

7 Zusammenfassung

Expression von caninem IL-4 in E.coli und Säugerkzellen (CHO-Zellen/canine Knorpelzellen) sowie Entwicklung eines direkten Sandwich-ELISA zur Messung von caninem Interleukin-4

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Zielzellen und Transfektionsmechanismen zu finden sowie eine geeignete Meßmethode für das canine IL-4 zu entwickeln, um in der Zukunft eine Gentherapie mit Interleukin-4 gegen die rheumatoide Arthritis beim Hund einsetzen zu können. Das canine IL-4 wurde in unserem Institut kloniert und in einen Transfektionsvektor für Säugerkzellen (pcDNA3.1) einkloniert. Wie aus zahlreichen Studien hervorgeht, eignen sich Knorpelzellen besonders als Zielzellen für eine Transfektion und zur späteren Transplantation in das erkrankte Gelenk. Da eine canine Knorpelzelllinie kommerziell nicht zu erhalten war, wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Knorpelzellen vom Hund verwandt. Als Kontrollzellen für die Transfektionen dienten CHO-Zellen. Die Transfektion wurde mit kationischen Lipiden (LipofectAMINE-PLUSTM) durchgeführt, um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen und gleichzeitig die potentielle Gefahr, die von viralen Vektoren ausgehen kann, auszuschließen. Um die Transfektionseffizienz qualitativ erfassen zu können, wurde das Gen für canines IL-4 ebenfalls in ein GFP-Plasmid mit dem Ziel einkloniert, eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Transfektion zu erhalten. Die Transfektionseffizienz betrug ca. 35%. Zusätzlich wurde die mRNA der transfizierten CHO- und Knorpelzellen mit Hilfe des TriStar-Reagenz gewonnen und mittels RT-PCR nachgewiesen. Um die Expression von IL-4 quantitativ messen zu können, wurde der Doppel-Sandwich-ELISA entwickelt; zur Erreichung einer höheren Sensitivität, wurde das Verstärkersystem Biotin/Streptavidin verwandt. Diese (Nachweisgrenze/Empfindlichkeit) belief sich auf 0,1 ng/ ml = 5 pg Gesamtproteinmenge. Die Messungen des IL-4 im Zellkulturüberstand der transfizierten Knorpelzellen ergab, daß es möglich war, bis zu 260 ng/ml exprimiertes IL-4 von ca. 10² Knorpelzellen zu erhalten. Als nächstes muß nun gezeigt werden, daß die hohe Expressionsrate des IL-4 der transfizierten Knorpelzellen ausreicht, um genügend therapeutische Effekte im erkrankten Gelenk erzielen zu können. Ist dies der Fall, dann ist man damit der Entwicklung einer Gentherapie gegen die rheumatoide Arthritis des Hundes einen großen Schritt näher gekommen.

Die Gentherapie stellt in vielen Bereichen ein vielversprechendes Behandlungskonzept dar. Gerade im Bereich der Orthopädie besteht ein großes wissenschaftliches Interesse, diese Behandlungsmethode einzusetzen. Der gezielte Einsatz des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-4 bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis ist in zahlreichen Studien der Humanmedizin beschrieben worden.