(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 986 T2** 2008.02.07

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 742 723 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 986.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/14888**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 906 116.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/017911**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.12.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **06.07.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.11.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **06.06.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.02.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 49/00*** (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
175469 **30.12.1993** **US**

(73) Patentinhaber:
Cell Genesys, Inc., South San Francisco, Calif., US; University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, N.C., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
KUCHERLAPATI, Raju, Darien, CT 06829, US; KOLLER, Beverly H., Carrboro, NC 27510, US; SMITHIES, Oliver, Chapel Hill, NC 27514, US; DUBRIDGE, Robert B., Belmont, CA 94002, US; GREENBURG, Gary, San Carlos, CA 94070, US; CAPON, Daniel J., Hillsborough, CA 94010, US; WILLIAMS, Steven R., San Francisco, CA 94131-2221, US; LOURDES ARBONES DE RAFAEL, Maria, San Francisco, CA 94110, US

(54) Bezeichnung: **HOMOLOGE REKOMBINATION FÜR UNIVERSELLE DONORZELLEN UND CHIMERISCHE SÄUGETIERZELLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Das Gebiet der vorliegenden Erfindung ist die Erzeugung und Verwendung von Zellen, denen Haupthistokompatibilitätskomplex-Antigene fehlen, und Organen, denen die Expression des funktionellen Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC-)Antigens fehlt, die bei zellulären und Organtherapien, unter anderem bei der Transplantation, als Universalspender dienen können, sowie die Herstellung nicht menschlicher chimärer Säugetiere.

Hintergrund

[0002] Um Wirbeltiere vor Krankheit und Infektion zu schützen, haben sich umfassende Schutzmechanismen entwickelt. Bei Säugetieren dient das Immunsystem als Hauptverteidigung mit vielen verschiedenen Arten an Zellen und Mechanismen, um den Wirt zu schützen. Es existiert eine große Bandbreite an hämatopoetischen Zellen, wobei die Haupt-Schutzlinien lymphoid und myeloisch sind. Das Immunsystem, das aus Zellen lymphoider und myeloischer Linien entsteht, wird in vivo entwickelt, um Eigenes von Fremdem zu unterscheiden. Jene abnormalen Situationen, in denen das Immunsystem Eigenes angreift, wie z.B. bei Gelenkrheumatismus, Lupus erythematodes und gewissen Formen von Diabetes, belegen die Bedeutung der Tatsache für den Wirt, dass nur fremde Stoffe angegriffen werden sollen. Der Schutzmechanismus, der den Wirt vor Krankheiten als Resultat eines Eindringens von Viren, Bakterien oder anderen Pathogenen schützt, ist ebenfalls in der Lage, Zellen zu erkennen, die von einem anderen Säugetierwirt stammen, sogar von einem allogenen Wirt.

[0003] Als Teil des Systems zur Erkennung von Eigenem gegenüber Fremdem spielen die Oberflächenmembranprotein-Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC-)Antigene eine wichtige Rolle. Jeder Wirt besitzt eine persönliche Reihe an Klasse-I- und -II-MHC-Antigenen, die dazu dienen, jenen Wirt von anderen Wirten zu unterscheiden.

[0004] Das T-lymphoide System basiert auf der Erkennung der Gegenwart solcher MHC-Antigene als Eigenes. In Fällen, in denen es zu einer Transplantation von anderen allogenen Wirten kommt, kann das Transplantat vom Immunsystem angegriffen und zerstört werden, es sei denn, das Transplantat ist auf den Wirt abgestimmt oder das Immunsystem des Wirts ist beeinträchtigt. Kommt es zu einer Transplantation, die Lymphozyten, Monozyten oder deren Vorläufer umfasst, insbesondere Knochenmark, so kann ein Transplantat den Wirt als Fremdes angreifen, was zu einer Abstoßungserkrankung führt.

[0005] Es gibt viele Situationen, wo gewünscht werden kann, Zellen in einen empfangenden Wirt zu transplantieren, wenn die Zellen des Empfängers fehlen, geschädigt oder dysfunktionell sind. Ist das Immunsystem des Wirts beeinträchtigt, so kann es von Interesse sein, spezifische weiße Blutkörperchen, insbesondere T-Zellen, zuzuführen, die den Wirt vor verschiedenen Erkrankungen schützen können. Fehlt dem Wirt die Fähigkeit, eine Abwehr gegen eine bestimmte Erkrankung aufzubauen, so kann es ebenfalls von Interesse sein, spezifische T-Zellen oder B-Zellen oder Vorläufer dieser zu verabreichen, die das beeinträchtigte Immunsystem des Wirts ergänzen können. In anderen Fällen, wenn gewisse Zellen fehlen, wie z.B. die Langerhans-Inseln im Fall von Diabetes oder Zellen, die Dopamin sekretieren, im Fall der Parkinsonkrankheit, oder Knochenmarkszellen bei verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen oder Muskelzellen bei Krankheiten, die Muskeln abbauen, oder retinale Epithelzellen bei Sehstörungen oder Keratinozyten bei Verbrennungen oder nicht heilen wollenden Wunden, wäre es wünschenswert, Zellen bereitstellen zu können, welche die gewünschte Funktion erfüllen könnten. Damit die Zellen wirksam sein können, müssen sie vor dem Angriff durch den Wirt geschützt werden, so dass sie ihre Funktion erfüllen können, ohne durch das Immunsystem zerstört zu werden. Es ist daher von Interesse, wirksame Wege zur Produktion von Zellen zu finden, die, je nach Eignung, ihre Funktion erfüllen, sich vermehren und differenzieren können, während sie vor einem Angriff durch das Immunsystem eines Empfängers geschützt sind, z.B. durch die Verwendung des Gen-Targetings zur Deaktivierung der Expression von Genprodukten, die eine Abstoßung der transplantierten Zellen hervorrufen. Dieselben Gründe treffen auf die Verwendung von Organen zur Transplantation zu, betreffend unter anderem, jedoch nicht eingeschränkt auf, Herz, Lunge, Leber und Nieren.

[0006] Die homologe Rekombination ermöglicht ortspezifische Modifikationen in endogenen Genen, wodurch vererbte oder erworbene Mutationen korrigiert werden können und/oder neue Veränderungen in dem Genom durch gentechnische Maßnahmen geschaffen werden können. Die Anwendung der homologen Rekombination in der Gentherapie hängt von der Fähigkeit ab, die homologe Rekombination in normalen diploiden Somazellen wirksam durchzuführen. Die homologe Rekombination oder das „Gen-Targeting" in normalen Somazellen

zur Transplantation stellt ein potentiell leistungsstarkes Verfahren zur Gentherapie dar, jedoch wurde die homologe Rekombination mit der Ausnahme pluripotenter embryonaler Maus-Stamm-(ES-)Zellen sowie kontinuierlicher Zelllinien nicht für gut charakterisierte, nicht transformierte, d.h. „normale" Säugetier-Somazellen beschrieben. Im Gegensatz zu Maus-ES-Zelllinien können normale menschliche Somazellen in vitro eine endliche Lebenszeit aufweisen (Hayflick und Moorhead, Exptl. Cell. Res. 25, 585-621 (1961)). Das macht ihre Modifikation durch das Gen-Targeting besonders schwierig, bedingt durch die geringe Wirksamkeit dieses Verfahrens, d.h. 10^{-5} bis 10^{-8} Rekombinanten/Eingabe-Zelle. Weiters wird dieses Verfahren noch durch die Tatsache verkompliziert, dass Säugetierzellen dazu tendieren, transfizierte DNA an Zufallsstellen 100- bis 1000fach wirksamer zu integrieren als an der homologen Stelle.

[0007] Die vorliegende Erfindung offenbart Verfahren zum Abzielen auf nicht transformierte diploide Somazellen, um Gene zu deaktivieren, die mit der MHC-Antigenexpression assoziiert sind, unter anderem β_2-Mikroglobulin- und IFN-γR-Gene in Zellen, wie z.B. retinalen Epithelzellen, Keratinozyten und Myoblasten. Diese Verfahren stellen neue Targeting-Mittel zur Deaktivierung von Target-Genen bereit, was zu einem Fehlen der Expression von funktionellem MHC führt. In einem Verfahren der Erfindung zum Abzielen auf ganze Membranproteine kann die Rolle dieser Proteine untersucht werden und ihre Expression manipuliert werden, z.B. Membranproteine, die als Rezeptoren dienen, wie etwa T-Zellen-Rezeptoren.

[0008] Es gibt ebenfalls ein substantielles Interesse daran, in der Lage zu sein, verschiedene physiologische Prozesse in vivo in einem Tiermodell untersuchen zu können. In vielen dieser Situationen wäre es wünschenswert, (ein) spezifische(s) Gen(e) zu deaktivieren oder auf eine ortspezifische Art und Weise einzuführen. In Fällen, in denen alle oder ein substantieller Teil der Zellen, die in dem Wirt vorhanden sind, mutiert wären, könnten verschiedene Prozesse untersucht werden. Zusätzlich dazu könnten heterozygote Wirte mit einem Wildtyp-Gen und einem mutierten Gen gekreuzt werden, um homozygote Wirte zu erhalten, so dass alle der Zellen die geeignete Modifikation aufweisen würden. Solche genetisch mutierten Tiere könnten bei Arzneimittelscreenings, zur Untersuchung physiologischer Prozesse, zur Entwicklung neuer Produkte und dergleichen von Nutzen sein.

Einschlägige Literatur

[0009] Eine Reihe an Dokumenten beschreibt die Verwendung der homologen Rekombination in Säugetierzellen, unter anderem menschlichen Zellen. Beispiele dieser Dokumente sind Kucherlapati et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3153-3157 (1984); Kucherlapati et al., Mol. Cell. Bio. 5, 714-720 (1985); Smithies et al., Nature 317, 230-234 (1985); Wake et al., Mol. Cell. Bio. 8, 2080-2089 (1985); Ayares et al., Genetics 111, 375-388 (1985); Ayares et al., Mol. Cell. Bio. 7, 1656-1662 (1986); Song et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6820-6824 (1987); Thomas et al., Cell 44, 419-428 (1986); Thomas und Capecchi, Cell 51, 503-512 (1987); Nandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3845-3849 (1988), und Mansour et al., Nature 336, 348-352 (1988).

[0010] Evans und Kaufman, Nature 294, 146-154 (1981); Doetschman et al., Nature 330, 576-578 (1987); Thomas und Capecchi, Cell 51, 503-512 (1987); Thompson et al., Cell 56, 316-321 (1989), beschreiben einzeln verschiedene Aspekte der Verwendung der homologen Rekombination zur Schaffung spezifischer genetischer Mutationen in embryonalen Stammzellen und zum Transfer dieser Mutationen in die Keimbahn. Die Polymerasekettenreaktion, die für das Screening von Ereignissen der homologen Rekombination verwendet wird, wird in Kim und Smithies, Nucleic Acids Res. 16, 8887-8903 (1988); und Joyner et al., Nature 338, 153-156 (1989), beschrieben. Von der Kombination eines Mutanten-Polyoma-Enhancers und eines Thymidinkinase-Promotors zur Steuerung des Neomycin-Gens wurde von Thomas und Capecchi, s.o. (1987); Nicholas und Berg, Teratocarcinoma Stem Cell, 469-197, Cold Spring Harbor Lab., Siver, Martin und Strikland (Hrsg.), Cold Spring Harbor, NY (1983); und Linney und Donerly, Cell 35, 693-699 (1983), gezeigt, dass sie sowohl in embryonalen Stammzellen als auch in EC-Zellen aktiv ist.

[0011] Sog. nackte Lymphozyten werden in Schuurman et al., The Thymocyte in „Bare Lymphocyte" Syndrome in: Microenvironments in the Lymphoid System, G.G.B. Klaus (Hrsg.), 921-928, Plenum Press, NY (1985); Sullivan et al., J. Clin. Invest. 76, 75-79 (1985); Lisowska-Grospierre et al., ibid. 76, 381-385 (1985); Arens et al., J. Inf. Dis. 156, 837-841 (1987); Clement et al., J. Clin. Invest. 81, 669-675 (1988); Sugiyama et al., Chest 89, 398-401 (1986); sowie Hume et al., Human Immunology 25, 1-11(1989), beschrieben.

[0012] Über die Transplantation verschiedener normaler Somazellen zur Behandlung von Erbkrankheiten wurde bereits berichtet (Blaese et al., Human Gene Ther. 4, 521-527 (1993)). Kürzlich durchgeführte Transplantationsexperimente zeigen, dass die Myoblastentransplantation ein potentiell nützliches Vehikel zur Arzneimittelanlieferung darstellt (Barr et al., Science 254, 1507-1509 (1991), und Dhawan et al., Science 254,

1509-1512 (1991)). Die Transplantation normaler Myoblasten zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie und anderer Muskeldegenerations- und -abbaukrankheiten wurde z.B. von Partridge, Muscle & Nerve 14, 197-212 (1991), vorgeschlagen.

[0013] Interferon-Gamma (IFN-γ) ist ein Zytokin, das während des Infektions- und Entzündungsvorgangs erzeugt wird, das potentielle antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen zeigt (Trinchieri et al., Immunol. Today 6, 131-136 (1985); Pestka et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727-777 (1987); sowie Farrar et al., Ann. Rev. Immunol. 11, 571-611 (1993)). Von zahlreichen dieser Wirkungen wird angenommen, sie würden durch die Bindung an einen allgegenwärtig exprimierten hochaffinen Zelloberflächenrezeptor, den IFN-γ-Rezeptor, vermittelt (Aguet et al., Cell 55, 273-280 (1988)), der die Induktion von MHC-Antigenen auslöst (Rosa et al., Immunol. Today 5, 261-262 (1984)). Da IFN-γ die Expression der Produkte der Gene hinaufreguliert, die für β_2-Mikroglobulin und den Transporter der antigenen Peptide TAP-1 und TAP-2 kodieren, die mit der Expression des MHC-Klasse-I-Komplexes (Germain et al., Ann. Rev. Immunol. 11, 403-450 (1993)) sowie der Expression der MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle assoziiert sind (Pestka et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727-777 (1987); Farrar et al., Ann. Rev. Immunol. 11, 571-611 (1993); Rosa et al., Immunol. Today 5, 262-262 (1984), und Trowsdale et al., Nature 348, 741-744 (1990)), kann das Blockieren der Wirkungen von IFN-γ durch die Deaktivierung seines Rezeptors unter Verwendung der homologen Rekombination die zelluläre Abstoßung von allogenen Transplantaten verringern. Gezüchtete menschliche Myoblasten exprimieren sowohl MHC-Klasse-I- als auch -Klasse-II-Antigene in sehr geringen Mengen, ihre Expression steigt jedoch signifikant an nach der Behandlung mit IFN-γ (Bao et al., Immunol. Cell Biol. 68, 235-242 (1990)). Daher kann IFN-γ, das von T-Zellen freigesetzt wird, die in die Transplantationsstelle infiltrieren, bei einem allogenen Empfänger die MHC-Expression hinaufregulieren, was zu einer Abstoßung der Spender-Myoblasten führt. Da die Expression von MHC-Klasse I auch durch andere Zytokine, wie z.B. IFN-α und IFN-β und IL-1, hinaufreguliert werden kann, kann die Deaktivierung des IFN-γR mit der Deaktivierung anderer Gene kombiniert werden, die für die MHC-Klasse-I-Expression von Bedeutung sind, z.B. IL-1R-, TAP-1- und/oder TAP-2- und/oder β_2-Mikroglobulin- und/oder Proteasom-Gene, um Universalspender-Myoblasten zu produzieren, die über Histokompatibilitätsbarrieren transportiert werden können.

[0014] Schwartzberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3210-3214 (1990), beschreiben eine gezielte Genzerstörung eines endogenen c-abl-Locus durch homologe Rekombination mit DNA, die für ein selektierbares Fusionsprotein kodiert. Andere Verweise von Interesse umfassen Jasin et al., Genes & Development 4, 157-166 (1990), die das Gen-Targeting am menschlichen CD4-Locus durch die Epitop-Addition beschreiben, sowie Doetschman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 8583-8587 (1988), worin die abgezielte Mutation des Hprt-Gens in embryonalen Maus-Stammzellen unter Verwendung eines Targeting-DNA-Fragments beschrieben wird, das ein neo-Gen ohne Promotor enthält. Andere Verweise, die verschiedene Verwendungen des Neo-Gens beim Targeting beschreiben, umfassen Sedivy und Sharp, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, 227-231 (1989); Riele et al., Letters to Nature 348, 649-651 (1990); Jeannotte et al., Molec. and Cell. Biol. 11 (11), 5578-5585 (1991); Charron et al., Molec. Cell. Biol. 10 (4), 1799-1804 (1990); Stanton et al., Molec. Cell. Biol. 10 (12), 6755-6758 (1990).

[0015] Die erfolgreiche Anwendung des Gen-Targeting auf die Somazellen-Gentherapie erfordert die genaue Integration exogener DNA in den Target-Locus ohne das Induzieren anderer genetischer Veränderungen, die zu phänotypischen Anomalien in der Zielzelle führen. Es besteht eine fortlaufende Notwendigkeit für Verfahren, welche zu einer Anreicherung in den Rekombinationsvorkommnissen mit geringerer Häufigkeit, die in Somazellen auftreten, im Vergleich zu der Häufigkeit einer zufälligen Rekombination führen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0016] Säugetierzellen, denen zumindest ein funktionelles Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC-)Antigen fehlt, werden bereitgestellt, wobei sie dazu dienen können, den Immunangriff zu verringern, wenn sie für die Transplantation verwendet werden, besonders als Universalspenderzellen, etwa als nicht transformierte diploide menschliche Somazellen, oder als embryonale Stammzellen, die verwendet werden können, um chimäre Säugetiere zu erzeugen, welche die Mutation in sich tragen. Die Zellen werden als Resultat der homologen Rekombination erhalten. Insbesondere durch Deaktivieren von zumindest einem Allel von zumindest einer MHC-Antigenkette, z.B. einer MHC-α-Kette, oder eines β_2-Mikroglobulins können Zellen produziert werden, die eine reduzierte Fähigkeit zur Expression funktioneller MHC-Antigene aufweisen. Die daraus resultierenden Zellen, denen ein funktionelles MHC-Antigen fehlt, können als Spender zur Transplantation verwendet werden, denen Marker für einen Wirt-(Empfänger-)Immunangriff fehlen. Die Zellen können verwendet werden, um Gewebe zur Transplantation zu erzeugen. Die Zellen können auch in vitro verwendet werden, um mit anderen Zellen wechselzuwirken. Transgene Tiere, die dieses Merkmal aufweisen, können in der Studie der Immunde-

fizienz verwendet werden und können als Quelle für Gewebearten und Zellen zur Transplantation verwendet werden.

[0017] Alternativ dazu werden Zellen, die deaktivierte Gene enthalten, die mit der Expression des MHC-Antigens assoziiert sind, z.B. das IFN-γR-Gen, unter Verwendung der Verfahren der Erfindung erhalten, um die Hinaufregulierung der MHC-Antigenexpression als Reaktion auf IFN-γ zu vermeiden, was zu einer Erzeugung von Spenderzellen führt, denen die Fähigkeit fehlt, die Expression des MHC-Antigens hinaufzuregulieren.

[0018] Verfahren und Targeting-Konstrukte werden bereitgestellt, wobei eine homologe Rekombination in geringer Häufigkeit in nicht transformierten Somazellen schnell detektiert werden kann. In einem Verfahren der Erfindung wird ein DNA-Konstrukt, das einen starken Promotor und ein Epitop, das an einen Liganden zur Detektion bindet, sowie ein selektierbares Markergen enthält, auf eine Sequenz in dem Chromosom einer Zelle gerichtet, die für den Target-Locus der homologen Rekombination kodiert. Wird dieses DNA-Konstrukt in Zellen transfiziert, so wird ein Fusionsprotein exprimiert und außerhalb der Zelle sekretiert. Zusätzlich dazu werden neue Verfahren und Targeting-Konstrukte zur Deaktivierung ganzer Membranproteine durch Insertieren eines selektierbaren Markergens in die für das Protein kodierende Region stromab von einer Sequenz bereitgestellt, die für eine Leitsequenz und eine Transmembransequenz kodiert. Das Targeting-Konstrukt insertiert das selektierbare Markergen in das Gen, das für das ganze Membranprotein kodiert, um im Leseraster mit der stromauf gelegenen Sequenz zu sein und für ein Fusionsprotein mit dem Marker auf der zytoplasmatischen Seite der Membran zu kodieren und funktionell zu sein. Zellen werden mit den Konstrukten unter Verwendung der Verfahren der Erfindung transformiert und werden durch den selektierbaren Marker selektiert und anschließend auf die Gegenwart von Rekombinanten gescreent.

[0019] Die Wirksamkeit eines therapeutischen Mittels zur Prävention einer Transplantatabstoßung in einem Säugetier wird durch die Verabreichung eines therapeutischen Mittels, wie z.B. Cyclosporin, an das Säugetier bestimmt, in das Gewebe oder Zellen, denen die Expression des funktionellen MHC-Antigens fehlt, transplantiert wurden, sowie durch Beobachten auf die Gegenwart oder das Fehlen der Abstoßung der implantierten Gewebe oder Zellen über eine gewisse Zeitspanne.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0020] Die Fig. 1A-C zeigen ein Diagramm des Targeting-Vektors Nr. 137 (**Fig.** 3A), des menschlichen β_2-M-Locus (**Fig.** 3B) und des rekombinanten Locus mit korrektem Targeting (**Fig.** 3C), wie in Beispiel V, s.u., beschrieben.

[0021] Fig. 2 zeigt ein Diagramm des β_2-M-Targeting-Vektors Nr. 148, beschrieben in Beispiel V, s.u.

[0022] Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Neo-Ersatz-Targeting-Vektors Nr. 159, beschrieben in Beispiel VI, s.u.

[0023] Die Fig. 4A-C zeigen die Strategie zum Targeting des Maus-IFNγR-Gens, wie in Beispiel VIII, s.u., beschrieben: Fig. 4A zeigt ein Diagramm der IFNγR-Targeting-Vektoren pB-IT1 und pB-IT2 (punktierte Box in pB-IT1 deutet auf die Promotor-Enhancer-Sequenzen von MC1-Neo-Poly A hin); Fig. 4B zeigt die partielle Restriktionskarte des Wildtyp-IFNγR-Gens (durchgehende Linie = das BamHI-Fragment); schwarze Boxen = Exons; strichlierte Linien = Sequenzen außerhalb des BamHI-Fragments); Fig. 4C zeigt die prognostizierte Struktur des Target-Locus nach der homologen Rekombination (quer schraffierte Boxen = IFNγR-Sequenzen, die mit Sonde B hybridisieren; B = BamHI; H = HindIII; E = EcoRI und X = XbaI).

[0024] Die Fig. 5A-B zeigen Fluoreszenzprofile, welche die Expression von Antigenen in Maus-Myoblasten, wie in Beispiel VIII, s.u., beschrieben, zeigen. Fig. 5A zeigt die Expression von MHC-Klasse-I-Antigenen und der IFNγR-Bindungsdomäne in der Stamm-Myoblasten-Zelllinie (IFNγR, +/+), der Myoblasten-Zelllinie 4C17, auf die abgezielt wird (IFNγR, +/–), und in Myoblasten, die aus homozygoten Mutantenmäusen isoliert wurden (IFNγR, –/–); Fig. 5B zeigt die GR-20-Antigen-Expression in Maus-Myoblasten (gepunktete Linien stellen die Hintergrundbindung des fluoreszierenden Antikörpers dar).

BESCHREIBUNG SPEZIFISCHER AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0025] Gentechnisch veränderte Säugetierzellen, denen funktionelle MHC-Antigene fehlen, werden für eine Reihe an Zwecken bereitgestellt, z.B. als Universalspenderzellen zur Transplantation. Die Zellen werden als Resultat der homologen Rekombination erhalten. Die Zellen können weiter durch die Einführung oder Deaktivierung eines Gens von Interesse modifiziert werden.

[0026] Die modifizierten Zellen können verwendet werden, um transgene Tiere zu erzeugen, die eine reduzierte Expression an MHC-Antigenen in allen Gewebearten und Organen aufweisen. Solche Tiere, insbesondere Mäuse und andere kleine Säugetiere, können experimentell verwendet werden, um die Wirkung eines Mittels zu bestimmen, insbesondere zum Screening von Arzneimitteln. Sie können als Modellsystem für verschiedene Transplantationstherapien verwendet werden, unter anderem für Transplantate der Haut, der Nieren, der Leber etc.

[0027] Die homologe Rekombination kann zur Deaktivierung oder Veränderung von Genen auf eine ortspezifische Art und Weise verwendet werden, insbesondere bei einem Gen, das mit einem MHC-Antigen assoziiert ist. In Abhängigkeit von der Art der Zelle kann die Zelle, der zumindest ein funktionelles MHC-Antigen fehlt, als Spender für einen allogenen Wirt eingesetzt werden, oder im Fall einer embryonalen Stammzelle kann sie in der Produktion von transgenen Säugetierwirten Anwendung finden, die selbst als Quelle von Organen oder Zellen oder Geweben zur Transplantation verwendet werden könnten.

[0028] Die Klasse-I- und Klasse-II-MHC-Antigene sind Heterodimere, wobei jedes aus einer α- und einer β-Untereinheit besteht. Bei Klasse-I-MHC-Antigenen ist die β-Untereinheit ein β_2-Mikroglobulin. Von besonderem Interesse ist die Deaktivierung von zumindest einer, vorzugsweise beiden, Kopien einer Untereinheit eines MHC-Antigens, insbesondere β_2-Mikroglobulin. Wird eine Mutation im β_2-Mikroglobulin-Gen einer embryonalen Stammzelle produziert, so kann ein Säugetierwirt, der von der embryonalen Stammzelle abstammt, zur Untersuchung des Immunsystems und der Rolle des Klasse-I-MHC-Antigens in diesem System verwendet werden. Von besonderem Interesse sind Verfahren, die Zellen bereitstellen, denen zumindest ein funktionelles MHC-Antigen, Klasse I oder Klasse II, vorzugsweise Klasse I, fehlt, wobei die Zellen eine Reihe an Funktionen in einem lebensfähigen Wirt erfüllen. Das Verfahren umfasst die Transfektion von Säugetierzellen, insbesondere von normalen Zellen, einer vorherbestimmten Spezies mit DNA, die mit einem der Loci assoziiert ist, der mit dem β_2-Mikroglobulin-Gen, der/den α-Untereinheit(en) der Klasse-I- oder Klasse-II-MHC-Antigene oder der/den β-Untereinheit(en) der Klasse-II-MHC-Antigene verwandt ist. Die menschlichen Klasse-II-MHC-Antigene sind HLA-DR, -DP und -DQ, wobei das Hauptinteresse DR gilt.

[0029] Die DNA umfasst zumindest einen Teil des/der Gens/Gene am bestimmten Locus mit der Einführung einer Läsion in zumindest eine, normalerweise beide, Kopien des/der nativen Gens/Gene, um die Expression eines funktionellen MHC-Antigenmoleküls zu vermeiden. Die Läsion kann eine Insertion, Deletion, Substitution oder Kombination davon sein. Wird die Läsion in nur eine Kopie des Gens, das deaktiviert wird, eingeführt, so werden die Zellen mit einer einzelnen unmutierten Kopie des Target-Gens amplifiziert und können einem zweiten Targeting-Schritt unterzogen werden, wo die Läsion dieselbe sein kann oder sich von der ersten Läsion unterscheiden kann, wobei sie sich normalerweise unterscheidet und wo eine Deletion oder eine Substitution involviert ist, und zumindest einen Teil der ursprünglich eingeführten Läsion überlappen kann. In diesem zweiten Targeting-Schritt wird ein Targeting-Vektor mit denselben Homologiearmen, jedoch enthaltend einen anderen selektierbaren Säugetiermarker, z.B. Hygromycin-Resistenz (hyg^r), verwendet, um einen Klon, der einem homozygoten Targeting unterzogen wurde (Targeting-Wirksamkeit von etwa 10^{-5} bis 10^{-8}), zu erzeugen. Die resultierenden Transformanten werden auf die Abwesenheit eines funktionellen Target-Antigens gescreent, und die DNA der Zelle kann weiter gescreent werden, um die Abwesenheit eines Wildtyp-Target-Gens sicherzustellen. Alternativ dazu kann Homozygotie zu einem Phänotyp durch das Züchten von Wirten erreicht werden, die zu der Mutation heterozygot sind.

[0030] Alternativ dazu kann nach Zellen selektiert werden, die spontan homozygot wurden. Daher können Zellen die unveränderte Wildtyp-Kopie des Locus auf dem Chromosom verlieren, das keinem Targeting unterzogen wurde, z.B. durch das Nichttrennen homologer Chromosomen in heterozygoten Zellen. Dies entsteht während der Zellteilung aus dem inkorrekten Sortieren der vier Chromosomensätze in einer normalen diploiden Somazelle oder einer ES-Zelle. Normalerweise sortiert die Zelle während der Zellteilung eine Kopie eines jeden Chromosoms in jede von zwei Tochterzellen. Manchmal (Häufigkeiten von etwa 10^{-5}) sortiert die Zelle zwei Kopien desselben Chromosoms in eine der Tochterzellen und beide Kopien des anderen Chromosoms in die andere Tochterzelle. Meistens produziert dieser Mechanismus eine normale lebensfähige Zelle, die zwei Kopien des veränderten Gens enthält. Ein anderer Mechanismus, der eine homozygote Zelle spontan während der Zellteilung produziert, ist die Genkonversion. Bei geringen Häufigkeiten (weniger als 10^{-6}) bearbeitet eine Zelle ein Gen unter Verwendung seines Homologs als Bearbeitungsmatrize. Dies ist im Wesentlichen ein Rekombinationsvorkommnis, bei dem die Unterschiede zwischen zwei ähnlichen Genen entfernt (heraus editiert) werden. Dieses Editieren tritt über eine kurze Region hinweg auf (von 1 bis 1000 bp) und produziert Homozygoten. In der vorliegenden Erfindung exprimiert ein homozygoter Klon nicht mehr länger ein funktionelles MHC-Antigen, da er nicht mehr länger eines der Genprodukte exprimiert, auf die abgezielt wird. Eine Zelle exprimiert z.B. nicht länger funktionelles Klasse-I-MHC, wenn sie für das deaktivierte β_2-Mikroglobulin-Gen ho-

mozygot ist. Die heterozygoten Zellen können anschließend unter Verwendung einer Kombination von Anti-MHC-Klasse-I-Antikörpern und Komplement oder unter Verwendung einer Kombination der Antikörper und Magnetperlen (Vaccaro, Am. Biotech. Lab., 30-35 (1990)) oder FACS-Sortierung gegenselektiert werden. Zusätzlich dazu ermöglicht eine Verringerung der Wirksamkeit des Resistenzgens, z.B. durch eine Mutation in der Neo-Squenz oder dem Promotor, eine Selektion an Konzentrationen des Selektionsmittels, z.B. G418, wodurch das Wachstum der homozygoten Zellen, die zwei Kopien enthalten, gefördert wird, da es in heterozygoten Zellen nur eine einzelne Kopie des Resistenzgens gibt, z.B. neo^r, während es in einem homozygoten Klon zwei Kopien dieses Gens gibt (Mortensen et al., Mol. Cell. Biol. 12 (5), 2391-2395 (1992)). Zusätzlich dazu führt eine antibiotische Selektion in geringem Ausmaß zu einer Verschiebung einer Population hin zur Homozygotie während einer kontinuierlichen Vermehrung der Zellpopulation, da das Nichttrennen homologer Chromosomen ein reziprokes Vorkommnis ist und da die homozygote Wildtyp-Zelle gegenüber der antibiotischen Selektion sehr empfindlich ist.

[0031] Die Zellen, die einer Transformation unterzogen werden können, können beliebige Säugetierzellen von Interesse sein, die in der Zelltherapie, in der Forschung und in der Wechselwirkung mit anderen Zellen in vitro oder dergleichen von Nutzen sein können. Zellen von besonderem Interesse umfassen neben anderen Linien die Langerhans-Inseln, Zellen des Nebennierenmarks, die Dopamin sekretieren können, Osteoblasten, Osteoklasten, Epithelzellen, Endothelzellen, T-Lymphozyten, Neuronen, Gliazellen, Ganglionzellen, retinale Zellen, embryonale Stammzellen, Leberzellen, Knochenmarkszellen und Myoblasten-(Muskel-)Zellen. Die Zellen können von einem beliebigen Säugetierwirt stammen, unter anderem von Mäusen und anderen Nagetieren, Lagomorpha, Schweinen, Katzen, Rindern, Hunden, Menschen etc.

[0032] Die Zellen, denen die funktionelle MHC-Expression fehlt, werden selektiert, um eine bestimmte Funktion zu erreichen, in einen Säugetierwirt eingeführt oder für Forschungs- oder andere Zwecke verwendet. Ebenfalls von Interesse sind Stammzellen, die als die Vorläufer für beliebige der oben genannten Zellen fungieren, die der ursprüngliche Vorläufer oder eine Vorläuferzelle sein können, die bereits einer bestimmten Linie zugeschrieben wird. Von besonderem Interesse sind nicht transformierte diploide Säugetier-Somazellen, insbesondere menschliche Zellen, unter anderem Epithelzellen, wie z.B. Keratinozyten, retinale Epithelzellen und Mesenchymzellen, wie z.B. Myoblasten, hämatopoetische Zellen, Lymphozyten, wie z.B. T-Zellen, sowie andere Zellen, die in vitro leicht manipuliert werden können, für lange Zeitspannen in Kultur gehalten werden können und in einen Wirt eingeführt werden können, wo die Zellen für lange Zeitspannen lebensfähig und funktionell bleiben.

[0033] Für embryonale Stammzellen kann eine embryonale Stammzellenlinie verwendet werden, oder embryonale Stammzellen können frisch von einem Wirt, wie z.B. einem murinen Tier, z.B. einer Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Chinahamster oder anderen kleinen Labortieren, erhalten werden. Die Zellen können auf einer geeigneten Fibroblasten-Wachstumsschicht gezüchtet werden oder in Gegenwart des Leukämie inhibierenden Faktors (LIF) gezüchtet werden und anschließend zur Mutation verwendet werden.

[0034] Die zur Deaktivierung einer oder beider Kopien eines Gens verwendeten Verfahren, die mit einem bestimmten MHC-Antigen assoziiert sind, zur Produktion von Zellen, denen die Expression des funktionellen MHC-Antigens fehlt, sind ähnlich und unterscheiden sich hauptsächlich in der Wahl der Sequenz, dem verwendeten selektierbaren Marker und dem Verfahren, das verwendet wird, um die Abwesenheit des MHC-Antigens zu identifizieren, obwohl ähnliche Verfahren verwendet werden können, um die Abwesenheit der Expression eines bestimmten Antigens sicherzustellen. Da die Verfahren analog sind, werden die Deaktivierung des β_2-Mikroglobulin-Gens und des IFN-γR-Gens als Beispiele verwendet. Es ist ebenfalls davon auszugehen, dass im Wesentlichen dieselben Verfahren, jedoch mit anderen genetischen Sequenzen, für die α- und die β-Untereinheiten der Klasse-II-MHC-Antigene ausreichen sowie für andere Gene, die mit der funktionellen MHC-Antigenexpression assoziiert sind.

[0035] DNA-Konstrukte können verwendet werden, welche die gewünschte Einführung der Läsion in die Zelle bereitstellen. Die Konstrukte können modifiziert werden, um andere funktionelle Einheiten zu inkludieren als die mutierte Sequenz, die bei der Herstellung des Konstrukts, der Amplifikation, der Transfektion der Wirtszelle und der Integration des Konstrukts in die Wirtszelle von Nutzen sein könnten. Verfahren, die verwendet werden können, umfassen Calciumphosphat/DNA-Copräzipitate, DNA-Mikroinjektion in den Nucleus, Elektroporation, Bakterienprotoplastenfusion mit intakten Zellen, Transfektion oder dergleichen. Die DNA kann einzel- oder doppelsträngige, lineare oder zirkuläre, relaxierte oder supergeknäulte DNA sein. Für verschiedene Verfahren zur Transfektion von Säugetierzellen siehe Keown et al., Methods in Enzymology, Vol. 185, 527-537 (1990).

[0036] Die homologe Sequenz zum Targeting des Konstrukts kann eine oder mehrere Deletionen, Insertio-

nen, Substitutionen oder Kombinationen davon aufweisen. Das β_2-Mikroglobulin kann z.B. eine Deletion an einer Stelle und eine Insertion an einer anderen Stelle umfassen, die ein Gen inkludiert, das für die Selektion verwendet werden kann, wobei die Gegenwart des insertierten Gens zu einem defekten deaktivierten Proteinprodukt führt. Vorzugsweise werden Substitutionen verwendet. Für ein insertiertes Gen ist ein Gen von besonderem Interesse, das einen Marker bereitstellt, z.B. Antibiotikaresistenz, wie etwa Neomycinresistenz, unter anderem G418-Resistenz.

[0037] Die Deletion umfasst zumindest etwa 50 bp, häufiger zumindest etwa 100 bp und allgemein nicht mehr als etwa 20 kbp, worin die Deletion normalerweise zumindest einen Abschnitt der kodierenden Region umfasst, inkludierend einen Abschnitt eines oder mehrerer Exons, einen Abschnitt eines oder mehrerer Introns, und einen Abschnitt der flankierenden nicht kodierenden Regionen, insbesondere der nicht kodierenden 5'-Region (Transkriptionsregulationsregion) umfassen kann oder auch nicht. Daher kann sich die homologe Region weiter als die kodierende Region in die nicht kodierende 5'-Region oder, alternativ dazu, in die nicht kodierende 3'-Region erstrecken. Insertionen übersteigen allgemein 10 kbp nicht, normalerweise übersteigen sie 5 kbp nicht, allgemein umfassen sie zumindest 50 bp, häufiger zumindest 200 bp.

[0038] Die homologe Sequenz sollte zumindest etwa 100 bp, vorzugsweise zumindest etwa 150 bp, noch bevorzugter zumindest etwa 300 bp, der Target-Sequenz umfassen, wobei sie im Allgemeinen 20 kbp nicht übersteigt, normalerweise 10 kbp nicht übersteigt, vorzugsweise weniger als etwa einen Gesamtwert von 5 kbp, und wobei sie normalerweise zumindest etwa 50 bp auf gegenüberliegenden Seiten der Insertion und/oder der Deletion aufweist, um eine doppelte Crossover-Rekombination bereitzustellen.

[0039] Stromauf und/oder stromab vom Target-Genkonstrukt kann sich ein Gen befinden, das für die Identifikation dessen sorgt, ob es zu einem doppelten Crossover gekommen ist. Zu diesem Zweck kann das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen verwendet werden, da die Gegenwart des Thymidinkinase-Gens durch die Verwendung von Nucleosid-Analoga, wie z.B. Acyclovir oder Gancyclovir, für ihre zytotoxischen Wirkungen auf Zellen detektiert werden kann, die ein funktionelles HSV-tk-Gen enthalten. Das Fehlen der Empfindlichkeit gegenüber diesen Nucleosid-Analoga deutet auf das Fehlen des Thymidinkinase-Gens hin und daher darauf, dass es dort, wo es zu einer homologen Rekombination gekommen ist, auch zu einem doppelten Crossover-Vorkommnis gekommen ist.

[0040] Die Gegenwart des selektierbaren Markergens, das in das β_2-Mikroglobulin-Gen ist, legt die Integration des Target-Konstrukts in das Wirtsgenom fest. Es ist jedoch eine DNA-Analyse erforderlich, um festzustellen, ob es zu einer homologen oder zu einer nicht homologen Rekombination gekommen ist. Dies kann durch Verwendung von Sonden für das Insert und anschließendes Sequenzieren der 5'- und 3'-Regionen, die das Insert flankieren, auf die Gegenwart des β_2-Mikroglobulins, das sich weiter als die flanierenden Regionen des Konstrukts erstreckt, oder durch Identifikation der Gegenwart einer Deletion, wenn eine solche Deletion eingeführt wird, bestimmt werden.

[0041] Die Polymerasekettenreaktion kann vorteilbringend bei der Detektion der Gegenwart der homologen Rekombination verwendet werden. Primer können verwendet werden, die zu einer Sequenz innerhalb des Konstrukts komplementär sind und komplementär zu einer Sequenz außerhalb des Konstrukts und am Target-Locus sind. Auf diese Art und Weise können nur DNA-Duplexe erhalten werden, die beide Primer in den komplementären Ketten aufweisen, wenn es zu einer homologen Rekombination gekommen ist. Durch das Aufzeigen der Gegenwart der Primersequenzen oder der Sequenz mit der erwarteten Größe wird das Auftreten der homologen Rekombination unterstützt.

[0042] Das Konstrukt kann weiters ein Replikationssystem umfassen, das in der Säugetier-Wirtszelle funktionell ist. Meistens umfassen diese Replikationssysteme virale Replikationssysteme, wie z.B. Simian-Virus 40, Epstein-Barr-Virus, Papilloma-Virus, Adenovirus und dergleichen.

[0043] Ist ein Markergen involviert, als Insert und/oder flankierendes Gen, abhängig von der Art des Gens, so kann es Wildtyp-Transkriptionsregulationsregionen aufweisen, insbesondere die Transkriptionsinitiationsregulationsregion oder eine andere Transkriptionsinitiationsregion. Wenn immer ein Gen von einem Wirt stammt, bei dem die Transkriptionsinitiationsregion durch den Transkriptionsmechanismus der Säugetier-Wirtszelle nicht erkannt wird, wird eine andere Transkriptionsinitiationsregion benötigt. Diese Region kann konstitutiv oder induzierbar sein, vorzugsweise induzierbar. Es wurde eine große Reihe an Transkriptionsinitiationsregionen isoliert und mit verschiedenen Genen verwendet. Von besonderem Interesse als Promotoren sind die Promotoren von Metallothionein-I und -II aus einem Säugetierwirt, Thymidinkinase, β-Actin, Immunglobulinpromotor, menschliche Zytomegalievirus-Promotoren, SV40-Promotoren und Polyoma-Virus-Promotoren. Zusätzlich

zu dem Promotor kann der Wildtyp-Enhancer vorhanden sein, oder ein Enhancer aus einem anderen Gen kann an die Promotorregion gebunden werden.

[0044] Das Konstrukt kann weiters ein Replikationssystem für Prokaryoten, insbesondere E. coli, umfassen, und zwar zur Verwendung in der Herstellung des Konstrukts, beim Klonieren nach jeder Manipulation, wodurch eine Analyse, wie z.B. Restriktionskartierung oder Sequenzierung, ermöglicht wird, gefolgt von der Vermehrung eines Klons und der Isolation des Plasmids zur weiteren Manipulation. Wo erforderlich, kann ein anderer Marker zur Detektion bakterieller Transformanten verwendet werden.

[0045] Wurde der Vektor einmal hergestellt, so kann er durch die Deletion der bakteriellen Sequenzen sowie durch die Linearisierung weiter manipuliert werden, wobei eine kurze Deletion in der homologen Sequenz bereitgestellt werden kann, die im Allgemeinen etwa 500 bp nicht übersteigt, wobei sie im Allgemeinen von etwa 50 bis 300 bp liegt. Die kleine Deletion befindet sich im Allgemeinen in der Nähe des einen oder des anderen Endes des Strukturgens, auf das abgezielt wird.

[0046] Wurde das Konstrukt einmal hergestellt und manipuliert und die ungewünschten Sequenzen aus dem Vektor entfernt, z.B. die ungewünschten bakteriellen Sequenzen, so ist das DNA-Konstrukt nun zur Einführung in die Target-Zellen bereit. Wie bereits angedeutet, kann jedes passende Verfahren zur Einführung der DNA in die Target-Zellen verwendet werden. Nach der Transformation der Target-Zellen werden viele Target-Zellen durch positive und/oder negative Marker, wie zuvor angegeben, Neomycinresistenz und Acyclovir- oder Gancyclovirresistenz selektiert. Jene Zellen, die den gewünschten Phänotyp aufweisen, können anschließend durch Restriktionsanalyse, Elektrophorese, Southern-Analyse, Polymerasekettenreaktion oder dergleichen weiter analysiert werden. Durch die Identifikation von Fragmenten, welche die Gegenwart der Läsion(en) an der Target-Genstelle zeigen, können Zellen identifiziert werden, in denen es zu einer homologen Rekombination gekommen ist, um eine der zwei Kopien des Target-Gens zu deaktivieren.

[0047] Das zweite Konstrukt unterscheidet sich vom ersten Konstrukt darin, dass es nicht notwendigerweise einen Marker zur Selektion benötigt, da das Fehlen des Target-MHC-Antigens auf der Oberfläche der Zellen als Marker verwendet werden kann. Daher können wieder Insertionen, Deletionen oder Substitutionen als Läsionen zur Modifikation und Deaktivierung des Targetgens verwendet werden. Auf ähnliche Art und Weise kann man das Fehlen eines Klasse-II-MHC-Antigens auf der Oberfläche als Beweis des Fehlens der Expression des bestimmten Klasse-II-MHC-Antigens detektieren.

[0048] In einem Verfahren der Erfindung zur Deaktivierung eines Gens, das mit der Expression von funktionellem MHC-Antigen in nicht transformierten menschlichen Somazellen assoziiert ist, werden Zellen, in denen auf das Target-Gen korrekt abgezielt wird, unter Verwendung neuer Targeting-Vektoren und eines ELISA-basierenden Detektionssystems identifiziert, was die schnelle Detektion von zahlreichen Klonen ermöglicht, auf die unabhängig voneinander abgezielt wird. In diesem Verfahren wird eine Stelle zur homologen Rekombination kreiert, um ein rekombinantes Fusionsprotein zu schaffen, das von einem starken Enhancer/Promotor gesteuert wird, z.B. dem CMV-Enhancer, das an die Domäne eines Proteins fusioniert ist, das ein Epitop enthält, wie z.B. CD4, das durch einen Liganden detektiert werden kann, an den es bindet, z.B. einen Antikörper, wobei das rekombinante Fusionsprotein durch eine Zelle sekretiert wird, auf die auf korrekte Art und Weise abgezielt wird, und anschließend unter Verwendung eines ELISA-basierenden Systems detektiert wird, das Antikörper verwendet, die das sekretierte Fusionsprotein erkennen. In diesem Verfahren stammt das 5'-Ende des rekombinanten Locus von dem Targeting-Vektor, während das 3'-Ende des Locus von dem Target-Gen stammt. Da das gesamte 5'-Ende experimentell kontrolliert wird, können sowohl die Menge der Expression des rekombinanten Fusionsproteins als auch das letztliche Transportschicksal gesteuert werden. In den unten stehenden Beispielen wurden menschliche retinale pigmentierte Epithel-(RPE)Zellen und menschliche Keratinozyten gentechnisch verändert, um ein CD4-β_2-Mikroglobulin-Fusionsprotein zu exprimieren, um die Detektion von Rekombinanten zu erleichtern. Medien werden gescreent, um das Fusionsprotein in einem ELISA zu detektieren, das Proteine fängt, die ein β_2-Mikroglobulin-Epitop enthalten, und Proteine detektiert, die ein CD4-Epitop enthalten. Von dem Test wurde gezeigt, dass er spezifisch für das CD4-β_2-Mikroglobulin-Fusionsprotein ist, was eine Detektion von einer Anzahl an exprimierenden Zellen ermöglicht, die bei nur 1000 liegt. Dieses Verfahren kann für andere Säugetierzelltypen verwendet werden, unter anderem ES-Zellen. Zusätzlich zu einem CD4-Epitop können andere Peptide, die ein Epitop enthalten, das von einem Liganden, wie z.B. einem Antikörper, erkannt wird, der an das Epitop bindet, in dem Fusionsprotein verwendet werden.

[0049] In einem anderen Verfahren der Erfindung werden Somazellen gentechnisch verändert, um Gene zu deaktivieren, die mit der funktionellen MHC-Antigen-Expression assoziiert sind. In diesem Verfahren wird ein selektierbares Markergen ohne Promotor im Leseraster mit der stromauf gelegenen Sequenz des Target-Gens

an die Transmembrandomäne eines ganzen Membranproteins fusioniert, wodurch ein Fusionsprotein produziert wird. Das Fusionsprotein wird zu der Membran transportiert und verarbeitet, um die Transmembransequenz, das normale externe Membranprotein und den selektierbaren Marker bereitzustellen, der auf der zytoplasmatischen Seite der Membran positioniert ist. Zellen, in die das DNA-Konstrukt eingeführt wurde und in denen es zur Bereitstellung des Fusionsproteins zu einer homologen Rekombination gekommen ist, werden unter selektiven Bedingungen gezüchtet, um eine Population an Zellen zu züchten, die den Marker enthalten und worin eines der Target-Gene deaktiviert wurde. Das führt zu einer größeren Detektionshäufigkeit der Gen-Targeting-Vorkommnisse (größere Häufigkeit pro Neo-resistenter Kolonie im Vergleich zu der Häufigkeit des Targetings, das unter Verwendung eines Neo-Gens mit seinem nativen Promotor erhalten wurde).

[0050] Nach der Integration umfasst die Zelle ein Gen für das Fusionsprotein, umfassend in der 5'- bis 3'-Richtung der Transkription die Wildtyp-Transkriptionsinitiationsregion, das Initiationscodon, die Sequenz, die für die extrazelluläre Region und die Transmembranregion des ganzen Membranproteins kodiert, beliebige vorhandene Introns, das selektierbare Markergen (unter anderem Stop-Codons), das durch ein Intron von der Sequenz getrennt sein kann, die für die Transmembranregion kodiert, wobei geeignete Donor- und Akzeptor-Spleißstellen vorhanden sind, um das selektierbare Markergen an die für die Transmembrandomäne kodierende Sequenz zu binden, und/oder einen Abschnitt, die gesamte oder nichts der Sequenz, die für die intrazelluläre (zytoplasmatische) Domäne des ganzen Membranproteins kodiert, sowie eine Transkriptionsterminationsregion, entweder an das selektierbare Markergen oder die Wildtyp-Transkriptionsterminationsregion des Target-Gens gebunden.

[0051] Ein beliebiges ganzes Membranprotein kann einem Targeting unterzogen werden, unter anderem Cluster- oder Differenzierungs-„CD"-Antigene. Von besonderem Interesse sind MHC-Antigene, T-Zellen-Rezeptoren und -Untereinheiten, z.B. α, β, η, ζ, und verschiedene Rezeptor-Proteine, die Interferonrezeptoren, Neurotransmitterrezeptoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Rezeptoren des das Koloniewachstum stimulierenden Faktors etc. umfassen.

[0052] In den unten stehenden Beispielen wurden Maus-ES-Zellen und Maus-Myoblasten gentechnisch verändert, um das IFN-γR-Gen zu deaktivieren, um die Hinaufregulirung der MHC-Expression zu vermeiden. Der verwendete Targeting-Vektor enthielt ein selektierbares Markergen, das in der Transkription und der Translation beeinträchtigt ist (Neomycin), das in die IFN-γR-Kodierregion insertiert ist. Nach der homologen Rekombination wurde der selektierbare Marker Neo als ein IFN-γR-Neo-Hybrid-Protein exprimiert, bei dem sich Neo, das an die Transmembrandomäne von IFN-γR fusioniert ist, auf der inneren Oberfläche der zytoplasmatischen Membran befindet, wodurch die Rekombinanten vor dem Abtöten durch das Antibiotikum (G418) geschützt sind. Andere selektierbare Markergene können verwendet werden, wie z.B. das Hygromycinresistenzgen (hyg^r), und jedes beliebige ganze Membranprotein kann als Target verwendet werden.

[0053] Die Transformation der Zellen, in denen eine der Kopien des MHC-Gens deaktiviert wurde, kann anschließend auf dieselbe oder eine andere Art und Weise als das vorherige Transformationsverfahren durchgeführt werden, um Zellen zu produzieren, die homozygot für das deaktivierte MHC-Gen sind. Die resultierenden transformierten Zellen können anschließend durch das Fehlen des Target-MHC-Antigens auf der Oberfläche der Zelle ausgewählt werden. Dies kann durch eine Reihe verschiedener Wege erreicht werden. Es können z.B. Antikörper für ein beliebiges Epitop des Target-MHC-Antigens zusammen mit dem Komplement verwendet werden, um beliebige Zellen, die das Antigen aufweisen, abzutöten. Alternativ dazu können Konjugate des geeigneten Antikörpers, insbesondere des monoklonalen Antikörpers, mit einem Toxin, wie z.B. die A-Kette von Ricin, Abrin, Diphtherietoxin oder dergleichen, verwendet werden. Die Affinitätschromatographie kann verwendet werden, wobei Antikörper verwendet werden können, um Zellen zu entfernen, die das Target-Antigen exprimieren. Die resultierenden Zellen, die überleben, sollten frei von zumindest einem MHC-Antigen auf ihrer Oberfläche sein und nun keiner Transplantatabstoßung unterworfen sein, wenn sie in vivo als Wildtyp-Zellen eingeführt werden.

[0054] Die resultierenden Zellen werden anschließend gescreent, um sicherzustellen, dass sich im Wesentlichen keine Klasse-I-MHC-Antigene auf der Oberfläche befinden. Dies kann, wie oben stehend beschrieben, durch das Selektieren auf Zellen erreicht werden, denen das Klasse-I-MHC-Antigen fehlt. Die Zellen können anschließend in einem geeigneten Nährmedium zur Expansion gezüchtet werden und auf verschiedene Arten verwendet werden. Die Zellen können zur Transplantation verwendet werden, um Teil eines existierenden Gewebes zu werden, oder sie können gezüchtet werden, um ein Gewebe zur Transplantation in einen nicht syngenetischen Wirt zu bilden. Bei Keratinozyten können die Zellen z.B. zur Substitution von Haut im Fall von Verbrennungen verwendet werden, wobei die Keratinozyten so gezüchtet werden können, dass sie vor der Applikation eine kontinuierliche Schicht bilden. Auf ähnliche Art und Weise können die Keratinozyten im Fall von

plastischer Chirurgie verwendet werden, um Haut zu ersetzen, die dem Wirt zur Verwendung an einer anderen Stelle entfernt wurde. Andere Verwendungen für die Keratinozyten umfassen die Transplantation bei Decubitus und anderen nicht heilenden Geschwüren.

[0055] Im Fall der Langerhans-Inseln können sie gezüchtet werden und in Kapseln oder Sonstiges zur Insertion in einen Wirt zur Produktion von Insulin eingeführt werden. Im Fall von retinalen Epithelzellen können sie in den subretinalen Raum des Auges injiziert oder implantiert werden, um Sehstörungen, wie z.B. Makuladegeneration, zu behandeln. Im Fall von Immunzellen können sie in die Blutbahn oder anderswo injiziert werden, um Immundefizienz zu behandeln. Im Fall von Myoblasten können sie an verschiedenen Stellen injiziert werden, um Muskel abbauende Erkrankungen, wie z.B. Duchenne-Muskeldystrophie, zu behandeln. Bei Organtransplantaten kann nicht syngenetisches Gewebe, wie z.B. xenogene Transplantate des Herzens oder der Leber, zwischen verwandten Spezies verwendet werden.

[0056] Die eingeführten Gene können auch zur Proteinproduktion dienen, wo die Proteine intrazellulär gehalten werden oder sekretiert werden. Die Produktion von Proteinen kann Wachstumsfaktoren, wie z.B. G-, M-, und GM-CSF, den epidermalen Wachstumsfaktor, den aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor, den transformierenden Wachstumsfaktor etc.; Lymphokine, wie z.B. die Interleukine; Hormone, wie z.B. ACTH, Somatomedin, Insulin, Angiotensin etc.; Coagulationsfaktoren, wie z.B. Faktor VIIIC; normale Versionen der Proteine, die mit genetischen Erkrankungen assoziiert sind, wie z.B. Adenosindeaminase oder das Protein, das mit zystischer Fibrose assoziiert ist; Schutzmittel, wie z.B. α1-Antitrypsin; Regulationsproteine oder Enzyme, die mit der Produktion von aminosäurefreien Produkten assoziiert sind, wie z.B. die Expression von Tyrosinhydroxylase zur Produktion von L-Dopamin, und dergleichen umfassen. Die Gene können unter der Transkriptionssteuerung eines konstitutiven Promotors oder eines induzierbaren Promotors (umfassend eine Enhancer-Sequenz) stehen. In letzterem Fall kann die Regulation durch Induktion eines natürlich auftretenden Signals oder als Resultat der Einführung eines exogenen Signals in den Wirt zustande kommen.

[0057] In Abhängigkeit von der Art der Zellen, der involvierten Therapie und der Erkrankung können die Zellen als Filme, eingeführt in Behälter zum Erhalt an einer bestimmten Stelle oder als feste Massen, die in inerten Matrizen oder unabhängig von einer Matrix imprägniert sind, oder als Zellsuspensionen im Fall von Lymphozyten, Leukozyten oder Blutzellen verwendet werden. Die Anzahl der verabreichten Zellen variiert in großem Ausmaß, je nach bestimmter Anwendung und der Art und Weise, auf die die Zellen verabreicht werden. Die Verabreichung kann durch Injektion, topische Anwendung, Inzision und Platzierung an der geeigneten Stelle erfolgen.

[0058] Wurden embryonale Stammzellen, insbesondere ES-Zellen von einem murinen Wirt, transformiert, so kann es wünschenswert sein, solche Zellen zu verwenden, um transgene Tiere zu züchten. Bei solch einem Verfahren können die Zellen nach der Mutation auf einer Nährschicht in einem geeigneten Medium, z.B. mit fötalem Rinderserum ergänztem DMEM, ausplattiert werden. Zellen, die das Konstrukt enthalten, können durch Verwendung eines selektiven Mediums detektiert werden, und nach ausreichend Zeit für das Wachstum der Kolonien können Kolonien ausgesucht werden und auf das Auftreten der homologen Rekombination analysiert werden. Wie zuvor beschrieben, kann die Polymerasekettenreaktion verwendet werden, und zwar mit Primern innerhalb der und ohne die Konstruktsequenz, jedoch am Target-Locus. Jene Kolonien, die eine homologe Rekombination aufweisen, können anschließend für das Manipulieren von Embryos und die Blastozysteninjektion verwendet werden. Blastozysten können von 4 bis 6 Wochen alten Weibchen mit Superovulation durch Spülen des Uterus 3,5 Tage nach der Ovulation erhalten werden. Die embryonalen Stammzellen können anschließend trypsinisiert und die modifizierten Zellen zu einem Tröpfchen hinzugefügt werden, das die Blastozysten enthält. Zumindest eine, normalerweise zumindest etwa 10 und bis zu etwa 30, der modifizierten embryonalen Stammzellen können in das Blastozöl der Blastozyste injiziert werden. Nach der Injektion wird/werden zumindest eine und nicht mehr als etwa 15 der Blastozysten zurück in jedes Uterushorn scheinträchtiger Weibchen platziert. Anschließend wurde es den Weibchen ermöglicht, die Jungen auszutragen, und die resultierenden Würfe wurden auf Mutantenzellen mit dem Konstrukt gescreent. Die Blastozysten werden auf verschiedene Abstammung aus den transformierten ES-Zellen selektiert. Durch das Bereitstellen eines anderen Phänotyps der Blastozyste und der ES-Zellen kann die chimäre Nachkommenschaft leicht detektiert werden. Ein besonders nützlicher Phänotyp ist die Haarfarbe, obwohl ein beliebiger Phänotyp verwendet werden kann, oder, wenn gewünscht, kann auf den Genotyp geschaut werden, wobei auf die Gegenwart der modifizierten genomischen DNA sondiert wird.

[0059] Die Jungen werden normalerweise 16-18 Tage nach dem Einsetzen der Blastozysten in die Pflegemütter geboren. Die chimären Tiere werden auf die Gegenwart des transformierten Genoms gescreent, und es erfolgt eine Paarung von Männchen und Weibchen, die das transformierte Genom besitzen. Der homozy-

goten Nachkommenschaft fehlen funktionelle Klasse-I-MHC-Zellen, und sie besitzen verringerte Anzahlen reifer $CD8^+$-T-Zellen (TCR αβ).

[0060] Die transgenen Tiere können beliebige nicht menschliche Säugetiere sein, wie z.B. Labortiere, Haustiere etc. Diese Tiere können murine und andere Nagetiere, Lagomorpha, Schweine, Katzen, Rinder, Hunde, Menschen etc. sein. Die Säugetiere, denen Klasse-I-MHC fehlt, können als Quelle von Organen, Zellen oder Geweben zur Transplantation, wie z.B. Herz, Lunge, Haut, Leber und Niere, verwendet werden. Die Tiere können auch experimentell für das Screening von Arzneimitteln verwendet werden, z.B. um die Abstoßung von Transplantaten in den Tieren in Gegenwart eines therapeutischen Mittels, wie z.B. eines immunsuppressiven Mittels, z.B. Cyclosporin, zu beobachten, oder als Modellsystem für Transplantationstherapien, unter anderem für Transplantationen von Haut, Nieren, Leber etc.

[0061] In dem unten stehenden experimentellen Abschnitt werden Ausführungsformen offenbart, welche die Produktion von Zellen, denen die Expression des funktionellen MHC-Antigens als Resultat der Deaktivierung verschiedener Gene fehlt, die mit der MHC-Antigen-Expression assoziiert sind, unter Verwendung der homologen Rekombination zeigen. Daher wird in einer ersten Ausführungsform das Verfahren für die Deaktivierung des β_2-Mikroglobulin-Gens in Maus- und menschlichen Keratinozyten unter Verwendung der Verfahren der Erfindung beschrieben.

[0062] In einer weiteren Ausführungsform werden embryonale Maus-Stammzellen beschrieben, die deaktiviertes β_2-Mikroglobulin enthalten, sowie Mäuse, die aus diesen Zellen erzeugt wurden. Die Transplantation von MHC-defizienten Maus-Hautzellen wird in einer anderen Ausführungsform offenbart.

[0063] In einer weiteren Ausführungsform wird das Targeting des HPRT-Gens in menschlichen retinalen Epithelzellen (RPE) beschrieben.

[0064] In einer anderen Ausführungsform wird das Targeting des β_2-Mikroglobulin-Gens in menschlichen RPE-Zellen unter Verwendung eines Targeting-Vektors offenbart, der eine Fusionsprotein-Rekombinante produziert. In einer weiteren Ausführungsform wird die Verwendung eines einfachen Neo-Ersatz-Targeting-Vektors zur Deaktivierung des β_2-Mikroglobulin-Gens beschrieben.

[0065] In einer weiteren anderen Ausführungsform wird das Targeting des IFN-γR-Gens in embryonalen Maus-Stammzellen und Maus-Myoblasten unter Verwendung von Targeting-Vektoren beschrieben, die ein promotorloses selektierbares Markergen enthalten.

[0066] Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung und nicht der Einschränkung.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Proliferation epidermaler Keratinozyten, denen das MHC-Antigen aufgrund der Deaktivierung der β_2-Mikroglobulin-Genexpression fehlt

Zellen

[0067] Epidermale Maus-Keratinozyten werden aus der Haut einer neugeborenen Maus erhalten. Die Hautproben werden in serumfreiem Medium gespült und in kleine Fragmente zerkleinert. Die Fragmente werden mit Trypsin behandelt, und die resultierende Einzelzell-Suspension wird gewaschen und auf 3T3-Fibroblasten-Wachstumsschichten ausplattiert. EGF (5 ng/ml) wird am Ende von fünf Tagen zugegeben. Die Zellen werden in Medien gehalten, die mit Hydrocortison (10^{-6} M), Choleratoxin (10 M), Insulin (5 ng/ml), Transferrin (5 ng/ml), T3 (2×10^{-8} M) und 20 % fötalem Kälberserum ergänzt sind. Nicht verwendete Zellen werden in flüssigem Stickstoff gelagert.

[0068] Menschliche epidermale Keratinozyten werden unter Verwendung einer frischen Hautprobe aus einem Hautstück, das durch Zirkumzision erhalten wurde, als Quelle der Keratinozyten isoliert. Anschließend wird die Probe im Wesentlichen wie oben beschrieben behandelt.

DNA-Vektoren

[0069] Die Maus- und die menschlichen β_2-Mikroglobulin-Gene, wie sie von Parnes und Seidman, Cell 29, 661-669 (1982), bzw. Gusow et al., J. Immunol. 139, 3132-3138 (1987), isoliert und charakterisiert wurden,

werden für die Homologie verwendet.

Konstruktion des Deaktivierungsvektors 1

[0070] Die Deaktivierungsvektoren werden aus dem 4-kb-HindIII-Fragment der genomischen DNA konstruiert, das die zweiten, dritten und vierten Exons des β_2-Mikroglobulin-Gens umfasst. Das 4-kb-HindIII-Fragment, das in pBR322 subkloniert wurde, wird mit EcoRI verdaut, und das selektierbare Neomycin-Phosphotransferase(neo^R-)Gen wird insertiert. Das neo^R-Gen wird aus pSV2neo erhalten (Southern und Berg, Mol. Appl. Genet. 1, 332 (1982)). Der resultierende Vektor wird B2KO1 genannt.

Konstruktion des Deaktivierungsvektors 2

[0071] Das Ausgangsplasmid zur Konstruktion des zweiten Vektors ist B2KO1. In diesem Fall wird das Herpes-simplex-Virus-Typ-1-Thymidinkinase-Gen an der HindIII-Stelle von B2KO1 insertiert.

Deaktivierung einer Kopie von β_2-Mikroglobulin

[0072] Die DNA, die zur Transformation im ersten oder zweiten Stadium verwendet wird, umfasst die insertierte Sequenz mit flankierenden homologen Sequenzen aus dem Klonierungsplasmid B2KO1 und dieselbe Sequenz, die an einem Ende vom tk-Gen flankiert wird, das frei von der bakteriellen Plasmid-DNA ist. Die resultierenden DNA-Fragmente werden durch Ethanolpräzipitation gereinigt und durch Durchleiten durch einen 0,22-µm-Filter geklärt. Die DNA wird durch herkömmliche Mittel isoliert und in die Keratinozyten-Zellen durch Mikroinjektion eingeführt (Capecchi, Cell 22, 479-488 (1980)). Etwa 5-50 Kopien der DNA-Konstrukte werden in jeden Nucleus injiziert. Anschließend werden die Zellen in selektivem Medium, umfassend 200 µg/ml G418 (Geneticin, Gibco Labs), gezüchtet. Für das zweite Konstrukt werden die Zellen auch in Gancyclovir (Syntex Corp., Palo Alto, CA) oder Acyclovir (Burrows-Wellcome, Research Triangle Park, NC) ausplattiert. Zellen aus Kolonien werden isoliert und durch Polymerasekettenreaktion und Southern-Blot-Hybridisierung analysiert. Zellen, die eine Kopie des β_2-Mikroglobulins aufweisen, die deaktiviert ist, werden für das Knock-Out der zweiten Kopie verwendet.

Deaktivierung der zweiten Kopie des β_2-Mikroglobulin-Gens

Gen

[0073] Zellen, die wie oben erhalten wurde, mit einem einzelnen deaktivierten β_2-Mikroglobulin-Gen werden, wie oben stehend beschrieben, einer Mikroinjektion mit dem modifizierten B2K02-Plasmid unterzogen, und es werden Zellen isoliert, die gegen Gancyclovir oder Acyclovir resistent sind. Zellen, denen die Klasse-I-Gen-Expression fehlt, werden durch Kombinieren der Zellen mit monoklonalen Antikörpern isoliert, die für das β_2-Mikroglobulin und das Komplement spezifisch sind, wie von Parish et al., Eur. J. Immunol. 4, 808 (1974), beschrieben. Die resultierenden lebensfähigen Zellen werden in selektiertem Medium gezüchtet und durch eine Affinitätssäule derselben monoklonalen Antikörper durchgeleitet. Die Säule wird wie von Harlow und Lane, Antibodies: A Laborstory Manual, CSH Press (1988), beschrieben hergestellt. Es wird eine Southern-Blot-Analyse der Zellen durchgeführt, um den genauen Locus der Integration zu bestimmen. Anschließend werden die Zellen vermehrt und zur weiteren Verwendung gelagert.

Erzeugung einer Monoschicht an Keratinozyten

[0074] Die resultierenden Zellen, denen Klasse-I-MHC fehlt, werden verwendet, um eine Monoschicht an Keratinozyten zu züchten, wie von Rheinwald und Green, Cell 6, 331-343 (1975), beschrieben wird. Diese Schicht wird auf allogene Mäuse transplantiert, wie von Rheinwald und Green, s.o. (1975), beschrieben wird. Die Zellen haften an der Oberfläche und wachsen, um eine schützende Hautschicht zu bilden.

[0075] Nach demselben Verfahren, wie es oben stehend für β_2-Mikroglobulin beschrieben wurde, können die HLA-DR-Gene durch Verwendung homologer Sequenzen deaktiviert werden, welche die α- oder die β-Untereinheit des HLA-DR-Gens der Wirtszelle flankieren. Auf diese Art und Weise wird verhindert, dass Zellen, die das Klasse-II-MHC-Antigen aufweisen oder die Fähigkeit haben können, dass die Expression eines solchen Antigens induziert wird, das primäre Klasse-II-Antigen exprimieren, das mit der zellulären Immunreaktion assoziiert ist.

[0076] In der nächsten Studie wurden embryonale Stammzellen durch homologe Rekombination mit einem

der β_2-Mikroglobulin-Gene modifiziert.

II. Deaktivierung des β_2-Mikroglobulin-Gens. Konstruktion des Targeting-Plasmids

[0077] Das Plasmid pKCβ_2B enthält das gesamte β_2-M-Gen innerhalb eines 8,4-kbp-XhoI-Fragments (Ozato und Orrison, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2427-2431 (1985); Warner et al., Bio. Reprod. 36, 611-616 (1987)). Das 5'-XhoI-bis-BamHI-Fragment dieses Gens wurde in pUC19 subkloniert. Zwei KpnI-Restriktionsenzymstellen, eine in der 5'-flankierenden DNA und die andere im ersten Intron, wurden durch Verdau mit KpnI entfernt, gefolgt von einer Behandlung mit T4-Polymerase und Re-Ligation. Eine einzigartige ClaI-Stelle wurde in Exon 2 durch partiellen Verdau mit EcoRI geschaffen, gefolgt von einer Behandlung mit Klenow-Polymerase und Ligation mit ClaI-Linkern. Das 1150-bp-XhoI-bis-HI-Fragment des Plasmids pMCI Neo (Kim und Smithies, Nucleic Acid Res. 16, 8887-8903 (1988)), enthaltend ein Neomycin-Gen, das durch den Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen-(HSV-tk-)Promotor und einen Polyoma-Enhancer gesteuert wurde, wurde über Linker in diese ClaI-Stelle insertiert. Zwei Plasmide, C65.2.3 und C65.5.9, wurden erhalten, die sich in der Transkriptionsausrichtung des insertierten Fragments hinsichtlich jener des β_2-Mikroglobulin-Gens unterscheiden. Das 5'-XhoI-bis-KpnI-Fragment eines jeden davon wurde in pUC19 kloniert, um die Targeting-Vektoren zu erhalten, die in den Experimenten der Erfinder verwendet wurden. Bei Plasmid C84.4B ist die 5'-bis-3'-Ausrichtung der Neomycin- und β_2-M-Promotoren identisch. Die umgekehrte Konfiguration tritt in Plasmid C84.2D zu Tage.

Züchten, Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

[0078] Die ES-Zelllinie E14TG2a (Sawicki et al., Nature 294, 450-451 (1981)) wurde im Wesentlichen wie beschrieben auf mit Mitomycin behandelten, embryonalen Primär-Fibroblasten-Feederschichten gezüchtet (Ostrand-Rosenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 5084-5088 (1989)). Die embryonalen Fibroblasten wurden aus Embryos von C57BL/6-Weibchen bereitgestellt, die sich 14 bis 17 Tage zuvor mit einem Männchen gepaart hatten, das für ein Neomycin-Transgen homozygot war (Evans und Kaufman, Nature 292, 154-156 (1981)); diese Zellen sind zu Wachstum in Medien, die G418 enthalten, in der Lage. Die Elektroporationsbedingungen ähnelten jenen, die zuvor beschrieben wurden (Doetschman et al., Nature 330, 576-578 (1987)). ES-Zellen wurden trypsinisiert, in Kulturmedien in einer Konzentration von 4×10^7/ml resuspendiert und in Gegenwart der Targeting-DNA in einer Konzentration von n im ersten Experiment und 5 nM DNA im zweiten elektroporiert. Eine Spannung von 300 V mit einer Kapazität von 150-250 µF wurde als optimal angesehen mit einer Elektroporationszelle mit einer Länge von 5 mm und einem Querschnitt von 100 mm^2. 5×10^6 elektroporierte Zellen wurden auf mitomycinbehandelten Fibroblasten in 100-mm-Schalen in Gegenwart von Dulbeccos Modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), ergänzt mit 15 % fötalem Rinderserum (FBS) und 0,1 mM 2-Mercaptoethanol, ausplattiert. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Elektroporation mit Medium ersetzt, das 200 µg/ml G418 enthielt.

Analyse von G418-resistenten ES-Zellkolonien

[0079] ES-Kolonien, die 10-14 Tage nach der Elektroporation sichtbar waren, wurden mit ausgezogenen Kapillarpipetten zur Analyse unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgesucht. Die Hälfte jeder ausgesuchten Kolonie wurde in 24-Well-Platten aufgehoben, die bereits mit mitomycinbehandelten Feeder-Zellen beimpft worden waren. Die anderen Hälften wurden, kombiniert in Pools von 3-4, in Eppendorf-Röhrchen transferiert, die etwa 0,5 ml PBS enthielten, und mittels PCR auf homologe Rekombination analysiert. Die Bedingungen für die PCR-Reaktionen waren im Wesentlichen wie beschrieben (Linney und Donerly, Cell 35, 693-699 (1983)). Die ES-Zellen wurden pelletiert, in 5 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert und durch die Addition von 55 µl H_2O zu jedem Röhrchen lysiert. DNA-sen wurden durch 10-minütiges Erhitzen jedes Röhrchens bei 9°C deaktiviert. Nach der Behandlung mit Proteinase K bei 55°C für eine Zeitspanne von 30 Minuten wurden 30 µl von jedem Lysat in ein Röhrchen transferiert, das 20 µl eines Reaktionsgemisches enthielt, umfassend PCR-Puffer, 1,5 µg von jedem Primer, 3U Taq-Polymerase, 10 % DMSO und dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils mit 0,2 mM. Die PCR wurde 55 Zyklen lang durchgeführt, und zwar unter Verwendung eines Thermocyclers, der einem zuvor beschriebenen nachempfunden wurde (Kim und Smithies, s.o. (1988)), mit 65 Sekunden langen Schmelzvorgängen bei 92°C und einer 10-Minuten-Annealing- und -Extensionszeit bei 65°C. Die zwei Priming-Oligonucleotide, TGGCGGACCGCTATAGGAC (Seq.-ID Nr. 01) und GATGCTGATCACATGTCTCG (Seq.-ID Nr. 02), entsprechen jeweils Sequenzen, die sich 650 Basen 3' vom Start-Codon des Neomycingens befinden, sowie Sequenzen, die sich in Exon 3 des β_2-m-Gens befinden. 20 µl des Reaktionsgemisches wurden einer Elektrophorese auf Agarosegelen unterzogen und auf Nylonmembranen transferiert (Zeta Bind). Filter wurden mit 32P-markiertem 450-bp-EcoRI-bis-KpnI-Fragment des β_2-M-Gens sondiert.

Herstellung und Restriktionsenzym-Analyse der genomischen DNA

[0080] Genomische DNA wurde aus ES-Zellen, ganzen neugeborenen Mäusen und Mausschwänzen durch herkömmliche Verfahren bereitgestellt. DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, wie von den Herstellern angeordnet, und es wurden Fragmente auf 0,7-%-Agarosegelen getrennt. DNA wurde auf Nylon-Membranen transferiert und mit dem oben beschriebenen 32P-markierten Fragment sondiert.

Embryomanipulation und Blastozysten-Injektion

[0081] Mäuse wurden entweder von Jackson Laborstories (Bar Harbor, ME) oder Charles River (Raleigh, NC) zugekauft. C57BL/6-Blastozysten wurden von 3 bis 4 Wochen alten Weibchen mit Superovulation erhalten. Die Uteri wurden 3,5 Tage nach der Ovulation mit M2-Medium gespült (Joyner et al., Nature 338, 153-156 (1989)). Die Blastozysten wurden gesammelt, mehrere Male in frischen M2-Medien gewaschen und in einem 100-µl-Tröpfchen M2 unter Paraffinöl platziert. Die ES-Zellen wurden trypsinisiert, einmal mit frischen DMEM-Medien gewaschen und auf etwa 2×10^6 Zellen/ml verdünnt. 5 µl Zellen wurden zu dem Tröpfchen hinzugefügt, das die Blastozysten enthielt. 10 bis 15 ES-Zellen wurden in das Blastozöl einer jeden Blastozyste injiziert. Nach der Injektion wurden 6 bis 9 Blastozysten erneut in jedes Uterushorn scheinträchtiger Weibchen platziert, die sich 2,5 Tage zuvor mit Männchen gepaart hatten, die einer Vasektomie unterzogen worden waren. Sowohl C57BL/6-x-DBA-FI- als auch C57BL/6-x-CBA-FI-Mäuse erwiesen sich als ausgezeichnete Pflegemütter, es ergab sich eine Trächtigkeitsrate von nahe 100 %, und die Tiere waren in der Lage, kleine Würfe großzuziehen.

Isolation und Charakterisierung von ES-Zellen, die einem Targeting unterzogen wurden

[0082] Es wurden zwei unabhängige Targeting-Experimente durchgeführt. In jedem wurden 2×10^7 Zellen in Gegenwart der hinzukommenden DNA elektroporiert und anschließend in Medium gezüchtet, das G418 enthielt. Nach etwa zwei Wochen waren G418-resistente Kolonien leicht erkenntlich. Anschließend wurde ein Teil jeder Kolonie in einen einzelnen Well einer 24-Well-Platte transferiert, während der verbleibende Teil mit Teilen von zwei bis vier anderen Kolonien zur PCR-Analyse gepoolt wurde. In dem ersten Experiment ergab ein Pool von 32 Pools, die eine Gesamtmenge von 100 G418-resistenten Kolonien umfassten, ein positives PCR-Signal. Die drei einzelnen Kolonien, die zu diesem positiven Pool beigetragen hatten, wurden einzeln durch PCR analysiert, und es wurde ein positiver Klon, ES39B, identifiziert. Eine ähnliche Analyse von 134 G418-resistenten Kolonien, die im zweiten Experiment erhalten wurden, ergab ebenfalls einen Klon, ES22A, der das 910-bp-DNA-Fragment erzeugte, das bei Unterziehung einer PCR auf ein erfolgreiches Targeting hindeutete.

[0083] Um die gezielte Zerstörung einer Kopie des β_2-M-Gens zu verifizieren (das Gen ist autosomal und in zwei Kopien vorhanden), wurden die zwei PCR-positiven Klone, ES39B und ES22A, vermehrt, und ihre DNA wurde isoliert und anschließend durch Southern-Blotting unter Verwendung einer Sonde analysiert, die Sequenzen aus dem zweiten Exon und einem Teil des ersten Introns des β_2-M-Gens detektiert. Muster, die mit den Restriktionsenzymen XbaI, BamHI und KpnI erhalten wurden, stimmen mit den erwarteten überein, wenn eine der zwei Kopien des β_2-M-Gens auf die geplante Art und Weise in den PCR-positiven Klonen zerstört wurde. D.h. ein DNA-Fragment, das in der Größe identisch mit jenem ist, das in unbehandelten Zellen vorhanden ist, war bei allen drei Enzymen vorhanden. Ein zusätzliches Fragment der Größe, die für ein homologes Rekombinationsvorkommnis prognostiziert wurde, war nur in den PCR-positiven Klonen vorhanden. Die Insertion des Neomycin-Gens in das zweite Exon durch Rekombination führt zu einem XbaI-Fragment, das mit der β_2-M-spezifischen Sonde detektierbar ist, die etwa 1 kb länger ist als das äquivalente Fragment in dem nativen Locus. Eine neue BamHI-Stelle wird in den Locus durch die Targeting-DNA eingeführt, wodurch die Größe des BamHI-Fragments, das durch die β_2-M-Sonde detektiert wird, von 10,6 kbp auf 900 bp reduziert wird. Ein neues Fragment ist auch nach dem KpnI-Verdau zu sehen. Bei ES39B ist das KpnI-Fragment 7 kb lang, wie von einem Crossover zwischen dem 5'-Ende des Targeting-Plasmids und dem nativen Locus prognostiziert. Bei ES22A ist dieses neue KpnI-Fragment 4,0 kb lang, was darauf hindeutet, dass die deletierten KpnI-Stellen nicht in den Locus inkorporiert wurden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich eines der Crossovers in der Zelllinie ES22A zwischen der dritten KpnI-Stelle des nativen Locus und dem insertierten Neomycin-Gen der hinzukommenden DNA auflöste, wahrscheinlich nach der Branch-Migration eines Crossover-Zwischenprodukts. Obwohl sich die 5'-Crossover-Stellen unterscheiden, enthalten beide modifizierten Zelllinien nun ein β_2-M-Gen, das auf die geplante Art und Weise durch Insertion eines Neomycin-Gens in Exon 2 zerstört wurde. Die Re-Hybridisierung des Filters, der für die Autoradiographie verwendet wurde, mit einer Sonde für das Neomycin-Gen zeigt, dass die einzigen hybridisierenden Banden jene sind, die durch die Struktur des Konstrukts prognostiziert werden.

Chimäre Nachkommenschaft von ES-Zellen, die einem Targeting unterzogen wurden

[0084] Von den zwei ES-Zelllinien, welche die deaktivierten β_2-M-Gene enthalten, wird erwartet, dass sie die Einführung dieser Mutation in die Maus-Keimbahn ermöglichen. Dafür injizierten die Erfinder 10 bis 15 Zellen in C57BL/6-Blastozysten. Embryos wurden erneut in scheinträchtige Weibchen implantiert. Da die ES-Zelllinie E14TG2a aus Stamm-129/01a-Embryos isoliert wurde, wird von ihr und von allen davon abstammenden Zelllinien erwartet, dass sie die für diesen Maus-Stamm charakteristischen Fell-Farbmarker trägt/tragen. Diese umfassen das dominante A^w-Allel am Agouti-Locus, das rezessive Chinchilla-Allel am c-Locus sowie das rezessive p-Allel (rotäugige Verdünnung) am p-Locus (Quinn et al., J. Reprod. Fertil. 66, 161-168 (1981)). Der Beitrag der ES-Zellen zu den vom Mesoderm abstammenden Teilen der Haarfollikel führt zu einem Agouti-Fell. Haarfollikel, zu denen Melanozyten mit ES-Zellursprung (und die daher die p- und die cch-Mutationen in sich tragen) migriert sind, produzieren cremefarbene Haare. Beide dieser Fellfarben sind vom tiefschwarzen Fell leicht zu unterscheiden, das bei Jungen anzutreffen ist, die von Nicht-Agouti-C57BL/6-Wirt-Blastozysten abstammen.

[0085] Mehr als 70 % der überlebenden Jungen sind Chimären. Die Intensität der 6.1-XbaI-Banddiagnostik des β_2-M-Locus, das dem Targeting unterzogen wurde, zeigt, dass die modifizierten ES-Zellen ausgiebig zum Gewebe dieses Tieres beitrugen.

Erzeugung chimärer Mäuse

[0086] Drei bis vier Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse wurden durch eine aufeinanderfolgende Injektion von PMS und hCG einer Superovulation unterzogen und mit fortpflanzungsfähigen Männchen eines ähnlichen Stamms gekreuzt. Vier Tage nach der Paarung wurden die weiblichen Mäuse getötet, und die Blastozysten wurden durch Spülen des Uterus mit M9-Medium erhalten. Die gesammelten Blastozysten wurden auf ein Tröpfchen desselben Mediums transferiert, das in Paraffinöl eingetaucht wurde und ebenfalls manche ES22a-Zellen enthielt. Diese Zellen wurden zur Injektion durch Trypsinisierung vorbereitet, gefolgt von Waschen und Resuspendieren in M2-Medium. Zehn bis fünfzehn ES22a-Zellen wurden in das Blastozöl jeder Blastozyste unter Verwendung von Standard-Mikromanipulationsverfahren eingeführt. Die ES-zellhältigen Blastozysten wurden anschließend in den Uterus einer scheinträchtigen Pflegemutter transferiert. Pflegemütter wurden durch das Paaren von B6/D2-Weibchen mit männlichen Mäusen, die einer Vasektomie unterzogen worden waren, erhalten. Weibchen, die sich 2,5 Tage vor dem Transfertag gepaart hatten, wie durch die Gegenwart eines Vaginalpfropfs festgestellt wurde, wurden als Pflegemütter für die ES-zellhältigen Blastozysten verwendet. Die Entwicklung der Blastozysten wird in vivo fortgesetzt, und die Jungen wurden allgemein 16-18 Tage später geboren. Der Beitrag der ES-Zellen für die Nachkommenschaft konnte sichtbar durch die Untersuchung der Fellfarbe der Jungen beurteilt werden. Die Blastozysten wurden von C57BL/6-Mäusen erhalten, die eine tiefschwarze Fellfarbe aufweisen. Die ES-Zelllinie E14TG2a, die elterliche Linie, von der ES22a abstammte, wurde aus 129/Ola-Mäusen isoliert. Dieser Mausstamm ist cremefarben, die kombinierte Wirkung von drei Fellfarbgenen, dem dominanten A^w-Allel am Agouti-Locus, dem rezessiven Rotäugige-Verdünnung-Allel am p-Locus und dem rezessiven c^{ch} am C-Locus. Nachkommen, bei denen ES22a zu der Bildung der Tiere beigetragen hatte, wiesen ein Fell auf, das braune und cremefarbene Haare enthielt. Etwa 80 % der Jungen aus Blastozysten, die ES22a-Zellen enthielten, zeigten ein gewisses Ausmaß an Fellfarb-Chimärismus.

Erzeugung von Tieren, die für das mutierte β_2-M-Gen heterozygot sind

[0087] Falls ES22a-Zellen bei den Gonaden mitwirken, wäre es zu erwarten, dass die Tiere Spermien produzieren, die das ES22a-Genom enthalten und dieses an ihre Nachkommen weitergeben. Das ES22a-Genom ist für den dominanten Fellfarb-Marker A^w homozygot. Wird die Chimäre mit einem Tier gekreuzt, das ein Nicht-Agouti-Tier ist, wie z.B. einem C57BL/6- oder B6/D2-Tier, so können Nachkommen, die aus Spermien- oder ES-Zellen-Ursprung stammen, von jenen, die aus Spermien- oder Blastozysten-Ursprung stammen, durch ihre Fellfarbe unterschieden werden. Von 50 % dieser Agouti-Tiere wäre zu erwarten, dass sie das mutierte β_2-M-Gen erben. Diese können durch Analyse der DNA, die aus den Schwänzen isoliert wird, identifiziert werden. 1 cm des Schwanzes wurde daher von den Agouti-Tieren entfernt, und die DNA wurde mittels Standardverfahren gewonnen. Die DNA wurde entweder mit dem Restriktionsenzym XbaI oder HindIII verdaut und durch Southern-Blotting und Sondieren mit einem radioaktiv markierten Fragment des β_2-M-Gens analysiert. Die Gegenwart eines XbaI- oder HindIII-Fragments, das 1 kb größer ist als jenes, das bei Kontrollmäusen anzutreffen ist, deutet auf die Gegenwart des mutierten β_2-M-Gens in dem Tier hin.

Erzeugung von Tieren, die für das mutierte β_2-M-Gen homozygot sind

[0088] Männliche und weibliche Tiere, deren DNA angab, dass sie eine Kopie des mutierten β_2-M-Gens in sich trugen, wurden gepaart. Die Nachkommen dieser Paarungen wurden erneut auf die Gegenwart der größeren XbaI- oder HindIII-Fragmente analysiert. Wie erwartet, war ein Viertel der Nachkommen aus solchen Paarungen für das defekte Gen homozygot. Diese Tiere stellen nun einen neuen Maus-Stamm dar, der die Mutation in sich trägt, die ursprünglich durch homologe Rekombination in die ES-Zelle E14TG2a eingeführt wurde.

Bestimmung des Phänotyps der β_2-M-(–/–)-Mäuse

[0089] Um zu bestimmen, ob die Mutation des β_2-M-Proteins wie erwartet zu einem Verlust der Klasse-I-Expression führte, wurden zwei Tiere, die für die β_2-M-Mutation homozygot sind, getötet und auf die Gegenwart der Zelloberflächen-Klasse-I-Expression untersucht. Zellen, die aus den Lymphknoten, der Milz und dem Thymus isoliert wurden, wurden mit monoklonalen Antikörpern untersucht, die gegen die Klasse-I-Antigene H-2K^b und H-2D^b gerichtet waren. Sowohl 129/Ola, der Maus-Stamm, von dem die ES-Zelllinie abstammte, als auch C57BL/6, der Stamm, mit dem die Chimäre, die zu diesen Tieren führte, gekreuzt wurde, exprimieren den H-2b-Haplotyp. Es war in keinem der untersuchten Gewebe eine Färbung über dem Hintergrund bei Zellen zu sehen, die von den homozygoten β_2-M-(–/–)-Mäusen erhalten wurden. Daher führte die Deaktivierung des β_2-M-Gens, wie vorhergesagt, zu einem Tier, das nicht in der Lage ist, Klasse-I-Antigene auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Die Tiere schienen gesund zu sein und konnten sichtbar nicht von den anderen Wurfgeschwistertieren unterschieden werden.

[0090] Die Wirkung des Fehlens von Klasse-I-Antigenen auf die Reifung der T-Zellen wurde durch Isolieren und Färben von Thymozyten mit Antikörpern untersucht, die verschiedene Stadien der T-Zellen-Differenzierung beschreiben. Die Daten zeigten, dass die CD4$^-$8$^-$-, die CD4$^+$8$^+$- und die CD4$^+$8$^-$-Zellpopulationen in den Thymusdrüsen normaler, β_2-M-(–/–)- und heterozygoter Tiere identisch sind. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die CD4$^-$8$^+$-Populationen zwischen Tieren der verschiedenen Genotypen. CD4$^-$8$^+$-Zellen stellen 10 % der Zellen des normalen Thymus dar, jedoch weniger als 1 % der Zellen im Thymus der β_2-m-Mäuse. Interessanterweise ist die Anzahl dieser Zellen in der Heterozygote ebenfalls etwas verringert.

[0091] Um zu bestimmen, ob das Fehlen der Klasse-I-Gene die Reifung der T-Zellen beeinträchtigte, wie durch die Expression der T-Zellen-Rezeptor-Gene angezeigt wurde, wurden Thymozyten mit Antikörpern gefärbt, die entweder gegen den TCRαβ- oder den TCRγδ-Rezeptor gerichtet waren. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Profil der αβ-Zellrezeptor-positiven Zellen bei β_2-M-(–/–)-Tieren festgestellt im Vergleich zu den normalen, was darauf hindeutet, dass die Klasse-I-Antigene nicht für die Reifung der Thymozyten zu TCR-tragenden CD4$^+$8$^+$- oder CD4$^+$8$^-$-Zellen benötigt werden.

[0092] Als Nächstes wurden periphere T-Zellen auf die Expression von αβ-TCR und CD4 und CD8 untersucht. Die Ausbeute der T-Zellen, die αβ-TCRs aus der Milz und den Lymphknoten von Tieren in sich trugen, denen β_2-M fehlte, unterschieden sich nicht signifikant von jenen normaler Wurfgeschwister-Kontrolltiere. Zwischen 20 % und 32 aller T-Zellen, die αβ-TCRs aufwiesen, trugen auch CD8 in β_2-M-(+/+)-Tieren und -(+/–)-Tieren in sich. Obwohl die CD4$^-$-, CD8$^+$-Thymozyten jedoch etwas verringert waren bei homozygoten β_2-M-Tieren, waren die Mengen peripherer CD8$^+$-T-Zellen dieser Mäuse vergleichbar mit jenen normaler Wurfgeschwister. Im Gegensatz dazu exprimierte praktisch keine der αβ-TCR-hältigen T-Zellen CD8 in Tieren, die für die β_2-M-Mutation homozygot waren. Ein Vorversuch wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob die wenigen αβ-T-Zellen, die in Mutantenmäusen CD8$^+$ zu sein schienen, auf ein Rauschen in den Färbungsverfahren zurückzuführen waren. T-Zellen von diesen Tieren wurden daher mehrere Tage lang auf Kunststoff, der mit Anti-CD3-Antikörpern beschichtet war, und in Interleukin 2 gezüchtet, ein Verfahren, das oftmals vorzugsweise die Proliferation der CD8$^+$-T-Zellen stimuliert. CD8-tragende αβ+-T-Zellen erschienen nach einer solchen Behandlung nicht in großen Anzahlen, obwohl γδ-tragende T-Zellen tatsächlich keimten. Die Schlussfolgerung lautet, dass CD8+-αβ-Zellen bei Tieren beinahe ganz fehlen, denen die Klasse-I-MHC-Expression fehlt.

[0093] Thymocyten und T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten wurden ebenfalls auf die Expression von γδ-TCRs untersucht. Die Anzahlen dieser Zellen waren bei β_2-M-(–/–)-Mäusen und Kontrolltieren ähnlich. Ein Outgrowth-Experiment (oben stehend beschrieben) zeigte, dass sich die γδ-tragenden Zellen von β_2-M vermehren konnten, und weiters deutete die Voruntersuchung dieser Zellen darauf hin, dass etwa ein Viertel dieser CD8 in sich trug. Daher zeigen diese Studien, dass γδ-T-Zellen möglicherweise keine Klasse-I-Expression zu ihrer Existenz benötigen, sogar dann, wenn sie auch CD8 in sich tragen.

III. Transplantation von MHC-defizienten Hautzellen

Erzeugung von Mäusen

[0094] Mäuse, denen ein funktionelles β_2-Mikroglobulin-Gen fehlte, wurden, wie oben stehend beschrieben, unter Verwendung der homologen Rekombination erhalten, um dieses Gen in ES-Zellen spezifisch zu zerstören, unter Verwendung des 129-Maus-Stamms. Diese modifizierten Zellen wurden verwendet, um chimäre Mäuse zu erzeugen, die zu C57BL/6-Mäusen gezüchtet wurden. Junge Mäuse, welche die zerstörte Kopie des β_2-Mikroglobulin-Gens in sich trugen, wurden untereinander gekreuzt, um $H2^b$-β_2-Mikroglobulin-defiziente Gründer-Homozygoten zu produzieren.

[0095] Dieses Verfahren erzeugte Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund, die Nebenhistokompatibilitätsantigene von sowohl dem C57BL/6- als auch dem 129-Stamm besaßen, denen jedoch ein funktioneller β_2-Mikroglobulin-Locus fehlte. Tabelle 1 zeigt die MHC-Haplotypen der verschiedenen Maus-Stämme, die in diesen Experimenten verwendet wurden.

TABELLE 1

Stamm	K	IA	IE	D	L
C57BL/6	b	b	–	b	–
129	b	b	–	b	–
B10-D2(R107)	b	b	–	d	d
B10-BR	k	k	k	k	–
B10-A(2R)	k	k	k	b	–
CBA	k	k	k	k	–

Haut-Transplantate auf syngenetische Empfänger

[0096] Haut-Transplantate wurden gemäß einer Anpassung des Verfahrens von Billingham und Medawar durchgeführt, J. Exp. Bio. 28, 385 (1951). Haut in voller Dicke, die vom Rumpf einer Spendermaus stammte, Alter 6-10 Wochen, wurde auf ein Implantatbett auf der Flanke der Empfängermaus, Alter 8-12 Wochen, angepasst. Die Stelle wurde mit einem Petroleum-Gaze-Pflaster bedeckt, und es wurde eine Gipsbinde um den mittleren Abschnitt des Empfängers gebunden. Der Verband wurde an Tag 7 entfernt, und das transplantierte Gewebe wurde danach jeden Tag visuell untersucht. Die Experimente wurden unter Verwendung eines Blind-Formats durchgeführt.

[0097] Haut-Transplantate von Mäusen, die β_2-Mikroglobulin-defizient waren, wurden leicht von syngenetischen Empfängern angenommen, während allogene Kontrolltransplantate auf denselben Rezipienten in einem normalen Zeitverlauf abgestoßen wurden. Im Gegensatz dazu wurden Knochenmarkstransplantate von denselben Tieren von syngenetischen Rezipienten von einem NK-zellvermittelten Prozess abgestoßen. Die Daten von den Haut-Transplantat-Experimenten sind in Tabelle 2 angeführt.

TABELLE 2

TAGE ÜBERLEBEN DES TRANSPLANTATS		
Empfänger	Empfänger	
	129	H-2b-β_2^--
(C57BL/6 X 129)F_1	> 300 Tage	> 300 Tage
C57BL/6	13,8 ± 2,2	13,9 ± 2,2
B10.D2(R107)	11	11,3 ± 0,5
B10.BR	11	11,7 ± 1,0
B10.A(2R)	11,3 ± 0,6	11,9 ± 1,2

[0098] Es geht aus den oben angeführten Daten hervor, dass das Fehlen von MHC-Klasse-I-Antigenen die Abstoßung eines Hauttransplantats von einem syngenetischen Spender nicht beeinflusst, wie durch die Daten des (C57BL/6 x 129)F_1-Rezipienten gezeigt wird. Die H-2^b-β_2^--Zellen exprimierten Neben-Histokompatibilitätsantigene aus dem 129-Stamm, und dadurch wurden die Transplantate von den homozygoten C57BL/6-Mäusen abgestoßen. Die Zeitdauer, bevor das Transplantat abgestoßen wurde, war länger bei Neben-Histokompatibilitätsantigen-Fehlpaarungen (13,9 Tage) als bei Transplantaten über eine Klasse-I-Fehlpaarung (11,3-11,9 Tage).

Hauttransplantate auf H-2-Klasse-I-fehlgepaarte Empfänger

[0099] Um die Transplantationsfähigkeit des β_2-Mikroglobulindefizienten Gewebes in Gegenwart einer Klasse-I-MHC-Antigen-Fehlpaarung zu testen, war das Züchten mehrerer neuer Maus-Stämme erforderlich.

[0100] Um F1-Empfänger-Tiere zu erzeugen, wurden kongene B10-Stämme mit dem 129-Stamm gekreuzt. Die Neben-Antigen-Profile von B10 und C57BL/6 waren beinahe identisch, und daher sind (B10 X 129)F_1-Mäuse gegenüber Neben-Antigenen tolerant, die in den H-2^b-β_2-mikroglobulindefizienten Mäusen vorhanden sind.

[0101] Um einen Spender-Stamm zu schaffen, der eine Klasse-I-MHC-Fehlpaarung enthält, wurde die β_2-Mikroglobulindefizienz in einen B10-Stamm, B10.BR, gezüchtet, der den H-2^k-Haplotyp besitzt. Es wurden Mäuse erzeugt, die den MHC-Phänotyp H-$2^{k/k}$, β_2-Mikroglobulin$^{-/-}$ aufwiesen. Diese Mäuse trugen Nebenhistokompatibilitätsantigene von sowohl den B10- als auch den 129-Stämmen in sich.

[0102] Vollhaut von diesen Tieren wurde durch das oben beschriebene Verfahren auf (B10.A(2R) X 129)F_1-Empfänger transplantiert. Die Rezipientenmäuse sind H-$2D^{b/b}$, während die Spendenmäuse, wie oben angeführt, H-$2D^{k/k}$ sind. Daher sind die MHC-Klasse-I-Allele am D-Locus fehlgepaart. Da jedoch den Spendermäusen β_2-Mikroglobulin fehlt, werden die MHC-Klasse-I-Antigene nicht auf der Zelloberfläche exprimiert, und daher wurden die Transplantate nicht vom fehlgepaarten Rezipienten abgestoßen. Tabelle 3 zeigt die Überlebenszeit der Hauttransplantate unter Verwendung dieser Tiere.

TABELLE 3

TAGE TRANSPLANTAT-ÜBERLEBEN

Empfänger	Spender	
	B10.BR	H-2^k-β_2^--
(B10.A(2R) X 129)F_1	12 Tage	> 90 Tage
B10.BR	> 90 Tage	12 Tage
(B10.BR X 129)F_1	> 90 Tage	> 90 Tage

[0103] Diese Resultate zeigen, dass eine homozygote Mutation am β_2-Mikroglobulin-Locus wirksam die Fähigkeit des D^k-Klasse-I-MHC-Antigens eliminierte, als Haupt-Transplantationsbarriere zu fungieren. Die Empfängermäuse waren noch in der Lage, die β_2-Mikroglobulin-defizienten Zellen abzustoßen, wenn es eine ausreichende Fehlpaarung an den Nebenhistokompatibilitäts-Loci gab, wie von der Fähigkeit der B10.BR-Rezipienten, die Hauttransplantate abzustoßen, gezeigt wurde.

[0104] In vivo dienen die Klasse-I-MHC-Moleküle dazu, fremde Peptid-Antigene zur Erkennung durch $CD8^+$-T-Zellen zu präsentieren. Als Resultat sind $CD8^+$-T-Zellen in der Lage, transplantiertes Gewebe nur auf der Basis seiner Expression fremder MHC-Klasse-I-Antigene zu erkennen und abzustoßen. Das verlängerte Überleben von MHC-Klasse-I-fehlgepaarten, β_2-Mikroglobulin-defizienten Haut-Transplantaten zeigt an, dass $CD8^+$-T-Zellen nicht in der Lage sind, dieses Gewebe als fremd anzusehen, was es diesen Zellen ermöglicht, einen gesamten Zweig der Immunantwort des Empfängers zu umgehen.

IV. Targeting bei menschlichen Soma-RPE-Zellen

[0105] Das HPRT-Gen in menschlichen retinalen pigmentierten Epithel-(RPE-)Zellen wurde unter Verwendung einer homologen Rekombination einem Targeting unterzogen, um die Fähigkeit zu zeigen, eine präzise Veränderung in nicht transformierten, diploiden menschlichen Somazellen vor dem Targeting von Genen zu erreichen, die mit der MHC-Antigen-Expression assoziiert sind.

[0106] Ein Fragment der menschlichen HPRT-Gensequenz (Edwards et al., Genomics 6, 593-608 (1990)) („R1" 11777-17810), das aus dem Lambda-Klon Huλ3 (ATCC) subkloniert wurde (Patel et al., Molec. and Cell. Biol. 6 (2), 393-403 (1986)), wurde unter Verwendung von Standardverfahren in einen pUC-Klonierungsvektor subkloniert. Das neo^r-Gen aus dem Vektor pMC1neo (Thomas und Capecchi, Cell 51, 503-512 (1987)) wurde in die einzigartige XhoI-Stelle insertiert, die sich im Exon 3 des hHPRT-Gens befindet. Dieser Vektor, genannt HPRT.MC1neo.ro, enthält 6 Kb Homologie zum hHPRT-Locus und wurde entweder mit BglII oder HindIII geschnitten, um Insertionsvektor- bzw. Ersatzvektor-Substrate zu schaffen. Die Vektorsubstrate wurden mittels Standardverfahren gereinigt, und die DNA-Konzentration wurde auf 1 mg/ml angepasst. 1 µg lineare Vektor-DNA wurde in jede Probe normaler männlicher, primärer, menschlicher RPE-Zellen (4×10^6 Zellen/Probe) elektroporiert, die aus Augengewebe menschlicher Kadaver unter Verwendung des Verfahrens von Mayerson

et al. (Invest. Opthalmol. & Visual Sci. 26, 1599-1609 (1985)) isoliert wurden. Anschließend wurden die Zellen in nicht selektives Wachstumsmedium auf drei 150-mm-Gewebskultur-Schalen ausplattiert und bei 37°C zwei Tage lang inkubiert. Am dritten Tag wurde das Wachstumsmedium ausgetauscht und Medium, das 150 µg/ml 0418 enthielt, hinzugefügt. Das Wachstumsmedium wurde erneut an Tag 5 ausgetauscht und Medium, das 150 µg/ml G418(neo) und 400 µg/ml 6-Thioguanin enthielt, hinzugefügt. Dieses Medium wurde danach jeden dritten Tag ausgetauscht. Etwa zwei Wochen nach der Transfektion waren wachsende Kolonien, die von Zellen abstammten, in denen sich der Targeting-Vektor homolog mit dem einzigen HPRT-Gen der Zelle rekombiniert hatte, auf etwa einer von zehn Platten sichtbar. Es waren keine Kolonien auf einer der Platten sichtbar, wenn keine Vektor-DNA inkludiert wurde. Einzelne Klone (Kolonien) wurden zu einer Massenkultur auf 150-mm-Schalen gezüchtet. Proben eines jeden Klons wurden in einem detergenshältigen Puffer lysiert, und DNA mit hohem Molekulargewicht (HMW) wurde mittels Standardverfahren isoliert. Diese Proben wurden mit BamHI verdaut, und es wurden 10-µg-Aliquoten auf einem Southern-Blot unter Verwendung einer Sonde analysiert, die durch PCR aus dem hHPRT-Gen kloniert wurde (3' der HPRT-R1-Vektor-Sequenzen).

[0107] Die Sonde wurde unter Verwendung der folgenden Primer hergestellt:
PC 5: 5' GACTCAGAATTCGCATGCTTAATTAAGATTGATTGATTGATGGTTTACAGTAGGAC 3' (Seq.-ID Nr. 03)
PC 31: 5' GATTACGAATTCAAGCTTGTCAAAGCATTTTCTACCACTGAGAATTGATC 3' (Seq.-ID Nr. 04)

[0108] Diese Blots zeigten eine 20-Kb-Bande im Fall der Wildtyp-Stamm-DNA, eine 15-Kb-Bande in den Klonen, die mit dem BgIII-geschnittenen Vektor transfiziert waren und mit G418 und 6-Thioguanin ausgewählt wurden; sowie eine 6-Kb-Bande in den Zellen, die mit dem HindII-geschnittenen Vektor transfiziert waren und in G418 und 6-Thioguanin ausgewählt wurden. Es wurden zumindest drei zusätzliche Verdauvorgänge verwendet, um jeden dieser Klone zu analysieren. Alle zeigten an, dass jeder ausgewählte (G418 + 6-Thioguanin)-Klon einer akkuraten Ersatz-(HindIII) oder Insertions-(BgIII)Rekombinationsreaktion unterzogen wurde. Sowohl Insertions- als auch Ersatz-Rekombinationsvorkommnisse traten mit einer Häufigkeit von etwa 10^{-7} Rekombinanten/Input-Zelle auf. Diese Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es wurde nur ein Klon pro Transfektion gezählt, um die Unabhängigkeit eines jeden rekombinanten Klons sicherzustellen. Die intramolekulare Rekombination wurde in diesem System durch Untersuchen der Reversionshäufigkeit mehrerer der Insertionsmutanten untersucht. Alle dieser Mutanten kehrten zu einem HPRT+, neo^s-Phänotyp in einer äquivalenten Häufigkeit zurück. Diese Revertanten wurden in einer Häufigkeit von 10^{-5} pro Input-Zelle detektiert. Von zahlreichen dieser Klone wurde mittels Southern-Blotting gezeigt, dass sie wahre Rekombinanten sind. Diese Resultate zeigen das Gen-Targeting in menschlichen Primär-RPE-Zellen, um das HPRT-Gen zu deaktivieren.

TABELLE 4

RPE/HPRT-Targeting-Resultate

DNA-VERHÄLTNIS	TYP	NEO^s-HÄUFIGKEIT	REKOMBINATIONS-HÄUFIGKEIT
BgIII-HPRT-MC/RO	O-Vektor	–	$1{,}3 \times 10^{-7}$
HindIII-HPRT-MC/RO	Ω-Vektor	–	$7{,}8 \times 10^{-8}$
BgIII-HPRT-MC/RO 36:1	O-Vektor	$1{,}4 \times 10^{-5}$	$3{,}8 \times 10^{-7}$
HindIII-HPRT-MC/RO 85:1	Ω-Vektor	$1{,}1 \times 10^{-5}$	$1{,}3 \times 10^{-7}$
BgIII 86.8 10:1	O-Vektor	$2{,}0 \times 10^{-6}$	$2{,}0 \times 10^{-7}$

V. Targeting des β_2-Mikroglobulin-Locus in menschlichen Zellen

[0109] Diese Experimente zeigen das Targeting der Loci zur Verringerung der Zelloberflächenexpression der Klasse-I-MHC-Antigene in normalen diploiden menschlichen Zellen durch das Deaktivieren des β_2-Mikroglobulin-(β_2-M-)Gens in normalen diploiden menschlichen RPE-Zellen.

[0110] Es wurden zwei Ansätze für das Deaktivieren des β_2-M-Locus entwickelt, um die Klasse-I-MHC-Antigenexpression zu verringern. Im ersten Ansatz wurde ein Targeting-Vektor, genannt Nr. 137, mit den folgenden Elementen konstruiert, die von den 5'- zu den 3'-Termini beschrieben sind: ein 7,6-Kb-Fragment der genomischen DNA-Homologie (NotI-MluI-Fragment aus der Region stromauf des Exon 1 des β_2-M-Gens); ein voll funktionelles Neomycin-(Neo-)Resistenzgen (stammt von pMC1Neo ab) zur Auswahl von Zellen, die den Vektor stabil integrieren, eine stromab gelegene Homologie oder ein DSH-Fragment (ein 1,4-Kb-XbaI-SmaI-Fragment stromab des Exons 4 des β_2-M-Gens); ein Herpes-Thymidinkinase-Gen (2,0 Kb); das 5'-Ende des rekom-

binanten Locus, umfassend einen starken frühen CMV-Promotor und Enhancer; eine partielle cDNA-Sequenz (603 bp) für menschliches CD4 (T4) (Maddon et al., Cell 42, 93-104 (1985); GENBANK: HUMATCT4), umfassend einen Teil der untranslatierten 5'-Region, die Signalsequenz (Aminosäuren Nr. 1-23) und die ersten zwei immunglobulinartigen Domänen des reifen menschlichen CD4-Genprodukts (Aminosäuren Nr. 24-222), im Rahmen an die letzten 10 Basenpaare von Exon 1 des β_2-M-Gens fusioniert (kodierend für ein Alanin, anschließend die ersten zwei Codons des reifen β_2-M-Genprodukts); sowie ein 3,5-kb-Fragment aus dem ersten Intron des β_2-M-Gens (bis zu der ClaI-Stelle) (**Fig. 1A**). Der menschliche β_2-M-Locus ist in **Fig. 1B** dargestellt, und der einem korrekten Targeting unterzogene, rekombinante Locus ist in **Fig. 1C** dargestellt.

[0111] Ein zusätzlicher Targeting-Vektor, benannt Nr. 148 (**Fig. 2**), wurde durch Entfernen von 3,6 Kb der 5'-Region stromauf des β_2-M-Promotors konstruiert, wobei 4,0 Kb Homologie beibehalten wurden.

[0112] Es wurde ein ELISA entwickelt, um das chimäre CD4-β_2-M-Genprodukt zu detektieren, das durch ein homologes Targeting-Vorkommnis durch die Bindung von Proteinen, die ein von β_2-M kodiertes Epitop enthalten, an die Oberfläche eines Mikrotiter-Wells produziert werden würde, sowie durch die Detektion gebundener Proteine, die ein CD4-kodiertes Epitop besitzen. Mikrotiter-Platten wurden mit einem Kaninchen-Anti-Mensch-β_2-M-IgG-Präparat beschichtet (DAKO Corp., Carpinteria, CA). Nicht spezifische Bindungsstellen wurden mit Ovalbumin gesättigt. Die Probe wurde aufgetragen und inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein muriner monoklonaler Anti-Mensch-CD4-Antikörper (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ), der bekanntermaßen ein Epitop bindet, das in dem Abschnitt von CD4 enthalten ist, der für das Deaktivierungskonstrukt verwendet wird, zu den Wells hinzugefügt und inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein alkalische-Phosphatase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-IgG2a (Cappel, Organon Teknika, Corp., Durham, NC) in den Wells inkubiert.

[0113] Anschließend wurden die Wells in dem chromogenen Phosphatase-Substrat p-Nitrophenylphosphat inkubiert, und die Resultate wurden auf einem Plattenleser gelesen. Um eine Formulierung des ELISA-Tests zu ermöglichen, wurden RPE-Zellen aus einer Passage-6-Kultur geerntet und mit Kontrollvektoren transfiziert: entweder einem CD4-Expressionsvektor voller Länge, der den unmittelbaren frühen CMV-Promotor, das Intron, die CD4-Signalsequenz und die CD4-cDNA-kodierende Region voller Länge und das SV40-Polyadenylierungssignal enthält, oder einem β_2-M-Fusionsprotein-Expressionsvektor, der den CMV-Promotor sowie eine chimäre cDNA, die aus der CD4-Signalsequenz und den ersten zwei immunglobulinartigen Epitopenm von CD4, die an die reife kodierende Region voller Länge von β_2-M fusioniert sind, besteht, sowie das SV40-Polyadenylierungssignal enthält, und zwar durch Elektroporation (0,5 ml Zellen; 270 Volt, 960 µF, 8×10^6 Zellen/ml in DME/F-12-Medium ohne Serum, 1-5 µg lineare DNA bei Raumtemperatur). Einen Tag nach der Transfektion wurde das konditionierte Medium von den transfizierten Zellen geerntet und in ELISA getestet, das Proteine einfängt, die ein β_2-M-kodiertes Epitop enthalten, und gebundene Proteine detektiert, die ein CD4-kodiertes Epitop besitzen. Der resultierende Test erwies sich als spezifisch für das CD4-β_2-M-Fusionsprotein, wodurch eine Detektion von einer so geringen Anzahl wie 1000 exprimierenden Zellen ermöglicht wird, wie durch Zellzählung und Probenverdünnung getestet wird.

[0114] Die Targeting-Vektoren Nr. 137 und Nr. 148 wurden mit Restriktionsenzymen linearisiert (wie in Tabelle 5 angeführt) und durch Elektroporation unter Verwendung von 2,0 bis 7,5 µg Vektor pro 4×10^6 Zellen in RPE-Zellen (Passage 7-18) transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in 12-Well- oder 24-Well-Platten ausplattiert. Am Tag nach der Transfektion wurde G418 zum Medium in einer Konzentration von 400 µg/ml hinzugefügt, und die Zellen wurden für eine Zeitspanne von etwa 2 Wochen in G418 ausgewählt, bis G418-resistente Kolonien sichtbar waren. Konditioniertes Medium aus Wells, enthaltend 1-10 Kolonien, wurde unter Verwendung des ELISA gescreent, um das chimäre CD4-β_2-M-Genfusionsprotein zu detektieren, das von Klonen erwartet wird, die einem korrekten Targeting unterzogen wurden. Konditionierte Medien, die von einzelnen Klonen erhalten wurden, die aus jedem positiven Pool stammten, wurden erneut gescreent, und es wurden rekombinante Klone identifiziert. Die Daten von neun unabhängigen Targeting-Experimenten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Mehrere ELISA-positive Klone wurden zufällig zur weiteren Analyse ausgewählt. Diese Klone wurden vermehrt und mittels Southern-Blotting und Radio-Immunpräzipitation getestet.

TABELLE 5

RPE/β_2-M-Targeting-Resultate

DNA	Rekombinanten	Rekombinationswirksamkeit
2 µg NotI Nr. 137	12	$6,4 \times 10^{-7}$
4 µg NotI Nr. 137	8	$2,7 \times 10^{-7}$
4 µg NotI Nr. 137	3	$3,8 \times 10^{-7}$
2 µg NotI Nr. 137	20	$6,7 \times 10^{-7}$
4 µg NotI Nr. 137	3	$1,0 \times 10^{-7}$
7,5 µg NotI Nr. 137	14	$1,2 \times 10^{-6}$
2 µg NotI Nr. 137	16	$2,5 \times 10^{-7}$
2 µg XhoI Nr. 137	35	$6,4 \times 10^{-7}$
2 µg Not-Cla Nr. 148	30	$7,5 \times 10^{-6}$

[0115] Ein Radio-Immunpräzipitations-(RIP-)Test zur Detektion des sekretierten Fusionsproteins wurde wie folgt durchgeführt. Eine kleine Subkultur nicht transfizierter und ELISA-positiver Zellen eines jeden ausgewählten Klons (Klone: 24.1.3.2 und 28.1.6.2) wurde mit S^{35}-Methionin und S^{35}-Cystein vier (4) Stunden lang radiomarkiert. Nach dieser Markierungsperiode wurden sowohl die Zellen als auch ihre Überstände geerntet. Die Zellen wurden lysiert, und die Lysate und Überstände wurden entweder mit einem Kaninchen-Anti-Mensch-β_2-Mikroglobulin-IgG-Präparat (DAKO, Carpinteria, CA) oder mit einem Kaninchen-Anti-CD4-IgG-Präparat (American Bio-Technologies, Inc., Cambridge, MA) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit fixierten Staphylococcus-aureus-Zellen inkubiert, die Kaninchen-IgGs über Protein A an ihre Oberfläche binden. Die resultierenden Immunkomplexe wurden mittels Zentrifugierung gesammelt und auf SDS-Polyacrylamidgradienten-Gelen einer Elektrophorese unterzogen. Die Gele wurden mit Natriumsalicylat behandelt, einer Szintillationssubstanz, welche die Empfindlichkeit der Detektion der schwachen β-Teilchen erhöht, die von ^{35}S ausgestrahlt werden. Die Gele wurden anschließend gegenüber einem Röntgen-Kodak-XAR-5-Film ausgesetzt, und es wurde ein fluorographisches Bild erhalten.

[0116] Die Stamm-RPE-Zellen zeigten eine 12-Kd-Bande mit dem β_2-M-IP und kleine klaren Banden mit dem CD4-IP. Im Gegensatz dazu zeigen die zwei ELISA-positiven Transfektanten (Spuren 2,3 und 5,6) eine zusätzliche 31-Kd-Bande, die auch vorhanden war, als sie mit einem CD4-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert wurden. Dies ist das erwartete Molekulargewicht des CD4-β_2-M-Fusionsproteins. Jeder der ELISA-positiven Klone zeigte auch die Expression des nicht modifizierten β_2-M-Proteins. Dies ist der erwartete Phänotyp der Klone, die an einer Kopie eines diploiden Locus modifiziert sind.

[0117] Zusätzliche ELISA-positive Klone wurden vermehrt (Klone 28.2.6.1 und 33.1.4.6), und genomische DNA wurde für die Southern-Analyse extrahiert. Genomische DNA wurde entweder mit HpaI oder EcoRV verdaut, auf einem 1-%-Agarose-Gel fraktioniert, auf einen Festträger geblottet und mit einer Sonde hybridisiert, welche die 3'-Homologieregion flankiert. Die Stamm-RPE-Zellen zeigten eine einzelne Bande mit jedem Verdau (etwa 6,4 Kb im HpaI-Verdau und etwa 20 Kb im EcoRV-Verdau), wobei die ELISA-positiven Klone sowohl das Wildtyp-Restriktionsfragment als auch eine neue rekombinante Bande jener Größe aufwiesen, die für ein akkurates Targeting-Vorkommnis erwartet wird (etwa 12,5 Kb im Hpa-I-Verdau und etwa 17 Kb im EcoRV-Verdau). Dies zeigt die rekombinante Natur dieser Zellen und zeigt, dass diese Methodik eine Bestimmung der Häufigkeit des homologen Rekombinationsvorkomnisses zuließ, ebenso wie es auch die Fähigkeit zeigte, auf einen Locus zu zielen, der direkt mit der MHC-Expression in einer nicht transformierten diploiden menschlichen Zelle zusammenhängt.

[0118] In gewissen Fällen kann es wünschenswert sein, den CD4-kodierten Teil des Fusionsgens aufgrund der potentiellen Immunogenität des Fusionspeptids in einem Wirtsorganismus, in den er eingeführt ist, zu eliminieren. In solchen Fällen wird Gancyclovir nach dem Targeting angewandt, um auf überlebende Zellen zu selektieren, die eine Deletion an DNA-Sequenzen zwischen den DSH-Homologieregionen (**Fig.** 1) enthalten, wodurch der CD4-Abschnitt des Fusionsproteins eliminiert wird. Alternativ dazu kann, um die Sekretion des Fusionsproteins aus der Zelle zu eliminieren, die Signalsequenz für CD4 aus dem Targeting-Vektor deletiert werden, und die Zelllysate können unter Verwendung von ELISA auf Rekombinanten gescreent werden.

VI. Targeting mit Neo-Ersatz-Vektoren

[0119] In einem zweiten Ansatz werden die Targeting-Vektoren Nr. 137 und Nr. 148 mit einem Targeting-Vektor ersetzt, der mit Nr. 159 bezeichnet wird (siehe **Fig. 3**). Dieser Vektor ist ein Neo-Ersatz-Vektor. Vektor Nr.

159 enthält dieselbe stromauf gelegene Homologie-Region wie p148, nämlich das 4,0-Kb-ScaI-MluI-Fragment aus der Region stromauf des Exon 1 des β_2-M-Gens, eine Mutanten-Neo-Expressionseinheit (der eine XhoII-Restriktionsstelle an bp 1286 in der Wildtyp-Neo-DNA-Sequenz fehlt) von pMC1Neo-Mutant und eine stromab gelegene 3,5-Kb-Homologieregion aus einer gentechnisch veränderten NheI-Stelle 14 bp vom 3'-Ende von Exon 1 bis zur ClaI-Stelle im ersten Intron des β_2-M-Gens. Erfolgreiches Targeting unter Verwendung dieses Vektors führt zu der Einführung einer Null-Mutation am β_2-M-Locus.

[0120] Normale menschliche Keratinozyten, die aus menschlichen Vorhäuten isoliert wurden und in Gegenwart von Mausembryo-Fibroblasten-Feeder-Zellen gezüchtet wurden, werden, wie oben stehend beschrieben, durch Elektroporation unter Verwendung von p159, das mit den Restriktionsenzymen NotI und/oder ClaI verdaut wurde, unter Verwendung von 2 µg DNA pro 4×10^6 Zellen transfiziert. Die Zellen werden anschließend in 100-mm- oder 150-mm-Gewebekultur-Schalen mit Feeder-Schichten ausplattiert, die aus Mausembryo-Fibroblasten bestehen. Am Tag nach der Transfektion wird G418 zu dem Medium in einer Konzentration von 400 µg/ml zugegeben, und die Zellen werden etwa 2 Wochen lang selektiert. Anschließend werden einzelne Klone in 24-Well-Platten aussortiert, die Feeder-Zellen enthalten, und auf zwei 150-mm-Schalen vermehrt. Genomische DNA wird aus einer Schale hergestellt, und die Zellen werden gefroren. DNA aus Klonen wird mit EcoRV verdaut, auf Agarose-Gelen einer Elektrophorese unterzogen und zum Southern-Blotting auf Nylon-Membranen transferiert. Ein 2-Kb-Eco-RI-Fragment aus dem β_2-M-Gen (stromab der Homologie, die zur Vektorkonstruktion verwendet wird) wird als Sonde verwendet (**Fig.** 1). Für den Vektor wird ein etwa 17-Kb-EcoRV-Fragment erwartet, das mit der Sonde hybridisiert, wenn es zu einem homologen Rekombinationsvorkommnis gekommen ist. Der nicht rekombinierte Locus sollte ein hybridisierendes Fragment mit einer Größe von etwa 20 Kb enthalten. Die anfänglichen rekombinanten Klone enthalten einen rekombinierten Locus und einen nicht rekombinierten Locus.

[0121] Um rekombinante Zellen zu erhalten, welche die Neo-Targeting-Vektoren in beiden Kopien des MHC-Locus enthalten (d.h. Zellen, die für das Targeting-Vorkommnis homozygot sind), werden Zellen in höheren Mengen von G418 ausgewählt. Alternativ dazu können heterozygote Zellen unter Verwendung einer Kombination von Anti-β_2-M- oder Anti-αMHC-Klasse-I-Molekülen und Komplement oder unter Verwendung von Anti-αMHC-Klasse-I-Antikörpern, die an Magnetperlen gekoppelt sind, gegenselektiert werden (Vaccaro, Am. Biotech. Lab., 30-35 (1990)). Unter Verwendung von Vektoren, die ein mutiertes Neo-Gen enthalten, werden Konzentrationen des Selektionsmittels G418 unter Verwendung des von Mortensen et al., Molec. and Cell. Biol. 12 (5), 2391-2395 (1992), beschriebenen Verfahrens getestet, um jene zu erhalten, die das Wachstum homozygoter Zellen fördern. Zusätzlich dazu führt eine Niedrig-Level-G418-Selektion dazu, dass die Zellpopulation sich während der kontinuierlichen Vermehrung der Zellpopulation hin zur Homozygotie verschiebt, da ein Nichttrennen homologer Chromosomen ein reziprokes Vorkommnis ist und die homozygote Wildtypzelle sehr empfindlich auf die G418-Selektion ist.

[0122] Zusätzlich zur Auswahl von Zellen, die spontan homozygot geworden sind, können Zellen, die für deaktivierte β_2-M-Gene homozygot sind, durch Wiederholen des homologen Targetings unter Verwendung von Neo-Vektoren, wie oben stehend bemologen Targetings unter Verwendung von Neo-Vektoren, wie oben stehend beschrieben, erhalten werden. Unter Verwendung eines Targeting-Vektors, der dieselben Homologiearme enthält, jedoch einen anderen selektierbaren Säugetier-Marker, wie z.B. Hygromycin^r (hyg^r), besitzt, wird mit der anfänglichen Targeting-Wirksamkeit (10^{-6} bis 10^{-7}, etwa 10^{-2} pro hyg^r- und Neo^r-Klon) ein Klon, der einem homozygoten Targeting unterzogen wurde, aus einer Heterozygote produziert.

VII. Targeting des β_2-M-Locus in normalen menschlichen Keratinozyten

[0123] Normale menschliche Keratinozyten, die aus menschlichen Vorhäuten isoliert wurden und in Gegenwart von Mausembryo-Fibroblasten-Feeder-Zellen gezüchtet wurden, wurden unter Verwendung eines linearisierten Präparats des Targeting-Vektors Nr. 137, der oben stehend in Beispiel V beschrieben wurde, transfiziert. G418^r-Kolonien der menschlichen Keratinozyten wurden ausgewählt und, wie oben stehend beschrieben, auf die Expression des CD4-β_2-M-Fusionsproteins gescreent. Die Resultate von drei (3) unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 6 angeführt.

TABELLE 6

Targeting von β_2-M in menschlichen Keratinozyten

DNA	positive Klone	Targeting-Wirksamkeit
Not-Cla 148	2	$3{,}3 \times 10^{-7}$
Not-Cla 148	11	$7{,}9 \times 10^{-7}$
Not-Cla 137	10	$1{,}3 \times 10^{-6}$

[0124] Diese Experimente zeigten eine homologe Rekombination, die in Somazellen in Häufigkeiten erreicht wurde, die, wie oben stehend beschrieben, jenen sehr ähnelten, die bei menschlichen RPE-Zellen beobachtet wurden. Die Unterschiede, die bei den absoluten Targeting-Häufigkeiten beobachtet wurden, sind auf die unterschiedlichen Plattierungseffizienzen der zwei Zelltypen zurückzuführen, etwa 90 % bei den hRPE-Zellen und 5 % bei den menschlichen Keratinozyten.

[0125] Diese Resultate zeigen, dass die homologe Rekombination zur gerichteten Modifikation verschiedener menschlicher Zelltypen verwendet werden kann, die in vitro gezüchtet werden. Die Resultate zeigen auch die Fähigkeit der Targeting-Konstrukte und der modifizierten ELISA-Bestimmung, die Rekombinanten zu detektieren, die unter Verwendung dieser Verfahren erzeugt wurden. Das Verfahren der Erfindung ermöglicht die schnelle und akkurate Detektion gewünschter homologer Rekombinationsvorkommnisse, die in geringer Häufigkeit auftreten können und schwer zu detektieren sein können, ohne dabei die Lebensfähigkeit der getesteten Zellen zu schädigen. Daher kann es auf intrazelluläre Protein-Targets angewandt werden, um die Produktion funktioneller Mutanten-Proteine einfach dadurch zu ermöglichen, dass das erfolgreich einem Targeting unterzogene Protein zur Detektion aus der Zelle transportiert oder außerhalb sekretiert wird.

VIII. Targeting des IFN-γR-Locus in embryonalen Stammzellen

[0126] Dieses Beispiel beschreibt das Targeting des IFN-γ-Locus in embryonalen Maus-Stammzellen. Da die Wirksamkeit des Gen-Targetings in normalen Somazellen erwartungsgemäß gering war, wurden Verfahren entwickelt, um Targeting-Vorkommnisse in embryonalen Maus-Stamm-(ES-)Zellen anzureichern, die leicht einer homologen Rekombination unterzogen werden.

[0127] Konstruktion von Targeting-Plasmiden. Ein Ersatzvektor, pB-IT1, der einen bezüglich der Transkription aktiven selektierbaren Neomycin-(Neo-)Marker enthielt, der in ein Exon des IFN-γR-Gens insertiert war, wurde folgendermaßen konstruiert (**Fig.** 4). Das Plasmid pB-I7.26 wurde als Quelle von Targeting-Sequenzen verwendet. Dieses Plasmid enthält ein 7,2-Kb-BamHI-Fragment, das aus einer λ-Phagen-Bibliothek isoliert wurde, die aus 129-Maus-PCC4-Zellen hergestellt worden war, die in Plasmid Bluescript (Stratagene, San Diego, CA) insertiert worden war. Oligonucleotide wurden basierend auf der veröffentlichten IFN-γR-cDNA-Sequenz synthetisiert (Hemmi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9901-9905 (1989)), markiert und als Sonden verwendet. Ein 5,2-Kb-BamHI-HindIII-Fragment von pB-I7.26, enthaltend IFN-γR-Exons IV bis VI (**Fig. 4B**), wurde anschließend in pBluescript-SK (Stratagene) subkloniert. Das resultierende Plasmid (pB-5.2BH) besitzt in Exon VI, das für die Transmembranregion des Proteins kodiert, eine einzigartige EcoRI-Stelle, die für die Insertion des selektierbaren Markergens ausgewählt wird. Der Vektor pB-IT1 (**Fig. 4A**) wurde durch Subklonieren der gesamten Neo-Kassette, eines 1,1-Kb-XhoI-SalI-Fragments von pMC1-Neo-Poly-A, in die EcoRI-Stelle von pB-5.2BH unter Verwendung eines XhoI-EcoRI-Adaptors hergestellt. Anschließend wurde ein Subklon mit dem Neo-Gen in derselben Transkriptionsausrichtung wie das Rezeptorgen ausgewählt. Nach der Selektion auf die G418-Resistenz wurden die Kolonien auf homologe Rekombination gescreent. Keiner der 432 analysierten ES-Zellklone wurde einem Targeting unterzogen, was zeigt, dass es sich bei der homologen Rekombination um ein rares Vorkommnis handelt (Tabelle 7). Um die Anzahl resistenter Kolonien zu reduzieren, die aus inkorrekter DNA-Integration resultierten, wurden sowohl die Promotor-Enhancer-Sequenzen als auch das Translations-Start-(ATG-)Codon von MC1-Neo in pB-IT1 durch oligonucleotidgerichtete Mutagenese deletiert. Bei dem resultierenden promotorlosen Neo-Vektor (pB-IT2) (**Fig. 4A**) ist das zweite Codon (GGA) des selektierbaren Markers stromab von Lys 254 gemäß Hemmi et al., s.o., im Raster in die kodierende Region des Rezeptorgens fusioniert. Die IFN-γR-Sequenzen in diesem Vektor sind dieselben wie in pB-IT1. Daher wird das Neo-Gen nach der Transfektion als ein IFN-γR-Neo-Fusionsprotein exprimiert, wenn es zu einer homologen Rekombination zwischen pB-IT2 und dem Target-Locus kommt. Da das selektierbare Gen 9 bp stromab von der für die Transmembran kodierenden Region insertiert wurde (Hemmi et al., s.o.), sollten die Neo-Sequenzen im Fusionsprotein im Zytoplasma, das Resistenz gegen G418 verleiht, beibehalten werden. Vor der Elektroporation wurden die Plasmide mit PvuI, das innerhalb des Bluescript-Plasmids schneidet, linearisiert.

TABELLE 7

Wirksamkeit der homologen Rekombination

Zelltyp	Vektor	Behandelte Zellen (x 10^{-7})	Gesamt $G418^r$	$G418^r$ anal.	Gesamt IFN-γR^-	IFN-γR^-/$G418^r$ %	Absol. TargetHäufigkeit
ES-Zellen							
Bsp. 1	pB-IT1	6	3480	432	0	0,0	0
Bsp. 2	pB-IT1	2	3150	–	–	–	–
	pB-IT2	14	182	124	22	17,3	$2,3 \times 10^{-7}$
Bsp. 3	pB-IT2	12	168	82	10	12,2	$1,7 \times 10^{-7}$
Myoblasten							
Bsp. 1	pB-IT2	2	3992	200	1	0,5	$1,0 \times 10^{-6}$
Bsp. 2	pB-IT2	2	2534	200	3	1,5	$1,9 \times 10^{-6}$

[0128] Die Plattierungseffizienz elektroporierter Zellen reichte von 20-30 % bei ES-Zellen und von 30-55 % bei Myoblasten. IFN-γR^- sind $G418^r$-Klone, die einem Targeting unterzogen wurden. * Klone wurden mittels PCR unter Verwendung eines 5'-Primers (5'ACGGTATCGCCGCTCCCGAT3') (Seq.-ID Nr. 05), der von Neo stammte, und unter Verwendung eines 3'-Primers (5'-GACCTATTTGTGCATTGGAAGC3') (Seq.-ID Nr. 06), der von genomischen IFN-γR-Sequenzen außerhalb des Targeting-Vektors stammte, gescreent. 132 dieser Klone wurden mittels Southern erneut gescreent.

[0129] Zellkultur, Elektroporation und Selektion. Um die Anreicherungsstrategie zu testen, wurden ES-Zellen mit Vektor pI-IT1 oder pB-IT2 elektroporiert und mit G418 selektiert. Die ES-Zelllinie E14TG2a (Hooper et al., Nature 326, 292-295 (1987), bereitgestellt von Dr. Oliver Smithies, University of North Carolina, Chapel Hill, NC) wurde auf mitotisch inaktiven STO-Fibroblasten gezüchtet, die gegen G418 (NSTO) resistent waren, wie von Robertson in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach, 71-112, IRL Oxford, Robertson (Hrsg.) (1987), beschrieben. Um die ES-Zelllinie E14-1 (Kuhn et al., Science 254, 707-710 (1991)) zu züchten, wurden embryonale Primär-Fibroblasten als Feeder-Schicht verwendet, und der rekombinante murine Leukämie-Inhibierungsfaktor (10^4 U/ml) wurde zu dem Medium hinzugefügt.

[0130] Zusätzlich dazu wurde die Fähigkeit von Maus-Myoblasten, eine homologe Rekombination durchzuführen, unter Verwendung der oben beschriebenen Strategie zur hochgradig wirksamen homologen Rekombination zur Deaktivierung des IFN-γR-Gens in Maus-ES-Zellen untersucht. Myoblasten wurden aus dem Skelettmuskel 14 Tage alter Mäuse (C57BL/6 X 129) unter Verwendung von 0,5 % Collagenase isoliert, 2 Stunden lang vorplattiert, um die Fibroblastenkontaminierung zu reduzieren, und anschließend bei 10^5 Zellen/cm^2 in ergänztem F10-Medium (frisches Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 5 % Pferdeserum, 2 mM Glutamin, 0,5 % Hühnerembryoextrakt, 20 ng/ml basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor und konditioniertem Medium aus Maus-Muskelfibroblasten, 1:1) beimpft. Zellen mit Myoblasten-Morphologie wurden kloniert und in ergänztem F-10-Medium mit fibroblastenkonditioniertem Medium für bis zu 100 Verdoppelungen gezüchtet. Unter diesen Kulturbedingungen exprimieren Zellen denselben Phänotyp und dieselbe Wachstumsregulierung wie isolierte Primär-Myoblasten und behalten ihre Fähigkeit, zu differenzieren und kontrahierende Myotuben zu bilden (Austin et al., In vitro 29A, 105A (1993)). Klone wurden ausgewählt und vermehrt. Es wurde eine sehr geringe Klonvariation bezüglich des Wachstums und der Morphologie beobachtet.

[0131] ES-Zellen (2×10^7) oder Myoblasten (1×10^7) wurden in 0,8 ml Ca^{2+}- und Mg^{2+}- freiem phosphatgepuffertem Medium (ES-Zellen) oder 0,5 ml F10-Medium (Myoblasten) mit 10 µg linearisierter Plasmid-DNA bei 600 V/cm und 500 µF (ES-Zellen) oder bei 875 V/cm und 960 µF (Myoblasten) in einem Bio-Rad-Gen-Pulser einer Elektroporation unterzogen. Die elektroporierten Zellen wurden ausplattiert, und das Medium wurde nach 24 Stunden (ES-Zellen) oder nach 48 Stunden (Myoblasten) mit Medium ersetzt, das 100 µg/ml G418 (aktive Form) enthielt. Einzelne G418-resistente Kolonien wurden nach 10-18 Tagen (ES-Zellen) und 10-12 Tagen (Myoblasten) ausgesucht, und es wurde ihnen eine Vermehrung ermöglicht.

[0132] ES-Zellen, die mit pB-IT2 elektroporiert wurden, bildeten G418-resistente Kolonien, was zeigte, dass

das selektierbare Gen in dem IFN-γR-Neo-Konstrukt funktionell war. Die Anzahl an Kolonien, die mit dem bezüglich der Transkription stummen Targeting-Vektor pB-IT2 erhalten wurde, war bedeutend geringer (120fach) als die Anzahl, die mit dem Targeting-Vektor mit voller Funktion erhalten wurde (Tabelle 7).

[0133] Myoblasten, die mit dem Vektor pB-IT2 elektroporiert wurden, bildeten auch G418-resistente Kolonien. Die Häufigkeit G418-resistenter Kolonien pro Gesamtanzahl elektroporierter Zellen war 120fach höher bei Myoblasten als bei ES-Zellen (Tabelle 7).

[0134] Screening. Resistente ES-Zellkolonien, die mit Vektor pB-IT2 erzeugt wurden, wurden wie folgt auf homologe Rekombination gescreent. BamHI-verdaute genomische DNA (6 bis 10 µg) wurde durch Elektrophorese durch ein 0,8-%-Agarose-Gel getrennt, auf Nylon-Membranen transferiert (Zeta Bind, Cuno Laborstory Products, Meriden, CONN) und unter Standardbedingungen mit einer IFN-γR-Sonde (Sonde A) hybridisiert, die sich 3' von den Targeting-Vektor-Sequenzen befindet (Fig. 4C). Die Insertion des Neo-Gens in den Target-Locus sollte zusätzlich zu einem 7,2-Kb-Wildtyp-BamHI-Fragment ein neues 2,5-Kb-BamHI-Fragment ergeben, das mit dieser Sonde hybridisiert. Von einer Gesamtanzahl von 206 G418-resistenten Kolonien, die in zwei verschiedenen Experimenten erzeugt wurden, wiesen 32 das für einen einem Targeting unterzogenen Locus prognostizierte 2,5-Kb-BamHI-Fragment auf (Tabelle 7). DNA von fünf der rekombinanten Klone, die nach diesem Verfahren positiv waren, wurden weiter vermehrt und analysiert. Genomische DNA wurde mit EcoRI oder XbaI verdaut und entweder mit Sonde A oder mit einer externen 5'-IFN-γR-Sonde (B), die auch zum Targeting-Vektor extern ist, hybridisiert (Fig. 4C). Die Sonden wurden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines cDNA-Klons (Sonde B) oder von pB-I7.26 (Sonde A) als DNA-Matrize erzeugt. Diese Sonden entsprechen den Nucleotiden 103 bis 486 (Sonde B) und 1000 bis 1666 (Sonde A) (Hemmi et al., s.o.). Die IFN-γR-cDNA wurde durch reverse Transkription der Gesamt-RNA erzeugt, die als Maus-EL-4-Zellen und durch Amplifikation des Produkts mittels PCR isoliert wurde. Da die EcoRI-Stelle in Exon VI im Targeting-Vektor entfernt wurde, ergab EcoRI-verdaute DNA aus einem Klon, der einem korrekten Targeting unterzogen wurde, ein Fragment mit 22,5 Kb, das mit beiden Sonden hybridisierte. Dieses neue EcoRI-Fragment besteht aus der Region, die durch das 9,5-Kb-EcoRI-Fragment bedeckt wird, das mit Sonde A hybridisiert, dem 12-Kb-EcoRI-Fragment, das mit Sonde B hybridisiert, und dem insertierten Neo-Gen. Ein neues Fragment von etwa 22 Kb wurde in allen fünf Klonen detektiert, was eine homologe Rekombination zwischen dem Vektor und dem Target-Locus zeigt. Dementsprechend ergab DNA aus denselben Klonen, die mit XbaI verdaut wurden und mit Sonde A hybridisierten, ein neues 7,5-Kb-Fragment, das aus der Insertion von Neo in das endogene 6,5-Kb-XbaI-Fragment resultierte. Die Häufigkeit der Rekombinationsvorkommnisse (1/6), die mit dem Vektor pB-IT2 erhalten wurde, zeigte, dass das Fehlen von Sequenzen im Targeting-Vektor, die für die Transkription und die Translation des selektierbaren Markers notwendig sind, die relative Gen-Targeting-Häufigkeit um zumindest das 70fache erhöhte.

[0135] Eine Gesamtanzahl von 400 G418-resistenten Myoblasten-Kolonien wurde ausgewählt, vermehrt und durch Southern-Blot-Analyse gescreent. Von vieren dieser Klone wurde herausgefunden, dass sie am IFN-γR-Locus einem korrekten Targeting unterzogen wurden. Man fand heraus, dass die Häufigkeit homologer Rekombinanten bei etwa 1/100 der G418-resistenten Myoblasten lag. Während die relative Häufigkeit des Gen-Targetings bei Myoblasten geringer war als jene, die bei ES-Zellen beobachtet wurde (1/6), war die Anzahl homologer Rekombinanten pro Gesamtanzahl der G418-resistenten Kolonien in ES-Zellen etwa 15fach höher als in Myoblasten, die absolute Gen-Targeting-Häufigkeit bei Myoblasten war den Ergebnissen zufolge etwa 8fach höher ($1{,}6 \times 10^{-6}$ bei Myoblasten und $2{,}1 \times 10^{-7}$ bei ES-Zellen) (Tabelle 7).

IX. Expression von MHC-Antigenen bei Myoblasten, die einem IFN-γR-Targeting unterzogen wurden

[0136] Das IFN-γR-Neo-Hybridprotein, das, wie oben stehend beschrieben wurde, durch homologe Rekombination erzeugt wurde, enthält die extrazellulären und Transmembran-Domänen des nativen Rezeptors, jedoch nicht die zytoplasmatische Domäne, von der gezeigt wurde, dass sie für die zelluläre Signalübertragung nach der IFN-γR-Behandlung essentiell ist (Farrar et al., J. Biol. Chem. 266, 19626-19635 (1991)). Um zu bestimmen, ob diese Mutation in der Lage ist, die IFN-γR-Funktion aufzuheben, wurde die Induktion der MHC-Klasse-I-Antigen-Expression, vermittelt durch IFN-γR, in Myoblasten evaluiert, die eine oder zwei Kopien des zerstörten IFN-γR-Allels enthielten. Myoblasten, die zwei Kopien der Mutation enthielten, wurden aus dem Muskel transgener Mäuse isoliert, die für die Mutation homozygot waren. Transgene Mäuse wurden durch Injektion einer E14-1-ES-Zelllinie, die ein korrektes, zerstörtes IFN-γR-Allel in sich trug, in Blastozysten erzeugt, und zwar folgendermaßen.

[0137] Erzeugung chimärer Mäuse. Blastozysten-Manipulationen wurden durchgeführt, wie von Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8932-8935 (1989), beschrieben wurde. Kurz gesagt wurden modifizierte ES-Zel-

len in Blastozysten injiziert, die von C57BL/6-Weibchen mit Superovulation erhalten wurden, und erneut in die Uteri scheinträchtiger Empfänger implantiert. Entsprechend der Fellfarbe wurden chimäre Mäuse mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt, und es wurden durch das Züchten heterozygoten Nachwuchses homozygote Mutanten-Tiere erhalten. Die Transmission des modifizierten IFN-γR-Allels im Agouti-Nachwuchs wurde durch Southern-Blotting der DNA, die von Schwanz-Biopsien erhalten wurde, getestet.

[0138] Zytofluorimetrische Analyse. Um die MHC-Klasse-I-Antigen-Expression zu induzieren, wurde die Stamm-Myoblasten-Zelllinie (IFN-γR, +/+), die in vitro einem Targeting unterzogene Myoblasten-Zelllinie 4C17 (IFN-γR, +/–) und Myoblasten, die aus homozygoten IFN-γR-Mutantenmäusen (–/–) isoliert wurden, 24 Stunden lang nur mit Kulturmedium (unbehandelte Zellen) oder in Gegenwart oder Abwesenheit von IFN-γR (1.000 U/ml) oder mit einem Gemisch aus Maus-IFN-α und -β (1200 U/ml, 1:9) gezüchtet. Die Expression der MHC-Klasse-I-Antigene wurde unter Verwendung einer spezifischen Immunfluoreszenz-Färbung bestimmt. Myoblasten wurden aus Kulturschalen mit 0,05 % EDTA-Lösung entfernt, gewaschen und 30 Minuten lang mit monoklonalem 28-14-8S-Anti-H-2D^{b}-Antikörper (ATCC, Rockville, MD) inkubiert (10^{6} Zellen). Nach zwei Waschvorgängen wurden die Zellen weitere 30 Minuten mit einem FITC-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG2a-Antikörper inkubiert (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Um zu bestimmen, ob das IFN-γR-Neo-Hybrid-Protein auf der Zelloberfläche exprimiert wurde oder nicht, wurden Zellen mit GR20, einem monoklonalen Ratten-Antikörper, der die Bindungsstelle von IFN-γ erkennt (Basu et al., J. Interferon. Res. 9, 551-562 (1989)) und Ziegen-Anti-Ratten-IgG-FITC (Caltag Laborstories, S. San Francisco, CA) gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen, und die zelluläre Fluoreszenz wurde mit einem Becton-Dickinson-FACScan-Durchflusszytometer gemessen.

[0139] Klasse-I-Antigene in unbehandelten Myoblasten waren in allen drei Zelltypen nicht detektierbar. IFN-γ induzierte die Klasse-I-Expression in (+/+)- und (+/–)-Myoblasten, jedoch nicht in (–/–)-Myoblasten (**Fig. 5A**). Die Reaktion, die in (+/–)-Myoblasten induziert wurde, war 38-60 % geringer als in (+/+)-Myoblasten, was zeigt, dass die Zerstörung eines IFN-γR-Allels zu einer Reduktion der IFN-γR-Funktion führt. Im Gegensatz dazu war die Expression von Klasse I, die durch ein Gemisch von IFN-α und -β induziert wurde, die an verschiedene Rezeptoren binden, bei allen drei Zelltypen ähnlich (**Fig. 5A**). Myoblasten von IFN-γR-(–/–)-Mäusen exprimierten GR-20-Epitope in Mengen, die mit jenen vergleichbar waren, die in Wildtyp-(+/+)- und 4C17-(+/–)-Myoblasten zu finden sind (**Fig. 5B**). Daher besitzen Myoblasten, die für das deaktivierte IFN-γR-Gen homozygot oder heterozygot sind, eine signifikant verringerte Reaktion auf IFN-γ trotz der Expression einer extrazellulären IFN-γR-Domäne auf ihrer Zelloberfläche.

Beschreibung von Myoblasten, die einem Gen-Targeting unterzogen wurden

[0140] Myoblasten-Klone, die einem Targeting unterzogen wurden, wurden charakterisiert, um zu bestimmen, ob sie die Eigenschaften normaler Stamm-Myoblasten aufwiesen. Die Klone 4H14, 4C8, 4C17 und 5114, die einem Targeting unterzogen wurden, wurden durch chromosomale Analyse und durch von einer Verankerung unabhängigen Wachstumstest charakterisiert, wie unten stehend beschrieben. Es wurden keine Unterschiede in der Morphologie oder bezüglich der Kulturerfordernisse zwischen diesen Zellen und Primär-Myoblasten (d.h. Zellen, die dem Tier direkt entnommen und gezüchtet wurden, jedoch nie passagiert wurden) beobachtet. Unter Bedingungen, welche die Myoblastendifferenzierung verhindern, waren die Myoblasten, die einem Targeting unterzogen wurden, klein und refraktil und wiesen dieselbe(n) gerundete Form und basalen Pseudopodia auf wie Primär-Myoblasten. Die einem Targeting unterzogenen Zellen behielten bei Zucht in Differenzierungsmedium (5 % Pferdeserum in DMEM) ihre Fähigkeit, zu differenzieren und kontrahierende Myotuben zu bilden, bei. Die Zellen wachsen anfänglich in die Länge, zeigen eine bipolare Morphologie und fusionieren, um vielkernige Myotuben zu bilden.

[0141] Um sicherzustellen, dass die Myoblasten nicht transformiert wurden, wurde eine chromosomale Analyse durchgeführt, und die Fähigkeit der einem Targeting unterzogen Zellen, Tumoren in Nacktmäusen zu bilden und in Weichagar zu wachsen, wurde untersucht. Die Chromosomenanalyse wurde, wie folgt, durch das Herstellen von Metaphase-Spreads aus jedem einem Targeting unterzogenen Klon durchgeführt:
Chromosomenanalyse. Metaphase-Spreads von Myoblasten wurden zuerst durch Behandeln von Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,4 µg/ml Demacolcin für eine Zeitspanne von 7 Stunden hergestellt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit 0,075 M KCl 10 Minuten lang behandelt, drei Mal 10 Minuten lang mit 3:1-MeOH/HAc fixiert und auf kalte, nasse, vorgereinigte Objektträger tropfen gelassen (Worton et al., Methods Enzymol. 58, 322-344 (1979)). Das G-Banding wurde auf gealterten Objektträgern unter Verwendung von 0,1 % Trypsin 20-30 Sekunden lang durchgeführt, gefolgt von einer 4-%-Giemsa-Färbung (Harleco) in Gurr-Puffer (pH 6,8) (Verma & Babu, in Human chromosomes: Manual of basic techniques, 45-113, Pergamon Press, NY (1989)). Einhundert gutdefinierte Metaphasen-Spreads wurden auf ihre Chromosomen-Modalität

analysiert. Spreads mit G-Banding wurden mit einem Kodak-Technical-Pan-Film photographiert, gedruckt und analysiert.

[0142] Eine modale Chromosomenanzahl von 40 (2n = 40) wurde bei allen Klonen beobachtet, wobei drei der vier größer als 79 % waren. Chromosomen mit G-Banding aus 19 Metaphase-Spreads der Myoblasten-Zelllinie 4C17 (+/–) wurden in Karyotypen ausgerichtet, angeordnet und gemäß Nesbitt und Francke, Chromosoms (Berl.) 41, 145-158 (1973), analysiert. Alle Spreads zeigten eine stabile Chromosomenanzahl, wobei alle Paare dargestellt waren. Es wurden keine sichtbaren strukturellen Chromosomenanomalien beobachtet.

[0143] Für die weitere Charakterisierung wurde das von der Verankerung unabhängige Zellwachstum der einem Targeting unterzogenen Myoblasten-Klone folgendermaßen getestet:
Von der Verankerung unabhängiges Wachstum. 7 ml 0,5-%-Agar in 15 % Serum enthaltendem Medium wurden in 6-cm-Schalen platziert und mit 10^4 Zellen überschichtet, die in 1,5 ml 0,3-%-Weichagarmedium suspendiert waren. Die Kulturen wurden bei 37°C 15 Tage lang inkubiert, wonach sie auf das Koloniewachstum analysiert wurden (Macpherson et al., Virology 23, 291-294 (1964)). Eine positive Kolonie wurde gezählt, wenn sie einen Durchmesser von mehr als 0,1 mm aufwies. Die transformierte Kontrolllinie NMU2 wuchs und bildete Kolonien in Weichagar, wohingegen keine Kolonien von einem der vier einem Targeting unterzogenen Myoblasten-Klone gebildet wurden (Tabelle 8).

TABELLE 8 Von der Verankerung unabhängiges Wachstum und Tumorgenität

Myoblasten			
IFN-γR(+/–)	Weichagar	Tumorbildung	
	Anzahl der Kolonien	Orte	Tumoren
Kontrolle	2160	8	8
4H14	Keine	4	Keine
4C8	Keine	4	Keine
4C17	Keine	4	Keine
5114	Keine	4	Keine

[0144] Kontrollzellen stellen eine transformierte Myoblasten-Zelllinie (NMU2) dar, die von der C_2C_{12}-Stamm-Myoblasten-Zelllinie abstammt. Die Klone 4H14, 4C8, 4C17 und 5114 sind Myoblasten-Klone, die einem IFN-γR-Targeting unterzogen wurden.

[0145] Zusätzlich dazu wurde die Fähigkeit zur Tumorbildung folgendermaßen gemessen:
Tumorgenität. 10^6 Zellen wurden in 50 µl PBS suspendiert und subkutan an zwei Stellen in 4-6 Wochen alte Nacktmäuse (CD-1BR, Charles River Lab, Wilmington, MASS) injiziert. Als positive Kontrolle wurden normale Myoblasten mit der transformierten Myoblasten-Mutante (NMU2, Rastinejad et al., Cell 72, 903-917 (1993)) verglichen. Die Tiere wurden nach zwischen 7 und 10 Wochen auf die Tumorbildung analysiert.

[0146] Keiner der vier einem Targeting unterzogenen Myoblasten-Klone bildete Tumoren.

[0147] Im Gegensatz dazu bildeten die NMU2-Kontrollzellen schnell Tumoren (Tabelle 8).

[0148] Diese Resultate deuten stark darauf hin, dass die einem Targeting unterzogenen Myoblasten nicht während der Selektion und der darauf folgenden Kultur transformiert wurden.

[0149] Daher weisen die einem Targeting unterzogenen Klone, wie durch die Morphologie, das Zellwachstum und die Fähigkeit zur Differenzierung und Bildung von Myotuben angedeutet, die normalen Eigenschaften von Primär-Myoblasten auf. Es wurden keine Anzeichen von Zelltransformationen oder abnormalen Karyotypen bei den einem Targeting unterzogenen Maus-Myoblasten beobachtet. Die Restriktionskartierung des einem Targeting unterzogenen IFN-γR-Locus in Myoblasten zeigte keine unvorhergesehenen DNA-Neuanordnungen. Diese Resultate zeigen, dass normale Säugetier-Somazellen, wie z.B. Myoblasten, die durch Gen-Targeting unter Verwendung der Verfahren der Erfindung genetisch modifiziert wurden, die Eigenschaften von Primär-Zellen beibehalten und für die Gen-Therapie bei Menschen von Nutzen sein können.

[0150] Das hierin als Beispiel angeführte Verfahren, das für das Gen-Targeting in Myoblasten verwendet wird,

stellt eine signifikante Anreicherung für homologe Rekombinationsvorkommnisse dar, die andernfalls aufgrund der erwarteten geringeren Häufigkeit des Auftretens in diesen normalen Somazellen schwierig zu detektieren sein könnten. Die Verwendung eines neuen Targeting-Vektors, der ein in der Transkription und in der Translation eingeschränktes selektierbares Gen, wie z.B. Neo, verwendet, das in die kodierende Region des Targetgens, IFN-γR, insertiert ist, kodierend für ein ganzes Membranprotein, führte zu der Produktion eines Hybrid-Proteins, bei dem der selektierbare Marker an die Transmembrandomäne des Target-Gens fusioniert ist, so dass der selektierbare Marker auf der zytoplasmatischen Seite der Membran exprimiert ist. Dieser Targeting-Vektor ermöglichte eine substantielle Anreicherung an Rekombinationsvorkommnissen in ES-Zellen und Myoblasten, was darauf hindeutet, dass ein membrangebundenes Neo-Polypeptid wirksam bei der Verleihung einer Arzneimittelresistenz ist. Die oben genannten Experimente führten zu einer zumindest 70fachen Erhöhung der relativen Gen-Targeting-Häufigkeit in ES-Zellen.

[0151] Im Einklang mit den oben genannten Resultaten können Zellen bereitgestellt werden, die als Resultat der Gegenwart funktioneller Klasse-I-MHC-Antigene keiner Immunzerstörung unterzogen werden sollten. Die Zellen können auf breiter Ebene Anwendung finden, da sie keinem Immunangriff unterzogen werden, wenn sie in einen allogenen Wirt eingeführt werden, während sie trotzdem in der Lage sind, auf ihre natürliche Art und Weise zu agieren. Auf diese Art und Weise kann eine große Bandbreite an Erkrankungen behandelt werden, die aus dem Verlust der Anzahl und/oder der Funktion von Zellen resultieren, bei denen die eingeführten Zellen überleben, sich vermehren und ihre Funktionen erfüllen. Daher können nicht nur Erkrankungen als Resultat von Verbrennungen, Abrasionen, Pathogenen oder dergleichen behandelt werden, sondern auch Erkrankungen, die das Resultat genetischer Defekte sind.

[0152] Embryonale Stammzellen können ebenfalls durch homologe Rekombination modifiziert werden, um chimäre Säugetier-Wirte bereitzustellen. Die chimären Säugetier-Wirte können anschließend selektiert werden und zur Zucht verwendet werden, um homozygote Wirte zu erzeugen, denen das deaktivierte Gen fehlt, und sie können anschließend als Quelle für Gewebe und Zellen zur Transplantation verwendet werden, als Modell für Transplantationstherapien sowie experimentell, um die Arzneimittelwirksamkeit zu testen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Cell Genesys, Inc.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Homologe Rekombination für Universalspenderzellen und chimäre Säugetierwirte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Flehr, Hohbach, Test, Albritton & Herbert
(B) STRASSE: Four Embarcadero Center, Suite 3400
(C) STADT: San Francisco
(D) BUNDESSTAAT: CA
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 94111-4187

(v) COMPUTERLESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: Floppy Disk
(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER: PCT/US94/
(B) EINREICHDATUM:
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) INFORMATIONEN ÜBER ANWALT/VERTRETER:
(A) NAME: Rowland, Bertram I
(B) REGISTRATIONSNUMMER: 20015
(C) KENNZAHL/ZEICHEN: FP-55190-4/BIR

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
(A) TELEFON: 415-781-1989
(B) TELEFAX: 415-398-3249

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 1:

TGGCGGACCG CTATAGGAC -- 19

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 2:

GATGCTGATC ACATGTCTCG 20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 56 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 3:

GACTCAGAAT TCGCATGCTT AATTAAGATT GATTGATTGA TGGTTTACAG TAGGAC 56

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 50 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

GATTACGAAT TCAAGCTTGT CAAAGCATTT TCTACCACTG AGAATTGATC 50

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

ACGGTATCGC CGCTCCCGAT 20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 6:

GACCTATTTG TGCATTGGAA GC 22

Patentansprüche

1. Gentechnologisch hergestellte nicht-menschliche Säugetierzelle, welcher die Fähigkeit fehlt, die Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC-)Antigens hinaufzuregulieren, worin die Defizienz durch Einführung einer Läsion an jedem Locus des IFNγR-Gens durch Transfektion der Säugetierzelle mit zumindest einem DNA-Targetingkonstrukt ausgelöst ist, das eine DNA umfasst, die für ein transkriptionell und translationell beeinträchtigtes positives selektierbares Markergen kodiert, das an die für die Transmembran kodierende Region des IFNγR-Proteins gebunden ist und sich stromab dieser befindet, worin das Expressionsprodukt des DNA-Targetingkonstrukts ein Fusionsprotein ist, das die Transmembranregion von IFNγR umfasst, die mit einem selektierbaren Marker fusioniert ist, und der selektierbare Marker auf der zytoplasmatischen Seite der Zellemembran der gentechnologisch hergestellten Zelle exprimiert wird.

2. Verfahren zur Produktion der gentechnologisch hergestellten nicht-menschlichen Säugetierzelle nach Anspruch 1, umfassend die Transfektion einer Säugetierwirtszelle mit einem DNA-Konstrukt, worin das DNA-Konstrukt DNA umfasst, die für ein transkriptionell und translationell beeinträchtigtes positives selektierbares Markergen kodiert, das an die für die Transmembran kodierende Region von IFNγR gebunden ist und sich stromab dieser befindet, und worin das Expressionsprodukt der DNA ein Fusionsprotein ist, das einen funktionellen selektierbaren Marker umfasst, der mit der Transmembranregion von IFNγR fusioniert ist und auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran der gentechnologisch hergestellten Zelle exprimiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin das selektierbare Markergen das Neomycinresistenzgen ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2, worin das selektierbare Markergen das Hygromycinresistenzgen ist.

5. DNA-Konstrukt, das DNA umfasst, die für ein transkriptionell und translationell beeinträchtigtes positives selektierbares Markergen kodiert, das an die für die Transmembran kodierende Region des IFNγR-Gens gebunden ist und sich stromab dieser befindet.

6. DNA-Konstrukt nach Anspruch 5, worin das selektierbare Markergen das Neomycinresistenzgen ist.

7. DNA-Konstrukt nach Anspruch 5, worin das selektierbare Markergen das Hydromycingen ist.

8. Gentechnologisch hergestellte nicht-menschliche Säugetierzelle, der die Fähigkeit fehlt, die Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC-)Antigens hinaufzuregulieren, worin die Defizienz durch Einführung einer Läsion an jedem Locus des IFNγR-Gens durch Transfektion der Säugetierzelle mit zumindest einem DNA-Targetingkonstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 7 verursacht ist.

9. Verfahren zur Produktion einer Zelle nach Anspruch 8, worin das Verfahren Folgendes umfasst:
– Transfektion einer Säugetierzelle mit zumindest einem DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 7;
– Selektion transfizierter Zellen, denen die Fähigkeit fehlt, das MHC-Antigen hinaufzuregulieren.

10. Verfahren zur Steigerung der Detektion einer homologen Rekombination zur Inaktivierung eines Gens, das für ein integrales Membranprotein in einer nicht-menschlichen Säugetierzelle kodiert, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
Transfektion der Säugetierzelle mit zumindest einem DNA-Konstrukt, das DNA umfasst, die für ein transkriptionell und translationell beeinträchtigtes positives selektierbares Markergen kodiert, das an die für die Transmembran kodierende Region eines IFNγR-Gens gebunden ist und sich stromab dieser befindet, worin das DNA-Konstrukt durch homologe Rekombination in ein Chromosom in dieser Säugetierzelle integriert wird, wodurch das Gen, das für IFNγR kodiert, inaktiviert wird und ein Fusionsprotein produziert wird, das die Transmembranregion von IFNγR umfasst, die mit einem selektierbaren Marker fusioniert ist, wobei der selektierbare Marker auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran der transfizierten Säugetierzelle exprimiert wird; und
Selektion transfizierter Zellen, die das Fusionsprotein produzieren.

11. Verwendung von Zellen nach Anspruch 1 oder Anspruch 8 zum Screenen eines Mittels auf die Eignung zur Prävention von Transplantatabstoßung bei einem Säugetierwirt.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

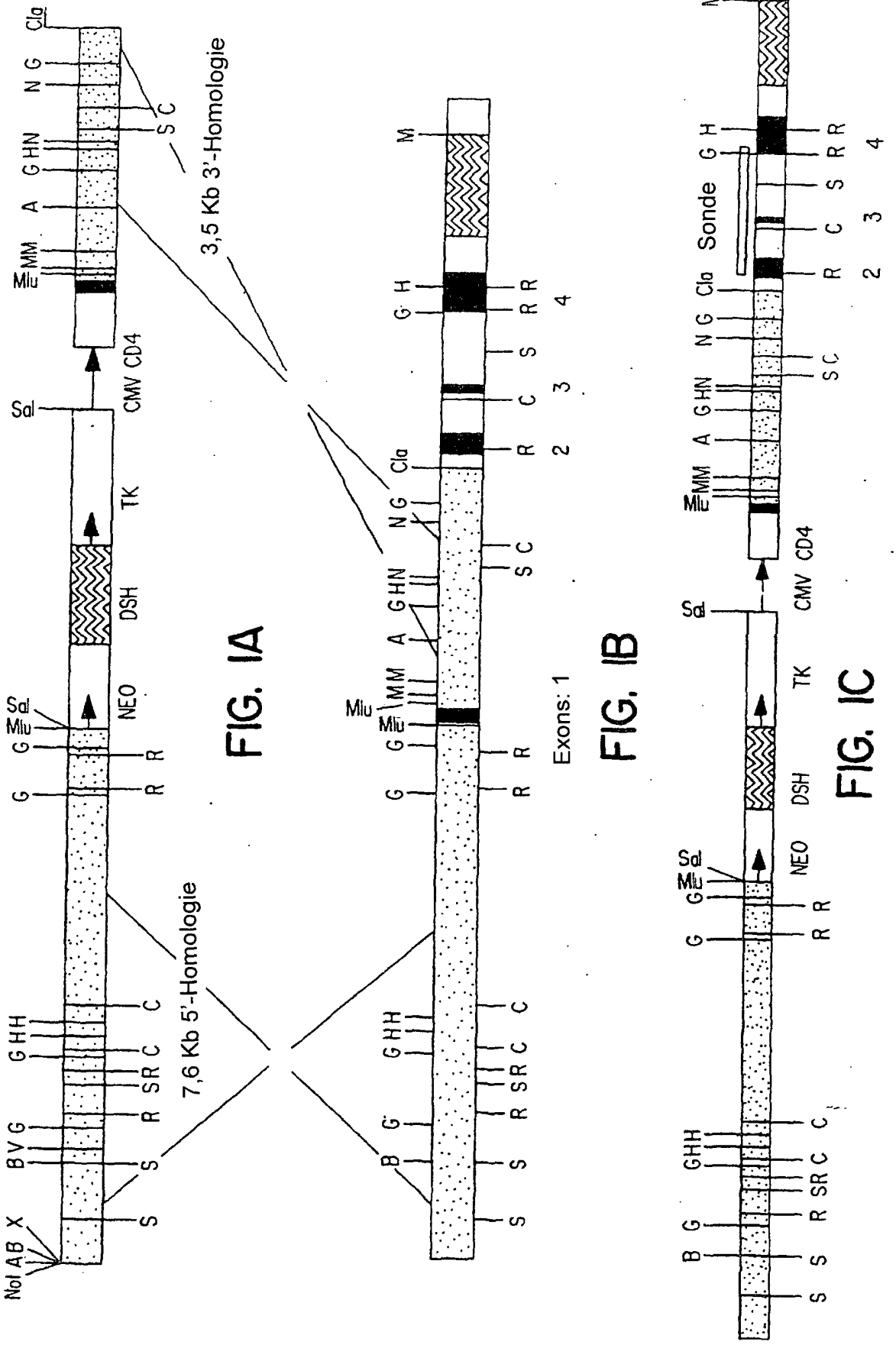


FIG. IA

FIG. IB

FIG. IC

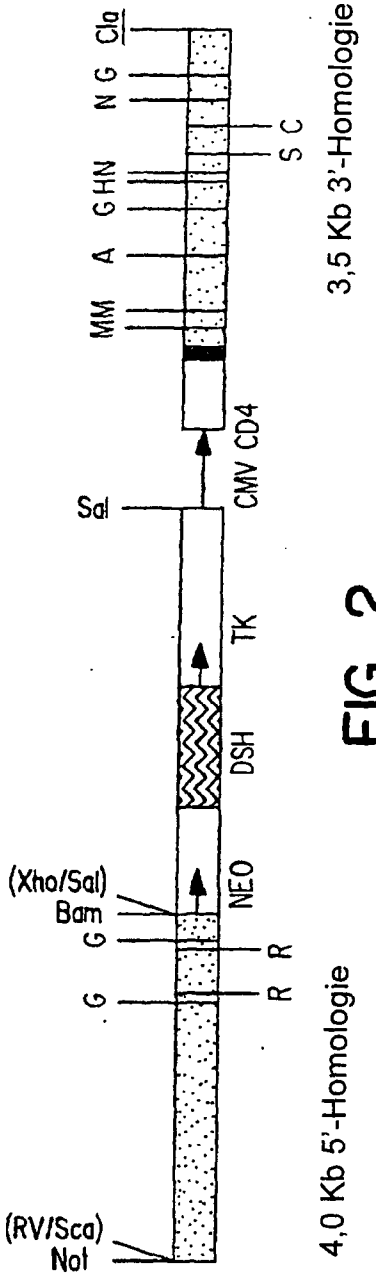

Cla
N G
S C
G HN
A
MM
CMV CD4
Sal
TK
DSH
(Xho/Sal)
Bam
NEO
G
R R
G
(RV/Sca)
Not
3,5 Kb 3'-Homologie
4,0 Kb 5'-Homologie

FIG. 2

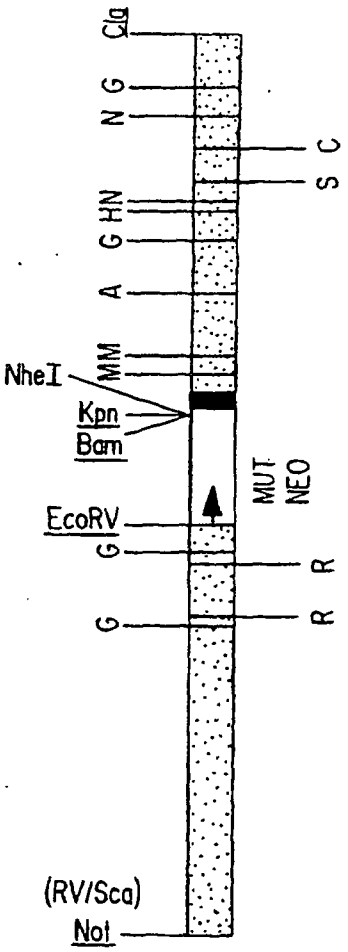

Cla
N G
S C
G HN
A
MM
NheI
Kpn
Bam
MUT
NEO
EcoRV
G
R
G
R
(RV/Sca)
Not
3,5 Kb 3'-Homologie
4,0 Kb 5'-Homologie

FIG. 3

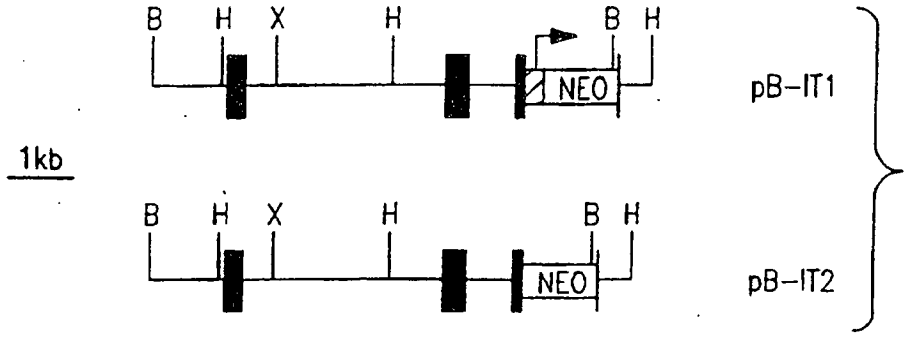


FIG. 4A

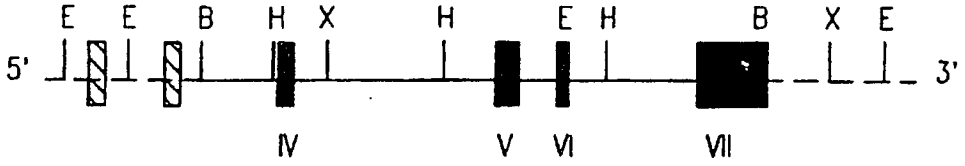


FIG. 4B

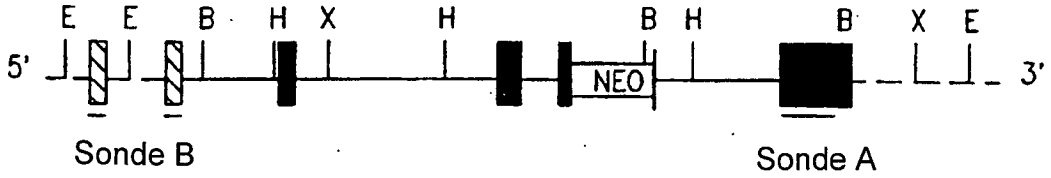


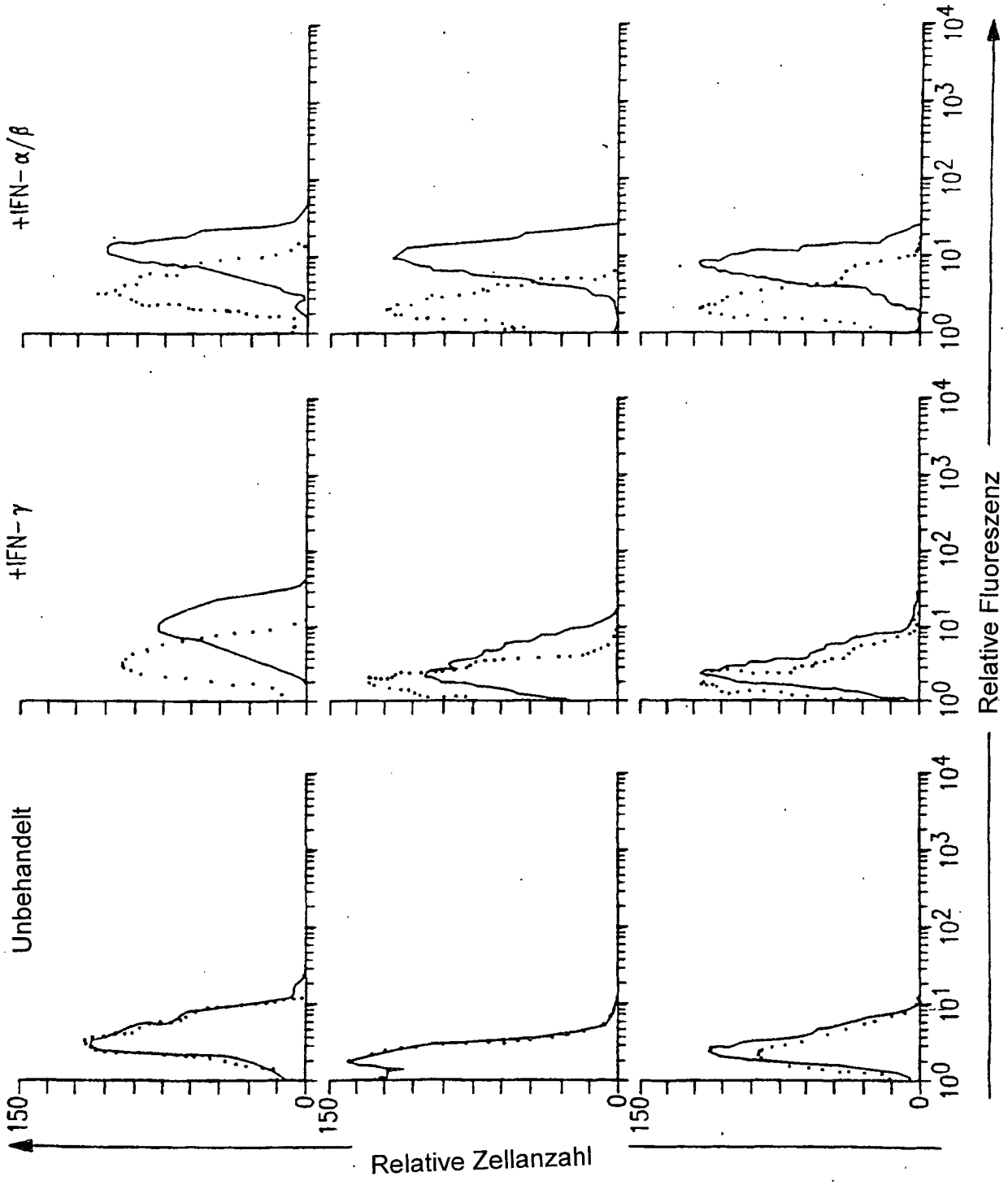
FIG. 4C

erwartete Fragmentlängen (Kb)

	BamHI	XbaI	EcoRI	
	Sonde A	Sonde B	Sonde A	Sonde B
WT	7.2	6.5	9.5	12.0,(6.5,5.0)*
M	2.5	7.5	22.5	22.5, (6.5,5.0)

FIG. 4D

FIG. 5A


Unbehandelt
+IFN-γ
+IFN-α/β
150
0
Relative Zellanzahl
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Relative Fluoreszenz

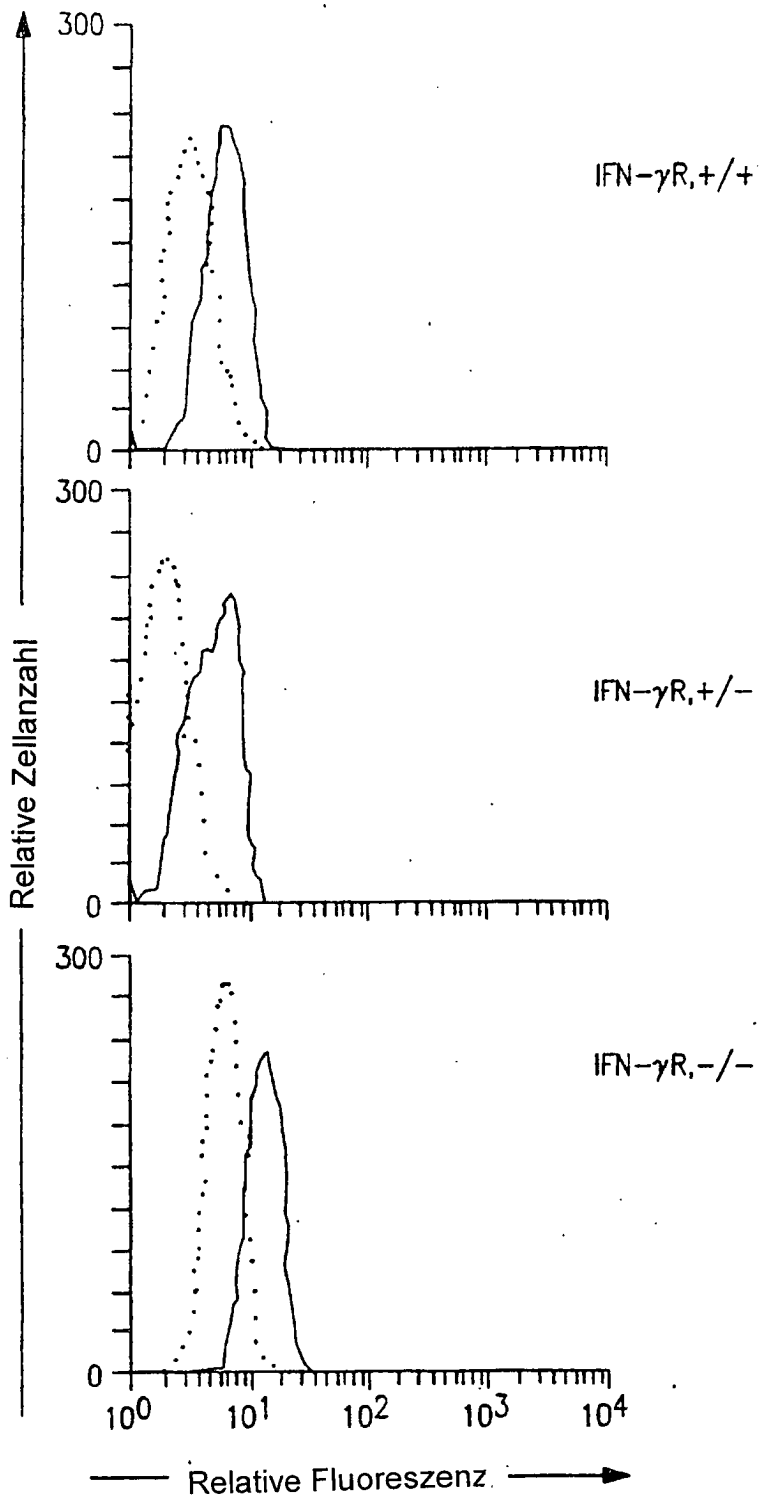

300
0
IFN-γR,+/+
300
0
IFN-γR,+/-
300
0
IFN-γR,-/-
Relative Zellanzahl
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Relative Fluoreszenz

FIG. 5B