

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Identifizierung von shRNAs gegen TGF- β -abhängige Signalproteine für den Knockdown in murinen regulatorischen T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Fabian Hieke
aus Zwenkau

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 21. August 2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. C. Schramm

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fehse

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. I. Müller

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Immunsystem	6
1.2	T-Zellen	6
1.3	Regulatorische T-Zellen und ihre Funktionen	7
1.4	Entwicklung natürlicher und induzierter regulatorischer T-Zellen	8
1.5	Signalwege in der Konversion induzierter regulatorischer T-Zellen ...	8
1.6	RNA-Interferenz	10
1.6.1	Formen der dsRNA für die RNA-Interferenz	11
1.6.2	Transfektion und Transduktion von dsRNA	12
1.7	Aktueller Forschungsstand	14
2	Ziel der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Puffer und Kulturmedien	16
3.2	Geräte	18
3.3	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	19
3.4	Zellkultur	22
3.4.1	NIH/3T3-Fibroblasten	22
3.4.2	Jurkat-Zellen	23
3.4.2.1	Passagieren der Jurkat-Zellen	23
3.4.2.2	Kryokonservierung von Jurkat-Zellen	23
3.4.3	HEK 293T-Zellen	23
3.4.4	Primäre murine CD4+ CD25- T-Lymphozyten	24
3.4.4.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	24
3.4.4.2	Milzentnahme aus Mäusen	24
3.4.4.3	Einzelzellsuspension aus Milzen	24
3.4.4.4	Isolation von CD4+ CD25- T-Lymphozyten	24
3.4.4.5	Kultivierung der CD4+ CD25- T-Lymphozyten	26
3.4.5	Stimulation der Zellen	26
3.5	UV-Bestrahlung von Zellen	26
3.6	SDS-PAGE und Western Blot	26
3.6.1	Probenvorbereitung	26
3.6.2	Proteinelektrophorese (SDS-PAGE)	27
3.6.3	Western Blot	28
3.6.4	Proteindetektion mit Antikörpern	29
3.6.5	Verwendete Antikörper	30
3.6.6	Densitometrie	30

3.7	Verwendete Plasmide	32
3.7.1	Der pLKO.1-Vektor	32
3.7.2	Das pmaxGFP®-Plasmid	32
3.7.3	Die LeGO-Vektoren	32
3.8	Molekularbiologische Methoden	34
3.8.1	PCR	34
3.8.2	DNA-Gelelektrophorese	35
3.8.3	Gelisolierung von DNA-Fragmenten	35
3.8.4	Klonierung von shRNAs in den pLKO.1-Vektor	35
3.8.5	Klonierung der Promoter-shRNA-Kassette in den LeGO-Vektor	36
3.8.6	Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien	37
3.8.7	Präparation von Plasmid-DNA	37
3.9	Durchflusszytometrie	37
3.10	Verwendete shRNAs	38
3.11	Lentiviren	39
3.11.1	Virusproduktion	40
3.11.2	Virustitration	40
3.11.3	Viruskonzentrierung	41
3.11.3.1	PEG-Präzipitation	42
3.11.3.2	Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation	42
3.12	Transfektion: transiente und stabile Lipofektion	42
3.12.1.1	Transiente Lipofektion von NIH/3T3	42
3.12.1.2	Puromycin-Selektion nach Transfektion	43
3.12.1.3	Anzucht von NIH/3T3-Klonen nach stabiler Transfektion	43
3.13	Transduktion	44
3.13.1	Transduktion von NIH/3T3-Fibroblasten	44
3.13.2	Transduktion primärer T-Zellen	44
3.14	Statistische Auswertung	45
3.15	Software	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Aktivierung der Zielproteine in NIH/3T3-Fibroblasten	46
4.1.1	Aktivierung von p38 und MAPKAPK2 in NIH/3T3-Fibroblasten durch UV-Bestrahlung	46
4.1.2	Aktivierung von p38, Smad2, Smad3 und der S6-Kinase in NIH/3T3 durch TGF- β	47
4.2	Aktivierung der Zielproteine in Jurkat-T-Zellen	48
4.2.1	Aktivierung von p38 und MAPKAPK2 in Jurkat-T-Zellen durch UV-Bestrahlung	48
4.3	Reinheit der CD4+ T-Zellen nach Isolation	49

4.4	Aktivierung der Zielproteine in primären CD4+ T-Zellen	51
4.4.1	Aktivierung von p38 und Smad2 in primären CD4+ T-Zellen durch TGF- β	51
4.5	Transiente und stabile Lipofektion von NIH/3T3	52
4.6	Lentiviren	55
4.6.1	Virustiter	55
4.6.2	Viruskonzentrierung	57
4.7	Transduktion von NIH/3T3	59
4.8	Knockdown der Zielproteine in NIH/3T3	60
4.8.1	Evaluation der Densitometrie zur Knockdown-Bestimmung	60
4.8.2	Knockdown nach Lipofektion von shRNAs	63
4.8.3	Knockdown nach lentiviraler Transduktion von shRNAs	68
4.8.4	Zeitverlauf des Knockdowns	71
4.9	Transduktion primärer T-Zellen	76
5	Diskussion	77
5.1	Aktivierung der Kinasen und Smad-Proteine	77
5.2	Densitometrie im Western Blot	77
5.3	Kein sicherer sichtbarer Knockdown nach Transfektion	78
5.4	Erfolgreicher Knockdown nach lentiviraler Transduktion	78
5.5	Der Knockdown geht im Zeitverlauf zurück	79
5.6	Positive Ergebnisse nur in NIH/3T3-Fibroblasten	80
5.7	Aktueller Kontext: RNA-Interferenz in primären murinen T-Zellen ...	80
5.8	Aktueller Kontext: In vivo-Versuche mit transduzierten T-Zellen	81
5.9	Ausblick	82
6	Zusammenfassung	84
7	Abkürzungsverzeichnis	85
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	87
9	Literaturverzeichnis	90
10	Danksagung	97

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Um das Eindringen und die Vermehrung von Krankheitserregern im Körper zu verhindern, existiert ein komplexes Abwehrsystem, das Immunsystem. Wenn Erreger die Barrieren Haut und Schleimhaut überwinden, werden sie zunächst von der unspezifischen, angeborenen Abwehr erkannt (Schwarz et al. 1999). Diese Erkennung beruht auf der Detektion konservierter molekularer Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen durch das retikulohistiozytäre System (RHS, synonym Monozyten-Makrophagen-System) und durch Granulozyten sowie das Komplementsystem (Janeway & Medzhitov 2002). Dieses unspezifische System interagiert eng mit der adaptiven Immunabwehr, dem evolutionär jüngeren Teil des Immunsystems (Cooper & Alder 2006). Zelluläre Vertreter des adaptiven Systems sind die Lymphozyten, die in B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) unterteilt werden. B-Zellen und ihre Differenzierungsform die Plasmazellen sind primär zuständig für die humorale Abwehr, also die Abwehr mittels spezifischer Antikörper. T-Zellen unterstützen die humorale Abwehr (Claman et al. 1966), koordinieren die Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems und eliminieren infizierte körpereigene Zellen (Neumann 2008, S. 110).

1.2 T-Zellen

T-Zellen reifen im Thymus, was zu ihrer Namensgebung führte. Sowohl im Thymus als auch nach Verlassen desselben differenzieren T-Zellen zu verschiedenen Untergruppen (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009; Neumann 2008). Wichtige Untergruppen zeigt Abbildung 1. Zum einen entwickeln sich CD8-exprimierende T-Zellen, deren Hauptaufgabe als zytotoxische T-Zellen die Eliminierung infizierter körpereigener Zellen ist, die zweite große Gruppe sind CD4-exprimierende T-Zellen. In diese Gruppe fallen CD4+ T-Helferzellen und CD4+ regulatorische T-Zellen. Jede dieser CD4+ T-Zell-Gruppen zeichnet sich durch spezifische Expressionsmuster aus. Insbesondere Transkriptionsfaktoren werden zur Klassifizierung herangezogen.

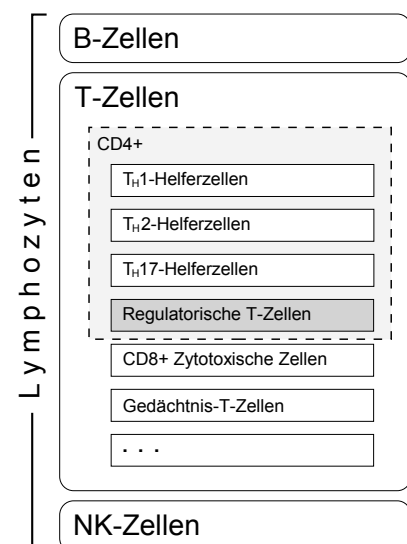


Abbildung 1: Schematische Einteilung der Lymphozyten mit Unterpopulationen der T-Zellen (modifiziert nach Jäger & Kuchroo 2010)

Wegen der besonderen Relevanz für diese Arbeit sind die regulatorischen T-Zellen hervorgehoben.

1.3 Regulatorische T-Zellen und ihre Funktionen

Toleranz und Immunität stehen im Immunsystem in Balance miteinander. Eine Imbalance zu Gunsten einer der beiden Seiten kann zur Entstehung von Krankheiten führen: Ein Überwiegen der Immunität kann bei Reaktionen gegen körpereigene Epitope zu Autoimmunerkrankungen oder bei einer überschießenden Reaktion gegen Umweltantigene zu Allergien führen. Überwiegt die Toleranz können Infektionen oder maligne Tumoren durch das Immunsystem nicht adäquat bekämpft werden und können chronisch persistieren bzw. wachsen.

Die an diesem immunologischen Gleichgewicht beteiligten Zellpopulationen und Signalwege sind zahlreich und noch nicht vollständig verstanden. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind wichtige Vertreter der Toleranz. Es handelt sich dabei um eine Differenzierungsform der CD4+ T-Zellen, die sich durch Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 identifizieren lässt (Fontenot et al. 2003). Im Gegensatz zu den proinflammatorischen T-Helferzellen vermitteln T_{reg} Toleranz gegenüber körpereigenen und -fremden Antigenen (S Sakaguchi et al. 1995; X Zhang et al. 2001).

T_{reg} sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Toleranz und Immunität beteiligt. Ein Mangel an T_{reg} -Funktion verschiebt das Gleichgewicht zugunsten verstärkter Abwehr, ein übermäßiger Einfluss der T_{reg} -Population hingegen sorgt für verstärkte Toleranz. Dieses Prinzip kann man in Untersuchungen an Patienten wiederfinden: Bei Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen wird eine verminderte Anzahl von T_{reg} oder eine verminderte suppressive Kapazität der vorhandenen T_{reg} beschrieben. Gleichzeitig ist bei einigen dieser Erkrankungen die regulatorische Kapazität der T_{reg} , also die Fähigkeit beispielsweise CD4+ Effektor-T-Zellen (T_{eff}) zu hemmen, verringert (Brusko et al. 2008).

Auch in der Pathogenese von Karzinomen spielen T_{reg} eine Rolle. Sie können mitverantwortlich für das Überleben des Tumors sein (Onizuka et al. 1999). Manche maligne Tumoren erschaffen ein Milieu, das die Konversion zu regulatorischen T-Zellen fördert und somit eine Reaktion des Immunsystems (beispielsweise durch zytotoxische CD8+ T-Zellen) verhindert. Dieses Milieu ist maßgeblich durch die Ausschüttung von TGF- β geprägt (V. C. Liu et al. 2007).

Auch für chronische Infektionen konnte gezeigt werden, dass T_{reg} mitverantwortlich für das Misslingen der vollständigen Erregerabwehr sind. Ein Beispiel dafür ist die chronische Hepatitis B (Stoop et al. 2005).

1.4 Entwicklung natürlicher und induzierter regulatorischer T-Zellen

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen natürlichen T_{reg} (nT_{reg}) und induzierten T_{reg} (iT_{reg}). nT_{reg} entstehen im Thymus und gehen aus dem Selektionsprozess im Verlauf der Reifung von T-Zellen hervor (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009). Zusätzlich zum Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren nT_{reg} den Transkriptionsfaktor Helios (Thornton et al. 2010). Die Generierung von nT_{reg} scheint unabhängig von TGF- β zu sein (Schramm et al. 2004).

Im Gegensatz zu den nT_{reg} gehen die iT_{reg} in der Peripherie aus naiven T-Zellen hervor (siehe Abbildung 2) (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009). Anders als bei nT_{reg} kommt dem hier bereits mehrfach erwähnten Zytokin TGF- β bei der Konversion sowie der Aufrechterhaltung der Funktion induzierter T_{reg} eine bedeutende Rolle zu.

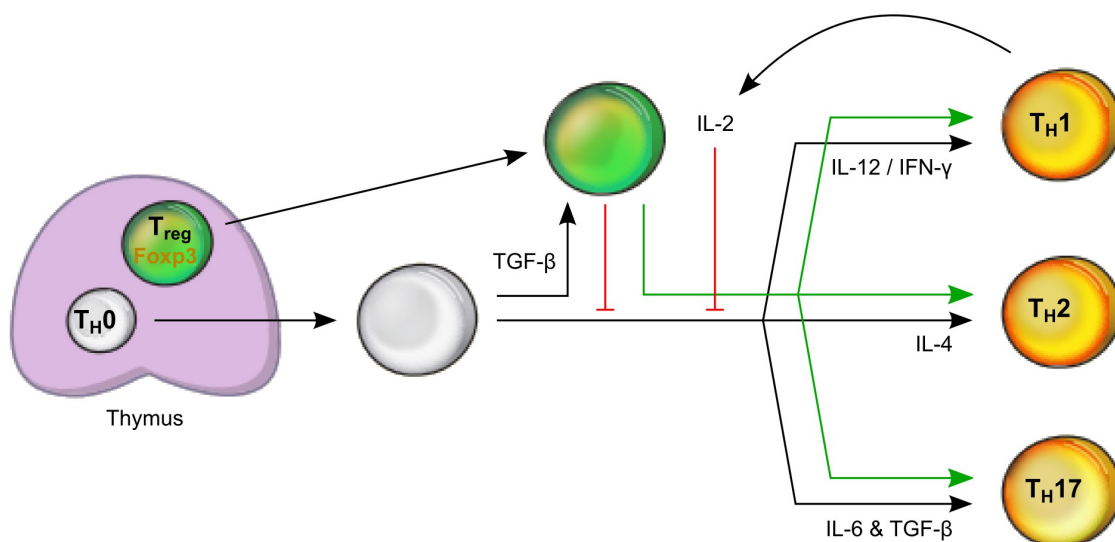


Abbildung 2: Entwicklung der regulatorischen T-Zellen und T-Helferzellen

Dargestellt sind die intrathymische Entwicklung der nT_{reg} und die periphere Konversion naiver T-Zellen zu iT_{reg} bzw. zu T-Helferzellen. Zusätzlich sind maßgeblich entwicklungsentscheidende Zytokine aufgelistet, wie z. B. das TGF- β für T_{reg} .

(modifiziert nach Shimon Sakaguchi 2010)

1.5 Signalwege in der Konversion induzierter regulatorischer T-Zellen

Die Konversion zu iT_{reg} ist in vivo abhängig von TGF- β (Schramm et al. 2004; Huber et al. 2004). Die intrazellulären Signalwege des TGF- β sind vielseitig (Abbildung 3). Konversionsversuche in vitro haben für einige Glieder dieser Signalketten gezeigt, dass sie wichtig für die Konversion zu iT_{reg} sind. Die folgenden Beispiele von Signalketten bzw. deren Glieder sind ausschlaggebend für diese Arbeit, sie sollen aber keine vollständige Auflistung aller relevanten Signalwege darstellen.

Smad

Die Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie, z. B. Smad3, fördern ebenfalls die Transkription des T_{reg}-typischen Transkriptionsfaktors Foxp3 (Y. Tone et al. 2008). Die Besonderheit der Smad-Proteine als Ausnahme in dieser Arbeit ist, dass sie keine Kinaseaktivität besitzen sondern die Signaltransduktion durch Komplexierung und Translokation in den Zellkern vermitteln (Dai et al. 2010).

1.6 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein zelleigener Mechanismus um die Expression von Genen zu verringern. Dieser Mechanismus kann, wie in dieser Arbeit, für eine von außen herbeigeführte Verringerung der Genexpression verwendet werden (Kurreck 2009).

RNA-Interferenz bezeichnet einen Eingriff auf dem Weg von der genomischen DNA zum Protein. Der Angriffspunkt ist die mRNA (Boten-RNA), die durch RNAi-Mechanismen noch vor der Translation abgebaut werden soll. Hierfür bildet kurze doppelsträngige RNA (dsRNA) zusammen mit zelleigenen Enzymen einen Komplex, der homologe mRNA spaltet. Dies verhindert die Translation der mRNA in ein Protein und verringert somit die Expression des Genprodukts.

Die RNAi ist ein zelleigener Mechanismus, dessen Rolle noch nicht vollständig geklärt ist. Die Bedeutung zelleigener RNAi scheint jedoch groß zu sein. Circa 30 % der humanen Gene werden durch miRNAs, einer Form der für die RNAi notwendigen kurzen Doppelstrang-RNA (dsRNA), beeinflusst (Kurreck 2009). miRNA spielen auch in der Immunologie eine Rolle, beispielsweise bei der T-Zell-Differenzierung und -Aktivität (Sauer et al. 2008; Villarino et al. 2011).

Das endogene RNAi-System kann für die posttranskriptionelle Stilllegung von Genprodukten (Knockdown) verwendet werden, indem dsRNA von außen in die Zelle eingebracht wird (Fire et al. 1998). Für den Knockdown eines Genproduktes stehen verschiedene Formen der dsRNA zur Auswahl. Ebenfalls vielfältig sind die verschiedenen Varianten um diese dsRNA in die Zelle einzuschleusen. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die für diese Arbeit relevanten Produkte und Varianten. Sie sind keine vollständige Aufzählung.

1.6.1 Formen der dsRNA für die RNA-Interferenz

shRNA

shRNA (small hairpin RNA) wird von der RNA-Polymerase III aus einer DNA-Vorlage transkribiert. Diese DNA-Vorlage kann z. B. in Form eines Plasmids in die Zelle eingebracht werden. Damit die shRNA von dem Plasmid transkribiert wird, muss ein entsprechender Promoter enthalten sein. Der Promoter, der in dieser Arbeit zum Einsatz kommt, ist der humane U6-Promoter (hU6), der sich für die Expression von shRNAs bewährt hat (Roelz et al. 2010). Die abgelesene RNA bildet durch Ausbildung einer haarnadelförmigen Sekundärstruktur (hairpin) eine dsRNA, die shRNA. Diese wird durch das Enzym Dicer zu einer siRNA ohne Hairpin zerschnitten (Abbildung 4) (McManus & Conklin 2003). Die weitere Prozessierung der siRNA verläuft genauso weiter wie im Folgenden unter „siRNA“ beschrieben.

siRNA

Eine siRNA (small interfering RNA) besteht aus zwei homologen, ca. 20 Basenpaare (bp) langen RNA-Strängen, die jeweils am 3'-Ende einen Überhang von 2 bp haben (H. Siomi & M. C. Siomi 2009). Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau einer siRNA. Die siRNA bildet mit dem RISC (RNAi silencing complex) einen Komplex (den „aktivierten RISC“), welcher die Ziel-mRNA spaltet (McManus & Conklin 2003).

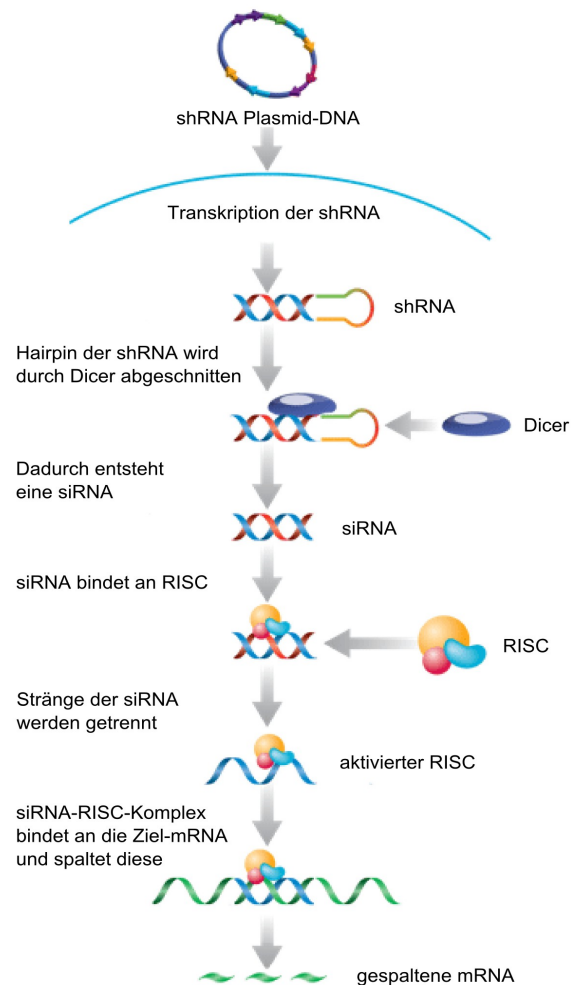


Abbildung 4: Prozessierung von shRNA

am Beispiel eines transfizierten DNA-Plasmids. Nach der Transkription zu mRNA wird formt sich die eigentliche shRNA mit dem charakteristischen Loop. Diese shRNA wird durch Dicer zu siRNA prozessiert und spaltet in Verbindung mit dem RISC die Ziel-mRNA.

Grafik von Santa Cruz Biotechnology, modifiziert.

http://www.scbt.com/gene_silencers.html (am 1.8.2012)

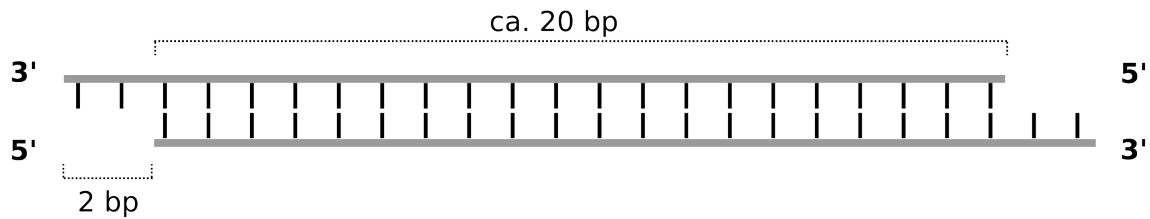


Abbildung 5: siRNA (schematische Darstellung)

Die siRNA besteht aus zwei homologen ca. 20 bp langen RNA-Strängen, die jeweils am 3'-Ende einen Überhang von 2 bp haben.

Grafik modifiziert nach http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/be/SiRNA_and_RNAi_german.png vom 02.05.2013

1.6.2 Transfektion und Transduktion von dsRNA

Die für die RNA-Interferenz benötigte Doppelstrang-RNA, beispielsweise siRNA, kann direkt in die Zelle eingeschleust, also transfiziert, werden. Alternativ kann eine DNA-Vorlage für die dsRNA mitsamt Promoter in die Zelle transfiziert werden. Als Träger hierfür dient ein Plasmid, welches wie in dieser Arbeit für eine shRNA kodiert.

Alternativ kann die DNA-Vorlage der shRNA durch virale Transduktion direkt in das Genom der Zelle integriert werden. Hierfür kommen häufig Lentiviren zum Einsatz. Für die Produktion dieser Retroviren kommt ebenfalls ein Plasmid zum Einsatz, das für die shRNA mitsamt ihrem Promoter kodiert. Ein für die Virusproduktion eingesetztes Plasmid wird Vektor genannt.

Die Transfektion und die Transduktion sollen im Folgenden näher erläutert werden. Hierbei wird auf die Techniken näher eingegangen, die für diese Arbeit Verwendung fanden. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Plasmiden und Vektoren gibt Abschnitt 3.7 auf S. 32.

Transfektion von Plasmid-DNA

Es gibt viele verschiedene Methoden um Plasmid-DNA in Zellen einzuschleusen. Zwei Arten der Transfektion spielen in dieser Arbeit eine Rolle:

Die *Calcium-Phosphat-Präzipitation* kam bei der Produktion der Lentiviren zum Einsatz. Hierbei präzipitiert die DNA an ausfallendem Calciumphosphat, welches von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wird (C. A. Chen & Okayama 1988).

Die *Lipofektion* wurde für die Transfektion von Plasmiden verwendet, die für die shRNA kodieren. DNA komplexiert bei diesem Verfahren an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel, die mit der Zelle fusionieren (Mülhardt 2009, S. 256).

Grundsätzlich gilt, dass beide Methoden (Calcium-Phosphat-Präzipitation und Lipofektion) sowohl für die transiente als auch für die stabile Transfektion geeignet sind (Mülhardt 2009, S. 264). In dieser Arbeit wurden beide Methoden mit einer Ausnahme nur für die transiente Transfektion eingesetzt, was sie von der Transduktion durch Lentiviren maßgeblich unterscheidet, da bei der transienten Transfektion keine Integration der DNA in das Genom der Zielzelle angestrebt wird. Als Ausnahme wurde in einem Experiment eine stabile Transfektion mittels Lipofektion angestrebt, für die die Zellen im Anschluss mit dem Chemotherapeutikum Puromycin selektioniert wurden (Root et al. 2006).

Transduktion mit Lentiviren

Im Gegensatz zur Transfektion, bei der maximal eine von 10^4 transfizierten Zellen eine stabile Integration des Plasmids in das Genom durchläuft (Mülhardt 2009, S. 264), wird bei der Transduktion ein Großteil der eingedrungenen Virus-RNA zu DNA transkribiert und stabil in die DNA der Zelle integriert (Bushman 2001).

Die reverse Transkription der Virus-RNA zu integrierender DNA ist typisch für Retroviren, zu deren Vertretern die Lentiviren gehören (Whitcomb & Hughes 1992). Der lentivirale LeGO-Vektor, der für diese Arbeit verwendet wurde, bietet gegenüber dem ebenfalls verwendeten pLKO.1-Vektor den Vorteil, dass er zusätzlich zur shRNA für ein Fluoreszenzprotein kodiert, mit dessen Hilfe die erfolgreiche Integration und anschließende Expression durchflusszytometrisch mit wenig Aufwand bewiesen werden kann (Weber et al. 2008).

Der Tropismus eines Virus bestimmt, welche Zellen infiziert werden können. Er lässt sich durch Pseudotypisierung des Virus, also durch die Verwendung anderer Hüllproteine bei der Virusproduktion, gezielt verändern. In dieser Arbeit kamen zwei Hüllproteine zum Einsatz: Mit VSV-G (Glykoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus) pseudotypisierte Viren haben einen breiten Tropismus, wohingegen eine Pseudotypisierung mit dem murinen ecotropen Hüllprotein zur Beschränkung auf murine Zellen sorgt. Mit ecotropen Viren können also Mauszellen aber keine humanen Zellen infiziert werden (Schambach et al. 2006). Ecotrope Viren bieten somit einen Sicherheitsvorteil, außerdem eignen sie sich besser für die Infektion von murinen T-Zellen (T. Zhang et al. 2003). Nachteilig ist, dass ecotrope Viren in der Produktion meist einen niedrigeren Titer (= Anzahl der Viruspartikel pro ml; siehe 3.11.2) erreichen und die Viruspartikel deswegen aufkonzentriert werden müssen (Schambach et al. 2006).

1.7 Aktueller Forschungsstand

Für Untersuchungen, die die Bedeutung einzelner Kinasen und Signalwege für regulatorische T-Zellen aufdecken sollen, hat sich der Einsatz reversibler Inhibitoren bewährt. Gleichfalls möglich ist eine transiente Transfektion von T-Zellen mit siRNA. Beide Methoden können aufgrund ihres reversiblen Charakters nicht für in vivo-Langzeitversuche eingesetzt werden. shRNAs können in das Genom integriert werden und könnten somit einen irreversiblen Knockdown in T-Zellen vermitteln. Der adaptive Transfer dieser T-Zellen würde die angestrebten in vivo-Langzeitversuche ermöglichen. Einen ausführlicheren Überblick über veröffentlichte Methoden sowie Verweise auf Originalarbeiten liefern die Abschnitte 5.7 und 5.8 der Diskussion ab Seite 80.

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist der Knockdown der p38 MAP-Kinase, der Kinase mTor und der Smad-Proteine Smad2 und Smad3 in murinen Zellen mittels lentiviral transduzierter shRNAs. Mit dem Knockdown sollen diejenigen Signalkaskaden negativ beeinflusst werden, die nachweislich eine Rolle für die Konversion naiver T-Zellen zu T_{reg} spielen.

Die Identifizierung passender shRNAs und ein nachgewiesener Knockdown sind die Grundlage für Untersuchungen an murinen T-Zellen mit auf diese Weise beeinträchtigten Signalwegen.

Zum Identifizieren der passenden shRNAs soll die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 dienen, da sie experimentelle Vorteile gegenüber primären T-Zellen bietet. Diese Vorteile sind im Abschnitt 5.6 ab Seite 80 der Diskussion beschrieben.

3 Material und Methoden

3.1 Puffer und Kulturmedien

Puffer

5× Lämmli-Ladepuffer

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	250 mM
SDS = Natriumdodecylsulfat	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
Glycerol	50 % (v/v)
DTT = Dithiothreitol	0,5 M
ad dH ₂ O	

Laufpuffer für SDS-PAGE

SDS = Natriumdodecylsulfat	0,05 % (w/v)
Glycin	0,144 % (w/v)
TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,303 % (w/v)
ad dH ₂ O	

Blotpuffer für Western Blot

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,303 % (w/v)
Glycin	1,44 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
ad H ₂ O	

Strippingpuffer für Protein-Immundetektion

SDS = Natriumdodecylsulfat	2% (w/v)
Mercaptoethanol	100 mM
1M TRIS pH 6,7	6,25% (v/v)

TBS/T

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,1211 % (w/v)
NaCl	0,8766 % (w/v)
ad H ₂ O, mit HCl auf pH 7,6 eingestellt	
Tween® 20 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat	0,05 % (v/v)

Milch für Protein-Immundetektion

Milchpulver	5% (w/v)
ad TBS/T	

TBE-Puffer

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	10,8 mM
Borsäure	89 mM
EDTA-Na ₂	2 mM
ad dH ₂ O	

PBS

NaCl	0,8 % (w/v)
KCl	0,02 % (w/v)
Na ₂ HPO ₄ = Dinatriumphosphat	0,144 % (w/v)
KH ₂ PO ₄ = Dikaliumphosphat	0,024 % (w/v)

MACS-Puffer

BSA = Rinderserumalbumin	0,5 %
EDTA	2,5 mM
ad PBS	

ACK-Puffer

NH ₄ Cl = Ammoniumchlorid	150 mM
KHCO ₃ = Kaliumhydrogencarbonat	10 mM
EDTA	0,1 mM
ad H ₂ O	

*Kulturmedien***DMEM**

Es wurde DMEM GlutaMAX der Firma Invitrogen verwendet. Wann 10 % (v/v) FCS zugegeben wurden, ist an entsprechender Stelle im Text angegeben.

RPMI-1640-Medium

Es wurde RPMI 1640 GlutaMAX der Firma Invitrogen verwendet. Wann 10 % (v/v) FCS zugegeben wurden, ist an entsprechender Stelle im Text angegeben.

LB-Medium

LB-Medium wurde als Pulver von invitrogen bezogen. Hiervon wurden 25 g/l in VE-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

SOC-Medium

SOC-Medium ist SOB-Medium + 20 mM Glukose. Das gebrauchsfertige SOC-Medium wurde von invitrogen bezogen.

Panserin 401-Medium

Panserin 401 ist ein serumfreies Komplettmedium, das von der Firma PAN Biotech bezogen wurde.

Opti-MEM®-Medium

Hierbei handelt es sich um ein serumfreies Komplettmedium, das von der Firma invitrogen bezogen wurde.

3.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Akkubetriebene Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Bunsenbrenner	WKS, Aalen
CO ₂ -Brutschrank für Zellkultur MCO-20AIC	SANYO Biomedica, München
Dispenser Varispenser	eppendorf AG, Hamburg
Durchflusszytometer LSR II, FACS Canto II	BD, Heidelberg
Dynalmagnet DynaMag 15	Invitrogen
Elektrophoresekammer #1852077	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Berlin
Heizbarer Schüttler	eppendorf AG, Hamburg
Kamera Chemidoc XRS+	Bio-Rad, München
Kühlzentrifuge Centrifuge 5810 R	eppendorf AG, Hamburg
MACS MultiStand	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Magnetrührer #34521	Cenco
Mikroskop DM IRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Bosch, München
Mikrozentrifuge Centrifuge 5417C	eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach
PC	Dell, Frankfurt/Main
pH-Meter ino Lab pH Level 1	WTW, Weilheim

Photometer EL 808	Bio-Tek Kontron Instruments
Pipette Multipette M4	eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Research plus (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	eppendorf AG, Hamburg
Präparierschere und -pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Reaktionsgefäß-Roller (tube roller)	IKA, Staufen
Reinwerkbank BDK	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Schüttler	IKA, Staufen
Schüttler Thermomixer Comfort	eppendorf AG, Hamburg
Thermoreaktor für PCR Dyad MJ Research PTC-220	Harlow Scientific, Arlington (USA)
Transformator PowerPac Basic	Bio-Rad, München
UV Crosslinker CX-2000	LTF, Wasserburg (Bodensee)
Vakuumpumpe für Zellkultur V7360EII	ALCATEL, Wertheim
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH
Waage Navigator N38110	OHAUS, Parsippany (USA)
Wasserbad #1022	Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel
Zellzerstörer Sonopuls HD 2070	Bandelin, Berlin

Tabelle 1: Verwendete Geräte (wenn nicht an gegebener Stelle im Text aufgeführt)

3.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Material	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 40, #3030.1)	Roth, Karlsruhe
Agarose für TBE-Agarose-Gele	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antikörper CD25-FITC (Rat anti-Mouse)	BD, Heidelberg
Antikörper CD4-Biotin Rat anti-Mouse	BD, Heidelberg
Antikörper CD4-PE und Isotyp Rat IgG2k	BD, Heidelberg
Antikörper für Western Blots siehe 3.6.5 auf S. 30	
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Bakterienkulturplatten	SARSTEDT, Nümbrecht
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Rinderserumalbumin)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)	invitrogen, Darmstadt
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desinfektionsmittel Antifect	Schülke & Mayr, Norderstedt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DNA-Farbstoff Gelred #41003-1	Biotium, Hayward (CA), USA
DNA-Größenstandard Ladder Mix #SM-0333	Fermentas, Schwerte
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dynabeads® Mouse CD8 (Lyt2)	invitrogen, Darmstadt
Dynabeads® Mouse Pan B (B220)	invitrogen, Darmstadt
Einweg-Pipetten für Pipettierhilfe 2,5 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Einwegskalpell	BRAUN, Melsungen
Einwegspritze 1 ml	BD, Heidelberg
Ethanol	Walter, Kiel
FCS (fetales Rinderserum)	invitrogen, Darmstadt
Glasflaschen 250 bis 5000 ml	Schott/DURAN, Wertheim/Main
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
hTGF- β	Roche, Grenzach-Wyhlen
Impföse	Greiner Bio-One, Kremsmünster/Österreich
Injektionskanüle Microlance	BD, Heidelberg
Interleukin-2	Novartis, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ketamin	aniMedica, Senden
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
KHCO ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim
Klonierzylinder #CLS31666	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kryoröhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht
Ladepuffer für DNA-Elektrophorese	Fermentas, Schwerte
LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit	invitrogen, Darmstadt
MACS-Säulen LS-Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Säulen und -Ständer	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

Methanol	
Microbeads Anti-FITC	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Microbeads-Streptavidin	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PCR-Mastermix	NEB, Frankfurt am Main
PCR-Reaktionsgefäße	SARSTEDT, Nümbrecht
Penicillin/Streptomycin	invitrogen, Darmstadt
Pipettenspitzen 10 µl 100 µl und 1000 µl	eppendorf, Hamburg
Polybren	Millipore, Darmstadt
Polyethylenglykol-4000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteingrößenstandard Pageruler #26619	Fermentas, Schwerte
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml	eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	BD, Heidelberg
Rompun 2 %	Bayer Vital, Leverkusen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	invitrogen, Darmstadt
Sterilfilter Filtropur V50	SARSTEDT, Nümbrecht
TRIS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau 0,4 %	invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA	invitrogen, Darmstadt
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylazin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellkultur-Lochplatten 6, 12 oder 24 Vertiefungen Flach- und Rundboden	SARSTEDT, Nümbrecht
Zellkulturflaschen 75 und 175 cm ²	SARSTEDT, Nümbrecht
Zellkulturschalen	SARSTEDT, Nümbrecht
Zellschaber	behr, Düsseldorf
Zellsieb 40 µm und 100 µm	BD, Heidelberg

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien (wenn nicht an gegebener Stelle im Text aufgeführt)

3.4 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden zum Schutz der Zellen vor Kontamination in einer Reinwerkbank durchgeführt. Alle Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert (37°C, 5 % CO₂, 100 % rel. Luftfeuchtigkeit).

3.4.1 NIH/3T3-Fibroblasten

Es wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) der Linie NIH/3T3 verwendet (Todaro & Green 1963). Die Zellen wurden von der UKE-Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie von Prof. Dr. Boris Fehse bereitgestellt. 2 bis 3 Tagen nach Erreichen der Konfluenz zu einem Zehntel in neue Flaschen transferiert (Passagieren). Für alle beschriebenen Versuche wurden Fibroblasten der Passagen 5 bis 15 verwendet.

Passagieren der NIH/3T3-Fibroblasten

Fibroblasten wachsen in Adhärenz, das Medium kann also ohne Verlust von den Zellen abgesaugt werden. Nach Absaugen des alten Mediums wurden Mediumreste mit 10 ml PBS von den Zellen abgespült und das PBS anschließend abgesaugt. Die Ablösung der adhärennten Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung. Um die Aktivität des Enzyms zu erhöhen wurde die Flasche samt Trypsin für 2 min unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 10 ml frischem Medium + 10 % FCS gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Gefäß transferiert und 5 min bei 470 g zentrifugiert um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium + 10 % FCS resuspendiert und anschließend 1 ml dieser Suspension in eine neue Flasche mit 19 ml vorgelegtem Medium + 10 % FCS transferiert.

Kryokonservierung und Auftauen von NIH/3T3

Kryokonservierung ist das Lagern von Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff. 2×10^6 Zellen wurden in einem 15 ml-Zentrifugengefäß 5 min bei 470 g pelletiert und auf Eis in 1,5 ml DMEM + 10 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen transferiert. Für ein langsames Abkühlen auf -196°C wurden die Kryoröhrchen für 48 bis 72 h in Watte im Gefrierschrank bei -80°C gelagert und anschließend in den Stickstofftank umgelagert.

Nach dem Auftauen der Zellen im Kryoröhrchen wurden sie in 50 ml PBS verdünnt, 5 min bei 470 g pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 20 ml DMEM + 10 % FCS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden die Zellen unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Frühestens nach zwei weiteren Passagen wurden die Zellen für Experimente verwendet.

3.4.2 Jurkat-Zellen

Bei der Jurkat-Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte humane T-Zell-Linie (Schneider et al. 1977). Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Andreas Guse des UKE-Instituts für Biochemie und Signaltransduktion bereitgestellt.

Jurkat-T-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium + 10 % FCS in 175 cm²-Zellkulturflaschen für Suspensionszellen kultiviert. Für alle beschriebenen Versuche wurden Jurkat-T-Zellen der Passagen 5 bis 15 verwendet.

3.4.2.1 Passagieren der Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Das alte Medium mitsamt der Suspensionszellen wurde bei 470 g für 5 min zentrifugiert um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche transferiert.

3.4.2.2 Kryokonservierung von Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zellen wurden nach der gleichen Vorgehensweise wie die NIH/3T3-Fibroblasten kryokonserviert (siehe 3.4.1), mit der Ausnahme dass 5×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren wurden.

3.4.3 HEK 293T-Zellen

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonal kidney) (Van der Eb et al. 1977). Diese Zellen wurden ausschließlich für die Titration der VSV-G-pseudotypisierten Viren verwendet (siehe 3.11.2) und genauso gehandhabt wie NIH/3T3-Fibroblasten.

3.4.4 Primäre murine CD4⁺ CD25⁻ T-Lymphozyten

3.4.4.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Isolation primärer Lymphozyten wurden ausschließlich Mäuse der Linie C57BL/6 im Alter zwischen 6 und 12 Wochen verwendet. Die Mäuse entstammten der Zucht des Tierstalls der Versuchstierhaltung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Die Mäuse wurden unter keimarmen Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur von 20°C gehalten. Die unten beschriebenen Organentnahmen wurden im Rahmen der Genehmigung ORG 543 durchgeführt.

3.4.4.2 Milzentnahme aus Mäusen

Die Primärzellen wurden aus der Milz isoliert. Die Maus wurde durch intraperitoneale Injektion von 200 µl PBS mit 5,7 mg/ml Xylazin und 36 mg/ml Ketamin narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde nach Eröffnung der Bauchhaut und des Peritoneums entnommen und in 1 ml PBS transferiert.

3.4.4.3 Einzelzellsuspension aus Milzen

Die Isolation wurde zum Schutz der Zellen vor Kontamination in einer Reinwerkbank durchgeführt. Alle angegebenen Arbeitsmaterialien waren steril.

Die Milz wurde mit Druck durch ein 100 µm-Sieb mithilfe eines Spritzenstempels zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet, die in einem 50 ml-Zentrifugengefäß aufgefangen wurde. Das Sieb wurde zum Erreichen einer höheren Ausbeute mehrfach mit MACS-Puffer gespült. Die gewonnenen Zellen wurden für 5 min bei 470 g pelletiert und zur Erythrozytenlyse in 1 ml eisgekühltem Ammoniumchlorid-Kalium-Puffer (ACK-Puffer) resuspendiert. Die Lyse fand für 30 bis 60 s auf Eis statt, und wurde durch Auffüllen des Gefäßes mit 50 ml MACS-Puffer gestoppt. Nach der Lyse wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm-Sieb in ein neues Reaktionsgefäß gefiltert um Zellklumpen und Bindegewebsreste zu entfernen.

3.4.4.4 Isolation von CD4⁺ CD25⁻ T-Lymphozyten

Zur Isolation wurde ein magnetisches Zellseparationssystem verwendet. Bei diesem Verfahren läuft eine Zellsuspension mit der Schwerkraft durch ein enges, magnetisiertes Metallgeflecht. Die Zellen werden vorher mit Antikörpern inkubiert, die eine spezifische Bindung der gewünschten Zellen an mikroskopisch kleine Metallkügelchen (Beads) vermitteln. Die gebundenen Zellen bleiben mitsamt der Kügelchen im Metallgeflecht hängen. Entweder der Durchfluss wird verworfen und die herausgefilterten Zellen

weiterverwendet (positive Selektion) oder die herausortierten Zellen werden verworfen (negative Selektion, auch Depletion genannt). Es wurden MACS®-LS-Säulen und ein quadroMACS®-Magnetständer der Firma Miltenyi Biotec verwendet.

Zunächst wurden aus der Splenozyten-Einzelzellsuspension CD25⁺ Zellen depletiert. Hierfür wurden sie für 10 min bei 4°C mit einem FITC-konjugierten CD25-Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1 : 100 bei 10⁸ Zellen/ml eingesetzt. Nach der Inkubation wurde das Zellgemisch mit MACS-Puffer gewaschen, das heißt der Inkubationsansatz wurde zwei mal hintereinander mit à 10 ml MACS-Puffer verdünnt, der Ansatz für 5 min bei 470 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurden MACS®-anti-FITC-Microbeads im Verhältnis 1 : 10 zur Zellzahl zugesetzt, für 10 min bei 4°C inkubiert und die Zellen erneut mit MACS®-Puffer gewaschen, pelletiert und resuspendiert. Die so teilweise MACS®-Microbead-markierte Zellsuspension wurde durch eine zuvor mit MACS®-Puffer befeuchtete MACS®-Säule laufen gelassen. Der Durchfluss mit CD25⁻ Zellen wurde aufgefangen und erneut durch eine neue MACS®-Säule aufgereinigt.

Im Anschluss wurde der gesammelte Durchfluss, welcher unter anderem CD4⁺ Zellen enthielt, aufgereinigt. Ziel war eine möglichst reine Population von CD4⁺ CD25⁻ Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit einem Biotin-gekoppelten CD4-Antikörper im Verhältnis 1 : 500 pro 10⁸ Zellen/ml für 10 min bei 4°C inkubiert und erneut wie oben gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-Microbeads (Miltenyi) im Verhältnis 1 : 40 für 10 min bei 4°C. Streptavidin-Beads binden an Biotin-Antikörper. Nach erneutem Waschen wie beschrieben wurde die Zellsuspension durch eine weitere MACS®-Säule laufen gelassen, so dass die CD4⁺ Zellen in der Säule gebunden wurden. Der Durchfluss wurde verworfen. Die CD4⁺ Zellen wurden mit 3 ml MACS®-Puffer durch Druck aus der Säule eluiert und über eine zweite neue MACS®-Säule durch wiederholte Bindung und Elution aufgereinigt. Das Eluat bestand aus CD25⁻ CD4⁺ T-Lymphozyten.

Um Verunreinigungen durch CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten und Makrophagen zu beseitigen, wurden die Zellen mit 5 µl anti-CD11b und 5 µl anti-CD8-Magnetkügelchen (invitrogen Dynabeads CD8) sowie 10 µl anti-B220 (invitrogen Dynabeads Pan B) pro 50 × 10⁶ Zellen in 1 ml PBS für 15 min bei Raumtemperatur unter Rollen des Reaktionsgefäßes inkubiert. Die so an Beads gebundenen Zellen wurden depletiert, indem sie in einem starken Magnetfeld an die Gefäßwand gezogen wurden und die Beads-freie Zellsuspension in ein neues Gefäß pipettiert wurde. Die Aufreinigung im Magnetfeld wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Die Resultat der Magnetzellseparation waren reine CD4⁺ CD25⁻ T-Lymphozyten.

3.4.4.5 Kultivierung der CD4⁺ CD25⁻ T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten wurden in Panserin 401-Medium + 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Es kamen 12- bzw. 24-Loch-Kulturschalen zum Einsatz, darin wurden 10^7 Zellen in 2 ml bzw. 5×10^6 Zellen in 1 ml pro Vertiefung kultiviert.

Wenn T-Zellen unspezifisch aktiviert werden sollten, wurden 5×10^6 T-Lymphozyten pro Vertiefung einer 12-Loch-Kulturschale in 1 ml RPMI-Medium + 10 % FCS mit Zugabe von 4 µg/ml stimulierenden CD3- und 4 µg/ml stimulierenden CD28-Antikörpern inkubiert.

3.4.5 Stimulation der Zellen

Nach der Isolation bzw. Passagierung der Zellen wurde eine Ruhezeit eingehalten um die manipulationsbedingte Autoaktivität zu minimieren. Um die gewünschten Konzentrationen der Stimulanzen zu erreichen ohne einen Mediumwechsel vorzunehmen wurden zum Zeitpunkt der Stimulation 10 % zusatzfreies Medium zur Ausgangsmenge hinzugefügt. Im hinzugefügten Medium befanden sich die Stimulanzen in der 11-fachen Endkonzentration.

3.5 UV-Bestrahlung von Zellen

Die UV-Bestrahlung diente der Aktivierung der p38-MAP-Kinase als Positivkontrolle. Die Bestrahlung wurde in einem UV Crosslinker (CX-2000 der Firma LTF) durchgeführt. 5×10^5 NIH/3T3-Fibroblasten oder 10^6 Jurkat-Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Kulturschale in 2 ml entsprechendem Kulturmedium ohne FCS ausgesät. Nach Inkubation für 24 h wurden sie ohne Deckel (unter unsterilen Bedingungen) im Crosslinker mit UV-Strahlung einer Gesamtenergie von 40 bis 400 J/m² bestrahlt. Die Negativkontrolle wurde während dieser Zeit (max. 30 s) ohne Deckel nur dem Raumlicht ausgesetzt. Nach der UV- bzw. Tageslicht-Exposition wurden die Zellen für 30 min bis 4 h unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert, anschließend lysiert und mittels Western Blot untersucht (siehe 3.6).

3.6 SDS-PAGE und Western Blot

3.6.1 Probenvorbereitung

Adhärenente Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und das PBS abgesaugt. Zu den gewaschenen adhärenenten Zellen wurden 100 µl Lysepuffer hinzugefügt, der frisch mit den in Tabelle 3 beschriebenen Protease- und Phosphataseinhibitoren supplementiert worden war. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst und das Lysat in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse fand auf Eis statt.

Suspensionszellen wurden zum Waschen stark mit PBS verdünnt, indem zu einem Teil Zell-Medium-Suspension mindestens drei Teile PBS hinzugefügt wurden. Im Anschluss wurden die Suspensionszellen für 5 min bei 470 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Auch die Lyse von Suspensionszellen fand auf Eis statt.

Substanz	Funktion	Konzentration
Natriumorthovanadat	Phosphataseinhibitor	2 mM
Leupeptin	} Proteaseinhibitoren	1 µg/ml
Benzamidin		10 mM
Aprotinin		3,4 µg/ml
PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid		1 mM

Tabelle 3: Inhibitoren im Lysispuffer

Um die Membranen im Zellysate zu zerstören wurde die Probe mit Ultraschall zerkleinert. Es wurde das Gerät Sonopuls HD 2070 der Firma Bandelin mit 10 Pulsen à 40 % Amplitude verwendet. Um das Zellysate von Zelltrümmern zu befreien wurde es für 30 min bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine beinhaltet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Konzentrationsbestimmung für Proteine unterzogen.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde das BCA-Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Als Standardreihe dienten BSA-Lösungen in Konzentrationen zwischen 250 und 2000 µg/ml.

Die gewünschte Proteinmenge wurde auf 4/5 des gewünschten Ladevolumens verdünnt und mit 1/5 des gewünschten Ladevolumens 5× Lämmli-Ladepuffer versetzt.

3.6.2 Proteinelektrophorese (SDS-PAGE)

Ziel der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) war die Auftrennung aller Proteine aus einem Zellysate nach Größe. Es wurde das System Mini PROTEAN 3 und Mini Trans Blot-Kammern der Firma Bio-Rad verwendet.

Die verwendeten vertikalen Polyacrylamid-Gele bestanden aus ca. 3/5 Trenngel (unterer Teil) und ca. 2/5 Sammelgel. Die detaillierte Zusammensetzung der Gele zeigt Tabelle 4. Die Ladetaschen befanden sich im Sammelgel. Direkt vor dem Gießen des Trenngels wurden 12,5 µl APS 10 % (w/v) (Ammoniumperoxodisulfat)-Lösung und 6,25 µl Temed (Tetramethylethyldiamin) zusammen zu 5 ml Trenngel-Stammlösung zugegeben um die

Polymerisation zu starten. Das durch Glycerol beschwerte Trenngel konnte sofort mit Sammelgel überschichtet werden. Direkt vor dem Gießen des Sammelgels wurden 10 µl APS-Lösung und 5 µl Temed zusammen zu 2,5 ml Sammelgel-Stammlösung zugegeben. Das Gel polymerisierte für mindestens 30 min vor dem Beladen.

Das Gel wurde mit 25 µg Protein pro Tasche beladen. Als Größenreferenz wurde eine Tasche mit 5 µl einer gefärbten, standardisierten Proteinmischung (Fermentas Pageruler, #26619) beladen.

Der Gellauf fand in einer vollständig mit Laufpuffer gefüllten Laufkammer statt (Puffer siehe 3.1 auf Seite 16). Die Laufkammer wurde von außen durch Eis gekühlt. Für ca. 15 min wurden 100 V, danach für ca. 2 h 160 V angelegt. Nach dieser Zeit konnte am gefärbten Größenstandard die Auftrennung der Proteine im Bereich von 10 bis 250 kDa kontrolliert werden.

Substanz	Konzentration		
	<i>Sammelgel 5 %</i>	<i>Trenngel 12 %</i>	<i>Trenngel 7,5 %</i>
40% Acrylamid	12,5 %	30 %	18,75 %
SDS	1 %	1 %	1 %
Glycerol	–	20 %	20 %
1,5M TRIS pH 8,8	–	25 %	25 %
1M Tris pH 6,8	12,5 %	–	–

Tabelle 4: Zusammensetzung der nicht polymerisierten Gele für die SDS-PAGE ad dH₂O

3.6.3 Western Blot

Im Western Blot wurden die Proteine aus der Gelmatrix mittels Elektrophorese auf eine Membran transferiert um sie später detektieren zu können.

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman PROTRAN 0,45 µm) aufgelegt. Diese Kombination wurde zwischen Filterpapier (Whatman Chromatography Paper) und Schwämmen eingespannt und vollständig in Blotpuffer schwimmend in die Blotkammer gehängt (Puffer siehe 3.1 auf Seite 16). Die Blotkammer wurde von außen mit Eis gekühlt. Zusätzlich kühlte ein Kühlakku in der Kammer. Für den Blotvorgang wurde für 1 h standardmäßig ein Strom von 300 mA angelegt. Wenn später das Protein mTor mit einer Größe von 290 kDa detektiert werden sollte, wurde abweichend für 12 h ein Strom von 30 mA angelegt. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran getrocknet, beschriftet und in TBS/T gelagert.

3.6.4 Proteindetektion mit Antikörpern

Zur spezifischen Detektion der Proteine wurde meist ein ungekoppelter Primärantikörper zur Bindung mit dem gesuchten Antigen verwendet (Ausnahmen siehe Tabelle 5). Anschließend wurde ein an Meerrettichperoxidase (= HRP, horseradish peroxidase) gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt, der unspezifisch gegen die Primärantikörper der verwendeten Spezies gerichtet ist. Der Sekundärantikörper konnte anschließend indirekt sichtbar gemacht werden, da die HRP die Chemiluminiszenzreaktion von Luminol katalysiert. Einzig der Aktin-Primärantikörper war HRP-gekoppelt und bedurfte keines Zweitantikörpers.

Vor jeder Antikörperinkubation wurde die Membran auf einem Schüttler für 30 min in Milch geblockt um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren (Puffer siehe 3.1 auf Seite 16).

Primär- und Sekundärantikörper wurden zur Inkubation mit der Membran wie in Tabelle 5 aufgelistet in TBS/T oder Milch verdünnt und mit der Membran in einem 15 ml-Reaktionsgefäß auf einem Reaktionsgefäß-Roller (tube roller) inkubiert (Puffer siehe 3.1 auf Seite 16). Inkubationen über Nacht fanden bei 4°C statt, kürzere Inkubationen bei Raumtemperatur. Nach jeder Antikörperinkubation wurde die Membran dreimal für 5 min in 5 ml TBS/T in einem 50 ml-Reaktionsgefäß auf dem Reaktionsgefäß-Roller gewaschen.

Zur Detektion wurde das Substrat Immobilon Western (Millipore #WBKLS0500) verwendet. Die gewaschene Membran mit dem HRP-gekoppelten Antikörper wurde mit 2 ml des nach Herstellerangaben angemischten HRP-Substrates für 60 s im 50 ml-Reaktionsgefäß auf dem Reaktionsgefäß-Roller inkubiert. Anschließend wurde die Chemiluminiszenz in einer Chemidoc XRS+ der Firma Bio-Rad sichtbar gemacht. Diese Chemiluminiszenz diente als Nachweis des Proteins auf der Membran.

Aufnahmen mit dem Nachweis von phosphorylierten Antigenen wurden mit dem Open Source-Grafikprogramm GIMP im Kontrast verstärkt um Unterschiede deutlicher hervorzuheben. In gleichem Maße wurde dann auch die Ladekontrolle im Kontrast verstärkt. Betroffene Abbildungen sind in der Abbildungsbeschriftung entsprechend gekennzeichnet. Aufnahmen mit dem Nachweis eines Knockdowns von Proteinen wurden nicht im Kontrast verstärkt um eine quantitative Abschätzung mittels Densitometrie (siehe 3.6.6 auf Seite 30) zu ermöglichen.

Wenn mehr als ein Antigen auf einer Membran detektiert werden sollte, wurde die Membran nach der ersten Detektion für 10 min bei 70°C im Wasserbad auf einem Schüttler mit Strippingpuffer (Puffer siehe 3.1 auf Seite 16) inkubiert um alle Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran wie oben beschrieben dreimal gewaschen.

3.6.5 Verwendete Antikörper

Antigen	Hersteller	Artikel-nummer	Inkubation	Bemerkungen
p38 α (MAPK14)	Cell Signaling	9218	1 : 1000 in 5 % BSA über Nacht	
Phospho-p38	Cell Signaling	9211	1 : 1000 in 5 % BSA über Nacht	
Smad2 + Smad3	Cell Signaling	3102	1 : 1000 in 5 % BSA über Nacht	
Aktin	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616	1 : 2000 in Milch für 1 h	HRP-gekoppelt
Kaninchen-IgG	Cell Signaling	7074	1 : 2000 in 5 % BSA für 1 h	Zweitantikörper, HRP-gekoppelt
Maus-IgG	Cell Signaling	7076	1 : 2000 in Milch für 1 h	Zweitantikörper, HRP-gekoppelt
mTor	Cell Signaling	2983	1 : 1000 in 5 % BSA über Nacht	
Phospho-MAPKAPK2	Cell Signaling	3007	1 : 1000 in 5 % BSA über Nacht	
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	1 : 1000 in Milch über Nacht	
β -Tubulin	Santa Cruz Biotechnology	sc-5274	1 : 1000 in Milch über Nacht	
Smad3	abcam	ab28379	1 : 1000 in 5 % BSA über Nacht	
pSmad2 + pSmad3	Santa Cruz Biotechnology	sc-11769-r	1 : 1000 in Milch über Nacht	

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immundetektion der Proteine nach dem Western Blot

3.6.6 Densitometrie

Um den Knockdown der Zielproteine zu quantifizieren wurden Western Blots densitometrisch ausgewertet. Die nachgewiesene Bande des Zielproteins wurde in Relation zur entsprechenden Bande eines Referenzproteins (Aktin, GAPDH oder β -Tubulin) gesetzt und dieser Quotient mit dem gleichartig errechneten Quotienten der Negativkontrolle (ohne Knockdown) auf der gleichen Membran in Relation gesetzt. Auf

diese Weise ließ sich der Knockdown im Vergleich zur Kontrolle quantitativ einschätzen. Voraussetzung für die densitometrische Analyse eines Blots war, dass der Kontrast der verwendeten Aufnahmen nicht durch Bildbearbeitung verstärkt worden war.

Mit der Histogramm-Funktion des Open Source-Grafikprogrammes GIMP wurde die mittlere Helligkeit des Bereiches jeder einzelnen Bande bestimmt (Abbildung 6). Die Fläche des Bereichs wurde immer exakt gleich gewählt. Außerdem wurde die mittlere Grundhelligkeit der Membran in einem gleichgroßen leeren Bereich der Membran gemessen. Die Differenz dieser beiden Werte ergibt einen negativen Wert, dessen absoluter Betrag die Intensität der Bande widerspiegelt. Diese Bandenintensität wurde in Relation zur Bandenintensität eines Referenzproteins der gleichen Spur gesetzt um die normalisierte Bandenintensität zu ermitteln. Die normalisierten Bandenintensitäten der verschiedenen Spuren konnten direkt miteinander verglichen werden.

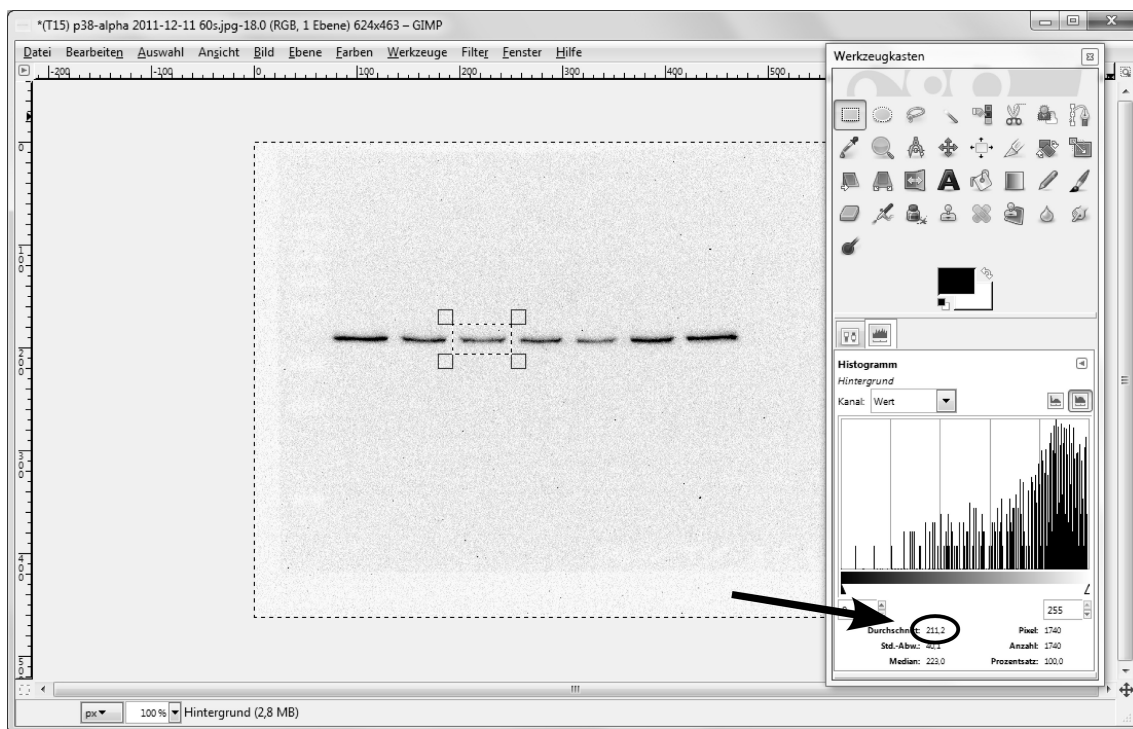


Abbildung 6: Densitometrie im Western Blot

Mit dem Grafikprogramm GIMP wurde über die mittlere Helligkeit die relative Bandenintensität ermittelt. Der entscheidende Wert („Durchschnitt“) ist rechts unten im Bild markiert. Nach Verrechnung mit der Hintergrundhelligkeit konnten über einen Vergleich der Banden Aussagen über die relative Proteinmenge getroffen werden.

3.7 Verwendete Plasmide

3.7.1 Der pLKO.1-Vektor

Der pLKO.1-Vektor ist ein lentiviraler Vektor der dritten Generation, der 2006 erstmals beschrieben wurde (Root et al. 2006). Dieser Vektor mit einer Größe von ca. 7 kbp (Kilobasenpaaren) kodiert für die shRNA unter Kontrolle des hU6-Promoters. Zusätzlich kodiert er für ein Puromycin-Resistenzprotein, die Puromycin-n-Acetyltransferase.

Der pLKO.1-Vektor wurde für alle Transfektionen mit der Lipofektion verwendet, da die von Open Biosystems gelieferten shRNAs als Glycerolstock im pLKO.1-Vektor vorlagen.

Der pLKO.1-Vektor mit der unspezifischen scramble-shRNA (Addgene #1864) sowie der pLKO.1-Leervektor ohne shRNA (addgene #10878) wurden von Addgene bezogen. Auskunft über die verwendeten shRNAs gibt 3.10 auf Seite 38.

Alle shRNAs, die in Form von Oligonukleotiden bestellt wurden, wurden zunächst in den pLKO.1-Vektor kloniert um sie anschließend mitsamt ihrem hU6-Promoter als Kassette in die LeGO-Vektoren klonieren zu können. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 7 auf Seite 33 gezeigt. Der murine U6-Promoter des LeGO-Vektors wurde auf diese Weise immer durch den humanen U6-Promoter ersetzt.

3.7.2 Das pmaxGFP®-Plasmid

Für die durchflusszytometrische Beurteilung der Transfektionseffizienz nach Lipofektion ist ein Fluoreszenzprotein erforderlich (siehe 3.9 auf S. 37). Zu diesem Zweck wurde das eGFP-kodierende Plasmid pmaxGFP® der Firma Lonza eingesetzt, da der pLKO.1-Vektor für kein Fluoreszenzprotein kodiert.

3.7.3 Die LeGO-Vektoren

Zur Herstellung der Lentiviren wurden die LeGO-Vektoren aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Boris Fehse verwendet (Weber et al. 2008). Diese lentiviralen Vektoren der dritten Generation kodieren für die shRNA unter Kontrolle des murinen U6-Promoters und zusätzlich ein Fluoreszenzprotein. Es kamen LeGO-Vektoren mit drei verschiedenen Fluoreszenzproteinen zum Einsatz, über die Tabelle 6 eine Übersicht gibt.

Vektorname	Fluoreszenzprotein (FP)	FP-Exzitation	FP-Emission
LeGO-G	GFP (grün)	484 nm	507 nm
LeGO-C	mCherry (rot)	587 nm	610 nm
LeGO-Cer	Cerulean (violett)	433 nm	475 nm

Tabelle 6: Verwendete LeGO-Vektoren und ihre Fluoreszenzproteine (FP)
(R Y Tsien 1998; Rizzo et al. 2004; Shaner et al. 2004)

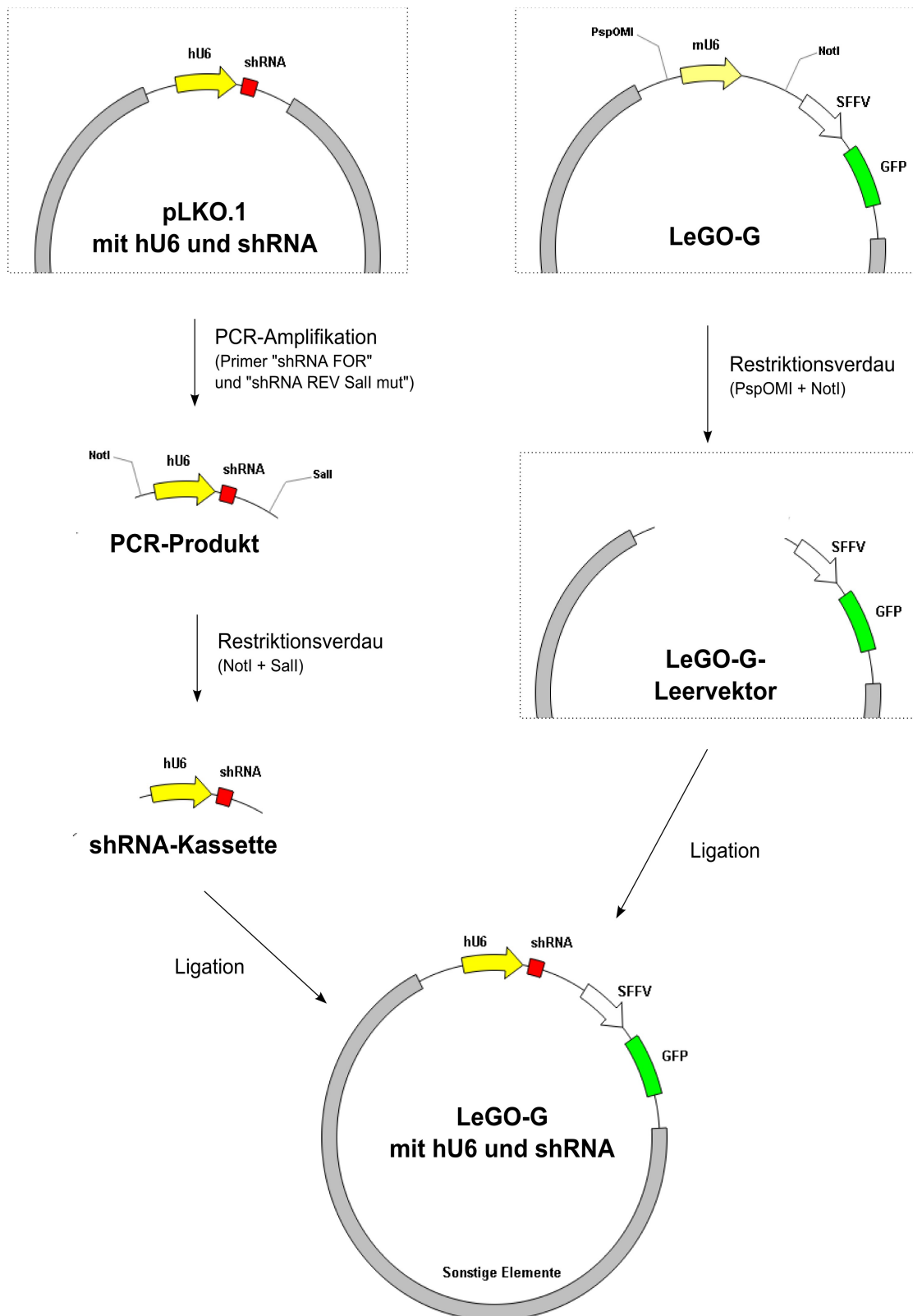


Abbildung 7: Klonierung der shRNA in den LeGO-Vektor

Der humane U6-Promoter aus dem pLKO.1-Vektor mitsamt der shRNA ersetzt nach Klonierung den murinen U6-Promoter des LeGO-Vektors. In der Abbildung ist exemplarisch der GFP-exprimierende LeGO-G-Vektor dargestellt.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) diente sowohl zum Nachweis gewünschter DNA-Abschnitte in einer Vorlage-DNA (Nachweis-PCR) als auch zur Vervielfältigung solcher DNA-Abschnitte zur weiteren Verwendung beim Klonieren (präparative PCR).

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden wie in Tabelle 7 aufgeführt die forward- und reverse-Primer, der PCR-Mastermix und die Vorlage-DNA zu einem Gesamtvolumen von 25 µl zusammengeführt. Als Vorlage-DNA dienten Plasmide oder Bakterien-Abstriche von Agarplatten. Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt. Alle Primer wurden von der Firma metabion synthetisiert.

Komponente	Menge
DNA-Vorlage (Plasmid oder Bakterienabstrich)	1 ng in 1µl H ₂ O/TBE oder Bakterienabstrich
forward-Primer	15 pmol in 0,15 µl
reverse-Primer	15 pmol in 0,15 µl
ddH ₂ O	12,2 µl
2× PCR-Mastermix	12,5 µl

Tabelle 7: Einzelkomponenten der 25 µl PCR-Reaktion

Primer	Basensequenz (von 5' nach 3')
shRNA FOR	ACG GTA TCG ATC ACG AGA CTA GCC TCG AGC
shRNA FOR Xbal mut	ATA TTC TAG ACC GAG GGC CTA TTT CCC ATG
shRNA REV Sall mut	TAC TGC CAT TTG TGT CGA CGT CGA GAA TTC
shRNA REV Sall short	TAC TGC CAT TTG TGT CGA CGT CGA GAA TT
pLKOtoLeGO REV Xbal	TAT AGT CGA CGT CGA TCT AGA TAC AAA AAA GAG CAA GAA GCT
Seq FOR	GGG ACA GCA GAG ATC CAG T
Seq LeGO-PolIII	GGT ACA GTG CAG GGG AAA GA
Seq REV	GGT CCC TCG ACC TGC TGG
pLKO.1 seq	CAA GGC TGT TAG AGA GAT AAT TGG A

Tabelle 8: PCR-Primer

Die PCR wurde bei 94°C Denaturierungs-, 60°C Annealing- und 72°C Elongations-Temperatur in 35 Zyklen durchgeführt. Das Produkt der PCR wurde einer DNA-Gelelektrophorese unterzogen. Wenn das PCR-Produkt vor der Elektrophorese mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten werden sollte, wurde es vorher mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.8.2 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese diente dem Nachweis der in der PCR entstandenen DNA-Fragmente oder dem Nachweis der aus einem Restriktionsendonuklease-Verdau hervorgegangenen DNA-Fragmente. Es wurden TBE-gepufferte Agarosegele mit 1 % Agaroseanteil und Gelred DNA-Farbstoff (Biotium #41003-1) in der Verdünnung 1 : 20.000 verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 6× Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Abhängig vom Elektrodenabstand der Gelkammer wurden Spannungen zwischen 80 und 400 V angelegt.

Nach dem Gellauf wurden die migrierten DNA-Banden in einer Chemidoc XRS+ der Firma Bio-Rad unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und fotografiert. Als Größenreferenz wurden 4 bis 10 µl DNA Ladder Mix (Fermentas #SM-0333) verwendet.

3.8.3 Gelisolation von DNA-Fragmenten

Mit Restriktionsendonukleasen verdaute DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) Kit nach Herstellerprotokoll isoliert.

3.8.4 Klonierung von shRNAs in den pLKO.1-Vektor

Vorbereitung der shRNA

Die mit Ausnahme der Überhänge komplementären shRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma metabion synthetisiert. Je 100 pmol forward- und reverse-Oligonukleotid wurden gemischt und mit Wasser auf 45 µl verdünnt, mit 5 µl Restriktionsenzym-Puffer #2 der Firma NEB versetzt und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Der Heizblock wurde in eine Styroporkiste gestellt und langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Die verschmolzenen Doppelstrang-Oligonukleotide mussten vor der Ligation mit dem Plasmid noch phosphoryliert werden. Hierfür wurden 20 pmol Oligonukleotide mit Wasser auf 9,5 µl verdünnt, mit 10 µl 2× Quick Ligase-Puffer (aus Quick Ligation Kit NEB

#M2200S) versetzt und anschließend 0,5 µl (\cong 5 Richardson units) Polynukleotid-Kinase (NEB #M0201S) hinzugefügt. Der Phosphorylierungsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

Vorbereitung des pLKO.1-Klonierungsvektors

Der pLKO.1 Klonierungsvektor (addgene #10878) wurde bei 37°C für 1 h mit den Restriktionsendonukleasen AgeI (NEB #R0552) und EcoRI (NEB #R0101) im mitgelieferten NEB Puffer #1 verdaut und das 7 kbp große Fragment nach Elektrophorese aus dem Agarosegel isoliert.

Ligation

Für die Ligation des kompletten Phosphorylierungsansatz von 20 µl wurden 50 ng geöffneter Vektor (\cong ca. 0,5 µl), 1 µl Quick Ligase (aus Quick Ligation Kit NEB #M2200S) und 1,5 µl 2× Quick Ligase-Puffer zugesetzt. Die Ligation fand für 15 min bei Raumtemperatur statt und der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend einer Transformation zugeführt (siehe 3.8.6).

3.8.5 Klonierung der Promoter-shRNA-Kassette in den LeGO-Vektor

Der humane U6-Promoter aus dem pLKO.1-Vektor wurde mitsamt der shRNA in den LeGO-Vektor kloniert.

Mittels einer präparativen PCR wurde die Kassette aus dem pLKO.1-Vektor mit den Primern „shRNA FOR“ und „shRNA REV Sall mut“ amplifiziert und durch Primer mit einem modifizierten 5'-Ende mit für die Klonierung passenden Restriktionsstellen (NotI und Sall) versehen. PCR und Primer sind in 3.8.1 auf Seite 34 beschrieben.

Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen NotI und Sall (NEB #R0189 und NEB #R0138) im mitgelieferten NEB-Puffer #3 und mitgelieferten BSA für 1 h bei 37°C verdaut. Der gewünschte LeGO-Vektor wurde unter gleichen Bedingungen mit den Endonukleasen BamHI und XhoI (NEB #R0136 und #R0146) in NEB-Puffer #4 und BSA verdaut. Es wurden für jede enzymatische Restriktion à 5 Einheiten jeder Endonuklease pro µg DNA eingesetzt.

Der Verdauungsansatz wurde anschließend einer Gelelektrophorese unterzogen und der geöffnete Vektor sowie die zurechtgeschnittene Promoter-shRNA-Kassette aus dem Gel extrahiert (siehe 3.8.2 und 3.8.3 ab S. 35). Vektor und shRNA-Kassette wurden im Verhältnis 1 : 5 (bei 50 ng Vektor) mit 2 µl Quick Ligase und 10 µl 2× Quick Ligase-Puffer (beide aus Quick Ligation Kit NEB #M2200S) in 20 µl Reaktionsvolumen für 15 min bei

Raumtemperatur ligiert und anschließend zur Vermehrung in kompetente Zellen transformiert. Die entstandenen Bakterienklone wurden mittels einer PCR mit dem Primer „shRNA FOR“, einem Bakterienabstrich und dem Primer „Seq REV“ auf das vollständige Insert untersucht. Erfolgreiche Klone wurden zu Plasmid-DNA weiterverarbeitet und anschließend zur Sequenzierung an die Firma GATC geschickt um Mutationen und Fehlignationen auszuschließen.

3.8.6 Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien

50 ng zirkuläres Plasmid wurden mit einem 100 µl-Aliquot kompetenter Zellen des Stammes E. coli XL10-Gold (Firma Stratagene) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch für 45 s auf 42°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 900 µl 37°C warmes SOC-Medium hinzugegeben und das Gemisch für 10 min bei 37°C langsam geschüttelt. 500 µl des Gemisches wurden mit einer sterilen Impföse auf einer LB-Agarplatte (Agar mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Nach Wachstum bei 37°C über Nacht wurden 5 bis 20 einzelne Kolonien respektive Klone ausgewählt und DNA-Minipräparationen zugeführt.

3.8.7 Präparation von Plasmid-DNA

Kleinpräparationen aus 7 ml LB-Medium-Kultur von Plasmid-DNA wurden nach Herstelleranleitung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN, Großpräparationen aus 300 ml Kultur mit dem Plasmid Maxi Kit der Firma QIAGEN hergestellt.

Die resultierende Konzentration der DNA wurde photometrisch in einer Verdünnung von 1 : 50 bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

3.9 Durchflusszytometrie

Das prinzipielle Ziel der Durchflusszytometrie ist die Identifizierung bestimmter Zellpopulationen in einer Zellsuspension. Detektiert werden dabei immer ein oder mehrere Fluoreszenzproteine, die bei Erregung durch einen Laser im Durchflusszytometer Licht einer definierten Wellenlänge emittieren. Es können entweder direkt von der Zelle exprimierte Fluoreszenzproteine detektiert werden, oder die zu identifizierende Population wird mit Fluoreszenzprotein-gekoppelten spezifischen Antikörpern gefärbt.

Alle Virustitrationen (siehe 3.11.2 Seite 40) wurden an einem FACS Canto II der Firma BD durchflusszytometrisch gemessen. Alle anderen durchflusszytometrischen Messungen wurden am Gerät LSR II deselben Herstellers durchgeführt. Die Fluoreszenzproteine wurden in passenden Kanälen detektiert, GFP im GFP-Kanal, mCherry im Texas Red-Kanal, Cerulean im DAPI-Kanal.

Färbung und verwendete Antikörper

10^6 Zellen wurden in 200 μ l PBS mit 1 μ l Antikörper für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 470 g abzentrifugiert.

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde eine lebend-tot-Färbung durchgeführt. Diese beruht auf einer Bindung des Farbstoffes an Amine. Tote Zellen besitzen eine für den Farbstoff permeable Membran, weshalb dieser an freie Amine in der ganzen Zelle binden kann. Lebende Zellen werden nur durch eine oberflächliche Bindung an die Amine der Membranproteine auf der Außenseite der Zellmembran gefärbt (Perfetto et al. 2006).

Für die lebend-tot-Färbung, die immer als letzte Färbung durchgeführt wurde, wurde Pacific-Orange-gebundenes NHS (PacO-N-Hydroxysuccinimid = PacO-NHS) als Stammlösung auf Eis 1 : 1000 in PBS zur gebrauchsfertigen Färbelösung verdünnt. Ein Zellpellet von maximal 10^6 Zellen wurde in 200 μ l dieser Färbelösung resuspendiert und für 25 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 470 g abzentrifugiert. Es folgte die Fixierung der Zellen mit PFA.

Fixierung mit Paraformaldehyd

Adhärent wachsende Zellen wurden analog zum Passagieren von Zellen (siehe 3.4.1 auf S. 22) mit Trypsin-EDTA-Lösung aus der Kulturschale abgelöst, mit 2 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 470 g abzentrifugiert. Nach Abgießen des PBS-Überstandes wurde das Zellpellet in 200 μ l PBS + 4 % Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und für 15 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, jeweils gleichermaßen zentrifugiert, bei 4°C gelagert und binnen 48 h durchflusszytometrisch analysiert.

3.10 Verwendete shRNAs

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über alle verwendeten shRNAs. Als Quelle sind für die shRNAs mit den Nummern 11, 12 und 13 jeweils eine Publikation angegeben, in der erfolgreich eingesetzte Sequenzen veröffentlicht wurden. Die scramble-Negativkontroll-

shRNA (also eine shRNA, deren zufällige Basenfolge kein Ziel im Genom der Zelle hat) wurde kommerziell von der Firma addgene erworben (addgene #1864). Alle anderen shRNAs wurden in Form von fertig klonierten pLKO.1-Vektor-Glycerolstocks von Open Biosystems geliefert. Diese shRNAs stammen aus der Datenbank von „The RNAi consortium“ (TRC), als Quelle ist die TRC-Nummer (TRCN) angegeben.

shRNA	Name	Sequenz FOR	TRC# oder Quelle
#13	Smad3 I	ACC TGA GTG AAG ATG GAG A	(Li et al. 2006)
#11	mTor I	GCC AGA ATC CAT CCA TTC ATT	(Araki et al. 2009)
#12	Smad2 I	GGA CTG AGT ACA GCA AAT ACG G	(Bernard 2004)
#1	p38 #1	AGA CCA TAT TGA TCA GTT GAA	TRCN0000023121
#2	p38 #2	CCT GAC CTA TGA TGA AGT CAT	TRCN0000023122
#4	p38 #4	CTC AGA GTC TGC AAG AAA CTA	TRCN0000055224
#25	p38 #25	GTC TGC AAG AAA CTA CAT TCA	TRCN0000055225
#26	p38 #26	AGA GTC TGC AAG AAA CTA CAT	TRCN0000055226
#27	p38 #27	CGA GGG CTG AAG TAT ATA CAT	TRCN0000055227
#19	p38 #19	CCT CTT GTT GAA AGA TTC CTT	TRCN0000023119
#20	p38 #20	GAG TCT GCA AGA AAC TAC ATT	TRCN0000023120
#123	p38 #123	GCT GAA TTG GAT GCA CTA TAA	TRCN0000023123
#223	p38 #223	CCA ACA ATT CTG CTC TGG TTA	TRCN0000055223
#39	mTor #39	GCC TTA AAC AAG AAA GCT ATT	TRCN0000023939
#41	mTor #41	CGA GAT TTA ATG GAG GCA CAA	TRCN0000023941
#42	mTor #42	CGT CCC TAC ATG GAT GAA ATA	TRCN0000023942
#36	Smad2 #36	CGA TTA GAT GAG CTT GAG AAA	TRCN0000040036
#76	Smad2 #76	GAC GAT TAG ATG AGC TTG AGA	TRCN0000010476
#77	Smad2 #77	CAA GTA CTC CTT GCT GGA TTG	TRCN0000010477
scr	scr	CCT AAG GTT AAG TCG CCC TCG	addgene Plasmid #1864

Tabelle 9: Verwendete shRNAs

3.11 Lentiviren

Alle Arbeiten mit Lentiviren und deren Produktion wurden zum Personenschutz und zur Vermeidung von Kontamination unter einer S2-Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Tabelle 10 auf Seite 56 gibt einen Überblick über die verwendeten Viren.

3.11.1 Virusproduktion

5×10^6 HEK 293T-Zellen wurden in einer Zellkulturschale mit 100 mm Durchmesser in 10 ml DMEM + 10 % FCS + 25 mM HEPES ausgesät. Das Medium wurde nach 12 h für die Kotransfektion gewechselt und mit 25 μ M Chloroquine (eingesetzt als 25mM 1000 \times Stammlösung) versetzt.

Anschließend wurden die Zellen zur Kotransfektion mit allen erforderlichen Plasmiden mittels CaCl_2 -Präzipitation transfiziert. Hierfür wurden 15 μ g Vektor-Plasmid, 10 μ g Gag/Pol-Plasmid (pMDLg/pRRE), 5 μ g Rev-Plasmid (pRSV-Rev) und 2 μ g VSV-G-envelope-Plasmid (phCMV-VSV-G) bzw. 4 μ g Eco-envelope-Plasmid (Eco-Env #522, K73) in einem Zielvolumen von 450 μ l destilliertem Wasser verdünnt und mit 50 μ l 2,5M CaCl_2 versetzt. Dieses DNA-Gemisch wurde tropfenweise mit dem Präzipitationspuffer (siehe 3.1 auf Seite 16) vermischt, wobei durch ständiges Blasen von Luft in den Präzipitationspuffer mit einer Pipettierhilfe eine möglichst feinkörnige Präzipitation erreicht werden sollte. Die präzipitierte DNA wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und tropfenweise auf das Medium der zu transfizierenden Zellen verteilt.

Nach 12 h wurde das Medium gewechselt, wobei das Ausgangsmedium verworfen wurde.

Für ecotrope Viren wurde anschließend alle 12 h der Überstand vier mal geerntet und bis zur letzten Ernte bei 4°C gelagert. Für VSV-G-pseudotypisierte Viren wurde nur ein Überstand geerntet, und zwar 24 h nach dem Mediumwechsel

Der Überstand mit den Viruspartikeln wurde durch Zentrifugieren für 5 min bei 470 g von Zelltrümmern befreit und mit einem 0,45 μ m-Spritzenfilter filtriert um letzte Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der filtrierte Überstand wurde entweder konzentriert (siehe 3.11.3 Seite 41) oder zu $\approx 1,6$ ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.11.2 Virustitration

Mit der Titration wurde die Anzahl der viralen Partikel pro ml Überstand bestimmt. Hierzu wurden am Vorabend 5×10^4 HEK 293T-Zellen pro Vertiefung in 24-Loch-Kulturschalen in 500 μ l Medium ausgesät. Für die Titration von ecotropen Viren wurden NIH/3T3-Zellen in gleicher Dichte verwendet.

Nachdem die Zellen über Nacht adhären konnten wurden 5 μ l 100 \times Polybren zu einer Endkonzentration von 8 μ g/ml zum Medium hinzugefügt. Polybren ist ein kationisches Polymer zur Erhöhung der Transduktionseffizienz. Anschließend wurde in verschiedenen Vertiefungen jeweils die gleiche Anzahl Zellen mit 0,1 μ l, 1 μ l, 10 μ l, oder 100 μ l des geernteten virushaltigen Überstandes infiziert.

Nach 48 h Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen wurden die Zellen gewaschen, mit 50 µl Trypsin abgelöst, in DMEM + 10 % FCS resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil der transduzierten Zellen bestimmt. Abbildung 8 zeigt eine dafür repräsentative Gating-Strategie in der durchflusszytometrischen Analyse.

Der Titer wurde aus dem Fluoreszenz-positiven Anteil jener transduzierten Zellen (aus einer Vertiefung) berechnet, deren infizierter Anteil zwischen 5 % und 20 % lag:

$$Titer = \frac{5 \times 10^5 \times \text{positive Zellen (in \%)}}{\text{Virusüberstand (in } \mu\text{l)}} \quad [Titer] = \frac{\text{infectious units (IFU)}}{\text{ml}}$$

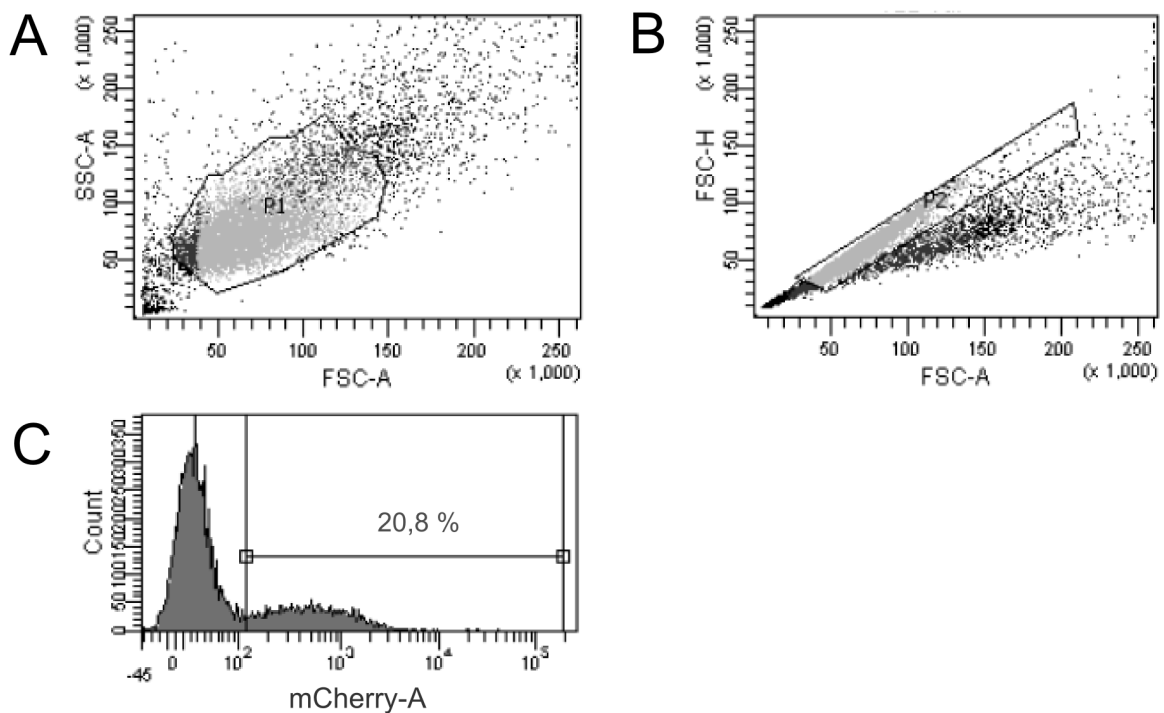


Abbildung 8: Gating nach Durchflusszytometrie zur Bestimmung des lentiviralen Titers

Nach Infektion der Zellen mit dem Lentivirus-Überstand (hier am Beispiel für 1 µl von Virus 22) und 48 h Inkubation wurden die infizierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. **(A):** Aus der gemessenen Gesamtpopulation wurden die intakten Zellen als „P1“ ausgewählt. **(B):** Aus den intakten Zellen wurden lediglich die Singulettzellen als „P2“ betrachtet. **(C):** Nur innerhalb der Singulettzellen wurde letztlich ausgewertet, wieviele Zellen das Fluoreszenzprotein (in diesem Fall mCherry) exprimieren, also infiziert waren.

3.11.3 Viruskonzentrierung

Um ausreichende Titer für die Transduktion zu erhalten wurden die viralen Partikel in den Überständen aus der Virusproduktion aufkonzentriert. Es kamen die Polyethylenglykol-Präzipitation (PEG-Präzipitation) und die Hochgeschwindigkeitszentrifugation zum Einsatz.

3.11.3.1 PEG-Präzipitation

20 ml der Überstände aus der Virusproduktion wurden auf Eis langsam unter Rühren mit 2 ml eiskaltem NaCl 4,4 M und 6,7 ml PEG-4000 34 % versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Rotator gerührt.

Das Virus-PEG-Präzipitat wurde bei 4°C für 15 min bei 4700 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Präzipitat in 500 µl frischem RPMI-Medium resuspendiert, zu à 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.11.3.2 Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation

180 ml der Überstände 2, 3 und 4 aus der Virusproduktion wurden gemischt, auf sechs Zentrifugengefäße zu à 30 ml aufgeteilt und bei 6°C und 8000 g über Nacht in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde aus jedem Röhrchen bis auf ca. 50 µl Restvolumen abpipettiert und das Restvolumen samt Viruspartikeln in 250 µl RPMI-Medium + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Das Konzentrat wurde zu à 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.12 Transfektion: transiente und stabile Lipofektion

3.12.1.1 Transiente Lipofektion von NIH/3T3

Die Lipofektion der Fibroblasten erfolgte mit Lipofectamine® LTX und PLUS®-Reagenz (invitrogen #15338-100) nach Protokoll des Herstellers.

Zur Bestimmung der optimalen Menge Lipofectamine® LTX wurden Mengen zwischen 1,5 und 4,5 µl zur Lipofektion des Plasmids pmaxGFP® in NIH/3T3-Fibroblasten getestet. Es wurde mit Ausnahme der Zellzahl (hier 8×10^4 Zellen pro 6-Loch-Kulturschale) vorgegangen wie im Folgenden beschrieben. Anschließend wurde die Transfektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Um die optimale Dauer für die Lipofektion festzustellen wurden Zeiten zwischen 3 und 24 h getestet. Als Transfektionsdauer galt hierbei die Zeit zwischen Hinzufügen der Liposomen und dem Entfernen des Mediums mit den Liposomen beim ersten Mediumwechsel.

Für alle nachfolgenden Lipofektionen wurden 2×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6-Loch-Kulturschalen in 2 ml DMEM + 10 % FCS ausgesät. Nach 12 h wurde das Medium durch 2 ml Opti-MEM® serumfreies Nährmedium (invitrogen) ersetzt.

2,5 µg des zu transfizierenden Plasmids wurden mit 2,5 µl PLUS®-Reagenz (invitrogen) und 500 µl Opti-MEM® gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 6 µl Lipofectamine® LTX gemischt und für weitere 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und

das Gemisch im Anschluss tröpfchenweise in der vorgesehenen Kulturschalen-Vertiefung verteilt. Nach 12 bis 24 h wurde das Opti-MEM® Medium gegen DMEM + 10 % FCS ausgetauscht.

Wenn als Negativkontrolle einer Transfektion eine Mock-Transfektion durchgeführt wurde, wurden dafür alle Arbeitsschritte einer Transfektion durchgeführt und alle Substanzen mit Ausnahme der DNA eingesetzt.

3.12.1.2 Puromycin-Selektion nach Transfektion

Das Chemotherapeutikum Puromycin diente zur Selektion von Zellen, in denen eine stabile Transfektion, also eine Integration des transfizierten Plasmids in die genomische DNA der Zelle, stattgefunden hatte.

Um festzustellen welche Puromycin-Konzentration binnen 3 bis 5 Tagen zum Absterben nicht transfizierter NIH/3T3-Fibroblasten führt wurde eine aufsteigende Reihe von 0 bis 10 µg/ml Puromycin in DMEM mit den Zellen inkubiert und das Überleben mikroskopisch beobachtet.

Nach Transfektion wurden die Zellen für 72 h Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen in DMEM + 10 % FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in identischem Medium mit zusätzlich 2 µg/ml Puromycin für mindestens 9 Tage in Zellkulturschalen selektioniert.

3.12.1.3 Anzucht von NIH/3T3-Klonen nach stabiler Transfektion

Nach mindestens 9 Tagen Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen mit 2 µg/ml Puromycin waren lichtmikroskopisch vereinzelte Zellhaufen, also vermeintliche Klone sichtbar. Um die Klone einzeln in größerer Anzahl kultivieren zu können mussten sie unter sterilen Bedingungen in verschiedene Kulturschalen getrennt werden. Hierfür wurden 10 Klone pro Kulturschale unter Mikroskopsicht von unten markiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen. Der Unterrand eines Klonierzylinder mit 6 mm Innendurchmesser (Sigma-Aldrich #CLS31666) wurde mit einer Pinzette in steriles Silikonfett eingetaucht und anschließend den Klon umschließend auf die Zellkulturschale aufgesetzt. Der isolierte Klon konnte somit innerhalb des wasserdicht aufsitzenen Ringes mit 50 µl Trypsin-EDTA abgelöst und in eine separate Kulturschale transferiert werden.

3.13 Transduktion

Als Negativkontrolle für jede Transduktion wurden Zellen Mock-transduziert, das heißt sie wurden allen Schritten einer Transduktion unterzogen - mit der Ausnahme, dass keine Viren sondern nur ein äquivalentes Volumen an Medium zugegeben wurde.

3.13.1 Transduktion von NIH/3T3-Fibroblasten

Für eine MOI von 64 IFU/Zelle (infektiöse lentivirale Partikel pro Zelle) wurden 5×10^4 NIH/3T3-Fibroblasten mit 500 µl DMEM + 10 % FCS in eine Vertiefung einer 24-Loch-Kulturschale ausgesät. Nachdem die Zellen nach 12 h unter Zellkulturbedingungen adhärirt waren wurden 5 µl 100× Polybren zu einer Endkonzentration von 8 µg/ml hinzugefügt. Im Anschluss wurde Virusüberstand mit $64 \times 5 \times 10^4$ Viruspartikeln (\cong MOI von 64) hinzugegeben und die Zellen mit den Viren für 1 h bei 1200 g zentrifugiert um eine optimale Transduktion zu gewährleisten. Nach der Zentrifugation wurden Zellen und Viren für mindestens 12 h bei Standardzellkulturbedingungen inkubiert und das Transduktionsmedium durch frisches DMEM + 10% FCS ersetzt.

3.13.2 Transduktion primärer T-Zellen

Nach der in 3.4.4 auf Seite 24 beschriebenen Isolation wurden die T-Zellen für 48 h mit 50 U/ml humanem rekombinatem Interleukin 2 (hIL-2) und zusätzlich einem der folgenden Zusätze unspezifisch aktiviert:

- 1 µg/ml Concanavalin A (ConA)
- jeweils 2 µg/ml löslicher stimulierender CD3- und CD28-Antikörper
- CD3/CD28-Beads der Firma Miltenyi nach Herstellerangaben
- CD3/CD28-Beads der Firma invitrogen im Verhältnis 2 Beads : 1 Zelle

Für diese Aktivierung wurden à 4×10^6 T-Zellen pro Vertiefung einer 12-Loch-Kulturschale in 1 ml Panserin 401-Medium + 50 U/ml hIL-2 ausgesät.

Für die Transduktion der aktivierten Zellen wurden à 5×10^4 bis 3×10^5 T-Zellen pro Vertiefung einer 48-Loch-Kulturschale in 200 µl Panserin 401-Medium + 50 U/ml hIL-2 + 4 µg/ml Polybren eingesetzt. Nach Zugabe der Viren wurden Zellen und Viren für 1 h mit 1200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert um eine optimale Transduktionsrate zu erzielen. Nach 16 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert bevor sie der Durchflusszytometrie unterzogen wurden.

3.14 Statistische Auswertung

Für alle Berechnungen wurde das Programm OpenOffice Calc verwendet. Hinter Mittelwerten wird die Standardabweichung $\pm x$ und in Klammern der Umfang der Stichprobe ($n = x$) angegeben.

3.15 Software

Die Analyse der Durchflusszytometrie-Ergebnisse wurde mit der Software FACSDiva von BD durchgeführt.

Für die Darstellung der Klonierungsschemata wurde die Freeware Plasm 2.1.5.30 (www.biofreesoftware.com) verwendet. Vergleiche von Sequenzen und die Planung der Klonierung wurden mit Hilfe der Freeware Serial Cloner 2.1 durchgeführt.

Zur Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie kam die Open Source-Bildbearbeitung GIMP 2.8.0 zum Einsatz.

Alle anderen Schemata und Diagramme für diese Arbeit wurden mit dem Open Source-Vektorgrafikprogramm Inkscape 0.48 und der Open Source-Bürosuite LibreOffice in den Versionen 3.4.0.1 bis 4.1.3.2 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung der Zielproteine in NIH/3T3-Fibroblasten

Da die Transfektion und Transduktion primärer muriner T-Zellen schwierig und ihre Isolation aufwändig und teuer ist, wurden zunächst Versuche an der murinen Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 durchgeführt. Erstes Ziel war der Nachweis einer Aktivierung der TGF- β -abhängigen Zielproteine.

4.1.1 Aktivierung von p38 und MAPKAPK2 in NIH/3T3-Fibroblasten durch UV-Bestrahlung

Es ist bekannt, dass UV-Bestrahlung zur Phosphorylierung, also Aktivierung, der Kinase p38 führt. Konsekutiv kommt es zur Aktivierung der Downstream-Kinase MAPKAPK2 (Jinlian et al. 2007). Als Positivkontrolle für die verwendeten Antikörper und Methoden wurden NIH/3T3-Fibroblasten UV-bestrahlt. Nach UV-Bestrahlung konnte wie erwartet die Aktivierung von p38 und MAPKAPK2 mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 9).

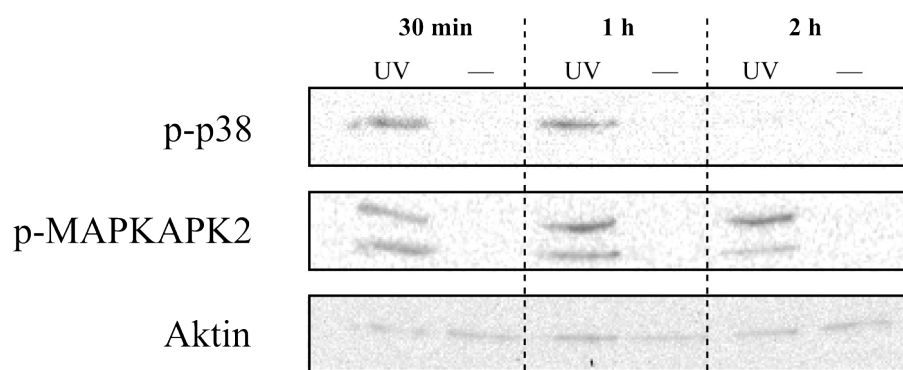


Abbildung 9: Phosphorylierung von p38 und MAPKAPK2 in NIH/3T3 nach UV-Bestrahlung

Als Positivkontrollen konnten die phosphorylierten Kinasen p38 und MAPKAPK2 nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Im Western Blot ist eine Aktivierung von p38 bis 1 h nach UV-Bestrahlung und eine Aktivierung der Downstream-Kinase MAPKAPK2 für den gesamten Beobachtungszeitraum von 2 h nach Bestrahlung erkennbar. Die Zellen wurden mit UV-Strahlung einer Gesamtenergie von 400 J/m² bestrahlt.

4.1.2 Aktivierung von p38, Smad2, Smad3 und der S6-Kinase in NIH/3T3 durch TGF- β

Um die TGF- β -abhängige Aktivierung der Zielkinasen in NIH/3T3-Fibroblasten zu untersuchen wurden die Zellen mit 2 ng/ml TGF- β stimuliert. Über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 12 h wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ein Teil der Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Phosphorylierung, respektive Aktivierung, der Zielkinasen untersucht.

Unter Zugabe von 2 ng/ml TGF- β konnte in NIH/3T3-Fibroblasten eine Aktivierung der Kinasen p38 α , S6-Kinase und der Smad-Proteine Smad2 und Smad3 gezeigt werden (Abbildungen 10 und 11). Die Phosphorylierung der MAPKAPK2 konnte nicht reproduzierbar nachgewiesen werden.

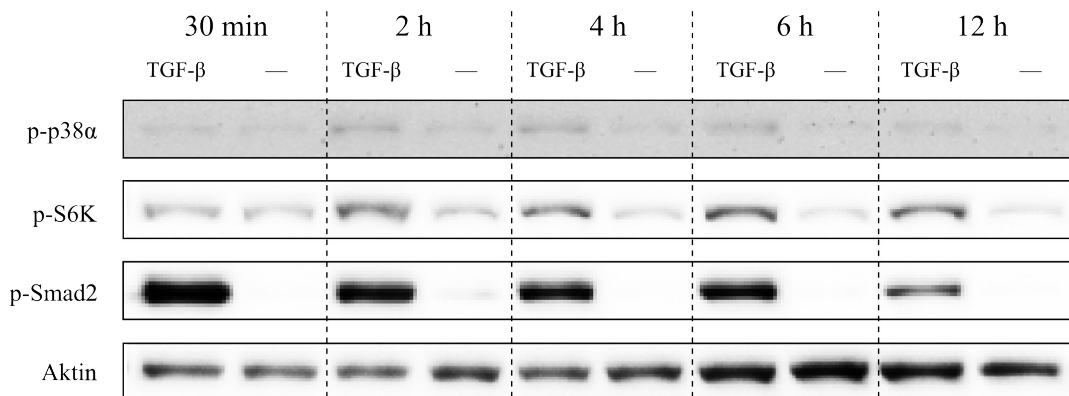


Abbildung 10: Phosphorylierung von p38 α , S6-Kinase und Smad2 durch TGF- β in NIH/3T3
 5×10^5 NIH/3T3-Fibroblasten wurden 18 h nach Aussaat in DMEM + 1 % FCS mit 2 ng/ml TGF- β stimuliert. Als Kontrolle diente die Zugabe von Medium. Im Western Blot ist im paarweisen Vergleich zur Kontrolle eine Aktivierung von p38 α , Smad2 und der S6-Kinase (S6K) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 h erkennbar. Der Kontrast der Abbildung wurde nachträglich verstärkt.

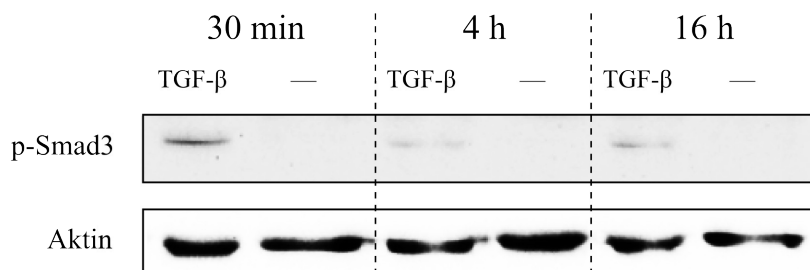


Abbildung 11: Phosphorylierung von Smad3 durch TGF- β in NIH/3T3
 5×10^5 NIH/3T3-Fibroblasten wurden 18 h nach Aussaat in DMEM mit 1 % FCS mit 2 ng/ml TGF- β stimuliert. Als Kontrolle diente die Zugabe von Medium. Im Western Blot ist im paarweisen Vergleich zur Kontrolle eine Aktivierung von Smad3 über den gesamten Beobachtungszeitraum von 16 h erkennbar. Der Kontrast der Abbildung wurde nachträglich verstärkt.

4.2 Aktivierung der Zielproteine in Jurkat-T-Zellen

Perspektivisch wäre ein Einschluss humaner T-Zellen in die Versuche interessant. Um herauszufinden ob die verwendeten Antikörper gegen die phosphorylierten Kinasen p38 und MAPKAPK2 in humanen T-Zellen einsetzbar sind, wurde die humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat in die Experimente mit UV-Bestrahlung eingeschlossen.

4.2.1 Aktivierung von p38 und MAPKAPK2 in Jurkat-T-Zellen durch UV-Bestrahlung

Nach UV-Bestrahlung konnten die phosphorylierten, also aktivierten, Kinasen p38 und MAPKAPK2 mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 12). Der Nachweis war hinsichtlich der niedrigeren verwendeten Strahlendosis sogar sensitiver als in den murinen NIH/3T3-Fibroblasten.

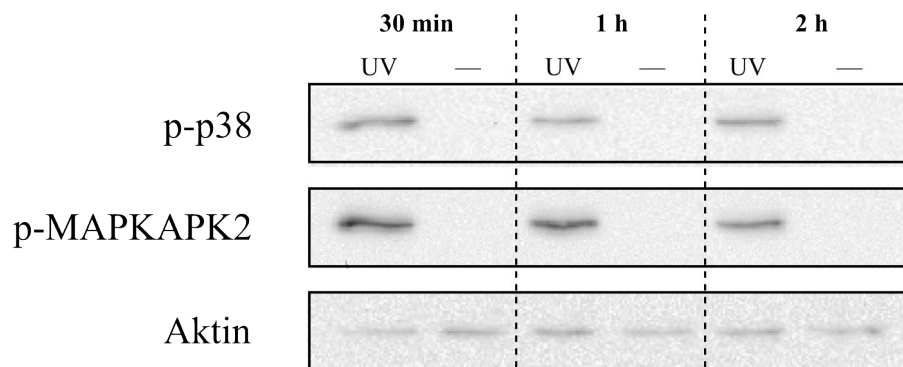


Abbildung 12: Phosphorylierung von p38 und MAPKAPK2 in Jurkat-T-Zellen nach UV-Bestrahlung

Auch in Jurkat-Zellen konnten die phosphorylierten Kinasen nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Zellen wurden mit UV-Strahlung einer Gesamtenergie von 160 J/m^2 bestrahlt und nach den angegebenen Zeitintervallen wurde jeweils ein Teil der Zellen lysiert und im Western Blot analysiert.

4.3 Reinheit der CD4+ T-Zellen nach Isolation

Die Aktivierung der TGF- β -abhängigen Signalwege wurde zunächst in NIH/3T3-Fibroblasten nachgewiesen (siehe oben). Zu einem späteren Zeitpunkt sollen diese Signalwege in regulatorischen T-Zellen mittels RNA-Interferenz negativ beeinflusst werden. Die Aktivierung der benannten Signalwege in murinen T-Zellen wurde vielfach publiziert (siehe 1.5: „Signalwege in der Konversion induzierter regulatorischer T-Zellen“ auf S. 8), sie sollte jedoch auch im Rahmen dieser Arbeit zumindest exemplarisch nachgewiesen werden. Für diesen Zweck wurden murine T-Zellen aus Mäusen isoliert und auf ihre Reinheit untersucht.

Primäre murine CD4+ T-Zellen mussten zunächst aus Mäusemilzen isoliert werden. Um die Reinheit dieser Zellen zu überprüfen wurden sie nach der Isolation durchflusszytometrisch analysiert. Innerhalb von 2 h nach der Isolation der CD4+ T-Zellen wurde deren CD4-Expression und Vitalität durchflusszytometrisch bestätigt. Abbildung 13 A zeigt, dass alle isolierten Zellen tatsächlich CD4+ waren. In allen Versuchen waren > 98 % der isolierten Zellen CD4+. Abbildung 13 B zeigt, dass 88 % der Zellen vital waren. In allen Versuchen lag die Vitalität der CD4+ Zellen bei > 80 %.

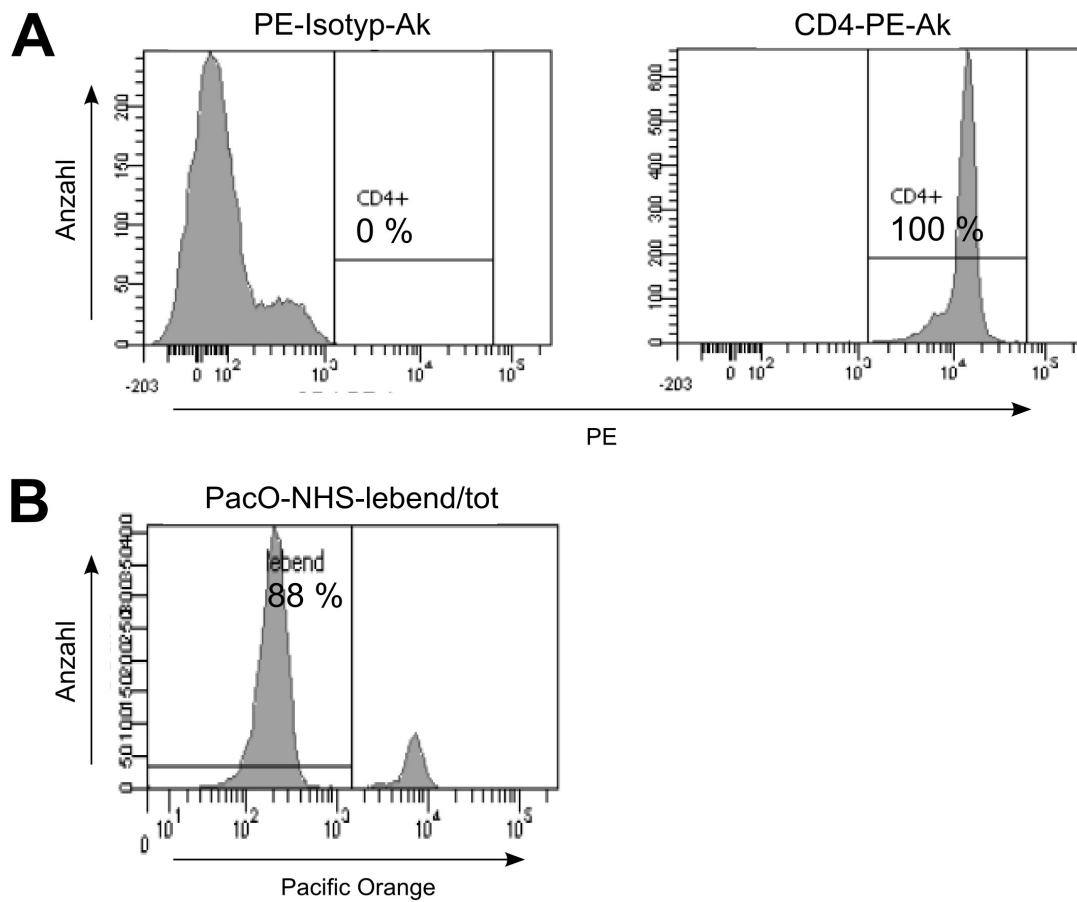


Abbildung 13: Reinheit und Vitalität der CD4+ Zellen nach Isolation aus Mäusemilzen
 Binnen 2 h nach Isolation wurden die Zellen mit CD4-PE-Ak und PacO-NHS gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A): Der Anteil der CD4+ Zellen nach der Isolation betrug bei allen Versuchen > 98 % (hier 100 %). (B): Der vitale Anteil der isolierten Zellen nach Paco-NHS-Färbung lag immer bei etwa 90 % (hier 88 %).

4.4 Aktivierung der Zielproteine in primären CD4+ T-Zellen

4.4.1 Aktivierung von p38 und Smad2 in primären CD4+ T-Zellen durch TGF- β

Da der Fokus dieser Arbeit auf der p38-MAP-Kinase und den Smad-Proteinen liegt, sollte die Aktivierung dieser beiden Zielproteine auch in primären T-Zellen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von Smad2 konnte nach Stimulation mit TGF- β problemlos nachgewiesen werden (Abbildung 14). Die TGF- β -abhängige p38-Aktivierung konnte leider nicht gezeigt werden, da sich eine von TGF- β unabhängige p38-Phosphorylierung zeigte (Abbildung 15).

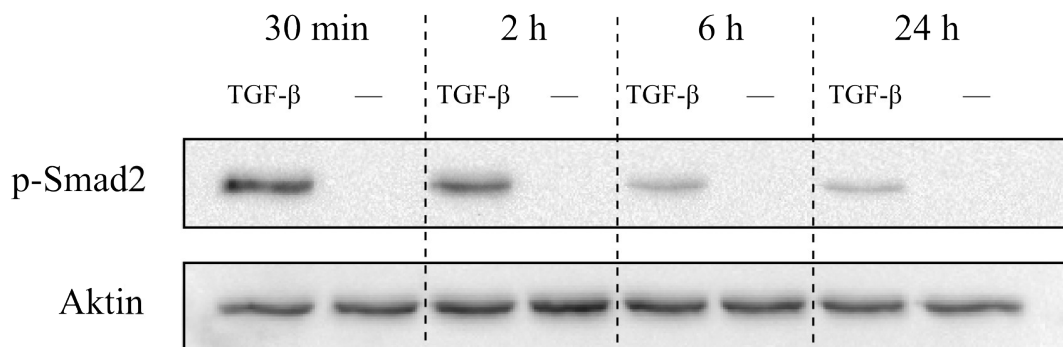


Abbildung 14: Smad2-Aktivierung nach TGF- β -Stimulation in CD4+ T-Zellen

Nach Isolation und 24 h Ruhe in Panserin 401-Medium wurden CD4+ T-Zellen mit 2 ng/ml TGF- β stimuliert und mit 2 μ g/ml löslichem stimulierendem CD3-Ak und 2 μ g/ml löslichem stimulierendem CD28-Ak kostimuliert. Nach 30 min, 2 h, 6 h und 24 h wurde jeweils ein Teil der Zellen lysiert und anschließend im Western Blot auf phosphoryliertes Smad2 untersucht. Es ist eine Aktivierung von Smad2 bereits 30 min nach Stimulation erkennbar. Die Aktivierung bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 h bei langsamer Abnahme erkennbar.

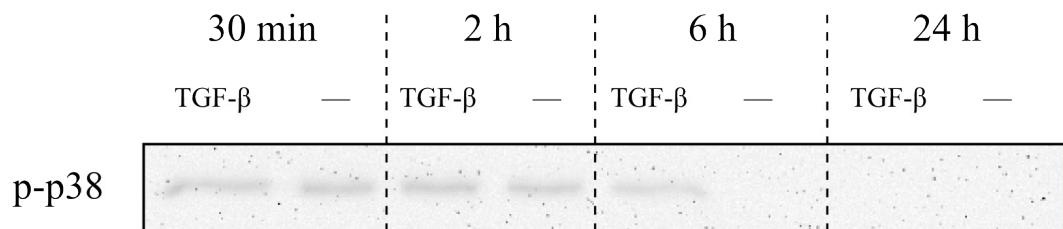


Abbildung 15: Unspezifische p38-Aktivierung in CD4+ T-Zellen,

Nach Isolation von CD4+ T-Zellen, wurden die Zellen mit löslichen CD3- und CD28-Antikörpern mit bzw. ohne TGF- β stimuliert. Nach 30 min, 2 h, 6 h und 24 h wurde jeweils ein Teil der Zellen lysiert und anschließend im Western Blot auf p38-Phosphorylierung untersucht. Im paarweisen Vergleich ist nach 30 min bzw. 2 h nach Stimulation keine TGF- β -Abhängigkeit der p38-Aktivierung erkennbar. Auch der nach 6 h erkennbare Unterschied zwischen Stimulation mit TGF- β und Kontrolle war nicht sicher reproduzierbar.

4.5 Transiente und stabile Lipofektion von NIH/3T3

Nachdem die Aktivierung der Zielproteine in NIH/3T3-Fibroblasten gezeigt worden war, sollte ein Knockdown dieser Proteine erfolgen um die TGF- β -abhängige Signalkaskade zu blockieren. Letztlich sollten die shRNAs für diesen Knockdown mittels eines lentiviralen Vektors in die Zielzellen eingebracht werden. Für die Vorauswahl der effektiven shRNAs aus der zur Verfügung stehenden shRNA-Bibliothek (siehe Tabelle 9 auf S. 39) wurden die shRNA-Plasmide zunächst transfiziert. Die Selektion geeigneter shRNAs mittels Transfektion bot den Vorteil, nicht mit jeder shRNA Lentiviren produzieren zu müssen.

Als Transfektionsmethode kam die Lipofektion zum Einsatz. Hierbei muss zwischen der transienten Transfektion (= temporäres Einbringen von Plasmid-DNA in Zytosol und Zellkern) und der stabilen Transfektion (= Zufällige Integration von Plasmiden in das Genom der Zelle nach transientscher Transfektion) unterschieden werden. Für Details siehe 3.12: „Transfektion: transiente und stabile Lipofektion“ auf Seite 42. Für beide Methoden mussten zunächst die optimalen Lipofektionsbedingungen bestimmt werden. Hierfür wurde ein für eGFP kodierendes Plasmid verwendet um die Transfektionsraten anhand der Fluoreszenz durchflusszytometrisch messen zu können. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 16 eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von NIH/3T3-Fibroblasten, die zuvor erfolgreich mit einem für eGFP kodierenden Plasmid transient lipofiziert worden waren.

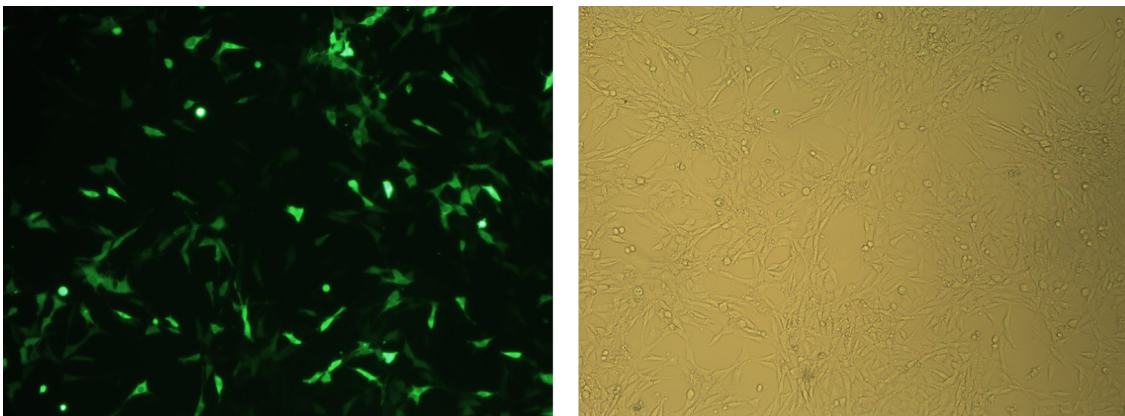


Abbildung 16: eGFP exprimierende NIH/3T3-Fibroblasten nach Lipofektion

Als Kontrolle der erfolgreichen Transfektion wurden parallel zu den Transfektionen mit den pLKO.1-Vektoren auch immer 8×10^4 NIH/3T3-Fibroblasten mit dem Plasmid pmaxGFP® mit $3,5 \mu\text{l}$ Lipofectamine® LTX transfiziert. **Links:** Nach 24 h konnte fluoreszenzmikroskopisch die eGFP-Expression gezeigt werden. **Rechts:** Zusätzlich ist ein Normalfoto der selben Zellen abgebildet.

In Versuchsreihen wurden die optimale Transfektionsdauer und die einzusetzende Menge Lipofectamine® LTX bestimmt. Die maximale Transfektionsrate von ca. 50 % konnte mit einer Transfektionsdauer von 6 bis 16 h erreicht werden (Abbildung 17). Die experimentell bestimmte optimale Menge Lipofectamine® LTX betrug 4,2 µl pro 10⁵ Zellen in der 12-Loch-Kulturschale (Abbildung 18).

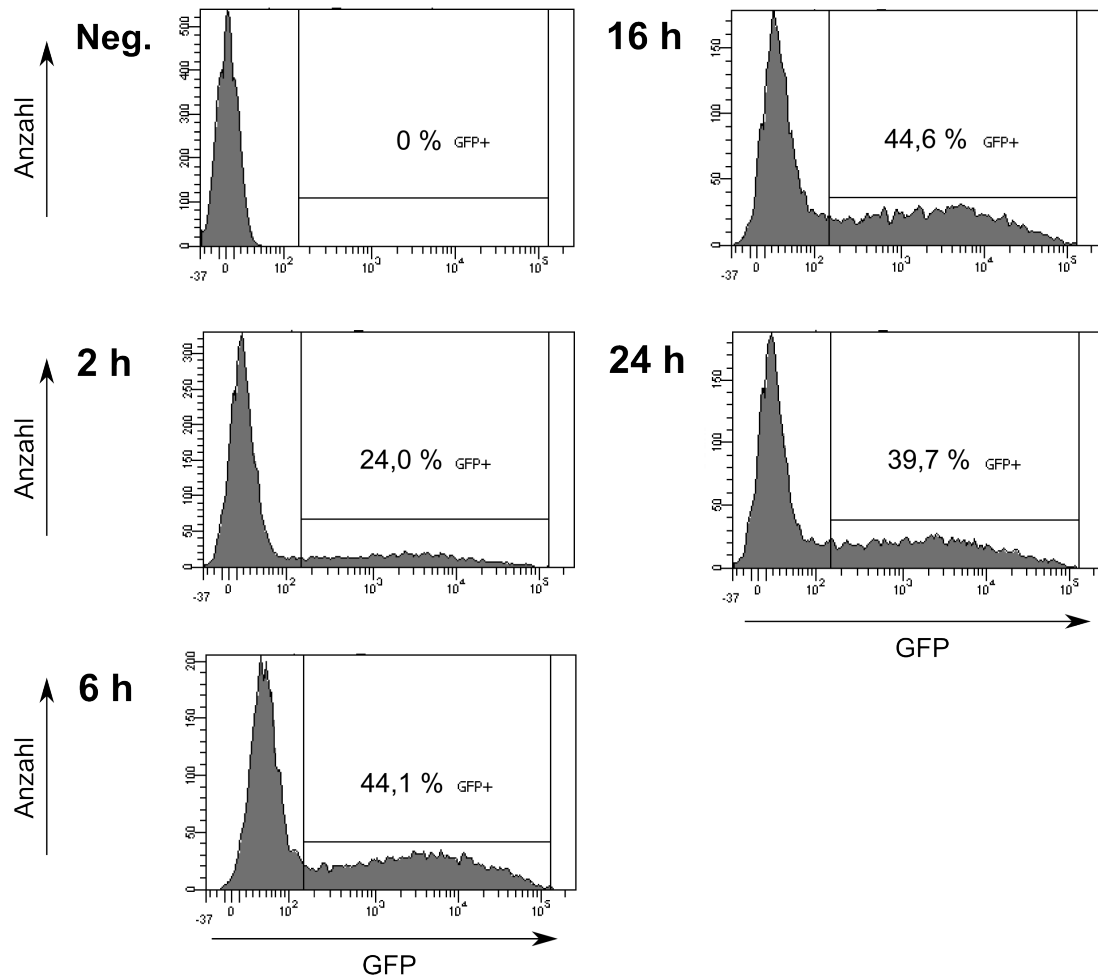


Abbildung 17: Optimale Lipofektionsdauer für NIH/3T3-Fibroblasten

2 × 10⁵ NIH/3T3-Fibroblasten wurden pro Vertiefung in 6-Loch-Kulturschalen ausgesät und jeweils mit 6 µl Lipofectamine® LTX mit dem Plasmid pmaxGFP® für die angegebene Zeitdauer transfiziert. Die durchflusszytometrische Analyse fand 48 h nach der Lipofektion statt. Es ist erkennbar, dass die Transfektionsrate mit zunehmender Lipofektionsdauer von 24 % (nach 2 h) auf 44,6 % (nach 16 h) ansteigt. Eine weitere Steigerung bei 24 h Lipofektionsdauer ist nicht erkennbar. Die besten Transfektionsraten waren nach 6 h und nach 16 h Transfektionsdauer messbar.

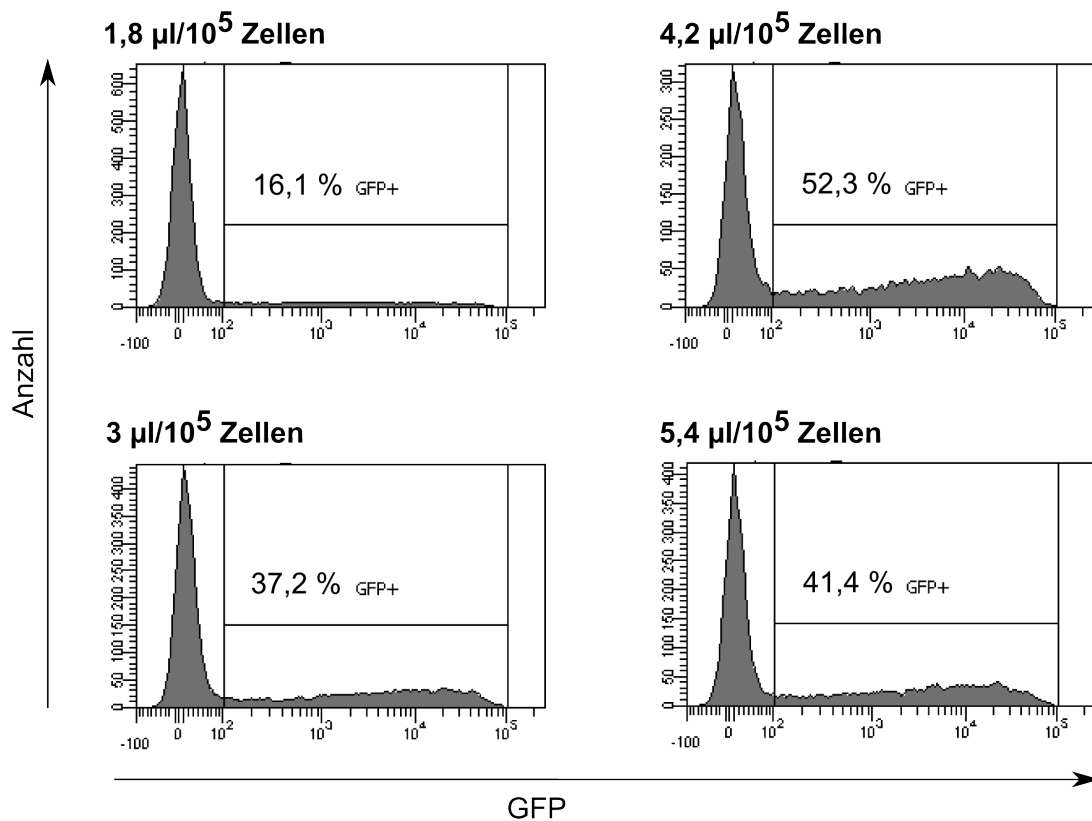


Abbildung 18: Optimale Menge Lipofectamine® LTX für die Transfektion von NIH/3T3-Fibroblasten
 8×10^4 Zellen wurden in 12-Loch-Kulturschalen mit den angegebenen Mengen Lipofectamine® LTX für 6 h mit dem Plasmid pmaxGFP® transfiziert. Nach 48 h wurde die GFP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Erkennbar ist eine Steigerung der Transfektionsrate von 16,1 % beim Einsatz von $1,8 \mu\text{l} / 10^5$ Zellen auf 52,3 % beim Einsatz von $4,2 \mu\text{l} / 10^5$ Zellen. Bei weiterer Steigerung der eingesetzten Menge auf $5,4 \mu\text{l} / 10^5$ Zellen sank die Transfektionsrate auf 41,4 %. Die optimale Transfektionsrate findet sich bei Verwendung von $4,2 \mu\text{l}$ Lipofectamine® LTX pro 10^5 Zellen.

Da nach der einfachen Transfektion nur Transfektionsraten um 50 % erreicht wurden, wurde die Transfektion in späteren Versuchen mit den selben Zellen mehrfach wiederholt um die Transfektionsrate zu erhöhen. Eine wiederholte Transfektion im Abstand von 3 Tagen führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Transfektionsrate. Es zeigte sich ein gleichbleibender Anteil eGFP exprimierender Zellen von $50 \pm 6 \%$ ($n = 4$) (siehe Abbildung 29 auf Seite 67).

Zur Auslese stabil transfizierter Zellen wurden diejenigen Zellen mit Puromycin selektioniert, in denen eine zufällige Integration des Plasmids in das Genom stattgefunden hatte. Für Details siehe 3.12.1.2: „Puromycin-Selektion nach Transfektion“ auf Seite 43. Für die Bestimmung der optimalen Puromycin-Konzentration wurde eine Versuchsreihe mit nicht transfizierten NIH/3T3-Fibroblasten durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich bei

einer Konzentration von 2 µg/ml Puromycin, dass alle Zellen binnen 4 Tagen starben. Es konnte somit gezeigt werden dass sich diese Konzentration gut zur negativen Selektionierung aller nicht transfizierten Zellen eignete.

4.6 Lentiviren

Für die Transduktion von shRNAs, also die virale Integration derselben in das Genom der Zellen, mussten zunächst Lentiviren hergestellt werden. Für die Produktion der Lentiviren mit shRNAs wurden ausschließlich LeGO-Plasmide mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen verwendet. Die shRNAs wurden jeweils samt Promoter in den entsprechenden LeGO-Vektor kloniert. Für Details über die verwendeten shRNAs und Vektoren siehe 3.7: „Verwendete Plasmide“ auf S. 32.

4.6.1 Virustiter

Nach der Produktion der Lentiviren wurde deren Titer bestimmt. Die ermittelten Virustiter sind in Tabelle 10 aufgelistet. Der Titer der VSV-G-pseudotypisierten Viren wurde mit humanen HEK 293T-Zellen bestimmt. Für die Titration der ecotropen Viren wurden NIH/3T3-Fibroblasten verwendet, da mit diesen ecotropen Viren ausschließlich murine Zellen infiziert werden können. Mit der Titration wurde gleichzeitig die Infektiosität der Viruspartikel überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass alle Viren wie erwartet zur Infektion von Zellen geeignet waren.

Virus	shRNA	envelope	Vektor	Titer [IFU/ml]	Titerlinie
V1	#1 (p38α)	VSV-G	LeGO-G	$1,08 \times 10^7$	HEK 293T
V2	#2 (p38α)	VSV-G	LeGO-G	$1,07 \times 10^7$	HEK 293T
V3	#4 (p38α)	VSV-G	LeGO-G	$1,29 \times 10^7$	HEK 293T
V4	scramble	VSV-G	LeGO-G	$1,23 \times 10^7$	HEK 293T
V12	scramble	Eco	LeGO-G	$2,9 \times 10^6$	NIH/3T3
V13	#36 (Smad2)	VSV-G	LeGO-G	2×10^7	HEK 293T
V14	#25 (Smad2)	VSV-G	LeGO-G	$2,2 \times 10^7$	HEK 293T
V15	#26 (Smad2)	VSV-G	LeGO-G	$2,25 \times 10^7$	HEK 293T
V16	#27 (Smad2)	VSV-G	LeGO-G	2×10^7	HEK 293T
V17	#12 (Smad2)	VSV-G	LeGO-G	$2,15 \times 10^7$	HEK 293T
V18	#13 (Smad3)	VSV-G	LeGO-Cer	$1,4 \times 10^7$	HEK 293T
V19	#39 (mTor)	VSV-G	LeGO-C	$1,3 \times 10^7$	HEK 293T
V20	#41 (mTor)	VSV-G	LeGO-C	$1,35 \times 10^7$	HEK 293T
V21	#42 (mTor)	VSV-G	LeGO-C	$1,15 \times 10^7$	HEK 293T
V22	#11 (mTor)	VSV-G	LeGO-C	$1,15 \times 10^7$	HEK 293T

Tabelle 10: Verwendete Lentiviren und erzielte Titer

4.6.2 Viruskonzentrierung

Murine T-Zellen müssen mit hohen Titern infiziert werden (T. Zhang et al. 2003). Um diese hohen Titer zu erreichen mussten die Viruspartikel nach Ernte des virushaltigen Überstandes konzentriert werden. Hierfür wurden die PEG-Präzipitation und die Hochgeschwindigkeitszentrifugation verglichen, wovon sich die letztere als deutlich effizienter herausstellte.

Die PEG-Präzipitation erhöhte den Titer im Durchschnitt um den Faktor 9 ± 6 ($n = 6$). Dabei konnten 36 ± 24 % der im Überstand befindlichen Viruspartikel aufkonzentriert werden ($n = 6$). Abbildung 19 zeigt die durchflusszytometrische Analyse für die Titerbestimmung, repräsentativ für den Virusüberstand mit Virus 9 und für dessen Konzentrat nach PEG-Präzipitation.

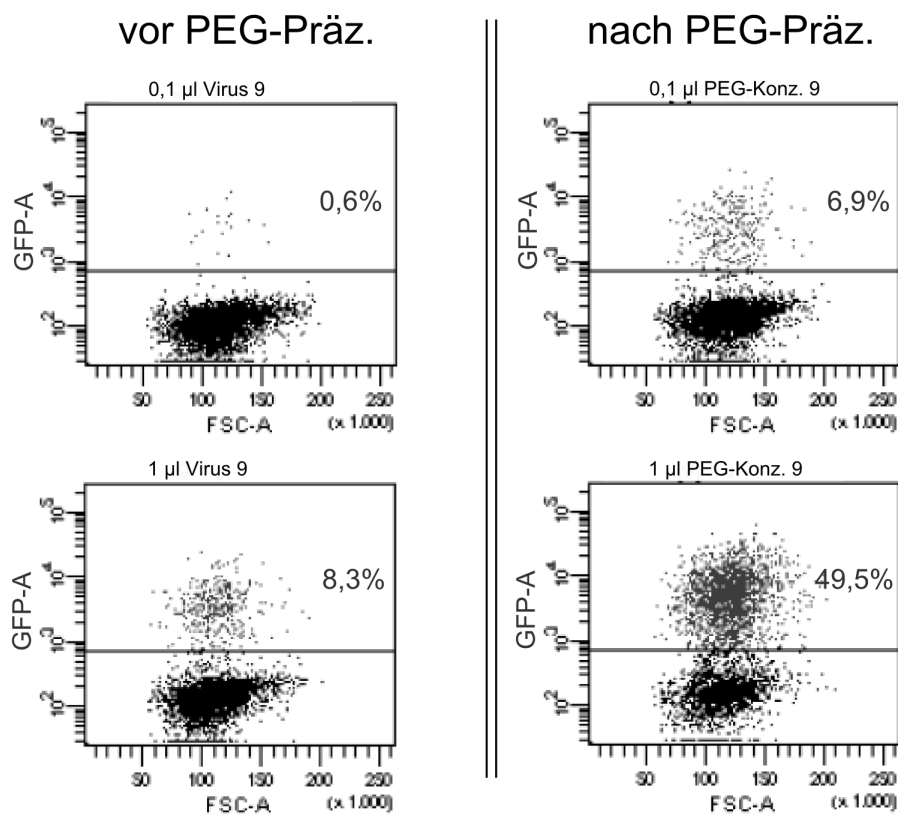


Abbildung 19: Titration vor (links) und nach (rechts) PEG-Präzipitation am Beispiel von Virus 9

Um den Konzentrierungsfaktor nach der PEG-Präzipitation zu bestimmen wurde mit konzentrierten und unkonzentrierten Viren eine Titration durchgeführt. Es wurden 5×10^4 HEK 293T-Zellen mit 0,1 µl (oben) bzw. 1 µl (unten) Zellüberstand bzw. -konzentrat infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Mit 0,1 µl PEG-Konzentrat konnten 6,9 % der Zellen infiziert werden (unkonzentriert 0,6 %), mit 1 µl PEG-Konzentrat konnten 49,5 % der Zellen infiziert werden (unkonzentriert 8,3 %). Die Anzahl der infizierten Zellen ergibt einen Titer von $4,15 \times 10^6$ IFU/ml vor PEG-Präzipitation und $3,45 \times 10^7$ IFU/ml nach PEG-Präzipitation.

Die Konzentrierung mittels Hochgeschwindigkeitszentrifugation erhöhte den Titer eines Zellüberstandes um den Faktor 37 ($n = 1$). Abbildung 20 zeigt die durchflusszytometrische Analyse für die Titerbestimmung, repräsentativ für den Virusüberstand mit Virus 12 und für dessen Konzentrat nach Hochgeschwindigkeitszentrifugation.

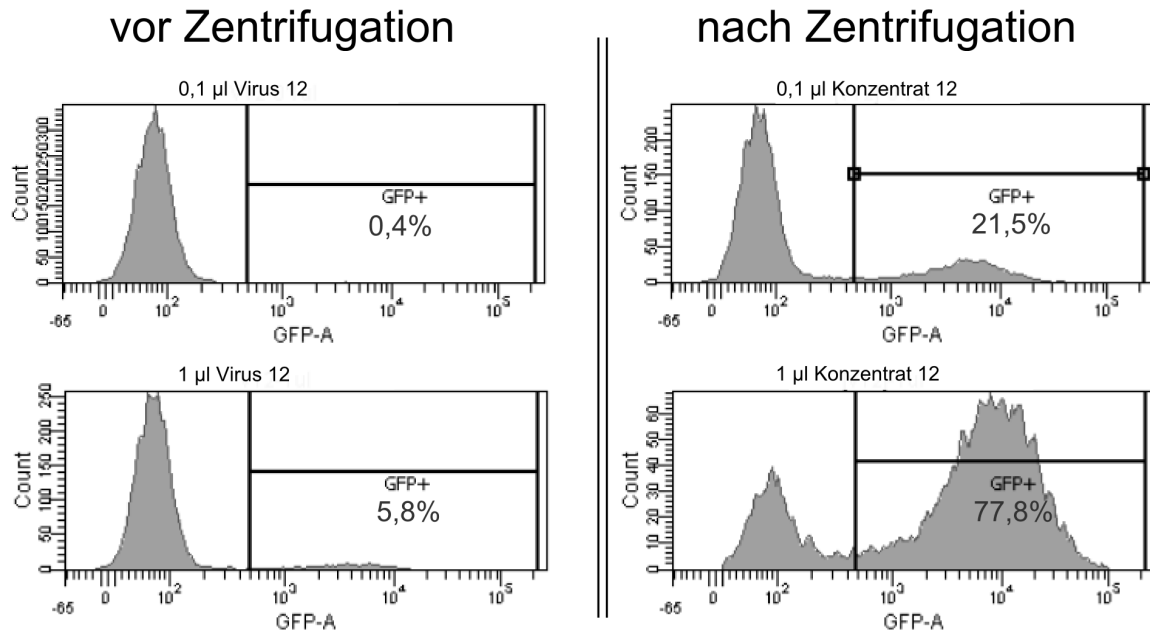


Abbildung 20: Titration vor (links) und nach (rechts) Hochgeschwindigkeitszentrifugation

Um den Konzentrierungsfaktor nach der Hochgeschwindigkeitszentrifugation zu bestimmen wurde mit konzentrierten und unkonzentrierten Viren eine Titration durchgeführt. Es wurden $\approx 5 \times 10^4$ HEK 293T-Zellen mit 0,1 μl (**oben**) bzw. 1 μl (**unten**) Zellüberstand bzw. -konzentrat infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Mit 0,1 μl Zentrifugationskonzentrat konnten 21,5 % der Zellen infiziert werden (unkonzentriert 0,4 %), mit 1 μl Zentrifugationskonzentrat konnten 77,8 % der Zellen infiziert werden (unkonzentriert 5,8 %). Die Anzahl der infizierten Zellen ergibt einen Titer von $2,9 \times 10^6$ IFU/ml **vor Zentrifugation** und $1,08 \times 10^8$ IFU/ml **nach Zentrifugation**.

Aufgrund der höheren Titer nach Hochgeschwindigkeitszentrifugation wurden für die späteren Versuche zur Transduktion primärer T-Zellen ausschließlich Viruspartikel verwendet, die durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation konzentriert worden waren.

4.7 Transduktion von NIH/3T3

NIH/3T3-Fibroblasten wurden sehr erfolgreich mit einer MOI von 32 oder 64 transduziert. Die Transduktionsrate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 21 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten, die zuvor mit einer MOI von 32 mit jeweils einem der drei verwendeten LeGO-Vektoren transduziert worden waren und somit jeweils eines der drei verwendeten Fluoreszenzproteine (GFP, mCherry oder Cerulean) exprimieren. Nach der Transduktion von shRNAs lagen die Transduktionsraten bei einer MOI von 32 immer im Bereich $> 90\%$ (siehe Abbildung 32 auf Seite 70).

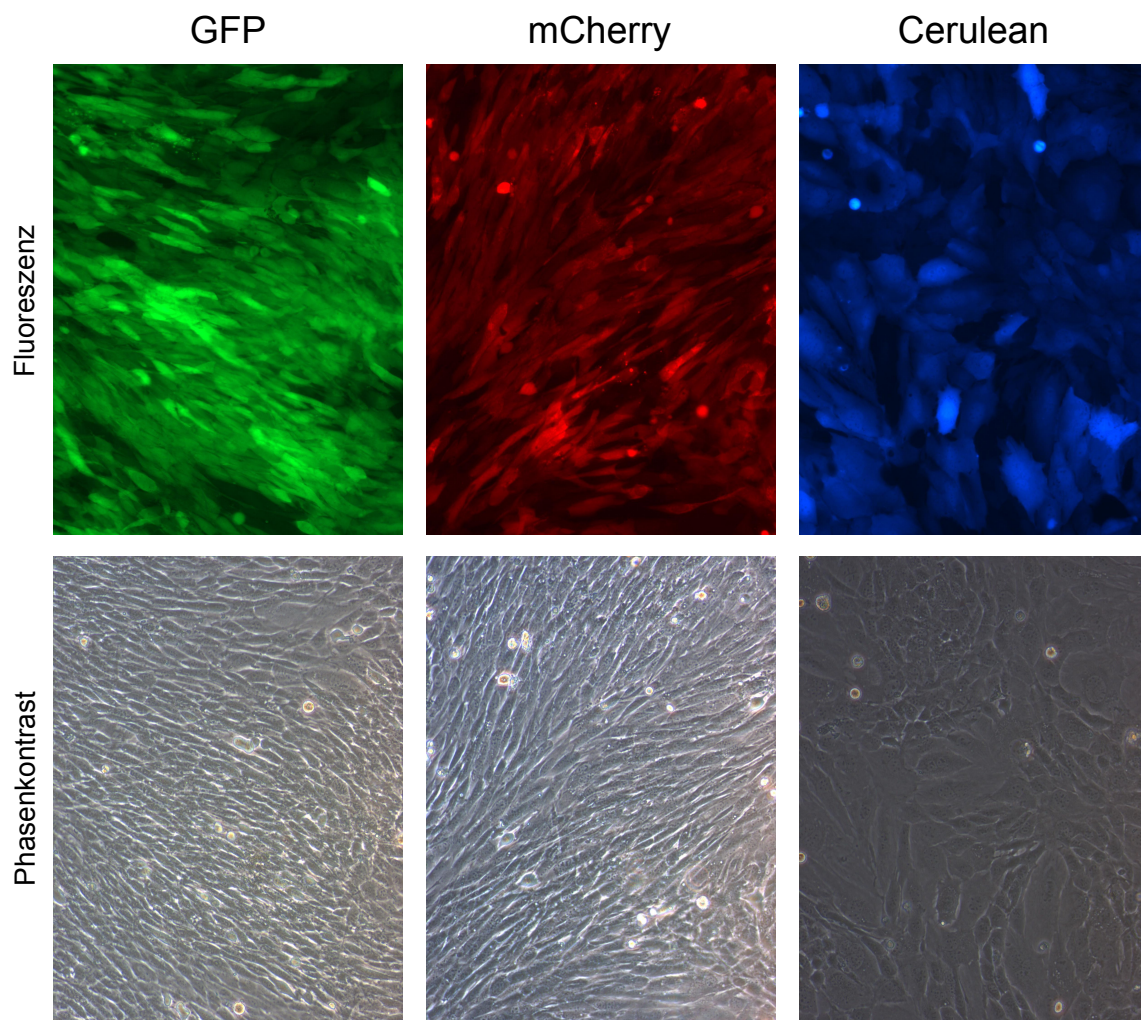


Abbildung 21: Transduzierte NIH/3T3-Fibroblasten

NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit dem LeGO-G- (GFP), LeGO-C- (mCherry) bzw. LeGO-Cer- (Cerulean)-Vektor lentiviral transduziert. Zur Kontrolle der Transduktion wurden Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder 7 Tage nach der Transduktion angefertigt. Diese Fotos zeigen eine starke Expression der Fluoreszenzproteine nach erfolgreicher Transduktion fast jeder Zelle.

4.8 Knockdown der Zielproteine in NIH/3T3

Für alle Knockdown-Experimente wurden ausschließlich murine NIH/3T3-Fibroblasten verwendet. Alle folgenden Ergebnisse beziehen sich deshalb auf NIH/3T3.

4.8.1 Evaluation der Densitometrie zur Knockdown-Bestimmung

Als Referenz für den Knockdown wurde für einen Western Blot eine absteigende Reihe unterschiedlicher Mengen eines Zelllysats in der Proteinelektrophorese geladen. Die absteigende Proteinmenge war im Western Blot deutlich zu erkennen (Abbildung 22), kleinere Differenzen waren jedoch nicht klar abzugrenzen. Rein optisch hätte sich ein Knockdown entsprechend nur sehr ungenau quantitativ abschätzen lassen. Für eine exaktere Bestimmung des Knockdowns sollte deshalb später die Densitometrie, also die Messung der optischen Dichte der Western Blot-Banden, zum Einsatz kommen.

Die oben beschriebene Standardreihe verschiedener Proteinmengen wurde zur Evaluation der Densitometrie densitometrisch ausgewertet. Zur Bewertung der Reliabilität des Verfahrens wurde für alle Proteinmengen der Quotient aus den Bandendichten von p38 und Aktin verglichen. Dieser Quotient zeigte über die gesamte Standardreihe eine mittlere Abweichung in Höhe von $32 \pm 36 \%$ ($n = 13$) vom Mittelwert (Tabelle 11). Bei besonders kleinen Proteinmengen ist die Fehleranfälligkeit der Densitometrie besonders hoch, da der Kontrast zwischen Bande und Hintergrundrauschen sehr klein ist. Schließt man die beiden Werte aus, in denen eine Proteinmenge $< 20 \%$ der Ausgangsmenge eingesetzt wurde, beträgt die Abweichung nur noch $17 \pm 11 \%$ ($n = 11$) vom Mittelwert. Dieser Ausschluss darf vorgenommen werden, da in den nachfolgenden Experimente ein Knockdown auf weniger als 20% der Ausgangsproteinmenge nicht erwartet wurde und auch nicht vorkam. Abbildung 23 stellt die beschriebenen Abbildungen vom Mittelwert als Balkendiagramm dar.

Neben der Reliabilität musste die Validität der Densitometrie überprüft werden. Als valide kann das Verfahren gelten wenn ein linearer Zusammenhang zwischen densitometrisch gemessener Bandendichte und Proteinmenge gezeigt werden kann. Abbildung 24 zeigt die Bandendichte in Abhängigkeit von der Proteinmenge als Punktdiagramm. Der Korrelationskoeffizient in dieser Reihe beträgt 0,98 für p38 und 0,96 für Aktin. Somit wurde ein linearer Zusammenhang bestätigt und die Densitometrie als Verfahren für die Einschätzung des Knockdowns für die folgenden Experimenten positiv evaluiert.

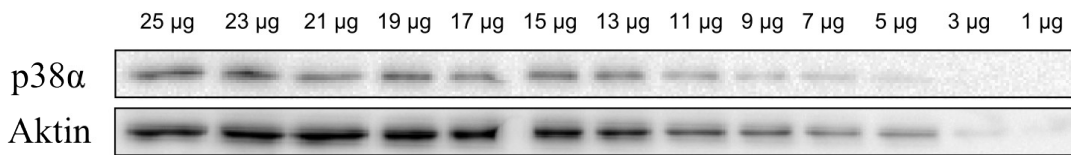


Abbildung 22: Protein-Standardreihe im Western Blot

Eine Standardreihe von 1 μg bis 25 μg Zelllysat aus unveränderten NIH/3T3-Fibroblasten wurde in der SDS-Gelelektrophorese aufgetragen und im Western Blot auf p38 α und Aktin untersucht. Mit bloßem Auge ist die Abnahme der Proteinmenge von links nach rechts gut erkennbar. Nach dieser Detektion durch Chemiluminiszenz wurden die Banden densitometrisch ausgewertet um die Densitometrie zu evaluieren (siehe Tabelle 11).

Beladung [μg]	25	23	21	19	17	15	13	11	9	7	5	3	1
$\frac{\text{Dichte}_{p38}}{\text{Dichte}_{\text{Aktin}}}$	0,6	0,54	0,37	0,45	0,39	0,5	0,49	0,41	0,29	0,38	0,33	1	0
Mittelwert $\frac{\text{Dichte}_{p38}}{\text{Dichte}_{\text{Aktin}}}$	0,44 (= 100%)												
$\frac{\text{Dichte}_{p38}}{\text{Dichte}_{\text{Aktin}}} / \text{Mittelwert}$	136	121	84	101	88	113	111	93	65	87	75	226	0
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%

Tabelle 11: Abweichung der densitometrisch gemessenen Bandendichte vom Mittelwert

Die Intensität (synonym Dichte) der detektierten p38- und Aktin-Banden im Proteinnengen-Standardreihen-Western Blot wurde densitometrisch gemessen. Mit zunehmender Proteinmenge steigt die Bandendichte (Daten nicht gezeigt). Der Quotient der beiden Bandendichten („Dichte p38 / Dichte Aktin“) sollte bei reliabler Messung gleich bleiben, er schwankt jedoch geringfügig um den Mittelwert von 0,44 (= theoretischer Sollwert). Die Abweichung vom Mittelwert wird verdeutlicht durch die Angabe des Quotienten in Prozent. Einen graphischen Überblick über die Abweichungen gibt Abbildung 23.

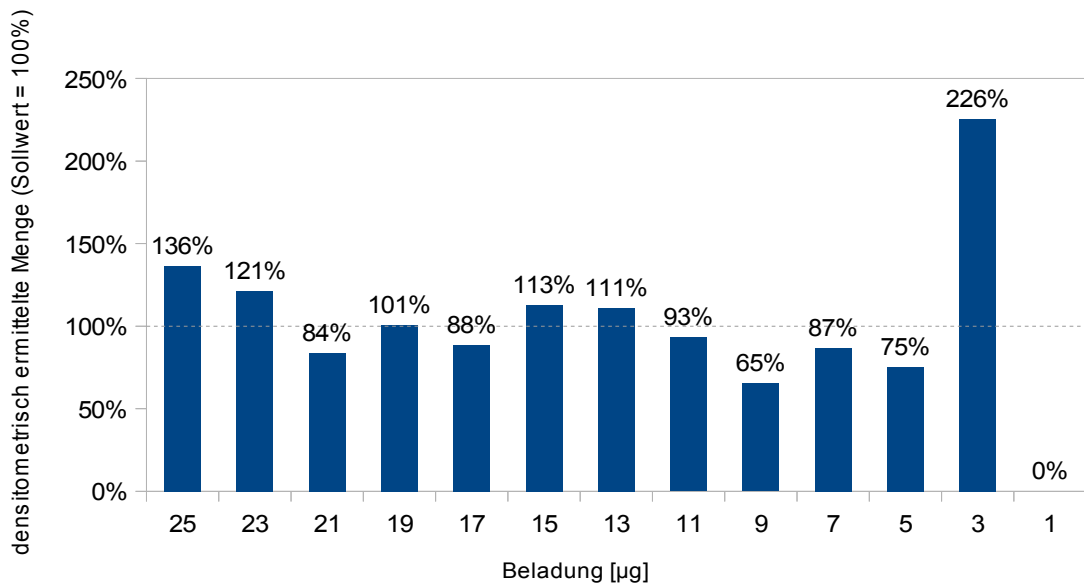


Abbildung 23: Abweichung der densitometrisch gemessenen Bandendichte vom Mittelwert

Die Bandendichte bei Detektion der verschiedenen Proteinmengen wurde densitometrisch ermittelt (siehe Tabelle 11) und für jede Proteinmenge als Balken dargestellt. Es ist eine Schwankung um den als 100 %-Wert markierten Mittelwert zu erkennen. Die größten Schwankungen sind bei sehr kleinen Proteinmengen erkennbar (226 % bei 3 µg und 0 % bei 1 µg).

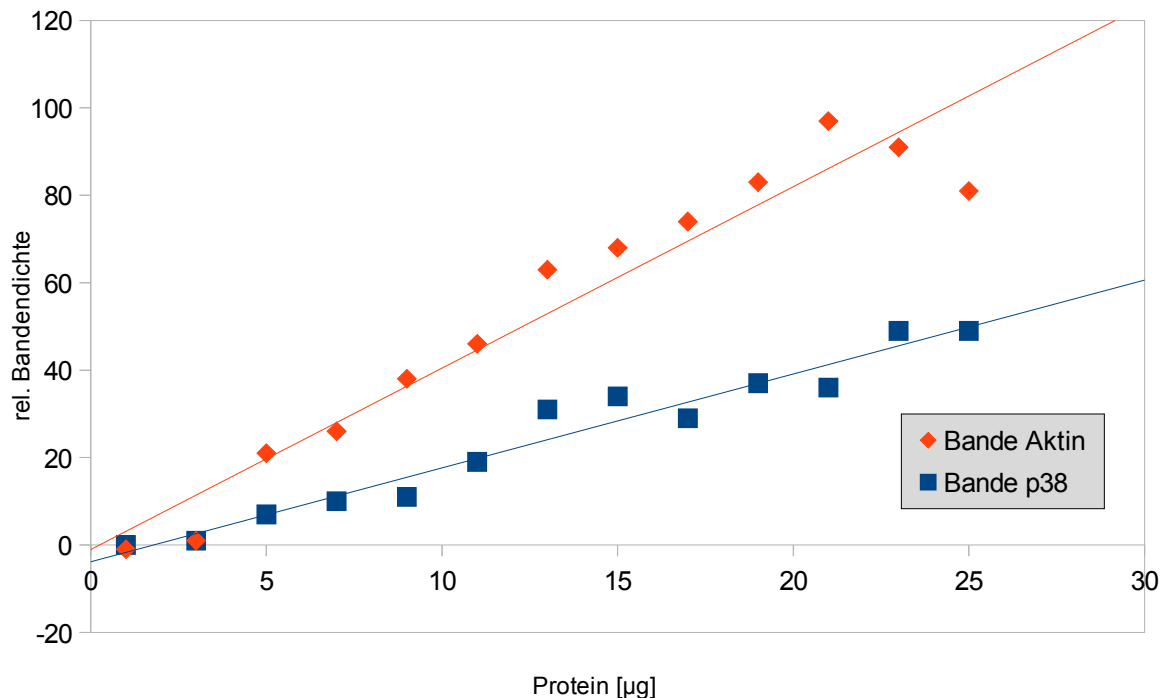


Abbildung 24: Densitometrische Bandendichte und wahre Proteinmenge korrelieren linear.

Die densitometrische Bandendichte von p38α (■) und Aktin (♦) ist in Abhängigkeit von der aufgetragenen Proteinmenge aufgetragen. Im Graph ist zusätzlich jeweils die lineare Regression gezeigt. Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der gemessenen Bandendichte von p38α bzw. Aktin von der Proteinmenge. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,98 für p38α und 0,96 für Aktin.

4.8.2 Knockdown nach Lipofektion von shRNAs

Nach einmaliger transients Lipofektion einzelner shRNAs gegen p38 α (shRNA #1, #2 oder #4) konnte im Zeitraum von 1 bis 4 Tagen nach Transfektion kein im Western Blot optisch oder densitometrisch belegbarer Knockdown festgestellt werden. Wider Erwarten zeigte sich sogar eine vermehrte Expression von p38 α – unabhängig davon ob eine shRNA gegen p38 α oder die Kontroll-shRNA transfiziert wurde. Abbildung 25 zeigt den Western Blot im Zeitverlauf nach einmaliger Transfektion, Abbildung 26 zeigt die densitometrisch ermittelten Bandendichten für p38 α und Aktin im Zeitverlauf nach dieser Transfektion. Die Transfektionsrate lag immer zwischen 50 und 55 %.

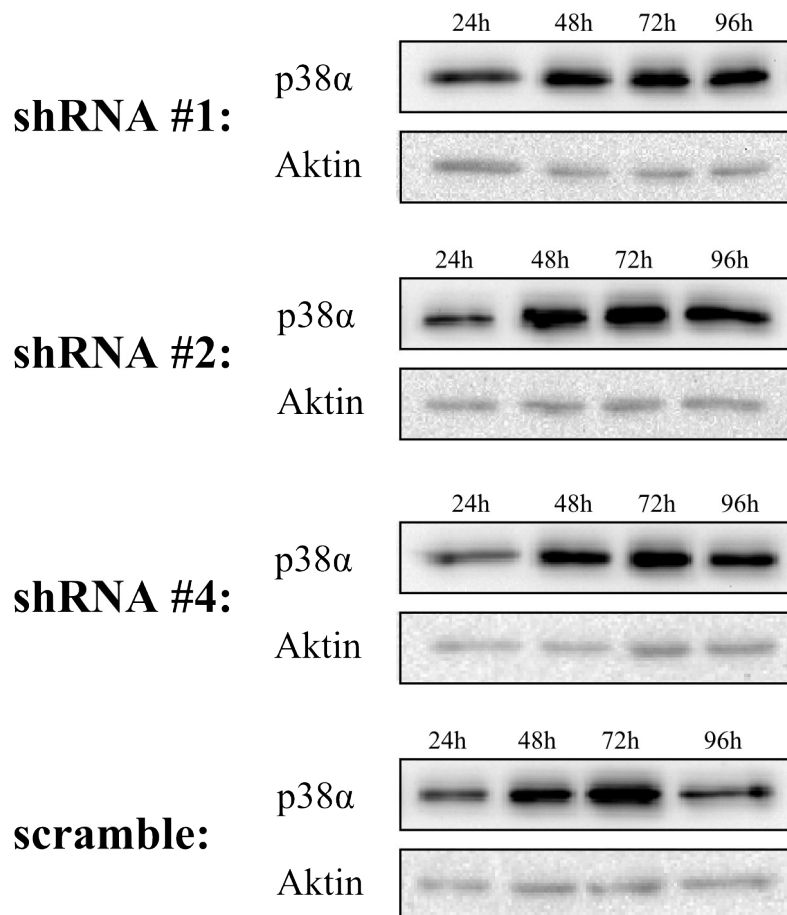


Abbildung 25: Einmalige Lipofektion von NIH/3T3-Fibroblasten mit einzelnen shRNAs gegen p38 α

2×10^5 Zellen wurden zum Testen der shRNAs mit einem shRNA-Plasmid gegen p38 α (#1, #2 oder #4) bzw. mit der Kontroll-shRNA (scramble) transfiziert. Nach den angegebenen Zeiten wurde jeweils ein Teil der Zellen lysiert und im Western Blot untersucht. Es lässt sich sowohl im Blot als auch in den densitometrisch ermittelten Bandendichten (Abbildung 34) kein signifikanter Knockdown erkennen. Einzig auffällig ist eine Steigerung der p38 α -Menge nach Transfektion jeder shRNA. Diese Steigerung erreicht 48 bis 42 h nach Transfektion ihren Höhepunkt und hält über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 h an.

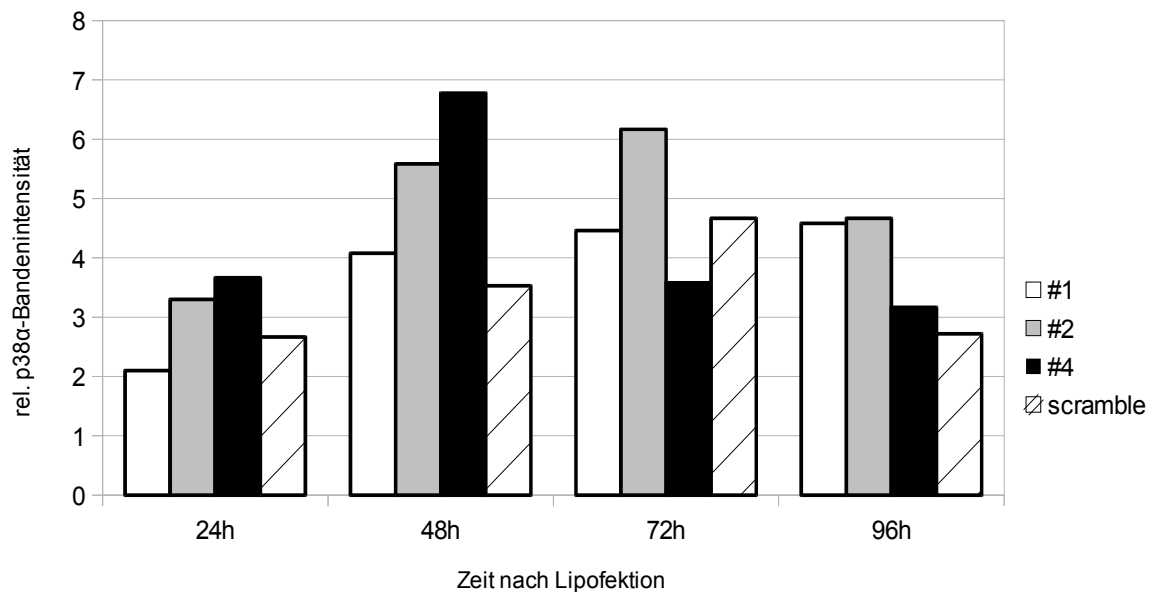


Abbildung 26: Densitometrie für p38α nach einmaliger Transfektion mit shRNAs gegen p38α
 Auch densitometrisch lässt sich nach einmaliger Transfektion einer einzelnen shRNA wie im Blot (Abbildung 25) kein Knockdown von p38α im Vergleich zur Kontrolle (scr) erkennen. Die Steigerung der Menge an p38α unabhängig von der verwendeten shRNA lässt sich ab 48 h nach Transfektion auch densitometrisch nachvollziehen.

Auch nach stabiler Transfektion und klonaler Selektion von 30 Klonen (à 10 Klone für die shRNAs #1, #2 bzw. #4) konnte im Zeitraum von 14 bis 31 Tagen kein reproduzierbarer Knockdown gezeigt werden.

Nach der wiederholten Lipofektion mit einer Mischung aus bis zu vier verschiedenen shRNA-Plasmiden gegen p38α zeigte sich in zwei von drei Zusammenstellungen von shRNAs ein im Western Blot sichtbarer Knockdown (Abbildung 27). Für die densitometrische Auswertung in Tabelle 12 wurde der Mittelwert der mit Aktin normalisierten Bandenintensität aller vier Lipofektionszyklen mit dem Mittelwert der vier Kontrollen verglichen. Die Densitometrie bestätigte den optischen Eindruck und zeigte einen Knockdown auf bis zu ca. 50 % der Kontrolle durch mehrfache Lipofektion mehrerer shRNAs (Abbildung 28 auf S. 66). Einige dieser erfolgreichen shRNAs wurden nach dieser Vorauswahl zu Lentiviren verarbeitet.

Um parallel die Transfektionsraten zu bestimmen wurden identische Zellen zu den gleichen Zeitpunkten und mit den gleichen Materialien mit dem Plasmid pmaxGFP® transfiziert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch der Anteil GFP exprimierender

Zellen ermittelt. Die wiederholte Transfektion führte nicht zu einer zunehmenden Transfektionsrate, sondern diese blieb konstant bei etwa 50 % (Abbildung 29 auf Seite 67).

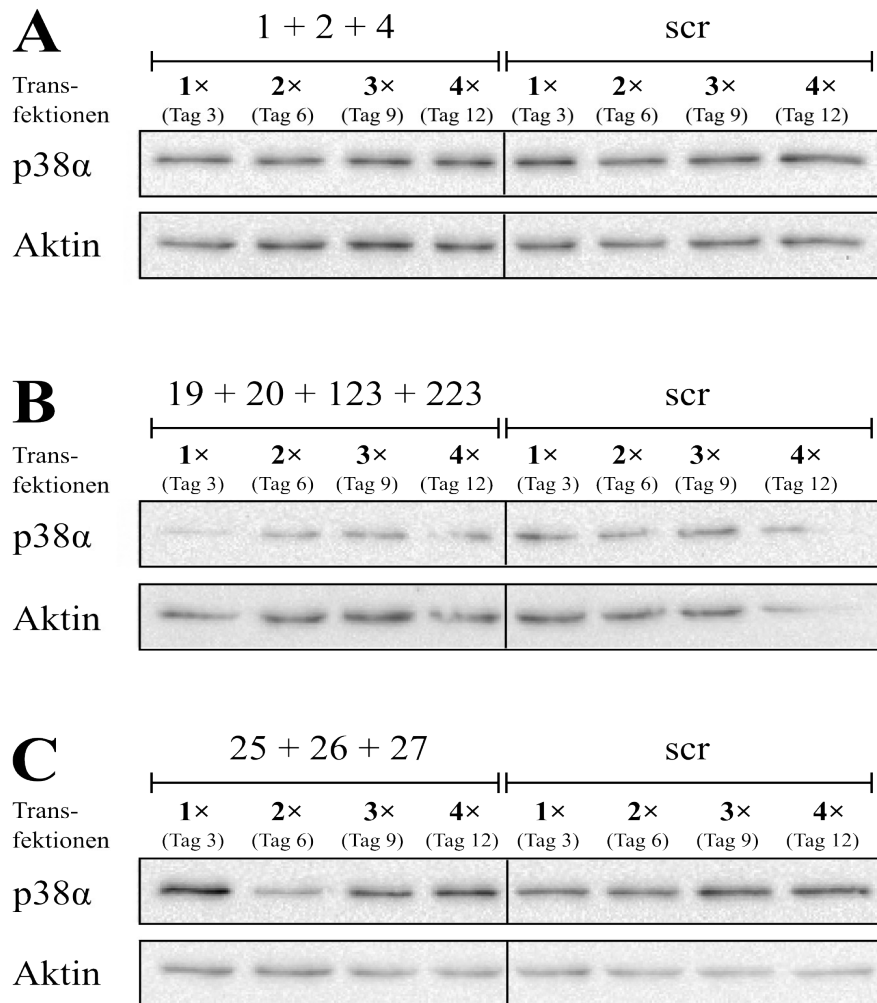


Abbildung 27: p38-Knockdown nach mehrmaliger Lipofektion von NIH/3T3-Fibroblasten mit mehreren shRNAs

2×10^5 Zellen wurden zum Testen der shRNAs alle 3 Tage mit einer Mischung aus shRNA-Plasmiden bzw. einer Kontroll-shRNA (scramble) transfiziert. Jeweils 48 h nach der Transfektion wurde an den angegebenen Tagen ein Teil der Zellen lysiert und im Western Blot untersucht. Im Vergleich der drei shRNA-Gemische A bis C mit der jeweiligen Kontrolle (scr) lässt sich ein nennenswerter Knockdown nur für die Mischung C am Tag 6 erkennen. Der Blot wurde daraufhin zur genaueren Differenzierung densitometrisch ausgewertet (siehe Abbildung 28).

	A shRNAs #1 + #2 + #4	B shRNAs #19 + #20 + #123 + #223	C shRNAs #25 + #26 + #27
mittl. normalis. Dichte $p38_{shRNAs}$	0,95	0,36	1,55
mittl. normalis. Dichte $p38_{scr}$	1,2	0,78	2,38
$\frac{\text{mittl. normalis. Dichte } p38_{shRNAs}}{\text{mittl. normalis. Dichte } p38_{scr}}$	79 %	47 %	65 %

Tabelle 12: p38 α -Knockdown nach mehrmaliger Lipofektion von shRNA-Plasmid-Mischungen

Die densitometrisch aus Abbildung 27 ermittelten Bandendichten wurden mit Aktin normalisiert, gemittelt und der Quotient mit der gemittelten zugehörigen scramble-Kontrolle berechnet. Die erfolgreichste Mischung aus den shRNA-Plasmiden #19, #20, #123 und #223 führte zu einem mittleren Knockdown auf 47 % der Kontrollmenge an p38 α . Abbildung 28 zeigt den Knockdown als Balkendiagramm.

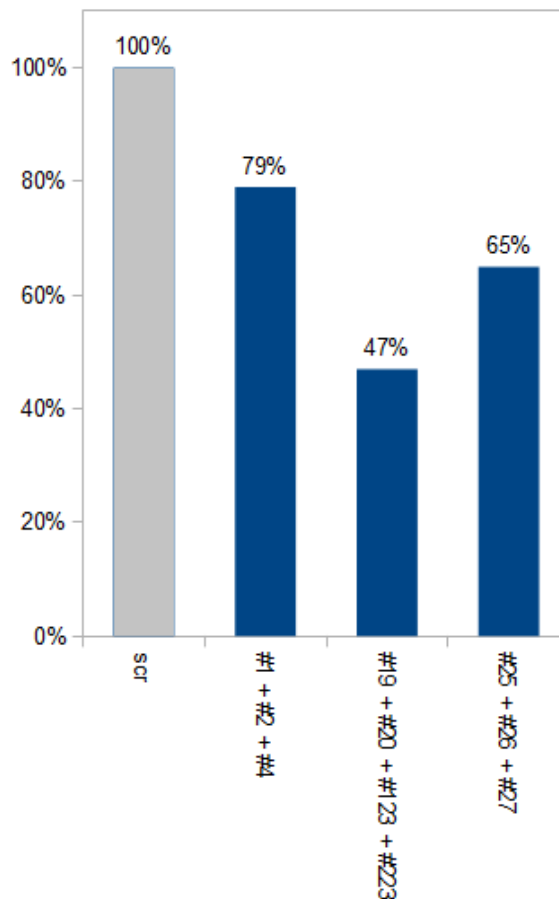


Abbildung 28: p38 α -Knockdown nach mehrmaliger Lipofektion von shRNA-Plasmid-Mischungen

Die gemittelten densitometrischen Bandendichten sind im Vergleich zur scramble-shRNA als Balken dargestellt. Die Berechnung kann in Tabelle 12 nachvollzogen werden. Die drei shRNA-Gemische verursachen einen Knockdown von 79 % bis zu 47 % der Kontrollmenge an p38 α .

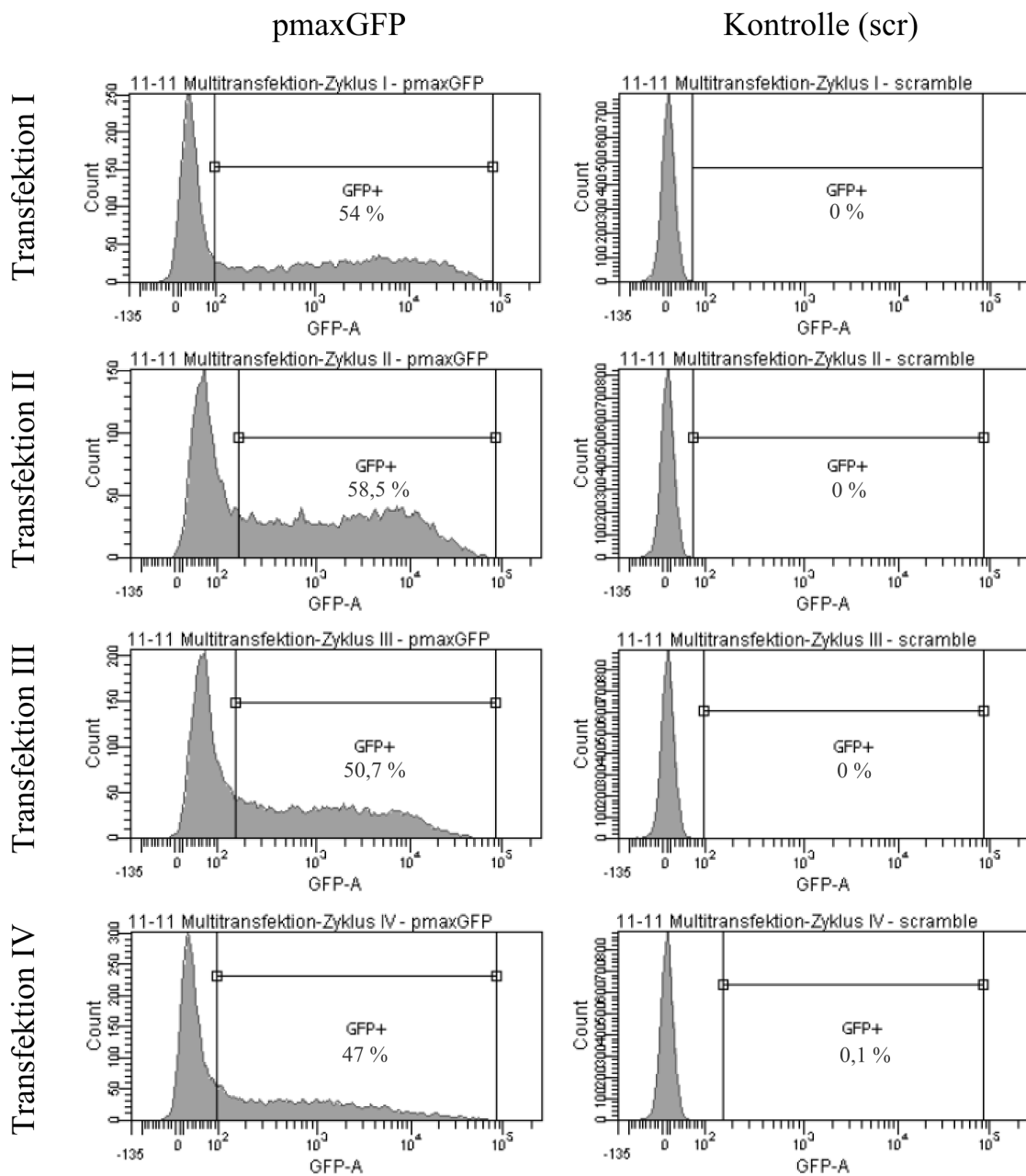


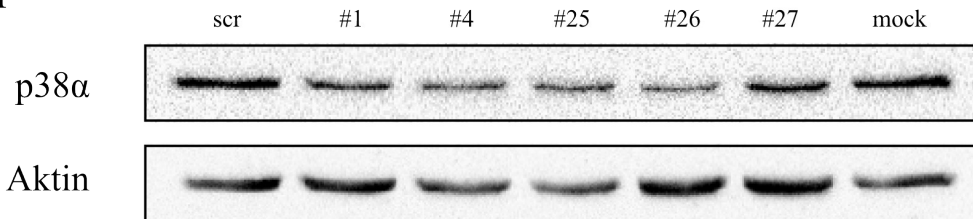
Abbildung 29: Wiederholte Transfektionen führten nicht zur Steigerung der Transfektionsrate.
 Um die Transfektionsrate von NIH/3T3-Fibroblasten nach mehrfacher Lipofektion zu ermitteln wurden 2×10^5 Zellen alle 3 Tage mit dem Plasmid **pmaxGFP**® bzw. mit einer Kontroll-shRNA (**scramble**) transfiziert. Jeweils 2 Tage nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen durchflusszytometrisch auf die GFP-Expression nach erfolgreicher Transfektion analysiert. Unabhängig von der Anzahl der Transfektionen lag die Transfektionsrate zwischen 47 % (nach Transfektion IV) und 58,5 % (nach Transfektion II).

4.8.3 Knockdown nach lentiviraler Transduktion von shRNAs

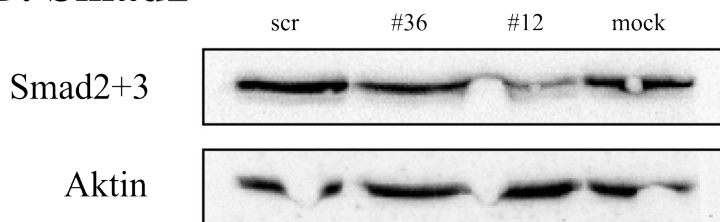
Nach der Vorauswahl der shRNAs mithilfe der Transfektion wurden wie oben beschrieben Lentiviren mit den meistversprechenden shRNAs produziert. NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit einer MOI von 32 transduziert und der Knockdown der Zielproteine im Western Blot nach 5 Tagen bestimmt.

Der Knockdown durch lentivirale Transduktion der shRNAs war häufiger nachweisbar und in allen Fällen stärker als nach Lipofektion der shRNA. Für jedes Zielprotein wurden mindestens eine shRNA gefunden, mit deren Hilfe ein Knockdown auf mindestens 52 % der Kontrolle erreicht werden konnte. Für drei der vier Zielproteine (p38 α , Smad2 und mTor) wurden sogar zwei erfolgreiche shRNAs identifiziert. Abbildung 30 zeigt den Knockdown im Western Blot, der wiederum für Abbildung 31 densitometrisch ausgewertet wurde. Die Transduktionsrate betrug im Mittel $92,3 \pm 3,4$ % (n = 16). Für jedes verwendete Fluoreszenzprotein zeigt Abbildung 32 eine repräsentative durchflusszytometrische Infektionskontrolle.

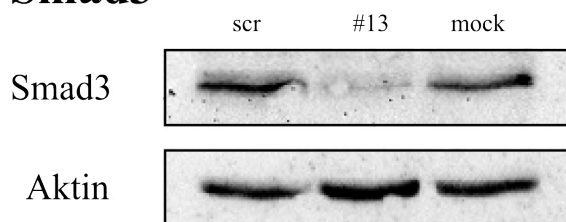
A: p38



B: Smad2



C: Smad3



D: mTor

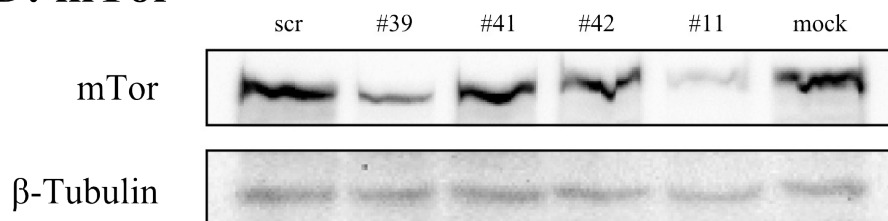


Abbildung 30: Knockdown der Zielproteine nach lentiviraler Transduktion von shRNAs
 5 × 10⁵ NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit einer MOI von 32 mittels VSV-G-Lentiviren mit den angegebenen shRNAs transduziert. 5 Tage nach Transduktion wurden die Zellen lysiert und im Western Blot die Expression des jeweiligen Zielproteins bestimmt. Als Kontrolle diente eine Mock-Transduktion. Für jedes Zielprotein konnte mindestens eine erfolgreiche shRNA identifiziert werden (#26 für p38, #12 für Smad2, #13 für Smad3, #11 für mTor). Abbildung 22 zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

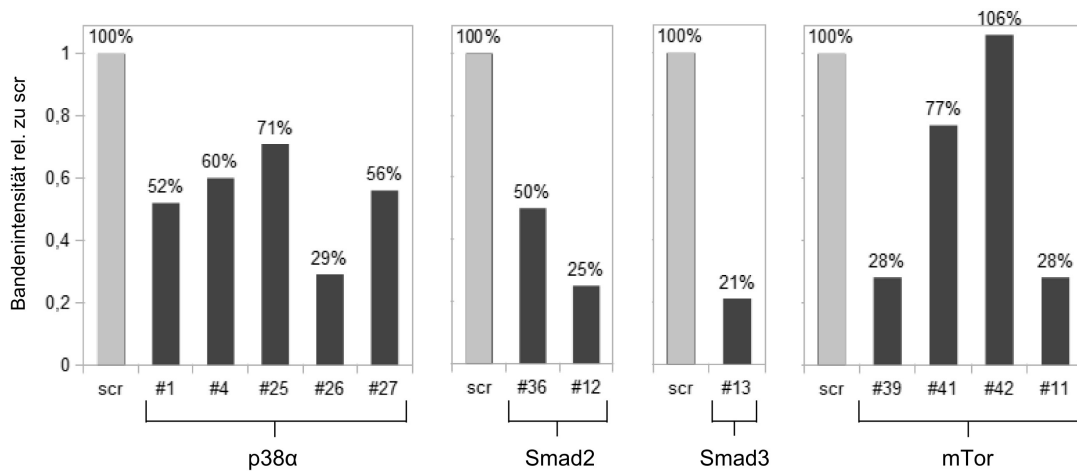


Abbildung 31: Knockdown der Zielproteine nach lentiviraler Transduktion von shRNAs

Der Western Blot aus Abbildung 18 wurde densitometrisch analysiert, mit Aktin normalisiert und in Relation zur Kontrolle (zur Mock-Transduktion) gesetzt. Der Eindruck eines erfolgreichen Knockdowns aus dem Blot wird bestätigt: Für alle shRNAs außer #42 (mTor) ist ein Knockdown nachweisbar und für jedes Zielprotein konnte mit mindestens einer shRNA ein Knockdown auf $\leq 50\%$ der Expression in der Kontrolle erzielt werden. Die shRNA #26 führte zum p38α-Knockdown auf 29 %, die shRNAs #36 bzw. #25 führten zum Knockdown von Smad2 auf 50 % bzw. 25 %, die shRNA #13 führte zum Knockdown von Smad3 auf 21 % und die shRNAs #39 bzw. #28 führten zum Knockdown von mTor auf jeweils 28 %.

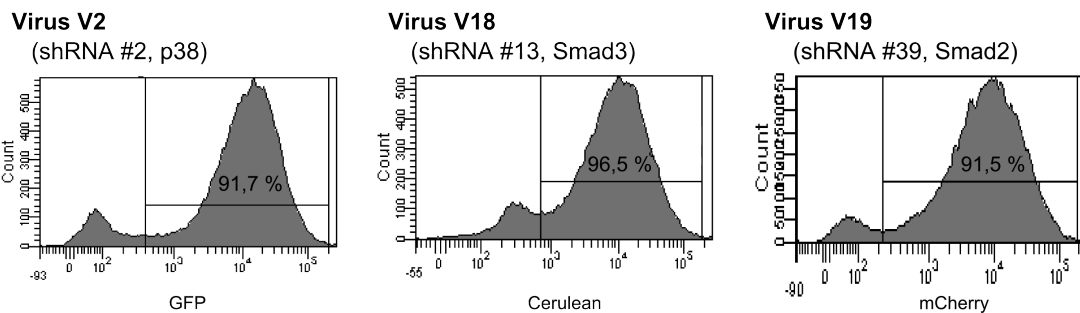


Abbildung 32: Transduktionsraten nach lentiviraler Transduktion

5×10^5 NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit VSV-G-Viren mit einer MOI von 32 transduziert. 5 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen fixiert und durchflusszytometrisch auf die Expression des jeweiligen Fluoreszenzproteins nach erfolgreicher Transduktion analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Virus für die drei verwendeten LeGO-Fluoreszenzproteine: **V2** = GFP (Transduktionsrate 91,7 %), **V18** = Cerulean (Transduktionsrate 96,5 %), **V19** = mCherry (Transduktionsrate 91,5 %)

4.8.4 Zeitverlauf des Knockdowns

Nach dem Knockdown eines Zielproteins muss dieser für eine möglichst lange Zeit erhalten bleiben, um Versuche mit den Knockdown-Zellen durchführen zu können. Zur Untersuchung des Zeitverlaufs wurde der Knockdown über mehrere Tage analysiert. Zeitverläufe wurden ausschließlich nach lentiviraler Transduktion ermittelt, da nur nach Integration der shRNA in das Genom der Zellen mit längerfristiger Expression der shRNAs gerechnet werden kann.

Der Knockdown von p38 α nach lentiviraler Transduktion der shRNA #4 mit einer MOI von 32 ging wie in Abbildung 33 gezeigt innerhalb von 2 Wochen stark zurück. Als Negativkontrolle dienten Zellen nach Transduktion der scramble-shRNA. Abbildung 34 zeigt die densitometrisch ermittelten Bandenintensitäten im Zeitverlauf. Während nach Transduktion der shRNA die p38 α -Bandenintensität innerhalb von 14 Tagen zunahm (ansteigende Proteinmenge), nahm sie im gleichen Zeitraum nach Transduktion der Negativkontrolle sehr stark ab (abfallende Proteinmenge). Die Interpretation dieses Ergebnisses wird in 5.5 ab Seite 79 diskutiert. Letztendlich zeigte sich jedoch ein Verlust des erzielten Knockdowns.

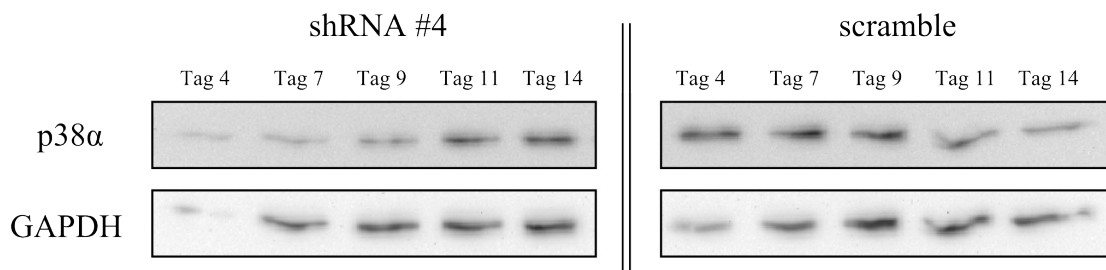


Abbildung 33: Der p38 α -Knockdown ging im Verlauf von 2 Wochen zurück.

5 × 10⁵ NIH/3T3-Fibroblasten wurden an Tag 0 mit einer MOI von 32 einmal transduziert. Es kam die shRNA #4 gegen p38 α zum Einsatz, als Kontrolle diente die scramble-Kontroll-shRNA. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert. Im Abstand von 3 Tagen wurde jeweils ein Teil der Zellen lysiert und im Western Blot auf die p38 α -Expression untersucht. Im Vergleich zur scramble-Kontrolle ist ein Anstieg der p38 α -Expression innerhalb von 14 Tagen auf das Niveau der Kontrolle zu erkennen. In der Kontrolle kam es hingegen zur Abnahme der p38 α -Expression im Zeitverlauf. Abbildung 34 zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

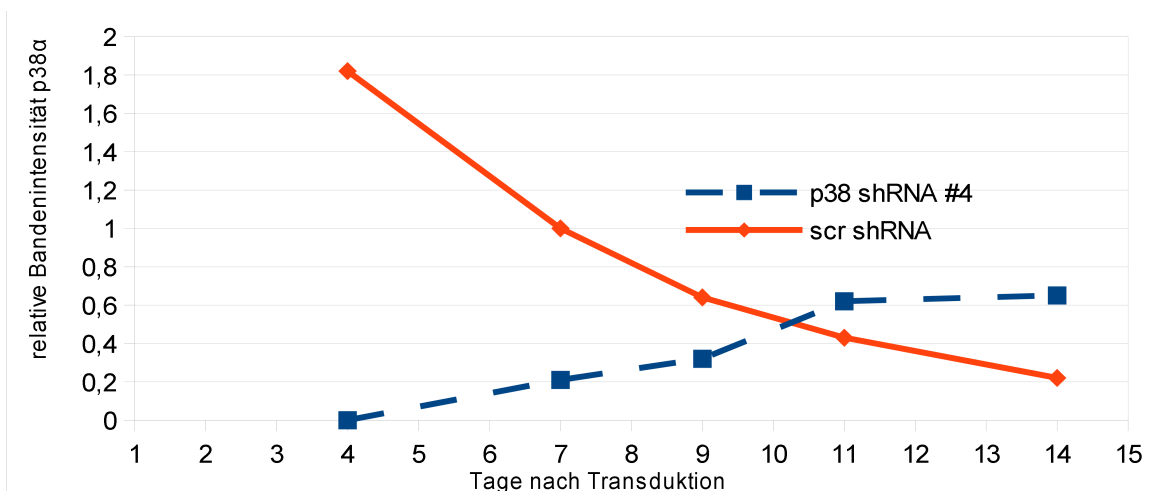


Abbildung 34: Der p38α-Knockdown ging im Verlauf von 2 Wochen verloren.

Der Western Blot in Abbildung 33 wurde densitometrisch analysiert und die p38α-Expression mit Aktin normalisiert. Die relative p38α-Bandenintensität ist im Zeitverlauf aufgetragen (♦). Sie zeigt im Vergleich zur Kontrolle (■) einen Anstieg der p38α-Expression im Verlauf der 14 Tage. Die abfallende p38α-Expression in der Kontrolle bleibt zu diskutieren (siehe 5.5).

Im Verlauf dieser Zeitreihe wurde regelmäßig die GFP-Expression der transduzierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 35 zeigt den Anteil der GFP+ Zellen im Zeitverlauf. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil GFP exprimierender Zellen nach Transduktion der shRNA gegen p38α kontinuierlich abnahm. Zu dieser Abnahme kam es also parallel zum Verlust des Knockdowns. Auch die bei der Durchflusszytometrie bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dieser anteilig abnehmenden GFP exprimierenden Zellen nahm kontinuierlich ab (Abbildung 35). Um die MFI trotz unterschiedlicher Messzeitpunkte vergleichbar zu machen wurde sie mit der MFI der GFP+ Zellen aus der Negativkontrolle normalisiert, die absolute MFI wird hier also relativ zur jeweiligen Kontrolle (scr) des gleichen Tages angegeben. Den Verlauf dieser normalisierten MFI zeigt Abbildung 36 graphisch.

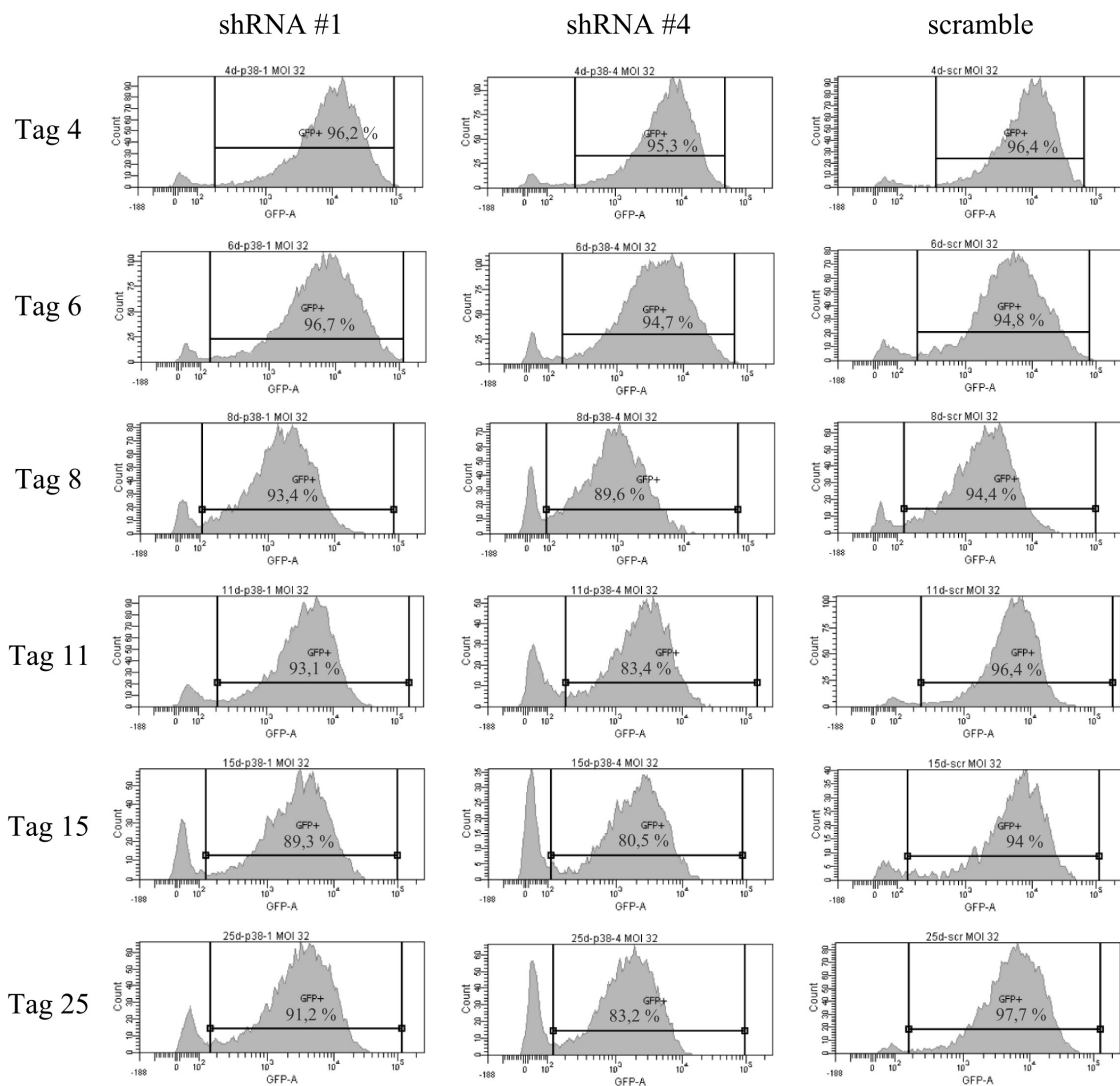


Abbildung 35: Die GFP-Expression erfolgreich transduzierter Zellen nahm im Zeitverlauf ab. 5×10^5 NIH/3T3-Fibroblasten wurden einmalig mit shRNAs gegen p38 α (shRNA #1 bzw. #4) oder mit der scramble-Kontroll-shRNA lentiviral transduziert (MOI 32). Die Zellen wurden regelmäßig passagiert. An den angegebenen Tagen wurde jeweils ein Teil der Zellen fixiert und durchflusszytometrisch auf ihre GFP-Expression untersucht. Im Vergleich zur scramble-Kontrolle kam es nach Transduktion der shRNAs #1 oder #4 zu einer Abnahme der GFP-Expression von ca. 95 % (#1 und #4 an Tag 4) auf bis zu 83 % (#4 an Tag 25). In der Kontrolle war die GFP-Expression stabil.

	MFI #1	MFI #4	<i>MFI scr</i>	$\frac{\text{MFI \#1}}{\text{MFI scr}}$	$\frac{\text{MFI \#4}}{\text{MFI scr}}$
Tag 4	13446	7849	11573	1,16	0,68
Tag 6	11223	6473	8640	1,3	0,75
Tag 8	2207	1298	2673	0,83	0,49
Tag 11	5275	3420	6794	0,78	0,5
Tag 15	4232	2844	8243	0,51	0,35
Tag 25	4666	2143	8315	0,56	0,26

Tabelle 13: Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der erfolgreich transduzierten GFP+ NIH/3T3-Fibroblasten nahm im Zeitverlauf ab.

Die MFI der in Abbildung 35 gezeigten GFP+ Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen und im Zeitverlauf aufgetragen und in Relation zur Kontrolle gesetzt (normalisierte Werte, grau hinterlegt). Nach Transduktion der shRNAs gegen p38 α zeigte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraums von 25 Tagen ein Absinken der normalisierten MFI von 1,16 auf 0,56 (shRNA #1) bzw. von 0,68 auf 0,26 (shRNA #4). Graphisch ist der MFI-Zeitverlauf in Abbildung 36 dargestellt.

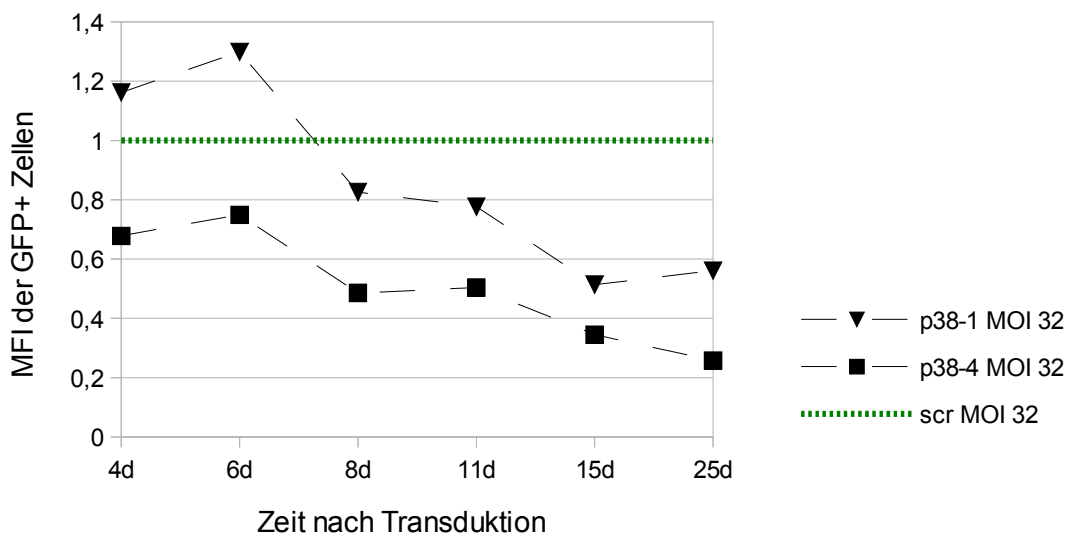


Abbildung 36: Die MFI der erfolgreich transduzierten GFP+ NIH/3T3-Fibroblasten nahm im Zeitverlauf ab.

Die in Tabelle 13 gezeigten normalisierten MFI nach Verwendung der shRNAs #1 und #4 sind im Zeitverlauf aufgetragen. Über den Beobachtungszeitraum von 25 Tagen nach der Transduktion einer shRNA gegen p38 α (shRNA #1 oder #2) ist ein Absinken der normalisierten MFI erkennbar.

Auch der Smad2-Knockdown nach lentiviraler Transduktion einer effektiven shRNA gegen Smad2 ging binnen Tagen verloren. Abbildung 37 zeigt den Knockdown von Smad2 an Tag 4 und an Tag 7 nach Transduktion.

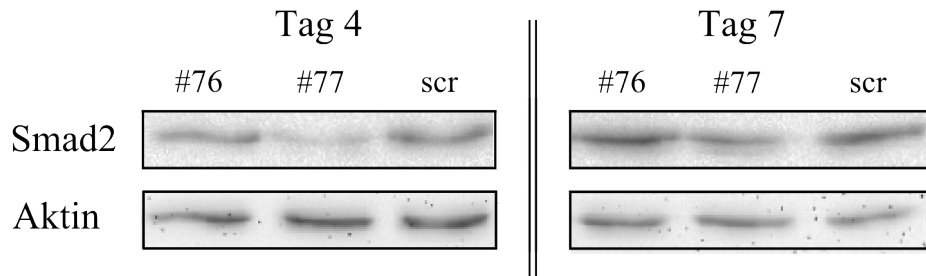


Abbildung 37: Auch der Smad2-Knockdown ging im Verlauf einer Woche zurück. 5×10^5 NIH/3T3-Fibroblasten wurden an Tag 0 mit einer MOI von 32 einmal transduziert. Es kamen die shRNAs #76 und #77 gegen Smad2 zum Einsatz, als Kontrolle diente die scramble-Kontroll-shRNA. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert. An den Tagen 4 und 7 wurde jeweils ein Teil der Zellen lysiert und im Western Blot auf die Smad2-Expression analysiert. Es zeigt sich an **Tag 7** ein Anstieg der Smad2-Expression im Vergleich zum Western Blot an **Tag 4** nach Transduktion..

4.9 Transduktion primärer T-Zellen

Als experimenteller Ausblick auf kommende Versuche sollten einmalig primäre murine T-Zellen transduziert werden. Da diese nicht mit VSV-G-pseudotypisierten Lentiviren transduziert werden können, wurden konzentrierte ecotrope Lentiviren verwendet. Eine weitere Besonderheit ist, dass T-Zellen vor der Transduktion unspezifisch aktiviert werden müssen. Hierfür kamen vergleichend CD3-Antikörper + CD28-Antikörper oder CD3-Beads + CD28-Beads oder Concanavalin A zum Einsatz. Es wurde für die T-Zell-Transduktion ausschließlich der Virus mit der scramble-shRNA und dem Fluoreszenzmarker GFP verwendet.

Mit einer MOI von 100 konnte eine Transduktionsrate von ca. 5 % erreicht werden (Abbildung 38 A), jedoch waren leider über 90 % der Zellen zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie tot (Abbildung 38 B). Dieses Ergebnis war unabhängig von der Aktivierungsart.

Die experimentelle Suche nach shRNAs, die für einen Knockdown der Zielproteine geeignet sind, war durch die Verwendung muriner Fibroblasten unabhängig von der Transduktion von T-Zellen. Die Suche wurde an den NIH/3T3-Fibroblasten fortgeführt, so dass für diese Arbeit keine weiteren Bemühungen angestellt wurden, murine T-Zellen zu transduzieren.

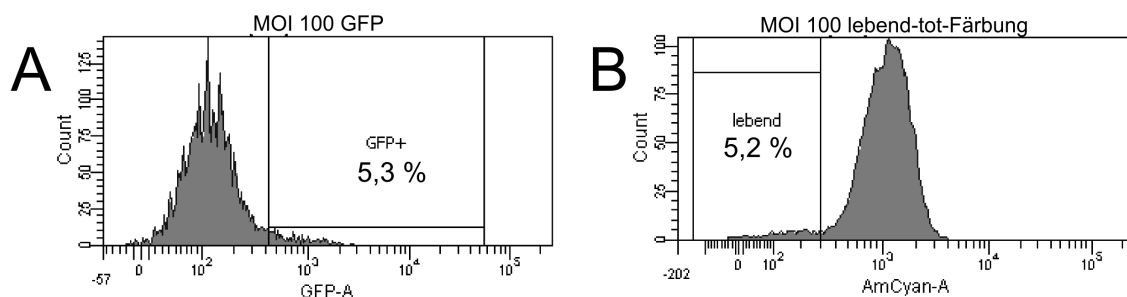


Abbildung 38: Transduktionsrate und Vitalität nach Transduktion primärer T-Zellen

48 h nach Transduktion mit ecotropen Viren mit einer MOI von 100 wurden die Zellen fixiert, die PacO-NHS-Färbung durchgeführt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. **(A):** Erfolgreich transduzierte Zellen exprimierten GFP. Es ist eine Transduktionsrate von 5,3 % ersichtlich. **(B):** In der lebend-tot-Färbung ist eine Vitalität von 5,2 % der Zellen zu erkennen, ca. 95 % der Zellen waren zu diesem Zeitpunkt also tot. Die 5 % lebende Zellen sind nicht die gleiche Population wie die GFP+ Zellen (Gating nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Aktivierung der Kinasen und Smad-Proteine

Nach Stimulation mit hTGF- β konnte in NIH/3T3-Fibroblasten die Phosphorylierung, respektive Aktivierung, aller Zielproteine (p38 α , Smad2, Smad3 und mTor) mittels Western Blot gezeigt werden. Gleichfalls gelang der Nachweis einer Phosphorylierung von Akt, einer Downstream-Kinase von mTor. Der Versuch, die phosphorylierte p38-Downstream-Kinase MAPKAP-Kinase 2 (MAPKAPK2; MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase 2) im Western Blot zu zeigen, gelang nicht. Es wäre wünschenswert gewesen diese Phosphorylierung als Aktivitätsnachweis von p38 nach TGF- β -Stimulation zu zeigen. Nur in der Positivkontrolle, also nach UV-Bestrahlung von Zellen, gelang der Nachweis der phosphorylierten MAPKAPK2. Der Grund für den fehlenden Nachweis kann nur technischer Art sein, da der eingesetzte Antikörper bereits verwendet worden ist um mit erheblich geringeren Proteinmengen die p38-Aktivität nach TGF- β -Stimulation zu zeigen (Huber et al. 2008). Auch der Nachweis der TGF- β -abhängigen p38-Phosphorylierung in primären murinen CD4+ T-Zellen war dort bereits gelungen. In dieser Arbeit hingegen konnte eine TGF- β -abhängige p38-Aktivierung in T-Zellen nicht zuverlässig nachgewiesen werden, vielmehr war eine stimulationsunabhängige Grundaktivität zu erkennen.

5.2 Densitometrie im Western Blot

Die Densitometrie wurde eingesetzt um eine Orientierung zu geben, in welcher Größenordnung ein Knockdown der Zielproteine erreicht wurde. Das Ergebnis dieser densitometrischen Analysen war die Grundlage für die Entscheidung welche shRNAs aus der Vorauswahl aufgrund eines erfolgreichen Knockdowns zu Lentiviren verarbeitet werden sollten und welche shRNAs für zukünftige Experimente erfolgversprechend sind. Des Weiteren wurde die Densitometrie eingesetzt um den Zeitverlauf von Proteinmengen zu verfolgen.

Die Densitometrie von Western Blots zur Quantifizierung von Proteinen ist ein Verfahren mit hoher Fehleranfälligkeit, dessen Ergebnisse stark von den verwendeten Geräten und Methoden abhängig sind (Gassmann et al. 2009). Die für diese Arbeit angefertigten densitometrischen Messungen wurden an Standardreihen überprüft und zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen densitometrischer Bandendichte und Proteinmenge in der Standardreihe. Es darf also bei der hier verwendeten Technik davon ausgegangen werden dass die Messergebnisse valide sind.

Verlass auf einen Knockdown ist jedoch nur dann, wenn er im Western Blot optisch zweifelsfrei erkennbar ist (Gassmann et al. 2009). Nach lentiviraler Transduktion kam es auch in dieser Arbeit mit allen als erfolgreich gewerteten shRNAs zu einem optisch erkennbaren Knockdown. Dieser kann also als gesichert angesehen werden.

5.3 Kein sicherer sichtbarer Knockdown nach Transfektion

Um erfolgversprechende shRNAs gegen p38 α aus der zur Verfügung stehenden Bibliothek herauszufiltern wurden diese zunächst einzeln und einmalig in NIH/3T3-Fibroblasten transfiziert. Ein Knockdown von p38 α nach einmaliger Lipofektion konnte sowohl optisch als auch densitometrisch nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil fiel auf, dass im Zeitraum von 24 h bis 96 h nach Transfektion die Expression von p38 α erhöht war. Dieser Effekt war unabhängig davon ob eine gegen p38 α gerichtete shRNA oder die unspezifische Kontroll-shRNA transfiziert wurde (siehe 4.8.2 auf Seite 63). Die p38 MAP-Kinase gehört zu den Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPKs) (Coulthard et al. 2009), somit könnte diese festgestellte verstärkte Expression als Stressreaktion interpretiert werden. Ob die gemessene p38 α -Erhöhung signifikant gegenüber nicht transfizierten Zellen ist, kann nicht ermittelt werden, da eine nicht transfizierte Kontrolle in Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung nicht untersucht wurde.

Um den Nachweis eines Knockdowns zu vereinfachen wurden identische Zellen mehrfach mit Gemischen aus mehreren shRNAs gegen p38 α transfiziert. Ein systematisch erfolgreicher sichtbarer Knockdown blieb aber auch nach mehrfacher Transfektion aus. Nur vereinzelt kam es zur Detektion sichtbarer Unterschiede im Western Blot. Da die Transfektion jedoch nur alle 3 Tage durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass eine „negative Selektion“ derjenigen Zellen stattgefunden hat, die eine Verringerung der Expression aufwiesen. Im Abschnitt 5.5 („Der Knockdown geht im Zeitverlauf zurück“) ab Seite 79 wird dieses Problem im Detail besprochen. Ein weiterer Grund für den fehlenden Nachweis eines Knockdowns könnte sein, dass nach der Transfektion zu jeder Zeit nur ca. 50 % der Zellen GFP exprimierten, also erfolgreich transfiziert waren. Um einen im Western Blot sichtbaren Effekt zu erzielen hätte also in den transfizierten Zellen ein doppelt so starker Knockdown vorliegen müssen wie bei einer idealen Transfektionsrate von 100 %.

5.4 Erfolgreicher Knockdown nach lentiviraler Transduktion

Die Unterbrechung der Signalkaskaden, zu denen die untersuchten Proteine gehören, ist ein Etappenziel, zu dem diese Arbeit beitragen soll.

Der erste Schritt wurde in diesen Experimenten etabliert: Für jedes der Zielproteine wurde eine, für drei der vier Ziele sogar zwei shRNA gefunden, durch deren Transduktion ein Knockdown in murinen Zellen um mindestens 50 % und um bis zu 80 % erreicht werden konnte.

Als nächster Schritt könnte der Nachweis folgen, dass der Knockdown die Signalkaskade wirklich negativ beeinflusst. Man wird zeigen müssen, dass die Downstream-Kinasen in geringerem Maße phosphoryliert werden oder der zeitliche Verlauf der Downstream-Phosphorylierung anders ist als ohne Knockdown. Im Fall der Smad-Proteine könnte untersucht werden, ob die Translokation in den Kern verspätet oder geringer ausgeprägt verläuft, da die Signaltransduktion nicht über eine Phosphorylierung erfolgt (siehe 1.5 ab S. 8).

5.5 Der Knockdown geht im Zeitverlauf zurück

Der primär erreichte Knockdown der p38 α MAP-Kinase bzw. von Smad2 (Abbildungen 33 und 37) ging binnen 14 Tagen bzw. 7 Tagen in etwa auf das Ausgangsniveau zurück. Gründe hierfür können eine verminderte Transkription der shRNA, eine zelluläre Kompensation im Sinne einer verstärkten Proteinexpression, oder aber eine Selektion derjenigen Zellen sein, in denen der Knockdown weniger erfolgreich war. Genprodukte, die für das Überleben der Zelle essenziell sind, können nicht über einen beliebig langen Zeitraum stillgelegt werden. In einem solchen Fall muss es zur „negativen Selektion“ kommen, da die erfolgreich beeinflussten Zellen untergehen (M. Al-Rubeai 2006). Die MAP-Kinase p38 ist ein essenzielles Genprodukt, da sie neben vielen anderen Aufgaben auch eine Rolle in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose spielt (Ono & Han 2000). Das festgestellte kontinuierliche Absinken der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) spricht ebenfalls für eine stärkere Expansion der weniger gut transduzierten Zellen und für das resultierende „Überwachsen“ der Kultur durch Zellen ohne nennenswerten Knockdown. Diese Tatsache ließe sich durch eine quantitative PCR nachweisen, die die Anzahl der integrierten Kopien im Zeitverlauf zeigen würde.

In Abbildung 34 auf Seite 72 lässt sich der beschriebene Anstieg der p38 α -Proteinmenge vom Knockdown-Niveau zum Ausgangsniveau erkennen. In der Negativkontrolle zeigt sich gegensätzlich hierzu nach Transduktion der unspezifischen Kontroll-(scramble)-shRNA ein Abfallen der p38 α -Menge. Dieser Effekt in der Negativkontrolle lässt sich nicht ursächlich erklären, da er aber genau gegenteilig zur untersuchten shRNA verläuft, lässt

er nicht am Ergebnis zweifeln sondern bekräftigt dieses durch Verstärkung des absoluten Unterschiedes. Als Erklärung kann möglicherweise die in 5.3 beschriebene p38-Stressreaktion dienen.

5.6 Positive Ergebnisse nur in NIH/3T3-Fibroblasten

Zur Bestimmung der Effektivität der verschiedenen shRNAs wurden NIH/3T3-Fibroblasten verwendet. Dafür gibt es mehrere Gründe. Eine Zelllinie ist im Vergleich zu primären Zellen einfacher zu handhaben, robuster, günstiger, und die Zellen stehen zu jedem Zeitpunkt in fast beliebiger Zahl zur Verfügung. Außerdem ist die Transfektion und Transduktion effektiver. Da somit höhere Transfektionsraten erzielt werden können erübrigt sich eine präanalytische Sortierung oder Selektionierung der Zellen (z. B. durch FACS oder Zytostatika). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Zelllinien ist, dass im Gegensatz zu primären Zellen keine Mäuse für die wiederholte Gewinnung getötet werden müssen.

Der Nachteil der Verwendung dieser Zelllinie ist, dass die Ergebnisse nur teilweise auf primäre T-Zellen übertragbar sind, da es sich zwar auch um murine Zellen aber um ein anderes Gewebe handelt. Primäre T-Zellen sind schwierig zu transduzieren und müssen mit ecotropen Lentiviren transduziert werden (T. Zhang et al. 2003), während die Fibroblasten-Zelllinie mit VSV-G-pseudotypisierten Viren transduziert wurde.

5.7 Aktueller Kontext: RNA-Interferenz in primären murinen T-Zellen

Der letzte Versuch dieser Arbeit war die Transduktion primärer T-Zellen. Diese gelang nicht. Es konnten nur 5 % der Zellen transduziert werden und 95 % aller Zellen waren binnen 2 Tagen nach der Transduktion tot. Die Infektiosität der ecotropen Lentiviren war gegeben, wie erfolgreiche Tests an NIH/3T3-Fibroblasten gezeigt hatten. Die Gründe für das Scheitern an T-Zellen können vielfältig sein: Mangelhafte Aktivierung der Zellen (Stevenson 2001), ein zu geringer Titer der Viren, negative Einflüsse des verwendeten Polybrens oder eine zu starke Vereinzelnung der T-Zellen für die Transduktion können für die niedrige Vitalität verantwortlich sein. Ob die geringe Transduktionsrate eine Folge mangelhafter Infektion und Virusintegration, oder aber nur Ausdruck einer fehlenden Expression beim Zelltod nach erfolgreicher Transduktion ist, muss ebenfalls systematisch untersucht werden um letztendlich eine erfolgreiche lentivirale Transduktion der shRNAs zu ermöglichen.

Von verschiedenen Autoren ist in der Vergangenheit bereits gezeigt worden, dass es möglich ist, T-Zellen mit ecotropen Lentiviren zu transduzieren um Transgene einzubringen und sie für weitere Untersuchungen - auch in vivo - zu nutzen (Derynck & Y.

E. Zhang 2003; Hansen et al. 2000; Rubinson et al. 2003). Diese publizierten Ergebnisse lassen es machbar erscheinen T-Zellen auch mit shRNAs gegen Proteinkinasen zu beeinflussen.

5.8 Aktueller Kontext: In vivo-Versuche mit transduzierten T-Zellen

Für in vitro-Versuche haben sich reversible Inhibitoren wie der p38-Inhibitor SB203580 bewährt (Huber et al. 2008). Eine systemische Gabe an Mäuse ist durchaus möglich und wurde beispielsweise für den systemischen Lupus erythematodes (SLE), eine Autoimmunerkrankung, untersucht (Jin et al. 2011). Dieser Inhibitor wirkt wenn in vivo angewendet jedoch unspezifisch auf alle Gewebe und nicht selektiv auf T-Zellen, weshalb Ergebnisse schwierig zuzuordnen sind (Ono & Han 2000).

Wegen dieser Einschränkungen bietet sich die RNA-Interferenz an um die Funktion bestimmter Genprodukte von T-Zellen in vivo für kurze Zeiträume (z. B. 48 h) zu untersuchen. Als Mittel zum Knockdown können siRNAs eingesetzt werden, wodurch der Knockdown schneller einsetzt aber nicht stabil ist (Gust et al. 2008). Erfolgreiche Anwendungen wurden veröffentlicht: 2003 infizierten Rubinson et al. periphere isolierte T-Zellen mit einer shRNA, in diesem Fall gegen den CD8-Oberflächenmarker. Der Nachweis einer CD8-Reduktion um > 90 % gelang noch nach 14 Tagen (Rubinson et al. 2003). Es ist auch möglich, hämatopoetische Stammzellen mit shRNAs zu transduzieren um in den daraus hervorgehenden Lymphozyten einen Knockdown zu erreichen. Eine solche Transduktion mit einer shRNA gegen CD8 zeigte nach 8 Wochen eine Reduktion der CD8+ Population um 90 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Rubinson et al. 2003). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Anwendung von shRNAs einen Beobachtungszeitraum von einigen Wochen ermöglicht.

Noch länger könnte der Beobachtungszeitraum nach der stabilen Integration von shRNAs in das Genom transduzierter Zellen sein, er würde nämlich durch die Lebensdauer der manipulierten Zellen bestimmt. Für in vivo-Langzeitversuche mit lentiviral genetisch veränderten Zellen ist es wichtig, dass der Knockdown der Kinasen stabil ist, denn das soll der Vorteil gegenüber reversiblen Inhibitoren oder siRNAs sein. Ein adaptiver Transfer von mit SB203580 behandelten T-Zellen ist durch die geringe Halbwertszeit von SB203580 von 1 bis 3,5 h (Ward et al. 2001) nicht erfolgversprechend. Auch siRNAs können keinen langfristigen Effekt vermitteln da sie bei der Zellteilung zwischen den Tochterzellen aufgeteilt („verdünnt“), und außerdem gemeinsam mit der Ziel-mRNA abgebaut werden (Rao et al. 2009).

Aus den Ergebnissen an NIH/3T3-Fibroblasten lässt sich bereits ableiten, dass ein einmaliger Nachweis eines erfolgreichen Knockdowns nicht ausreichend ist, um von einem gelungenen stabilen Knockdown zu sprechen. Vielmehr muss gezeigt werden, dass ein Knockdown über den gesamten Untersuchungszeitraum gewährleistet ist. Da ein direkter Nachweis (Western Blot) in vivo nicht möglich ist, muss man sich in der Durchflusszytometrie auf die Fluoreszenz durch das auf dem Vektor kodierte Fluoreszenzprotein als Surrogatparameter der Expression der shRNA verlassen. In dieser Arbeit ist eine Korrelation zwischen MFI und Knockdown erahnbar, diese Korrelation sollte für zukünftige Experimente jedoch systematisch überprüft werden.

5.9 Ausblick

Die Unterbrechung der Signalkaskaden durch den Knockdown einzelner Schritte dieser Kaskaden ist ein Etappenziel, zu dem diese Arbeit beitragen sollte. Der Knockdown in murinen Fibroblasten wurde erreicht. Der nächste Schritt ist der Nachweis, dass eine Unterbrechung der Signalketten in T-Zellen mit diesen shRNAs erreicht werden kann. Danach können Langzeit-in-vivo-Untersuchungen zur Bedeutung der einzelnen Signalwege bei der Konversion von naiven zu regulatorischen T-Zellen oder bei der Funktionsausübung der regulatorischen T-Zellen folgen.

Es ist gezeigt worden, dass die hier untersuchten Kinasen und Smad-Proteine eine wichtige Rolle bei der Konversion zu regulatorischen T-Zellen und bei deren Funktion spielen (Huber et al. 2008; Y. Tone et al. 2008; Sauer et al. 2008). Es ist jedoch zu beachten, dass die meisten Experimente für diese Veröffentlichungen in vitro durchgeführt wurden. Für das Verständnis der Ätiologie von Krankheitsbildern und des Einflusses der iT_{reg} auf diese Krankheiten ist es von großer Wichtigkeit, ein in-vivo-System zur Verfügung zu haben, mit dem die iT_{reg} -Einflüsse moduliert werden können. Sowohl eine Steigerung als auch eine gesteuerte Erniedrigung von TGF- β -abhängiger Konversion und Funktionalität sind wünschenswerte Werkzeuge für die zukünftige Forschung. Für diese Modulation der iT_{reg} -Konversion bietet sich ein adaptiver Transfer von T-Zellen an, deren hier untersuchte Kinasen durch lentivirale Transduktion von shRNAs in verschiedenem Maße stillgelegt wurden. Ein selektives Ausschalten einzelner Signalwege in T-Zellen könnte die Frage beantworten, welcher gestörte Signalweg eine Imbalance zwischen Immunität und Toleranz verursachen kann – beispielsweise im Sinne einer Autoimmunerkrankung.

Vergleichbare Versuche mit einer präzisen Aussage sind, am Beispiel von p38, mit einer systemischen Gabe der bisher verfügbaren reversiblen Hemmstoffe (z. B. SB203580 oder SB202190) unmöglich, da p38 ubiquitär verbreitet ist und verschiedenste teils essenzielle Funktionen übernimmt (Coulthard et al. 2009; Ono & Han 2000).

Es ist jedoch fraglich ob essenzielle Proteine wie p38 in T-Zellen mittels shRNA überhaupt dauerhaft ausgeschaltet werden können ohne den Zelltod zu induzieren. Die Hemmung der Aktivität von p38 durch einen Inhibitor zeigt für den Zeitraum von 4 Tagen, dass die Proliferation von T-Zellen durch die verminderte p38-Aktivität in vitro nicht eingeschränkt ist (Huber et al. 2008). Bisher fehlen jedoch für längere Zeiträume entsprechende Daten.

Wenn der Versuch gelingt, in vivo-Experimente mit Knockdown-T-Zellen durchzuführen, ist es denkbar verschiedene shRNAs auf LeGO-Vektoren mit jeweils unterschiedlichem Fluoreszenzprotein zu kombinieren um so Wechselwirkungen oder Kompensationseffekte zwischen verschiedenen Kinasen zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) vermitteln zelluläre Toleranz und spielen eine große Rolle in der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Immunabwehr und Toleranz gegenüber Antigenen. Induzierte Treg (iT_{reg}) sind eine Unterform der T_{reg} . Diese iT_{reg} werden aus naiven T-Zellen in der Peripherie durch Antigen-Präsentation in einem tolerogenen Kontext konvertiert. Ein wichtiger Bestandteil dieses tolerogenen Kontextes ist das Zytokin TGF- β , dessen Signalwirkung über den TGF- β -Rezeptor zur Konversion dieser Zellen zu iT_{reg} führt und auch für die Aufrechterhaltung der Funktion der iT_{reg} notwendig ist. Verschiedene Signalkaskaden vermitteln die Wirkung des TGF- β in T-Zellen. Manipulationen an den Signalkaskaden in Mausexperimenten, beispielsweise die Inhibition von Kinasen durch Inhibitoren, modulieren somit die Anzahl und Funktionalität der iT_{reg} . Beispielsweise vermindert die Inhibition der MAP-Kinase p38 die Konversion zu iT_{reg} , die Inhibition der Kinase mTor verstärkt die Konversion. Limitierend sind hierbei die Halbwertszeit und die eingeschränkte in vivo-Anwendbarkeit der Inhibitoren. Mittels RNA-Interferenz sind in vivo-Langzeitversuche in Hinblick auf die Konversion von T-Zellen zu iT_{reg} denkbar. Wenn eine shRNA durch lentivirale Transduktion dauerhaft in das Genom einer T-Zelle integriert wird, können z. B. TGF- β -abhängige Kinasen dauerhaft in dieser T-Zelle und allen aus ihr hervorgehenden T-Zellen stillgelegt werden (Knockdown).

Für diese Arbeit wurden Zellen der murinen NIH/3T3-Fibroblastenlinie verwendet um zunächst ohne primäre T-Zellen aber zumindest mit Zellen der gleichen Spezies arbeiten zu können. Es konnte nachgewiesen werden, dass die MAP-Kinase p38, der Kinase mTor und die beiden Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3 durch exogenes TGF- β aktiviert werden. Anschließend wurde für jedes der genannten Proteine mindestens eine shRNA identifiziert, die einen Knockdown des Proteins um mindestens 50 % im Vergleich zur Kontrolle vermittelt. Im Zeitverlauf hielt der Knockdown von p38 und Smad2 bis zu zwei Wochen an. Als Vektorsystem für die lentivirale Transduktion wurden für alle shRNAs LeGO-Vektoren mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen verwendet, die eine einfache Transduktionskontrolle sowie eine Kombination mehrerer shRNAs erlauben.

Diese Arbeit stellt einen Schritt auf dem Weg zum dauerhaften Knockdown von TGF- β -abhängigen Kinasen mittels lentiviral transduzierter shRNAs in T-Zellen dar. Diskutiert werden die Aussichten einen dauerhaften Knockdown zu erreichen und die Möglichkeiten, die derlei Experimente heute bieten und zukünftig bieten könnten.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kalium-Puffer
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	bicinchoninic acid = Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	double stranded RNA = Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting = fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	fetal calve serum = fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Fluoreszenzprotein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEK 293	human embryonal kidney 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
hTGF- β	human tissue growth factor β
hU6	humaner U6(-Promoter)
(h)IL-2	(humanes) Interleukin-2
iT _{reg}	induzierte regulatorische T-Zelle
kbp	Kilo-Basenpaare = 1000 Basenpaare
LB	Luria broth
LeGO	Lentiviral Gene Ontology
MAPK	MAP-Kinase; mitogenaktivierte Kinase
MAPKAPK2	MAP-Kinase-aktivierte-Proteinkinase 2
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA = Boten-RNA
mTor	mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nT _{reg}	natürliche regulatorische T-Zelle
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RHS	retikulohistiozytäres System
RISC	RNAi silencing complex
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

S2	Schutzstufe 2
SAPK	stress activated protein kinase = Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
shRNA	small hairpin RNA = kleine Haarnadel-RNA
siRNA	small interfering RNA = kleine interferierende RNA
SLE	systemischer Lupus erythematoses
Smad	mothers against decapentaplegic, drosophila, homolog of
SOB	super optimal broth
SOC	super optimal + carbon
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS/T	Tris buffered saline / Tween® = Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®
T _{eff}	Effektor-T-Zelle
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	tissue growth factor β
TRC	The RNAi Consortium
TRCN	The RNAi Consortium number
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VE-Wasser	vollentsalzenes Wasser
VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Geräte	19
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	21
Tabelle 3: Inhibitoren im Lysispuffer	27
Tabelle 4: Zusammensetzung der nicht polymerisierten Gele für die SDS-PAGE	28
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für den Western Blot	30
Tabelle 6: Verwendete LeGO-Vektoren und ihre Fluoreszenzproteine	32
Tabelle 7: Einzelkomponenten der 25 µl PCR-Reaktion	34
Tabelle 8: PCR-Primer	34
Tabelle 9: Verwendete shRNAs	39
Tabelle 10: Verwendete Lentiviren und erzielte Titer	56
Tabelle 11: Abweichung der densitometrisch gemessenen Bandendichte	61
Tabelle 12: p38 α -Knockdown nach mehrmaliger Lipofektion von shRNA-Mischungen ...	66
Tabelle 13: Die MFI der transduzierten NIH/3T3-Fibroblasten im Zeitverlauf	74

Abbildungen

Abbildung 1:	Schematische Einteilung der Lymphozyten mit Unterpopulationen der T-Zellen (modifiziert nach Jäger & Kuchroo 2010)	6
Abbildung 2:	Entwicklung der regulatorischen T-Zellen und T-Helferzellen	8
Abbildung 3:	Signalwege des TGF- β -Rezeptors	9
Abbildung 4:	Prozessierung von shRNA	11
Abbildung 5:	siRNA (schematische Darstellung)	12
Abbildung 6:	Densitometrie im Western Blot	31
Abbildung 7:	Klonierung der shRNA in den LeGO-Vektor	33
Abbildung 8:	Gating nach Durchflusszytometrie zur Bestimmung des lentiviralen Titers	41
Abbildung 9:	Phosphorylierung von p38 und MAPKAPK2 in NIH/3T3 nach UV-Bestrahlung	46
Abbildung 10:	Phosphorylierung von p38 α , S6-Kinase und Smad2 durch TGF- β in NIH/3T3	47
Abbildung 11:	Phosphorylierung von Smad3 durch TGF- β in NIH/3T3	47
Abbildung 12:	Phosphorylierung von p38 und MAPKAPK2 in Jurkat-T-Zellen nach UV-Bestrahlung	48
Abbildung 13:	Reinheit und Vitalität der CD4+ Zellen nach Isolation aus Mäusemilzen	50
Abbildung 14:	Smad2-Aktivierung nach TGF- β -Stimulation in CD4+ T-Zellen	51
Abbildung 15:	Unspezifische p38-Aktivierung in CD4+ T-Zellen,	51
Abbildung 16:	eGFP exprimierende NIH/3T3-Fibroblasten nach Lipofektion	52
Abbildung 17:	Optimale Lipofektionsdauer für NIH/3T3-Fibroblasten	53
Abbildung 18:	Optimale Menge Lipofectamine® LTX für die Transfektion von NIH/3T3-Fibroblasten	54
Abbildung 19:	Titration vor (links) und nach (rechts) PEG-Präzipitation am Beispiel von Virus 9	57
Abbildung 20:	Titration vor (links) und nach (rechts) Hochgeschwindigkeits-zentrifugation	58
Abbildung 21:	Transduzierte NIH/3T3-Fibroblasten	59
Abbildung 22:	Protein-Standardreihe im Western Blot	61
Abbildung 23:	Abweichung der densitometrisch gemessenen Bandendichte vom Mittelwert	62

Abbildung 24: Densitometrische Bandendichte und wahre Proteinmenge korrelieren linear.	62
Abbildung 25: Einmalige Lipofektion von NIH/3T3-Fibroblasten mit einzelnen shRNAs gegen p38 α	63
Abbildung 26: Densitometrie für p38 α nach einmaliger Transfektion mit shRNAs gegen p38 α	64
Abbildung 27: p38-Knockdown nach mehrmaliger Lipofektion von NIH/3T3- Fibroblasten mit mehreren shRNAs	65
Abbildung 28: p38 α -Knockdown nach mehrmaliger Lipofektion von shRNA- Plasmid-Mischungen	66
Abbildung 29: Wiederholte Transfektionen führten nicht zur Steigerung der Transfektionsrate.	67
Abbildung 30: Knockdown der Zielproteine nach lentiviraler Transduktion von shRNAs	69
Abbildung 31: Knockdown der Zielproteine nach lentiviraler Transduktion von shRNAs	70
Abbildung 32: Transduktionsraten nach lentiviraler Transduktion	70
Abbildung 33: Der p38 α -Knockdown ging im Verlauf von 2 Wochen zurück.	71
Abbildung 34: Der p38 α -Knockdown ging im Verlauf von 2 Wochen verloren.	72
Abbildung 35: Die GFP-Expression erfolgreich transduzierter Zellen nahm im Zeitverlauf ab.	73
Abbildung 36: Die MFI der erfolgreich transduzierten GFP+ NIH/3T3-Fibroblasten nahm im Zeitverlauf ab.	74
Abbildung 37: Auch der Smad2-Knockdown ging im Verlauf einer Woche zurück.	75
Abbildung 38: Transduktionsrate und Vitalität nach Transduktion primärer T-Zellen	76

9 Literaturverzeichnis

- Araki, K. et al., 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, 460(7251), pp.108–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2710807&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2011].
- Battaglia, M., Stabilini, A. & Roncarolo, M.-G., 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*, 105(12), pp.4743–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746082> [Accessed August 16, 2012].
- Bernard, D.J., 2004. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse gonadotrope cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(3), pp.606–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701940> [Accessed January 2, 2012].
- Brusko, T.M., Putnam, A.L. & Bluestone, J. a, 2008. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunological reviews*, 223, pp.371–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613848>.
- Bushman, F.D., 2001. Integration Site Selection by Lentiviruses: Biology and Possible Control. *Lentiviral Vectors*, pp.165–177.
- Chen, C.A. & Okayama, H., 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques*, 6(7), pp.632–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3273409> [Accessed August 1, 2012].
- Claman, H.N., Chaperon, E.A. & Triplett, R.F., 1966. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 122(4), pp.1167–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5918139> [Accessed February 10, 2013].
- Cooper, M.D. & Alder, M.N., 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), pp.815–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497590> [Accessed February 1, 2013].
- Coulthard, L.R. et al., 2009. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 15(8), pp.369–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665431>.

- Curotto de Lafaille, M. a & Lafaille, J.J., 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30(5), pp.626–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464985>.
- Dai, F. et al., 2010. Coupling of dephosphorylation and nuclear export of smads in tgf-Beta signaling. P. J. Higgins, ed. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 647, pp.125–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694664> [Accessed August 17, 2010].
- Derynck, R. & Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958), pp.577–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534577>.
- Van der Eb, A.J. et al., 1977. Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene*, 2(3-4), pp.115–132.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–11.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(4), pp.330–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612578> [Accessed August 15, 2012].
- Gao, W. et al., 2007. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(7), pp.1722–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17511761> [Accessed July 17, 2012].
- Gassmann, M. et al., 2009. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 30(11), pp.1845–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517440> [Accessed March 14, 2012].
- Gust, T.C. et al., 2008. RNA interference-mediated gene silencing in murine T cells: in vitro and in vivo validation of proinflammatory target genes. *Cell communication and signaling: CCS*, 6, p.3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2517589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 29, 2012].

- Hansen, G. et al., 2000. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 105(1), pp.61–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=382583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 29, 2012].
- Huber, S. et al., 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(11), pp.6526–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557141> [Accessed August 10, 2010].
- Huber, S. et al., 2008. P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25- T cells into iTreg. *PLoS one*, 3(10), p.e3302. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2553190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 9, 2010].
- Jäger, a & Kuchroo, V.K., 2010. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology*, 72(3), pp.173–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3129000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 10, 2013].
- Janeway, C. a & Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20(2), pp.197–216. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602> [Accessed January 28, 2013].
- Jin, N. et al., 2011. The selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580, improves renal disease in MRL/lpr mouse model of systemic lupus. *International immunopharmacology*, 11(9), pp.1319–26. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.015> [Accessed July 24, 2012].
- Jinlian, L., Yingbin, Z. & Chunbo, W., 2007. p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. *Journal of biomedical science*, 14(3), pp.303–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334833> [Accessed February 26, 2013].
- Kurreck, J., 2009. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(8), pp.1378–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153977> [Accessed July 23, 2012].

- Li, L. et al., 2006. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nature immunology*, 7(11), pp.1157–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013388> [Accessed January 2, 2012].
- Liu, V.C. et al., 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(5), pp.2883–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312132> [Accessed August 16, 2012].
- M. Al-Rubeai, M.F., 2006. *Systems Biology* 1st ed., Springer Verlag, Luxemburg/Hamburg.
- McManus, M.T. & Conklin, D.S., 2003. shRNA-mediated Silencing of Mammalian Gene Expression. In G. J. Hannon, ed. *RNAi: A Guide to Gene Silencing*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 448.
- Mülhardt, C., 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-8274-2158-6> [Accessed July 21, 2012].
- Neumann, J., 2008. *Immunbiologie* J. Neumann, ed., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-72569-5> [Accessed February 10, 2013].
- Onizuka, S. et al., 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research*, 59(13), pp.3128–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397255> [Accessed August 7, 2012].
- Ono, K. & Han, J., 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular signalling*, 12(1), pp.1–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676842>.
- Perfetto, S.P. et al., 2006. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 313(1-2), pp.199–208. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756987> [Accessed March 8, 2013].
- Rao, D.D. et al., 2009. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews*, 61(9), pp.746–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389436> [Accessed July 17, 2012].

- Rizzo, M.A. et al., 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature biotechnology*, 22(4), pp.445–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990965> [Accessed May 5, 2013].
- Roelz, R. et al., 2010. Of mice and men: human RNA polymerase III promoter U6 is more efficient than its murine homologue for shRNA expression from a lentiviral vector in both human and murine progenitor cells. *Experimental hematology*, 38(9), pp.792–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685233> [Accessed August 26, 2010].
- Root, D.E. et al., 2006. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nature methods*, 3(9), pp.715–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929317> [Accessed March 1, 2012].
- Rubinson, D. a et al., 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature genetics*, 33(3), pp.401–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12590264> [Accessed July 16, 2012].
- Sakaguchi, S et al., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(3), pp.1151–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184> [Accessed August 9, 2012].
- Sakaguchi, Shimon, 2010. Immunology: Conditional stability of T cells. *Nature*, 468(7320), pp.41–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048753> [Accessed November 10, 2010].
- Sauer, S. et al., 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), pp.7797–802. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schambach, A. et al., 2006. Lentiviral vectors pseudotyped with murine ecotropic envelope: increased biosafety and convenience in preclinical research. *Experimental hematology*, 34(5), pp.588–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647564> [Accessed July 29, 2012].

- Schneider, U., Schwenk, H.-U. & Bornkamm, G., 1977. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 19(5), pp.621–626. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910190505> [Accessed August 13, 2012].
- Schramm, C. et al., 2004. TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *International immunology*, 16(9), pp.1241–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249539>.
- Schwarz, K., Fugmann, S.D. & Pannicke, U., 1999. Angeborene Immundefekte.
- Shaner, N.C. et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), pp.1567–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558047> [Accessed March 11, 2013].
- Siomi, H. & Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), pp.396–404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158785> [Accessed July 13, 2012].
- Stevenson, M., 2001. Molecular biology of lentivirus-mediated gene transfer. *Lentiviral Vectors*, pp.1–31.
- Stoop, J.N. et al., 2005. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(4), pp.771–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15791617> [Accessed August 16, 2012].
- Thornton, A.M. et al., 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(7), pp.3433–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181882>.
- Todaro, G.J. & Green, H., 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*, 17(6), pp.299–313. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2106200&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 29, 2012].
- Tone, Y. et al., 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology*, 9(2), pp.194–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157133> [Accessed August 19, 2010].

- Tsien, R Y, 1998. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67, pp.509–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759496> [Accessed March 11, 2013].
- Villarino, A. V et al., 2011. Posttranscriptional Silencing of Effector Cytokine mRNA Underlies the Anergic Phenotype of Self-Reactive T Cells. *Immunity*, 34(1), pp.50–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21236706> [Accessed January 18, 2011].
- Ward, K.W. et al., 2001. Preclinical pharmacokinetics of SB-203580, a potent inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 31(11), pp.783–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11765141> [Accessed July 29, 2012].
- Weber, K. et al., 2008. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(4), pp.698–706. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362927>.
- Whitcomb, J.M. & Hughes, S.H., 1992. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annual review of cell biology*, 8, pp.275–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1282352> [Accessed August 1, 2012].
- Zhang, T., Tsang, T.C. & Harris, D.T., 2003. Efficient transduction of murine primary T cells requires a combination of high viral titer, preferred tropism, and proper timing of transduction. *Journal of hematotherapy & stem cell research*, 12(1), pp.123–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12662443> [Accessed March 30, 2011].
- Zhang, X et al., 2001. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(8), pp.4245–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591746> [Accessed August 9, 2012].

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ansgar Lohse für die Möglichkeit die Experimente für diese Arbeit im Labor seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Außerdem gewährten er und das Graduiertenkolleg des SFB 841 von UKE und DFG mir ein Stipendium über 12 Monate, das mir die Anfertigung dieser Dissertation in Vollzeitarbeit ermöglichte. Dafür bin ich außerordentlich dankbar. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Boris Fehse und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe bei der Herstellung von Lentiviren und die Bereitstellung des S2-Labors.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Schramm, der mir als Betreuer mit großer Unterstützung und Vertrauen ein selbständiges Arbeiten ermöglichte, und dabei zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen und Ideen hatte.

Auch für die Unterstützung von Herrn PD Dr. Johannes Herkel, der immer bereitwillig für Fragen zur Verfügung stand, möchte ich mich bedanken.

Ohne die tägliche Hilfe von Dr. Dorothee Schwinge wäre mir der Einstieg in die Laborarbeit schwerlich gelungen, und bis zum letzten Tag der Laborarbeit und darüber hinaus war sie meine erste Ansprechpartnerin. Für ihre Geduld bei der Vermittlung wissenschaftlichen Denkens und praktischer Fähigkeiten bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Boris Fehse stand mir Dr. Kristoffer Riecken (geb. Weber) als gleichermaßen geforderter Ansprechpartner zur Verfügung, wofür ich mich auch bei ihm herzlich bedanke.

Besonders viel Unterstützung bei den Western Blots und der zeitintensiven Klonierung erhielt ich von Martina Fahl und Marko Hilken, die mir mit viel Geduld und Fachkompetenz zur Seite standen. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Eigentlich müsste ich jeder Mitarbeiterin und jedem Mitarbeiter im Labor namentlich danken, denn die vielen alltäglichen kleinen und großen Hilfen von allen haben die Arbeit im Labor zu einer wirklich angenehmen und produktiven Zeit gemacht.