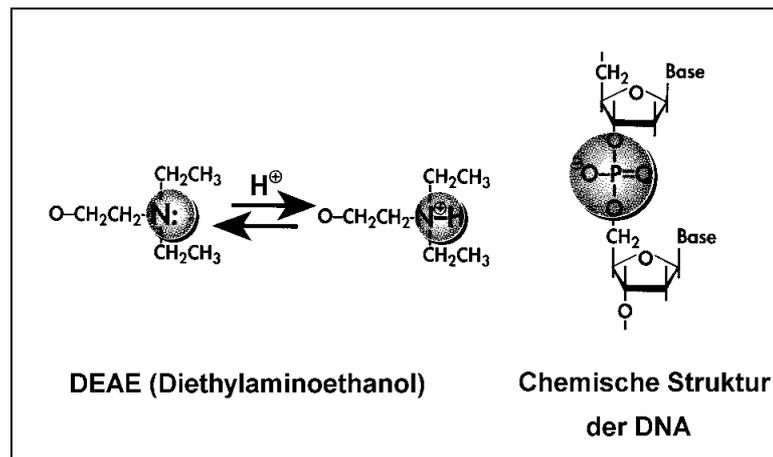


Abbildung 15: Bindungsprinzip der Säulenmatrix (QIAGEN Product Manual)

### 2.2.7.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe wurden Agarose-Gele verwendet. Dabei richtet sich die Konzentration des Agarose-Gels nach der Größe der zu trennenden Fragmente.

Hier wurde mit 1%igen Gelen gearbeitet.

Eingesetzter Basenstandard in den Gelen: 1 Kb DNA Ladder (Gibco)

Die erforderliche Agarose-Menge wurde in 1x TAE-Puffer unter Erhitzen aufgelöst und nach dem Abkühlen auf 50°C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Nun wurde die Agarose in die Elektrophoresekammer gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden der Kamm und die Gusspacer entnommen und TAE als Elektrophoresepuffer dazugegeben. Die Proben wurden mit Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm (gemessen als der Abstand der Elektroden) durchgeführt. Nach der Auftrennung konnte das Gel unter UV-Licht (302 nm) analysiert und ausgewertet werden.

### 2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Messung der DNA erfolgt bei 260 nm und 280 nm gegen den jeweils verwendeten Puffer bzw. Wasser in einer Quarzküvette.

Eine Extinktionseinheit bei 260 nm entspricht einer Konzentration von

- 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
- 40 µg/ml einzelsträngiger DNA
- 31 µg/ml Oligoribonukleotide
- 30 µg/ml RNA.

Die genaue Konzentrationsbestimmung lässt sich durch folgende Formel für DNA bestimmen:

$$\text{OD}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \mu\text{g/ml doppelsträngige DNA}$$

Zur Ermittlung der Reinheit der präparierten DNA wurde noch die Absorption bei 280 nm gemessen, um eine Verunreinigung mit Proteinen feststellen zu können. Hierfür wurde die OD bei 260 nm durch die OD bei 280 nm dividiert. Bei einem Wert von >1,8 kann man von einer geringen Proteinverunreinigung ausgehen.

### 2.2.7.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA wurde den Bedingungen der einzelnen Restriktionsenzyme angepasst. Im Allgemeinen wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 5 µg DNA in einem 20 µl-Ansatz geschnitten wurde. Die DNA wurde nacheinander mit den beiden benötigten Restriktionsenzymen verdaut, um eine jeweils vollständige Spaltung zu erreichen. Dazu wurde je eine Einheit Restriktionsenzym pro Mikrogramm DNA über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die DNA wurde nach jedem Verdau mit QiaQuick-Säulchen (QIAGEN) von kleinen Spaltfragmenten und Salzen gereinigt.

Alternativ wurden die PCR-Produkte nach folgendem Protokoll gereinigt:

Der PCR-Ansatz wurde mit 50 µl Wasser verdünnt und mit 3 M NaAc auf pH 7 eingestellt. Nach der Zugabe von Dextranblau/Glykogen und 3 Volumen absolutem Ethanol wurde der Ansatz bei -70°C für 30 Minuten inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 20 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 30 µl TE, pH 8 oder bidest. Wasser gelöst.

#### 2.2.7.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

(Kit und Protokoll nach QIAGEN / QIAEX II Product Manual, Hilden)

Die DNA-Bande wurde aus dem Gel mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten. Zu den Gelstückchen wurde pro 100 mg 300 µl Puffer QX 1 gegeben. Die QIAEX II-Suspension (Glasmilch) wurde 30 Sekunden gerüttelt und dann 10 µl zu 2 µg DNA gegeben. Dieses wurde bei 50°C für 10 Minuten inkubiert, um die Agarose zu lösen und die DNA zu binden. Alle 2 Minuten wurde die Suspension gerüttelt. Dann wurde nach einer Zentrifugation von 30 Sekunden der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde zuerst mit 500 µl Puffer QX1 gewaschen, gerüttelt und erneut kurz zentrifugiert, der Überstand wurde wieder verworfen. Das Gleiche wurde mit PE-Puffer wiederholt. Die DNA wurde nun 10-15 Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurde 20 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und resuspendiert. Die DNA-Lösung wurde dann 30 Sekunden zentrifugiert und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.2.7.5 Anhängen neuer Schnittstellen an DNA mittels PCR

Um an das 5'- und 3'- Ende einer vorhandenen doppelsträngigen DNA eine neue Restriktionsschnittstelle mittels PCR anzufügen, sollten die eingesetzten Primer mit 12 Basen das Template überlappen. Die Primer sollten so beschaffen sein, dass am 5'-Ende die benötigte Sequenz ist und am 3'-Ende ein A oder T ist. Die anschließende PCR sollte mit Proofreading-Polymerase durchgeführt werden, um sicherzugehen, dass keine verkehrte Base eingebaut wird.

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

- |   |                |        |      |
|---|----------------|--------|------|
| 1. Initiale Denaturierung der DNA                     | 1x             | 4'30'' | 95°C |
| Die folgenden drei Schritte wurden 35 mal wiederholt. |                |        |      |
| 2.  | Denaturierung  | 30''   | 95°C |
| 3.  | Annealing      | 20''   | 52°C |
| 4.  | Polymerisation | 40''   | 72°C |

Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt. Beim Annealing-Schritt hybridisieren die Primer mit der einzelsträngigen DNA und schließlich läuft bei 72°C durch die thermostabile Polymerase die Polymerisation ab. Die erhaltene DNA wurde dann mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut, so dass die DNA die für die Ligation in einen Vektor benötigten Enden hatte.

Primersequenzen:

*BamH I*, 5'-TGGATCCAGGATGGCTTCTCA-3', Vorwärts-Primer

*Xho I*, 5'-TTTTCTCGAGCCCTTTCACAGGAAT-3', Rückwärts-Primer

### 2.2.7.6 Anhängen von RNA-Polymeraseprimersequenzen an DNA mittels PCR

Für die spätere *in vitro* Transkription wurden TTR DNA-Substrate synthetisiert, an die während der PCR-Reaktion über spezifische Primer an das 5'-Ende eine T7-RNA-Promotorsequenz und an das 3'-Ende eine T3-RNA-Promotorsequenz angehängt wurden. Das methodische Vorgehen war analog zu dem in 2.2.7.5 beschrieben. Die Sequenz der Primer lautet:

a) für die TTR-*full length*-Transkripte:

T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGATGGCTTCTCA-3'

T3 5'-TCCCTTTAGTGTAGGTTATTCCTTGGGAT-3'

b) für die TTR-300mer-Transkripte:

T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGATGGCTTCTCA-3'

T3 5'-TCCCTTTAGTGTAGGTTAGCCAAGTGCCT-3'

### 2.2.7.7 Ligation

Das Zusammenfügen (Ligation) zweier DNA-Fragmente wurde damit begonnen, dass eine Dephosphorylierung des aufgeschnittenen Vektors mit SAP (Amershan), um Ligation der Vektorenden zu verhindern, durchgeführt wurde.

Vektor und Insert wurden vor der Ligation, wenn nicht schon vorher geschehen, aufgereinigt (QiaQuick). Für einen Ligationsansatz wurde die zehnfache Menge des Inserts mit dem aufgeschnittenen Vektor der entsprechenden Menge T4-DNA-Ligase, Ligase-Puffer, 1 µl ATP (10 mM) und Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen zusammenpipettiert und 14 Stunden bei 14°C inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde dann auf kompetente Zellen gegeben.

## 2.2.7.8 Amplifikation von DNA in Bakterien

### 2.2.7.8.1 Herstellen kompetenter Zellen

Der Bakterienstamm wurde auf Agar-Agar-Platten (Ampicillin 0,1% (w/v), Glucose 0,08% (w/v)) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 25 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und wiederum bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert.

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml der Übernacht-Kultur angeimpft und die Kultur bei 37°C mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 0,45 erreichte. Dann wurden die Zellen in zehn 50 ml-Röhrchen aliquotiert, in eiskaltem Wasser für 2 Stunden inkubiert und anschließend bei 4°C und 2.500 x g 15 Minuten zentrifugiert. Jedes Zellpellet wurde in 15 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und in dieser Lösung auf Eis für weitere 45 Minuten inkubiert. Dann wurde bei 1.800 x g für 10 Minuten zentrifugiert und jedes Pellet in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 200 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### 2.2.7.8.2 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

200 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und sofort mit 10 ng der Plasmid-DNA in 10 µl TE-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 45 Minuten auf Eis, 90 Sekunden bei 42°C und dann 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurden 800 µl 37°C warmes LB-Medium zugegeben und bei 37°C leicht geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl auf einer LB-Agarplatte, die entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids mit Antibiotikum Ampicillin versetzt war, ausgestrichen und bei 37°C 24 Stunden inkubiert.

## 2.2.7.9 Sequenzierung von DNA

### 2.2.7.9.1 Cyclesequencing

(nach AbiPrism 310 Handbook, Perkin Elmer, Weiterstadt)

Das Sequenzieren der klonierten Plasmide wurde mit einem automatischen Sequenzierer der Firma PerkinElmer - AbiPrism 310 (Weiterstadt) nach der Cyclesequencing-Technik durchgeführt. Es basiert auf der Sanger-Methode, die jedoch durch den Gebrauch des BigDye™-Terminator-Cyclesequencing-Ready-Reaction-Kit der Firma Perkin-Elmer abgewandelt wurde. Das Kit ist speziell auf die Verwendung von PCR-

Produkten als Sequenzier-Template ausgerichtet. Es verwendet eine Variante der *Taq*-Polymerase (AmpliTaq DNA-Polymerase). Enthalten sind außerdem Fluoreszenz-Farbstoffe, sog. Farbterminatoren, die auf die vom Laser des Sequenzier-Gerätes gelieferte notwendige Aktivierungsenergie ausgerichtet sind, und alle weiteren für eine Sequenzierung nötigen Reagenzien. Im Einzelnen enthält die Terminationsreaktionsmischung folgende Bestandteile:

- markierte A- /C- /G- und T- Farbterminatoren
- Desoxinukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
- AmpliTaq DNA-Polymerase mit thermisch stabiler Pyrophosphatase
- $MgCl_2$
- Tris-HCl - Puffer, pH 9,0

Das Prinzip der Farbterminatoren besteht darin, dass jedes der vier Oligoribonukleotide nicht nur mit einem anderen Fluorochrom markiert ist, sondern auch, dass durch ihren Einbau die Kettenverlängerung abgebrochen wird, da es sich um Didesoxinukleotide (ddNTP's) handelt. Zwei separate Reaktionen, die Markierung und den Kettenabbruch hat man miteinander gekoppelt. Mit dem Einbau der Farbterminatoren ist das Molekül im Gegensatz zu anderen sich nicht verlängernden Ketten fluoreszenzmarkiert, da es vorher beispielsweise zur Bildung einer Sekundärstruktur der Matrize oder zu Verunreinigungen gekommen ist.

Für die Sequenzierung wurden die Proben nach folgendem Schema gemischt:

2 µl	Terminationsreaktionsmischung
2 µl	Primer
2 µl	resuspendiertes PCR- Produkt
4 ml	HPLC- H <sub>2</sub> O

PCR:

95°C	30 s
95°C	30 s
52°C	1 min
72°C	1 min 30 s    30 Cyclen

PEG-Lösung: (100ml) kühl lagern

4,92 g	NaOAc
0,12 g	$MgCl_2 \cdot xH_2O$
26,20 ml	PEG 8000 (Sigma)

Das erhaltene PCR-Produkt wurde durch eine PEG-Fällung aufgereinigt. Hierfür wurden gleiche Volumina PCR-Lösung und PEG-Löung bei Raumtemperatur gemischt und

dann gerüttelt. Dieses wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 10 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die ausgefällte DNA wurde mit 100 µl absolutem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde verworfen und das Pellet 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Termi-Mix	2 µl	(enthält die fluoreszenzmarkierten dNTP's)
PCR-Produkt	2 µl	(aus der oben durchgeführten PCR)
Primer (nur einer) 5 µM	2 µl	(T3- oder T7-Primer)
H <sub>2</sub> O (HPLC grade)	4 µl	
	Σ10 µl	

PCR Cyclesequencing:

95°C 30 s  
95°C 30 s  
52°C 30 s      25 Cyclen  
60°C 4 min

Nach dieser PCR wurde das Produkt durch Aufreinigung von überschüssigem Farbstoff befreit. Dazu wurden die Proben auf kleine Sephadex-Säulchen aufgetragen und durch die Säulenmatrix zentrifugiert. Die Verunreinigungen und die überschüssigen Basen blieben in den Säulchen zurück. Die aufgereinigten Cyclesequencing PCR-Produkte wurden dann zur automatischen Detektion in den Sequenzierer gestellt.

Die Sequenzierung der amplifizierten DNA wurde mit Hilfe des ABIPrism, 310 Genetic Analyzer durchgeführt. Dieses Gerät kann gleichzeitig über eine Kamera Fluoreszenz bei vier verschiedenen Wellenlängen erfassen, die den Emissionswellenlängen der verwendeten Farbterminatoren entsprechen. Die Reaktionsansätze laufen nur auf einer Spur. Das Gel wird mit einem Argonlaser beleuchtet. Passiert ein Fragment den Detektor, wird der spezifische Farbstoff durch den Laser angeregt und emittiert ein für ihn spezifisches Licht. Aus der jeweiligen Farbe kann auf die betreffende Base geschlossen werden. Verarbeitet werden die entstehenden Signale durch eine Computer-Software zu einem sogenannten Elektropherogramm.

### 2.2.8 Ribozymsynthese

Die Ribozyme wurden in einer Kooperation mit der Firma InnoVir, Göttingen und dem EMBL, Heidelberg nach der Phosphoramidit-Methode an einem DNA-Synthesizer synthetisiert (Gait et al., 1991; Ludwig et al., 1998). Dabei wurde das vom Synthesizer gebildete Oligoribonukleotid nach der Synthese von der Matrix abgespalten und die Schutzgruppen entfernt. Nach Aufreinigungsschritten mit Lösungsmitteln erfolgte dann eine gelelektrophoretische und eine Aufreinigung über HPLC.

Folgende Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme wurden synthetisiert:

Ribozyme	Spezifität	Pos. 4	Pos. 12	5'-Arm	3'-Arm
<b>R1091</b>	TTR-Met30 cca	2'-O-allyl U	Ribo G	ACAUGCA	IGCCACAU
<b>R1092</b>	hnTTR ccg	2'-O-allyl U	Ribo G	GAACACA	ICACGGCC
<b>R1401</b>	TTR-Met30 cca	Ribo U	Ribo G	ACAUGCA	IGCCACAU
<b>R1402</b>	TTR-Met30 cca	2'-Amino U	Ribo G	ACAUGCA	IGCCACAU
<b>R1547</b>	TTR-Met30, inaktive	2'-O-allyl U	2'-O-allyl G	ACAUGCA	IGCCACAU
<b>R1151</b>	nicht TTR	2'-O-allyl U	Ribo G	CCAUCCC	ICUUGUCU
<b>MR1</b>	allgem. TTR	2'-Amino U	Ribo G	CGUUGGC	IUGAAUAC

**Tabelle 3:** Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme mit ihren Ziel RNA's (Spezifität), chemischen Modifikationen sowie der Sequenz der Hybridisierungsarme

5' **ACACAUGCA**ugaUgAGGCCGUGAGGCCgAA**iGCCACAU** 3'

Großbuchstaben: 2'-O-allyl modifizierte Basen

Kleinbuchstaben: Ribonukleotide (Ribobasen)

unterstrichen: 2'-Amino-Uridin

i: Ribo-Inosin

fett gedruckt: Arme des Ribozyms

**Abbildung 16:** Sequenz des R1402 Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyms.

## 2.2.9 RNA-Synthese

### 2.2.9.1 RNA-Arbeiten, RNase-freies Arbeiten

RNAsen, die sich normalerweise an allen Laboroberflächen und hier insbesondere der menschlichen Hautoberfläche befinden, dürfen beim Arbeiten mit RNA nicht in die Proben eingeschleppt werden. Auch bei der Präparation von RNA aus Gewebe oder Zellkultur stellen zelluläre RNAsen das Hauptproblem dar.

Alle Arbeiten, die der Präparation und Analyse von RNA dienen, wurden deshalb mit Handschuhen durchgeführt. Glasmaterialien wurden bei 250°C durch zweistündiges Autoklavieren RNase-frei gemacht. Lösungen wurden nur mit RNase-freiem Wasser (Ampuwa, Fresenius AG, Bad Homburg) angesetzt und anschließend autoklaviert. Alle anderen Materialien wurden mit Lösungen behandelt, die RNAsen zerstören (RNase-Zap, Ambion).

### 2.2.9.2 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde der MAXIscript Kit der Firma Ambion (Austin, Texas, USA) eingesetzt. Die Vorbereitung der Proben und das Zusammengeben des Transkriptionsansatzes erfolgte bei Raumtemperatur. Dafür wurden alle Reagenzien des Kits aufgetaut und auf Eis gelagert. Nun wurden die Komponenten des Transkriptionskits in einem RNase-freien Eppendorf-Reaktionsgefäß wie folgt zusammengegeben:

H <sub>2</sub> O - Nuklease-frei	ad 20 µl
DNA, linearisiert (max. 6 µl)	1 µg
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
10 mM ATP	1 µl
10 mM CTP	1 µl
10 mM GTP	1 µl
10 mM UTP	1 µl
T7, T3, or SP6-RNA Polymerase (10 U/µl) + ribonuklease inhibitor (5 U/µl)	<u>2 µl</u>
	<b>Σ 20 µl</b> ENDEVOLUMEN

Der Ansatz wurde durch Fingerschnippen oder Pipettieren gemischt und anschließend kurz anzentrifugiert. Nun wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Um das DNA Template zu entfernen, wurde anschließend 1 µl RNase-freie DNase I (2 U/µl) zum Reaktionsmix hinzugegeben, kurz gemischt, anzentrifugiert und dann bei 35°C 15 Minuten inkubiert. Durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA-Lösung wurde die DNase I inhibiert.

Zur Aufreinigung der RNA und zur Entfernung von freien Nukleotiden wurde die Transkriptionsreaktion mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und dann 3 µl 5 M Ammoniumbicarbonatlösung hinzugegeben und gerüttelt. Dann wurde das dreifache Volumen absoluter Ethanol hinzugegeben und die RNA durch eine Inkubation bei -20°C für 30 Minuten ausgefällt. Diese wurde durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und anschließend nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurde die RNA in 30 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen, die Konzentration wie oben beschrieben bestimmt und bei -70°C gelagert.

## 2.2.10 Spaltungsassays

### 2.2.10.1 Kurze Fragmente - 21mer RNA-Oligoribonukleotide

#### Reagenzien:

- Tris HCl pH 7,4 100 mM (autoklaviert, für kurze Substrate)
- MgCl<sub>2</sub> 100 mM
- EDTA 0,5 M

#### Ansatz:

- + 10 µl TrisHCl
- + 75 µl H<sub>2</sub>O
- + 2,5 µl 10 µM RNA-Substrate
- + 2,5 µl 100 µM RibozymIsg.

*In vitro* Spaltungsassay der 21mer TTR RNA-Oligoribonukleotide (21mer):

Die kurzen 21mer-Substrate wurden so synthetisiert (Oswel , Southhampton, Great Britain), dass sie die spezifischen Sequenzen für TTR-Met30 und hnTTR enthielten. Die Sequenz für das Wildtyp Oligomer lautet 5'-AUGUGGCCGUGCAUGUGUUCA-3' und für das TTR-Met30 Oligomer 5'-AUGUGGCCAUGCAUGUGUUCA-3'. Die unterstrichenen Triplets markieren jeweils die Sequenz, nach der die Ribozyme spalten.

Zur Durchführung des Spaltungsassays der kurzen RNA Oligomere wurden je Ansatz 75 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl Ribozymlösung (200 µM), 5 µl RNA Template (20 µM) und 10 µl Tris-HCl pH 7,4 (100 mM) gemischt. Die Mischung wurde für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 10 µl MgCl<sub>2</sub> (100 mM) gestartet. Die Endkonzentration der verwendeten Reagenzien betrug 250 nM RNA Template, 2,5 µM Ribozym und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Zu den Zeitpunkten 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 und 60 Minuten wurden Proben entnommen und die Reaktion

durch Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ –95% Formamid–0,05% Bromphenolblau (Gel Loading Buffer II, Ambion MAXIScript Kit, Ambion, Austin, USA) gestoppt. Referenzproben wurden der Reaktionsmischung vor Zugabe des  $\text{MgCl}_2$  entnommen. Die Proben wurden mittels Elektrophorese in einem 20% Acrylamid–1,5% Bisacrylamid–7 M Harnstoff Gel (14 x 16 cm) mit Tris-Borat pH 8,0, 2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  als Laufpuffer analysiert. Das Gel wurde mit SYBRGold (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) gefärbt und die Bandenintensität bei 302 nm mit einem GelDoc 1000 System (BioRad, Hercules, USA) und der Software Molecular Analyst Version 2.5 (BioRad) quantifiziert.

### 2.2.10.2 *Full length* und 300mer-Oligoribonukleotide

#### Reagenzien:

- Tris HCl pH 8 100 mM (autoklaviert, für *full length*)
- Tris HCl pH 7,4 100 mM (autoklaviert, für kurze Substrate)
- $\text{MgCl}_2$  100 mM
- EDTA 0,5 M

#### Ansatz: für 80 $\mu\text{l}$ Gesamtvolumen

- + 10  $\mu\text{l}$  TrisHCl
- + 60  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- + 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  RNA (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
- + 5  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  Ribozymg. (8,5  $\mu\text{l}$ )

#### *In vitro* Spaltung der *full length* und 300mer-Oligoribonukleotid (300mer) TTR RNA:

Zur Spaltung der *full length* / 300mer RNA wurden 19,5  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{l}$  Ribozymlösung (100  $\mu\text{M}$ ), 3  $\mu\text{l}$  RNA Template (10  $\mu\text{M}$ ) und 3,5  $\mu\text{l}$  Tris-HCl pH 7,4 (100 mM) gemischt. Die Endkonzentration von Tris-HCl, pH 7,4 im Ansatz betrug 10 mM. Die Mischung wurde für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde ebenfalls mit der Zugabe von 10  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (100 mM) gestartet. Die Endkonzentration betrug 250 nM RNA Template, 2,5  $\mu\text{M}$  Ribozym und 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Nach 30 Minuten wurden Proben entnommen und die weitere Reaktion sofort durch die Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ –95% Formamid–0,05% Bromphenolblau (Gel Loading Buffer II) gestoppt. Die Proben wurden wie zuvor beschrieben in denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert.

### 2.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA

Für die Elektrophorese der *full length* RNA nach den Spaltungsexperimenten wurde ein 5%iges Polyacrylamidgel (PA), das 8 M Harnstoff enthielt, gegossen. Dazu wurden für 15 ml Gel 7,2 g Harnstoff abgewogen, 1,5 ml 10 X TBE-Puffer und 1,875 ml 40%iges Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) hinzugegeben und mit Wasser auf 15 ml aufgefüllt. Nachdem sich der Harnstoff gelöst hatte, wurden 120 µl 10%iges Ammoniumpersulfat sowie 20 µl TEMED hinzugegeben, kurz geschüttelt und das noch flüssige Gel zwischen die Elektrophoreseplatten gegossen. Vor dem Auspolymerisieren wurden Gelkämme zwischen die Scheiben geschoben. In die so erhaltenen Geltaschen wurden dann die mit Laufpuffer versetzten RNA-Proben pipettiert. Die RNA-Fragmente wurden dann bei 200 Volt im Gel aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit voneinander getrennt.

#### 2.2.11.1 Gelanalyse nach SYBRGold-Anfärbung

Die Polyacrylamidgele wurden zur Detektion der RNA in eine 1:10.000 Verdünnung einer SYBRGold-Lösung (MolekularProbes, Eugene, USA) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. SYBRGold ist eine fluoreszierende Substanz, die sich aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften an Nukleinsäuren wie RNA und DNA anlagert und diese unter UV-Licht sichtbar werden lässt. Die Banden der RNA werden in Relation zur RNA-Menge durch das SYBRGold angefärbt, was dann mit einem speziellen UV-Transilluminator (GelDoc1000, BioRad, München) ausgewertet werden kann. Dazu werden die Gele mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm bestrahlt und die Fluoreszenz durch eine CCD-Kamera gescannt. Mittels einer Software (Molekular Analyst, BioRad) lässt sich die Intensität der Banden quantifizieren und durch die Überführung der erhaltenen Daten in ein Datenanalyseprogramm (SigmaPlot 5, SPSS Inc.) das Ribozym-spaltungsexperiment auswerten.

## **2.2.12 Zellkultur**

### **2.2.12.1 Zellkultur der Humanen Zelllinien HepG2 und 293**

Für die *in vitro* Zellkultur-Spaltungsexperimente stand die natürlich TTR exprimierende humane Zelllinie HepG2 zur Verfügung (Bellovino et al., 1996). Die humane Nierenzelllinie 293, die kein TTR synthetisiert, sollte stabil transfiziert werden, so dass diese TTR-Met30 exprimiert. An diesen Zellen sollten die spezifisch TTR-Met30 spaltenden Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme getestet werden.

#### **2.2.12.1.1 Kultur der Zellen**

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem Kulturmedium (DMEM) wurden 10% FCS zugesetzt. Als Antibiotika wurden eine 1:1 Mischung Penicillin-Streptomycin zugesetzt (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin).

Die Passagierung der Zellen erfolgte nach Erreichen der Konfluenz. Dabei wurde zuerst das alte Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche wurden die HepG2-Zellen 5 Minuten mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (1%) im Brutschrank inkubiert und durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Die 293-Zellen ließen sich ohne Trypsinierung vereinzeln. Nach der Zugabe von 5 ml Kulturmedium wurden die Zellen in dieser Suspension in neue 250 ml Zellkulturflaschen ausgesät und pro Flasche 10 ml neues Medium hinzugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 7 Tagen.

#### **2.2.12.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Einfrieren:

Als erstes wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst. Die Zellsuspension wurde nun in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 1.200 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert, so dass alle Zellen sedimentierten. Der Überstand wurde abgesaugt und eiskaltes Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) zugegeben, die Zellen suspendiert und zu je 0,5 ml in Kryogegefäßen bei -80°C tiefgefroren.

Auftauen:

Die gefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und nach Zugabe von 50 ml Kulturmedium 10 Minuten bei 1.200 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml DMEM/10% FCS resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

## **2.2.12.2 Transfektion von Zellen mit DOTAP und Effecten**

### **2.2.12.2.1 Vorbereitung der Zellen**

Es wurden Zellkulturflaschen ausgewählt, die durch die HepG2 / 293-Zellen zu 60-80% konfluent waren. Es erfolgte die Trypsinierung mit anschließender Vereinzelung der Zellen. Zur Zellzahlbestimmung werden die lebenden Zellen nach Trypanfärbung in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahlbestimmung erfolgt folgendermaßen: Auf einem speziellen Objektträger mit eingezähntem Zählraster (Neubauer) wird ein Deckglas gelegt. Der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas ist im Bereich des Rasters definiert und beträgt 0,1 µl. So wurden 4 mal 16 Felder ausgezählt, aufsummiert und das Ergebnis durch 4 dividiert. Das Ergebnis entsprach einer Zellzahl von  $10^4$  Zellen pro Milliliter ausgezählter Zellsuspension.

Auf die 6 cm-Schalenplatte wurden  $2-7 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Über Nacht erfolgte die Kultivierung mit DMEM/10% FCS im Brutschrank.

### **2.2.12.2.2 DOTAP**

Zur Transfektion wurden zwei Tage zuvor  $5 \times 10^5$  HepG2-Zellen und  $4 \times 10^5$  293-Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und 24 Stunden mit FCS und Antibiotikum bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Waren die Schalen 75% konfluent, wurde das Medium gegen FCS-freies gewechselt und die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert.

Für die Transfektionslösung wurden 5 µg Ribozym auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. 30 µl DOTAP wurden auf ein Volumen von 100 µl verdünnt, bei größeren Ribozymengen wurden die anderen Komponenten angepasst. Beide Verdünnungen wurden vermischt und 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde nun zu 2 ml Zellkulturmedium gegeben und dieses auf die zuvor gewaschenen Zellen pipettiert. Nun wurden die Zellen 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.12.2.3 Effecten

(Effecten Handbook, QIAGEN, Hilden)

Zur Transfektion wurden wie bei DOTAP zwei Tage zuvor  $5 \times 10^5$  HepG2-Zellen und  $4 \times 10^5$  293-Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und 24 Stunden mit FCS und Antibiotikum bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Waren die Schalen 75% konfluent, wurde das Medium gegen FCS-freies gewechselt und die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert.

Für die Transfektion wurde 1 µg Ribozym in 150 ml Puffer EC aufgenommen, 8 µl Enhancer hinzugegeben und 1 Sekunde gerüttelt. Bei größeren Ribozymmengen wurde die Menge an EC und Enhancer sowie Effecten angepasst. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur von 2-5 Minuten mit anschließendem Anzentrifugieren. Nun wurden 25 µl Effecten Transfektionsreagenz hinzugegeben, 10 Sekunden lang gerüttelt und anschließend 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das alte Medium wurde von den Zellen abgenommen und diese zweimal mit PBS gewaschen. 2 ml Zellkulturmedium (ohne FCS) wurde nun auf die gewaschenen Zellen gegeben und die Effecten Transfektionslösung hinzupipettiert. Durch leichtes Schwenken wurde eine vollständige Durchmischung des Mediums mit Transfektionslösung erreicht. Die Zellen wurden dann 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert.

### 2.2.12.3 Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie - Retrovirus

Als Retrovirusvektor wurde der unter 2.1.12.1 beschriebene Vektor pLXINtr verwendet. Der Einsatz von bicistronischen Vektoren hat zwei wichtige Vorteile. Nach der Transfektion in eine Verpackungszelllinie erlaubt die Selektion über die Antibiotikaresistenz die Selektion eines *high-titer* Virus produzierenden Zellklones. Später, nach der Infektion der Zielzellen mit dem Virus, können die transfizierten Zellen ebenso über die Antibiotikaresistenz selektiert werden.

pLXINtr wird über Standardmethoden in die Verpackungszelllinien  $\psi$ 2 transfiziert. In diesen ecotropen Zellen wird die RNA des Vektors in infektiöse, aber replikationsinkompetente Retroviren verpackt. Der Vektor pLXINtr enthält nicht die Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, die nötig sind für den Zusammenbau der Viruspartikel und die Virusreplikation. Diese Gene sind aber stabil integriert in die Verpackungszelllinie, der wiederum das Verpackungssignal  $\psi$  fehlt. Nach der Transfektion der Verpackungszelllinie mit pLXINtr und der Freisetzung von replikationsinkompetenten Viren, sind diese rekombinanten Viren in der Lage ein einziges Mal eine Zielzelle zu infizieren. Das TTR-Gen kann

nun in der Wirtszelle (hier: 293-Zellen) exprimiert werden. Diese Expression steht unter der Kontrolle des viralen LTR-Promotors. Eine Virusvermehrung ist aufgrund der fehlenden viralen Strukturgene im pLXINtr-Vektor (s.o.) nicht mehr möglich.

### 2.2.12.3.1 Retroviraler Gentransfer

2 x HBS,      pH 7,05-7,1

0,5 M HEPES

2 M NaCl

0,15M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Zuerst wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro 6 cm-Schale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen durch CaPO<sub>4</sub> mit 10 µg Plasmid-DNA (pLXINtr) in 25 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und 2 x HBS Lösung transfiziert. Nach 16 Stunden wurde das DNA enthaltene Medium abgenommen und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion am folgenden Tag wurden sechs 6 cm-Schalen mit  $5 \times 10^6$  293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium der Verpackungszellen, das nun Virus enthielt, abgenommen und durch Zentrifugation bei 3.000 x g für 5 Minuten von Verunreinigungen befreit. Die zu transfizierenden Zellen wurden mit frischem Medium, das 4 µg/ml Polybrene enthielt, versorgt und dann mit unterschiedlichen Volumina (1 µl, 10 µl, 100 µl) Virus-Zellkulturmedium geimpft. Sie wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 1:20 auf neue Schalen umgesetzt. Zum Medium wurde 500 µg/ml Geneticin (G418) zur Selektion zugegeben. Nach 3-4 Tagen wurden die positiven Klone in neue Kulturgefäße umgesetzt und für die späteren Untersuchungen kultiviert. Die sich entwickelnden stabil transformierten Zellklone wurden mehrere Male umgesetzt, immer unter Selektionsdruck durch Antibiotika-Anwesenheit.

## 2.2.13 Tierversuch

### 2.2.13.1 Transgene TTR-Met30 C57/Bl6-Mäuse

Für die *in vivo* Untersuchungen der Insosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme wurde ein Mausmodell verwendet, das freundlicherweise von Prof. Ken-ichi Yamamura zur Verfügung gestellt wurde (Watanabe et al., 1993; Yamamura et al., 1987). Diese C157/Black6 Mauslinie ist human TTR-Met30 transgen. Die Mäuse mussten 3-4 Monate alt sein, damit die Schwanzvenen für die notwendige Ribozyminjektion eine Mindestgröße haben.

Aus der Schwanzspitze entnommenes Blut wurde bei 3.000 U/min 10 Minuten zentrifugiert, das Serum abgenommen und 1:40 mit Wasser verdünnt. Diese Verdünnung war notwendig, um ein Mindestvolumen für die nephelometrische Messung zu erhalten.

In jeder Versuchstiergruppe sollten mindesten fünf Tiere sein. Der Einfluss des Geschlechts wurde für den Ribozymversuch nicht beachtet.

### 2.2.13.2 Tierversuchsprotokoll

Zunächst wurde zur Bestimmung des Normalwertes über mehrere Tage eine TTR-Met30-Konzentrationsmessung durchgeführt. Die Blutabnahme fand immer zur selben Zeit statt und es wurden immer gleiche Mengen abgenommen. Hierbei musste beachtet werden, dass es durch den täglichen Blutverlust zu einer Beeinflussung der Proteinkonzentration im Blut kommt (Abbildung 17).

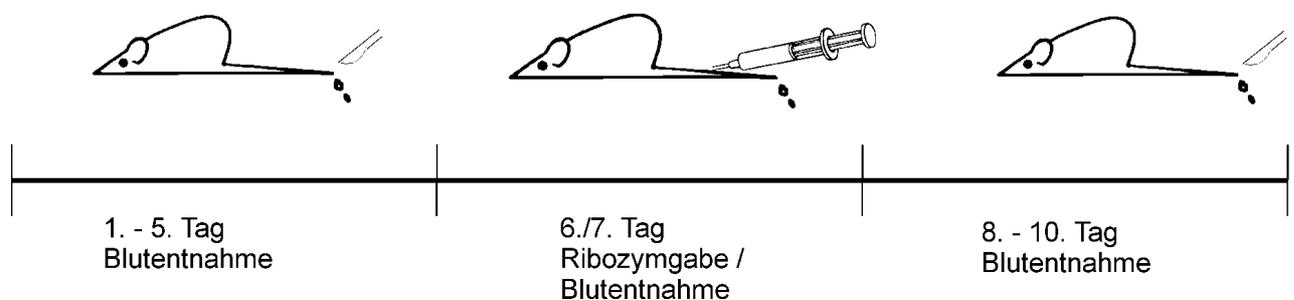


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf des Tierversuchsexperiments.

Protokoll:

### 1. Die Versuchstiergruppen

In jeder Gruppe sollten fünf Tiere sein. Gruppe a) diente als Kontrollgruppe, diesen Tieren wurde 400 µl Sterofundin (Braun, Melsungen) injiziert. Den Tieren der Gruppe b) wurde das aktive Ribozym R1402 injiziert. Die Tiere der Gruppe c) bekamen das inaktive Ribozym R1547 verabreicht.

### 2. Der Versuchsablauf

In den ersten fünf Tagen wurde den Tieren jeder Gruppe morgens ab 8 Uhr zur gleichen Zeit ca. 15 µl Blut entnommen, um die TTR-Normalserumkonzentration zu bestimmen.

Am sechsten Tag wurde morgens ab 8 Uhr den Tieren der Gruppe a) 400 µl Sterofundin, den Tieren der Gruppe b) je 50 µg aktives Ribozym R1402 in Sterofundin und den Tieren der Gruppe c) 50 µg inaktives Ribozym R1547 in 400 µl Sterofundin injiziert. Nach 8 Stunden erfolgte eine Blutentnahme von ca. 15 µl.

Am siebten Tag wurde morgens ab 8 Uhr 15 µl Blut abgenommen und dann wie am Vortag der Gruppe a) Sterofundin, der Gruppe b) 50% aktives und der Gruppe c) 50% inaktives Ribozym injiziert.

Die nächsten drei Tage wurde wieder jeweils morgens ab 8 Uhr pro Tier 15 µl Blut abgenommen.

#### **2.2.13.3 Injektion der Ribozyme**

Nachdem die Ribozyme aufgetaut worden waren, wurde die benötigte Menge mit  $MgCl_2$  und der Injektionslösung Sterofundin gemischt und 2 Minuten auf 95°C erhitzt. Dann wurde diese Ribozymlösung auf 37°C über 10 Minuten abgekühlt. Bei 37°C wurde die Lösung dann in Injektionsspritzen aufgezogen und in eine Schwanzvene einer Maus injiziert. Um die Venen der Maus besser punktieren zu können, wurde den Mäusen zuvor der Schwanz 3-5 Minuten in warmes Wasser gehalten.

#### **2.2.13.4 Blutentnahmen**

Das Blut wurde den Mäusen an der Schwanzspitze entnommen. Dieses ist für die Maus mit relativ geringem Stress und Schmerz verbunden. Beim ersten Mal wurden wenige Millimeter der Schwanzspitze mit dem Skalpell entfernt. Für spätere Blutentnahmen musste nur der Schorf der Wunde etwas angeritzt werden.

#### **2.2.13.5 Serumanalyse**

Das Serum wurde wie unter 2.2.1 beschrieben analysiert.

### 3 Ergebnisse

Infolge der Möglichkeit an Serumproben von HA-Patienten vor und nach einer Domino-Lebertransplantation den Verlauf der TTR-Konzentration zu bestimmen, wurde zuerst eine biochemische Charakterisierung des Transthyretin im Patientenserum durchgeführt. Für die Entwicklung eines Gentherapieansatzes bei HA wurden mit dem Ziel der Unterbindung der Translation und somit Expression des Proteins TTR Hammerhead-Ribozyme getestet. Zuerst wurde die Spaltungsaktivität und Spezifität *in vitro* an RNA-Substraten und dann im Zellkulturexperiment überprüft. Abschließend wurden die Ribozyme *in vivo* im Mausmodell getestet.

#### 3.1 Domino-Lebertransplantation

##### 3.1.1 Klinische Charakterisierung der Domino-lebertransplantierten Patienten

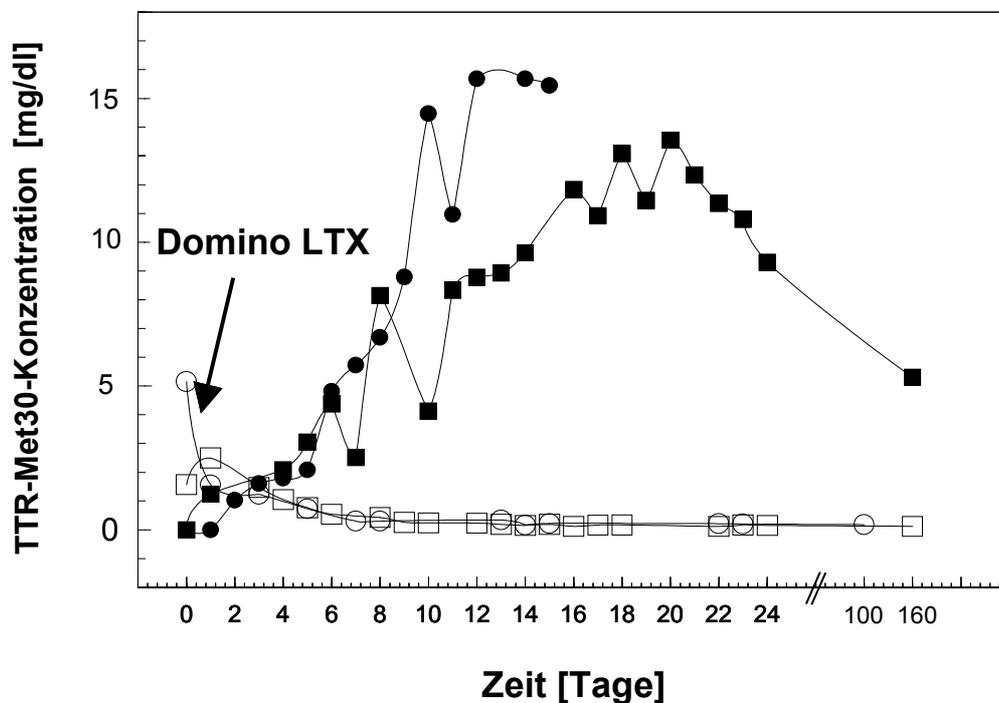
HA-Patienten erhielten durch eine Organtransplantation eine Spenderleber. Die nun zur Verfügung stehenden Amyloidose-Lebern, die weiterhin physiologisch voll funktionsfähig waren, wurden Patienten mit LTX-Bedarf implantiert. Diese Amyloidose-Leber-Empfänger waren Patienten im Alter von 59 bzw. 60 Jahren, die jeweils ein hepatozelluläres Karzinom hatten.

	Alter	Geschlecht	Diagnose	Beginn der Symptome	PN	AN
Patient 1	29	m	HA	1992	+	+
Patient 2	31	m	HA	1990	+	+
Patient 3	60	m	HCC	1995	(+)	-
Patient 4	59	m	HCC	1995	-	-

**Tabelle 4:** Klinische Charakteristika der Patienten. HA, Hereditäre Amyloidose; HCC, Hepatozelluläres Karzinom; PN, periphere Polyneuropathie; AN, Autonome Neuropathie; +, vorhanden; -, nicht vorhanden.

### 3.1.2 Konzentration von TTR-Met30 vor und nach Domino-LTX

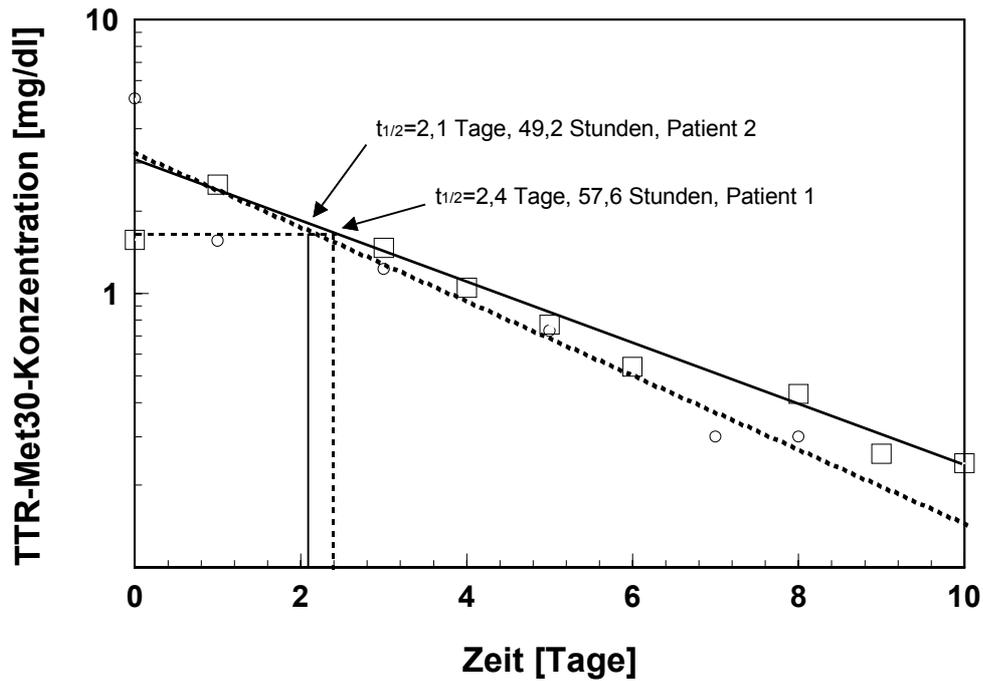
Am Tag direkt vor der Domino-LTX wurde die TTR-Met30-Konzentration der beiden Patienten unter Einsatz eines Radioimmunoassay (RIA) (Nakazato et al., 1984) bestimmt und danach täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen. In Abbildung 18 ist zu sehen, dass die TTR-Met30 Konzentration bei den Patienten 1 und 2 nach der Transplantation allmählich auf einen Wert von 0 mg/dl zurückgingen. Parallel dazu stieg die TTR-Met30-Konzentration bei den Patienten 3 und 4 an und erreichte nach 14 Tagen einen durchschnittlichen Wert von 13 mg/dl. Patient 4 ist am 16. Tag nach der Lebertransplantation verstorben.



**Abbildung 18:** Serumkonzentration vor und nach Domino-LTX. Patient 4 (-■-) erhielt die Leber von Patient 2 (-□-) und Patient 3 (-●-) [am 16. Tag nach LTX verstorben] erhielt die Leber von Patient 1 (-○-).

### 3.1.3 Bestimmung der Halbwertszeit von TTR-Met30 nach Domino-LTX

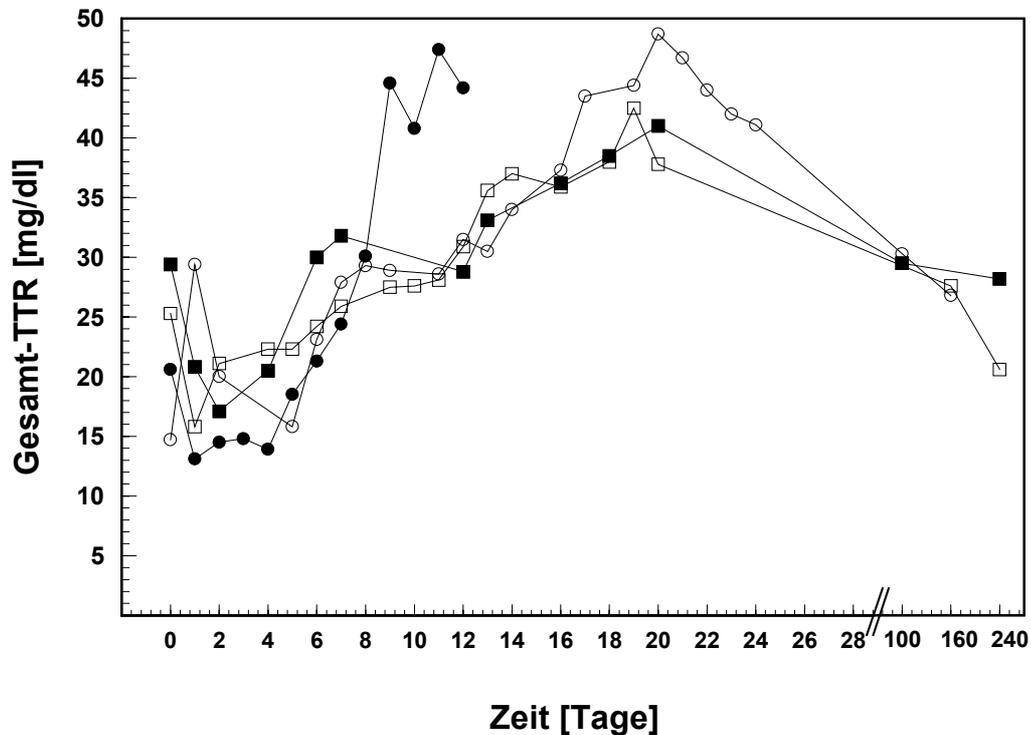
Da die Leber als Hauptsyntheseorgan für TTR-Met30 bei den HA-Patienten im Organismus nach der Transplantation nicht mehr vorhanden war, konnte die Halbwertszeit bestimmt werden. Durch einen logarithmischen Auftrag wurde die Halbwertszeit des TTR-Met30-Abbaus auf 2,1 für Patient 2 und auf 2,4 Tage für Patient 1 berechnet. Durchschnittlich ergibt sich ein Wert von 2,25 Tagen (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Logarithmische Darstellung der Abnahme der TTR-Met30-Konzentration von HA-Patient 1 und HA-Patient 2. Die Halbwertszeit beträgt bei Patient 1 2,4 Tage=57,6 Stunden und bei Patient 2 2,1 Tage=49,2 Stunden.

### 3.1.4 Konzentration von Gesamt-TTR vor und nach Domino-LTX

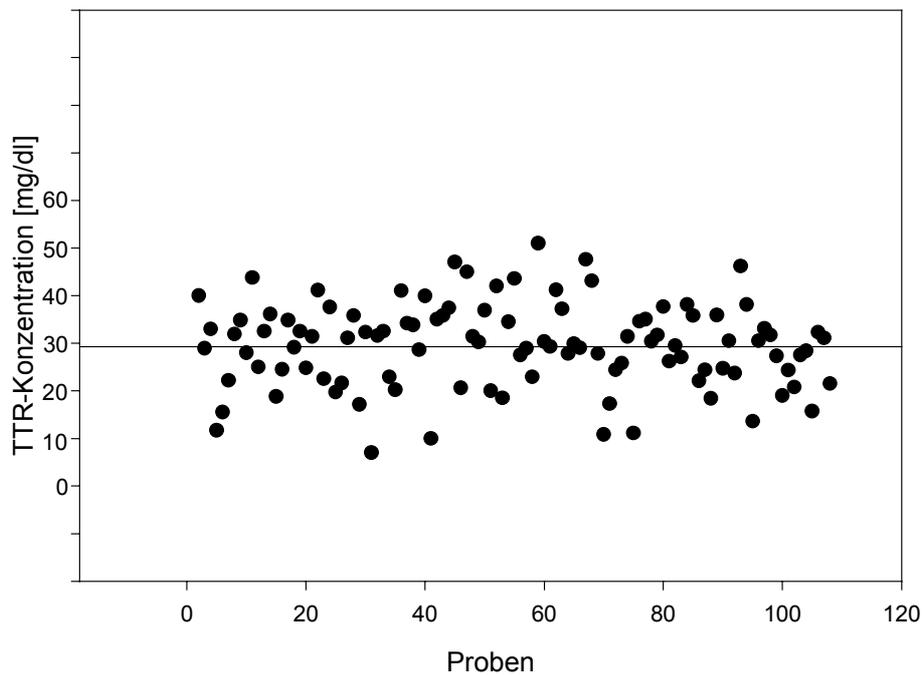
Gleichzeitig zur Bestimmung der TTR-Met30-Konzentration wurde nephelometrisch die Gesamtkonzentration von Transthyretin im Serum aller Patienten der Domino-LTX bestimmt. (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Konzentration von Gesamt-TTR vor und nach Domino-LTX bei Patient 1, 2, 3 und 4. Die Normal-TTR-Konzentration wurde bei allen Patienten nach ca. 120 Tagen erreicht. Die Domino-LTX erfolgte zwischen den Tagen 0 und 1.

Die TTR-Konzentration fiel bei allen vier Patienten nach der Transplantation von durchschnittlich 25 mg/dl auf ca. 17,5 mg/dl. Nachdem die Lebern ihre normale Syntheseleistung nach 5 Tagen erreicht hatten, stieg der TTR-Wert auf durchschnittlich 40 mg/dl und lag somit 10 mg/dl über der normalen TTR-Konzentration im Serum. Dieses ist auf die Akute-Phase-Reaktion nach der Transplantation zurückzuführen. Nach deren Abklingen erreichten die Werte nach ca. 120 Tagen das Normallevel von 25-30 mg/dl. Diese Langzeitwerte konnten für drei Patienten erhoben werden.

Zur Feststellung der durchschnittlichen normalen TTR-Konzentration wurde das Serum von 105 stoffwechselgesunden Patienten untersucht. Dazu wurde die TTR-Konzentrationsbestimmung am Nephelometer etabliert und die Werte bestimmt. Der Mittelwert betrug 29,6 mg/dl (Abbildung 21). Die Standardabweichung lag bei 31 mg/dl und die Variabilität lag unter 8%.

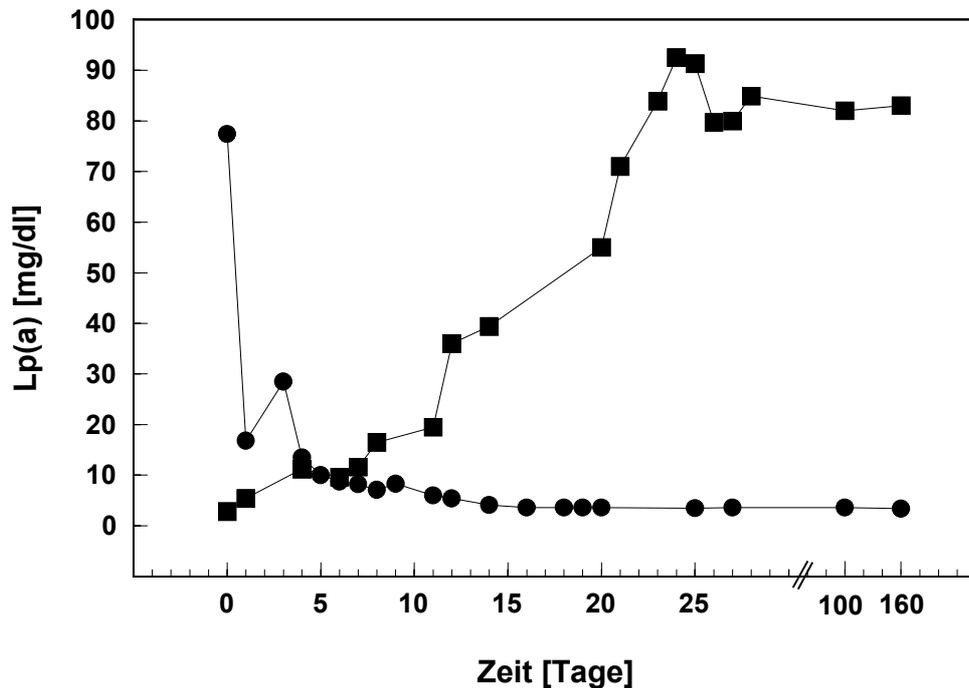


**Abbildung 21:** Gesamt-TTR-Konzentration von 105 Normalpatienten und Bestimmung des Mittelwertes auf 29,6 mg/dl.

### 3.1.5 Kontrollbestimmung des leberspezifischen Proteins Lp(a)

Dass die Beobachtungen zum Verlauf der TTR- bzw. TTR-Met30-Konzentration vor und nach der Domino-Lebertransplantation auch tatsächlich mit dem Austausch der Organe zusammenhing, wurde durch die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung eines anderen Proteins überprüft. Lipoprotein (a) [Lp(a)] ist ein Protein des Fettstoffwechsels und wird nur in der Leber synthetisiert. Die Serumkonzentration des Lp(a) ist genetisch bedingt und unterliegt nur geringen Schwankungen. Somit kann die Konzentration dieses Proteins als Marker für die jeweilige Leber angesehen werden. Die Lp(a)-Konzentrationsbestimmung wurde ebenfalls nephelometrisch durchgeführt. Es wurden die Patienten 2 und 4 ausgewählt, da die Lp(a)-Konzentration im Serum von Patient 2 sehr hoch (78,5 mg/dl) und bei Patient 4 niedrig (3 mg/dl) war (Abbildung 22). Nach der Domino-LTX am Tag 1 stieg die Konzentration bei Patient 4, dem Empfänger der Amyloidose-Leber, an und erreichte nach 25 Tagen ein Niveau von 80 mg/dl. Dieses ent-

sprach der Serumkonzentration der HA-Donor-Leber. Beim HA-Patient 2 sank der Lp(a)-Wert auf ein normales Niveau von 4 mg/dl.



**Abbildung 22:** Konzentration von Lp(a) von HA-Patient 2 und Patient 4 vor und nach Domino-LTX. Patient 4 (-■-) hat die Leber von Patient 2 (-●-) erhalten.

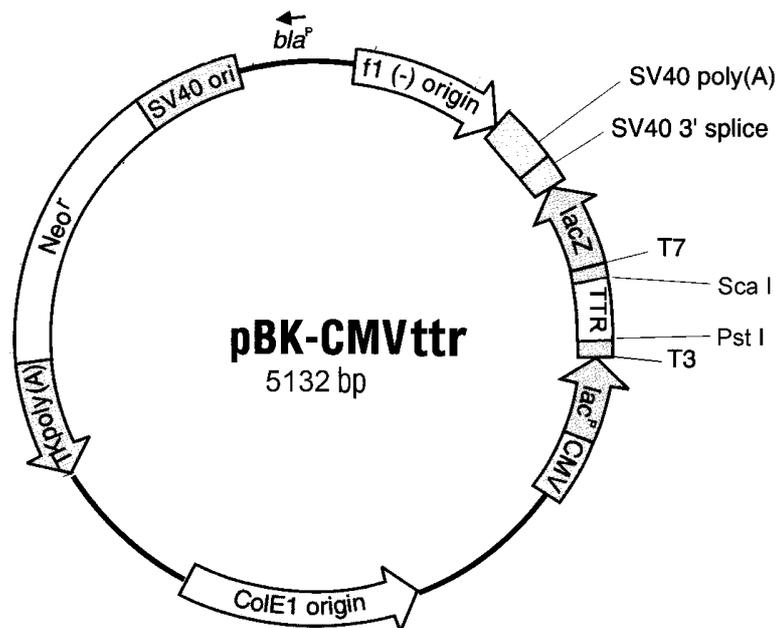
## 3.2 Molekularbiologische Arbeiten

Um die Ribozyme sowohl *in vitro* an RNA-Substraten als auch im Zellkulturexperiment zu testen, war es nötig die vorhandene TTR cDNA (pPA1-Plasmid) durch ein Transkriptionssystem in RNA umzuschreiben. Hierfür schien ein Plasmidvektorsystem (pBK-CMV) geeignet. Über eine interne T3- bzw. T7-Promotorsequenz ist so *in vitro* Transkription mit T3- bzw. T7-Polymerase möglich. Eine zusätzliche Promotorsequenz ermöglicht Transkription auch nach Transfektion von humanen Zellen. Ebenfalls wurde RNA aus PCR-Produkten mit T3/T7-Promotorsequenzen *in vitro* transkribiert.

### 3.2.1 Erstellung des Expressionsvektors pBK-CMVttr

Das pPA1-Plasmid wurde aus einer gesättigten Übernachtskultur *E.coli* pPA1 mit dem QIAGEN MaxiPrep Kit isoliert und die Konzentration bestimmt. Mit den Restriktionsenzymen *Pvu II* und *Pst I* wurde die TTR cDNA-Sequenz aus dem pPA1-Vektor heraus-

geschnitten, über ein Agarosegel aufgetrennt und mit QiaEx (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Der Vektor wurde mit *Pst* I und *Sca* I verdaut. Nach dem Verdau der einzufügenden Sequenz (Insert) und des Vektors und anschließender Dephosphorylierung wurden Insert und Vektor nach erneuter Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung miteinander ligiert. Das neue Plasmid (Abbildung 23) wurde in kompetente *E.coli* überführt und anschließend über eine Plasmid-Präparation isoliert.



**Abbildung 23:** Plasmidkarte des pBK-CMVttr-Expressionsvektor. Die Expression der cDNA von *hnTTR* und *TTR-Met30* steht unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Zur Kontrolle durch Sequenzierung ist 5' eine T3 Primersequenz und 3' eine T7 Primersequenz.

Zur Kontrolle des pBK-CMVttr-Vektors wurde eine Sequenzierung an dem automatischen Sequenzer AbiPrism 310 der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die erhaltene Sequenz stimmte mit der erwarteten überein. In Abbildung 24 ist ein Stück der erhaltenen Sequenz zu sehen. Es handelt sich um den Bereich um die Mutationsstelle für TTR-Met30.

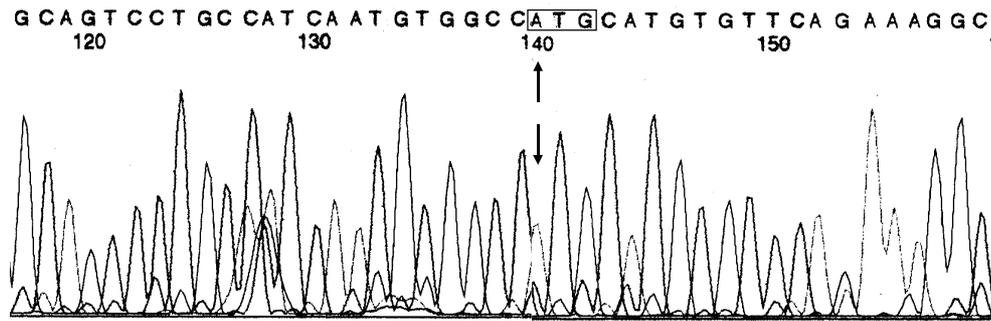


Abbildung 24: Kontrollsequenzierung des Vektors pBK-CMVttr. Darstellung des Abschnitts der DNA-Sequenz, der die TTR-Met30-Mutation (Pfeile) enthält. Die Box markiert das Triplett, das für Methionin kodiert.

### 3.2.2 Erstellung des Retrovirusvektors pLXINtr

Die Arbeiten zur Erstellung des Retrovirusvektors erfolgten analog zu den vorhergegangenen. Nach dem Herausschneiden der TTR cDNA aus dem pPA1-Plasmid und der Bestimmung der Konzentration wurde mittels PCR über zwei spezifische Primer (siehe 2.2.7.5) am 5'-Ende eine *BamH I* Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Xho I* Schnittstelle angehängt. Der ursprüngliche Retrovirus-Vektor wurde mit *BamH I* und *Xho I* aufgeschnitten und der Vektor pLXINtr wie unter 2.2.7.5 beschrieben erstellt und ist in Abbildung 25 dargestellt.

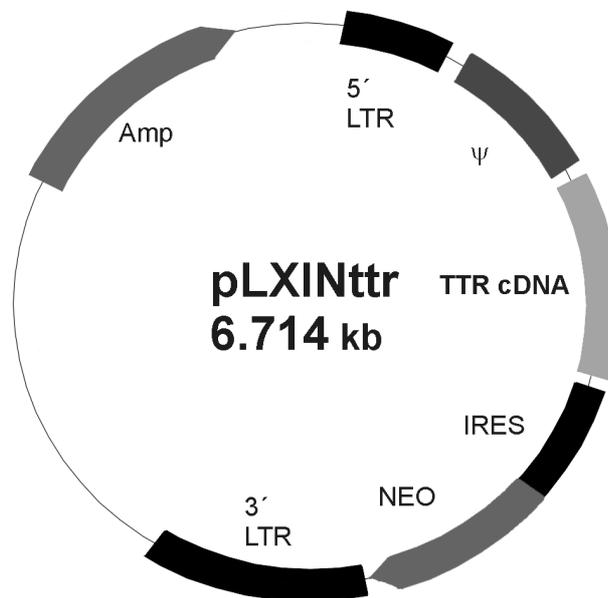


Abbildung 25: Retrovirusplasmid pLXINtr mit eingefügter TTR-Met30 / hnTTR cDNA. Die Expression der TTR DNA steht unter der Kontrolle des Virus LTR-Promotors.

### 3.2.3 Stabile Transfektion

Nach der Präparation des in *E.coli* vermehrten neuen Vektors wurde dieser für die Transfektion der Verpackungszelllinie  $\psi$ 2 eingesetzt. Die Verpackungszellen produzierten nun den replikationsdefizienten Retrovirus. Nach ausreichender Virusproduktion wurde der virusenthaltende Zellkulturüberstand abgenommen und zur stabilen Transfektion auf 293-Zellen gegeben.

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden von den nichttransfizierten Zellen durch Antibiotika selektiert. Da das Retrovirusplasmid hinter der IRES Sequenz noch ein Gen für die Neomycin-Resistenz hatte, konnten durch Zugabe von Geneticyn (G418) die untransformierten Zellen abgetötet werden. Durch nephelometrische Bestimmung des aufkonzentrierten Zellkulturüberstandes wurde dann die TTR-Met30- bzw. hnTTR-Konzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl die ausgewählten mit TTR-Met30 transfizierten 293-Klone (293-TTR-Met30) als auch die mit hnTTR transfizierten 293-Klone (293-hnTTR) das jeweilige Transthyretin-Protein exprimierten (3.4.2). Somit konnten die Zellen für die weiteren Experimente verwendet werden.

## 3.3 Ribozymsspaltungen - *in vitro* Spaltungen

Über einen Kooperationspartner (InnoVir, Göttingen) bestand die Möglichkeit ein spezielles Ribozym (Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozym) zur Targetierung des NCH-Triplets von TTR-Met30 (CCG) einzusetzen (Ludwig et al., 1998) (Abbildung 8).

Zur chemischen Stabilisierung entschieden wir uns für die Einführung eines 2'-Amino-Uridin (Abbildung 7) an Position u4, da für diese Veränderung der minimalste Verlust an Aktivität und die größtmögliche Stabilität untersucht wurde (Beigelman et al., 1995).

Die Ribozyme, die synthetisiert wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Zur Überprüfung der Spezifität und der Aktivität der Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme mussten zuerst Spaltungsexperimente *in vitro* durchgeführt werden. Hierfür wurden drei unterschiedlich lange RNA-Substrate eingesetzt.

### 3.3.1 Spaltung von 21mer Oligoribonukleotiden

Für erste qualitative und quantitative Aussagen wurden zwei Gruppen von 21-Basenlangen RNA-Oligoribonukleotiden (21mer) eingesetzt, wobei die eine die TTR-Met30 Sequenz (CCA) und die andere die Sequenz für humanes TTR (CCG) enthielt. Zur Spaltung wurden sämtliche Ribozyme aus Tabelle 3 eingesetzt.

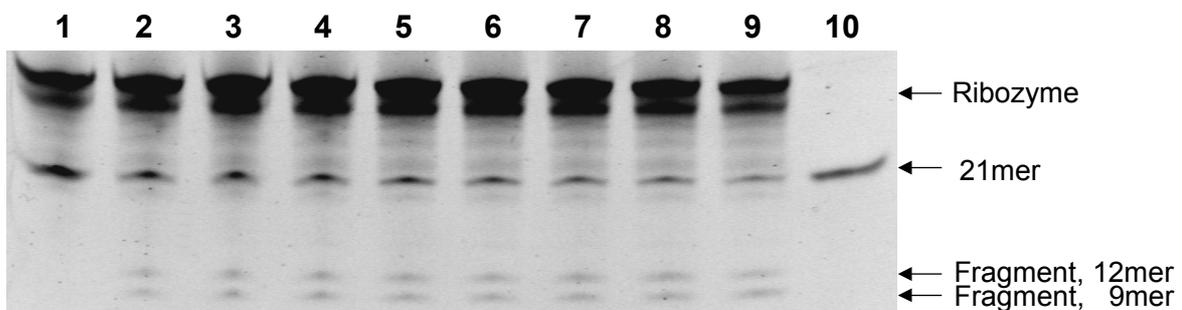


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Spaltung des TTR-Met30-spezifischen 21mer-Substrates (CCA) mit dem Ribozym R1401. Spur 1 = 0 min, 2 = 1 min, 3 = 2 min, 4 = 4 min, 5 = 6 min, 6 = 10 min, 7 = 20 min, 8 = 30 min, 9 = 60 min, und 10 = RNA pure.

Abbildung 26 zeigt die kinetische Spaltung des Ribozyms R1401, das nur nach dem Triplet CCA, d.h. der TTR-Met30-spezifischen Sequenz spaltete. Die Intensität der Spaltfragmente, ein 12mer und ein 9mer, nahm mit der Zeit zu und im gleichen Maße nahm die Intensität der Substratbande des 21mer ab.

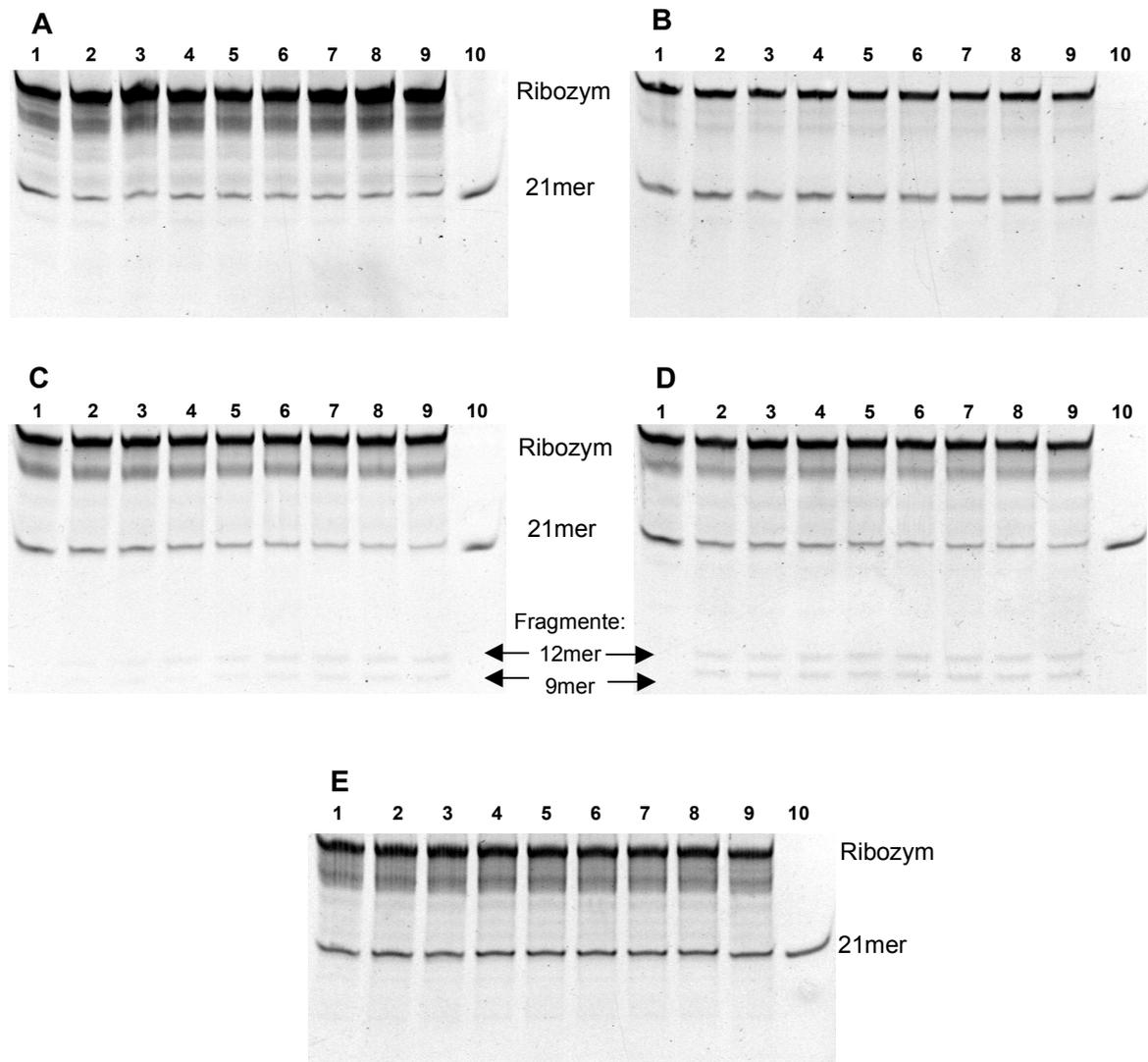
Die Abbildung zeigt den Scan eines 20% Polyacrylamidgels, auf dem nach dem Stopp der einzelnen Spaltungen die RNA und die Ribozyme durch Elektrophorese aufgetrennt wurden. Nach der Trennung der Komponenten wurde die RNA im Gel durch SYBRGold angefärbt und im UV-Licht elektronisch eingescannt.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse weiterer Spaltungskinetiken zu sehen. Auf Gel A wurden die Proben des kinetischen Experiments mit der Inkubation von hnTTR mit Ribozym R1401 aufgetragen. Das TTR-Met30-spezifische Ribozym R1401 konnte das 21mer mit der hnTTR Sequenz CCG nicht spalten, es traten keine Spaltfragmente auf. Dieser Ansatz diente als Kontrollansatz für die Spezifität der Ribozyme. Gel B zeigt das Ergebnis der Negativkontrolle. TTR-Met30-spezifisches 21mer wurde mit dem aktiven Ribozym R1151 inkubiert. R1151 hatte keine Komplementarität zu dem 21mer, d.h. TTR war nicht die Zielsequenz. Es traten keine Fragmente auf, eine Spaltung fand nicht statt.

Zwei weitere Spaltungskinetiken mit den aktiven TTR-Met30-Ribozymen R1091 und R1402 und dem TTR-Met30 21mer wurden zum Vergleich mit dem Ribozym R1401 durchgeführt. R1091 hatte an Position 4 eine 2'-O-allyl-Modifizierung und R1402 an gleicher Position eine Amino-Uridinbase. Die Scans des jeweiligen Gels zeigten, dass die Intensität der Fragmente der R1091-Spaltung geringer waren (Gel C) als die des Ribozyms R1402 und auch erst später auftraten. Die genaue Auswertung der Scans erfolgte mit der Software MolekularAnalyst. Ribozym R1401 spaltete schneller und effektiver das 21mer als R1402. R1091 spaltet am langsamsten von den drei aktiven Ribozymen.

Die Quantifizierung der Banden aller Spaltungen ergab, dass nach 10 Minuten 60% des 21mer-Substrates durch Ribozym R1401 gespalten war und nach 35 Minuten das langsamere Ribozym R1402 60% gespalten hatte. R1091 erreichte nach 60 Minuten nur eine 45%ige Spaltung des Substrates.

Zur Kontrolle wurde dann noch eine Spaltungskinetik durchgeführt. Das TTR-Met30 21mer Oligoribonukleotid wurde mit dem inaktiven Ribozym R1547, das sowohl an Position 4 als auch 12 2'-O-allyl modifiziert war, inkubiert. Es fand keine Spaltung durch das Ribozym R1547 statt (Gel E).



**Abbildung 27:** Zeitlicher Verlauf verschiedener Spaltungen von 21meren. Bei jedem Ansatz: Spur 1 = 0 min, 2 = 1 min, 3 = 2 min, 4 = 4 min, 5 = 6 min, 6 = 10 min, 7 = 20 min, 8 = 30 min, 9 = 60 min und 10 = RNA pur. **A)** Spaltungsansatz mit dem hnTTR spezifischen 21mer und dem TTR-Met30-spezifischen Ribozym R1401. Es fand keine Spaltung statt - Kontrollansatz. **B)** Spaltungsansatz mit dem TTR-Met30 spezifischen 21mer und dem Ribozym R1151, das keine Basenkomplementarität zu dem 21mer hat und als Negativkontrolle diente - keine Spaltung. **C)** Spaltungsansatz mit dem TTR-Met30 spezifischen 21mer und dem TTR-Met30 spezifischen Ribozym R1091. **D)** Spaltungsansatz mit dem TTR-Met30 spezifischen 21mer und dem TTR-Met30 spezifischen Ribozym R1402. **E)** Spaltungsansatz mit dem TTR-Met30 spezifischen 21mer und dem TTR-Met30 spezifischen, aber inaktiven Ribozym R1547 - keine Spaltung - Kontrollansatz.

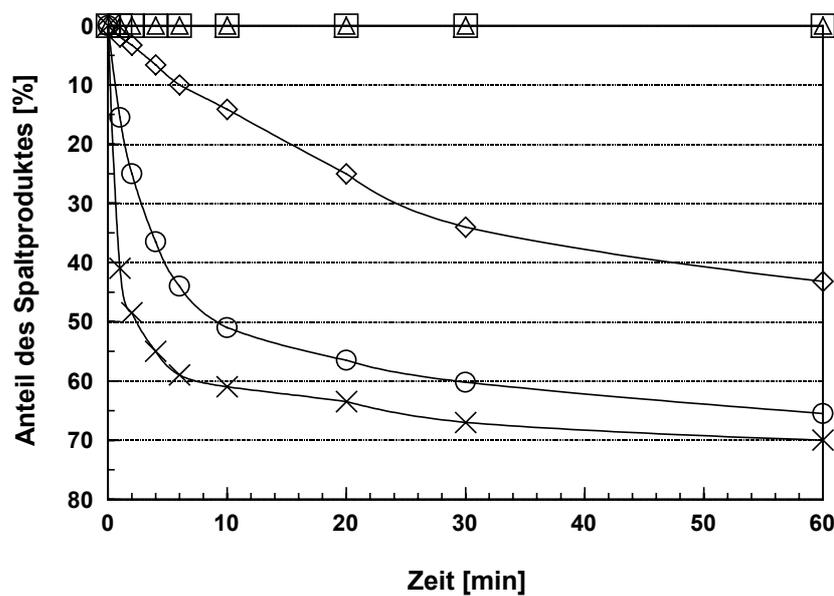
Die ermittelte Spaltungsgeschwindigkeit bzw. Reaktionsrate der Ribozyme, aus den Anfangsteigungen der Spaltkurven (Abbildung 28) abgeleitet, lag bei  $k_{\text{obs}}=0,23 \text{ min}^{-1}$  für R1402,  $k_{\text{obs}}=0,82 \text{ min}^{-1}$  für R1401 und bei  $k_{\text{obs}}=0,023 \text{ min}^{-1}$  für R1091. Durch die hohe Substratkonzentration im Spaltungsansatz war davon auszugehen, dass man sich im Sättigungsbereich befand und somit die Anfangsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  der maximal zu erreichenden Geschwindigkeit der Ribozyme entsprach. So ließen sich die Ribozyme qualitativ durch den Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten bei den Spaltungsexperimenten vergleichen.

Der mathematische Zusammenhang sei hier nur kurz durch die beiden Formeln wieder-

$$\text{gegeben: } v = \frac{d[P]}{dt}, \quad k_{\text{obs}} = \frac{v}{[E]_g},$$

$v$  ist die Reaktionsgeschwindigkeit,  $[P]$  die Produktkonzentration,  $t$  die Zeit und  $[E]_g$  ist die Ribozymkonzentration (Hendry et al., 1997; Hertel et al., 1994).

Die relative Spaltungsrate der Ribozyme betrug im Vergleich 10:9:1 (R1401:R1402:R1091).



**Abbildung 28:** Quantifizierung der Daten der Spaltungsassays aus Abbildung 2 und 3. Symbole: -◇-, Spaltung des TTR-Met30-Substrates mit Ribozym R1091; -○-, Spaltung des TTR-Met30-Substrates mit Ribozym R1402; -×-, Spaltung des TTR-Met30-Substrates mit Ribozym R1401; -□-, Spaltung des hnTTR-Substrates mit Ribozym R1091; -△-, Spaltung des TTR-Met30-Substrates mit Ribozym R1547. R1401 spaltet das TTR-Met30-Substrat schneller als R1402 und R1091. R1091 spaltet das hnTTR-Substrat nicht, ebenso wie das Ribozym R1547 das TTR-Met30-Substrat nicht spaltet.

Ribozym	$k_{\text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
R1401	0,82
R1402	0,23
R1091	0,023

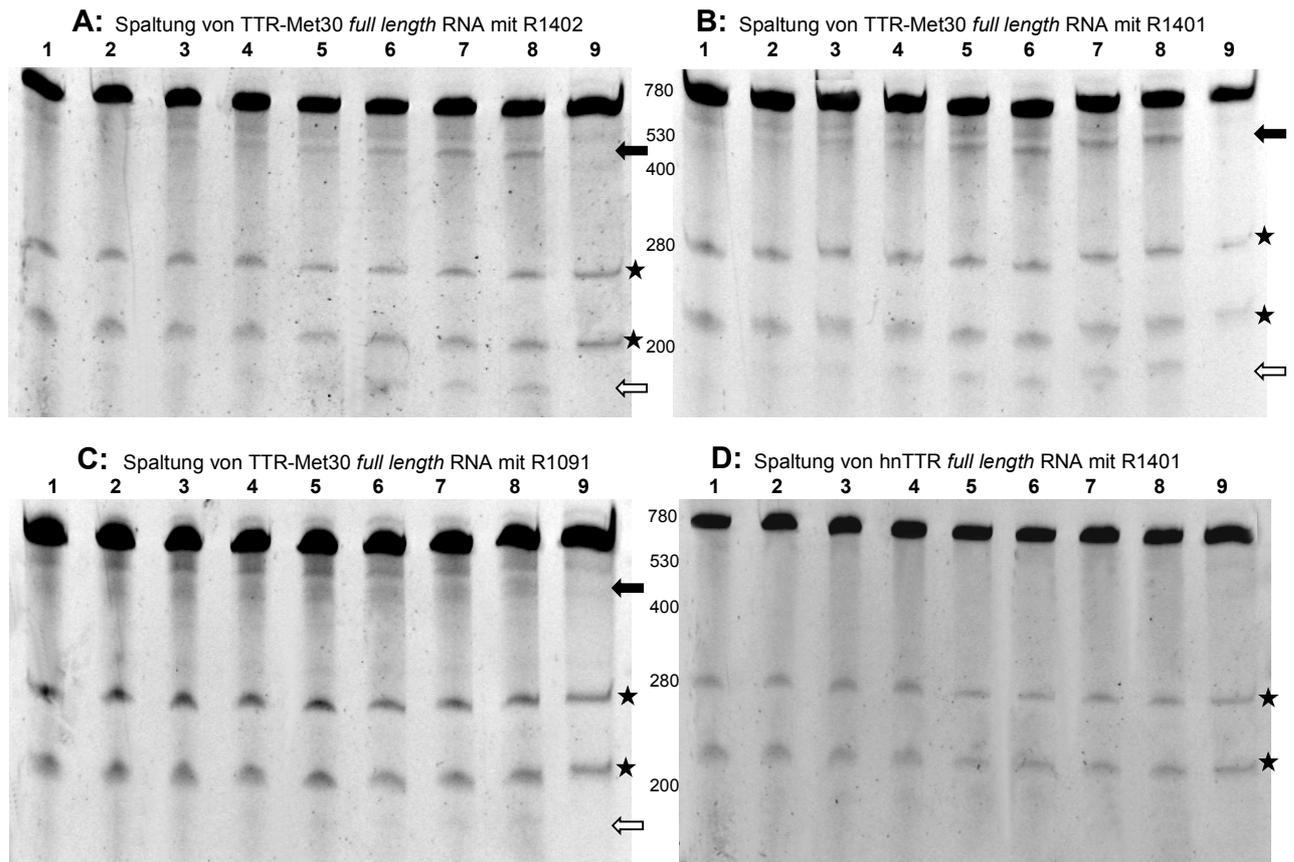
Tabelle 5: Spaltungsgeschwindigkeiten der Ribozyme an kurzen 21mer-Substraten

### 3.3.2 Spaltung von *in vitro* transkribierter *full length* TTR RNA

Zur Überprüfung mussten die Spaltungen der Ribozyme an den kurzen Substraten an der *full length* RNA wiederholt werden. Hierfür wurde über *in vitro* Transkription mit dem MAXIscript Kit von Ambion *full length* RNA aus PCR- und Plasmid-Templates synthetisiert.

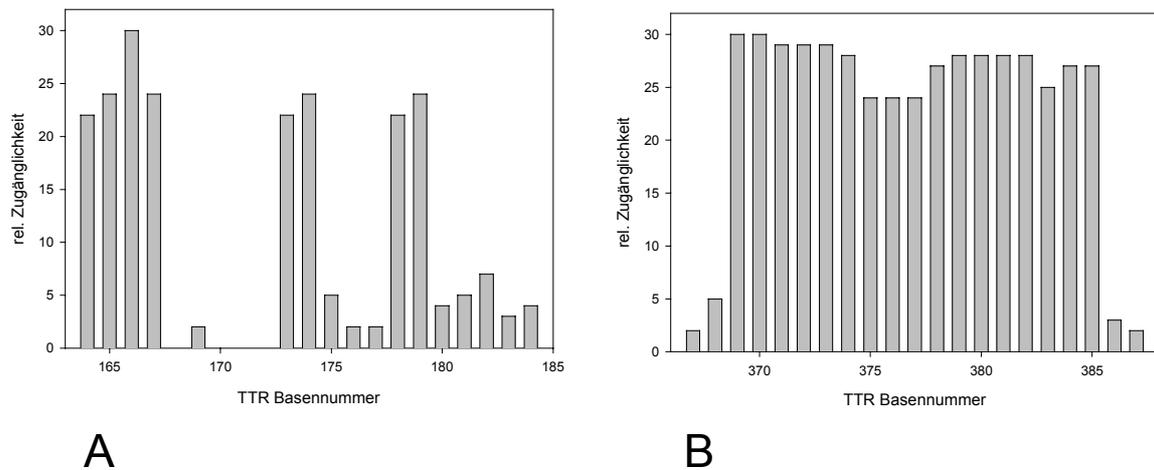
Die 680-Basen-langen TTR-Met30 und hnTTR RNA wurden wie bei der 21mer-Spaltung in kinetischen Spaltungsansätzen mit Ribozymen inkubiert. In Abbildung 29 sind die Scans der Gele zu sehen, auf denen die Proben der Spaltungsexperimente elektrophoretisch aufgespalten wurden. Das größere 3'-Spaltungsfragment ist 495 Basen, das kleinere 5'-Spaltungsfragment 185 Basen lang. Gel A zeigt den Spaltungsansatz von TTR-Met30 RNA mit Ribozym R1402, Gel B den Spaltungsansatz von TTR-Met30 RNA mit R1401 und Gel C den Spaltungsansatz von TTR-Met30 RNA mit R1091. Wie auch schon bei den kurzen Oligomeren ist Ribozym R1401 das Ribozym mit der höchsten Spaltungsrate, gefolgt von R1402 und R1091. Als Kontrolle für die Spezifität der Ribozyme bei *full length* RNA wurde hnTTR RNA mit Ribozym R1401 inkubiert (Gel D). Es fand keine Spaltung statt.

Nach 30 Minuten hatte das Ribozym R1401 7,4% des Substrates, R1402 6,4% und R1091 3,9% gespalten.



**Abbildung 29:** Kinetischer Spaltungsansatz der full length TTR RNA. A) TTR-Met30 full length RNA-Spaltung mit R1402, B) TTR-Met30 full length RNA-Spaltung mit 1401, C) TTR-Met30 full length RNA-Spaltung mit 1091. Die Proben wurden zu folgenden Zeiten genommen:  $t_1=0$  min (Spur 1),  $t_2=1$  min (Spur 2),  $t_3=2$  min (Spur 3),  $t_4=4$  min (Spur 4),  $t_5=6$  min (Spur 5),  $t_6=10$  min (Spur 6),  $t_7=20$  min (Spur 7),  $t_8=30$  min (Spur 8). Auf Spur 9 wurde TTR RNA pur aufgetragen. Das Symbol  $\blacktriangleright$  markiert die Bande mit den 3'-Fragmenten (ca. 495 bp), das Symbol  $\blacktriangleleft$  markiert die 5'-Fragmente (ca. 185 bp). Das  $\star$  Symbol markiert Banden, die Fragmentierungsprodukte der TTR RNA sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Spezifität bei der *full length* Spaltung die gleiche ist wie bei den kurzen 21mer. Die Ribozym-Aktivität ist aber wesentlich geringer als bei den 21meren. Da bekannt ist, dass RNA eine ausgeprägte Sekundärstruktur haben kann, wurde diese mit dem Computerprogramm MFold, das die RNA-Struktur nach einem Algorithmus von M. Zuker (Zuker, 1989b) berechnet, erstellt. Es zeigte sich, dass das TTR-Met30-spezifische Triplett in einer stark gepackten Region der RNA liegt. Deshalb wurde nach einer anderen Spaltungssequenz gesucht. Das NCH Triplett ACA an Position 374 eignete sich der Theorie nach als Schnittstelle für ein Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozym. Hier sollte die RNA weniger stark gepackt sein und die Arme des Ribozyms besser komplementär binden können. Die Zugänglichkeit wurde an beiden Stellen mittels MFold berechnet und in einem Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 30).



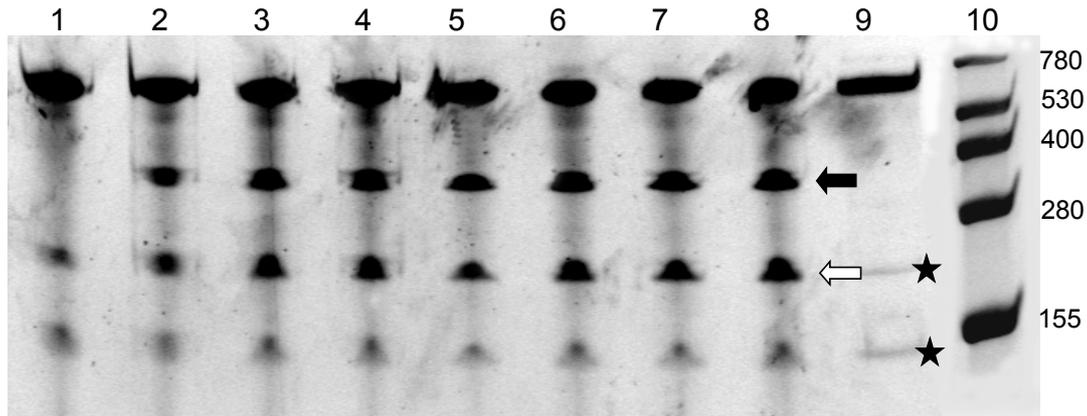
**Abbildung 30:** Relative Zugänglichkeit der TTR RNA. Berechnung mit dem Programm MFold. A: Darstellung der Zugänglichkeit an der Spaltsequenz Base Nummer 173 CCA. B: Darstellung der Zugänglichkeit an der Spaltsequenz Base Nummer 374 ACA.

Die Abbildungen zeigen, dass das Triplet an Position 374 in einer Region der TTR-Sequenz mit relativ hoher Zugänglichkeit lag und dass die TTR-Met30-spezifische Sequenz CCA in einer Region lag, die kaum Zugänglichkeit aufwies. Ein entsprechendes Ribozym MR1, das an Position 374 spalten sollte, wurde im EMBL in Heidelberg synthetisiert (Abbildung 31). Mit MR1 war die Spaltung von TTR-Met30 und hnTTR möglich. Das synthetisierte Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozym MR1 (Tabelle 3 und Abbildung 31) wurde wie oben beschrieben zur Spaltung von *full length* TTR RNA in einem kinetischen Spaltungsansatz eingesetzt. Schon nach 2 Minuten war ein deutliches Spaltungsfragment auf dem Gel zu erkennen (Abbildung 32). Die Auswertung des Gels ergab, dass nach 30 Minuten 35% der *full length* RNA gespalten worden waren, mehr als doppelt soviel als mit dem schnellsten Ribozym R1401 für die Schnittstelle an Position 173.

5'CGUUGGCCugaUgAGGCCGUGAGGCCgAAiUGAAUAC'3

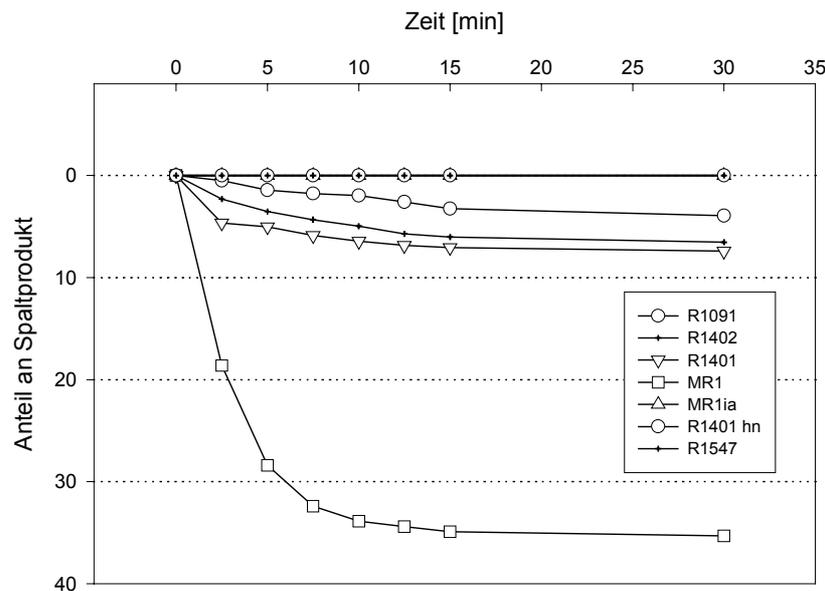
Großbuchstaben: 2'-O-allyl modifiziert  
 Kleinbuchstaben: Ribonukleotide (Ribobasen)  
 unterstrichen: 2'Amino-Uridin  
 i: Ribo-Inosin

**Abbildung 31:** Sequenz des Inosin Hammerhead-Ribozyms MR1, das nach dem Triplet ACA Position 374 der TTR RNA schneidet.



**Abbildung 32:** Kinetischer Spaltungsansatz der full length TTR RNA mit Ribozym MR1. Die Proben wurden zu folgenden Zeiten genommen:  $t_1=0$  min (Spur 1),  $t_2=1$  min (Spur 2),  $t_3=2$  min (Spur 3),  $t_4=4$  min (Spur 4),  $t_5=6$  min (Spur 5),  $t_6=10$  min (Spur 6),  $t_7=20$  min (Spur 7),  $t_8=30$  min (Spur 8). Auf Spur 9 wurde TTR RNA pur aufgetragen. Spur 10 zeigt einen Molekulargewichtsstandard. Das Symbol ➤ markiert die Bande mit den 3'-Fragmenten, das Symbol ⇐ markiert die 5'-Fragmente. Das Symbol ★ markiert Banden, die Fragmentierungsprodukte der TTR RNA sind. Das 5'-Fragment der TTR-Met30-MR1-Spaltung ist auf gleicher Höhe wie das größere TTR Degradationsprodukt.

Die Ergebnisse der Auswertung aller Gele wurden in einer Grafik zusammengefasst (Abbildung 33). Wie an den Banden auf dem Gel zu erkennen, spaltet MR1 die *full length* TTR RNA am schnellsten und effektivsten. Nach 30 Minuten sind 35% Substrat gespalten, das Ribozym hat eine Geschwindigkeit von  $k_{\text{obs}}=0,2 \text{ min}^{-1}$ . Die Ribozyme R1401, R1402 und R1091, die alle nur TTR-Met30 spalten können, sind entschieden langsamer als MR1. Die Geschwindigkeiten dieser drei Ribozyme bei der *full length* Spaltung betragen  $k_{\text{obs}}=0,017 \text{ min}^{-1}$  für R1401,  $k_{\text{obs}}=0,008 \text{ min}^{-1}$  für R1402,  $k_{\text{obs}}=0,003 \text{ min}^{-1}$  für R1091. Somit haben die vier spaltenden Ribozyme ein Spaltungsverhältnis von 100:8,5:4:1,5 (MR1:R1401:R1402:R1091). Hierbei ist zu beachten, dass MR1 an einer anderen Stelle spaltet als die anderen Ribozyme. Die TTR-Met30-spezifischen Hammerhead-Ribozyme haben ein Verhältnis von 100:47:18 (R1401:R1402:R1091).



**Abbildung 33:** Grafische Darstellung der kinetischen Spaltungen der full length TTR RNA.

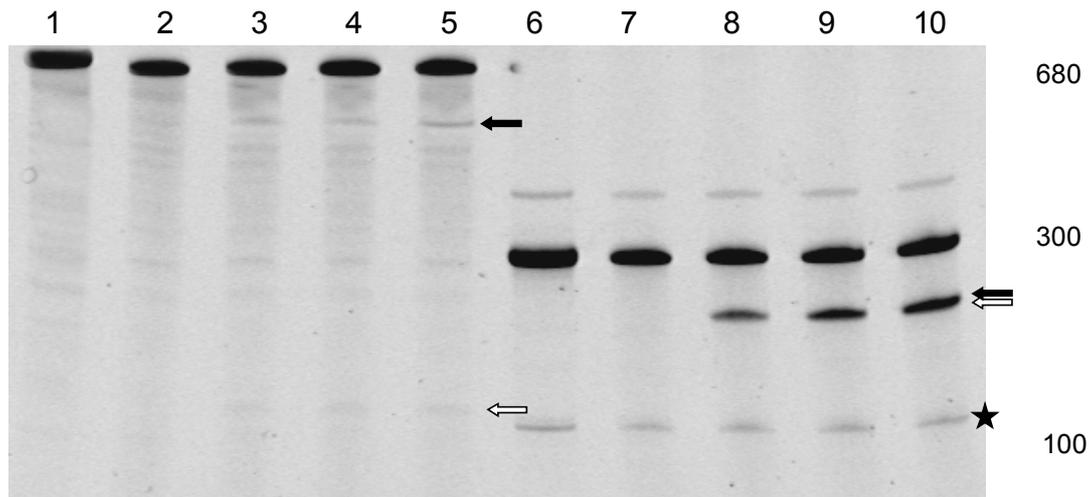
Ribozym	$k_{\text{obs}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	Target (Basennummer)
MR1	0,2	374 (hnTTR / TTR-Met30)
R1401	0,017	173 (TTR-Met30)
R1402	0,008	173 (TTR-Met30)
R1091	0,003	173 (TTR-Met30)

**Tabelle 6:** Spaltungsgeschwindigkeiten der Ribozyme an full length Substraten.

### 3.3.3 Spaltung einer TTR 300mer RNA - Spaltungsvergleich der verschiedenen langen TTR RNA-Substrate (21mer - 300mer - full length)

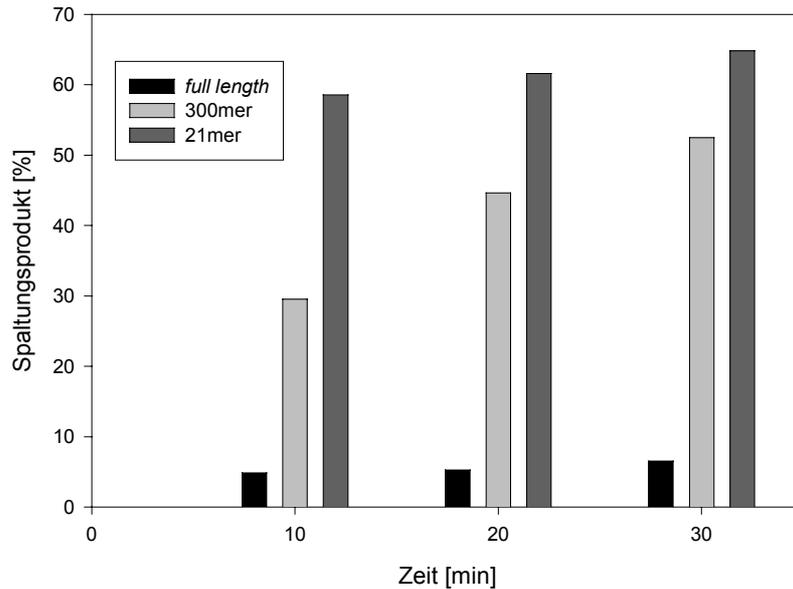
Um die Vermutung, dass die dreidimensionale Faltung einen Einfluss auf die Spaltungsaktivität der TTR-Met30-spezifischen Ribozyme hat, zu überprüfen, wurde ein weiterer Spaltungsansatz durchgeführt. Über *in vitro* Transkription wurden 300-Basen-lange RNA-Oligoribonukleotide (300mer) synthetisiert, die das TTR-Met30-spezifische Triplet enthielten. Dazu wurde vorher über PCR mit zwei speziellen Primeren aus der TTR cDNA ein 300-Basen-langes Substrat synthetisiert, in dem die TTR-Met30-Mutation enthalten war (vgl. 2.2.7.6).

Mit dem 300mer wurde wie mit den 21meren und der *full length* RNA eine kinetische Ribozymsspaltung durchgeführt. Parallel wurde so eine Spaltung von *full length* TTR-Met30 RNA mit R1401 und von 300mer mit R1401 durchgeführt und Proben nach 0, 10, 20 und 30 Minuten auf ein PA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und gescannt (Abbildung 34). Die Bande mit den Fragmenten tritt bei der Spaltung des 300mer viel eher und deutlicher auf als beim *full length* Ansatz.



**Abbildung 34:** Kinetische Spaltung der *full length* TTR-Met30 RNA mit Ribozym R1401 (Spur 1-5) und der 300mer TTR-Met30 RNA mit R1401 (Spur 6-10). Die Proben wurden zu folgenden Zeiten genommen:  $t=0$  min (Spur 1/6),  $t=10$  min (Spur 2/7),  $t=20$  min (Spur 3/8),  $t=30$  min (Spur 4/9). Das Symbol ➔ markiert die Bande mit den 3'-Fragmenten, das Symbol ➞ markiert die 5'-Fragmente. Das Symbol ★ markiert Banden, die Fragmentierungsprodukte der TTR RNA sind.

Um das Spaltvermögen der Ribozyme an den drei verschiedenen Substraten zu vergleichen, wurden die Ergebnisse der einzelnen Spaltungen nach 0, 10, 20 und 30 Minuten in einem Säulendiagramm direkt nebeneinander aufgetragen (Abbildung 35). Während sich der prozentuale Anteil an Spaltungsprodukten bei der *full length* Spaltung wenig verändert und nach 30 Minuten nur 6,5% erreicht, steigt der Anteil an Spaltungsprodukten beim 300mer von 29,7% nach 10 Minuten auf 52% nach 30 Minuten. Die Spaltung des 21mer erfolgt am schnellsten. Nach 10 Minuten sind bereits 58% des Substrates gespalten und nach 30 Minuten 64%.

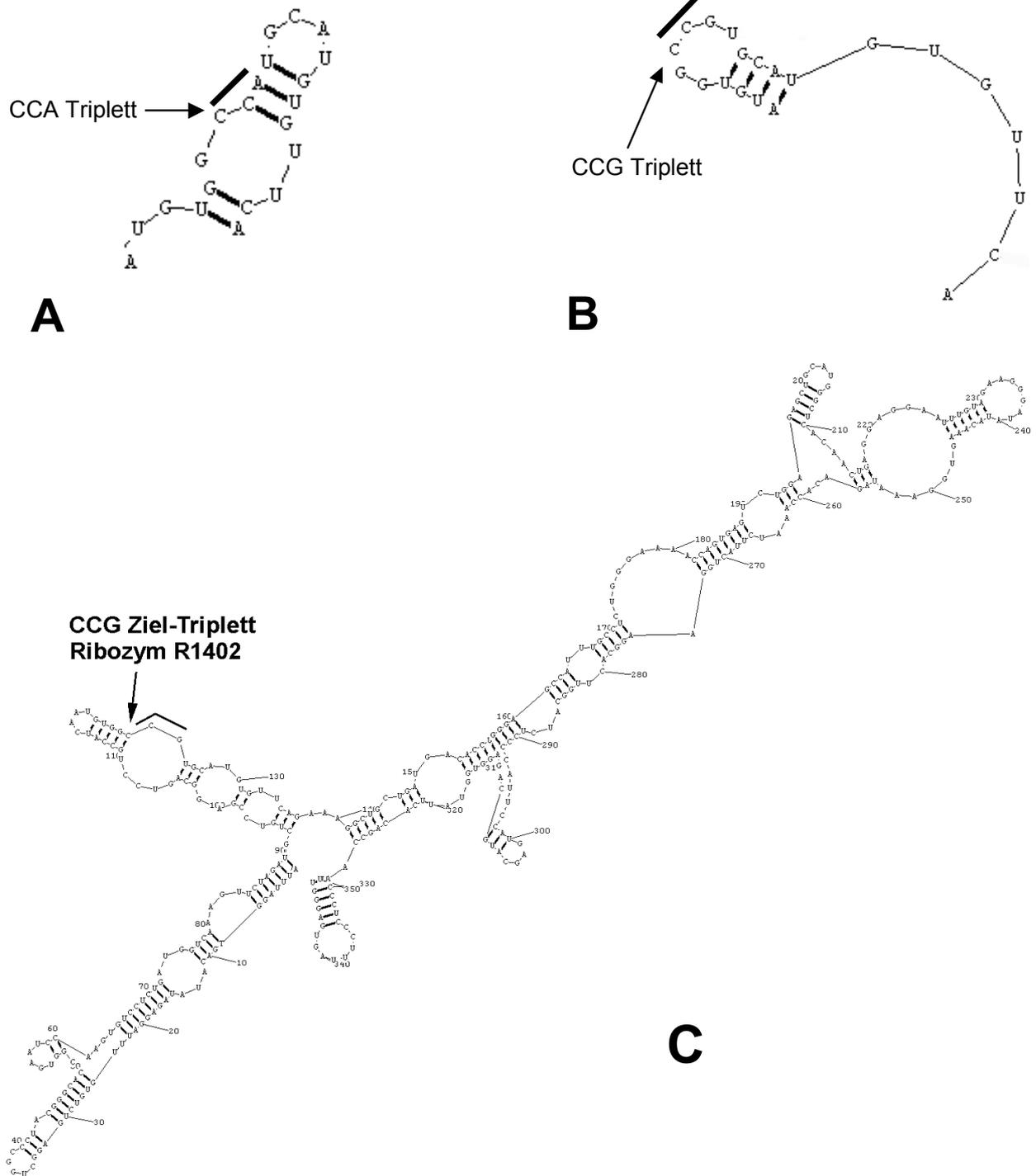


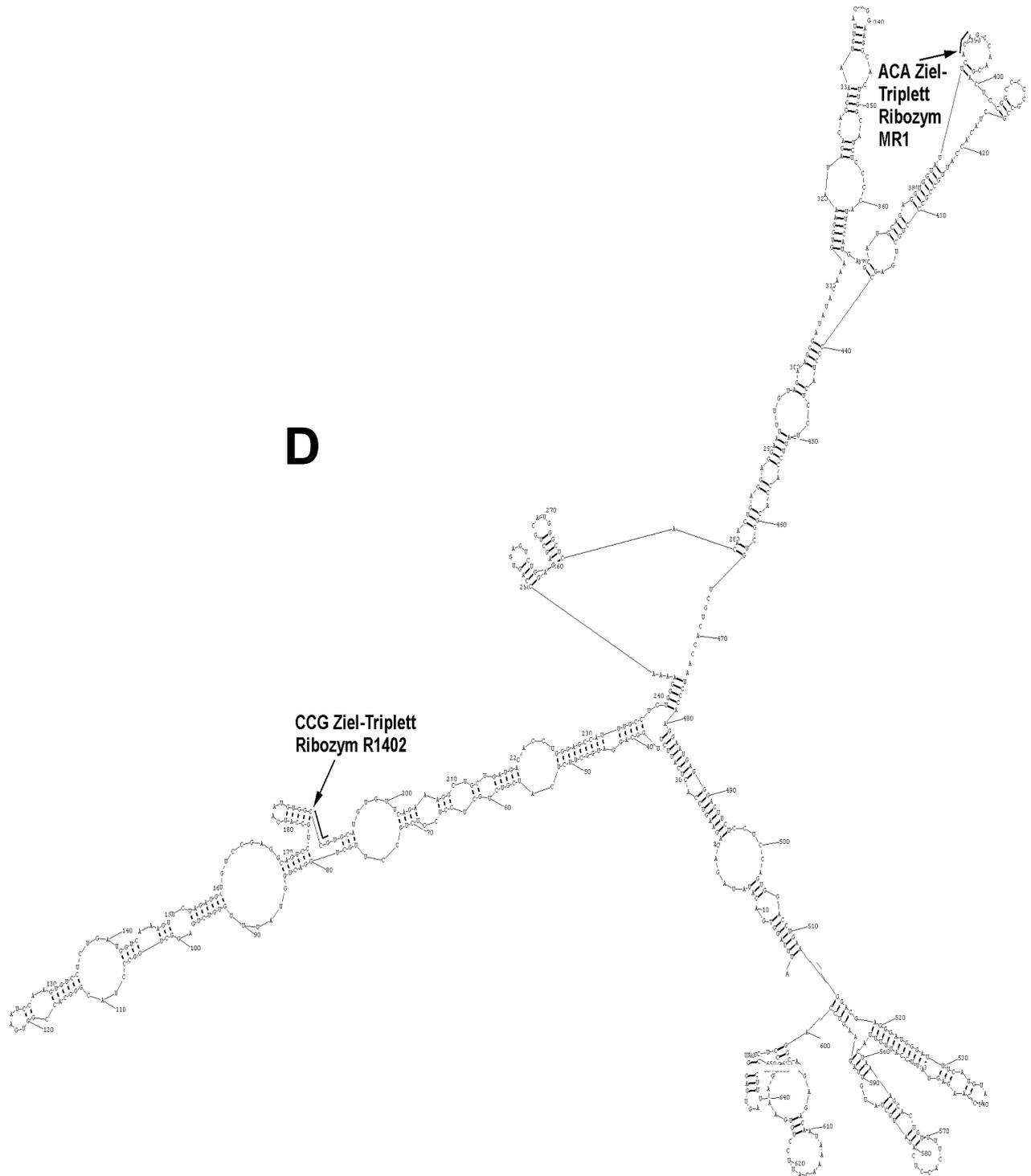
**Abbildung 35:** Vergleichende Spaltung eines 21mer, eines 300mer und der full length TTR-Met30 RNA durch das Ribozym R1401. Es wurde aus jedem Ansatz zu den Zeitpunkten  $t=0$  (vor der Zugabe von  $MgCl_2$ ),  $t=10$  min,  $t=20$  min und  $t=30$  min eine Probe entnommen. Bei dem 21mer und 300mer kam es nach 30 Minuten zu einer Spaltung des Produktes von 64% bzw. 52%, bei der full length TTR RNA nur zu 7%.

### 3.3.4 Berechnung der RNA-Sekundärstruktur

Mit dem Programm RNAstruktura 3.21 wurden die Sekundärstrukturen der eingesetzten RNA-Substrate berechnet (Abbildung 36). Dieses Foldprogramm basiert auf der UNIX Version des Programms MFold von Zuker (Zuker, 1989b). Wichtig für die Spaltung durch Ribozyme ist die Zugänglichkeit der Zielsequenz auf der RNA. Liegt die Sequenz, an die das Ribozym hybridisieren soll, in einem sterisch schwer zugänglichen Bereich des gefalteten RNA-Komplexes, dann kann das eine reduzierte Spaltungsgeschwindigkeit des Ribozyms zur Folge haben. Die Ziel-Triplets, hinter denen die Ribozyme spalten sollten, lagen alle auf einzelsträngigen RNA-Bereichen (Abbildung 36). Das Triplet für Ribozym MR1 lag in einer *Loop*-Region (Abbildung 36 D), die eine gute Spaltung erwarten ließ. Der Unterschied zwischen der Lage des CCG-Triplets für das Ribozym R1402 in der *full length* TTR-Met30 RNA-Sequenz und der 300mer-TTR-Met30 RNA-Sequenz ist, dass das Triplet beim 300mer in einem peripheren einzelsträngigen, *loop*-ähnlichen Sequenzabschnitt liegt und in der *full length* TTR RNA eine zentrale, von mehr helikalen Bereichen umgebene Lage hat. Die komplexere Sekundärstruktur

könnte einen Einfluss auf die Spaltungseffizienz der Ribozyme haben. Bei einer Abnahme der Länge der RNA-Sequenz wie hier von der *full length* TTR RNA (Abbildung 36 D) über die 300mer TTR RNA (Abbildung 36 C) zu den 21mer Oligoribonukleotiden (Abbildung 36 A) kommt es zu einer besseren räumlichen Zugänglichkeit der Ribozyme an die Zielsequenz.





**Abbildung 36:** 2D-Abbildungen von RNA. Die Strukturen wurden mit dem Programm RNAstructure 3.21 (<http://rna.chem.rochester.edu/RNAstructure.html>) berechnet, es ist die PC-Version des UNIX Programms Mfold. **A:** 21mer TTR-Met30; **B:** 21mer hnTTR; **C:** TTR-Met30-300mer und **D:** TTR-Met30 - full length 657 Basen.

### 3.4 Ribozyme - in Zellkultur

Nach den erfolgreichen *in vitro* Spaltungen konnten die Ribozyme im Zellkultorexperiment eingesetzt werden.

#### 3.4.1 Herabregulation der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand bei HepG2-Zellen

Die humane Leberzelllinie HepG2 synthetisiert Transthyretin (hnTTR-Wildtyp) (Bellovino et al., 1996) und eignet sich deshalb sehr gut als Positivkontrolle für mRNA-Spaltungsexperimente mit Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozymen.

##### 3.4.1.1 Nephelometrische Bestimmung der TTR-Konzentration

Vor den Spaltungsexperimenten wurde über die nephelometrische Bestimmung die TTR-Konzentration der HepG2-Zellen ermittelt. Das reine Kulturmedium DMEM - ohne Antibiotikum und Serum - enthielt kein TTR (Tabelle 7). Die Konzentration von Transthyretin im Überstand von HepG2-Zellen nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C betrug 1,5 mg/l. Das Medium wurde, nachdem es abgenommen war, 1:5 aufkonzentriert.

Als Negativkontrolle wurde die Konzentration von TTR im DMEM Kulturmedium bestimmt. Sie betrug erwartungsgemäß 0 mg/l. Alle Werte bezogen sich auf den konzentrierten Zellkulturüberstand. Für die Zellkultur-Spaltungsansätze wurde das Ribozym MR1 eingesetzt, das hnTTR spaltet. Auf die ersten mit Ribozymen behandelten Zellen wurde pro Schale 4 µg Ribozym MR1 gegeben, inkubiert und der Überstand dann wie oben beschrieben untersucht. Die nächsten Zellen wurden mit der gleichen Menge MR1 inkubiert, wobei das Ribozym durch das Transfektionsreagenz Effecten verpackt war. Die letzten Zellen wurden mit der doppelten Menge Ribozym, 8 µg mit Effecten verpackt, inkubiert. Als Kontrolle wurden noch Zellen nur mit entsprechender Menge Transfektionsreagenz Effecten inkubiert. Die nephelometrischen Ergebnisse zeigten, dass die Konzentration von TTR durch Ribozymgabe zum Zellkulturmedium beeinflusst wurde (Tabelle 7). So wurde die Konzentration durch den Zusatz von reinen Ribozymen von 1,5 mg/l auf 1,2 mg/l herabreguliert. Bei gleichzeitigem Einsatz eines Transfektionsreagenz wurden die Ribozyme noch besser in die Zellen aufgenommen und die TTR-Konzentration konnte bei gleicher Ribozymmenge auf 1,1 mg/l gesenkt werden. Eine

Verdoppelung der Ribozymkonzentration bei angepasster Transportermenge bewirkte eine Senkung der TTR-Menge auf 1,0 mg/l.

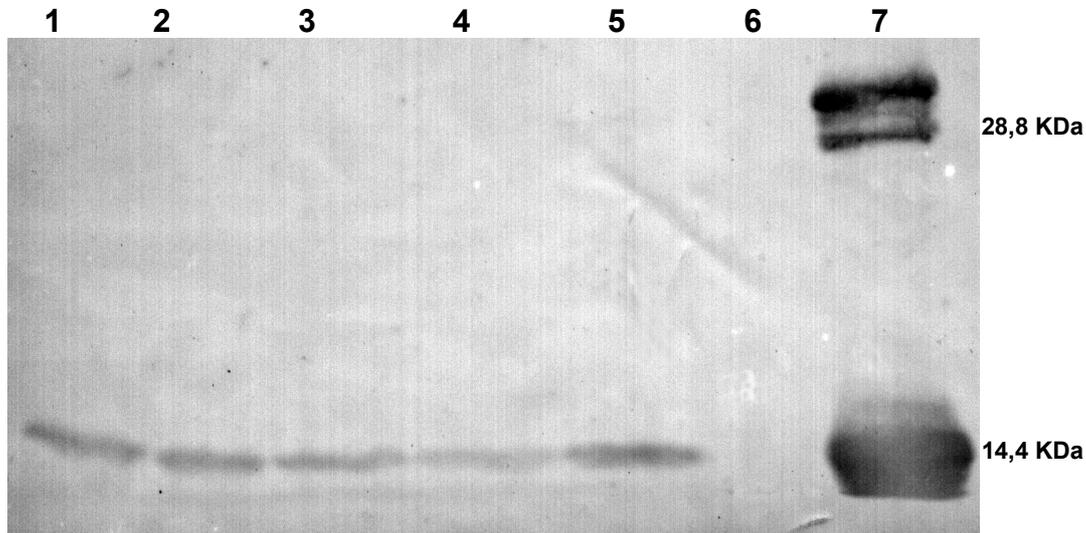
	Zellen	Ribozym / Menge	TTR-Konzentration
1	nur DMEM	-	0 mg/l
2	HepG2	-	1,5 mg/l
3	HepG2	MR1; 4 µg	1,2 mg/l
4	HepG2	MR1; 4 µg + Effecten	1,1 mg/l
5	HepG2	MR1; 8 µg + Effecten	1,0 mg/l
6	HepG2	Effecten	1,5 mg/l

**Tabelle 7:** TTR-Konzentration der HepG2-Zellkulturüberstände nach Ribozymspaltung. Die Überstände sind 5fach konzentriert.

Diese Ergebnisse waren aber nur qualitativ auswertbar. Die Messung der TTR-Konzentration am Nephelometer ist bei sehr geringen Proteinkonzentrationen messtechnisch bedingt nicht fein genug. Somit waren noch keine quantitativen Aussagen über den Einsatz durch Ribozyme möglich.

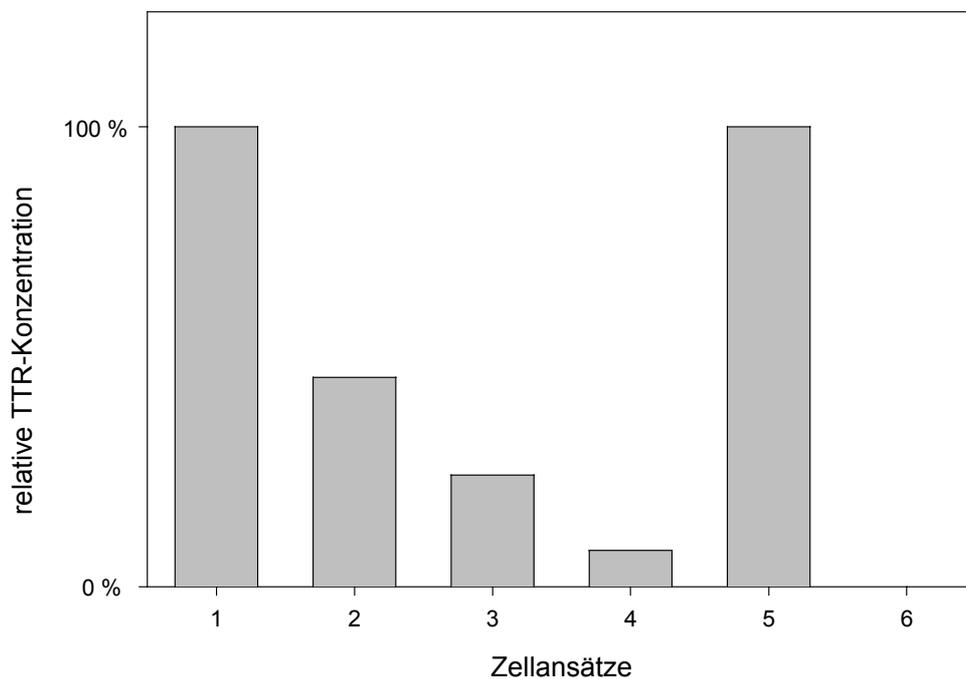
### 3.4.1.2 TTR-Nachweis über Westernblot

Zum qualitativen Nachweis der Ribozymwirkung auf die TTR-Konzentration wurde ein Westernblot nach Immunpräzipitation durchgeführt.



**Abbildung 37:** Westernblot von HepG2-Zellkulturüberständen. Die unteren Banden entsprechen dem TTR-Monomer (14,4 KiloDalton (kDa)). Die beiden oberen Banden auf Spur 7 sind der nicht vollständig dissoziierte TTR-Tetramer. Auf **Spur 1** wurde der Überstand von Zellen ohne Ribozymgabe aufgetragen. **Spur 2** zeigt den Überstand von Zellen, die mit 4  $\mu$ l Ribozym MR1 48 Stunden inkubiert wurden. Auf **Spur 3** wurde der Überstand von HepG2 Zellen, die 48 Stunden mit 4  $\mu$ l MR1 und dem Transfektionsreagenz Effecten inkubiert wurden, aufgetragen. Auf **Spur 4** ist der Überstand von Zellen, die mit 8  $\mu$ l MR1 und entsprechender Menge Effecten inkubiert wurden, aufgetragen. **Spur 5** zeigt das Ergebnis des Ansatzes nach der Zugabe von Effecten ohne Ribozym. Auf **Spur 6** wurde nur Medium DMEM aufgetragen und auf **Spur 7** 2  $\mu$ g reines humanes TTR.

Die Intensität der Banden wurde nach dem Scannen des Blots mit der Analysesoftware ausgewertet (Abbildung 38). Die Ergebnisse der nephelometrischen Messung wurden bestätigt. Eine Zugabe von MR1 zum Kulturmedium bewirkte ein Absinken der TTR-Konzentration. Durch Zugabe von 4  $\mu$ g MR1 kam es zu einem Absinken der Konzentration auf 45,5%. Durch Einsatz eines Transportsystems mit 4  $\mu$ g MR1 konnte die TTR-Konzentration auf 24,3% gesenkt werden und schließlich bei Verdoppelung der Ribozymkonzentration mit Transporter auf 7,9%.



**Abbildung 38:** Säulendiagramm der Ergebnisse aus Abbildung 37. Die Zugabe von 4  $\mu$ l Ribozym R1402 zum Zellmedium führte innerhalb von 48 Stunden zu einer Senkung der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand um mehr als 50%. Durch das Transfektionsreagenz Effecten ließ sich die TTR-Konzentration weiter herabsetzen und durch eine Verdoppelung der Ribozymkonzentration auf 8% herabregulieren.

### 3.4.2 Herabregulation der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand bei stabil transfizierten TTR-Met30 exprimierenden 293-Zellen

#### 3.4.2.1 Nephelometrische Bestimmung der TTR-Met30-Konzentration

Für die spezifische TTR-Met30-Spaltung wurde eine Zelllinie benötigt, die stabil TTR-Met30 exprimiert. 293-Zellen wurden ausgewählt, da sie als Nierenzellen kein TTR synthetisieren und schnell transfiziert werden konnten. Durch den Einsatz des Retrovirusvektors pLXINtr (siehe 2.1.12.1) wurden 293-Zellen transfiziert. Die Zugabe von G418 ermöglichte nur den Zellen, die das Retrovirusgenom mit der IRES Sequenz stabil integriert und somit eine Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum hatten, zu überleben. Positive Zellklone wurden isoliert und hochgezogen. Anschließend wurde die TTR-Met30-Konzentration nephelometrisch bestimmt. Der polyklonale Antikörper für den nephelometrischen Nachweis targetierte auch die TTR-Mutante. So konnte gezeigt

werden, dass transfizierte 293-TTR-Met30-Zellen TTR-Met30 synthetisieren (Tabelle 8). Wildtyp 293-Zellen exprimieren hingegen kein TTR (vgl. Abbildung 39 Spur 9).

Für die Spaltungsansätze wurde wie bei den HepG2-Spaltungsansätzen vorgegangen. Als Ribozym zur Spaltung von TTR-Met30 wurde das Ribozym R1402 mit der Amino-Uridin-Modifikation an Position 4 eingesetzt. Durch die Modifikation an dieser Stelle war das Ribozym im Zellkulturmedium stabil. Eine Zugabe von 5 µl R1402 bewirkte nach 48 Stunden ein Absinken der TTR-Met30-Konzentration im 1:5 aufkonzentrierten Zellkulturüberstand auf 1,2 mg/l. Durch den Einsatz von Effecten konnte die Konzentration weiter verringert werden (1,1 mg/l), ebenso durch die Verdoppelung der Ribozymkonzentration (1,0 mg/l). Der Einsatz eines anderen Transfektionsmittels, DOTAP, bewirkte ebenfalls ein Absinken der TTR-Met30-Konzentration auf 1,3 mg/l bzw. bei der Verdoppelung der Ribozymkonzentration auf 1,0 mg/l. Die Zugabe von Puffer oder DOTAP allein bewirkte keine Veränderung der TTR-Met30-Konzentration.

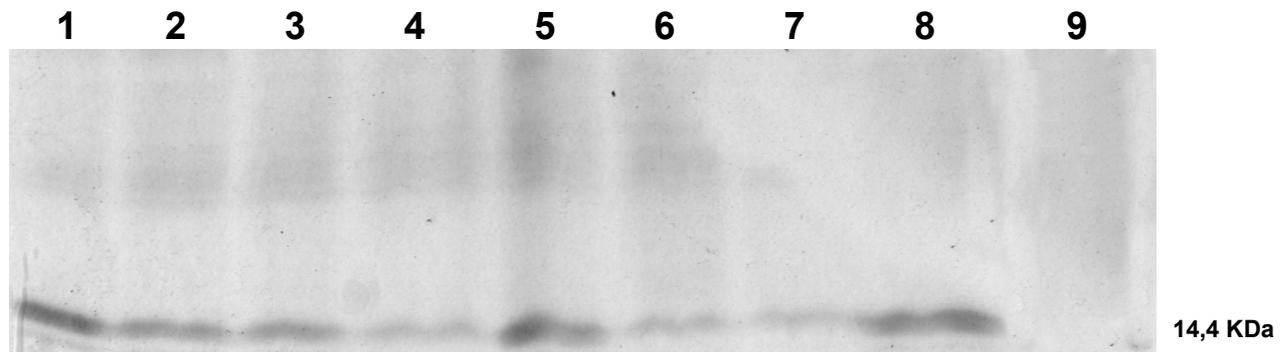
	Zellen	Ribozym / Menge	TTR-Met30-Konzentration
1	293-Met30	-	1,5 mg/l
2	293-Met30	R1402; 5 µl	1,2 mg/l
3	293-Met30	R1402; 5 µl + Effecten	1,1 mg/l
4	293-Met30	R1402; 10 µl + Effecten	1,0 mg/l
5	293-Met30	-; + Puffer	1,5 mg/l
6	293-Met30	R1402; 5µl + DOTAP	1,5 mg/l
7	293-Met30	R1402; 10µl + DOTAP	1,3 mg/l
8	293-Met30	-; + DOTAP	1,5 mg/l
9	293-WT	-	0 mg/l

**Tabelle 8:** TTR-Konzentration der Zellkulturüberstände nach Ribozymspaltung im 293-TTR-Met30-Zellkultorexperiment. Die Überstände sind 5fach konzentriert. 293-TTR-Met30-Zellen sind stabil transfiziert und exprimieren TTR-Met30.

Diese Ergebnisse waren, wie oben schon erwähnt, nur qualitativ auswertbar.

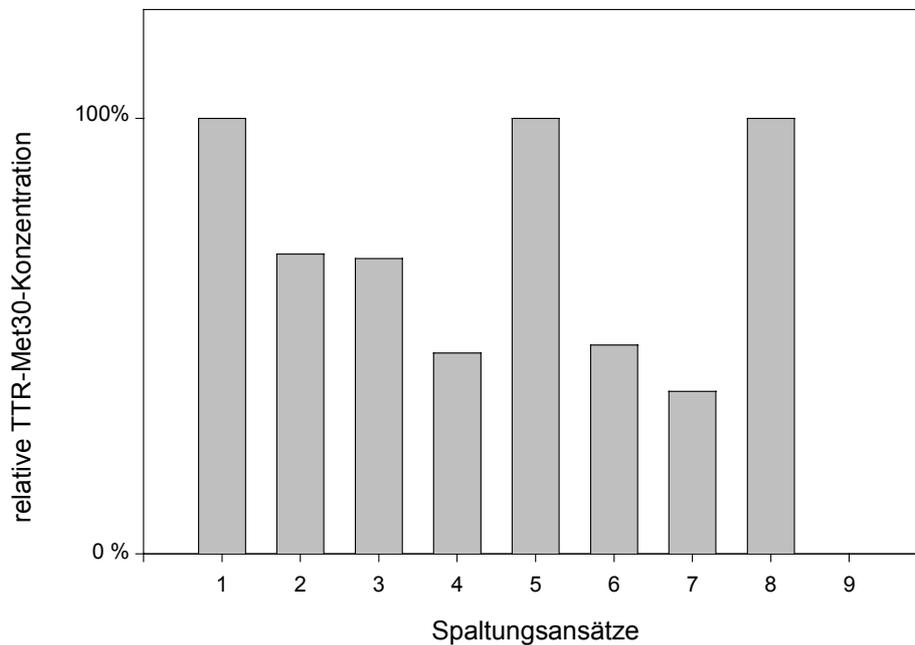
### 3.4.2.2 TTR-Nachweis über Westernblot

Mit einem Westernblot konnten die Ergebnisse quantifiziert werden (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Westernblot von stabil transfizierten 293-TTR-Met30-Zellen-Zellkulturüberständen. **Spur 1** = 293-Zellen ohne Ribozym; **Spur 2** = 293-Zellen nach Zugabe von 5  $\mu$ l Ribozym R1402 und 48 Stunden Inkubation; **Spur 3** = 293-Zellen nach Zugabe von 5  $\mu$ l Ribozym R1402 mit Effecten und 48 Stunden Inkubation; **Spur 4** = 293-Zellen nach Zugabe von 10  $\mu$ l Ribozym R1402 mit Effecten und 48 Stunden Inkubation; **Spur 5** = 293-Zellen nach 48 Stunden Inkubation, nur Effectenzugabe; **Spur 6** = 293-Zellen nach Zugabe von 5  $\mu$ l Ribozym R1402 mit DOTAP und 48 Stunden Inkubation; **Spur 7** = 293-Zellen nach Zugabe von 10  $\mu$ l Ribozym R1402 mit DOTAP und 48 Stunden Inkubation; **Spur 8** = 293-Zellen nach 48 Stunden Inkubation nur mit zusätzlichem DOTAP-Transfektionspuffer und **Spur 9** = Wildtyp 293-Zellen - kein TTR nachweisbar.

Die Auswertung ergab, dass die TTR-Met30-Konzentration durch die Zugabe von 5  $\mu$ l R1402 auf 68,8% herabreguliert werden konnte (Abbildung 40). Durch den Einsatz von Effecten für das Ribozym konnte eine minimale Steigerung der Konzentrationsabsenkung auf 67,8% erreicht werden. Durch die Verdoppelung der Ribozymkonzentration mit Transportsystem wurde das TTR-Met30-Niveau auf 46,1% gesenkt. Mit DOTAP als Ribozymtransporter wurde bei 5  $\mu$ l R1402 die TTR-Met30-Konzentration auf 47,9% und mit doppelter Ribozymkonzentration (plus Transporter) auf 37,3% gesenkt.



**Abbildung 40:** Säulendiagramm der Ergebnisse aus Abbildung 39.

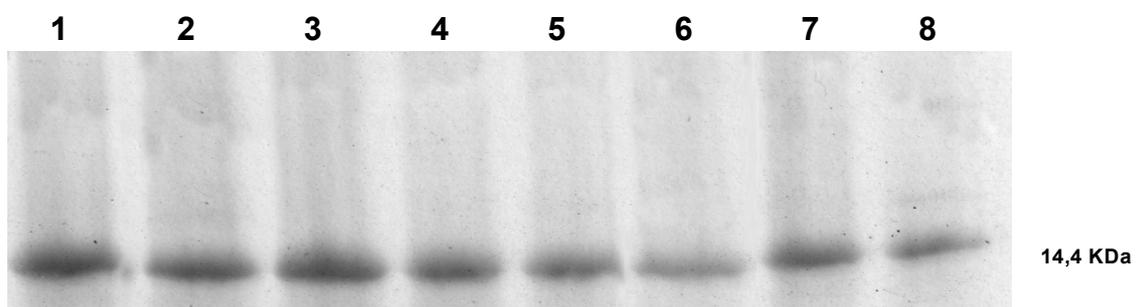
Die entsprechenden Experimente wurden auch mit hnTTR stabil transfizierten 293-Zellen durchgeführt. Die 293-hnTTR-Zellen waren wie die 293-TTR-Met30-Zellen mit dem Retrovirusvektor pLXINtr (human normal) transfiziert worden. Die stabile Expression wurde durch nephelometrische TTR-Konzentrationsbestimmung im 1:5 konzentrierten Zellkulturüberstand gemessen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass transformierte im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen TTR synthetisieren (Tabelle 9). Ein Einsatz des Ribozyms MR1, das hnTTR spaltet, bewirkte ein Absinken der TTR-Konzentration, das durch gleichzeitigen Einsatz eines Nukleinsäuretransportsystems noch erhöht werden konnte. Durch den Einsatz von 2 µl MR1 mit DOTAP konnte ein Absinken der hnTTR-Konzentration auf 1,2 mg/l bewirkt werden. Wurde Effect eingesetzt, konnte bei der gleichen Ribozymmenge wie beim DOTAP-Ansatz ein Absinken der hnTTR-Konzentration auf 1,3 mg/l erreicht werden. Wurde die Ribozymmenge auf 3,5 µl bzw. 5 µl erhöht konnte ein weitere Absenkung der hnTTR-Konzentration auf 1,2 mg/l bzw. 1,0 mg/l erreicht werden. Bei der reinen Ribozymgabe ohne Transfektionsystem konnte ein Absinken des hnTTR-Wertes auf 1,3 mg/l erreicht werden. Bei den Negativkontrollen blieb die hnTTR-Konzentration unverändert.

	Zellen	Ribozym / Menge	hnTTR-Konzentration
1	293-hn	-	1,5 mg/l
2	293-hn	MR1; 2 $\mu$ l + DOTAP	1,2 mg/l
3	293-hn	-; + Effecten	1,5 mg/l
4	293-hn	MR1; 2 $\mu$ l + Effecten	1,3 mg/l
5	293-hn	MR1; 3,5 $\mu$ l + Effecten	1,2 mg/l
6	293-hn	MR1; 5 $\mu$ l + Effecten	1,0 mg/l
7	293-hn	-; + Puffer	1,4 mg/l
8	293-hn	MR1; 2 $\mu$ l	1,3 mg/l

**Tabelle 9:** TTR-Konzentration der Zellkulturüberstände nach Ribozymspaltung im 293-hnTTR-Zellkultorexperiment. Überstände sind 5fach konzentriert. 293-hnTTR-Zellen sind stabil transfiziert und exprimieren hnTTR.

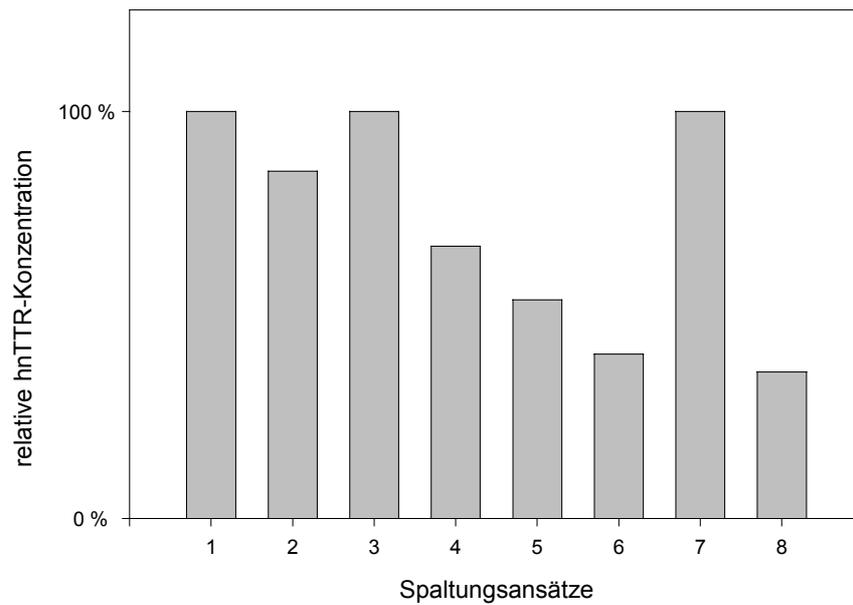
Die quantitative Auswertung konnte wieder nur nach einem Westernblot erfolgen (Abbildung 41). Die Ansätze im Westernblot waren zu den nephelometrischen verändert.

Die Auswertung der Banden ergab, dass durch den Einsatz von 5  $\mu$ l R1092 die Konzentration von TTR auf 86% herabreguliert werden konnte. Durch den Einsatz von 2  $\mu$ l, 3,5  $\mu$ l und 5  $\mu$ l MR1 mit Transporter konnte die TTR-Konzentration auf 66,9%, 53,7% sowie 40,4% gesenkt werden. Eine Zugabe von 5  $\mu$ l MR1 ins Zellkultumedium ohne Transfektionssystem bewirkte eine Absenkung der hnTTR-Konzentration auf 39,8%. Bei Negativkontrollen kam es zu keinem Effekt.



**Abbildung 41:** Westernblot von stabil transfizierten 293-hnTTR-Zellen-Zellkulturüberständen. **Spur 1** = 293-hnTTR-Zellen ohne Ribozym; **Spur 2** = 293-hnTTR-Zellen nach Zugabe von 5  $\mu$ l Ribozym R1092 mit Effecten und 48 Stunden Inkubation; **Spur 3** = 293-hnTTR-Zellen nach Zugabe von nur Effecten und 48 Stunden Inkubation; **Spur 4** = 293-hnTTR-Zellen nach Zugabe von 5  $\mu$ l Ribozym MR1 mit Effecten und 48 Stunden Inkubation; **Spur 5** = 293-hnTTR-Zellen nach Zugabe von 7,5  $\mu$ l Ribozym MR1 mit Effecten und 48 Stunden Inkubation; **Spur 6** = 293-hnTTR-Zellen nach Zugabe von 10  $\mu$ l Ribozym MR1 mit Effecten und 48 Stunden Inkubation, **Spur 7** = 293-hnTTR-Zellen nach Zugabe von Transfektionspuffer und 48 Stunden Inkubation und **Spur 8** = 293-hnTTR-Zellen nach der Zugabe von 5  $\mu$ l Ribozym MR1 und 48 Stunden Inkubation.

Die Auswertung des Westernblot ist in Abbildung 42 dargestellt. Wie bei der vorangehenden Auswertung entspricht die Bande des Ansatzes ohne Ribozym und Transfektions- bzw. Transportersystem 100%. Bei diesem Spaltungsexperiment konnte durch eine Zunahme der Ribozyme eine Korrelation zur Abnahme der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand gezeigt werden.



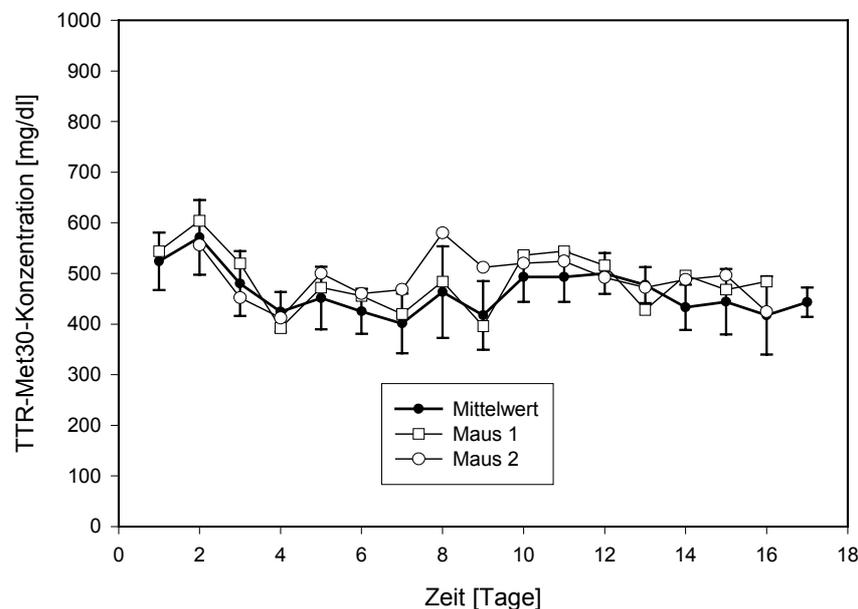
**Abbildung 42:** Säulendiagramm der Ergebnisse aus Abbildung 41.

### 3.5 Ribozyme - *in vivo* Mausmodell

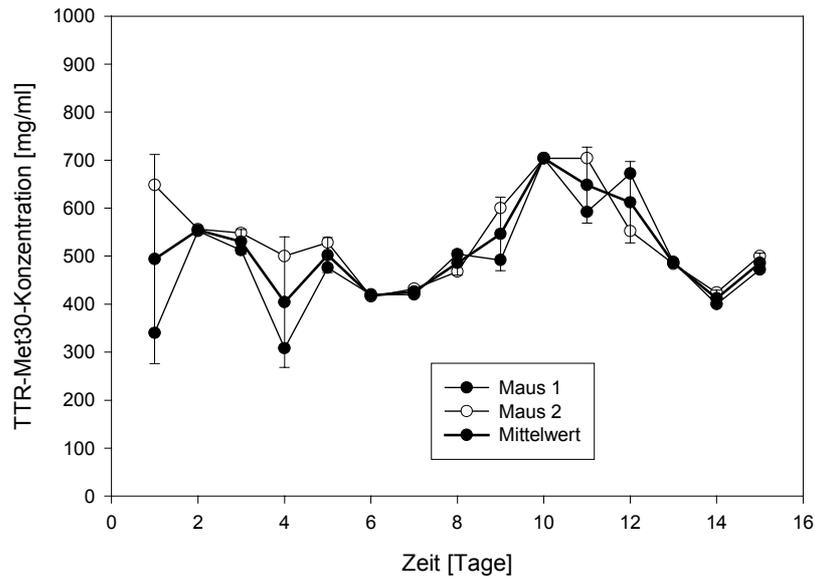
#### 3.5.1 Proteinkonzentration im Serum

Für die *in vivo* Kinetiken stand ein Mausmodell zur Verfügung. Diese human TTR-Met30-transgenen Mäuse mit dem Hintergrundstamm C57/Bl6 wurden uns von Prof. Yamamura/Prof. Maeda (Japan) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse waren nicht mausTTR *knock out*. Sie bildeten laut Auskunft von Prof. Maeda Maus/Mensch TTR-Heterotetramere.

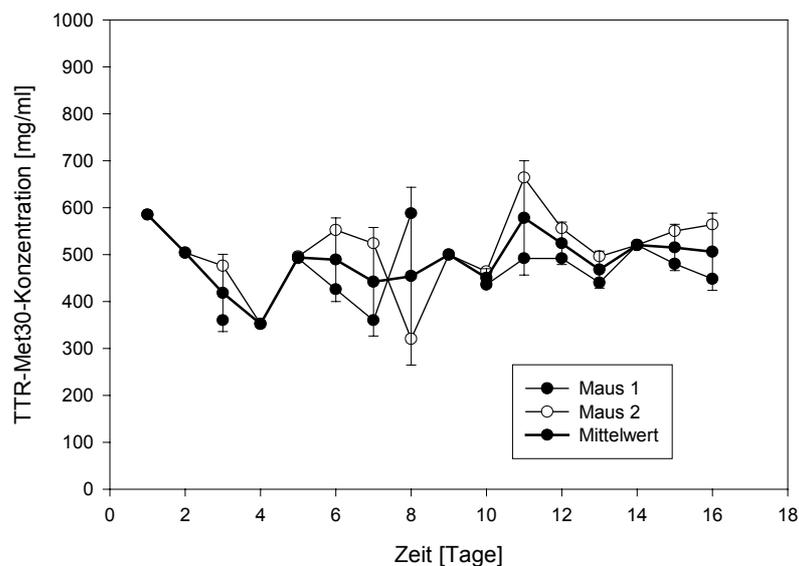
Der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen humanens Transthyretin und TTR-Met30 der Firma Behring reagierte nicht kreuz mit dem mausTTR. Dieses wurde vor Versuchsbeginn an drei Wildtyp-Black6-Mäusen getestet. Sowohl bei der Spaltungskinetik am *in vivo* Mausmodell mit human TTR-Met30-transgenen C57/Bl6 mit aktiven Ribozymen (Abbildung 43) als auch mit inaktiven (Abbildung 44) und ohne Ribozyme (Abbildung 45) ist kein signifikanter Effekt nach der Ribozymgabe zu erkennen.



**Abbildung 43:** *In vivo* Spaltungskinetik mit aktivem Ribozym R1402. Verlauf der Serumkonzentration von TTR-Met30 im *in vivo* Mausmodell. Vier Mäusen wurde nach fünfmaliger Blutentnahme und TTR-Met30-Bestimmung am 6. Tag nach Versuchsbeginn 50  $\mu$ l Ribozym R1402 in eine Schwanzvene injiziert. Am 7. Tag wurden 25  $\mu$ l Ribozym nachinjiziert. Bis zum 9. Tag nach der ersten Injektion wurde Blut abgenommen und die TTR-Met30-Konzentration bestimmt. Der Mittelwert ist mit der jeweiligen Standardabweichung für vier Mäuse eingezeichnet. Zur Übersichtlichkeit wurden nur die Kurven von zwei Mäusen in das Diagramm eingefügt. Die Daten der andere Mäuse war entsprechend.



**Abbildung 44:** In vivo Spaltungskinetik mit inaktivem Ribozym R1547. Verlauf der Serumkonzentration von TTR-Met30 im in vivo Mausmodell. Vier Mäusen wurde nach fünfmaliger Blutentnahme und TTR-Met30-Bestimmung am 6. Tag nach Versuchsbeginn 50  $\mu$ l inaktives Ribozym R1547 in eine Schwanzvene injiziert. Am 7. Tag wurden 25  $\mu$ l Ribozym nachinjiziert. Bis zum 9. Tag nach der 1. Injektion wurde Blut abgenommen und die TTR-Met30-Konzentration bestimmt. Von allen Konzentrationen wurde für jeden Tag ein Mittelwert errechnet. Zur Übersichtlichkeit wurden nur die Kurven von zwei Mäusen in das Diagramm eingefügt. Die Daten der andere Mäuse war entsprechend.



**Abbildung 45:** In vivo Spaltungskinetik, Versuchsansätze ohne Ribozym. Verlauf der Serumkonzentration von TTR-Met30 im in vivo Mausmodell. Zwei Mäusen wurde nach fünfmaliger Blutentnahme und TTR-Met30-Bestimmung am 6. Tag nach Versuchsbeginn nur Puffer in eine Schwanzvene injiziert. Bis zum 9. Tag nach der 1. Injektion wurde Blut abgenommen und die TTR-Met30-Konzentration bestimmt. Von allen Konzentrationen wurde für jeden Tag ein Mittelwert errechnet.

Die Proteinbestimmung wurde am Nephelometer durchgeführt. Das Maus-Serum wurde für die Messungen 1:40 verdünnt. In der Gruppe mit dem inaktiven Ribozym wurde 4 Mäusen das Ribozym injiziert. Für die Kontrollgruppe standen nur 2 Mäuse zur Verfügung, die mit Sterofundin behandelt werden konnten. Das aktive Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozym R1402 konnte 4 TTR-Met30-synthetisierenden Mäusen injiziert werden.

Die Auswertung der TTR-Met30-Konzentrationsbestimmungen im Mäuseserum ergab, dass nach Ribozymgabe über Schwanzveneninjektion kein Absinken des TTR-Met30 erreicht worden ist. Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente mit dem aktiven Ribozyme R1402 gleichen denen mit dem inaktiven Ribozyme R1547 und der Negativkontrollen. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind zu groß, als dass eine wissenschaftlich vernünftige Aussage zu treffen ist.

## 4 Diskussion

Protein- bzw. Amyloidablagerungen treten im natürlichen Alterungsprozess des Menschen auf. Bestimmte Erkrankungen wie die Alzheimer- und Jakob-Creutzfeldt-Krankheit zeigen frühzeitige Proteinablagerungen im Nervensystem. Zahlreiche weitere Erkrankungen wie die chronische Hämodialyse niereninsuffizienter Patienten führen ebenfalls zu lebenslimitierenden Amyloidablagerungen. Die Charakterisierung des Mechanismus der Proteinablagerungen und deren Therapie stellen somit eine medizinische Herausforderung dar.

Die Hereditäre Amyloidose kann durch Mutationen in normalerweise löslichen Proteinen und daraus resultierenden Ablagerungen dieser Proteine bedingt werden. Die häufigste vorkommende Variante ist dabei eine Punktmutation im Transthyretin-Gen an Position 173. Es kommt zu einem Aminosäureaustausch an Position 30, Valin gegen Methionin (TTR-Met30). Die Erkrankung tritt regional sehr unterschiedlich gehäuft auf und stellt ein geeignetes Krankheitsbild zur Etablierung eines gentherapeutischen Verfahrens zur Korrektur einer spezifischen genetischen Mutation dar. Kenntnisse dieser Untersuchungen könnten möglicherweise auch auf nicht genetisch bedingte Erkrankungen ausgeweitet werden. Zur Untersuchung dieses Krankheitsbildes sind bereits verschiedene Tiermodelle etabliert.

Die vorliegende Arbeit versucht eine Verbindung zu schaffen zwischen der biochemischen Charakterisierung klinisch betroffener Patienten und der Targetierung dieser Erkrankung auf RNA-Ebene sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Ansätzen. Zum Einsatz kamen spezifische chemisch modifizierte Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme.

Die derzeit einzige mögliche Therapieoption zur Behandlung der Hereditären Amyloidose stellt die Lebertransplantation dar. Bis August 1999 wurden weltweit in 16 Staaten 380 Patienten in 39 Transplantationszentren lebertransplantiert, die an HA erkrankten. Davon waren 60 Domino-Lebertransplantationen [*Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Register = FAPWTR*, <http://www.fapwtr.org>].

Die spezielle Technik der Domino-LTX wird zur Zeit zunehmend infolge der Organknappheit in verschiedenen Zentren durchgeführt. Bei ihr wird die ansonsten physiologisch intakte HA-Leber einem Patienten implantiert, der aufgrund seiner Erkrankung und seines Alters ausgewählt wird. Da die Symptome sich erst nach ca. 20-30 Jahren manifestieren, ist wegen der natürlichen Lebenserwartung der transplantierten Patienten ein Auftreten einer HA nicht mehr wahrscheinlich. Außerdem könnte die generell bei Organtransplantationen übliche Immunsuppression den Prozess der Amyloidogenese

verzögern. Die im HA-Spenderorganismus verbleibenden maximal 10% TTR-Met30, die durch die Syntheseorte wie der Plexus Choroideus und die Netzhaut synthetisiert werden, tragen aller Wahrscheinlichkeit zu keiner weiteren Ablagerung von Amyloid bei. Eine klinische Regression der Amyloidose wurde bei mehrjährigen Verläufen nach Lebertransplantation beschrieben. Eine Progressionshemmung der Amyloidogenese ist zu erwarten. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssten noch Untersuchungen durchgeführt werden.

Die erste Domino-Lebertransplantation wurde 1996 in Portugal durchgeführt (Furtado et al., 1997). Nachdem das spezielle Verfahren der Domino-LTX der hiesigen Ethikkommission vorgelegt und von ihr akzeptiert wurde, fand im Frühjahr 1997 an der Medizinischen Hochschule Hannover zum ersten Mal eine Domino-LTX eines HA-Patienten statt, wenige Wochen später eine zweite. Jeder so transplantierte Patient wurde ausführlich informiert und hat schriftlich diesem Verfahren zugestimmt. Die zwei Empfänger der Spenderorgane waren 59 bzw. 60 Jahre alt und waren jeweils an einem Leberkarzinom erkrankt. An den beiden Transplantationspaaren wurde die biochemische Charakterisierung der TTR und der TTR-Met30-Konzentration durchgeführt (Schmidt et al., 1998).

Die TTR-Met30-Konzentration ging bei den HA-Patienten unter die Nachweisgrenze zurück und stieg parallel dazu bei den HA-Leber-Akzeptoren an. Der initiale größere Anstieg auf ein höheres Niveau bei den Akzeptoren als bei den Donoren ist vermutlich im Sinne einer Akut-Phase-Reaktion zu interpretieren, denn die Gesamtkonzentration von TTR stieg nach der Transplantation zunächst bei allen Patienten stark an. Durch einen logarhythmischen Auftrag der TTR-Met30-Konzentration im Serum der HA-Leber-Donoren konnte die Halbwertszeit des Proteins auf 2,25 Tage bestimmt werden. Eine Halbwertszeit dieser Größenordnung ist für ein Transportprotein wie das Transthyretin zu erwarten. Voraussetzung für diese Bestimmung war ein stabiler Hämatokrit sowie eine stabile Albumin-Serumkonzentration, d.h. dass im Rahmen der Transplantation keine größeren Blutverluste oder Infusionen und Transfusionen die Ergebnisse beeinträchtigten.

Durch die Kontrolle eines anderen leberspezifischen Proteins konnte bestätigt werden, dass die Domino-LTX der Grund für die Abnahme der TTR-Met30-Konzentration war. Als Kontrollprotein diente hier das Lipoprotein (a). Patient 2 hatte eine hohe genetisch determinierte Lp(a)-Serumkonzentration. Nach der Transplantation stieg die Lp(a)-Serumkonzentration beim Akzeptor dieser Leber (Patient 4) auf eine vergleichbar hohe

Konzentration an. Diese Beobachtung bestätigt den bereits bekannten Mechanismus, dass die Serumkonzentration von Lp(a) nahezu ausschließlich durch die Synthese dieses Lipoproteins durch die Leber determiniert wird (Lobentanz und Dieplinger, 1997).

Eine TTR-Met30 Apherese ist untersucht und getestet worden. Infolge der in dieser Arbeit dokumentierten relativ geringen Halbwertszeit müsste jedoch eine so engmaschige Apherese durchgeführt werden, dass dieses Verfahren nicht erfolgversprechend eingesetzt werden kann. Dieses wird bestätigt durch Erfahrungen einer japanischen Arbeitsgruppe bereits in den 80er Jahren [persönliche Mitteilung von Prof. Maeda].

Als neue Therapie wird neben der Gentherapie an der Entwicklung einer Chemotherapie gearbeitet. Dabei sollen bestimmte Medikamente (Proteasen) entwickelt und eingesetzt werden, die speziell Amyloidablagerungen abbauen (Bellotti et al., 1999). Weiterhin wird versucht Stoffe zu finden, die stabilisierend auf den TTR-Met30-Tetramer-Komplex wirken (Baures et al., 1999; Miroy et al., 1996; Peterson et al., 1998). Die größere Instabilität des mutierten TTR-Komplexes wird als Hauptgrund für das Auftreten von Amyloidablagerungen diskutiert (Bellotti et al., 1999; Goldsteins et al., 1999; Kelly, 1998a; Kelly et al., 1997).

Die am meisten Erfolg versprechende Therapie könnte die Gentherapie darstellen, durch die eine Herabregulation der TTR-Met30-Konzentration im gesamten Organismus angestrebt wird. Verschiedene Möglichkeiten zur Inhibierung der Synthese mutierter Proteine sind bereits bekannt. Neben der Proteintargetierung z.B. mittels spezifischen Antikörper (Rungger-Brändle et al., 1979) gibt es die Möglichkeit der Inhibierung der Genexpression. Dieses kann u. a. durch Bildung einer Tripelhelix dazu führen, dass die Transkription der DNA unterbunden wird (Gibson, 1994; Majumdar et al., 1998). RNA/DNA chimäre Oligonukleotide wurden erfolgreich eingesetzt, um auf DNA-Ebene Mutationen zu korrigieren (Abe et al., 1998; Cole-Strauss et al., 1996; Yoon et al., 1996). Durch die Inhibierung der Translation konnte auch eine Unterdrückung der Genexpression gezeigt werden. Dazu wurde die mRNA durch Antisense-Oligodesoxynukleotide blockiert (Izant und Weintraub, 1984; Zamecnik und Stephenson, 1978).

Eine weitere Möglichkeit die Expression eines Gens zu verhindern, ist die Blockierung der dem Gen entsprechenden mRNA. Neben Antisense-Oligoribonukleotiden kommen hier Ribozyme zum Einsatz (Cotten, 1990; Woolf, 1995). Antisense-Oligoribonukleotide inhibieren die Translation z.B. durch die Anlagerung an RNA-Sequenzen, die für das Splicing und somit für die Funktionalität der RNA essentiell sind (Scherczinger et al.,

1992). Ribozyme besitzen die Eigenschaft RNA an hochspezifischen Tripletts-Sequenzen zu spalten. Dies ist speziell für die Targetierung einer Punktmutation geeignet (Woolf, 1995).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Entwicklung eines somatischen Gentherapieansatzes unter Einsatz von Hammerhead-Ribozymen erfolgreich beschreiben (L'Huillier et al., 1996; Lyngstadaas et al., 1995). Diese Ribozyme bestehen aus kurzen RNA-Sequenzen, die teils einzelsträngig, teils doppelsträngig vorliegen und zu ihrer charakteristischen, namensgebenden Struktur gefaltet sind. Hammerhead-Ribozyme können mit einer komplementären Ziel-RNA hybridisieren und diese an einer definierten Triplettssequenz spalten. Untersuchungen zeigten, dass alle natürlich vorkommenden Hammerhead-Ribozyme nach der allgemeinen Triplettssequenz NUH spalten (Shimayama et al., 1995; Zoumadakis und Tabler, 1995). Die TTR-Met30-Mutation ist jedoch durch die Sequenz CCA charakterisiert (Sparkes et al., 1987; Wallace et al., 1985). Für die Detektion eines entsprechenden NCH-Tripletts wurden Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme entwickelt (Ludwig et al., 1998). Diese Ribozyme sind 1998 von Ludwig *et al.* generiert worden, um andere Tripletts als nur die bis dahin bekannte Sequenz NUH (Haseloff und Gerlach, 1988) zu spalten. Die Spezifität dieser speziellen Hammerhead-Ribozyme konnte bereits demonstriert werden (Ludwig et al., 1998; Pröpsting et al., 1999). Außerdem bestand die Möglichkeit nach erfolgreicher exogener Anwendung von Ribozymen ein endogenes Ribozymexpressionssystem aufzubauen (L'Huillier et al., 1996). Dadurch konnte nach Transfektion von bestimmten Zielzellen mit Adeno- (Lieber et al., 1996) oder Retroviren (Sun et al., 1996) eine endogene Expression von Ribozymen erreicht werden und eine weitere Gentherapiemöglichkeit bei mononukleären Mutationen untersucht werden.

Um die Spezifität der TTR-Met30-targetierenden Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme zu testen, wurden unterschiedlich lange TTR RNA-Substrate mit diesen gespalten. Zusätzlich konnte die relative Geschwindigkeit der Ribozyme untersucht werden. Da die Ribozyme auch *in vivo* eingesetzt wurden, mussten die Basen der Ribozyme chemisch modifiziert werden, damit ein zu schneller Abbau durch RNAsen verhindert werden konnte (Heidenreich et al., 1994; Heidenreich et al., 1996; Lyngstadaas et al., 1995).

Um erste allgemeine Aussagen über Spaltungsspezifität und Spaltungsgeschwindigkeit der unterschiedlich chemisch modifizierten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme zu erhalten wurden Spaltungskinetiken an 21-Basen-langen Oligoribonukleotiden (21mer) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlich chemisch modifizierten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme die Substrate mit verschiedenen Geschwindigkeiten abbauen. Die Substratspezifität war dabei sehr hoch. So konnte ein TTR-Met30-spezifisches Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozym ein hnTTR 21mer nicht spalten. Der qualitative Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeit ergab, dass das Ribozym R1401, das keine chemische Modifikation an Position u4 besitzt, die höchste Geschwindigkeit hatte. Die Position u4 zeichnete sich dadurch aus, dass sie eine konservierte Base und somit wichtig für die Spaltungsfunktionalität des Hammerhead-Ribozyms war. *In vitro* Mutagenese-Untersuchungen zeigten, dass unterschiedliche chemische Modifikationen hier große Auswirkungen auf das Spaltvermögen des Ribozyms hatten (Paolella et al., 1992; Perreault et al., 1990; Yang et al., 1992). Das Ribozym R1091 hatte an Position u4 eine 2'-O-allyl-Modifikation, die dazu führte, dass die Spaltungsgeschwindigkeit die langsamste war. Ribozym R1402 hatte eine zehnfach höhere Spaltungsgeschwindigkeit. An Position u4 war anstatt eines Uridin ein 2'-Amino-Uridin in die Ribozymsequenz eingebaut. Die Amino-Modifikation wurde gewählt, da diese Modifikation eine relative hohe Spaltungsgeschwindigkeit des Ribozyms zulässt und gleichzeitig eine größtmögliche Stabilität gegenüber RNAsen liefert, wie frühere Untersuchungen gezeigt haben (Beigelman et al., 1995). Das Ribozym R1402 sollte und konnte im Gegensatz zu R1401 für die späteren *in vivo* Experimente eingesetzt werden, da es durch die chemische Modifikation an Position u4 in Serum und Zellkulturmedium stabil war (Leirdal und Sioud, 1998; Lyngstadaas et al., 1995). R1091 sollte aufgrund seiner geringen Spaltungsgeschwindigkeit *in vivo* nicht eingesetzt werden. Die ermittelten Spaltungsgeschwindigkeiten stimmen mit schon veröffentlichten Daten anderer Hammerhead-Ribozyme überein (Fedor und Uhlenbeck, 1990; Paolella et al., 1992).

Bei der Spaltung der *full length* TTR RNA konnten analoge Ergebnisse bezüglich der Spezifität und der Effektivität der Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme im Vergleich zur Spaltung der 21-Basen-langen Oligomere erzielt werden. So konnte eine hnTTR RNA vom Ribozym R1401 nicht gespalten werden. Bei der vergleichenden Spaltung von *full length* TTR-Met30 RNA zeigte das Ribozym R1401 die höchste Spaltungsgeschwindigkeit. R1402 erreichte eine zweimal geringere, R1091 eine fünfmal geringere Spaltungsgeschwindigkeit als R1401. Diese Ergebnisse zeigten, dass durch die längeren Substrate die Spezifität der Ribozyme nicht beeinflusst wurde. Generell sind die Spaltungsgeschwindigkeiten bei den *full length* Substraten erheblich langsamer als bei den 21mer-Substraten. Ursächlich dafür könnte hierbei der räumlich unterschiedliche

Aufbau der Substrate sein. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen bestätigen dieses (Birikh et al., 1997a; Heidenreich und Eckstein, 1992; Hendrix et al., 1996). Die räumliche Zugänglichkeit der TTR-Met30-spezifischen Sequenz ist sehr gering. Berechnungen der räumlichen Struktur der RNA durch das Programm Mfold (Zuker, 1989a; Zuker, 1989b) bestätigen die experimentellen Ergebnisse. In weiterführenden Spaltungsversuchen wurde ein anderes Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozym (MR1) eingesetzt, welches nicht spezifisch TTR-Met30, sondern hnTTR spalten kann. Dieses hatte eine andere Zielsequenz, die über das Faltungsprogramm ermittelt eine bessere Zugänglichkeit haben sollte. Für therapeutische Ansätze wäre auch der Einsatz eines TTR-Met30 unspezifischen Ribozyms denkbar, da möglicherweise ein totaler *knock out* des Transthyretins keine physiologischen Effekte hat. Prof. Maeda (Japan) hat dazu Tierversuche im Mausmodell durchgeführt und dabei Hinweise erhalten, dass eine Maus ohne TTR normal leben kann, da die einzige Funktion des Transthyretin im Transport von Retinol und Thyroxin zu bestehen scheint und dieser offensichtlich von anderen Proteinen übernommen werden kann (persönliche Mitteilung).

Ribozym MR1 besitzt eine andere Zielsequenz als die bisher verwendeten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme und kann somit nicht zwischen hnTTR und TTR-Met30 differenzieren. Es spaltet nach der RNA-Position 374 und hat eine deutlich höhere Spaltungsgeschwindigkeit als die Ribozyme, die hinter der RNA-Position 173 (spezifisch für TTR-Met30) spalteten. MR1 war somit 118 mal schneller als R1401. Die in den Experimenten ermittelten Spaltungsgeschwindigkeiten sind im Vergleich zu bereits publizierten Daten auch für unmodifizierte Ribozyme relativ langsam (Burgin et al., 1996; Dropulich et al., 1992). Diese Spaltungsgeschwindigkeiten werden im *in vivo* Experiment möglicherweise ausreichen, um TTR mRNA in dem Maße zu spalten, dass eine Herabregulation der TTR Serumkonzentration erreicht wird (Lyngstadaas et al., 1995). Da es sich beim TTR-Protein nicht um ein regulatorisches Protein handelt, sondern um ein Transportprotein, könnte die erreichte Spaltungsgeschwindigkeit ausreichen, um das mutierte Transthyretin herabzuregulieren. Untersuchungen von mausTTR-*knock out*-Mäusen (Episkopou et al., 1993) ergaben keinerlei phänotypische Erkrankungen, d.h. TTR könnte auch im humanen System ein nicht zwingend notwendiges Protein sein. Dieses bedeutet, dass zukünftig weitere therapeutische Strategien verfolgt werden können, die die Inhibierung des gesamten humanen Transthyretin erreichen.

Der direkte Vergleich der Spaltung eines 21mer-, 300mer- und *full length* Substrates mit demselben Ribozym zeigte, dass die Spaltung eines 21mer siebenmal und eines

300mer sechsmal schneller verlief als die des *full length* Substrates, obwohl sich die RNA-Kette vom 300mer zum *full length* Substrat verdoppelt, vom 21mer zum *full length* sogar verdreißigfach hatte. Die Ursache für die unterschiedliche Spaltungseffektivität ist möglicherweise in der Zugänglichkeit der Sequenzen unter den jeweiligen räumlichen Bedingungen der unterschiedlich langen Substrate zu suchen. Liegt es in einer doppelsträngigen, stabilen RNA-Struktur, kann es sein, dass das Ribozym nicht hybridisieren kann. Das Resultat ist eine unzureichende Spaltung. Die Abbildung der Strukturen der drei verschiedenen RNA-Ketten zeigte, dass sich die direkte Umgebung der Zielsequenzen jeweils unterschiedlich verändert hatte, so dass dadurch eine veränderte Zugänglichkeit abgeleitet werden könnte. Die Triplets, hinter denen die RNA von den Ribozymen gespalten wurde, lagen bei allen Substraten in einer relativ gut spaltbaren einzelsträngigen Region. Während das 21-Oligomer einen relativ einfachen räumlichen Aufbau zeigte, lag die TTR-Met30-Spaltstelle bei der *full length* RNA in einem sehr stark gepackten bzw. unzugänglichen Bereich. War die RNA nur 300-Basen-lang, hatte dieses einen erheblichen Einfluss auf ihre räumliche Struktur. Die Sequenz mit der TTR-Met30-Spaltstelle war nun nicht mehr in einem unzugänglichen Bereich, so dass die Hammerhead-Ribozyme gut an die RNA binden und diese spalten konnten. Das Triplet, nach dem die RNA gespalten wurde, befand sich in einer *Loop*-Region, so wie es für die Spaltung am effektivsten ist (Sakamoto et al., 1996; Shimayama et al., 1993; Zhang et al., 1996). Außerdem ist die allgemeine Zugänglichkeit bei einer nur 300-Basen-langen RNA höher als bei einer doppelt so langen. Dieses ist an den zweidimensionalen Strukturen nicht abzulesen, dreidimensional jedoch besser vorstellbar. Es gibt bei kürzeren Substraten weniger sterische Hindernisse in einem räumlichen Aufbau. Die berechneten Strukturen sind nur Näherungen an die tatsächliche. Möglicherweise bestehen Abweichungen zwischen der realen Struktur der Substrate und der Zugänglichkeit der Zielsequenz und den mit dem Programm berechneten Strukturen. Eine Deutung der unterschiedlichen Spaltungsergebnisse bei den verschiedenen langen Substraten nur aufgrund des zweidimensionalen Aufbaus ist nur ein erster Hinweis und sollte in weiterführenden Experimenten verifiziert werden. Genaue Aussagen konnten nicht getroffen werden, da das Faltungsprogramm keine Darstellung der RNA-Sequenz dreidimensional zeigte. Je länger eine RNA-Kette ist, desto komplexer ist sie auch räumlich gefaltet. Ein Ribozym, das an eine Sequenz, die in der Mitte eines solchen RNA-Komplexes liegt, hybridisieren soll, kann eventuell aufgrund der sterischen Hindernisse diese nicht erreichen. Die Ergebnisse aus den Spaltungen der drei Substrate

waren ein Hinweis auf den Einfluss des räumlichen Aufbaus der RNA auf die Spaltungsgeschwindigkeit der Ribozyme.

Die Wirkung der Ribozyme musste nach den *in vitro* Experimenten zunächst *in vivo* an kultivierten Zellen getestet werden. Die Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme wurden in diesem Zellkulturansatz direkt aus dem Medium exogen über Endozytose wie beschrieben aufgenommen (Loke et al., 1989; Yakubov et al., 1989). Die Aufnahme von Oligoribonukleotiden an sich ist ein Problem. Sie findet zwar statt, aber die Oligoribonukleotide befinden sich dann zumeist in endozytotischen Vesikeln (Loke et al., 1989). Spalten können Ribozyme aber nur, wenn sie direkt im Zytoplasma oder Zellkern mit der mRNA zusammentreffen. Außerdem müssen Oligoribonukleotide gegenüber Nukleasen stabil sein, wenn sie bei einem Zellkulturexperiment direkt in das Medium gegeben werden (Heidenreich et al., 1994). Ribozyme lassen sich durch diese exogene Gabe leicht dosieren. Als Positivkontrolle stand beim Zellkulturexperiment die humane Leberzelllinie HepG2 zur Verfügung. Von diesen weiß man, dass sie TTR synthetisieren (Bellovino et al., 1996). Ein Spaltungsexperiment konnte bei den HepG2-Zellen, die hnTTR synthetisieren, nur mit dem Ribozym MR1 durchgeführt werden, das allgemein humanes Transthyretin spaltet. MR1, ins Zellkulturmedium gegeben, bewirkte eine Herabregulierung der TTR-Konzentration nach 48 Stunden. Dieses konnte durch die Konzentrationsbestimmung mit dem Nephelometer und über einen Westernblot gezeigt werden. Durch den Einsatz eines Transfektionsystems zum Transport der Ribozyme in die Zelle konnte nahezu eine Verdoppelung der Konzentrationsabnahme beobachtet werden. Mit dieser Lipofektionstechnik wurde schon gezeigt, dass Ribozyme und Antisense-Oligoribonukleotide die Translation von Proteinen unterbinden (Monia et al., 1992; Taylor et al., 1992). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass ein großer Teil der Liposomen in Endosomen aufgenommen und zusammen mit den Oligoribonukleotiden abgebaut werden (Lasic und Papahadjopoulos, 1995; Lewis et al., 1996). Auch die Spaltung von mRNA nach Aufnahme ohne Transportsystem wurde bereits erfolgreich gezeigt (Sioud et al., 1992). Die aus den Versuchen mit den HepG2 erhaltenen Ergebnisse konnten an einem stabil transfizierten Zellsystem verifiziert werden. Dafür wurden 293-Zellen ausgewählt, da sie sich leicht durch Retroviren transfizieren lassen und als Nierenzelllinie kein TTR exprimieren. Die TTR-Met30-Konzentration der exprimierenden 293-TTR-Met30-Zellen wurde durch die Inkubation mit Ribozymen beeinflusst. Die Zugabe von Ribozym R1402 zum Zellkulturmedium senkte die TTR-Met30-Konzentration signifikant. Eine weitere, wenn auch nur geringe Herabsenkung der TTR-Met30-

Konzentration konnte durch den Einsatz von Transfektionsreagenzien, die als Transportsystem für die Ribozyme ins Zellinnere dienen, erreicht werden. Eine Erhöhung der Ribozymkonzentration führte zu einer weiteren Erniedrigung der TTR-Konzentration im Zellkulturüberstand. Im Vergleich der Transfektionssysteme konnte gezeigt werden, dass das kationische Liposom DOTAP in Verbindung mit dem Ribozym R1402 eine stärkere Erniedrigung des TTR-Met30 bewirkte als das Transfektionssystem Effecten. Die Unterschiede könnten mit den Zellen zusammenhängen, die sich eventuell mit kationischen Liposomen am besten transfizieren lassen. Es könnte aber auch sein, dass die Komplexierung der Ribozyme durch das jeweilige System eine wichtige Rolle spielt. DOTAP bildet einfache Komplexe mit der Nukleinsäure aufgrund unterschiedlicher Ladungen, die RNA wird auf der Oberfläche der Liposomen angelagert. Beim Effecten wird die RNA kondensiert und dann in ein Liposom verpackt. Außerdem sollte grundsätzlich überlegt werden wie die Ribozyme in die Zielzellen transportiert werden sollen. Die Aufnahme von nackter RNA bzw. Ribozymen wird durch das Vorhandensein hydrophober Gruppen erhöht (Lyngstadaas et al., 1995). So steigern 2'-O-allyl-Gruppen die Lipophilie der Ribozyme und es kommt zu einer leichteren Diffusion durch die Zellmembran, die aus einer Doppelschicht Lipiden besteht. Der Einsatz von kationischen Liposomen als Transporter für Ribozyme in die Zelle hingegen hat den Vorteil, dass durch die Verschmelzung dieser Liposomen mit der Zellmembran die komplexierten Ribozyme direkt ins Zytosol gelangen. Sie werden nicht in Endosomen aufgenommen und in diesen abgebaut (Sioud, 1996). Außerdem sind die Ribozyme, wenn sie in Liposomen verpackt sind, vor dem Abbau durch RNAsen geschützt, weshalb sie in diesem Fall auch nicht chemisch modifiziert sein müssten (Jarvis et al., 1996b; Karikó et al., 1994; Sioud, 1996).

Die 293-Zellen, die nach der stabilen Transfektion hnTTR synthetisierten, wurden ebenso wie HepG2 Zellen mit MR1 transfiziert. Auch hier zeigte sich, dass die RNA durch das Ribozym gespalten werden konnte, denn die hnTTR-Konzentration wurde in 48 Stunden herabreguliert. Durch eine Versuchsreihe mit ansteigenden Ribozymkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die Absenkung der TTR-Konzentration invers mit der Zunahme der Ribozymkonzentration korrelierte. Ein Unterschied aufgrund der Transfektionssysteme DOTAP bzw. Effecten konnte hier nicht gezeigt werden. Bei den 293-hnTTR Zellen konnte im Vergleich zu den HepG2 Zellen eine geringere Senkung der TTR-Konzentration beobachtet werden. Dieses wird zum einen ein Effekt der vorher stattfindenden Ribozym-Transfektion der Zelllinien sein und zum anderen am unter-

schiedlichen Stoffwechsel der verschiedenen Zelllinien liegen. Eine Abnahme der TTR-Konzentrationen bedingt durch das Transfektionssystem oder andere verwendete Reagenzien konnte durch Negativkontrollen, d.h. Ansätze ohne Ribozym ausgeschlossen werden.

Die *in vitro* erhaltenen Spaltungsergebnisse sollten auf ein *in vivo* Mausmodell übertragen werden. Hierzu wurden in verschiedenen Ansätzen Ribozyme direkt über die Schwanzvene in TTR-Met30-transgene Mäuse injiziert. Dabei wurden sowohl aktive als auch inaktive Ribozyme eingesetzt. In allen Versuchsgruppen blieb die Serumkonzentration des TTR jedoch unverändert. Hier könnten mehrere Faktoren ursächlich sein. Da den Mäusen pro Blutabnahme nur 20-30 µl Blut über die Schwanzspitze abgenommen werden konnte, musste das Serum stark verdünnt werden, damit eine nephelometrische Bestimmung möglich war. Möglicherweise wurde dadurch in diesen Proben die Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode unterschritten. Somit wäre die Entwicklung eines ELISA's oder RIA's sinnvoll, mit dem auch geringere Konzentrationen noch detektierbar sind. Eine weitere Möglichkeit für den ausbleibenden Effekt ist, dass die TTR-Met30-spezifischen Ribozyme im Mausmodell nicht an die Ziel-mRNA anlagern konnten, um diese zu spalten. Die mRNA könnte im Mausmodell anders räumlich gefaltet sein als im Zellkultursystem. Es handelt sich um humane mRNA im Mausorganismus. Möglicherweise kommt es hier zu konkurrierenden Effekten zwischen mausTTR mRNA und humaner TTR mRNA. Kürzlich wurde ein transgenes *knock out* Maus-Modell generiert, bei dem das mausTTR ausgeschaltet ist und nur noch humanes TTR exprimiert wird. Der Einsatz anderer Hammerhead-Ribozyme mit unterschiedlichen Zielsequenzen wie z.B. MR1 ist ebenfalls geplant, wenn das neue Mausmodell zur Verfügung steht. Ebenfalls ursächlich für einen ausbleibenden Effekt könnte die Injektionstechnik der Ribozyme über die Schwanzvene sein. Durch den relativ langen Weg bis zum Zielorgan Leber sind die Ribozyme dem Stoffwechsel der Maus, d.h. dem Abbau durch RNAsen unterlegen. Auch kommt es zu einem Verlust von Ribozymen, die in andere Kompartimente gelangen. So bleiben Ribozyme z.B. in den Lungenkapillaren hängen oder werden durch ihre elektrische Ladung aus dem Blut gefiltert, indem sie an entgegengesetzt geladenen Stoffen haften bleiben können. Ein weiterer Punkt ist die Aufnahme der Ribozyme in die Leber bzw. Hepatozyten, die nicht ohne weiteres RNA aufnehmen (Lyngstadaas et al., 1995). Dieses könnte durch den Einsatz z.B. kationischer Liposomen (Sioud, 1996) oder Effecten als Transportsysteme erleichtert werden. Hierbei wäre zu bedenken, dass diese Komplexe aus Transporter und RNA durch die Makrophagen

der Leber aus dem Blut gefiltert werden könnten. Auch müsste die Toxizität der Liposomen untersucht werden und ihr eventueller Einfluss auf den Zellstoffwechsel (Mirabelli et al., 1991; Rossi et al., 1992). Die hier eingesetzten Transporter DOTAP und Effecten scheinen keine toxischen Effekte hervorzurufen. Die Mäuse zeigten auch nach hohen Gaben von beiden Transportern keine Anzeichen von Fieber, Durchfall oder auffälligem Verhalten, das auf toxische Einflüsse hinweisen würde.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit dieses Ergebnisses ist, dass die Spaltung des Ribozyms im *in vivo* Mausmodell im Gegensatz zum Zellkulturversuch nicht stattgefunden hatte, da die mRNA an der Spaltstelle durch Proteine blockiert war (Lee et al., 1997). Im *in vivo* Modell liegt die mRNA immer in einem Protein-mRNA-Komplex vor. Dieses ist der wichtigste Grund für das unterschiedliche Verhalten der Ribozyme *in vivo* und *in vitro*. In der Zelle sind die Ribozyme außerdem nicht mehr frei diffusionsfähig und somit in ihrer Aktivität eingeschränkt (Casas-Finet et al., 1993; Portman und Dreyfuss, 1994). Die Ribozym-Bindung und die Spaltung kann verhindert werden durch sterische Behinderung oder durch protein-vermittelte Veränderung der räumlichen Struktur der mRNA (Lee et al., 1997).

Die Schwierigkeit der Übertragbarkeit von *in vitro* Ergebnissen bei Anwendung der Ribozymtechnik auf *in vivo* Modelle wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Domi et al., 1996; L'Huillier et al., 1992; Ramezani und Joshi, 1996). Die Experimente zeigten, dass häufig positive *in vitro* Spaltungsergebnisse im *in vivo* Experiment nicht reproduzierbar sind. Im Gegensatz dazu konnten in *in vivo* Modellen positive Ergebnisse erzielt werden, obwohl die entsprechenden *in vitro* Experimente negativ ausgefallen waren. Die Anzahl von Beispielen für erfolgreiche *in vivo* Applikationen von Ribozymen ist bisher begrenzt. Lyngstadaas et al. (Lyngstadaas et al., 1995) konnten 1995 in einer Arbeit zeigen, dass Ribozyme gegen das Enzym Amelogenin bewirken, dass der Zahnschmelz bei Mäuseembryonen nicht ausgebildet wird. Die Ribozyme wurden nackt in den Kiefer der Mäuse injiziert. Es gibt auch Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von Ribozymen, die mit kationischen Liposomen verpackt waren (Kitajima et al., 1997; Masuda et al., 1998; Sioud, 1996; Sioud et al., 1992; Snyder et al., 1993).

Die Wirkung und die Aktivität von Ribozymen ist *in vivo* sehr stark von zellulären Faktoren abhängig. Dieses könnte eine Ursache der beobachteten Diskrepanzen zwischen *in vivo* und *in vitro* sein. Die physiologischen Unterschiede zwischen den humanen Zellen im Zellkulturexperiment und dem Mausorganismus könnten hier maßgeblich beteiligt sein.

Weitere wichtige zu beachtende Faktoren bei Anwendung der Ribozymtechniken sind differierende strukturelle Eigenschaften der verwendeten Hammerhead-Ribozyme. So sind z.B. Aktivität und Spezifität abhängig von den Armlängen der Hammerhead-Ribozyme, welche maßgeblich die Hybridisierungseigenschaften bestimmen (Jarvis et al., 1996b). So sollte bei längeren Substraten die Armlänge vergrößert werden, um die Spezifität zu erhöhen (Amarzguioui und Prydz, 1998). Im Gegensatz dazu konnte Goodchild *et al.* zeigen, dass durch eine Verkürzung der Armlänge von 20 auf 12 Basen die Spaltungsgeschwindigkeit um das zehnfache stieg (Goodchild und Kohli, 1991). Hier gilt es einen ausgewogenen Mittelweg zwischen Spezifität und Geschwindigkeit zu finden (Jarvis et al., 1996b; Lieber und Strauss, 1995). Die Dissoziationsrate der hybridisierenden Arme vom Substrat ist entscheidend für die Zeit, in der ein Ribozym spalten kann. Ist die Rate sehr klein, kann das Ribozym die RNA schlecht spalten (Perkins et al., 1996). Bei A-U reichen Bereichen ist die Bindungsenergie geringer als bei G-C reichen Bereichen (Herschlag, 1991). Es hat sich gezeigt, dass die Ribozymarme möglichst in Bereichen mit hoher Bindungsenergie binden sollten, denn hier ist die Dissoziationsrate geringer als in A-U reichen Bereichen. Bei einer zu hohen Dissoziationsrate des Ribozyms vom Substrat kann unter Umständen eine Ablösung des Ribozyms von der Ziel-RNA erfolgen, ohne dass eine Spaltung stattgefunden hat.

Ein weiteres strukturell wichtiges Merkmal ist die Funktionalität des Ribozyms durch den korrekten Aufbau des Hammerhead Cores (Williams et al., 1992). Der genaue räumliche Aufbau, der für die Spaltung der Ziel-RNA wichtig ist und quasi das aktive Zentrum des Ribozyms bildet, wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Fu und McLaughlin, 1992). Chemische Modifikationen führen möglicherweise zu einer Reduktion der notwendigen Wasserstoffbrückenbindungen und damit zu Veränderungen der räumlichen Strukturen. Die Folge kann eine veränderte Spaltungsaktivität sein (Perreault et al., 1991).

Darüber hinaus ist die Anwesenheit notwendiger Metallionen entscheidend für die Aktivität verwendeter Hammerhead-Ribozyme (Dahm und Uhlenbeck, 1991). Hammerhead-Ribozyme können nur bei Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen RNA schneiden. Physiologisch vorhandene  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen sowohl im *in vitro* Modell als auch im Tiermodell entsprechen in der Regel nicht der optimalen Konzentration, die für die Ribozymsspaltung bei maximaler Geschwindigkeit notwendig ist. Aus diesem Grund wäre eine Erhöhung der intrazellulären  $Mg^{2+}$ -Konzentration in den Experimenten anzustreben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Temperatur und des

pH-Wertes große Auswirkungen auf die Ribozymaktivität hat (Sakamoto et al., 1997). So konnte z.B. ein Optimum des pH-Wertes zwischen 5,6 und 8 ermittelt werden (Hertel und Uhlenbeck, 1995).

Die Lokalisation der Spaltstelle auf der Ziel-RNA beeinflusst ebenfalls den Erfolg einer Ribozymsspaltung. Eine stromabwärts liegende Spaltstelle ist weniger geeignet, da ein langsam schneidendes Ribozym durch den sich abwärts bewegenden Translationskomplex verdrängt werden könnte (Chen et al., 1997). Eine Unterdrückung der Translation kann möglicherweise somit die Effektivität der Ribozyme *in vivo* erhöhen (Amarzguioui und Prydz, 1998).

## 5 Zusammenfassung

Die Hereditäre Amyloidose (HA) wird am häufigsten durch eine spezifische Mutation des Proteins Transthyretin (TTR) an der Position 30 (TTR-Met30) bzw. 173 der cDNA Sequenz des TTR-Gens verursacht. Die Lebertransplantation (LTX) im Sinne eines gentherapeutischen Organersatzes zum Zeitpunkt des Auftretens erster klinischer pathologischer Symptome stellt zur Zeit die einzige Therapiemöglichkeit dar. Die Etablierung neuer gentherapeutischer Verfahren ist somit eine vielversprechende Therapieoption. Diese Arbeit fasst sowohl die Entwicklung eines neuen gentherapeutischen Verfahrens zur spezifischen Targetierung dieser häufigsten Mutation als Ursache der Hereditären Amyloidose in der präklinischen Phase als auch die biochemische Charakterisierung betroffener Patienten vor und nach Lebertransplantation zusammen.

Die biochemische Charakterisierung der Gesamt-Transthyretin- und der Transthyretin-Met30-Konzentration vor und nach LTX ergab, dass die TTR-Met30-Konzentration bei HA-Patienten nach der Transplantation nicht mehr nachweisbar war. Die Halbwertszeit des TTR-Met30 konnte auf 2,25 Tage bestimmt werden.

Eine mögliche neue Therapieform ist der hier gezeigte Ansatz einer Gentherapie durch den Einsatz von TTR-Met30-spezifischen chemisch modifizierten Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozymen. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig bei diesem Krankheitsmodell, dass die TTR-Met30 mRNA sowohl *in vitro* als auch in Zellkultur spezifisch spaltbar, d.h. targetierbar ist. Im Zellkulturexperiment hatte diese Spaltung der mRNA zur Folge, dass die Translation des TTR-Met30 Proteins verlangsamt bzw. teilweise unterbunden wurde, so dass die Zellen weniger TTR-Met30 synthetisieren konnten. Die *in vivo* Experimente am Mausmodell zeigten, dass eine Applikation von Ribozymen keine wesentlichen Nebenwirkungen mit sich bringt. Eine relevante therapeutische Wirkung konnte jedoch an diesem Tiermodell (humanTTR-Met30-transgene Maus) noch nicht herausgearbeitet werden. Ein neueres Mausmodell (mausTTR *knock out* humanTTR-Met30-transgene Maus) erscheint vielversprechender und wird deshalb für die zukünftig geplanten *in vivo* Versuche verwendet werden. Weitere Faktoren werden diskutiert, die mögliche Verbesserungen dieser Therapiestrategie darstellen können.

Diese Arbeit stellt somit erstmalig einen gentherapeutischen Ansatz mittels chemisch modifizierter Inosin<sup>15.1</sup>-Hammerhead-Ribozyme dar, die spezifisch die Mutation dieser Erkrankung targetieren können, zumindest im Stadium der hier beschriebenen *in vitro* Versuche.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe, T., Suzuki, S., Hatta, T., Takai, K., Yokota, T. und Takaku, H. (1998). Specific inhibition of influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein gene expression by liposomally encapsulated antisense phosphorothioate oligonucleotides in MDCK cells. *Antivir Chem Chemother* 9:253-62.
- Ali, M., Lemoine, N. R. und Ring, C. J. (1994). The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1:367-84.
- Amarzguioui, M. und Prydz, H. (1998). Hammerhead ribozyme design and application. *Cell Mol Life Sci* 54:1175-202.
- Ando, Y., Ericzon, B. G., Suhr, O. B., Tashima, K. und Ando, M. (1997). Reuse of a Japanese familial amyloidotic polyneuropathy patient's liver for a cancer patient: the domino liver transplantation procedure [letter]. *Intern Med* 36:847.
- Ando, Y., Tanaka, Y., Nakazato, M., Ericzon, B. G., Yamashita, T., Tashima, K., Sakashita, N., Suga, M., Uchino, M. und Ando, M. (1995). Change in variant transthyretin levels in patients with familial amyloidotic polyneuropathy type I following liver transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 211:354-358.
- Andrade, C. (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75:408.
- Baures, P. W., Oza, V. B., Peterson, S. A. und Kelly, J. W. (1999). Synthesis and evaluation of inhibitors of transthyretin amyloid formation based on the non-steroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid. *Bioorg Med Chem* 7:1339-1347.
- Beigelman, L., McSwiggen, J. A., Draper, K. G., Gonzalez, C., Jensen, K., Karpeisky, A. M., Modak, A. S., Matulic-Adamic, J., DiRenzo, A. B., Haeberli, P. und et. al. (1995). Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J Biol Chem* 270:25702-8.
- Bellotti, V., Mangione, P. und Stoppini, M. (1999). Biological activity and pathological implications of misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* 55:977-91.
- Bellovino, D., Morimoto, T., Tosetti, F. und Gaetani, S. (1996). Retinol binding protein and transthyretin are secreted as a complex formed in the endoplasmic reticulum in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 222:77-83.
- Benson, M. (1995). In "The metabolic basis of inherited diseases." (C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly und D. Nolle, eds), 7 edn., vol. Amyloidosis, pp. 4159-4191. McGraw Hill, New York.
- Benson, M. und Uemichi, T. (1996). Transthyretin amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 3:44-56.
- Benson, M. D. und Dwulet, F. E. (1983). Prealbumin and retinol binding protein serum concentrations in the Indiana type hereditary amyloidosis. *Arthritis Rheum* 26:1493-8.
- Benson, M. D. und Dwulet, F. E. (1985). Identification of carriers of a variant plasma prealbumin (transthyretin) associated with familial amyloidotic polyneuropathy type I. *J Clin Invest* 75:71-75.
- Birikh, K. R., Berlin, Y. A., Soreq, H. und Eckstein, F. (1997a). Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *RNA* 3:429-37.
- Birikh, K. R., Heaton, P. A. und Eckstein, F. (1997b). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur J Biochem* 245:1-16.

- Blake, C. und Serpell, L. (1996). Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure* 4:989-98.
- Blake, C. C., Geisow, M. J., Oatley, S. J., Rerat, B. und Rerat, C. (1978). Structure of prealbumin: secondary, tertiary und quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol* 121:339-356.
- Blake, C. C. F., Geisow, M. J., Swan, I. D., Rerat, C. und Rerat, B. (1974). Structure of human plasma prealbumin at 2-5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *J Mol Biol* 88:1-12.
- Branch, W. T., Robbins, J. und Edelhofer, H. (1972). Thyroxine-binding prealbumin. Conformation in urea and guanidine. *Arch Biochem Biophys* 152:144-151.
- Burgin, A., Jr, Gonzalez, C., Matulic-Adamic, J., Karpeisky, A. M., Usman, N., McSwiggan, J. A. und Beigelman, L. (1996). Chemically modified hammerhead ribozymes with improved catalytic rates. *Biochemistry* 35:14090-7.
- Cameron, F. H. und Jennings, P. A. (1989). Specific gene suppression by engineered ribozymes in monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9139-43.
- Casas-Finet, J. R., Smith, J. D. J., Kumar, A., Kim, J. G., Wilson, S. H. und Karpel, R. L. (1993). Mammalian heterogeneous ribonucleoprotein A1 and its constituent domains. Nucleic acid interaction, structural stability and self-association. *J Mol Biol* 229:873-89.
- Cech, T. R., Zaugg, A. J. und Grabowski, P. J. (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27:487-96.
- Chen, H., Ferbeyre, G. und Cedergren, R. (1997). Efficient hammerhead ribozyme and antisense RNA targeting in a slow ribosome Escherichia coli mutant. *Nat Biotechnol* 15:432-5.
- Cole-Strauss, A., Yoon, K., Xiang, Y., Byrne, B. C., Rice, M. C., Gryn, J., Holloman, W. K. und Kmiec, E. B. (1996). Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide [see comments]. *Science* 273:1386-9.
- Costa, P. M., Teixeira, A., Saraiva, M. J. und Costa, P. P. (1993). Immunoassay for transthyretin variants associated with amyloid neuropathy. *Scand J Immunol* 38:177-182.
- Costa, P. P., Figueira, A. S. und Bravo, F. R. (1978). Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4499-503.
- Costa, R. H., Lai, E. und Darnell, J. E. Jr. (1986). Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific. *Mol Cell Biol* 6:4697-708.
- Cotten, M. (1990). The in vivo application of ribozymes. *Trends Biotechnol* 8:174-8.
- Dahm, S. C. und Uhlenbeck, O. C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* 30:9464-9.
- Dickson, P. W., Aldred, A. R., Marley, P. D., Tu, G. F., Howlett, G. J. und Schreiber, G. (1985). High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 127:890-5.
- Domi, A., Beaud, G. und Favre, A. (1996). Transcripts containing a small anti-HIV hammerhead ribozyme that are active in the cell cytoplasm but inactive in vitro as free RNAs. *Biochimie* 78:654-62.

- Dropulic, B., Lin, N. H., Martin, M. A. und Jeang, K. T. (1992). Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J Virol* 66:1432-41.
- Duan, W., Richardson, S. J., Babon, J. J., Heyes, R. J., Southwell, B. R., Harms, P. J., Wettenhall, R. E., Dziegielewska, K. M., Selwood, L., Bradley, A. J. und et al. (1995a). Evolution of transthyretin in marsupials. 227:396-406.
- Duan, W., Richardson, S. J., Kohrle, J., Chang, L., Southwell, B. R., Harms, P. J., Brack, C. M., Pettersson, T. M. und Schreiber, G. (1995b). Binding of thyroxine to pig transthyretin, its cDNA structure, and other properties. *Eur J Biochem* 230:977-986.
- Dwulet, F. E. und Benson, M. D. (1984). Primary structure of an amyloid prealbumin and its plasma precursor in a hereditary familial polyneuropathy of Swedish origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:694-8.
- Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G. A., Gottesman, M. E. und Robertson, E. J. (1993). Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. 90:2375-2379.
- Fedor, M. J. und Uhlenbeck, O. C. (1990). Substrate sequence effects on hammerhead RNA catalytic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1668-72.
- Felding, P., Fex, G., Westermark, P., Olofsson, B. O., Pitkanen, P. und Benson, L. (1985). Prealbumin in Swedish patients with senile systemic amyloidosis and familial amyloidotic polyneuropathy. *Scand J Immunol* 21:133-140.
- Feng, M., Cabrera, G., Deshane, J., Scanlon, K. J. und Curiel, D. T. (1995). Neoplastic reversion accomplished by high efficiency adenoviral-mediated delivery of an anti-ras ribozyme. *Cancer Res* 55:2024-8.
- Flory, C. M., Pavco, P. A., Jarvis, T. C., Lesch, M. E., Wincott, F. E., Beigelman, L., Hunt SW, r. und Schrier, D. J. (1996). Nuclease-resistant ribozymes decrease stromelysin mRNA levels in rabbit synovium following exogenous delivery to the knee joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:754-8.
- Fu, D. J. und McLaughlin, L. W. (1992). Importance of specific purine amino and hydroxyl groups for efficient cleavage by a hammerhead ribozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3985-9.
- Furtado, A., Tome, L., Oliveira, F. J., Furtado, E., Viana, J. und Perdigoto, R. (1997). Sequential liver transplantation. *Transplant Proc* 29:467-468.
- Gait, M. J., Pritchard, C. und Slim, G. (1991). In "Oligonucleotides and Analogues" (F. Eckstein, ed.), vol. Oligoribonucleotide synthesis., pp. 25-48. Oxford University Press, New York.
- Genschel, J., Haas, R., Pröpsting, M. J. und Schmidt, H. H. (1998). Apolipoprotein A-I induced amyloidosis. *FEBS Lett* 430:145-9.
- Gibson, I. (1994). Antisense DNA and RNA strategies: new approaches to therapy. *J R Coll Physicians Lond* 28:507-11.
- Goldsteins, G., Persson, H., Andersson, K., Olofsson, A., Dacklin, I., Edvinsson, A., Saraiva, M. J. und Lundgren, E. (1999). Exposure of cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid and in amyloidogenic mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3108-13.

- Goodchild, J. und Kohli, V. (1991). Ribozymes that cleave an RNA sequence from human immunodeficiency virus: the effect of flanking sequence on rate. *Arch Biochem Biophys* 284:386-91.
- Grassi, G., Forlino, A. und Marini, J. C. (1997). Cleavage of collagen RNA transcripts by hammerhead ribozymes in vitro is mutation-specific and shows competitive binding effects. *Nucleic Acids Res* 25:3451-8.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35:849-57.
- Hamilton, J. A., Steinrauf, L. K., Braden, B. C., Liepnieks, J., Benson, M. D., Holmgren, G., Sandgren, O. und Steen, L. (1993). The x-ray crystal structure refinements of normal human transthyretin and the amyloidogenic Val-30-->Met variant to 1.7-Å resolution. *J Biol Chem* 268:2416-2424.
- Harrison, H. H., Gordon, E. D., Nichols, W. C. und Benson, M. D. (1991). Biochemical and clinical characterization of prealbuminCHICAGO: an apparently benign variant of serum prealbumin (transthyretin) discovered with high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Am J Med Genet* 39:442-52.
- Haseloff, J. und Gerlach, W. L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334:585-91.
- Heidenreich, O., Benseler, F., Fahrenholz, A. und Eckstein, F. (1994). High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J Biol Chem* 269:2131-8.
- Heidenreich, O. und Eckstein, F. (1992). Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem* 267:1904-9.
- Heidenreich, O., Xu, X., Swiderski, P., Rossi, J. J. und Nerenberg, M. (1996). Correlation of activity with stability of chemically modified ribozymes in nuclei suspension. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:111-8.
- Heim, S. und Ulrich, J. (1993). The value of nerve biopsy in the diagnosis of familial amyloidosis. *Schweiz Rundsch Med Prax* 82:25-7.
- Hendrix, C., Anné, J., Joris, B., Van Aerschot, A. und Herdewijn, P. (1996). Selection of hammerhead ribozymes for optimum cleavage of interleukin 6 mRNA. *Biochem J* 314 ( Pt 2):655-61.
- Hendry, P., McCall, M. J. und Lockett, T. J. (1997). In "Ribozyme Protocols" (P. C. Turner, ed.), vol. Characterizing ribozyme cleavage reactions, pp. 221-229. Humana Press, Totowa.
- Herschlag, D. (1991). Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules in vivo: more isn't always better. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6921-5.
- Hertel, K. J., Herschlag, D. und Uhlenbeck, O. C. (1994). A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* 33:3374-3385.
- Hertel, K. J. und Uhlenbeck, O. C. (1995). The internal equilibrium of the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* 34:1744-9.
- Holmgren, G., Costa, P. M., Andersson, C., Asplund, K., Steen, L., Beckman, L., Nylander, P. O., Teixeira, A., Saraiva, M. J. und Costa, P. P. (1994). Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *J Med Genet* 31:351-354.

- Holmgren, G., Ericzon, B. G., Groth, C. G., Steen, L., Suhr, O., Andersen, O., Wallin, B. G., Seymour, A., Richardson, S., Hawkins, P. N. und et al. (1993a). Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 341:1113-1116.
- Holmgren, G., Lundgren, E., Kangawa, K., Kurihara, T., Matsukura, S., Matsuo, H., Nakazato, M. und Steen, L. (1993b). Diagnostic radioimmunoassay and DNA-analysis in Swedish and Japanese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. Homozygosity for the TTR met30 gene. *Acta Neurol Scand* 87:124-127.
- Izant, J. G. und Weintraub, H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36:1007-15.
- James, H. A. und Gibson, I. (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* 91:371-82.
- Jarvis, T. C., Alby, L. J., Beaudry, A. A., Wincott, F. E., Beigelman, L., McSwiggen, J. A., Usman, N. und Stinchcomb, D. T. (1996a). Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by ribozymes that cleave c-myc mRNA. *RNA* 2:419-28.
- Jarvis, T. C., Wincott, F. E., Alby, L. J., McSwiggen, J. A., Beigelman, L., Gustofson, J., DiRenzo, A., Levy, K., Arthur, M., Matulic-Adamic, J., Karpeisky, A., Gonzalez, C., Woolf, T. M., Usman, N. und Stinchcomb, D. T. (1996b). Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myc. *J Biol Chem* 271:29107-12.
- Kanda, Y., Goodman, D. S., Canfield, R. E. und Morgan, F. J. (1974). The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem* 249:6796-6805.
- Karikó, K., Megyeri, K., Xiao, Q. und Barnathan, E. S. (1994). Lipofectin-aided cell delivery of ribozyme targeted to human urokinase receptor mRNA. *FEBS Lett* 352:41-4.
- Kelly, J. W. (1998a). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* 8:101-6.
- Kelly, J. W. (1998b). The environmental dependency of protein folding best explains prion and amyloid diseases [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:930-2.
- Kelly, J. W., Colon, W., Lai, Z., Lashuel, H. A., McCulloch, J., McCutchen, S. L., Miroy, G. J. und Peterson, S. A. (1997). Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid. *Adv Protein Chem* 50:161-81.
- Kitajima, I., Hanyu, N., Soejima, Y., Hirano, R., Arahira, S., Yamaoka, S., Yamada, R., Maruyama, I. und Kaneda, Y. (1997). Efficient transfer of synthetic ribozymes into cells using hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-cationic liposomes. Application for ribozymes that target human t-cell leukemia virus type I tax/rex mRNA. *J Biol Chem* 272:27099-106.
- Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J. F. und Ohnuma, T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res* 54:1271-5.
- Lai, Z., Colon, W. und Kelly, J. W. (1996). The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry* 35:6470-6482.
- Lai, Z., McCulloch, J., Lashuel, H. A. und Kelly, J. W. (1997). Guanidine hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochemistry* 36:10230-9.

- Lamond, A. I. und Sproat, B. S. (1993). Antisense oligonucleotides made of 2'-O-alkylRNA: their properties and applications in RNA biochemistry. *FEBS Lett* 325:123-7.
- Lan, N., Howrey, R. P., Lee, S. W., Smith, C. A. und Sullenger, B. A. (1998). Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science* 280:1593-6.
- Lashuel, H. A., Lai, Z. und Kelly, J. W. (1998). Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. *Biochemistry* 37:17851-64.
- Lasic, D. D. und Papahadjopoulos, D. (1995). Liposomes revisited. *Science* 267:1275-6.
- Lee, N. S., Bertrand, E. und Rossi, J. J. (1997). In "Ribozyme Protocols" (P. C. Turner, ed.), vol. Enhancement of ribozyme function by RNA binding proteins, pp. 275-279. Human Press, Totowa.
- Leirdal, M. und Sioud, M. (1998). High cleavage activity and stability of hammerhead ribozymes with a uniform 2'-amino pyrimidine modification. *Biochem Biophys Res Commun* 250:171-4.
- Lewis, J. G., Lin, K. Y., Kothavale, A., Flanagan, W. M., Matteucci, M. D., DePrince, R. B., Mook, R. A. J., Hendren, R. W. und Wagner, R. W. (1996). A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3176-81.
- Lewis, W. D., Skinner, M., Simms, R. W., Jones, L. A., Cohen, A. S. und Jenkins, R. L. (1994). Orthotopic liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Transplant* 8:107-110.
- L'Huillier, P. J., Davis, S. R. und Bellamy, A. R. (1992). Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in alpha-lactalbumin mRNA levels in C1271 mouse cells. *EMBO J* 11:4411-8.
- L'Huillier, P. J., Soulier, S., Stinnakre, M. G., Lepourry, L., Davis, S. R., Mercier, J. C. und Vilotte, J. L. (1996). Efficient and specific ribozyme-mediated reduction of bovine alpha-lactalbumin expression in double transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6698-703.
- Lieber, A., He, C. Y., Polyak, S. J., Gretch, D. R., Barr, D. und Kay, M. A. (1996). Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol* 70:8782-91.
- Lieber, A. und Kay, M. A. (1996). Adenovirus-mediated expression of ribozymes in mice. *J Virol* 70:3153-8.
- Lieber, A. und Strauss, M. (1995). Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol Cell Biol* 15:540-51.
- Linke, R. P. (1987). Die Amyloidosen. Pathogenetisch exakte Klassifizierung und Möglichkeit einer Amyloid-spezifischen Therapie. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 16:144-152.
- Linke, R. P. (1996). In "Klinische Immunologie" (H. H. Peter und W. J. Pichler, eds), 2 edn., vol. Amyloidosen, pp. 822-833, München, Wien, Baltimore.
- Lobentanz, E. M. und Dieplinger, H. (1997). Biogenesis of lipoprotein(a) in human and animal hepatocytes. *Electrophoresis* 18:2677-81.
- Loke, S. L., Stein, C. A., Zhang, X. H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J. S. und Neckers, L. M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3474-8.

- Long, D. M., LaRiviere, F. J. und Uhlenbeck, O. C. (1995). Divalent metal ions and the internal equilibrium of the hammerhead ribozyme. *Biochemistry* 34:14435-40.
- Lott, W. B., Pontius, B. W. und von Hippel, P. H. (1998). A two-metal ion mechanism operates in the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of an RNA substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:542-7.
- Ludwig, J., Blaschke, M. und Sproat, B. S. (1998). Extending the cleavage rules for the hammerhead ribozyme: mutating adenosine15.1 to inosine15.1 changes the cleavage site specificity from N16.2U16.1H17 to N16.2C16.1H17. *Nucleic Acids Res* 26:2279-85.
- Lyngstadaas, S. P., Risnes, S., Sproat, B. S., Thrane, P. S. und Prydz, H. P. (1995). A synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel in vivo. *EMBO J* 14:5224-9.
- Majumdar, A., Khorlin, A., Dyatkina, N., Lin, F. L., Powell, J., Liu, J., Fei, Z., Khripine, Y., Watanabe, K. A., George, J., Glazer, P. M. und Seidman, M. M. (1998). Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides. *Nat Genet* 20:212-4.
- Malone, R. W., Felgner, P. L. und Verma, I. M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6077-81.
- Martone, R. L., Herbert, J., Dwork, A. und Schon, E. A. (1988). Transthyretin is synthesized in the mammalian eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 151:905-912.
- Masuda, Y., Kobayashi, H., Holland, J. F. und Ohnuma, T. (1998). Reversal of multidrug resistance by a liposome-MDR1 ribozyme complex. *Cancer Chemother Pharmacol* 42:9-16.
- McCutchen, S. L., Lai, Z., Miroy, G. J., Kelly, J. W. und Colon, W. (1995). Comparison of lethal und nonlethal transthyretin variants and their relationship to amyloid disease. *Biochemistry* 34:13527-13536.
- Mirabelli, C. K., Bennett, C. F., Anderson, K. und Crooke, S. T. (1991). In vitro and in vivo pharmacologic activities of antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des* 6:647-61.
- Miroy, G. J., Lai, Z., Lashuel, H. A., Peterson, S. A., Strang, C. und Kelly, J. W. (1996). Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15051-6.
- Mita, S., Maeda, S., Shimada, K. und Araki, S. (1984). Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin. *Biochem Biophys Res Commun* 124:558-64.
- Monia, B. P., Johnston, J. F., Ecker, D. J., Zounes, M. A., Lima, W. F. und Freier, S. M. (1992). Selective inhibition of mutant Ha-ras mRNA expression by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 267:19954-62.
- Moses, A. C., Rosen, H. N., Moller, D. E., Tsuzaki, S., Haddow, J. E., Lawlor, J., Liepnieks, J. J., Nichols, W. C. und Benson, M. D. (1990). A point mutation in transthyretin increases affinity for thyroxine and produces euthyroid hyperthyroxinemia. *J Clin Invest* 86:2025-33.
- Nakazato, M., Kangawa, K., Minamino, N., Tawara, S., Matsuo, H. und Araki, S. (1984). Radioimmunoassay for detecting abnormal prealbumin in the serum for diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* 122:719-725.

- NC-IUB. (1981). Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Newsletter 1981. *J Biol Chem* 256:12-4.
- Oatley, S. J., Blaney, J. M., Langridge, R. und Kollman, P. A. (1984). Molecular-mechanical studies of hormone-protein interactions: the interaction of T4 and T3 with prealbumin. 23:2931-41.
- Ojwang, J. O., Hampel, A., Looney, D. J., Wong-Staal, F. und Rappaport, J. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10802-6.
- Olsen, D. B., Benseler, F., Aurup, H., Pieken, W. A. und Eckstein, F. (1991). Study of a hammerhead ribozyme containing 2'-modified adenosine residues. *Biochemistry* 30:9735-41.
- Paoletta, G., Sproat, B. S. und Lamond, A. I. (1992). Nuclease resistant ribozymes with high catalytic activity. *EMBO J* 11:1913-9.
- Perkins, T. A., Wolf, D. E. und Goodchild, J. (1996). Fluorescence resonance energy transfer analysis of ribozyme kinetics reveals the mode of action of a facilitator oligonucleotide. *Biochemistry* 35:16370-7.
- Perreault, J. P., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. H. und Cedergren, R. (1991). Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. *Biochemistry* 30:4020-5.
- Perreault, J. P., Wu, T. F., Cousineau, B., Ogilvie, K. K. und Cedergren, R. (1990). Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity. *Nature* 344:565-7.
- Peterson, S. A., Klabunde, T., Lashuel, H. A., Purkey, H., Sacchettini, J. C. und Kelly, J. W. (1998). Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12956-60.
- Pieken, W. A., Olsen, D. B., Benseler, F., Aurup, H. und Eckstein, F. (1991). Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* 253:314-7.
- Pley, H. W., Flaherty, K. M. und McKay, D. B. (1994). Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372:68-74.
- Pomfret, E. A., Lewis, W. D., Jenkins, R. L., Bergethon, P., Dubrey, S. W., Reisinger, J., Falk, R. H. und Skinner, M. (1998). Effect of orthotopic liver transplantation on the progression of familial amyloidotic polyneuropathy. *Transplantation* 65:918-25.
- Pontius, B. W., Lott, W. B. und von Hippel, P. H. (1997). Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two-divalent-metal-ion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2290-4.
- Portman, D. S. und Dreyfuss, G. (1994). RNA annealing activities in HeLa nuclei. *EMBO J* 13:213-21.
- Pröpsting, M. J., Blaschke, M., Haas, R. E., Genschel, J., Hedrich, H. J., Manns, M. P. und Schmidt, H. H. (1999). Inosine(15.1) hammerhead ribozymes for targeting the transthyretin-30 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 260:313-7.
- Ramezani, A. und Joshi, S. (1996). Comparative analysis of five highly conserved target sites within the HIV-1 RNA for their susceptibility to hammerhead ribozyme-mediated cleavage in vitro and in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:229-35.

- Reilly, M. M., Adams, D., Davis, M. B., Said, G. und Harding, A. E. (1995). Haplotype analysis of French, British and other European patients with familial amyloid polyneuropathy (met 30 and tyr 77). *J Neurol* 242:664-668.
- Rossi, J. J., Elkins, D., Zaia, J. A. und Sullivan, S. (1992). Ribozymes as anti-HIV-1 therapeutic agents: principles, applications, and problems. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8:183-9.
- Rungger-Brändle, E., Chaponnier, C. und Gabbiani, G. (1979). Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation. *Nature* 282:320-1.
- Sakamoto, N., Wu, C. H. und Wu, G. Y. (1996). Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest* 98:2720-8.
- Sakamoto, T., Kim, M. H., Kurihara, Y., Sasaki, N., Noguchi, T., Katahira, M. und Uesugi, S. (1997). Properties of a hammerhead ribozyme with deletion of stem II. *J Biochem (Tokyo)* 121:288-94.
- Saraiva, M. J., Costa, P. P. und Goodman, D. S. (1983). Studies on plasma transthyretin (prealbumin) in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. *J Lab Clin Med* 102:590-603.
- Sarver, N., Cantin, E. M., Chang, P. S., Zaia, J. A., Ladne, P. A., Stephens, D. A. und Rossi, J. J. (1990). Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 247:1222-5.
- Sasaki, H., Yoshioka, N., Takagi, Y. und Sakaki, Y. (1985). Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene* 37:191-7.
- Scherzinger, C. A., Yates, A. A. und Knecht, D. A. (1992). Variables affecting antisense RNA inhibition of gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 660:45-56.
- Scherr, M., Grez, M., Ganser, A. und Engels, J. W. (1997). Specific hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mutant N-ras mRNA in vitro and ex vivo. Oligoribonucleotides as therapeutic agents. *J Biol Chem* 272:14304-13.
- Schmidt, H. H., Pröpsting, M. J. und Manns, M. P. (1999). [Hereditary amyloidosis]. *Internist (Berl)* 40:493-501.
- Schmidt, H. H.-J., Nashan, B., Pröpsting, M. J., Nakazato, M., Flemming, P., Kubicka, S., Böker, K., Pichlmayr, R. und Manns, M. P. (1998). Familial amyloid polyneuropathy: domino liver transplantation. *30:293-298*.
- Scott, W. G. und Klug, A. (1996). Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis. *Trends Biochem Sci* 21:220-4.
- Serpell, L. C., Sunde, M., Fraser, P. E., Luther, P. K., Morris, E. P., Sangren, O., Lundgren, E. und Blake, C. C. (1995). Examination of the structure of the transthyretin amyloid fibril by image reconstruction from electron micrographs. *J Mol Biol* 254:113-8.
- Sheldon, C. C., Jeffries, A. C., Davies, C. und Symons, R. H. (1990). In "Nucleic Acids and Molecular Biology" (F. Eckstein und D. M. J. Lilley, eds), vol. RNA Self-Cleavage by Hammerhead Structure., pp. 227-242. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shimayama, T., Nishikawa, S. und Taira, K. (1993). Cleavage of the highly conserved hairpin-loop region of HIV-1 by synthetic ribozymes. *Nucleic Acids Symp Ser* 177-8.

- Shimayama, T., Nishikawa, S. und Taira, K. (1995). Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry* 34:3649-54.
- Sioud, M. (1996). Ribozyme modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by peritoneal cells in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 26:1026-31.
- Sioud, M., Natvig, J. B. und Førre, O. (1992). Preformed ribozyme destroys tumour necrosis factor mRNA in human cells. *J Mol Biol* 223:831-5.
- Sioud, M., Opstad, A., Zhao, J. Q., Levitz, R., Benham, C. und Drlica, K. (1994). In vivo decay kinetic parameters of hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res* 22:5571-5.
- Sipe, J. D. (1994). Amyloidosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 31:325-354.
- Skinner, M., Connors, L. H., Rubinow, A., Libbey, C., Sipe, J. D. und Cohen, A. S. (1985). Lowered prealbumin levels in patients with familial amyloid polyneuropathy (FAP) and their non-affected but at risk relatives. *Am J Med Sci* 289:17-21.
- Smith, A. E. (1995). Viral vectors in gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 49:807-38.
- Snyder, D. S., Wu, Y., Wang, J. L., Rossi, J. J., Swiderski, P., Kaplan, B. E. und Forman, S. J. (1993). Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line. *Blood* 82:600-5.
- Soprano, D. R., Herbert, J., Soprano, K. J., Schon, E. A. und Goodman, D. S. (1985). Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J Biol Chem* 260:11793-11798.
- Sparkes, R. S., Sasaki, H., Mohandas, T., Yoshioka, K., Klisak, I., Sakaki, Y., Heinzmann, C. und Simon, M. I. (1987). Assignment of the prealbumin (PALB) gene (familial amyloidotic polyneuropathy) to human chromosome region 18q11.2-q12.1. *Hum Genet* 75:151-4.
- Sproat, B. S. (1996). Synthetic catalytic oligonucleotides based on the hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Mol Biol* 10:265-282.
- Sproat, B. S., Lamond, A. I., Garcia, R. G., Beijer, B., Pielers, U., Douglas, M., Bohmann, K., Carmo-Fonseco, M., Weston, S. und O'Loughlin, S. (1991). 2'-O-alkyloligoribonucleotides, synthesis and applications in molecular biology. *Nucleic Acids Symp Ser* 59-62.
- Stage-Zimmermann, T. K. und Uhlenbeck, O. C. (1998). Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* 4:875-89.
- Stangou, A. J., Heaton, N. D., Rela, M., Pepys, M. B., Hawkins, P. N. und Williams, R. (1998). Domino hepatic transplantation using the liver from a patient with familial amyloid polyneuropathy. *65:1496-8*.
- Suga, H., Cowan, J. A. und Szostak, J. W. (1998). Unusual metal ion catalysis in an acyl-transferase ribozyme. *Biochemistry* 37:10118-25.
- Sun, L.-Q., Gerlach, W. L. und Symonds, G. (1996). The use of ribozymes to inhibit HIV replication. *Nucleic Acids Mol Biol* 10:329-342.
- Symons, R. H. (1989). Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends Biochem Sci* 14:445-50.
- Symons, R. H. (1992). Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem* 61:641-71.

- Taylor, N. R., Kaplan, B. E., Swiderski, P., Li, H. und Rossi, J. J. (1992). Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozymes have enhanced in vitro catalytic efficiency and increased stability in vivo. *Nucleic Acids Res* 20:4559-65.
- Terry, C. J., Damas, A. M., Oliveira, P., Saraiva, M. J., Alves, I. L., Costa, P. P., Matias, P. M., Sakaki, Y. und Blake, C. C. (1993). Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *EMBO J* 12:735-741.
- Thomson, J. B. (1996). The hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Mol Biol* 10:173-196.
- Tsuzuki, T., Mita, S., Maeda, S., Araki, S. und Shimada, K. (1985). Structure of the human prealbumin gene. *260:12224-12227*.
- Uhlenbeck, O. C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328:596-600.
- Usman, N. und Stinchcomb, D. T. (1996). Design, synthesis and funktion of therapeutic ribozymes. *Nucleic Acids Mol Biol* 10:243-264.
- van Tol, H., Buzayan, J. M., Feldstein, P. A., Eckstein, F. und Bruening, G. (1990). Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. *Nucleic Acids Res* 18:1971-5.
- Varga, J. und Wohlgethan, J. R. (1988). The clinical and biochemical spectrum of hereditary amyloidosis. *Semin Arthritis Rheum* 18:14-28.
- Vatassery, G. T., Quach, H. T., Smith, W. E., Benson, B. A. und Eckfeldt, J. H. (1991). A sensitive assay of transthyretin (prealbumin) in human cerebrospinal fluid in nanogram amounts by ELISA. *Clin Chim Acta* 197:19-25.
- Ventura, M., Wang, P., Franck, N. und Saragosti, S. (1994). Ribozyme targeting of HIV-1 LTR. *Biochem Biophys Res Commun* 203:889-98.
- Wallace, M. R., Naylor, S. L., Kluge Beckerman, B., Long, G. L., McDonald, L., Shows, T. B. und Benson, M. D. (1985). Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochem Biophys Res Commun* 129:753-758.
- Watanabe, S., Ikegawa, S.-I., Yi, S., Araki, S. und Yamamura, K.-I. (1993). Immunohistochemical and morphological studies of amyloid fibril protein from transgenic mice of familial amyloidotic polyneuropathy. *Kumamoto Med J* 44:9-17.
- Westermarck, P., Pitkanen, P., Benson, L., Vahlquist, A., Olofsson, B. O. und Cornwell, G. G. (1985). Serum prealbumin and retinol-binding protein in the prealbumin-related senile and familial forms of systemic amyloidosis. *Lab Invest* 52:314-318.
- Williams, D. M., Pieken, W. A. und Eckstein, F. (1992). Function of specific 2'-hydroxyl groups of guanosines in a hammerhead ribozyme probed by 2' modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:918-21.
- Woolf, T. M. (1995). To cleave or not to cleave: ribozymes and antisense. *Antisense Res Dev* 5:227-32.
- Yakubov, L. A., Deeva, E. A., Zarytova, V. F., Ivanova, E. M., Rytte, A. S., Yurchenko, L. V. und Vlassov, V. V. (1989). Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6454-8.
- Yamamura, K., Wakasugi, S., Maeda, S., Inomoto, T., Iwanaga, T., Uehira, M., Araki, K., Miyazaki, J. und Shimada, K. (1987). Tissue-specific and developmental expression of human transthyretin gene in transgenic mice. *Dev Genet* 8:195-205.
- Yang, J. H., Usman, N., Chartrand, P. und Cedergren, R. (1992). Minimum ribonucleotide requirement for catalysis by the RNA hammerhead domain. *Biochemistry* 31:5005-9.

- Yoon, K., Cole-Strauss, A. und Kmiec, E. B. (1996). Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2071-6.
- Zamecnik, P. C. und Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:280-4.
- Zhang, X., Yamada, R., Shimayama, T., Imada, K., Uchiyama, T. und Hattori, T. (1996). Phosphorothiolate ribozyme against the conserved sequence in V3 loop of HIV-1. *Biochem Biophys Res Commun* 229:466-71.
- Zhou, C., Bahner, I., Rossi, J. J. und Kohn, D. B. (1996). Expression of hammerhead ribozymes by retroviral vectors to inhibit HIV-1 replication: comparison of RNA levels and viral inhibition. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:17-24.
- Zoumadakis, M. und Tabler, M. (1995). Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res* 23:1192-6.
- Zuker, M. (1989a). Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol* 180:262-88.
- Zuker, M. (1989b). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244:48-52.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. M. P. Manns für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie sowie für die Möglichkeit die vorliegende Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen.

Herrn PD Dr. W. Müller danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die Übernahme des Referats als mein Doktorvater.

Herrn PD Dr. Hartmut H.-J. Schmidt gilt mein besonderer Dank für die kompetente fachliche Beratung und Hilfestellung bei dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferats.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, besonders Monika Seifert für so manche Nephelometer-Messung. Bei Thomas Bock und Florian Kühnel bedanke ich mich für die Beratung bei Molekularbiologischen Methoden. Der Arbeitsgruppe von Stefan Kubicka danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei den Retrovirus-Arbeiten.

Bei Martina Blaschke bedanke ich mich ganz besonders für die Unterweisung im Umgang mit RNA und Ribozymen.

Ich danke Herrn Professor Maeda (Japan) für die Überlassung der TTR cDNA und Herrn Professor Yamamura (Japan) für die Überlassung der transgenen Mäuse. Bei Herrn Professor Nakazato (Japan) möchte ich mich für die TTR-Met30-Messung (RIA) bedanken.

Insbesondere bei den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Schmidt, Janine Genschel, Regina Haas und Beate Wolfram möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei meiner Arbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Lars Komorowski danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Frau Steffi, die mir während meiner Promotion immer geduldig zur Seite stand und so manchen Fehler bei der Durchsicht dieser Arbeit entdeckt hat.

Auch bei meiner Tochter Marie bedanke ich mich dafür, dass sie mich durch ihre ganz besondere Art immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückholte.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich bei meinem Berufswunsch stets ohne Vorbehalt und Zögern unterstützt haben.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, im November 1999

## Lebenslauf

Name: Marcus Johannes Pröpsting  
Geburtsdatum: 23. Juli 1969  
Geburtsort: Hildesheim  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet mit Stefanie Pröpsting, geb. Müller, 28 Jahre  
Tochter Marie, 10 Monate

### schulischer und beruflicher Werdegang:

1976 - 1980 Marienschule Nordhorn  
1980 - 1982 Orientierungsstufe Frensdorfer Schule Nordhorn  
1982 - 1989 Gymnasium Nordhorn  
April 1989 Abitur

1989 -1991 Zivildienst

### Studium:

Okt. 1991 - Nov. 1996 Fach: Diplom Biochemie an der Universität Hannover  
April 1996 Diplomprüfungen an der Universität Hannover  
Mai-Oktober 1996 Diplomarbeit: Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung  
Gastroenterologie und Hepatologie, Prof. Manns  
November 1996 Erwerb des Diploms im Fach Biochemie

### Promotion:

Januar 1997 Beginn der Promotion in der Abteilung Gastroenterologie und  
Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover,  
Prof. M.P. Manns, Arbeitsgruppe PD H.H.-J. Schmidt unter  
Anleitung von PD W. Müller  
Juli 1997 Stipendium, Graduiertenförderung der Medizinischen Hoch-  
schule Hannover