



**Identifizierung von durch PI3K-Inhibition induzierten
Spleißvarianten in T-Zellen mittels Exon Array und
die Effekte funktionell relevanter Gene auf
T-Zell-Funktionen und Viabilität**

**Identification of splice variants in response to PI3K inhibition
in T cells using an Exon Array approach and
effects of functional relevant genes on
key T cell functions and viability**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: IRTG 1522

Vorgelegt von

Alice Felicitas Rein
geb. Riedel
aus Bayreuth

Würzburg, Juli 2014

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

2. Betreuer: PD Dr. Gabriele Pradel

3. Betreuer: Prof. Dr. Nicola Mulder

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

*für Christian, Justin, Lucie
und meine Eltern*

„Es sind die *Begegnungen* mit Menschen,
die das Leben lebenswert machen.“

Guy de Maupassant (1850-1893)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Masernvirus	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Klinik und Pathogenese.....	2
1.1.3 Morphologie und virale Proteine.....	2
1.1.4 Genom und Replikation	4
1.2 Masernvirus-induzierte Immunsuppression.....	4
1.3 Masernvirus-induzierte PI3K-Inhibition.....	6
1.4 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg	6
1.5 Spleißreaktion eukaryotischer prä-mRNA	8
1.5.1 Spleißmechanismus	9
1.5.2 Alternatives Spleißen.....	10
1.5.3 Regulation des Spleißens.....	12
1.6 Vorarbeiten zu dieser Arbeit.....	13
1.6.1 Generierung der mRNAs für den Exon Array	13
1.6.2 Prozessierung der im Exon Array gewonnenen Daten	14
1.7 Fragestellung	14
2 Material	16
2.1 Verwendete Organismen	16
2.1.1 Zelllinien	16
2.1.2 Primäre Zellen	16
2.1.3 Kompetente Bakterien	16
2.2 Viren.....	17
2.3 Nukleinsäuren	17
2.3.1 Expressionsvektor pEGFP-N1.....	17
2.3.2 Primer	17
2.3.3 siRNA	23
2.4 Größenstandards	23
2.5 Medien und Zusätze.....	23
2.5.1 Eukaryotische Zellen	23
2.5.2 Bakterien	24
2.6 Puffer und Lösungen.....	24

2.7 Enzyme und Reaktionspuffer	27
2.8 Antikörper und Farbstoffe.....	27
2.9 Zytokine	28
2.10 Kits.....	28
2.11 Chemikalien	28
2.12 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial.....	29
2.13 Geräte	30
2.14 Software.....	30
3 Methoden.....	31
3.1 Zellkultur und -isolation	31
3.1.1 Zellkultur von Suspensionszellen	31
3.1.2 Zellkultur adhärenter Zelllinien	31
3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	31
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
3.1.5 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	32
3.1.6 Generierung humaner dendritischer Zellen aus Monozyten	32
3.1.7 Anreicherung primärer T-Zellen mittels Nylonwolle	32
3.2 Virologische Methoden.....	33
3.2.1 Anzucht von Viren	33
3.2.2 Bestimmung des Virustiters TCID50.....	33
3.2.3 Virusaufreinigung durch Ultrazentrifugation.....	34
3.2.4 T-Zell-Inhibition durch inaktiviertes Virus.....	35
3.3 Exon Array - Microarray auf Exonebene	36
3.3.1 Qualitätskontrolle der RNA-Proben	36
3.3.2 Durchführung des GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array.....	37
3.3.3 Prozessierung der Exon Array Rohdaten	39
3.3.4 Charakterisierung alternativ gespleißter Gene	39
3.3.5 Charakterisierung differentiell regulierter Gene	40
3.3.6 Validierung der Genlisten mittels RT-PCR und qPCR.....	40
3.3.7 Funktionelle Annotation der Genlisten.....	41
3.4 RNA Methoden	41
3.4.1 RNA-Extraktion.....	41
3.4.2 cDNA-Synthese	42
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	42

Inhaltsverzeichnis

3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion	42
3.5.2 Agarosegelelektrophorese.....	44
3.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
3.5.4 Restriktionsverdau von DNA	44
3.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten	45
3.5.6 Transformation kompetenter Bakterien	45
3.5.7 Überprüfung der Klone mittels PCR, Mini-Präparation und Verdau.....	45
3.5.8 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	46
3.5.9 Herstellung eines Glycerolstocks.....	46
3.5.10 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	46
3.5.11 Sequenzierung von DNA	47
3.6 Zellbiologische Methoden	47
3.6.1 Stimulation und Inhibition primärer T-Zellen	47
3.6.2 Transfektion adhärenter Zellen mittels Polyethylenimin	47
3.6.3 Transfektion von siRNA in primäre T-Zellen.....	48
3.6.4 Überprüfung des Knockdowns in primären T-Zellen.....	48
3.6.5 T-Zell-Proliferation	49
3.6.6 T-Zell-Polarisierung auf Fibronectin.....	49
3.6.7 T-Zell-Aktivierung durch CD3/ CD28-Stimulation	49
3.6.8 Immunfluoreszenzfärbung	50
3.7 Durchflusszytometrie.....	50
3.8 Proteinbiochemische Methoden	51
3.8.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	51
3.8.2 Western Blot.....	52
3.9 Statistische Analyse	52
4 Ergebnisse	53
4.1 Visualisierung alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene	53
4.1.1 Alternativ gespleißte Gene	53
4.1.2 Differentiell regulierte Gene	53
4.2 Validierung der Exon Array Genlisten	54
4.2.1 RT-PCR.....	54
4.2.1.1 Alternativ gespleißte Gene.....	54
4.2.1.2 Differentiell regulierte Gene	56
4.2.2 Semiquantitative qPCR	58

4.3 Funktionelle Annotation.....	59
4.3.1 Reactome - Signalwegdatenbank.....	59
4.3.2 GENE SeT AnaLysis Toolkit V2	60
4.3.2.1 Alternativ gespleißte Gene.....	61
4.3.2.2 Differentiell regulierte Gene	62
4.3.3 Blast2GO.....	63
4.4 Selektion einzelner alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene für funktionelle Tests	69
4.5 Klonierung der selektierten Gene in den Expressionsvektor pEGFP-N1	71
4.6 Transiente Expression der pEGFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen.....	74
4.6.1 Nachweis der Fusionsproteine mittels Western Blot.....	74
4.6.2 Effekt der Überexpression auf Zellviabilität und Apoptose	75
4.6.3 Effekt der Überexpression auf die Proliferation	76
4.6.4 Lokalisierung mittels konfokaler Mikroskopie	77
4.7 Knockdown des differentiell regulierten Gens SLFN5 in primären T-Zellen.....	79
4.7.1 Überprüfung des Knockdowns	80
4.7.2 Effekt des Knockdowns auf Zellviabilität und Apoptose.....	80
4.7.3 Effekt des Knockdowns auf die T-Zell-Proliferation	81
4.7.4 Effekt des Knockdowns auf stimulierte morphologische T-Zell-Veränderungen.....	82
4.7.4.1 Polarisation auf Fibronectin.....	82
4.7.4.2 Costimulatorisches Slide.....	84
4.8 Expression ausgewählter Gene im Virus-inhibierten System.....	86
4.8.1 Effekte auf die Regulation ausgewählter Gene nach Virus-Inhibition	86
4.8.1.1 Alternativ gespleißte Gene.....	86
4.8.1.2 Differentiell regulierte Gene	87
4.9 Expression ausgewählter Gene in verschiedenen Zelllinien	89
5 Diskussion.....	91
5.1 Identifikation von Spleißvarianten in T-Zellen mittels Exon Array	91
5.2 Selektion, Klonierung und funktionelle Effekte ausgewählter Gene auf HEK293T-Zellen (transiente Expression) und primäre T-Zellen (Knockdown).....	96
5.3 Genexpression im Virus-inhibierten System und in Zelllinien.....	100

6 Zusammenfassung	102
7 Summary	103
8 Literaturverzeichnis	104
9 Abkürzungsverzeichnis	I
10 Abbildungsverzeichnis	V
11 Tabellen- und Formelverzeichnis	VII
11.1 Tabellenverzeichnis	VII
11.2 Formelverzeichnis	VII
12 Veröffentlichungen/ Publikationen/ Vorträge/ Poster	VIII
12.1 Publikation	VIII
12.2 Vorträge	VIII
12.3 Poster.....	IX
13 Anhang	X
14 Danksagung	XIV
15 Lebenslauf	XVI
16 Erklärung der Selbstständigkeit	XVII

1 Einleitung

1.1 Das Masernvirus

Die Masern sind eine hochansteckende, schwere Erkrankung und gehören immer noch zu den Hauptursachen für die hohe Kindersterblichkeit weltweit, obwohl ein sicherer und wirksamer Impfstoff vorhanden ist. Weltweite Immunisierungskampagnen haben es geschafft, die Todesfälle von geschätzten 750000 Fällen im Jahr 2000 auf 197000 Fälle 2007 zu reduzieren (WHO, 2009). Dennoch kommt es auch in Europa regional zu Masernausbrüchen, wobei sich die Zahl 2010 bis 2013 auf ca. 100000 gemeldete Masernfälle beschränkte (WHO, 2013).

1.1.1 Taxonomie

Der Erreger der akuten Masern beim Menschen ist das Masernvirus (MV), das mit seinem einzelsträngigen, kontinuierlichen RNA-Genom in Negativstrangorientierung zur Ordnung der *Mononegavirales* gehört. Diese Ordnung umfasst die Familien *Rhabdo-*, *Borna-*, *Paramyxo-* und *Filoviridae*. Das MV wird in der Familie der *Paramyxoviridae* zur Unterfamilie der *Paramyxovirinae* gezählt, wegen der fehlenden Neuraminidase-Aktivität in die Gattung *Morbillivirus* eingeordnet und ist der einzige humanpathogene Vertreter dieser Gattung (Modrow et al, 2010).

Tab. 1.1 Übersicht charakteristischer Vertreter der Familie der Paramyxoviridae (verändert nach Modrow et al, 2010).

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
<i>Paramyxovirinae</i>	Respirovirus	Parainfluenzavirus Typ 1 + 3	Sendaivirus Simianvirus 10
	Rubulavirus	Mumpsvirus Parainfluenzavirus Typ 2 + 4	Simianvirus 5 Simianvirus 41
	Avulavirus	---	Newcastle-Disease-Virus Vogelparamyxoviren Typ 2-9
	Morbillivirus	Masernvirus	Hundestaupevirus Rinderstaupevirus
	Henipavirus	Hendravirus Nipahvirus	Hendravirus (Pferd) Nipahvirus (Hund, Schwein)
<i>Pneumovirinae</i>	Pneumovirus	Respiratorisches Syncytialvirus (RSV)	Respiratorisches Syncytialvirus (Rind)
	Metapneumovirus	Metapneumovirus	Metapneumovirus (Geflügel)

1.1.2 Klinik und Pathogenese

Masern sind eine schwere Erkrankung, die mit hohem Fieber einhergeht. Das MV wird durch Tröpfcheninfektion von Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut, der Augenbindehaut oder durch direkten Kontakt übertragen und gelangt über den respiratorischen Trakt in die Lunge. Das Virus infiziert die dort anwesenden Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen, durch den zellulären Eintrittsrezeptor CD150 (SLAM, *signaling lymphocyte activation molecule*). Die vom Virus befallenen Zellen werden zu den lokalen lymphatischen Organen transportiert, in denen eine verstärkte Virusreplikation und -vermehrung stattfindet (Swart et al, 2007). Von den Lymphknoten, in denen sich eine Vielzahl Monozyten, T- und B-Zellen finden, geht die erste Virämie aus, sodass sich das Virus hauptsächlich zellgebunden in das retikuloendotheliale System ausbreitet. In der Mund- und Rachenschleimhaut entstehen die charakteristischen Warthin-Finkeldeyschen Riesenzellen, die durch die Fusion infizierter Endothelzellen gebildet werden. In der zweiten Virämie werden Epithel- und Endothelzellen der Haut und vieler Organe (Nieren, Leber, Harnblase, Gastrointestinaltrakt) befallen (Modrow et al, 2010). Infizierte Lymphozyten wandern zum Respirationstrakt und transferieren Viren ins Epithel, wo diese an den basolateral-gelegenen Epithelzellrezeptor Nektin-4 (PVRL4) binden und den Replikationszyklus einleiten (Mühlebach et al, 2011; Racaniello, 2011; Noyce et al, 2011). Über diese durch subepitheliale Immunzellen bewirkte Infektion von Epithelzellen des oberen respiratorischen Traktes gelangen neu synthetisierte Viruspartikel über die apikale Zellseite in das Lungenlumen, sodass diese als Tröpfchen freigesetzt werden und sich verbreiten (Ludlow et al, 2009; Ludlow et al, 2013).

Das erste Anzeichen einer Maserninfektion ist hohes Fieber. In dieser Initialphase können weitere Symptome wie Schnupfen, Husten, Bindehautentzündung und die Koplikschen Flecken, ein charakteristisches Masern-Enanthem in der Mundschleimhaut, entstehen. Nach einigen Tagen tritt ein Hautausschlag auf, der sich – ausgehend von Nacken und Gesicht – innerhalb von drei Tagen über den ganzen Körper ausbreitet und binnen weiterer drei Tage wieder abklingt. Neben Komplikationen wie Mittelohrentzündung und Diarrhoe können auch schwere Komplikationen auftreten wie Pneumonie, akute postinfektiöse Enzephalitis (zwei bis vier Wochen nach dem Ausschlag) oder auch die letale subakute sklerosierende Panencephalitis (SSPE), die – ausgelöst durch eine im Hirngewebe persistierende MV-Infektion – Jahre nach der akuten Masernerkrankung erscheint (Modrow et al, 2010).

1.1.3 Morphologie und virale Proteine

Das MV ist ein polymorphes, umhülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 120 - 250 nm. Der virale Ribonukleoproteinkomplex (RNP) enthält das einzelsträngige RNA-Genom, das Nukleokapsid-Protein (N) und den Polymerase-Komplex aus Large-Protein (L) und Phospho-Protein (P). Das N-Protein verpackt die virale RNA, schützt diese vor dem Abbau durch Ribonukleasen und bindet den Polymerase-Komplex (Schneider-Schaulies, ter Meulen, 2009). Die Replikation des viralen Genoms wird durch das L-Protein als katalytische Einheit und das P-Protein als regulatorischen Co-Faktor der RNA-Polymerase ermöglicht (Horikami, Moyer, 1995). Eine Lipidhülle aus der Wirtszellmembran umgibt den viralen RNP, wobei das Matrixprotein (M), das die Hülle mit dem RNP verbindet, späte

1 Einleitung

Schritte im viralen Lebenszyklus auslöst (Viruszusammenbau und Virionknospung von der Plasmamembran) und die Transkription reguliert. Die Oberflächenproteine F (Fusionsprotein) und H (Hämagglutinin-Protein) interagieren mit dem M-Protein und stehen von der Hülle ab (Schneider-Schaulies, ter Meulen, 2009). Das H-Protein als Typ-II-Glykoprotein vermittelt die Interaktion mit CD150/ SLAM und Nektin-4. Attenuierte MV-Stämme können aufgrund von Mutationen im H-Protein zusätzlich auch CD46/ MCP (*membrane cofactor protein*) als Eintrittsrezeptor verwenden (Liu et al, 2014). Des Weiteren übt das H-Protein für die F-Protein-vermittelte Fusion mit der Zellmembran des Wirtes eine Hilfsfunktion aus (Nussbaum et al, 1995). F₁ und F₂ sind die funktionellen Untereinheiten des Typ-I-Glykoproteins (F-Protein), dabei ist F₁ als transmembrane Untereinheit über eine Disulfidbrücke mit F₂ verbunden (Abbildung 1.1).

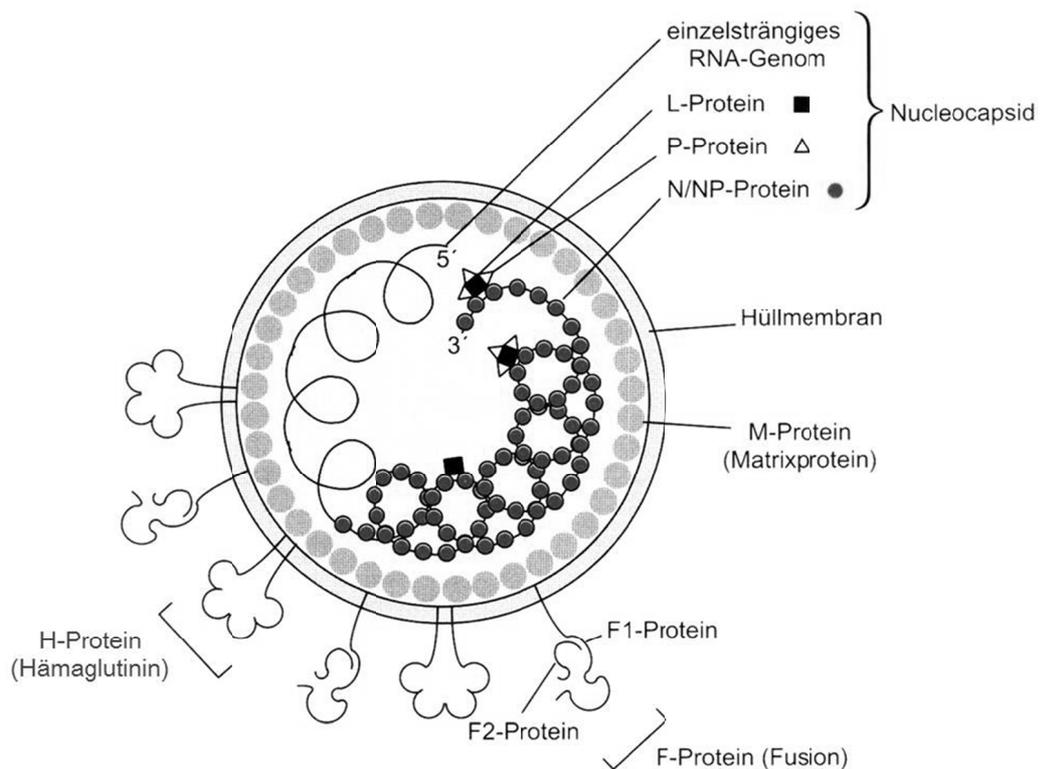


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau eines Masernviruspartikels (verändert nach Modrow et al, 2010).

Die Nicht-Strukturproteine C und V werden beide von der mRNA des P-Proteins kodiert. Das C-Protein entsteht aus einem anderen Leseraster und verwendet ein alternatives Startkodon. Das V-Protein entsteht durch RNA-Editing, indem die virale Polymerase an einer definierten Stelle ein zusätzliches Guanosin einfügt (Bellini et al, 1985; Cattaneo et al, 1989). Diese Proteine scheinen funktionell an der Regulation der Effizienz der MV-Replikation, der Modulation der viralen Genexpression sowie der Induktion und Sensitivität der zellulären Interferonantwort nach einer MV-Infektion beteiligt zu sein (Zuckerman et al, 2009).

1.1.4 Genom und Replikation

Das RNA-Genom des MV ist einzelsträngig, nicht segmentiert, negativ orientiert, von N-Proteinen umgeben und 15894 Nukleotide lang. Es kodiert für sechs Strukturproteine, deren Gene linear in der Reihenfolge 3' N-P/C/V-M-F-H-L 5' ohne Überlappung angeordnet und durch intergenische Sequenzen (IGS) voneinander getrennt sind. Die IGS bestehen aus einem Poly-A-Signal, drei Nukleotiden (CUU) und einer Signalsequenz für die Reinitiiierung der Transkription für distale Gene. Das Genom ist flankiert von einer transkribierten 3' Leader- und einer nichttranskribierten 5' Trailer-Sequenz, die spezifische Enkapsidationssignale und einen viralen Promotor für die virale Transkription (Leader) und Replikation (Trailer) beinhalten (Schneider-Schaulies, ter Meulen, 2009).

Nach dem Eintritt des MV in die Zelle wird die mRNA des N-Gens synthetisiert, katalysiert durch die RNA-Polymeraseaktivität des L-Proteins. An den Kontrollsequenzen der IGS erfolgt ein Transkriptionsstopp, woraufhin polyadenyliert, die IGS überlesen und die Transkription des P-Gens gestartet wird. Mithilfe dieses Mechanismus werden auch die mRNAs der Proteine M, F, H und L synthetisiert. Die gebildeten mRNAs sind am 5' Ende gekappt und am 3' Ende polyadenyliert. Der Start-/ Stopp-Mechanismus ist aber nicht immer erfolgreich, sodass ein Konzentrationsgradient an Transkripten entsteht bei dem distale Gene mit statistisch geringerer Häufigkeit abgelesen werden. Translatierte H- und F-Proteine werden im Golgi-Apparat modifiziert und zur Zelloberfläche transportiert. M-Proteine lagern sich an die Innenseite der Zytoplasmamembran an und bilden in Wechselwirkung mit den H- und F-Proteinen eine Matrixproteinschicht. Liegen genug N-Proteine in der Zelle vor, so wird zusammen mit dem L- und P-Protein das Überlesen der IGS induziert, wobei durchgehende RNA-Positivstränge entstehen. Diese dienen wiederum als Matrizen für die Herstellung von RNA-Genomen in Negativorientierung. Die auf voller Länge mit N-Proteinen versehene, genomische RNA bildet RNP-Komplexe. Diese assoziieren mit der intrazytosolischen Matrixproteinschicht an der Zytoplasmamembran, die wiederum mit den in der Zellmembran eingelagerten Glykoproteinen interagiert, welche mit *lipid rafts* assoziiert sind. Abschließend kommt es zur Ausstülpung der Membran, was zur Freisetzung neuer Viruspartikel führt (Modrow et al, 2010).

1.2 Masernvirus-induzierte Immunsuppression

Eine Maserninfektion resultiert in einer lebenslangen Immunität. Jedoch ist die MV-Infektion mit einer mehrwöchigen Immunsuppression verbunden, was die hohe Sterblichkeitsrate durch Sekundärinfektionen erklärt (Griffin, 2010).

Die Effekte der Immunsuppression durch das MV wurden bereits 1908 von Pirquet in der Studie über die verzögerte Überempfindlichkeitsantwort in Hauttests beschrieben (Pirquet, 1908). Die Tuberkulinantwort bleibt noch Wochen nach dem Verschwinden des Exanthems unterdrückt (Tamashiro et al, 1987). Die MV-induzierte Immunsuppression ist eine Folge verschiedener Abnormalitäten des Immunsystems wie Lymphopenie, Verschiebung der Zytokinsekretion der T-Helferzell (Th2/CD4⁺)-Antwort und die Unterdrückung der Expansionsfähigkeit peripherer Blutlymphozyten (Ward et al, 1991; Hirsch et al, 1984). Die Lymphopenie betrifft B-Zellen, CD4⁺ und zytotoxische (CD8⁺) T-Zellen, wobei die Ausprägung mit der Schwere der Infektion und dem Alter in Zusammenhang steht. Die

1 Einleitung

Anzahl der T-Zellen regeneriert sich innerhalb weniger Tage, doch die Immunsuppression ist noch Wochen nach der Infektion nachweisbar (Avota et al, 2010; Okada et al, 2001). Mit dem Erscheinen des Exanthems sind erhöhte Plasmawerte von Interleukin-8 (IL-8), Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2 aufgrund der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen und der Th1-Antwort der CD4⁺ T-Zellen nachweisbar. Nach dem Abklingen des Exanthems nimmt die Expression von IL-4, IL-10 und IL-13 durch die Th2-Antwort der CD4⁺ T-Helferzellen stark zu (Griffin, 2010). IL-10 ist ein Zytokin, das die Synthese vieler anderer Zytokine herunterreguliert, die Makrophagen-Aktivierung und T-Zell-Proliferation unterdrückt und die Freisetzung von Zytokininhibitoren begünstigt (Moss et al, 2002; Waal Malefyt et al, 1991 a; Waal Malefyt et al, 1991 b). Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 für die MV-induzierte Immunsuppression von Bedeutung ist (Sieling et al, 1993).

Die MV-induzierte Immunsuppression ist auch gekennzeichnet durch eine Proliferationsinhibition primärer Lymphozyten nach mitogener/ allogener Stimulation. Die Ursache für diese Hemmung ist nicht der zytopathische Effekt (CPE, Fusion infizierter Zellen), da die Proliferation peripherer Blutlymphozyten durch den Kontakt mit infizierten Zellen, die nach Ultraviolett (UV)-Inaktivierung keine Viren mehr freisetzen, gehemmt werden kann. MV-infizierte DCs können einen negativen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung ausüben (Swart et al, 2007). Die Infektion führt zu einer phänotypischen Reifung der DCs, die sich durch eine erhöhte Expression von Reifungsmarkern, wie CD40, CD80, CD86, CD83 und des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (*major histocompatibility complex*, MHC-II-Molekülen), darstellt (Klagge et al, 2000). Die Reifung der DCs löst eine Umstellung von proinflammatorischen zu lymphoid-spezifischen Chemokinen aus, was sich durch die Veränderung der Oberflächenexpression von CCR5 zu CCR7 äußert, jedoch nach MV-Infektion nicht detektierbar ist (Abt et al, 2009). Infizierte DCs verlieren ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren und deren Expansion zu induzieren. Für die Aktivierung der T-Zelle ist die Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) zwischen DC und T-Zelle vonnöten. Diese stimulatorische Kontaktfläche zwischen infizierter DC und T-Zelle ist jedoch nicht stabil genug, um einen ausreichenden Kalziumeinstrom in die T-Zelle und folglich die T-Zell-Aktivierung zu induzieren (Shishkova et al, 2007).

Des Weiteren ergaben *in vitro* Experimente, dass T-Zellen lediglich durch den Kontakt mit dem MV einen Proliferationsarrest zeigen, wofür die viralen Glykoproteine verantwortlich sind (Schlender et al, 1996). Die Lymphozyten werden durch diesen Kontakt in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert. Für diese Proliferationsinhibition ist die proteolytische Spaltung des F-Proteins essentiell (Niewiesk et al, 1997). Bei Verwendung eines rekombinanten MV, bei dem die MV-spezifischen Glykoproteine mit denen des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) ersetzt wurden, konnten periphere Blutlymphozyten nicht inhibiert werden, was die Bedeutung der Glykoproteine des MV bestätigt (Schlender et al, 1996). Dieses Verhalten ist unabhängig von den MV-Eintrittsrezeptoren CD150 und CD46 (Yanagi et al, 2006), da auch Zellen, die diese Rezeptoren nicht exprimierten, eine MV-induzierte Inhibition der Proliferation zeigten und auch CD46- und CD150-blockierende Antikörper die Inhibition nicht verhinderten (Schneider-Schaulies, Dittmer, 2006).

Des Weiteren wurde auch eine Inhibition der Zytoskelettdynamik bei T-Zellen nach MV-Kontakt beobachtet. Dieses Verhalten konnte auf die herunterregulierte Aktivierung der GTPasen Rac und Cdc42 sowie der Aktin-bindenden Linkerproteine Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine) und auf die Aktivierung von RhoA und Cofilin zurückgeführt werden. Diese veränderte Regulation stört die

Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien und schließlich auch die Adhärenz der Zellen auf Fibronectin (Müller et al, 2006).

1.3 Masernvirus-induzierte PI3K-Inhibition

Die Proliferationshemmung ist auf molekularer Ebene auf den Zellzyklusarrest und dieser wiederum auf die Inhibition der PI3-/Akt-Kinase-Signalkaskade, eines wichtigen Bestandteils des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signalwegs, zurückzuführen. Der 24-stündige Kontakt der T-Zellen mit dem MV führte zu einer reduzierten Akt-Phosphorylierung nach CD3/CD28-Stimulation (Avota et al, 2001).

Das MV verhindert den Abbau der E3-Ubiquitin-Ligase Cbl-b, eines Negativregulators der PI3-Kinase. Dadurch wird der Transport der PI3-Kinase, deren Aktivierung in den *lipid rafts* und die Generierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) gestört. Da PIP₃ für die Rekrutierung PH (*pleckstrin homology*)-Domänen enthaltender Proteine wie Akt oder Vav notwendig ist, werden auch die zugehörigen Signalkaskaden durch den MV-Kontakt gehemmt (Avota et al, 2004). Dem MV-induzierten Proliferationsarrest kann entgangen werden, indem eine membrangebundene, aktive Form von Akt überexprimiert wird (Avota et al, 2001).

Der PI3K-Signalweg kann auch pharmakologisch durch Wortmannin (Wipf, Halter, 2005) oder LY294002 (Vlahos et al, 1994) blockiert werden. Die beiden Moleküle inhibieren jeweils die katalytische Untereinheit p110 der PI3-Kinase und bewirken einen mit dem MV-Kontakt vergleichbaren T-Zell-Arrest.

1.4 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg

Der PI3K-Signalweg übernimmt essentielle zelluläre Aufgaben wie z.B. das Überleben, Steuerung des Zellzyklus und Migration, weshalb Fehlregulationen der PI3K mit schweren Erkrankungen assoziiert werden. Die PI3-Kinasen bestehen aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Untereinheit. p110 besteht aus einer N-terminalen p85- und Ras-Bindungsdomäne, einer C2- und einer Phosphatidylinositolkinase-Homologie-Domäne, gefolgt von einer katalytischen Domäne am C-Terminus. p85 hingegen besteht aus einer p110-Bindungsdomäne, die von zwei Src-Homologiedomänen flankiert wird.

Es existieren acht Isoformen, die nach den p110-Untereinheiten in drei Klassen eingeteilt werden. Die am besten untersuchte Klasse I (p110 α /PIK3CA, p110 β /PIK3CB, p110 γ /PIK3CG und p110 δ /PIK3CD) kommt in allen Zelltypen vor, wobei PIK3CG und PIK3CD stark in Leukozyten angereichert sind. Die p110-Untereinheiten der Klasse I binden eine der fünf regulatorischen p85-Untereinheiten (außer p110 γ /PIK3CG), wodurch 15 Kombinationsmöglichkeiten entstehen. Die p85-Untereinheiten regulieren p110-Proteine durch Stabilisierung, Inaktivierung ihrer Kinaseaktivität auf ein Basislevel und Rekrutierung an phosphorylierte Tyrosinreste auf aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) bzw. in Adaptermolekülen über die Src-Homologiedomänen (Astoul et al, 2001; Vanhaesebroeck et al, 2010). Durch die Bindung an die RTKs wird die inhibitorische Wirkung

von p85 aufgehoben und das p85-p100-Heterodimer zum PIP₂-Substrat an die Plasmamembran transportiert (Engelman et al, 2006).

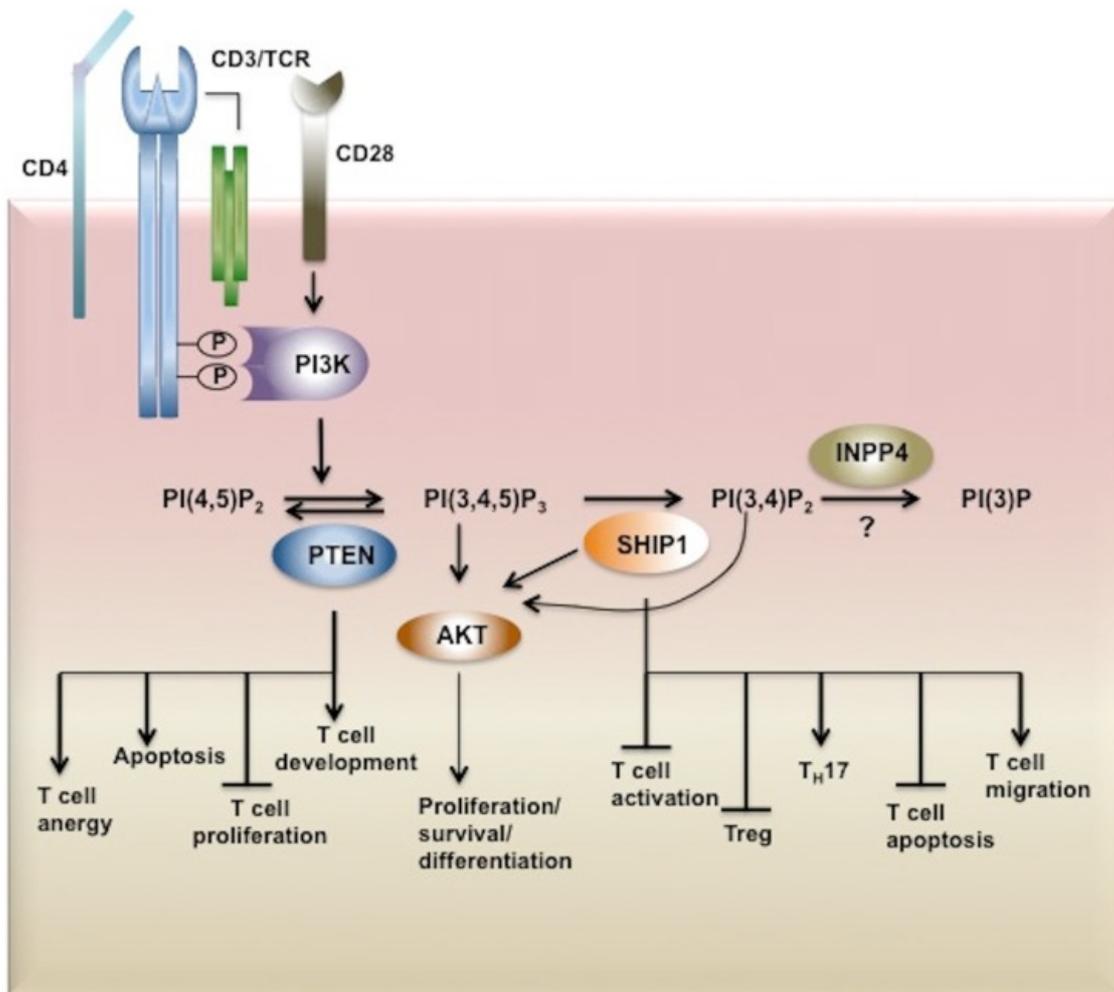


Abb. 1.2 Bedeutung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg in der T-Zell-Biologie: SHIP - SH2-Domäne-enthaltende Inositol-5-phosphatase, PTEN - Phosphatase und Tensin Homolog, INPP4 - Inositolpolyphosphat-4-phosphatasen (Srivastava et al, 2013).

Die Klasse I PI3-Kinase ist charakterisiert durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen an der dritten OH-Gruppe des Inositolrings. Dabei agieren die Phosphatidylinositollipide als sekundäre Botenstoffe, welche von anderen Proteinen gebunden werden können (Engelman et al, 2006). Die Abbildung 1.2 zeigt, dass die Kinase durch die Stimulation des TCR aktiviert wird, woraufhin p110 aktiviert und das p85-p110-Heterodimer zur Membran rekrutiert wird. Dann erfolgt die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P₂) zu PIP₃. Das Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) terminiert und reguliert das PI3K-Signal durch analoge Dephosphorylierung, während die SH2-Domäne-enthaltende Inositol-5-phosphatase (SHIP) PIP₃ in Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI-3,4-P₂) umwandelt (Harris et al, 2008; Zhang et al, 2009 b; Srivastava et al, 2013). Dieses PI-3,4-P₂ kann durch die Inositolpolyphosphat-4-phosphatasen (INPP4, Funktion in Immunzellen unbekannt) dephosphoryliert werden (Srivastava et al, 2013). Nachgeschaltete

1 Einleitung

Signal-moleküle wie die Protein-Serin/Threonin-Kinase Akt (auch bekannt als Proteinkinase B/ PKB) binden an PIP_3 in der Membran. Diese wird dort durch den mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Rictor-Kinasekomplex und PDK1 (3-Phosphoinositol-abhängige Kinase 1) phosphoryliert und aktiviert (So, Croft, 2013). Aber auch das von SHIP gebildete $PI-3,4-P_2$ kann Akt rekrutieren und aktivieren (Srivastava et al, 2013). Die vollständige Aktivierung von Akt führt zu dessen Ablösung von der Membran und Translokation in das Zytoplasma und in den Nukleus, wo es wiederum viele Zielproteine - wie z.B. FOXO-Proteine - phosphoryliert und dadurch weitere zelluläre Funktionen reguliert (Engelman et al, 2006).

Aktiviertes Akt inhibiert die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) (Barthel et al, 2005), was für die Stabilisierung von c-Myc und damit die Zellzyklusprogression wichtig ist. Akt fördert das Überleben der Zelle, indem es die Transkription des proapoptotischen Proteins BAD (*BCL2-antagonist of cell death*) blockiert und MDM2 (*transformed 3T3 cell double-minute 2 p53-binding protein*) für den p53-Abbau phosphoryliert (Vivanco, Sawyers, 2002). Des Weiteren führt Akt zur Aktivierung des mTOR-Raptor-Kinase-Komplexes, wodurch die Proteinbiosynthese über die Phosphorylierung des Translations-initiationsfaktors 4E-BP1 stimuliert wird (Richardson et al, 2004).

Auch die Motilität und Polarität der Zelle werden durch diesen Signalweg reguliert. Dafür kontrolliert die PI3-Kinase zusammen mit den GTPasen Rac und Cdc42 die Aktindynamik (van Haastert, Devreotes, 2004). Zusätzlich treibt der PI3K-Signalweg noch die T-Helferzell-Expansion und die Differenzierung an (So, Fruman, 2012).

1.5 Spleißreaktion eukaryotischer prä-mRNA

Da MV die PI3K-Akt-Signalkaskade hemmt (Abschnitt 1.3), liegt es nahe, am Signalweg beteiligte Proteine, wie z.B. Lipidphosphatasen, auf eine veränderte Aktivität zu untersuchen. Bei Analysen der Lipidphosphatase SHIP1 (145 kDa) in primären T-Zellen wurde nach MV-Behandlung eine zusätzliche Bande bei 110 kDa im Western Blot entdeckt (Abbildung 1.3 a), die auch durch die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 hervorgerufen werden konnte. Diese Bande konnte als eine Isoform des SHIP1 identifiziert werden, bei deren Synthese eine im Intron gelegene, alternative Translations-initiationsstelle genutzt wird (Abbildung 1.3 b). Das Leseraster und die Phosphatase-Domäne bleiben erhalten, aber anders als SHIP1 ist das sogenannte SIP110 dauerhaft an der Membran gebunden. In seiner Funktion als Phosphatase dephosphoryliert es dadurch kontinuierlich das zelluläre PIP_3 , sodass der PI3-/Akt-Kinase-Signalweg gehemmt wird, keine T-Zell-Proliferation mehr stattfinden kann und ein T-Zell-Arrest einsetzt (Harris et al, 2008; Avota et al, 2006).

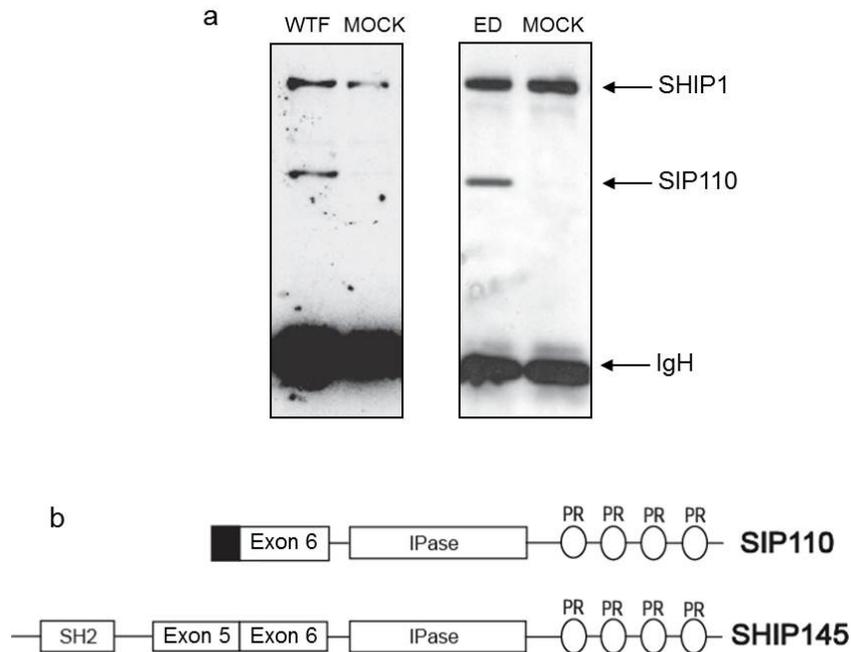


Abb. 1.3 MV-induzierte Expression von SIP110 in primären T-Zellen: a - Western Blot von T-Zellen 24h kokultiviert mit inaktiviertem MV (WTF), dem MV-Impfstamm Edmonston (ED) oder Mock-Extrakt, WTF und ED zeigen die SIP110 spezifische Bande bei 110 kDa zusätzlich zur vollständigen Isoform des SHIP1 bei 145 kDa; b - ermittelte Isoformen von SHIP1 und SIP110 mit der Position der Exons 5 und 6, der SH2-Domäne (essentiell für die aktivierungsabhängige Tyrosinphosphorylierung und die Rekrutierung zur Membran), der Inositolphosphatase-Domäne (IPase), der alternativen Translationsinitiationsstelle (schwarze Box) und den Prolinreichen Domänen (PR) (verändert nach Avota et al, 2006).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl in MV-kontaktierten als auch in PI3K-inhibierten T-Zellen intronische Sequenzen in der reifen SHIP-mRNA verbleiben und folglich der Spleißprozess beeinflusst wird.

1.5.1 Spleißmechanismus

Eukaryotische Gene sind immer aus proteinkodierenden (Exons) und nicht-kodierenden Bereichen (Introns) aufgebaut. Beim Spleißen werden Introns aus der prä-mRNA entfernt und die Exons zu translatierbarer mRNA zusammengefügt. Die drei wichtigsten Spleißsignale (Abbildung 1.4 a) sind die 5' Spleißstelle des Introns mit einem konservierten GU-Dinukleotid, die Verzweigungsstelle mit einem konservierten Adenosin, an die das 5' Ende des Introns bindet, und die 3' Spleißstelle mit einem hochkonservierten AG-Dinukleotid, welches das Ende des Introns definiert (Matlin et al, 2005; Kim et al, 2008).

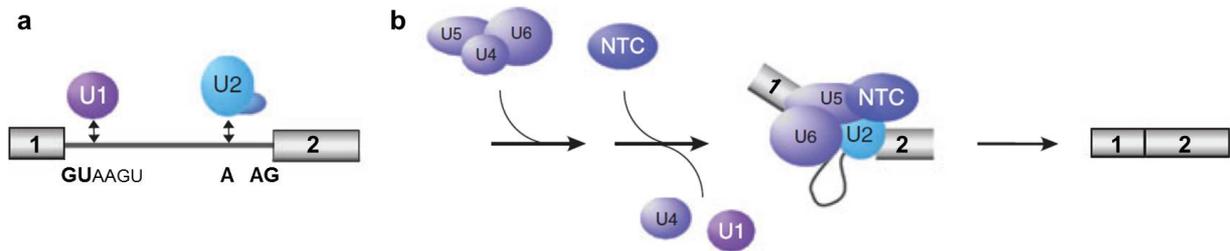


Abb. 1.4 Spleißsignale und Spleißmechanismus: a - 3 Spleißsignale: 5' Spleißstelle mit konserviertem GU, Verzweigungsstelle mit konserviertem Adenosin, 3' Spleißstelle mit hochkonserviertem AG; b - Spleißreaktion: Spleißosom-Assemblierung und Bindung an 5' Spleiß- und Verzweigungsstelle, Bildung der Loop-Struktur, zweite Umesterung zur Verbindung von Exon 1 und 2; U1 - U6 - snRNPs, NTC - snRNP- freie spleißosomale Untereinheit, Boxen - konstitutive Exons, Linie zwischen Exons - Intron (verändert nach Martinez, Lynch, 2013).

Die Spleißreaktion (Abbildung 1.4 b) wird durch das Spleißosom, einem makromolekularen Ribonukleoproteinkomplex, katalysiert und erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden, einfachen Umesterungsreaktionen. Das Spleißosom setzt sich aus kleinen nukleären Ribonukleoproteinpartikeln (snRNPs, U1 - U6) zusammen, die sich an das GU-Dinukleotid der 5' Spleißstelle und an das Adenosin der Verzweigungsstelle anlagern. Durch gegenseitige Wechselwirkung entsteht eine Loop-Struktur, sodass die Phosphodiesterbindung zwischen Exon und Intron an der 5' Spleißstelle gespalten werden kann und sich eine Verzweigung und eine intermediäre Lassostruktur bildet. Bei der zweiten Umesterung greift die 3' Ende des 5' Exons (Exon 1) die Phosphodiesterbindung zwischen dem Intron und dem 3' Exon (Exon 2) an, wodurch Exon 1 und Exon 2 miteinander verbunden werden und das Intron in einer Lassoform freigesetzt wird (Alberts, 2004; Berg et al, 2003; Purves, Markl, 2006).

1.5.2 Alternatives Spleißen

Zusätzlich zum konstitutiven Spleißen, bei dem alle Introns entfernt und konsekutive Exons zusammengefügt werden, gibt es auch noch das alternative Spleißen, bei dem Exons ein- bzw. ausgeschlossen oder auch Intronsequenzen in die mRNA eingebaut werden können (Affymetrix, Technical Note I; Lynch, 2004). Dadurch können aus einem Gen mehrere Proteine generiert werden, was die Proteinviefalt enorm vergrößert und des Weiteren eine Kontrollmöglichkeit für die Genexpression darstellt (Black, 2000). Es wird geschätzt, dass mehr als 74 % der humanen proteinkodierenden Gene alternativ gespleißt werden (Blaustein et al, 2007).

In Abbildung 1.5 sind die verschiedenen Varianten für alternatives Spleißen dargestellt. Das Kassettenexon (*exon skipping/ cassette exon*) ist ein einzelnes Exon, das unabhängig in die mRNA eingegliedert oder ausgeschlossen werden kann. Es kann in „übersprungene“ oder „verborgene“ Exons eingeteilt werden, je nachdem ob die Hauptisoform das Exon enthält oder nicht. Dieser Modus kommt in Säugetieren am häufigsten vor. Bei der Beibehaltung eines Introns (*intron retention*) kann ein Intron teilweise oder komplett in der mRNA erhalten bleiben. Dieser Modus ist am seltensten vertreten (Matlin et al, 2005) und kommt beispielsweise in humanen T-Zellen vor, wodurch auch SIP110 gebildet wird (Abschnitt 1.5).

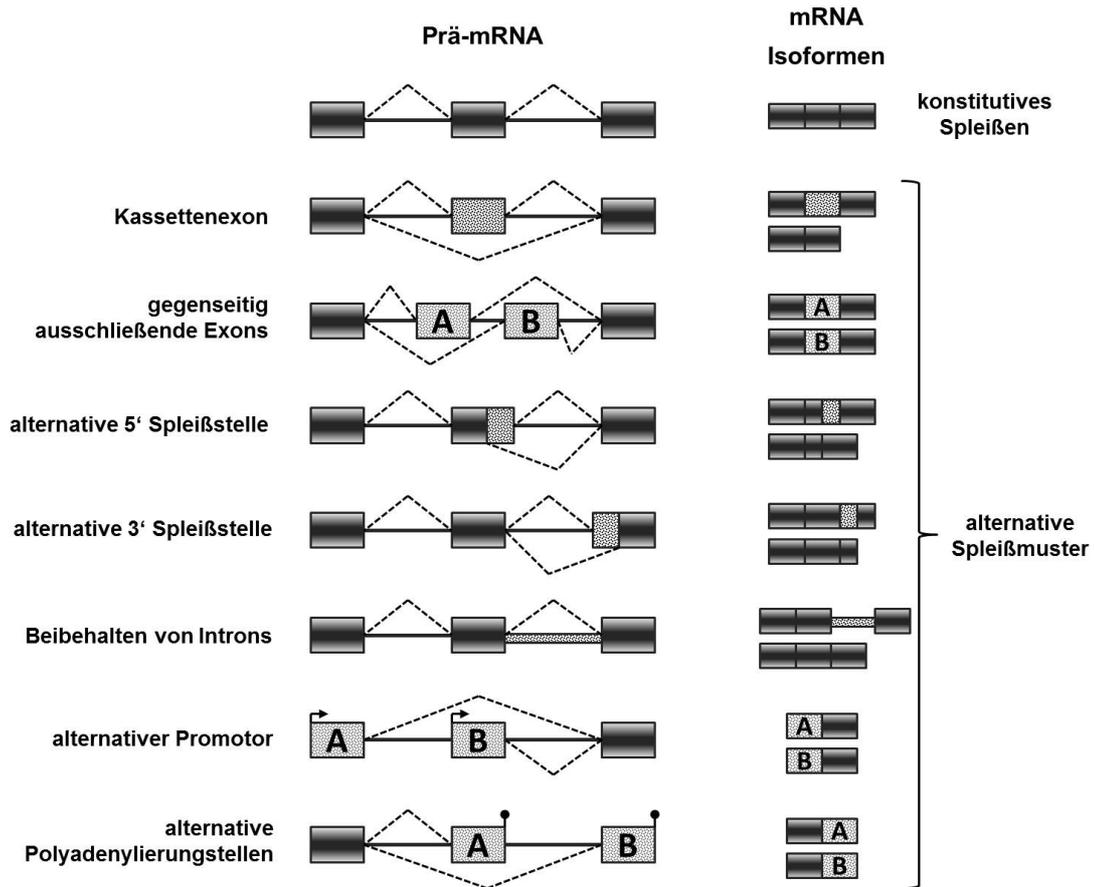


Abb. 1.5 Verschiedene Spleißmuster für alternatives Spleißen: Exons (Boxen), Introns (schwarze bzw. graue, Linien), verschiedene Möglichkeiten des Spleißens (gestrichelte Linien), konstitutive Bereiche sind grau dargestellt, alternative Bereiche in gepunktetem Muster.

Alternative Spleißprozesse werden häufig für immunrelevante Genprodukte beobachtet. Dazu zählen Oberflächenrezeptoren, Kinasen und Adapterproteine (wie z.B. CD3, FYN und VAV1) sowie Transkriptionsfaktoren (wie z.B. LEF1), aber auch Proteine, die RNA binden oder an der Regulation der mRNA-Prozessierung beteiligt sind (wie z.B. CELF1 und SAM68) (Lynch, 2004; Martinez, Lynch, 2013). Die CD3 ζ -Kette des TCR-Komplexes verknüpft Antigenerkennung und intrazelluläre Signalkaskaden, sodass das Expressionslevel von CD3 ζ die Aktivierungsfähigkeit von T-Zellen bestimmt. Nach T-Zell-Aktivierung wird ein Intron in der 3' UTR beibehalten, das in ruhenden T-Zellen entfernt wird. Defekte in dieser Intronretention konnten mit der Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses in Verbindung gebracht werden (Nambiar et al, 2001).

Die bekanntesten Beispiele sind jedoch CD44 und CD45. Das Oberflächenmolekül CD44 ist am Zellwachstum, Überleben und an der Differenzierung beteiligt. Dessen Gen enthält zehn Kassettenexons, die in naiven T-Zellen herausgespleißt und bei T-Zell-Aktivierung in verschiedenen Kombinationen in die mRNA eingefügt werden können. SAM68, das als Mitglied der STAR (*signal transduction and RNA*)-Familie in der Regulation der mRNA-Stabilität und Translation aktiv ist, löst auch das durch T-Zell-Aktivierung induzierte alternative Spleißen von CD44 aus. Dabei interagieren SAM68 und das SR-verwandte Protein SRm160 durch die Ras-Signalkaskade und bilden einen

Komplex, der an *Exonic Splicing Enhancer* bindet und zum Exoneinschluss führt. CD45 ist als Protein-Tyrosin-Phosphatase an der T-Zell-Aktivierung beteiligt. Dessen Gen enthält drei Kassettenexons, die bei T-Zell-Aktivierung aus der mRNA herausgespleißt werden, sodass CD45 an der Zelloberfläche Homodimere bildet. Die dadurch hervorgerufene Inaktivierung der Phosphatase führt zu einer Verminderung des TCR-Signalwegs. Dadurch reguliert alternatives Spleißen von CD44 und CD45 die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase (Matter et al, 2002; Lynch, 2004; Shin, Manley, 2004; Blaustein et al, 2007; Martinez, Lynch, 2013).

1.5.3 Regulation des Spleißens

In höheren Eukaryoten werden die Spleißprozesse durch vielzählige, schwache *cis*-regulatorische Elemente (Repressoren und Aktivatoren), *trans*-wirkende Faktoren (Silencer und Enhancer) und durch starke Spleißstellen auf der prä-mRNA reguliert (Lynch, 2004).

Letztere können die Assemblierung des Spleißosoms alleine nicht initiieren, weshalb hier spleißregulatorische Elemente (SREs) eingesetzt werden, die das Spleißen sowohl positiv als auch negativ regulieren können. Ob ein Exon konstitutiv oder alternativ gespleißt wird, hängt neben der Stärke der beiden Spleißstellen auch von der Anwesenheit weiterer Regulatoren ab (Matlin et al, 2005).

Die *cis*-regulatorischen Elemente bestehen aus vier Kategorien (Abbildung 1.6): den *Intronic Splicing Silencer* (ISS) und den *Exonic Splicing Silencer* (ESS), die beide spleißinhibitorisch wirken, sowie den *Intronic Splicing Enhancer* (ISE) und den *Exonic Splicing Enhancer* (ESE), die beide den Spleißprozess unterstützen. Diese Faktoren wirken oft einander entgegen oder sie verstärken ihre Wirkung, um die Spleißregulation zu erfüllen.

Die *trans*-wirkenden Faktoren binden direkt oder indirekt an Silencer/ Enhancer Elemente und haben eine Spleißinhibition/ -verstärkung zur Folge, wie z.B. die SR-Proteine oder deren Gegenspieler die hnRNP-Komplexe (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), die hauptsächlich im Zellkern gefunden werden können, an ISS/ESS binden, um die Spleißosom-Assemblierung und die Rekrutierung der snRNPs zu verhindern, und primär als Spleißrepressoren agieren (Graveley, 2000; Matlin et al, 2005; Pozzoli, Sironi, 2005; Zhu et al, 2001).

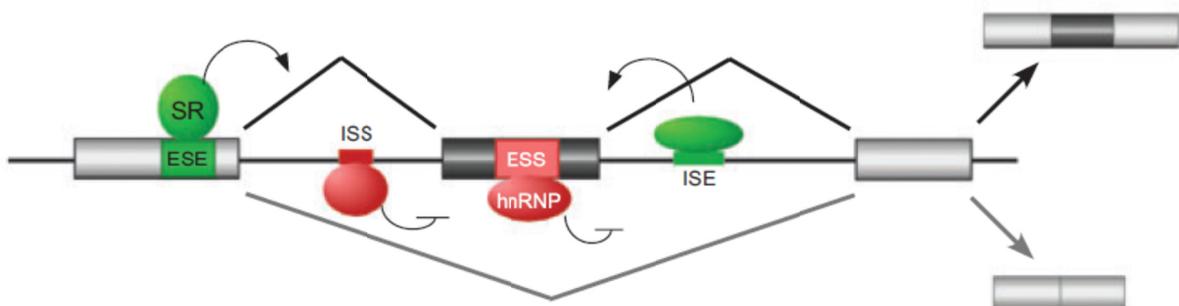


Abb. 1.6 Regulation des alternativen Spleißens: grün - Enhancer Elemente für Exons (ESE) und Introns (ISE), rot - Silencer Elemente für Exons (ESS) und Introns (ISS); SR-Proteine bzw. hnRNPs induzieren die Aktivierung der Hilfselemente; helle bzw. dunkle Boxen - konstitutive bzw. alternative Exons, Linien zwischen Exons - Introns (Martinez, Lynch, 2013).

Die SR-Proteine sind eine große, gut untersuchte Gruppe essentieller spleißregulatorischer Faktoren und bestehen aus ein bis zwei RNA-Bindungsdomänen am N-Terminus und einer RS-Domäne mit Wiederholungen von Serin/Arginin-Dipeptiden am C-Terminus. Die RNA-Bindungsdomäne enthält ein bis zwei RNA-Erkennungs-Motive (RRMs), die nötig sind, um mit der prä-mRNA interagieren zu können. Die RS-Domäne dient anderen RS-Domäne-tragenden Proteinen zur Protein-Protein-Interaktion, rekrutiert snRNPs ins Spleißosom und kontaktiert direkt die prä-mRNA innerhalb des Spleißosoms (Hertel, Graveley, 2005; Graveley, 2005). Durch die Bindung der SR-Proteine an ESEs kann das Spleißen von angrenzenden Introns stimuliert werden. Hingegen kann die Bindung von SR-Proteinen an exonische Sequenzen auch eine Spleißinhibition hervorrufen (Pozzoli, Sironi, 2005; Long, Caceres, 2009). Han et al (2011) zeigten, dass ein Exoneinschluss bzw. -ausschluss sowohl von der Bindung der SR-Proteine in ein alternatives oder flankierendes konstitutives Exon abhängt, als auch die Mitwirkung mindestens eines weiteren SR-Proteins benötigt.

Je nach Phosphorylierungsstatus der RS-Domäne wird nicht nur die Funktion, sondern auch die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine reguliert, sodass diese an vielen weiteren Prozessen beteiligt sind, wie mRNA-Export, Genomstabilisierung, Abbau fehlerhafter RNA, Translation, aber auch Apoptose (Long, Caceres, 2009; Shepard, Hertel, 2009; Twyffels et al, 2011; Shin, Manley, 2004; Graveley, 2000).

Sowohl der Kontakt mit MV als auch die Hemmung der PI3-Kinase inhibieren die Phosphorylierung und infolgedessen die Aktivierung der SR-Proteine sowie deren nukleäre Anreicherung in PMA/ Ionomycin-stimulierten T-Zellen (Avota et al, 2006).

1.6 Vorarbeiten zu dieser Arbeit

1.6.1 Generierung der mRNAs für den Exon Array

Da alternatives Spleißen in T-Zellen gerade auch für die Funktionalität essentiell ist (Abschnitt 1.5.2 - CD44, CD45 - und Abschnitt 1.5 - SIP110) und bei MV-Kontakt auch SR-Proteine, die als Spleißregulatoren wirken, beeinflusst werden, sollten in einem Modell für die PI3K-abhängigen T-Zell-Suppression Veränderungen der Exonmuster zwischen PI3K-inhibierten und normalen T-Zellen untersucht werden. Um diese Veränderungen der frühen Transkription im kompletten Genom mit Hilfe des Exon Human 1.0 ST Arrays zu analysieren, wurden in Vorarbeit von Meena Balakumari Narayanan T-Zellen aus den PBMCs von sieben unabhängigen Spendern gewonnen. Jeder Ansatz wurde halbiert, wobei nur eine Hälfte mit dem PI3K-Inhibitor behandelt wurde, gefolgt von der Stimulation mit PMA/ Ionomycin. Daraus hervorgehende Proben wurden mit S (stimuliert) und I (inhibiert/ stimuliert) bezeichnet. Nach der Selektion geeigneter RNAs für die Analyse wurden die gepaarten Ansätze von fünf Spendern von Margarete Göbel (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) für den *Whole Transcript Sense Target Labeling Assay* und die Analyse mit dem Exon Human 1.0 ST Array eingesetzt, mit dem Expressionsprofile auf Genomebene, was einem herkömmlichen Microarray gleichgesetzt werden kann, aber auch auf Exonebene dargestellt werden können. Ebenfalls können alternative Spleißereignisse auf der Ebene des gesamten Genoms erfasst werden, da jedes Exon oder auch schon ein Teil davon als individuelles Objekt betrachtet werden kann. Diese

genomische Transkriptanalyse zusammen mit statistischen Technologien zur Analyse der Arraydaten kann von entscheidender Bedeutung bei der Aufklärung funktioneller Spleißregulationsmechanismen sein (Yoshida et al, 2006).

1.6.2 Prozessierung der im Exon Array gewonnenen Daten

Die Datenprozessierung wurde von Dr. Susanne Kneitz (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) durchgeführt. Auf dem gesamten Array wurden 35685 verschiedene Transkripte entsprechend der Ensemble-Annotation getestet, von denen nur die *Core*-Probe Sets berücksichtigt wurden. Diese Transkriptcluster beinhalten alle RefSeq-Transkripte und vollständigen mRNAs. Nachdem zusätzlich noch alle Exons und Transkripte verworfen wurden, die in beiden gepaarten Proben nicht exprimiert wurden, blieben 283927 mit den Transkriptcluster IDs übereinstimmende Probe Sets für weitere Filterschritte übrig. Dadurch kann eine erhöhte Anzahl an falsch-positiven Genen vermieden werden (Whistler et al, 2010 a). Bei Plots zur Qualitätskontrolle wurden die Proben eines Spenders als Ausreißer identifiziert und für die weitere Analyse nicht berücksichtigt.

Für die Identifikation alternativ gespleißter Gene wurde der Spleißindex (SI) für jedes Probe Set berechnet. Dazu wurde das Log-Verhältnis (*log fold change*, logFC) der Intensitäten des Probe Sets und des Gens ermittelt. Unter der Annahme, dass alternatives Spleißen eines Gens mit dem Streuungsgrad des SI der Probe Sets zusammenhängt, wurde das Intervall des SI für jedes Gen ermittelt. Dabei ist der SI der Unterschied von der Expression eines einzelnen Probe Sets zur Durchschnittsexpression des gesamten Gens. Je stärker sich dieser ermittelte Quotient unterscheidet, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gen reguliert wird. Mit Hilfe der Binären für den SI wurde für jedes Probe Set ermittelt, ob es reguliert oder nicht reguliert ist. Um als alternativ gespleißt eingeordnet zu werden, mussten die SI der gepaarten Proben eine ausreichende Differenz zeigen und 10 % aller Probe Sets sich von der durchschnittlichen Expression des ganzen Gens unterscheiden. Mittels dieser Filter wurden 6156 Transkripte als alternativ gespleißt identifiziert. Nach dem Entfernen möglicher falsch-positiver alternativ gespleißter Gene und erneutem Filtern mit den zwei bereits verwendeten Bedingungen blieben 2192 Transkripte übrig, die als alternativ gespleißt eingestuft wurden (Riedel et al, 2013).

1.7 Fragestellung

Interagiert das Masernvirus mit T-Zellen, wird die Aktivierung der TCR-Signalkaskade gestört. Durch diesen Kontakt löst das MV über einen noch unbekanntem Rezeptor ein Signal aus, das zur Aktivierung von Sphingomyelinasen und zu Ceramidakkumulation in der T-Zell-Membran führt. Dadurch wird die Reorganisation des Aktinzytoskeletts beeinträchtigt, sodass keine für die Polarisation notwendigen Membranausstülpungen gebildet werden können und die Motilität blockiert wird (Gassert et al, 2009). Ein wesentliches Zielmolekül dieser Hemmung ist die PI3-Kinase, die zur Aufhebung der T-Zell-Aktivierung führt. Dadurch werden nachgeschaltete (*downstream*) Signalwege sowie der Eintritt in den Zellzyklus, aber auch die Genexpression reguliert. Ein besonders wichtiger

1 Einleitung

downstream-Effektor ist die Protein-Serin/Threonin-Kinase Akt, auf dessen essentielle Bedeutung zum Beispiel bei der Aufrechterhaltung des Zellzyklus bereits in Abschnitt 1.4 eingegangen wurde. Infolgedessen werden die Aktivität spleißregulatorischer Faktoren, wie der SR-Proteine, deren nukleäre Akkumulation und die Spleißmuster von mRNAs verändert, wie zum Beispiel bei der alternativ gespleißten SHIP1-Isoform SIP110. Im Vergleich zu SHIP1 handelt es sich bei SIP110 um eine dauerhaft membrangebundene, aktive Phosphatase, die kontinuierlich den PIP₃-Gehalt der Zelle vermindert, durch die Umwandlung von PIP₃ in PIP₂ das PI3K-Signal terminiert und infolgedessen die Rekrutierung von PH-Domänen enthaltenden Proteinen erschwert (Harris et al, 2008; Avota et al, 2004; Avota et al, 2006). Daher liegt die Annahme nahe, dass während dieser PI3K-abhängigen T-Zell-Suppression neue Genprodukte mit verändertem Spleißmuster gebildet werden, die aktiv an der T-Zell-Suppression beteiligt sind. So unterbricht zum Beispiel das alternative SHIP1 Spleißprodukt SIP110 tatsächlich die TCR-gesteuerte Expansion und Proliferation in T-Zellen (Avota et al, 2006).

Um PI3K-induziertes alternatives Spleißen oder differentielle Regulation auf Genomebene in T-Zellen zu untersuchen, können folglich Vergleichsanalysen verschiedener durch den Exon Array ermittelter Exonmuster zwischen PI3K-inhibierten und normalen T-Zellen eingesetzt werden, die Aufschluss über unterschiedliche, bislang unbekannte Spleißvarianten geben. Solche neuen Spleißvarianten könnten auch den Zellzyklus oder die Zellviabilität regulieren und demzufolge als genetische Biomarker für die MV-induzierte Immunsuppression Verwendung finden, aber auch durch Überexpression Veränderungen auf T-Zell-Funktionen verursachen und z.B. als T-Zell-Silencer agieren. Diese Spleißvarianten zu identifizieren sowie weitere funktionell für die MV-vermittelte Immunsuppression relevante Kandidaten zu finden und zu charakterisieren, war Ziel dieses Projekts.

2 Material

2.1 Verwendete Organismen

Alle verwendeten Zelllinien und Bakterien standen im Institut für Virologie Würzburg zur Verfügung.

2.1.1 Zelllinien

Tab. 2.1 verwendete Zelllinien: RPMI - Roswell Park Memorial Institute, FCS - fetales Kälberserum, DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium.

Zelllinie	Zelltyp, Ursprung	Medium
BJAB	humane EBV-negative lymphoblastoide B-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS
B95a	EBV-transformierte B-Zelllinie, Krallenaffe (<i>Callithrix jacchus</i>), semiadhärent	RPMI 1640 mit 5 % FCS
HEK293T	humane embryonale Nierenepithelzelllinie mit stabiler Expression des SV 40 T-Antigens, semiadhärent	DMEM mit 10 % FCS + 0,6 % Glutamin
A301	humane HTLV-1-negativ lymphoblastoide T-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS
HuT-78	humane lymphoblastoide T-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS
H9	humane lymphoblastoide T-Zelllinie, klonales Derivat von HuT-78, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS
Jurkat	humane lymphoblastoide T-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS
TAXI	Tax-immortalisierte T-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS
MOLT-4	humane lymphoblastoide T-Zelllinie, Suspensionszellen	RPMI 1640 mit 10 % FCS

2.1.2 Primäre Zellen

Primäre Zellen wurden aus Leukozytendepletionsfiltern isoliert (Abschnitt 3.1.5), welche von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg bereitgestellt wurde. Der Gebrauch dieses Blutes wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt.

2.1.3 Kompetente Bakterien

Für Transformationen zur Amplifikation von Plasmiden wurden *E. coli* Top10 (Invitrogen) oder *E. coli* XL10-Gold (Stratagene) verwendet.

2.2 Viren

Das verwendete Virus Wildtyp Fleckenstein (WTF) wurde in BJAB-Zellen vermehrt (Abschnitt 3.2.1).

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Expressionsvektor pEGFP-N1

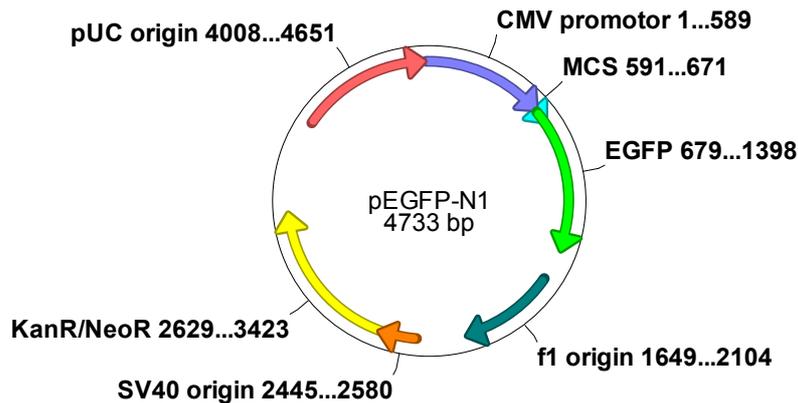


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pEGFP-N1.

2.3.2 Primer

Die Primer (FW - vorwärts, REV - rückwärts) für die Validierung und die Überprüfung der Regulation im Virus-inhibierten System wurden mit Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>), die für die CDS-Sequenz und die Klonierung per Hand gewählt und über Sigma-Aldrich geordert.

Tab. 2.2 Primer für die Validierung des Exon Arrays: alt. spl. – bezieht sich auf den alternativ gespleißten Bereich, const. – bezieht sich auf den konstanten Bereich.

	Primer	Sequenz 5' - 3'	Lokalisation
<u>Alternativ gespleißt</u>			
TRIM47	FW alt. spl. 162bp	CAAGACCTCGAGAGTACGAACC	Exon 5
	REV alt. spl. 162bp	GGGGTAGTTGATAGGACACAGC	Exon 6
	FW const. 173bp	GGCTAGAGGAGAGCCTGTGC	Exon 1
	REV const. 173bp	GCTCAGGACTTTGGACTGCTC	Exon 2
WRAP53	FW alt.spl. 174bp	G TTCCTGCATCTTGACCAATAG	Exon 4
	REV alt.spl. 174bp	GGGCTGAGGACATCAGAGAATA	Exon 5
	FW const. 184bp	G TTCCTAGTGAGTGGCAGCAC	Exon 9
	REV const. 184bp	CTCAGGAAACACACGCTGAC	Exon 10

2 Material

CHN1	FW alt.spl. 198bp	GCCACACTGGTGTGAATACTGT	Exon 9
	REV alt.spl. 198bp	CGCTTAGTGGTATGTGCTTTCA	Exon 10
	FW const. 151bp	GATGAATATAGACCTCCTGTTTG	Exon 2
	REV const. 151bp	CTGCTTCTCTGGAGATCATGC	Exon 5
TPRG1	FW alt.spl. 522bp	GCTTCTGGCTCTTGACAAAGAT	Exon 3
	REV alt.spl. 522bp	CAAGGGAATAGCCAAGTTTGTT	Exon 6
	FW const. 538bp	TTATCTGAGCCAATCACACCTC	Exon 1
	REV const. 538bp	ATAGACAGCGCTCAGAGGAATC	Exon 4
STAP2	FW alt.spl. 601bp	CTGCTTCTGGGCACCTATAC	Exon 5
	REV alt.spl. 601bp	CATCTTGGTTCTCATAGTCAACAGC	Exon 10
	FW const. 569bp	CGTCTAGCCAGGACAAGCTG	Exon 10
	REV const. 569bp	TCCTGGGGTCAGAGTTTTAATC	Exon 13
IL4I1	FW alt.spl. 780bp	CTGTCCTGGGCTAACCATAAAG	Exon 6
	REV alt.spl. 780bp	GCGAAGCTGAGATAGAAGAAGC	Exon 13
	FW alt.spl. 212bp	CAAGTTCACCCAGTACGACAAG	Exon 10
	REV alt.spl. 212bp	CAAACCTTCTTCATCGCCTTTCT	Exon 12
	FW const. 332bp	CCTTCTGTGGCAGTTAGGAGAC	Exon 3
	REV const. 332bp	CTTTATGGTTAGCCCAGGACAG	Exon 6
	FW const. 213bp	ACAGTGGAGGGCAGTGGAGA	Exon 7
	REV const. 213bp	GCAGCTGCTCATAGTCAGGAT	Exon 9
Primer		Sequenz 5' - 3'	Lokalisation
<u>Differentiell reguliert</u>			
DTL	FW 125bp	GCAAGTGAATCAAATCAGTGGA	Exon 8
	REV 125bp	CCACAGTAACACTTTGCTGGAA	Exon 9
	FW 154bp	GCCTTAGTCCAGATGACCAGTT	Exon 11
	REV 154bp	TTTGTGAAGTCAGATGGACACC	Exon 16
SLFN5	FW 172bp	AGACAATTGCCACAAGAGAAT	Exon 2
	REV 172bp	AGTAGCGTTTCTGCTGCTCTTT	Exon 3
	FW 227bp	CCAGAGAGTTGTTTGTTTCATGG	Exon 4
	REV 227bp	AATGTGCTGGATGTGTTCAAAG	Exon 5

2 Material

PFKM	FW 718bp	GACTCCGAGCTGCCTACAAC	Exon 5
	REV 718bp	CTGACTACACAGGCTGGGGTAT	Exon 10
	FW 758bp	TCTAAGAGTGGTTCGCACACAG	Exon 12
	REV 758bp	CCCTCCTCAGAGTACAGGTTGA	Exon 19
DOK2	FW 644bp	GGAGTGAAGGAGAGAGCTGAAG	Exon 1
	REV 644bp	CAGAAACCTGTAGGGCCAGTC	Exon 4
	FW 602bp	CCACAAGGAATTTGCTGTGAC	Exon 4
	REV 602bp	GCTCATCGTATATGTGGTCAGG	Exon 5
RAD51 AP1	FW 538bp	TCACAGTTTGACCACTCTGACA	Exon 2
	REV 538bp	CACTATCACCATCACTGCCTTC	Exon 8
	FW 748bp	AAGATTCTTCTGGAAGGCAGTG	Exon 8
	REV 748bp	CGCTCTTCACAAGGAAAGGTAT	Exon 12
Primer		Sequenz 5' - 3'	Lokalisation
<u>Kontrollprimer für RT-PCR</u>			
β-Aktin	FW 514 bp	GCACTCTTCCACCTTCCTTCC	
	REV 514 bp	TCACCTTCACCGTTCCAGTTTT	

Tab. 2.3 zusätzliche Primer für die Validierung und die Überprüfung der Regulation in Zelllinien: alt. spl. – bezieht sich auf den alternativ gespleißten Bereich, const. – bezieht sich auf den konstante Bereich, N/A - nicht vorhanden.

Primer		Sequenz 5' - 3'	Lokalisation
<u>Alternativ gespleißt</u>			
FBXO6	FW alt. spl. 202bp	GGGAGACAGCTTCAGGACAC	Exon 1
	REV alt.spl. 202bp	GGTCATGAGGTCGATGAGGTC	Exon 2
	FW const. 217bp	CCAGCTGGTGGACCTTGTAG	Exon 4
	REV const. 217bp	ATTGTTCCACTGTTGGATGGTC	Exon 5
BRSK1	FW alt.spl. 226bp	GTAAACTCGGGTCCACTG	Exon 4
	REV alt.spl. 226bp	CCAGGTAGTCGAATAGCTCACC	Exon 6
	FW const. 197bp	GTGAGGAGGAGAACCAAGAAAA	Exon 4
	REV const. 197bp	GGTGATGCTCAGGACTTCAT	N/A

2 Material

HDAC9	FW alt.spl. 219bp	GATCAGCTCAGTGGATGTGAAG	Exon 2	
	REV alt.spl. 219bp	CGTGTCAAGTTCTCATGCTGTT	N/A	
	FW const. 153bp	GTGACACCATTTGGAATGAGC	Exon 20	
	REV const. 153bp	CTGTGGATTCTTCAGCGTGAT	N/A	
Primer		Sequenz 5' - 3'	Lokalisation	
<u>Differentiell reguliert</u>				
HELLS	FW 246bp	GGGATTGGGTAAGACAGTTCAG	Exon 10	
	REV 246bp	GACGTGATTACCACAGGATGAA	Exon 11	
	FW 169bp	CACAAATGACAAGCATGTTGGA	Exon 20	
	REV 169bp	CCACCAGCTCGTGTACTCACTA	Exon 21	
	FW 750bp	TCAGAGGTCATGTCAAAGAGG	Exon 7	
	REV 750bp	GTTTGCAAGGGAGTACCAGTC	Exon 13	
	FW 725bp	TCCTATAGACCCTGTTACACAAGAA	Exon 18	
	REV 725bp	CCATCTTCTCTTTAATTGGTCCTG	Exon 24	
	SESN3	FW 246bp	GAGTGGTTGAATGGTTTGAAT	Exon 5
		REV 246bp	CTTGCCAAAGCATGATAATGTG	Exon 6
FW 169bp		GCTGCGCAGAGCTTTATTTAAC	Exon 9	
REV 169bp		TTGAACTGCCGCCAGTAACTAT	Exon 10	
FW 724bp		CCAACTACCTGCTCTGTACCAA	Exon 2	
REV 724bp		AAGTTGCTGCCTGAAAGAGATG	Exon 6	
FW 459bp		GGGTATGAAGACTTTGCCAGAC	Exon 8	
REV 459bp		GGCACGAAGAGCATAAAGAAGT	Exon 11	
ARHGEF6	FW 170bp	CCTTTATTCAGGGGTCAATTC	Exon 5	
	REV 170bp	GCCCTGAAACTGTGCTAGAAAC	Exon 6	
	FW 211bp	TCCATTGTAACAACAACCAGGA	Exon 18	
	REV 211bp	GGTGCAGGTCGTAGACAACCTTA	Exon 19	
	FW 562bp	GAGATGACGGAAAATGGAAGTC	Exon 7	
	REV 562bp	CTGAAGGATGGTTTGCACAGTA	Exon 12	
	FW 511bp	TTAGACCATCAGCAGCACTAGG	Exon 19	
	REV 511bp	CTACTGGACTCGCCTCGAATAC	Exon 25	

2 Material

DNMBP	FW 178bp	AGCTACCAAGAAGCCATTTGAG	Exon 19
	REV 178bp	CAAGTCTTGAGCAGCATTGAAG	Exon 20
	FW 196bp	GGAGAAGAGAGCCAAGGTCATA	Exon 9
	REV 196bp	GATTTCCAGAGCAGCCAATAAT	Exon 10
	FW 702bp	GGATGAGCTTGAGGGAACATAC	Exon 11
	REV 702bp	GTGAAGAGCTGGTCACTGATGT	Exon 17
	FW 707bp	AGCTACCAAGAAGCCATTTGAG	Exon 19
	REV 707bp	CGGAGTAGCCAACACTATTTCTGG	Exon 21

Tab. 2.4 Primer für die CDS-Sequenz, der zu klonierenden Gene: T_m - Schmelztemperatur.

Primer	Sequenz 5' - 3'	T_m
FBXO6 882bp FW	ATGGATGCTCCCCACTCCAAAG	70,2 °C
FBXO6 882bp REV	TCAGAAAATCTGGACAACAGCTC	64,4 °C
SLFN5 2676bp FW	ATGAGTCTTAGGATTGATGTGGA	61,5 °C
SLFN5 2676bp REV	TCACACAGAAGCCTTCAGAATAT	61,6 °C
FAM184A 3423bp FW	ATGGCGACCCCGGGCATGAG	77,3 °C
FAM184A 3423bp REV	TCAGAATGTGAAGTACCGGGCA	68,7 °C
LAT2 732bp FW	ATGAGCTCGGGGACTGAAC	64,3 °C
LAT2 732bp REV	CTAGGCTTCTGTGGCTGCC	65,0 °C

Tab. 2.5 Primer für die Klonierung in den Expressionsvektor pEGFP-N1: T_m - Schmelztemperatur.

Primer	Sequenz 5' - 3'	T_m
FBXO6 903bp FW (<i>XhoI</i>)	AGATCTCGAGATGGATGCTCC	64,6 °C
FBXO6 903bp REV (<i>HindIII</i>)	ATTCGAAGCTTGAAAATCTGGAC	64,3 °C
SLFN5 2697bp FW (<i>XhoI</i>)	AGATCTCGAGATGAGTCTTAGGA	60,1 °C
SLFN5 2697bp REV (<i>HindIII</i>)	ATTCGAAGCTTCACAGAAGCCTT	66,2 °C
Fam184A 3443bp FW (<i>XhoI</i>)	CAGATCTCGAGATGGCGACCCCGGG	80,7 °C
Fam184A 3443bp REV (<i>EcoRI</i>)	CTGCAGAATTCGGAATGTGAAGTACCGGG	76,4 °C
LAT2 750bp FW (<i>XhoI</i>)	AGATCTCGAGATGAGCTCGGG	67,0 °C
LAT2 750bp REV (<i>HindIII</i>)	ATTCGAAGCTTGGCTTCTGTGG	68,5 °C

2 Material

Tab. 2.6 Primer für Überprüfung der Regulation ausgewählter Gene im Virus-inhibierten System: alt. spl. – bezieht sich auf den alternativ gespleißten Bereich, const. – bezieht sich auf den konstanten Bereich.

Primer		Sequenz 5' - 3'	Lokalisation
<u>Alternativ gespleißt</u>			
FBXO6	FW alt.spl. 202bp	CCAGCTGGTGGACCTTGTAG	Exon 4
	REV alt.spl. 202bp	ATTGTTCCACTGTTGGATGGTC	Exon 5
	FW const. 217bp	GGGAGACAGCTTCAGGACAC	Exon 1
	REV const. 217bp	GGTCATGAGGTCGATGAGGTC	Exon 2
WRAP53	FW alt.spl. 174bp	GTTCTGCATCTTGACCAATAG	Exon 4
	REV alt.spl. 174bp	GGGCTGAGGACATCAGAGAATA	Exon 5
	FW const. 184bp	GTTCTAGTGAGTGGCAGCAC	Exon 9
	REV const. 184bp	CTCAGGAAACACACGCTGAC	Exon 10
<u>Differentiell reguliert</u>			
SLFN5	FW 172bp	AGACAATTGCCACAAGAGAAT	Exon 2
	REV 172bp	AGTAGCGTTTCTGCTGCTCTTT	Exon 3
	FW 227bp	CCAGAGAGTTGTTTGTTCATGG	Exon 4
	REV 227bp	AATGTGCTGGATGTGTTCAAAG	Exon 5
HELLS	FW 246bp	GGGATTGGGTAAGACAGTTCAG	Exon 10
	REV 246bp	GACGTGATTACCACAGGATGAA	Exon 11
	FW 169bp	CACAAATGACAAGCATGTTGGA	Exon 20
	REV 169bp	CCACCAGCTCGTGTACTCACTA	Exon 21
<u>Kontrollprimer für RT-PCR</u>			
β-Aktin	FW 514 bp	GCACTCTCCACCTTCCTTCC	
	REV 514 bp	TCACCTTCACCGTTCCAGTTTT	

Für die Validierung der Genlisten mittels qPCR wurden die geeigneten Housekeeping Gene Ubiquitin C (UBC) und *Tyrosin-3-monooxygenase/tryptophan5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide* (YWHAZ) gewählt und die entsprechenden Primer bei Qiagen bestellt.

2.3.3 siRNA

Die verwendeten siRNAs wurden mit Hilfe des BLOCK-iT™ RNAi Designers von Life Technologies gewählt und über Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 2.7 verwendete siRNAs: ntc - Nukleotidposition der Gensequenz.

siRNA	Sequenz 5' - 3'
SLFN5 siRNA <i>sense</i> (ntc 1570)	GCACAUGGAAGCCCUGUUA
SLFN5 siRNA <i>antisense</i> (ntc 1570)	UAACAGGGCUUCCAUGUGC
FBXO6 siRNA <i>sense</i> (ntc 609)	CCAUCCAACAGUGGAACAA
FBXO6 siRNA <i>antisense</i> (ntc 609)	UUGUCCACUGUUGGAUGG

Das siRNA-Trockenpellet wurde in 100 µl HPLC-H₂O aufgenommen, 1 min bei 90 °C und 1 h bei 37 °C inkubiert, zu je 10 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.4 Größenstandards

Agarosegele: GeneRuler™ 1kb und 100bp DNA Ladder (Fermentas)

SDS-PAGE: Page Ruler™ prestained protein ladder (Fermentas)

2.5 Medien und Zusätze

Alle Medien, ATV, Versene, Glutamin und PBS wurden in der hausinternen Medienküche hergestellt. Das fetale Kälberserum (FCS) von Invitrogen wurde vor der ersten Verwendung zur Inaktivierung bei 56 °C für eine Stunde erhitzt und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.5.1 Eukaryotische Zellen

5,6 % Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

Antibiotika: Penicillin/ Streptomycin (100 I.E./ml, 1 ml pro Röhrchen)

IL-4

Miltenyi Biotech

GM-CSF

Immunex

Lipopolysaccharid (LPS)

Sigma-Aldrich

Fusionsinhibitorisches Peptid (FIP, Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)

Bachem

Die Medien RPMI 1640 und DMEM wurden auf 500 ml immer mit 15 ml 5,6 %-NaHCO₃ gepuffert und mit 1 ml Antibiotika und 25 ml (5 %) bzw. 50 ml (10 %) FCS versetzt. Zusätzlich wurde das DMEM für die Kultur von HEK293T-Zellen mit 0,6 % Glutamin versehen.

2 Material

Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zelllinien wurde hergestellt aus 80 % FCS und 20 % DMSO.

2.5.2 Bakterien

Medium	Zusammensetzung	
LB-Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	Tris HCl (pH 7,5)

Für LB Agar wurde das LB-Medium zusätzlich mit 15 g Agar-Agar versehen. Um Selektionsmedium oder Selektionsagar herzustellen wurde dem autoklaviertem LB-Medium/ -Agar 100 µg/ml des Antibiotikums Kanamycin hinzugefügt.

2.6 Puffer und Lösungen

Die für die folgenden alphabetisch aufgelisteten Puffer verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Applichem, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in aqua dest.
Anodenpuffer – 30 mM	3,6 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l aqua dest., pH 10,4
Anodenpuffer – 300 mM	36 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l aqua dest., pH 10,4
ATV (aus hausinterner Medienküche)	8 g NaCl 0,4 g KCl 1 g D(+)-Glucose 0,58 g NaHCO ₃ 0,5 g Trypsin 0,2 g Versene ad 1 l aqua dest., pH 7,4
FACS-Puffer	PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei) 0,5 % (w/v) BSA 0,02 % (w/v) NaN ₃

2 Material

Kathodenpuffer	5,2 g Hexansäure 3 g Tris 20 % (v/v) Methanol ad 1 l aqua dest., pH 9,4
Milchpuffer	PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei) 5 % (w/v) Magermilchpulver 0,05 % (v/v) Tween-20
Mini-Präparationspuffer	
Lösung 1	5 ml 1 M Tris pH 7,5 2 ml 0,5 M EDTA pH= 8,0 (4 °C) 1 ml RNase 10 mg/ml ad 100 ml aqua dest.
Lösung 2	0,2 M NaOH 1 % SDS ad 150 ml aqua dest.
Lösung 3	3,0 M Kalium-Azetat pH 5,5 mit Essigsäure einstellen
Lösung 4	100 ml 0,1 M Tris pH 6,4 8,8 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 2,6 ml Triton X-100 120 g Geno Cyanate 13,2 ml aqua dest.
Dia Erde	10 g Diatomaceaus Earth 500 µl HCL ad 50 ml aqua dest.
Waschpuffer	10 ml 5 M NaCl 5 ml 1 M Tris pH 7,5 2,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 250 ml aqua dest. 250 ml EtOH
NTE-Puffer	1 mM NaCl 0,1 M Tris, pH 7,4 0,01 M EDTA ad 1 l aqua dest., pH 7,4

2 Material

Paraformaldehyd (PFA, 4 %)	4 g Paraformaldehyd ad 100 ml PBS (Ca^{2+} / Mg^{2+} -frei)
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 2 g KH_2PO_4 ad 1 l aqua dest.
Proteingelpuffer	250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,7
Saccharoselösungen	25 % (w/v) Saccharose in NTE 30 % (w/v) Saccharose in NTE 54 % (w/v) Saccharose in NTE 60 % (w/v) Saccharose in NTE
Saponin-Puffer	FACS-Puffer 0,33 % (v/v) Saponin
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,5 g Tris pH 6,8 0,4 % SDS 6 ml Glycerol 0,6 ml β -Mercaptoethanol 2,4 mg Bromphenol blau ad 20 ml aqua dest.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,5 ad 1 l aqua dest.
Trypanblau	0,25 % (w/v) in PBS (Ca^{2+} / Mg^{2+} -frei)
Versene (aus hausinterner Medienküche)	0,2 g KCl 0,2 g KH_2PO_4 0,572 g Na_2HPO_4 8,2 g NaCl 0,2 g Versene
Waschpuffer für Western Blot	PBS (Ca^{2+} / Mg^{2+} -frei) 0,05 % (v/v) Tween-20

2.7 Enzyme und Reaktionspuffer

Enzyme/ Reaktionspuffer

Restriktionsenzyme (*XhoI*, *Hind III*, *EcoRI*)

Tango-/ R-Puffer (10 x)

T4 DNA-Ligase (5 Weiss u/μl)

T4 DNA-Ligasepuffer (10 x)

50 % PEG 4000 (w/v)

Hersteller

Thermo Scientific

Thermo Scientific

Fermentas

Fermentas

Fermentas

2.8 Antikörper und Farbstoffe

Tab. 2.8 verwendete Antikörper und Farbstoffe: BD - Becton Dickinson, TPB - Torrey Pines Biolabs, WB - Western Blot, IF - Immunfluoreszenz.

Epitop	Klon	Isotyp/ Ursprung	Hersteller	Methode	Verdünnung
<u>Antikörper für die T-Zell-Stimulation</u>					
α-Maus IgG	polyclonal	Ziege	Dianova	αCD3/ CD28 Stimulation	1:40
α-CD3	UCHT1	Maus-IgG ₁ , κ	BD		1:1000
α-CD28	CD28.2	Maus-IgG ₁ , κ	BD		1:1000

<u>Primärantikörper</u>					
α-MV H Serum	H45	Kaninchen-IgG	VIM	WB	1:1000
α-GFP	polyclonal	Kaninchen-IgG	TPB	WB	1:5000

Epitop	Konjugat	Isotyp, Konjugat	Hersteller	Methode	Verdünnung
<u>konjugierter Primärantikörper</u>					
α-human Ki67	B56	Maus-IgG ₁ , κ; PE	BD	FACS	1:50
Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	Maus-IgG ₁ , κ; PE	BD	FACS	1:50

<u>Sekundärantikörper</u>					
Name	Hersteller	Ursprung	Methode	Verdünnung	
α-Kaninchen IgG (H+L) – HRP	Cell signaling	Ziege	WB	1:2000	

<u>Fluoreszierende Farbstoffe</u>				
Name	spez. Färbung von	Hersteller	Methode	Verdünnung
Phalloidin-Alexa 594	F-Aktin	Molecular probes	IF	1:50
AnnexinV-PE	apoptotische Zellen	BD	FACS	1:20
7AAD	tote Zellen	BD	FACS	1:10

2.9 Zytokine

Tab. 2.9 verwendete Zytokine und Chemokine.

Bezeichnung	Hersteller
rekombinantes, humanes SDF-1 α	PeptoTech
GM-CSF	Immunex
humanes IL-4	Miltenyi Biotec

2.10 Kits

Bezeichnung

Amaya® Human T cell Nucleofactor® Kit
 Bicinchoninic Acid (BCA) Kit (Proteinkonzentration)
 Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
 DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit (F-416)
 ECL™ Western Blotting Detection Reagents
 Endofree® Plasmid Purification Maxi Kit
 First Strand cDNA Synthesis Kit
 mit: M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/ μ l)
 RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l)
 illustra™ pureTaq Ready-To-Go PCR Beads
 NucleoSpin® Extract II Kit (PCR Clean-up)
 Phusion High-Fidelity PCR Kit
 RNA 6000 Nano Kit
 RNeasy® Mini Kit
 Whole Transcript Sense Target Labeling Assay

Hersteller

Lonza
 Sigma-Aldrich
 Applied Biosystems
 Finnzymes
 Amersham
 Qiagen
 Thermo Scientific

 GE Healthcare
 Macherey-Nagel
 Finnzymes
 Agilent
 Qiagen
 Affymetrix

2.11 Chemikalien

Allgemeine Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich und Appllichem bezogen. Projekt-spezifische Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt.

Chemikalie

7AAD Staining Solution
 AnnexinV Bindungspuffer (10 x)
 ECL Western Blotting Detection Reagents
 Fibronectin
 Ficoll, Lymphocyte Separation Medium LSM 1077
 Fluorescein Calibration Dye (qPCR)
 Fluoromount-G

Hersteller

Becton Dickinson
 Becton Dickinson
 GE Healthcare
 Sigma-Aldrich
 Amersham
 BioRad
 Southern Biotech

2 Material

Fusionsinhibitorisches Peptid (FIP, Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
GelRed™	Genaxxon
Glycogen (20 µg/µl)	Invitrogen
Hefeextrakt Bacto™	Becton Dickinson
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich
Ingenio® Electroporation Solution	Mirus
jetPEI™ Cationic polymer transfection reagent	Polyplus Transfection
LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenylchromon)	Calbiochem
Magermilchpulver	Sucofin
Page Ruler™ prestained protein ladder	Fermentas
Phalloidin-Alexa 594	Invitrogen
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail (complete, EDTA-free)	Roche
[methyl- ³ H] Thymidine (37 MBq in 1000 µl)	Hartmann Analytik
TRIzol® RNA Isolation Reagents	Life Technologies
Trypton	Becton Dickinson

2.12 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial

Allgemeine Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien wurden vom Laborversand Hartenstein, Greiner bio-one und Eppendorf bezogen. Projekt-spezifische Verbrauchsmaterialien sind im Folgenden aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienzentrifugenbehälter	Nalgene
Chamber Slides, LabTek II™	Nunc
Einfrierboxen Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltbreite mit Spezialpipette)	VWR
FACS-Röhrchen	BD-Falcon
Filtermatten	Perkin Elmer
µ-Slide VI ibiTreat	Ibidi
µ-Slide VI uncoated	Ibidi
µ-Slide 8 well ibiTreat	Ibidi
µ-Slide 8 well uncoated	Ibidi
Nylonwolle	G. Kisker GbR
UltraPure™ Agarose	Invitrogen
Ultrazentrifugenröhrchen (25 x 89 mm)	Beckman
Whatman Nitrozellulosetransfermembran Protran® BA83	GE Healthcare

2.13 Geräte

Im Folgenden sind projektrelevante Geräte aufgeführt.

Gerät

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer
Bakterienzentrifuge Beckman J2-MC (Rotor: JA-10)
Bioanalyzer
Dark Box
FACS Calibur - Durchflusszytometer
Fluidic Station 450
Fluoreszenzmikroskop DM IRE2
GeneChip Scanner 3000 7G
Gradientenzykler Mastercycler gradient 5331
Harvester 96®
iCycler IQ
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta
Lichtmikroskop Labovert FS
Nucleofector™ II Device
PCR-Maschine, PTC-200 Thermo Cycler
Photometer
Realtime-Thermocycler LightCycler 2.0 real-time PCR System
Szintillationszähler MicroBeta2™
Ultrazentrifuge Sorvall® Discovery™ 90SE (Rotor: Surespin 33)
UV-Lichttisch Fluo-Link
UV-Transilluminator Gel Jet Imager

Hersteller

Applied Biosystems
Beckman
Agilent
Fujifilm
Becton Dickinson
Affymetrix
Leica
Affymetrix
Eppendorf
Tomtec
BioRad
Zeiss
Leitz
Lonza
MJ Research (BioRad)
Eppendorf
Roche
Perkin Elmer
Hitachi
Vilber Lourman
Intas

2.14 Software

Programm

AIDA
ApE – A plasmid Editor v1.17
Cell Quest Pro
Excel – Office 2010
FlowJo
iCyclerIQ Multicolor Real Time PCR Detection System Version 3.1
Intas GDS
LSM Image Browser
Powerpoint – Office 2010
Photoshop® CS5
R (freie Programmiersprache für Statistik)
Word – Office 2010

Hersteller

Raytest
Wayne Davis
Becton Dickinson
Microsoft
Tree Star Inc.
BioRad
Intas
Carl Zeiss
Microsoft
Adobe
Bioconductor project
Microsoft

3 Methoden

3.1 Zellkultur und -isolation

Die verwendeten primären Zellen und Zelllinien (2.1.2 und 2.1.1) wurden in Zellkulturflaschen oder -platten im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

3.1.1 Zellkultur von Suspensionszellen

BJAB-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS in aufrecht stehenden Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Weiterkultivierung wurden sie abzentrifugiert (5 min, 300 g, Raumtemperatur (RT)), in frischem Medium resuspendiert und mit einer 1:5 Verdünnung in neue Zellkulturflaschen überführt.

Humane, primäre mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und T-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS gehalten.

3.1.2 Zellkultur adhärenter Zelllinien

Die semiadhärente Zelllinie HEK293T wurde in DMEM mit 10 % FCS und 0,6 % Glutamin in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert, die semiadhärente Zelllinie B95a in RPMI 1640 mit 5 % FCS. Zur Weiterkultivierung wurden die konfluenten Zellen nach einmaligem Spülen mit ATV-Lösung abgelöst, abzentrifugiert (5 min, 300 g, RT), in frischem Medium resuspendiert und mit einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzahl wurde mit Hilfe des Vitalfarbstoffs Trypanblau ermittelt. Dafür wurden die Zellen im Medium resuspendiert, ein Aliquot 1:4 oder 1:10 mit Trypanblau verdünnt und in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und können anhand der Blaufärbung unter dem Lichtmikroskop identifiziert werden. Daraufhin können die lebenden, ungefärbten Zellen in allen vier Quadranten gezählt und die Zellzahl mittels der folgenden Gleichung berechnet werden.

Lebendzellzahl pro ml = Mittelwert aus vier Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10⁴

Formel 3.1 Berechnung der Lebendzellzahl.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

5 x 10⁶ Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 300 g, RT), das Pellet in 0,5 ml eisgekühltem FCS resuspendiert, mit 0,5 ml Einfriermedium versetzt und in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt. Dieses Röhrchen wurde über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox auf -80 °C abgekühlt und anschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3 Methoden

Zur Reaktivierung wurden die kryokonservierten Zellen unter fließendem, kaltem Wasser fast komplett aufgetaut, in 8 ml eiskaltem Medium aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 300 g, RT). Das Pellet wurde einmal mit 10 ml eisgekühltem Medium gewaschen, anschließend in 10 ml 37 °C warmen Medium resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3.1.5 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) umfassen einkernige Blutzellen wie T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und natürliche Killer-Zellen. Für die Isolation von PBMCs wurden die durch Zentrifugation angereicherten Blutzellen aus Leukozytendepletionsfiltern verwendet. Die ca. 7 ml Blut pro Filter wurden mit Versene auf 50 ml aufgefüllt und jeweils die Hälfte auf 9 ml Ficoll-Plaque vorsichtig mit einer Plastikpipette überschichtet. Durch die anschließende Dichtegradientenzentrifugation (2 min Anlauf, 30 min, 300 g, 2 min Bremse, RT) wurden die Erythrozyten von den PBMCs separiert. Die angereicherten PBMCs (milchige Interphase) wurden abgenommen, dreimal mit 37°C warmen PBS/- gewaschen (5 min, 300 g, RT), das Pellet in 10 ml 10 % RPMI 1640 resuspendiert und für die Isolierung von Monozyten (Abschnitt 3.1.6) und T-Zellen (Abschnitt 3.1.7) weiterverwendet.

3.1.6 Generierung humaner dendritischer Zellen (DCs) aus Monozyten

Dazu wurden zwei 175 cm² Zellkulturflaschen mit 45 ml 10 % RPMI 1640 befüllt, jeweils mit 5 ml PBMC-Suspension aus Abschnitt 3.1.5 versehen und liegend 1 - 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Suspensionszellen abgenommen, auf eine Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt und für die Aufreinigung von T-Zellen verwendet (Abschnitt 3.1.7). Die adhärenz Monozyten wurden dreimal mit PBS/- gewaschen und mit 10 % RPMI 1640 über Nacht im Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieser Zeit lösten sich die Monozyten vom Plastik und befanden sich dann im Überstand. Daraufhin wurden die Monozyten mit einer Konzentration von 5 x 10⁵ Zellen/ml differenziert, indem dem Medium die Zytokine GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, 500 U/ml) und IL-4 (250 U/ml) zugesetzt wurden. Nach zwei Tagen wurde das zytokinhaltige Medium gewechselt. Nach weiteren drei Tagen in zytokinhaltigem Medium verlieren die Monozyten den zelltypischen Oberflächenmarker CD14 und exprimieren die für unreife DCs typischen Oberflächenmarker CD1a, CD11c, CD80^{niedrig}, CD86^{niedrig}, HLA-DR^{niedrig}. Zur Ausreifung der DCs wurden dem zytokinhaltigen Medium 100 ng/ml LPS hinzugefügt.

3.1.7 Anreicherung primärer T-Zellen mittels Nylonwolle

Für die Anreicherung von T-Zellen nutzt man deren geringere Bindungsaffinität an Nylonwolle in Abhängigkeit von Temperatur und FCS-Gehalt des verwendeten Mediums im Vergleich zu allen anderen mononukleären Zellen.

50 ml Spritzen wurden mit 2 g Nylonwolle befüllt und autoklaviert. Diese wurden als Säule verwendet und vor Gebrauch am unteren Ende mit einem Stück Plastikschauch versehen, der mit einer Metallklemme verschlossen werden konnte. Die Säule wurde mit 5 % RPMI 1640 äquilibriert, mit einer sterilen Pipette alle Luftblasen entfernt und mit neuem Medium versehen. Die nicht-adhärenz

3 Methoden

PBMCs (Abschnitt 3.1.6) wurden gezählt, $1,5 \times 10^8$ Zellen abgenommen, pelletiert (5 min, 300 g, RT), resuspendiert in 7 ml 5 % RPMI 1640 und auf die Säule gegeben. Daraufhin wurde das Medium solange langsam abgelassen, bis die komplette Zellsuspension in die Nylonwolle eingedrungen war. Um eine Austrocknung der Nylonwolle zu vermeiden, wurde diese mit 5 - 10 ml frischem 5 % RPMI 1640 vorsichtig überschichtet, die Säule sowie der Nylonschlauch mit abgeflammter Alufolie verschlossen und 40 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die ungebundenen T-Zellen von der Säule langsam eluiert. Die Säule wurde mit 25 ml warmen 5 % RPMI 1640 gewaschen und der komplette Durchfluss in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach der Zentrifugation (5 min, 300 g, RT) wurden die angereicherten T-Zellen in 10 % RPMI 1640 mit einer Konzentration von $2 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Anzucht von Viren

Die Zucht des Wildtypstammes WTF (Wildtyp Fleckenstein) erfolgte auf BJAB-Zellen. Für die Präinfektion wurden 5×10^7 Zellen abzentrifugiert (5 min, 225 g, RT), in 7 ml serumfreiem RPMI 1640 resuspendiert, mit einer Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI) von 0,01 infiziert und auf einem Wippschüttler für 2 - 4 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Pelletieren (5 min, 225 g, RT) wurden die infizierten Zellen in 100 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS resuspendiert und 2 - 3 Tage liegend im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden je 10 ml dieser Präinfektion auf zehn Zellkulturflaschen mit 70 % konfluenten BJAB-Zellen verteilt und bei 37°C inkubiert bis ca. 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) zeigten. Unter dem CPE versteht man bei den *Paramyxoviridae* die Ausbildung mehrkerniger Riesenzellen (Synzytien). Zusätzlich wurden fünf weitere Zellkulturflaschen mit nicht-infizierten BJAB-Zellen als Negativkontrolle (Mock) verwendet. Am Folgetag wurde die Hauptinfektion geerntet, indem die Zellen abzentrifugiert (5min, 225 g, RT) und in jeweils 1 ml eisgekühltem PBS aufgenommen wurden. Die so hergestellten 5 ml der Mock-Kontrolle und 10 ml der Viruslösung wurden bei -80 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit dem Dounce-Homogenisator 10 x homogenisiert und anschließend die Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min, 1400 g, 4 °C). Nach wiederholter Zentrifugation wurde vom Überstand ein Aliquot als ungereinigtes Virus in Kryokonservierungsröhrchen abgenommen und bei -80 °C eingefroren. Die übrige Virussuspension wurde vollständig für die Virusaufreinigung (Abschnitt 3.2.3) eingesetzt. Die Bestimmung des Virustiters (Abschnitt 3.2.2) erfolgte mittels der Endpunkttitration TCID₅₀.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters TCID₅₀

Mit dem TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose of 50%*) wird ermittelt, bei welchem Verdünnungsgrad einer virushaltigen Lösung die Hälfte der beimpften Zellkultur tatsächlich infiziert wird. Für die Virustitration wurden 5×10^4 B95a-Zellen pro Napf in zwei 96-Napf-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Danach wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe des ungereinigten Wildtypvirus WTF in serumfreiem RPMI 1640 von 10^{-1} bis 10^{-8} hergestellt. Acht Nöpfe jeder Platte

3 Methoden

wurden mit je 100 µl einer Verdünnungsstufe infiziert – angefangen mit der größten Verdünnung – und diese Infektion für 1 - 2h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden zur Kontrolle jeweils acht Näpfe jeder Platte mit 100 µl RPMI 1640 ohne FCS bzw. mit 100 µl Mock-Kontrolle versehen und auch 1 - 2h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt und 100 µl RPMI 1640 mit 5 % FCS zu den Zellen gegeben, ausgehend von den Näpfen mit der größten Virusverdünnung. Drei Tage nach der Infektion wurden in jedem Napf die Zellen im Lichtmikroskop auf die Ausbildung des CPEs hin überprüft. Anhand der Anzahl der Näpfe mit CPE konnte der Virustiter mit Hilfe der folgenden Formeln berechnet werden.

$$\log TCID50 = x_{p=1} + \frac{1}{2} d - d \sum p$$

Formel 3.2 Formel zur Bestimmung der 50 % Endpunkttitration: $x_{p=1}$ - dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist, d - dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors, p - Anteil der CPE positiven Näpfe pro Verdünnungsstufe, $\sum p$ - Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE; berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID50 = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

Formel 3.3 Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID50: d - dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe, p - Anteil an CPE positiven Näpfe pro Verdünnungsstufe, n - für die Anzahl der Näpfe pro Verdünnungsstufe.

3.2.3 Virusaufreinigung durch Ultrazentrifugation

Um das Virus anzureichern und dessen Reinheit zu verbessern, wurden drei aufeinanderfolgende Ultrazentrifugationen mit den Aliquots aus der Viruspräparation (Abschnitt 3.2.1) durchgeführt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis gehandhabt. Dazu wurden je 5 ml 25 %-ige Saccharoselösung in Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt, mit je ca. 4 ml Virussuspension bzw. ca. 2 ml Mock-Suspension vorsichtig überschichtet und mit PBS-/- vorsichtig aufgefüllt. Das durch Ultrazentrifugation (8 min Anlauf, 125500 g, 90 min, 4 °C, 8 min Bremse) gewonnene Viruspellet wurde in je 2 ml NTE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Am Folgetag wurde ein Saccharosegradient geschichtet (Abbildung 3.1). Dazu wurden 5 ml 60 %-ige Saccharose vorgelegt, mit 10 ml 54 %-iger und 10 ml 30 %-iger Saccharose überschichtet, gefolgt von den 2 ml Viruslösung und mit NTE-Puffer aufgefüllt, woraufhin die zweite Ultrazentrifugation (8 min Anlauf, 125500 g, 2 h, 4 °C, 8 min Bremse) durchgeführt wurde.

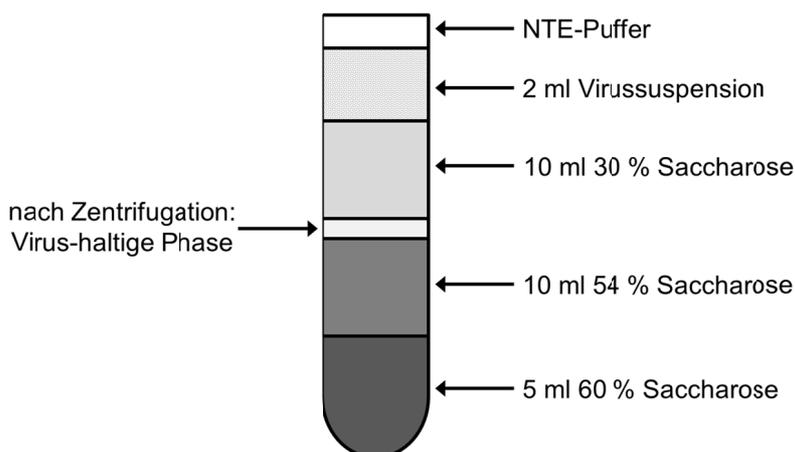


Abb. 3.1 Saccharosegradient zur Gewinnung gereinigter Viruspartikel.

Die Viruspartikel konnten als milchige Phase zwischen der 30 %-igen und 54 %-igen Saccharose-lösung vorsichtig abgesaugt und in neue Ultrazentrifugationsröhrchen überführt werden. Nachdem die Röhrchen mit NTE-Puffer aufgefüllt und austariert worden waren, erfolgte eine weitere Ultra-zentrifugation (8 min Anlauf, 125500 g, 90 min, 4 °C, 8 min Bremse), um das Virus zu pelletieren. Die Mock-/ Viruspellets wurden jeweils in insgesamt 1 - 1,5 ml PBS resuspendiert, jeweils zu 200 µl aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Virusmenge und Abschätzung des Glykoproteingehalts wurde der Gesamt-proteingehalt über das Bicinchoninic Acid (BCA) Kit entsprechend den Herstellerangaben photometrisch ermittelt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe (0,75 - 6 µg) des ungereinigten und gereinigten Wildtypvirus WTF sowie 6 µg des Mock-Ansatzes über ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem α-MV H Serum detektiert. In der Abbildung 3.2 ist die Anreicherung des Virus nach der Aufreinigung zu sehen. Die Bestimmung des Virustiters TCID₅₀ ergab eine Infektiösität des gezogenen Virus von $1,1 \times 10^6$ pfu/ml.

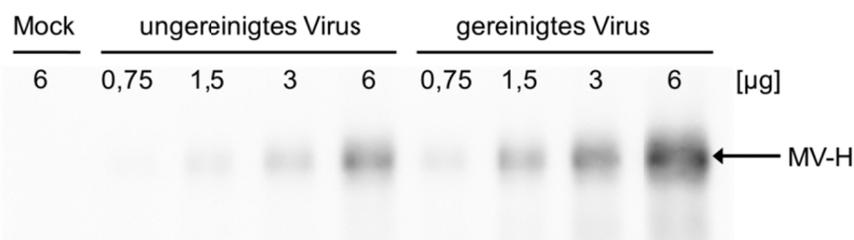


Abb. 3.2 Western Blot zur Abschätzung der Virusmenge des gereinigten Virus: 6 µg Mock-Kontrolle, 0,75 µg, 1,5 µg, 3 µg und 6 µg des ungereinigten und gereinigten Virus wurden auf einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit α-MV H Serum detektiert.

3.2.4 T-Zell-Inhibition durch inaktiviertes Virus

Zur Inhibition von T-Zellen wurde zunächst standardmäßig 400 µl gereinigtes Wildtypvirus WTF (Abschnitt 3.2.3) für ca. 5 min UV-inaktiviert ($1,5 \text{ J/cm}^2$) und anschließend mit 2 ml RPMI 1640 mit

10 % FCS und FIP (1:1000, verhindert Aufnahme viraler Partikel) vermischt. Daraufhin wurden 1×10^7 T-Zellen pelletiert (5 min, 300 g, RT), im vorbereiteten Virus-versetzten Medium resuspendiert und über Nacht im 37 °C warmen Brutschrank kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS, FIP (1:1000), 0,5 µl Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 400 ng/ml) und 1 µl Ionomycin (5 µM) 24 h stimuliert. Analog wurde ein Kontrollansatz mit 1×10^7 T-Zellen ohne Virus behandelt.

3.3 Exon Array - Microarray auf Exonebene

Der GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array besteht aus ungefähr 5,5 Millionen Sonden, die in 1,4 Millionen Sondensets (Probe Sets) eingeteilt werden können und sich auf über eine Million Exons (Exoncluster) beziehen. In diesem Array werden jedem Genlokus des gesamten humanen Genoms Transkriptcluster IDs zugewiesen. Die Exons eines jeden Genlokus werden mit Exoncluster IDs und jedes dieser Exons nochmals mit Probe Set IDs versehen, von denen jedes mit durchschnittlich vier perfekt kompatiblen Sonden (25bp Oligomere) beprobt wird, um verlässliche Daten zu schaffen (Abbildung 3.3). Die Probe Sets können in drei Gruppen eingeteilt werden: *Core*, *Extended* und *Full*. Die *Core*-Probe Sets bestehen aus RefSeq Transkripten und mRNAs vollständiger Länge und umfassen 17800 Transkriptcluster. Die *Extended*-Probe Sets bestehen aus den *Core*-Transkripten und auf cDNA basierenden Annotationen und umfassen 129000 Cluster. Die *Full*-Probe Sets bestehen aus den *Extended*-Transkripten und *ab initio* Genvorhersagen und umfassen 262000 Cluster (Affymetrix, Technical Note II).

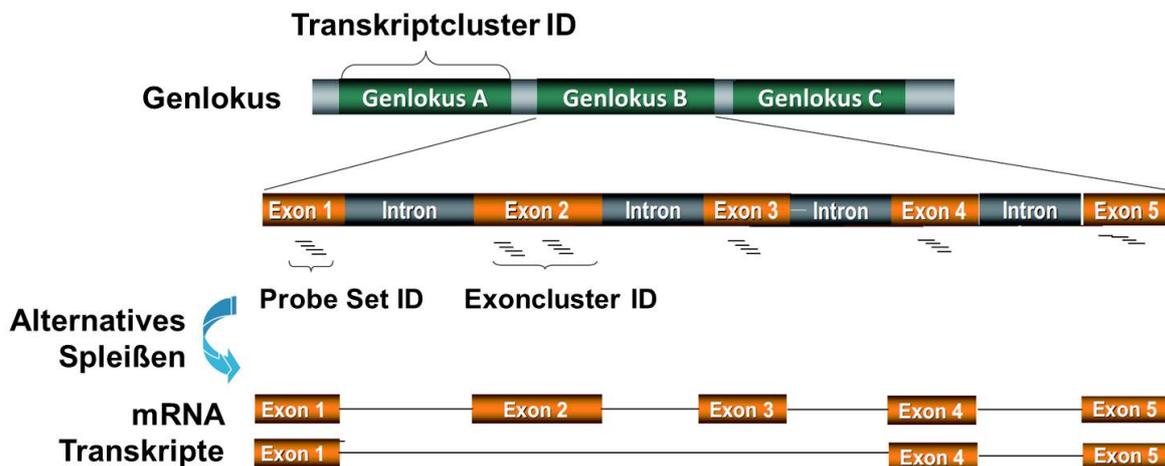


Abb. 3.3 System des GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array (verändert nach Yoshida et al, 2006).

3.3.1 Qualitätskontrolle der RNA-Proben

Für die Herstellung der RNA wurden in Vorarbeit von Meena Balakumari Narayanan T-Zellen PI3K-inhibiert und PMA/ Ionomycin-stimuliert (Abschnitt 3.6.1). Die RNA wurde aus diesen T-Zell-Ansätzen mithilfe des RNeasy Mini Kit analog zu Abschnitt 3.4.1 gewonnen. Die RNA-Integrität wurde durch die Bestimmung der RNA-Integritätsnummer (RIN) entsprechend des Protokolls von Agilent Technologies

3 Methoden

mittels des Bioanalyzers überprüft, was von Margarete Göbel (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) durchgeführt wurde. Die Abbildung 3.4 zeigt Elektropherogramme von RNAs mit verschiedenen RINs, durch die die RNA-Qualität abgeschätzt werden kann. Bei einem RIN-Level 10 ist die RNA komplett intakt, bei Level 5 ist sie teilweise und bei Level 3 stark degradiert.

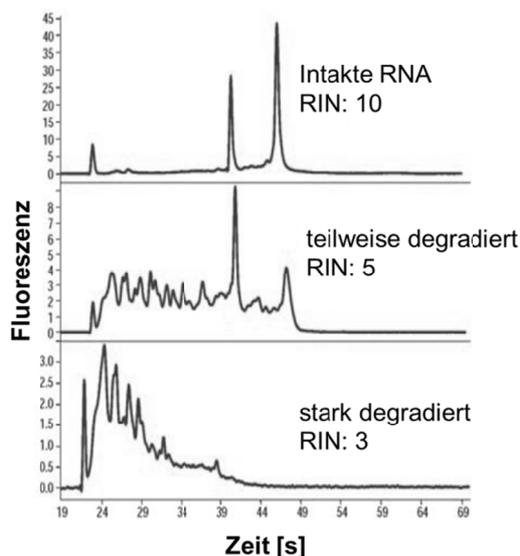


Abb. 3.4 Bestimmung der RNA-Qualität anhand der RIN (verändert nach Herstellerprotokoll von Agilent Technologies).

Für die Durchführung des Exon Arrays wurden nur die RNAs verwendet, die einen RIN-Level von 8,6 bis 9,7 hatten und dementsprechend nahezu vollständig intakt waren.

3.3.2 Durchführung des GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array

Die aus Abschnitt 3.3.1 erhaltene RNA wurde für den *Whole Transcript Sense Target Labeling Assay* verwendet, welches entsprechend des Herstellerprotokolls von Affymetrix von Margarete Göbel (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) durchgeführt wurde. Dabei wurden 100 ng RNA für die Reduktion der 28 S und 18 S rRNA eingesetzt, um Hintergrundsignale zu minimieren und dadurch die Detektionssensitivität und -spezifität des Arrays zu verbessern. Daraufhin wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert und diese als Template für *antisense*-cRNA verwendet. Im zweiten cDNA-Synthese-Zyklus wurden zufällige Hexamere genutzt, um die reverse Transkription der cRNA vom ersten Zyklus zu initiieren, wodurch einzelsträngige *sense*-DNA gebildet wurde. Gleichzeitig wurden dUTPs in die DNA eingebaut, um die einzelsträngige DNA reproduzierbar fragmentieren zu können. Durch die Behandlung mit DNA-Glykosylase und Endonuklease 1 (APE 1) wurden die unnatürlichen dUTP-Reste spezifisch erkannt und der DNA-Strang gebrochen. Diese einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden durch terminale Transferase mithilfe des Affimetrix® *DNA Labeling Reagents* markiert, welches kovalent an Biotin gebunden ist. Jede dieser so hergestellten Proben wurde auf einen einzelnen Array hybridisiert, gefolgt von einem Waschschrift und der Färbung mit Streptavidinphycoerithrin in der Fluidic Station 450. Abschließend wurden die GeneChips im GeneChip Scanner 3000 7G gescannt.

3 Methoden

Ein Überblick über den genaueren Ablauf kann der Abbildung 3.5 entnommen werden.

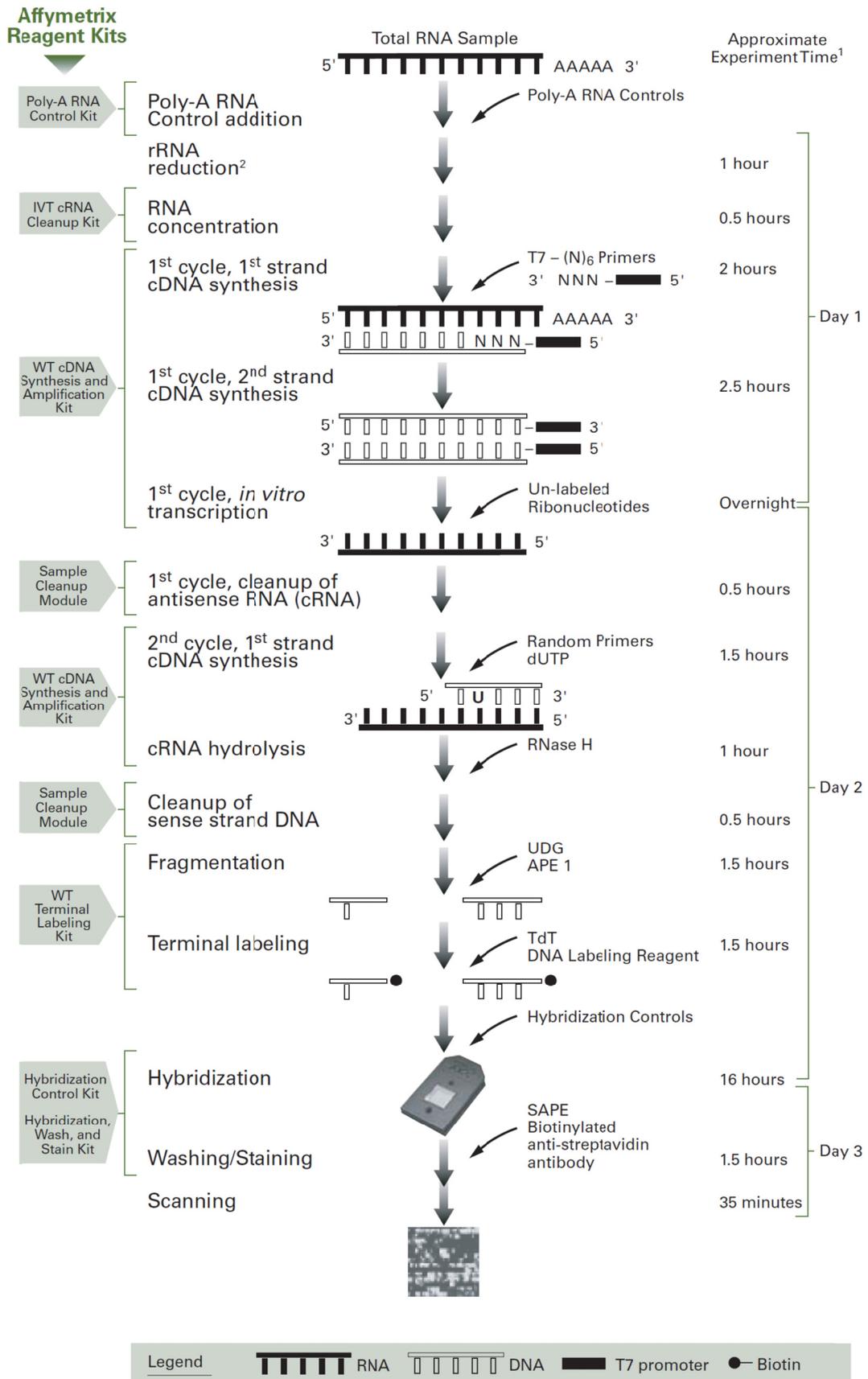


Abb. 3.5 Whole Transcript Sense Target Labeling Assay (Affymetrix, Technical Note III).

3.3.3 Prozessierung der Exon Array Rohdaten

Die Datenprozessierung und die Charakterisierung alternativ gespleißter (Abschnitt 3.3.4) bzw. differentiell regulierter Gene (Abschnitt 3.3.5) wurden von Dr. Susanne Kneitz (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) mittels der Expressionskonsolensoftware von Affymetrix durchgeführt. Der Algorithmus PLIER wurde verwendet, um die Probe Sets auf der Exonebene zusammenzufassen (Affymetrix, Technical Note IV), der Algorithmus iterPLIER für die Zusammenfassung auf Genebene. Für beide Ebenen wurden ausschließlich die *Core*-Probe Sets für die Analyse in Betracht gezogen. Für die folgende Datenprozessierung wurde das Statistikprogramm „R“ verwendet, in das Pakete des Bioconductor Projekts geladen wurden. Für die Qualitätskontrolle wurden Normfaktor von Affymetrix, Degradationsplots und Korrespondenzanalysen evaluiert. Die Daten der Exonebene und die der Genebene wurden normalisiert mittels Quantilequantile-Normalisierung (Bolstad et al, 2003).

Nach der Normalisierung der Rohdaten wurden die Gene herausgefiltert, bei denen keine oder eine zu schwache Signalintensität auf dem Array unabhängig von der Probe ermittelt werden konnten. Diese zeigten in beiden Probengruppen (inhibiert/ stimuliert - I, nur stimuliert - S) eine geringere Signalintensität als das 10 %-Quantil der durchschnittlichen Genexpression aller Proben und wurden als „nicht exprimiert“ aus weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Gene ausgeschlossen, die starke individuelle Variationen zeigten und daher weniger reproduzierbar waren. Dann wurde für jeden Donor der \log_2 -Quotient aus den Gruppen S und I auf Probe Set-Ebene und Genebene ermittelt, wodurch zwei Listen entstanden. Daneben wurde der Spleißindex (SI) berechnet, der den Unterschied der Expression eines einzelnen Probe Sets zur Durchschnittsexpression des gesamten Gens darstellt.

3.3.4 Charakterisierung alternativ gespleißter Gene

Ausgehend von der Annahme, dass alternatives Spleißen mit dem Ausmaß der SI-Divergenz korreliert, wurde das Intervall (Quotient) des SI des entsprechenden Gens berechnet. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gen reguliert ist, dann höher, je stärker sich dieser Quotient unterscheidet. Dann wurden die Binären für den SI bestimmt, sodass ein SI von $\geq 0,5$ den Binärcode 1 (entspricht reguliert) und ein SI $< 0,5$ den Binärcode 0 (entspricht nicht reguliert) ergibt. Der SI für jedes Gen wurde entsprechend des $SI_{\text{Min}}-SI_{\text{Max}}$ geordnet. Danach wurden zwei Filter verwendet, um alternativ gespleißte Gene zu identifizieren. Erstens musste der Unterschied des SI $\geq 0,75$ sein, zweitens mussten sich mindestens 10 % der Exons von der durchschnittlichen Expression des ganzen Gens unterscheiden. Um falsch-positive, alternative gespleißte Gene als Folge von Ausreisern zu vermeiden, wurde die Funktion „Sliding Window“ mit der Fenstergröße 3 angewandt, um langgezogene Bereiche gleichmäßig regulierter Gene zu betonen und einzelne Extremwerte zu glätten. Diese Funktion wurde für die Gene verwendet, die mehr als sechs Probe Sets umfassten (2 x Fenstergröße). Für die abschließende alternativ gespleißte Genliste wurde das Intervall (Range) erneut kalkuliert und mittels der zwei bereits erwähnten Bedingungen erneut gefiltert, sodass 2192 als alternativ gespleißt eingestufte Transkripte übrig blieben.

3.3.5 Charakterisierung differentiell regulierter Gene

Für die Ermittlung der differentiell regulierten Gene wurden alle exprimierten Gene verwendet. Zuerst wurde das LIMMA (*Linear Models for Microarray Analysis*)-Paket für die Berechnung der log-fachen Veränderung (*log fold change*) und des p-Values verwendet, um einen modifizierten t-Test auf der Grundlage der normalisierten *Core*-Daten auf Genebene zu generieren. Ein Gen wurde dann als differentiell reguliert eingestuft, wenn der *fold change* $\geq 1,5$ und der p-Value $< 0,01$ waren. Um falsch-positive, differentiell regulierte Gene als Folge starken alternativen Spleißens zu vermeiden, wurde als zweites der modifizierte t-Test auf die normalisierten *Core*-Daten auf Exonebene berechnet. Dabei wurde ein Gen als differentiell reguliert bezeichnet, wenn der *fold change* für die einzelnen Probe Sets $\geq 1,35$ und der allgemeine *fold change* für ein Gen $> 1,35$ waren. Da Gene sowohl differentiell reguliert als auch alternativ gespleißt sein können (Grigoryev et al, 2009; Abbildung 3.6) und für die Identifikation der differentiell regulierten Gene alle exprimierten Gene verwendet wurden, mussten zuletzt alle alternativ gespleißten Gene aus dieser Liste entfernt werden. In der finalen differentiell regulierten Genliste blieben insgesamt 619 Gene übrig.

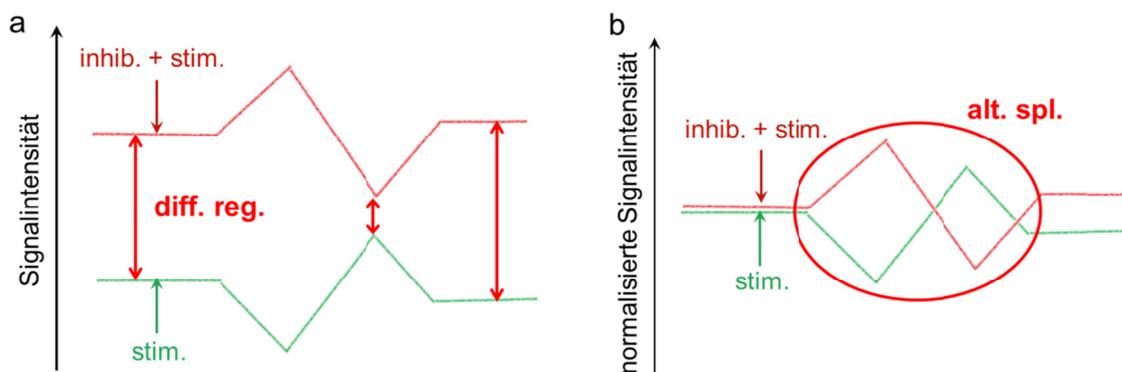


Abb. 3.6 Visualisierungsbeispiel für ein Gen, das sich sowohl für differentielle Regulation (a) als auch für alternatives Spleißen (b) qualifiziert.

3.3.6 Validierung der Genlisten mittels RT-PCR und qPCR

Die Validierung der Exon Array Genlisten wurde zuerst mittels RT-PCR durchgeführt. Das *First Strand cDNA Synthesis Kit* wurde verwendet, um cDNA aus 2 μg RNA (I oder S) mit oligo-d(T) Primern revers zu transkribieren (Abschnitt 3.4.2). Für die darauffolgende PCR wurden Illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads verwendet. Diese Kügelchen enthielten dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA (je 200 μM in 10 mM Tris-HCl), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , zehnfach Reaktionspuffer und 2,5 Units pureTaq DNA-Polymerase. Nach dem Lösen der Kügelchen in 21 μl HPLC-gereinigtem Wasser, wurden je 1 μl der spezifischen FW-/ REV-Primer (33 pmol) und 2 μl cDNA aus der vorgeschalteten cDNA-Synthese bzw. dem vorgeschalteten PCR-Produkt hinzugegeben. Das PCR-Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: Denaturierung bei 94 $^{\circ}\text{C}$ für 30 s, Annealing bei 58 $^{\circ}\text{C}$ für 1 min, Elongation bei 72 $^{\circ}\text{C}$ für 2 min, 35 Zyklen, Endelongation bei 72 $^{\circ}\text{C}$ für 7 min. Für die alternativ gespleißten Gene wurde je ein Primerpaar in benachbarten Exons in der alternativ gespleißten und in der konstanten Region verwendet, für die differentiell regulierten Gene beide Primerpaare in zufällig

3 Methoden

gewählten, benachbarten Exons. β -Aktin diene als Kontrolle für die RT-PCRs. Die erwarteten Fragmentgrößen und Primersequenzen der getesteten Gene sowie die Lokalisation der Primer im Gen können den Tabellen 2.2 und 2.3 entnommen werden. Die PCR-Produkte wurden über ein 2,5 %-iges Agarosegel mit GelRed (1:30000) zur Visualisierung aufgetrennt. Soweit angegeben wurde das Programm AIDA verwendet, um die Bandenintensitäten zu quantifizieren, was eine semi-quantitative Analyse durch die Normalisierung der Transkript-spezifischen Signale gegen die der β -Aktin-Kontrolle ermöglichte, sowie einen Vergleich der Probengruppen S und I zueinander.

Eine weitere Validierung erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Das ColorFlash SYBR® Green qPCR Kit wurde für den Mastermix (1 x SYBR Green Mastermix, je 500 nM FW- bzw. REV-Primer, 12,5 nM Fluorescein Calibration Dye und ad 19 μ l DEPC-H₂O) verwendet. Für die qPCR wurden dieselben Primer der getesteten Gene eingesetzt wie für die RT-PCR. UBC und YWHAZ dienten als Kontrolle für die qPCR. 1 μ l cDNA (I bzw. S) wurden als Triplikate sowie eine Wasserkontrolle auf eine 96-Napf-Platte aufgetragen, 19 μ l Mastermix zu jedem entsprechenden Template hinzugefügt und das folgende iCycler iQ® PCR-Protokoll angewendet: Denaturierung bei 95 °C für 7 min, Amplifikation und Quantifikation (95 °C für 10 s, 60 °C für 30 s, 45 Zyklen), Schmelzkurve (52 °C - 95 °C mit einer Hitzezunahme von 0,5 °C pro 10 s) und abschließender Abkühlschritt auf 15 °C.

Das iCycler Programm ermittelte automatisch den Δ CT-Wert, der für die relative Quantifizierung über die $\Delta\Delta$ CT-Methode benötigt wurde. Diese Methode eignet sich bestens für eine schnelle Abschätzung des relativen Expressionsverhältnisses zweier Gruppen, setzt aber optimale und identische Amplifikationseffizienzen der Ziel- und Referenzgene voraus. Die Housekeeping Gene ermöglichten die relative Quantifizierung, dazu wurde die Normalisierung über das geometrische Mittel durchgeführt.

3.3.7 Funktionelle Annotation der Genlisten

Zur funktionelle Analyse der generierten Genlisten wurde web-basierte Hilfsprogramme verwendet, wie die Signalwegdatenbank Reactome (<http://www.reactome.org/>), das GENE SeT Analysis Toolkit V2 (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>) für die statistisch angereicherten KEGG Signalwege und die JAVA-basierte Software Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) für ein automatisches, funktionelles Hochdurchsatzverfahren über Standardeinstellungen. Durch die Microarray Core Unit (IZKF, Universitätsklinikum Würzburg) wurden mit Hilfe von Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) zusätzliche funktionelle Cluster für Geninteraktionen über biologische Modellsysteme und ein eingegliedertes Textsuchprogramm erstellt.

3.4 RNA Methoden

3.4.1 RNA-Extraktion (RNeasy® Mini Kit/ Trizol)

Die Isolierung der zytoplasmatischen RNA aus primären Zellen und Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit. Dazu wurden 2×10^7 Zellen pelletiert, mit einer Spritze (20 gauche Nadel) homogenisiert und lysiert. Zusätzlich zum Herstellerprotokoll wurde ein DNase-Verdau nach dem ersten Waschschrift durchgeführt (für vier Proben: 40 μ l DNase I Puffer, 50 μ l DNase I (50 U) und

3 Methoden

310µl HPLC-H₂O). Die Elution der RNA wurde mit 20 - 50 µl HPLC-H₂O durchgeführt und mit dem Eluat einmal wiederholt.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus primären Zellen und Zelllinien konnte auch mit TRIzol® entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt werden. Dabei wurde der optionale Arbeitsschritt mit Glykogenzugabe nur dann durchgeführt, wenn weniger als 10⁶ Zellen eingesetzt wurden, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Resuspendierung des RNA-Pellets wurde je nach dessen Größe in 20 - 30 µl HPLC-H₂O durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch ermittelt (Abschnitt 3.5.10). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

3.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des *First Strand cDNA Synthesis Kits* durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Es wurden pro cDNA-Ansatz je nach Verfügbarkeit 2 µg RNA eingesetzt. Wurden gepaarte RNA-Proben verwendet, wie z.B. stimuliert und inhibiert/ stimuliert, so wurde für beide Ansätze dieselbe verfügbare RNA-Menge für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Die hergestellten 20 µl cDNA pro Ansatz wurden entweder direkt in eine PCR eingesetzt (Illustration PuReTaq Ready-To-Go PCR beads oder Phusion High-Fidelity PCR (Abschnitt 3.5.1)) oder bei -20 °C gelagert.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird eine spezifische DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert. Die Reaktion besteht aus der zyklischen Wiederholung dreier Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch die hohe Temperatur (95 °C) in einzelsträngige DNA umgewandelt. Für das Annealing wird die Temperatur herabgesetzt, wodurch sich die Sequenz-spezifischen Primer an die DNA anlagern. Diese Anlagerungstemperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt des jeweils eingesetzten Primerpaars (Tabellen 2.2 - 2.6) sowie dem Komplementaritätsgrad der Primer zum Matrizenstrang. Nach der Anlagerung der Primer folgt die Elongation bei 72 °C (Temperaturoptimum der Polymerase). Dazu wird eine thermostabile Polymerase verwendet, die an den bereits gebundenen Primern mit der Replikation beginnt und den komplementären Strang synthetisiert. Durch mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte (30 - 40 Zyklen) erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz.

Der erste Denaturierungs- bzw. der letzte Elongationsschritt wurden verlängert auf 2 min bzw. 10 min, damit eine vollständige Aufspaltung bzw. DNA-Synthese gewährleistet ist. Modifikationen an den Klonierungsprimern erlaubten Änderungen an der amplifizierten Sequenz, wie z.B. das Einfügen von Restriktionsenzymststellen, die die Zielsequenz flankierten und dadurch weiteres Klonieren mit dem Amplifikat ermöglichten.

3 Methoden

Die Kolonie-PCRs wurden mit den Illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR beads laut Herstelleranweisungen, alle anderen PCRs mit Hilfe des Phusion High-Fidelity PCR Kits durchgeführt. Dazu wurden folgende Zusammensetzungen verwendet:

Tab. 3.1 Zusammensetzung der Phusion-PCR-Ansätze.

Ansätze	10 µl-Ansatz [µl]	25 µl-Ansatz [µl]	50 µl-Ansatz [µl]
5 x Reaktionspuffer	2	5	10
dNTPs (10 mM)	0,2	0,5	1
DMSO (100 %)	0,3	0,75	1,5
FW-Primer (10 µM)	0,5	1,25	2,5
REV-Primer (10 µM)	0,5	1,25	2,5
cDNA/ PCR-Produkt	0,5	1,25	2,5
Phusion-DNA Polymerase (2 Units/µl)	0,1	0,15	0,5
HPLC-H₂O	ad 10	ad 25	ad 50

Die für diese Arbeit generierten Primerpaare wurden überwiegend für eine Schmelztemperatur von 60 °C optimiert, wobei für die endgültig verwendete Schmelztemperatur T_m der Mittelwert aus FW- und REV-Primer gewählt wurde. Die PCRs wurden im Thermo Cycler PTC-200 mit den folgenden Programmen durchgeführt.

Tab. 3.2 Verwendete PCR-Programme: T_m - Schmelztemperatur.

	Bezeichnung	Phusion-PCR	Klon-PCR	Kolonie-PCR
1	primäre Denaturierung	98 °C, 1 min	98 °C, 1 min	94 °C, 6 min
2	Denaturierung	98 °C, 30 s	98 °C, 30 s	94 °C, 30 s
3	Annealing	T_m , 30 s	T_m , 30 s	T_m , 1 min
4	Elongation	72 °C, 90 s	72 °C, 90 s	72 °C, 2 min
5	gehe zu Schritt, x-fach	zu 2, 35 - 40 x	zu 2, 5 x	zu 2, 35 - 40 x
6	Denaturierung	---	98 °C, 30 s	---
7	Elongation	---	72 °C, 90 s	---
8	gehe zu Schritt, x-fach	---	zu 6, 30 x	---
9	Endelongation	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	72 °C, 7 min
10	Abkühlen und halten auf 4 °C, zeitlich unbegrenzt			

Das entstandene PCR-Produkt wurde dann bei 4°C gelagert, bis die gelelektrophoretische Analyse (Abschnitt 3.5.2) erfolgte.

3.5.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um DNA-Fragmente anhand einer Agarosematrix aufzutrennen. Die Auftrennung aufgrund der negativen Polarität der DNA erfolgt nach der Länge der Nukleinsäure. Dabei wandern kürzere Fragmente schneller durch die Matrix des Agarosegels und trennen sich so von längeren Nukleinsäuren. Dafür wurde Agarose zu 1,5 % in einfachem TAE-Puffer gelöst. Nach dem Aufkochen der Lösung wurde GelRed (1:30000) hinzugefügt. Das ausgehärtete Gel wurde dann mit DNA-Proben, die mit sechsfachem Ladepuffer versehen waren, beladen und für 1 - 2,5 h bei 80 - 120 V aufgetrennt.

Durch das in die DNA interkalierte GelRed konnte der aufgetrennte DNA-GelRed-Komplex im UV-Transilluminator Gel Jet Imager unter UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und über die Software „Intas GDS“ digital erfasst werden.

3.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract II Kit. Dazu wurden entsprechende Banden unter UV-Licht ($\lambda = 354 \text{ nm}$) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Für die Elution wurden 35 μl des mitgelieferten Elutionspuffers verwendet.

3.5.4 Restriktionsverdau von DNA

Wegen ihrer Sequenzspezifität werden Restriktionsendonukleasen präparativ für Klonierungen und analytisch für die Überprüfung von DNA und Plasmiden eingesetzt.

Tab. 3.3 Verwendete Ansätze für den Restriktionsverdau.

Reaktionsansatz	präparativ (Doppelverdau)		analytisch	
	einzufügendes Fragment	Leervektor	Einzelverdau	Doppelverdau
RE-Puffer (2xTango, R)	10 μl	50 μl	1 μl	2 μl
DNA	35 μl (Abschnitt 3.5.3)	50 μl	2 μl	4 μl
Konzentration der Restriktionsenzym/e	je 30 U	je 60 U	10 U	je 10
Aqua dest.	---	ad 250 μl	ad 10 μl	ad 10 μl

Für den Doppelverdau mit *XhoI* und *EcoRI* wurde zweifach Tango-Puffer verwendet, bei dem mit *XhoI* und *HindIII* hingegen der Puffer R.

Die präparativen Ansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, die analytischen 1 h bei 37 °C und anschließend die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Bei den präparativen Ansätzen wurden die entsprechenden DNA-Banden wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben aus dem Gel isoliert.

3.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden Vektor und einzufügendes Fragment in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:1 eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Ligation ohne einzufügendes Fragment angesetzt, um das Religationspotential des Vektors zu ermitteln. Polyethylenglykol (PEG) wurde der Reaktion hinzugefügt, um die Ligationseffizienz zu verbessern.

Ligationsansatz:

10 x T4 DNA-Ligasepuffer	3 µl
50 % PEG	3 µl
Vektor	100 ng (1:1), 50 ng (1:3)
einzufügendes Fragment	100 ng (1:1), 150 ng (1:3)
T4 DNA-Ligase	1,5 µl (5 Weiss Units)
Aqua dest.	ad 30 µl

Der Ligationsansatz wurde 1 h bei RT, anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert und am Folgetag für die Transformation weiterverwendet.

3.5.6 Transformation kompetenter Bakterien

In dieser Arbeit wurden kompetente *E. coli* Top10 oder *E. coli* XL10-Gold für die Transformation verwendet. 100 µl dieser frisch aufgetauten Bakterien wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes von 3.5.5 gemischt, 30 min auf Eis, 30 s im Thermoblock bei 42 °C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die transformierten Bakterien mit 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) vermischt und 2 h bei 37 °C und 200 Umdrehungen auf dem Bakterienrüttler kultiviert. 100 µl dieses Ansatzes wurden dann mit dem Drigalskispatel auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten (c = 100 µg/ml) ausplattiert. Abschließend wurden die Bakterienplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert und am Folgetag Kolonien gepickt oder die Platte bei 4 °C gelagert.

3.5.7 Überprüfung der Klone mittels PCR, Mini-Präparation und Verdau

Für die Überprüfung der Klone wurden entsprechend der Anzahl der zu pickenden Kolonien zuerst PuReTaq PCR beads mit den für das einzufügende Fragment spezifischen Primern, sowie Reagenzgläser mit 5 ml LB-Selektionsmedium vorbereitet. Nachdem eine Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt worden war (Bakterienplatte von Abschnitt 3.5.6), wurde diese Spitze mehrfach in den PCR-Mastermix getaucht und danach in das Selektionsmedium abgeworfen. Die PCR wurde mit dem Programm Kolonie-PCR (Tabelle 3.2) durchgeführt und das angeimpfte Selektionsmedium über Nacht bzw. für 8 h bei 37 °C und 200 Umdrehungen auf dem Bakterienrüttler inkubiert. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und auf Primer-spezifische Banden hin überprüft.

1,5 ml der Übernachtskultur wurden am Folgetag für die Mini-Präparation in ein Eppendorf Reaktionsgefäß abgenommen und abzentrifugiert (2 min, 9500 g, RT). Das Pellet wurde in 150 µl Lösung 1 (entfernt RNA) resuspendiert, 150 µl Lösung 2 (lysiert Bakterien alkalisch und durch SDS)

3 Methoden

dazugegeben, 10 x invertiert, 150 µl Lösung 3 (präzipitiert DNA durch Kaliumazetat) hinzugegeben und ebenfalls 10 x invertiert, sodass weiße Flocken ausfallen. Nach kurzer Inkubation wurde der Zellschrott abgetrennt (15 min, 16000 g, 4 °C). Der Überstand wurde mit 900 µl Lösung 4 resuspendiert, mit 50 µl Dia Erde versetzt, 10 min bei RT inkubiert und dabei jede Minute invertiert, sodass die DNA an die Dia Erde binden kann. Der komplette Ansatz wurde über Spritzen mithilfe der Mini-Präparations-Saugapparatur auf eine Säule appliziert und dreimal mit je 1 ml Waschpuffer gespült. Die Säule wurde trocken zentrifugiert (1 min, 9500 g, RT), mit 30 µl HPLC-H₂O versehen, 20 min bei RT inkubiert, die DNA bei 9500 g für 1 min eluiert und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (Abschnitt 3.5.10).

4 µl des gewonnenen Plasmids wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (Abschnitt 3.5.4), zusammen mit dem unverdauten Plasmid über ein Agarosegel aufgetrennt und auf die entsprechenden Fragmentgrößen hin überprüft.

2 µl des gewonnenen Plasmids wurden für die Sequenzierung (Abschnitt 3.5.11) eingesetzt.

3.5.8 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien in großen Mengen aufzureinigen, wurden 200 ml LB-Selektionsmedium mit den übrigen 3,5 ml der Übernachtskultur von Abschnitt 3.5.7 angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Umdrehungen auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Am Folgetag wurde ein Aliquot für den Glycerolstock (Abschnitt 3.5.9) abgenommen und die restliche Übernachtskultur für die Maxi-Präparation eingesetzt. Dazu wurde sich strikt an das Herstellerprotokoll des Endofree® Plasmid Purification Maxi Kits gehalten. Das gewonnene Plasmid-Pellet wurde in 200 µl HPLC-H₂O gelöst und eingefroren. Am Folgetag wurde das gelöste Plasmid aufgetaut, die DNA-Konzentration ermittelt (Abschnitt 3.5.10) und die Plasmidlösung auf eine Konzentration von 1 - 3 µg/µl eingestellt. Letztendlich wurde das komplette einzufügende Fragment mit den entsprechenden FW- und REV-Primern sequenziert, um die Sequenz auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen.

3.5.9 Herstellung eines Glycerolstocks

Der Glycerolstock wurde von transformierten Bakterien hergestellt, damit die entsprechenden Plasmide bei Bedarf schnellstmöglich mittels der Maxi-Präparation neu kultiviert werden können. Dazu wurden 900 µl der transformierten Bakterienkultur von Abschnitt 3.5.8 mit 100 µl Glycerol versetzt, vorsichtig gemischt, sofort in einer Isopropanoleinfrierbox heruntergekühlt und bei -80 °C gelagert.

3.5.10 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Nukleinsäurekonzentration und -qualität wurden über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer gemessen. Das Verhältnis zu der Absorption bei 280 nm zeigt den Reinheitsgrad der Probe an, wobei der Wert zwischen 1,7 und 2 liegen sollte. Ein Wert kleiner als 1,7 deutet auf eine Proteinkontamination hin, ein Wert größer als 2 auf eine RNA-Kontamination. Für die Messung wurde die DNA-Lösung 1:100 bis 1:33 mit HPLC-H₂O verdünnt. Als Referenzprobe wurde HPLC-H₂O verwendet. Die Konzentration der DNA wie auch der Absorptionsquotient konnte direkt am Gerät abgelesen werden.

3.5.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung nach Sanger et al, 1977, wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits analog zu den Herstellerangaben durchgeführt, wobei 2 µl cDNA/ PCR-Produkt und nur 10 pmol eines Primers (FW oder REV) pro 5 µl Reaktionsansatz eingesetzt wurden. Die Amplifikation der DNA erfolgte anhand des folgenden Thermocyclerprogramms:

Denaturierung	96 °C, 30 sec	} 29 Zyklen
Hybridisierung	50 °C, 15 sec	
Elongation	60 °C, 4 min	
Abkühlen/ halten bei	10 °C ohne Zeitbegrenzung	

Nach der Synthese der DNA-Einzelstränge erfolgte die Aufreinigung und Sequenzierung mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer durch die diagnostische Abteilung des Instituts.

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Stimulation und Inhibition primärer T-Zellen

2×10^7 T-Zellen eines Donors wurden in zwei Ansätze aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit 50 µM LY200492 in 5,5 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS für 2 h bei 37 °C im Brutschrank PI3K-inhibiert, die andere ohne Inhibitor belassen. Anschließend wurden beide Ansätze (je 1×10^7 T-Zellen) durch Zugabe von jeweils 0,5 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS, 0,5 µl PMA (400 ng/ml) und 1 µl Ionomycin (5 µM) 24 h im Brutschrank stimuliert.

3.6.2 Transfektion adhärenter Zellen mittels Polyethylenimin (PEI)

Am Vortag der Transfektion wurden 8×10^5 HEK293T-Zellen in 1,5 ml DMEM mit 10% FCS und 0,6 % Glutamin pro Napf einer 6-Napf-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert, sodass sie am folgenden Tag ca. 70 % konfluent gewachsen waren. Das PEI-Substrat und die Plasmid-DNA wurden aufgetaut und 1 min bzw. 30 s gut vermischt. Dann wurden 3 µg Plasmid-DNA und 12 µl PEI jeweils in 100 µl sterilfiltriertes 150 mM NaCl gegeben und erneut 30 s gemischt. Die PEI-Lösung wurde zur DNA-Lösung pipettiert, 15 s gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Medium von den HEK293T-Zellen (je drei Nöpfe pro Durchgang) abgenommen, das PEI-DNA-Gemisch langsam mit 800 µl DMEM mit 10 % FCS und 0,6 % Glutamin versetzt und ebenfalls sehr langsam über den Rand des Napfes auf die Zellen gegeben. Es ist wichtig das Pipettieren des PEI-DNA-Gemisches sehr vorsichtig durchzuführen, um den PEI-DNA-Komplex nicht zu schädigen. Danach wurde die 6-Napf-Platte über Nacht im Brutschrank inkubiert und am Folgetag das Medium gewechselt, da das PEI für die Zellen schädlich ist. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie wurde nach 24 h oder 48 h durchgeführt und die Zellen anschließend für funktionelle Tests verwendet (Köthe, 2012). Die Transfektionseffizienzen lagen zwischen 20 % und 59 %.

3.6.3 Transfektion von siRNA in primäre T-Zellen

Für die Transfektion unstimulierter T-Zellen wurde die Ingenio Elektroporationslösung verwendet. Zur Vorbereitung wurde das Elektroporationsprogramm U-014 auf dem Nucleofactor™ 2b Device eingestellt, die Elektroporationsküvetten bereitgelegt, die entsprechende Anzahl an Näpfen einer 6-Napf-Platte mit 3 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS versehen und im Brutschrank erwärmt, sowie die siRNA aufgetaut und auf Eis gelagert.

Pro Ansatz wurden 8×10^6 frisch isolierte primäre T-Zellen in einzelnen 15 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert (5 min, 300 g, RT) und das Medium dekantiert. Die folgenden Schritte wurden für jeden Ansatz getrennt durchgeführt. Der Medium-Rest wurde vollständig abgenommen, das Pellet mit 100 µl Elektroporationslösung 20 x (RT) resuspendiert, 500 pmol siRNA (max. 15 µl Volumen) dazugegeben und erneut 10 x gemischt. Mantei et al (2008) haben gezeigt, dass der Einsatz von 1000 pmol siRNA bzw. von siRNA mit chemisch modifizierten Nukleotiden den Knockdown verlängert, jedoch zeigt der Einsatz von 500 pmol siRNA ohne Modifikationen in dieser Arbeit die gleiche Effizienz. Der komplette Ansatz wurde in die Elektroporationsküvetten unter strengster Vermeidung von Blasenbildung überführt, die Küvetten in das Nucleofactor™ 2b Device gesetzt und die Elektroporation durchgeführt. Direkt nach dem elektrischen Impuls wurde aus dem entsprechenden Napf mit der mitgelieferten Spezialpipette Medium in die Küvette gegeben und die elektroporierten Zellen mit Zellschrott langsam in den Napf überführt. Die Küvette wurde einmal mit Medium aus dem Napf gespült, um einen größeren Zellverlust zu vermeiden. Die 6-Napf-Platte wurde für zwei Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen gut resuspendiert und die Elektroporation nach genau demselben Prinzip wiederholt, wobei die wiederholt elektroporierten T-Zellen in einen neuen Napf mit neuem Medium gegeben wurden. Nach weiteren 2 - 3 Tagen wurde jeder Ansatz auf den erfolgreichen Knockdown überprüft.

Analog zum Testansatz wurde eine Kontroll-siRNA (scrambled siRNA) und ein Ansatz ohne siRNA parallel zur spezifischen siRNA durch alle Schritte hinweg mitbehandelt.

3.6.4 Überprüfung des Knockdowns in primären T-Zellen

Für die Überprüfung wurde zuerst die RNA aus ca. $0,8 \times 10^6$ siRNA-transfizierten Zellen mittels TRIzol isoliert (Abschnitt 3.4.1) und davon cDNA hergestellt (Abschnitt 3.4.2). Danach erfolgte die Phusion-PCR mit einem 25 µl-Ansatz pro Reaktion (Abschnitt 3.5.1), wobei die folgende Verdünnungsreihe für jede cDNA erstellt wurde: 0,5 µl – 0,2 µl – 0,1 µl – 0,05 µl – 0,02 µl. Von der cDNA-Verdünnungsstufe 0,05 µl wurde immer eine β-Aktin-Kontrolle mitgeführt, sowie eine Negativkontrolle ohne Template. Für die Überprüfung wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

primäre Denaturierung	98 °C für 1 min	
Denaturierung	98 °C, 30 s	} 36 Zyklen
Annealing	T_m , 30 s	
Elongation	72 °C, 30 s	
Endelongation	72 °C, 10 min	
Abkühlen/ halten bei	4 °C ohne Zeitbegrenzung	

Die Schmelztemperatur T_m der SLFN5-Primer betrug 61,5 °C. Danach wurden alle PCR-Produkte mit einem Agarosegel aufgetrennt und auf den entsprechenden Knockdown im Vergleich zu den Kontrollen überprüft.

3.6.5 T-Zell-Proliferation (MLR, *mixed lymphocyte reaction*)

Für die MLR werden allogene antigenpräsentierende Zellen (APCs) und T-Zellen kokultiviert. Dabei werden die präsentierten MHC-Peptid-Komplexe auf der APC-Oberfläche von den T-Zellen als fremd erkannt, wodurch die T-Zellen aktiviert werden und proliferieren. Pro Ansatz wurden als Triplikate je 2×10^4 LPS-gereifte DCs im Verhältnis 1:10 mit allogenen T-Zellen in 200 µl RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2,5 µl/ml IL-4 und 5 µl/ml GM-CSF gemischt und für fünf Tage bei 37 °C kokultiviert. Parallel wurden pro Ansatz zur Kontrolle Triplikate angesetzt, die nur T-Zellen in 200 µl RPMI 1640 mit 10 % FCS enthielten. Am vierten Tag der Kokultivierung wurde radioaktiv markiertes Thymidin ($[^3\text{H}]$ -Thymidin, 0,5 µCi/Napf) zugesetzt und am fünften Tag die 96-Napf-Platte im Harvester 96® auf Filterpapier übertragen und im Szintillationszähler MicroBeta2™ gemessen. Dadurch wurde das Maß der Proliferation über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin bestimmt.

3.6.6 T-Zell-Polarisierung auf Fibronektin

Die Polarisation von humanen T-Zellen wurde auf µ-SlidesVI gemessen. Dazu wurde das Slide mit 80 µl pro Kanal 20 µg/ml Fibronektin in PBS+/+ 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4°C beschichtet. Dann wurden die Kanäle je dreimal mit 100 µl PBS+/+ gewaschen, die unspezifischen Bindungsstellen mit 2,5 % BSA für 2 h bei 37 °C geblockt und je dreimal mit 100 µl PBS+/+ gewaschen. Inzwischen wurden 2×10^6 T-Zellen pro Kanal pelletiert (1 min, 6000 g, RT) und in je 40 µl RPMI 1640 mit 0 % FCS, 0,1 % BSA und 1:500 SDF-1α (Hungermedium) resuspendiert. Die Näpfe der Kanäle wurden leergesaugt, die 40 µl Zellsuspension in die Kanäle appliziert und das Slide 30 - 45 min im Brutschrank inkubiert bis unter dem Lichtmikroskop eine Streckung der Kontroll-T-Zellen sichtbar war. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl 4 % PFA/ PBS 20 min bei RT fixiert und je dreimal mit 100 µl PBS+/+ gewaschen. Danach folgte die Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 3.6.8).

3.6.7 T-Zell-Aktivierung durch CD3/ CD28-Stimulation

Die Costimulation von T-Zellen erfolgte in Chamber Slides (LabTekII™). Diese wurden mit 200 µl/Kammer Poly-L-Lysin (0,01 % in sterilem aqua dest.) für 10 min bei RT beschichtet und dreimal mit 500 µl PBS+/+ gewaschen. Dann wurden 200 µl/Kammer 25 µg/ml Ziege α-Maus IgG (in 50 mM Tris pH 8,7) für 1 h im Brutschrank inkubiert. Der Objektträger wurde dreimal mit 500 µl/Kammer PBS+/+ gewaschen, bei RT getrocknet und 15 min vor Beginn des Experimentes im Brutschrank auf 37 °C vorgewärmt.

In der Zwischenzeit wurden 2×10^5 T-Zellen pelletiert, in 100 µl PBS+/+ resuspendiert und auf Eis abgekühlt. Nach 15 min wurden je 1 µg/ml α-CD3- und α-CD28-Antikörper hinzugefügt, gut gemischt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem, ausgiebigem Mischen wurden 100 µl Zellen pro Kammer auf die, wie oben beschrieben, beschichteten Objektträger gegeben. Dabei wurde mit dem

3 Methoden

längsten Zeitpunkt und der Negativkontrolle, bestehend aus unbehandelten Zellen, angefangen, sodass später alle Zellen gleichzeitig fixiert werden konnten. Dann wurden die T-Zellen im Brutschrank bei 37 °C stimuliert (Müller, 2006). Nach dem kürzesten Zeitpunkt wurde das Medium vollständig abgenommen, die Zellen mit 200 µl 4 % PFA/ PBS 20 min bei RT fixiert und je dreimal mit 500 µl PBS+/- gewaschen. Danach folgte die Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 3.6.8).

3.6.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die fixierten und gewaschenen T-Zellen (Abschnitte 3.6.6 und 3.6.7) oder Zellen verwendet, die ein Fusionsprotein mit EGFP exprimierten. Für die µ-SlideVI mit Kanälen wurden für alle Schritte 100 µl Volumen eingesetzt. Für die Chamber Slides (LabTekII™) mit Kammern wurden 500 µl Volumen für die Waschschrte eingesetzt, für alle anderen Schritte 200 µl. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,01 % Triton-X100 für maximal 5 min auf Eis, gefolgt von je drei Waschschrten mit PBS+/- . Geblockt wurde 10 - 20 min mit 5 % BSA/ PBS, gefolgt von je drei Waschschrten mit PBS+/- . Das Zytoskelett der T-Zellen wurde mit Alexa 594-konjugiertem Phalloidin über Nacht bei 4 °C gefärbt und abschließend je 3 x mit PBS+/- gewaschen.

Bei den µ-SlideVI wurde dann die T-Zell-Polarisierung mikroskopisch analysiert und die Kanäle für die Lagerung mit Fluoromount-G eingedeckt. Das Chamberslide wurde abschließend für die Mikroskopie und Lagerung mit Fluoromount-G eingedeckt. Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop wurden von Dr. Nora Müller am Institut durchgeführt.

3.7 Durchflusszytometrie

Die Messung von Zellen, die ein Fluoreszenzprotein exprimierten, erfolgte direkt nach einem Waschschrte mit 1 ml FACS-Puffer und einem Zentrifugationsschrte (5 min, 400 g, RT).

Alle Proben wurden im FACS Calibur™ gemessen und mit Hilfe der Programme CellQuest Pro und FlowJo ausgewertet.

Für eine intrazelluläre Färbung wurden 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen zunächst einmal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 400 g, 4 °C), in 200 µl 4 % PFA/ PBS resuspendiert und 20 min bei 4 °C fixiert. Nach einem zweifachen Waschschrte (mit 1 ml FACS-Puffer) wurden die Zellen in 50 µl Saponinpuffer mit einer entsprechenden konjugierten Primärantikörperverdünnung (Tabelle 2.8) resuspendiert und für 45 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Von den Zellen wurde ungebundener Antikörper durch einen weiteren zweifachen Waschschrte (mit 1 ml FACS-Puffer) entfernt, das Pellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und die markierten Zellen dann im Durchflusszytometer gemessen.

Zur Kontrolle des unspezifischen Hintergrunds sowie zur Überprüfung der Kompensation wurden entsprechende Isotyp-, Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

Zur Analyse der Zellviabilität wurde 7-Aminoactinomycin (7AAD) und der Zellapoptose AnnexinV-PE verwendet. Durch die Aufnahme des Farbstoffs 7AAD durch tote Zellen, kann man zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden und durch die Aufnahme des konjugierten Farbstoffs AnnexinV-PE

durch apoptotische Zellen, kann man zwischen lebenden und apoptotischen Zellen unterscheiden. Für jeden Ansatz wurden 2×10^5 Zellen verwendet.

Exprimierten die zu untersuchenden Zellen kein Fusionsprotein, so wurden beide Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt, d.h. auf 100 μ l AnnexinV-Bindungspuffer wurden 5 μ l AnnexinV-PE und 10 μ l 7AAD eingesetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Proben umgehend gemessen.

Exprimierten die Zellen jedoch ein Fusionsprotein mit EGFP, so wurde jeder Ansatz mit AnnexinV-PE und 7AAD getrennt gefärbt.

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 12 %-iges Trenngel hergestellt. Die Lösungen für das Trenngel wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt und sofort zu 5/6 in eine vorbereitete, dichte SDS-Gelelektrophoresekammer gefüllt.

Trenngelzusammensetzung – 12 %:

1,5 M Tris/ HCL pH 8,7	8 ml
HPLC-H ₂ O	10,8 ml
Acrylamid-4K-Lösung (30 %)	12,8 ml
20 % SDS	160 μ l
10 % APS	280 μ l
TEMED	15 μ l

Zum Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit 300 μ l Isopropanol überlagert. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol vollständig abgenommen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm für die Probenaschen eingesteckt.

Sammelgelzusammensetzung:

1 M Tris/ HCL pH 6,8	1,25 ml
HPLC-H ₂ O	6 ml
Acrylamid-4K-Lösung (30 %)	1,3 ml
20 % SDS	50 μ l
10 % APS	100 μ l
TEMED	10 μ l

Die Gelelektrophoresekammer wurde mit einfachem Proteingelpuffer gefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen gespült.

Das Pellet aus ca. $1 - 2 \times 10^6$ Zellen (1 min, 6000 g, RT) wurde mit sechsfachem SDS-Probenpuffer verdünnt, resuspendiert, 6 min bei 100 °C inkubiert, auf Eis gekühlt, zentrifugiert und in die Probenaschen aufgetragen. Um das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine bestimmen zu können, wurden 10 μ l eines Proteinstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 12 mA über Nacht.

3.8.2 Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine durch einen halbtrockenen Elektroblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei wandern negativ-geladene Proteine im elektrischen Feld zur positiv-geladenen Anode, wobei die Nitrozellulosemembran zwischen Gel und Anode liegt.

Die Nitrozellulosemembran wurde im 30 mM Anodenpuffer äquibriert. Die Blotkammer wurde in der folgenden Reihenfolge luftblasenfrei befüllt:

- 1) mit Aqua dest. die Oberfläche der Blotkammer befeuchten,
- 2) zwei in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere,
- 3) das in Kathodenpuffer getauchte SDS-Gel (180 ° gespiegelt),
- 4) die Nitrozellulosemembran aus dem 30 mM Anodenpuffer,
- 5) zwei in 30 mM Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere,
- 6) zwei in 300 mM Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere.

In der geschlossenen Blotkammer wurden die Proteine 1,5 h bei 125 mA auf die Nitrozellulosemembran gebloftet. Danach wurde die Membran entnommen und mindestens 20 min in 5 % Milchpuffer auf dem Wippschüttler geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurde die Membran mit dem Primärantikörper (verdünnt in 5 % Milchpuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 15 min bei RT mit dem Waschpuffer für Western Blots gewaschen, woraufhin die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (ebenfalls verdünnt in 5 % Milchpuffer) für 1 h bei RT erfolgte. Nach erneutem, dreimaligem Waschen für jeweils 5 min wurde die Membran für 1 min im Dunkeln bei RT mit der Elektrochemilumineszenz (ECL)-Substratlösung inkubiert. Dazu wurden die beiden ECL-Komponenten, eine stabile Peroxidlösung und eine verstärkte Luminollösung, 1:1 gemischt und 2 ml des ECL-Gemisches gleichmäßig auf der Membran verteilt. Das Enzym Peroxidase, das kovalent an den sekundären Antikörper gebunden ist, setzt die Substrate um, wodurch Chemilumineszenzsignale erzeugt werden. Belichtet man damit einen Röntgenfilm, so verfärbt sich dieser an den entsprechenden Stellen schwarz. Mit Hilfe des Page Ruler™ prestained protein ladder Markers kann man daraufhin die Masse (kDa) der exprimierten Proteine bestimmen.

3.9 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde die bereits erwähnte freie Programmiersprache R für statistisches Rechnen und statistische Grafiken verwendet. Die Experimente wurde weitestgehend mit $n = 3$ durchgeführt und damit die statistische Signifikanz ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ und $***p < 0.001$) errechnet, wofür die Formel für den Studentischen t-Test in Excel verwendet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Visualisierung alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene

4.1.1 Alternativ gespleißte Gene

Mit Hilfe der Visualisierung auf Exonebene konnten geeignete, repräsentative Gene für die Validierung selektiert werden. Die Abbildung 4.1 zeigt Visualisierungen für drei der sieben für die Validierung verwendeten alternativ gespleißten Gene. Im konstanten Bereich zeigen beide gepaarten Proben nahezu gleiche Signalintensitäten für mehrere aufeinanderfolgende Probe Sets, im alternativ gespleißten Bereich hingegen unterschiedliche Expressionsniveaus.

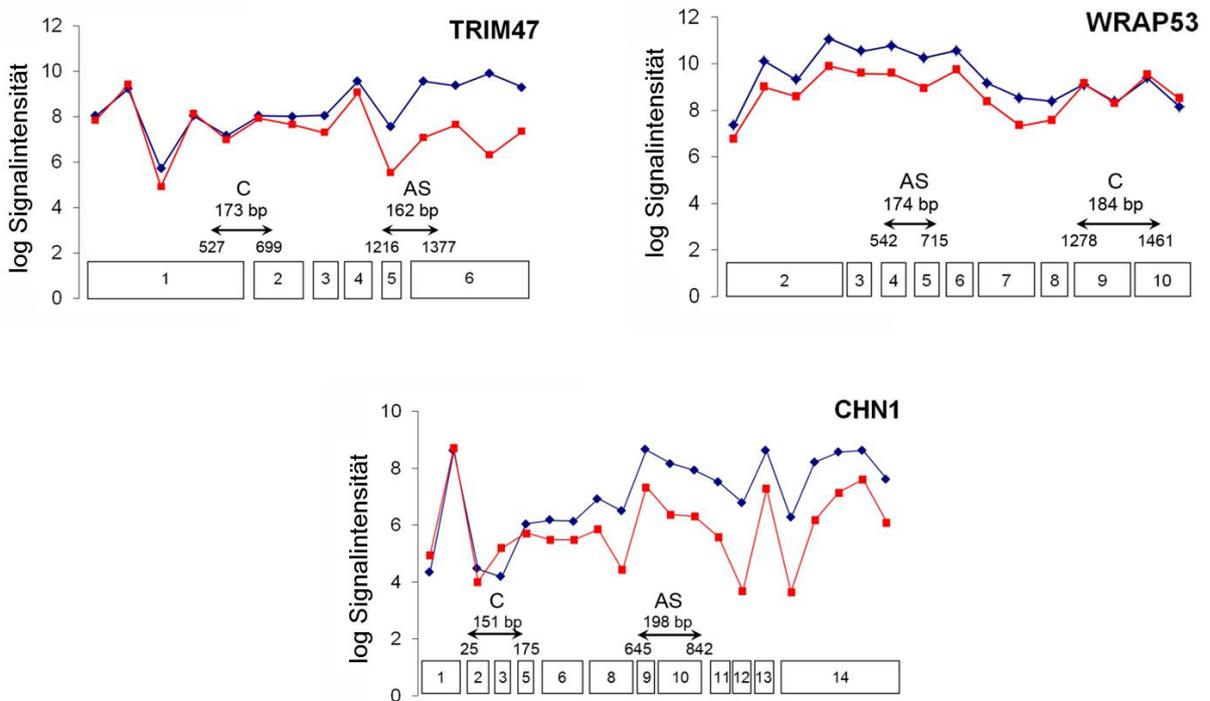


Abb. 4.1 Visualisierung geeigneter Gene auf Exonebene repräsentativ für alternatives Spleißen: auf der x-Achse sind die Exons aufgetragen, blau (Raute) – stimulierte Probe, rot (Quadrat) – gepaarte inhibiert/ stimulierte Probe, C – konstanter Bereich mit nahezu gleichem Expressionslevel der zwei gepaarten Proben, AS – alternativ gespleißter Bereich mit unterschiedlichem Expressionslevel der zwei gepaarten Proben, Pfeile geben die Position und Länge der für die RT-PCR amplifizierten Fragmente an (verändert nach Riedel et al, 2013).

4.1.2 Differentiell regulierte Gene

Mit Hilfe der Visualisierung auf Exonebene konnten geeignete, repräsentative Gene für die Validierung der differentiellen Regulation selektiert werden. Die Abbildung 4.2 zeigt Visualisierungen für zwei der neun für die Validierung verwendeten Gene. Den Diagrammen kann man entnehmen, dass das Expressionsniveau der gepaarten inhibiert/ stimulierten Probe auf der gesamten Transkriptebene hoch- (SLFN5) bzw. herunterreguliert (DTL) ist. Die verschiedenen Proben zeigten bei keinem der korrespon-

4 Ergebnisse

dierenden Probe Sets dieselben Signalintensitäten, weshalb dieser Ansatz das gleiche Ergebnis wie ein konventioneller Microarray liefert.

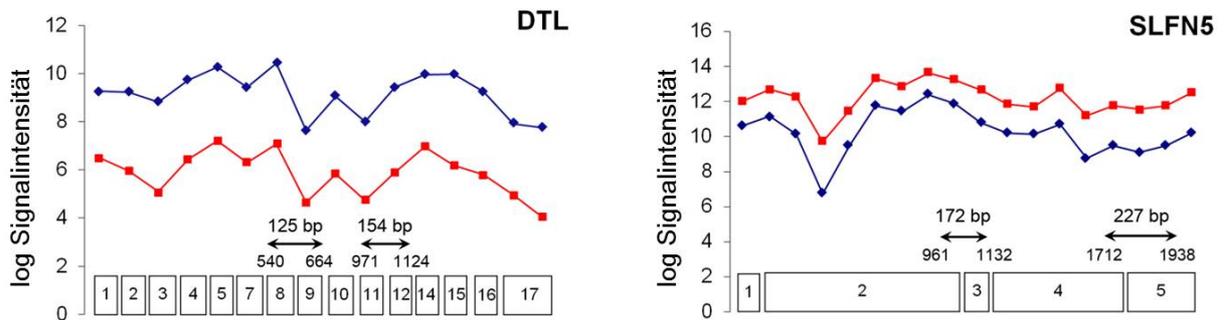


Abb. 4.2 Visualisierung geeigneter Gene auf Exonebene repräsentativ für differentielle Regulation: auf der x-Achse sind die Exons aufgetragen, blau (Raute) – stimulierte Probe, rot (Quadrat) – gepaarte inhibiert/ stimulierte Probe, Expressionsniveaus auf gesamter Transkriptebene hoch- (SLFN5) bzw. herunterreguliert (DTL), Pfeile geben die Position und Länge der für die RT-PCR amplifizierten Fragmente an (verändert nach Riedel et al, 2013).

4.2 Validierung der Exon Array Genlisten

4.2.1 RT-PCR

Die Validierung erfolgte zuerst mittels 2-Schritt-RT-PCR. Dazu wurde jeweils cDNA aus denselben gepaarten RNA-Proben hergestellt, die bereits für den Exon Array eingesetzt wurden. Zusätzlich wurden aus weiteren Spendern gepaarte stimulierte und inhibiert/ stimulierte RNA-Proben hergestellt und verwendet. Die für die Validierung selektierten Gene wurden aufgrund der großen Unterschiede in den Signalintensitäten zwischen den gepaarten Proben im alternativ gespleißten Bereich alternativ gespleißter Gene bzw. auf der ganzen Transkriptebene differentiell regulierter Gene ausgewählt, waren jedoch für funktionelle Untersuchungen nicht relevant.

4.2.1.1 Alternativ gespleißte Gene

Basierend auf der Differenz der Signalintensitäten der gepaarten Proben (S und I) im alternativ gespleißten Bereich und der nahezu gleichen Signalintensität im konstanten Bereich (Abbildung 4.1) wurden sieben alternativ gespleißte Gene für die Validierung mittels RT-PCR ausgewählt. Diese können der folgenden Tabelle 4.1 entnommen werden.

4 Ergebnisse

Tab. 4.1 Ausgewählte alternativ gespleißte Gene für die Validierung: AS – alternativ gespleißter Bereich, C – konstanter Bereich (Riedel et al, 2013).

Gensymbol	Beschreibung	Funktion	Bestätigung bei Validierung
TRIM47	Tripartite motif-containing protein 47	unbekannt	AS: 10/ 10 C: 2/ 8
WRAP53	WD40 repeat-containing protein encoding RNA antisense to p53	p53 Regulator, Telomerasekomplex	AS: 5/ 7 C: 1/ 7
CHN1	Chimerin 1	Rho GTPase Aktivator	AS: 5/ 5 C: 2/ 5
FBXO6	F-box only protein 6	Untereinheit des SKP1/ Cullin-F-box Komplexes der Ubiquitinierung	AS: 5/ 8 C: 4/ 8
TPRG1	Tumor protein p63-regulated gene 1 protein	unbekannt	AS: 6/ 6 C: 2/ 6
STAP2	Signal-transducing adaptor protein 2	Adapter	AS: 7/ 7 C: 3/ 7
IL4I1	Interleukin-4-induced protein 1	L-phenyl-Oxidase, inhibiert T-Zell-Proliferation	AS: 4/ 6 C: 2/ 6

Für diese Gene wurde jeweils ein Primerpaar im alternativ gespleißten Bereich gewählt, in dem die Probe Sets der gepaarten Proben unterschiedliche Signal- und somit Expressionsintensitäten zeigten. Das zweite Primerpaar wurde in den konstanten Bereich gelegt, in dem die Probe Sets beider Proben das gleiche Expressionsniveau aufwiesen. Bei beiden Primerpaaren wurden darauf geachtet, dass sich Vorwärts- und Rückwärtsprimer nicht auf demselben Exon befanden. Die Validierung ist hier exemplarisch für TRIM47, WRAP53 und CHN1 dargestellt (Abbildung 4.3). Die Lage sowie die erwartete Länge der amplifizierten Fragmente für diese drei alternativ gespleißten Gene können der Abbildung 4.1 entnommen werden. Die Darstellungen aller anderen alternativ gespleißten Gene, die für die Validierung verwendet wurden, sind im Anhang in Abbildung A1 gezeigt.

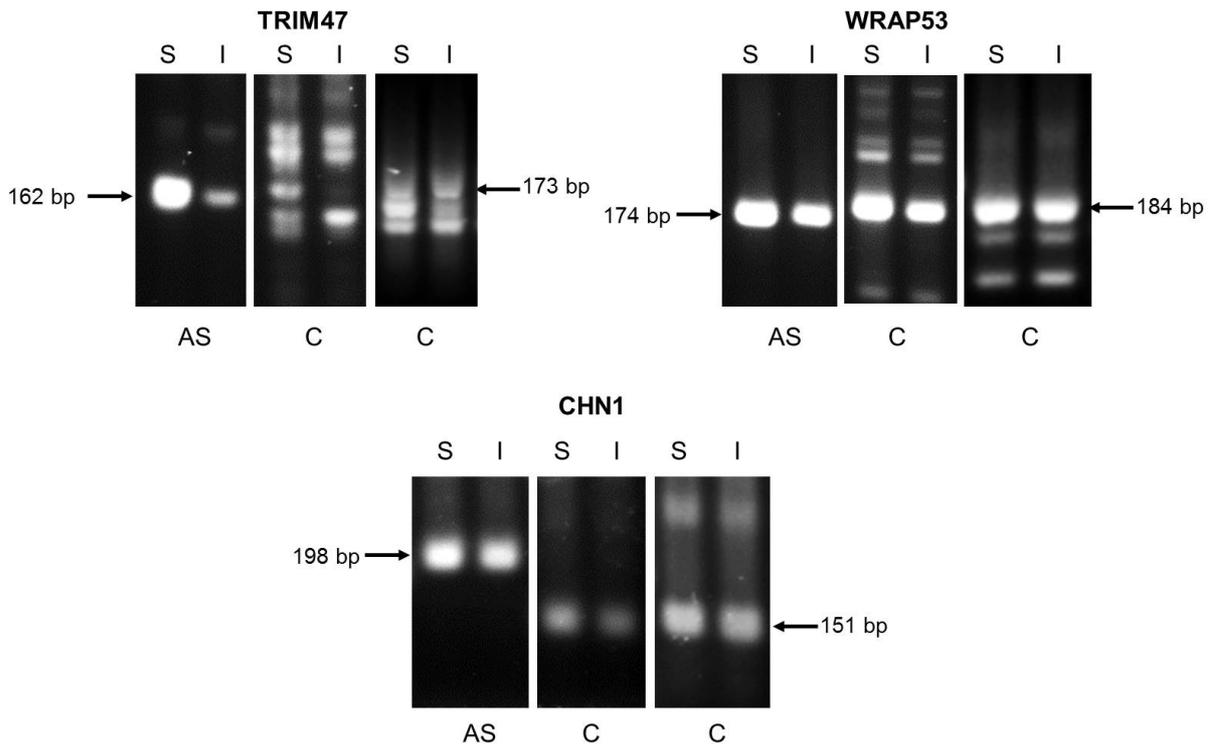


Abb. 4.3 Validierung geeigneter Gene repräsentativ für alternatives Spleißen: drei ausgewählte Gene mit erwarteter Länge des DNA-Fragments (Primerlokalisierung in Abbildung 4.1), S – stimuliert, I – inhibiert/ stimuliert, AS – alternativ gespleißter Bereich, C – konstanter Bereich (links - unterschiedliche Expressionsniveaus bzw. mehrere Banden, rechts - gleiches Expressionsniveau).

Nach Normalisierung mit dem entsprechenden β -Aktin-Amplifikat mittels AIDA war erkennbar, dass die alternativ gespleißten Bereiche aufgrund der Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002, wie vermutet, herunterreguliert wurden: 49 % bei TRIM47, 83 % bei WRAP53 und 85,2 % bei CHN1. Für den konstanten Bereich, der ein DNA-Fragment mit derselbe Expression für beide Proben zeigen sollte, war die Validierung in den meisten Fällen nicht interpretierbar, weil mehrere Banden zu sehen waren sowie unterschiedliche Expressionsniveaus, teilweise sogar entgegengesetzt zum alternativ gespleißten Bereich (Riedel et al, 2013). Zwar entsprach der konstante Bereich nicht den Erwartungen, jedoch konnten bei Betrachtung beider validierter Bereiche eine differentielle Regulation ausgeschlossen werden. Daher kann man davon ausgehen, dass diese Ergebnisse die Annahme des alternativen Spleißens bestätigen, da sich im Vergleich zu den differentiel regulierten Genen der alternativ gespleißte und konstante Bereich bezüglich der Regulation unterschieden.

4.2.1.2 Differentiell regulierte Gene

Basierend auf den großen Unterschieden in den Signalintensitäten zwischen den gepaarten Proben (S und I) auf der gesamten Transkriptebene (Abbildung 4.2) wurden neun differentiel regulierte Gene für die Validierung mittels RT-PCR ausgewählt und können der folgenden Tabelle entnommen werden.

4 Ergebnisse

Tab. 4.2 Ausgewählte differentiell regulierte Gene für die Validierung (Riedel et al, 2013).

Gensymbol	Beschreibung	Funktion
DTL	Denticleless protein homolog	Homolog der E3 Proteinligase
SLFN5	Schlafen family member 5	unbekannt
PFKM	Phosphofruktokinase, muscle	Phosphofruktokinase
DOK2	Docking protein 2	RasGAP Adapter
RAD51AP1	RAD51-associated protein 1	RAD assoziiertes Protein
HELLS	Helicase lymphoid-specific	lymphoid-spezifische Helikase
DNMBP	Dynamin-binding protein/ TUBA	Dynamin-bindendes Protein
ARHGEF6	Rac/ Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6	Rac/ Cdc42 Guanosin Austauschfaktor
SESN3	Sestrin 3	Regulator der TORC-Aktivität

Alle Gene wurden entsprechend ihrer Regulation durch die Validierung bestätigt. Für diese Gene wurden die Primer willkürlich in zwei verschiedenen, Intron-überspannenden Bereichen gewählt. Exemplarisch ist in Abbildung 4.4 die Validierung der Gene DTL und SLFN5 gezeigt. Die Lage sowie die erwartete Länge der amplifizierten Fragmente für DTL und SLFN5 können der Abbildung 4.2 entnommen werden. Die Darstellungen aller anderen differentiell regulierten Gene, die für die Validierung verwendet wurden, sind im Anhang in Abbildung A2 gezeigt.

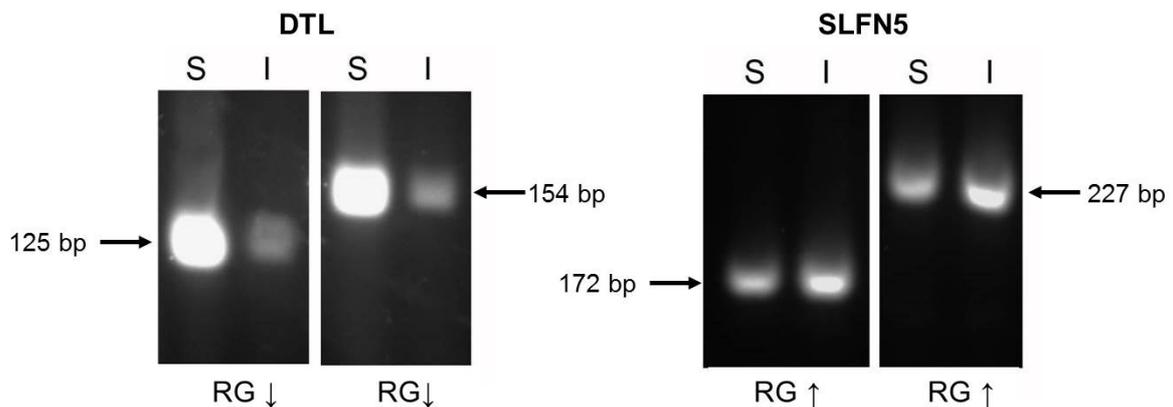


Abb. 4.4 Validierung geeigneter Gene repräsentativ für differentielle Regulation: zwei ausgewählte Gene mit erwarteter Länge des DNA-Fragments (Primerlokalisierung in Abbildung 4.2), S – stimuliert, I – inhibiert/ stimuliert, RG – differentiell regulierter Bereich, ↓ – herunterreguliert, ↑ – hochreguliert (verändert nach Riedel et al, 2013).

Nach Normalisierung mit dem entsprechenden β -Aktin-Amplifikat mittels AIDA war erkennbar, dass beide amplifizierten Bereiche aufgrund der Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 herunter- (DTL, ca. 45 %) bzw. hochreguliert (SLFN5, ca. 130 %) wurden. Das bestätigt die Annahme der differentiellen Regulation auf der gesamten Transkriptebene (Riedel et al, 2013).

4.2.2 Semiquantitative qPCR

Nachfolgend wurde die Validierung mittels der semiquantitative Realtime-PCR mit dem DyNAmo™ ColorFlash SYBR® Green System durchgeführt, in der dieselben Primer wie bei der RT-PCR verwendet wurden. Die relative Quantifizierung wurde über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode direkt durch das iCycler Programm ermittelt, wodurch das relative Expressionsverhältnis zweier Gruppen abgeschätzt werden kann. Vorausgesetzt wurde, dass zwischen Ziel- und Referenzgene optimale und identische Amplifikations-effizienzen herrschten, sodass die Housekeeping Gene eine relative Quantifizierung mit Hilfe der Normalisierung über das geometrische Mittel ermöglichten.

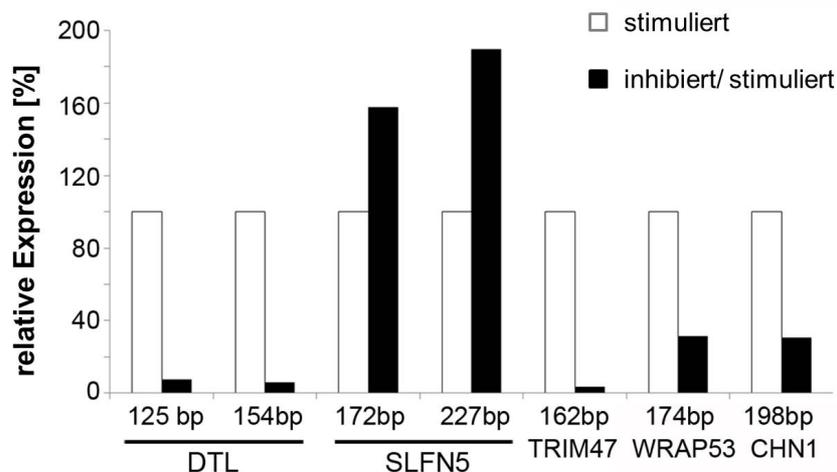


Abb. 4.5 Validierung der Expression alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene mittels qPCR: drei alternativ gespleißte Gene (TRIM47, WRAP53 und CHN1) und zwei differentiell regulierte Gene (DTL und SLFN5) mit erwarteter Länge des DNA-Fragments, weiße Balken - stimulierte Proben, schwarze Balken - gepaarte inhibiert/ stimulierte Proben (Triplet-Messung, Fragmentlokalisierung in Abbildung 4.1 und 4.2) (Riedel et al, 2013).

Die alternativ gespleißten Gene wurden durch die semiquantitative qPCR im alternativ gespleißten Bereich, wie schon bei der RT-PCR, bestätigt. Die Abbildung 4.5 zeigt, dass die relative Expression von TRIM47, WRAP53 und CHN1 bei PI3K-Inhibition im alternativ gespleißten Bereich deutlich herunterreguliert wurde. Aber auch hier ergaben die Reaktionen für den konstanten Bereich, wie schon bei der RT-PCR, unklare Ergebnisse. Das bestätigt die Annahme des alternativen Spleißens, da im Vergleich zu den differentiell regulierten Genen alternativ gespleißter und konstanter Bereich eine unterschiedliche Regulation zeigten und sich nicht aufeinander bezogen.

Die differentiell regulierten Gene hingegen wurden durch die semiquantitative qPCR jeweils mit beiden Primerpaaren bestätigt. Die Abbildung 4.5 zeigt, dass die relative Expression von DTL bei PI3K-Inhibition herunterreguliert wurde, während die von SLFN5, wie schon bei der RT-PCR gezeigt, hochreguliert wurde.

4.3 Funktionelle Annotation

Zur Definition biologisch relevanter Muster innerhalb der großen Datenmenge der Exon Array Analyse wurden funktionelle Annotationen mittels bioinformatischer Ansätze ermittelt. Beispiele für entsprechende Vorgehensweisen sind das Daten-Clustering und die Analyse der Hauptkomponenten. Mit diesen Annotationen können funktionell geclusterte Genfamilien sowie Genprodukte, die als potentielle T-Zell-Suppressoren agieren könnten, identifiziert werden.

Die generierten und validierten Listen für alternativ gespleißte (2192) und differentiell regulierte (619) Gene wurden für die funktionelle Analyse eingesetzt. Verschiedene Analysemöglichkeiten wurden mit Hilfe der folgenden web-basierten Hilfsprogramme aufgeführt. Aus den ermittelten Genclustern konnten anschließend funktionell interessante Gene selektiert werden, die auch hinsichtlich ihrer Expression und Regulation geeignet waren.

4.3.1 Reactome - Signalwegdatenbank

Reactome repräsentiert facettenreiche Prozesse im humanen System, wie z.B. Metabolismus, regulatorische Signalwege, Signaltransduktion und biologische Prozesse (Joshi-Tope et al, 2005; Vastrik et al, 2007). Das Grundprinzip von Reactome ist die Darstellung biologischer Signalwege mit mechanistischer Richtigkeit, mittels der Datenanalyse kann auch eine Anreicherungsauswertung durchgeführt werden. Die Annotation erfolgte hauptsächlich in den Bereichen Zellzyklus, Stoffwechsel, Signaltransduktion, Transport, Zellbewegung, Immunreaktion, Pathogen-Wechselwirkungen und Neurobiologie.

Die folgende Abbildung 4.6 zeigt den prozentualen Anteil der beteiligten Gene aus den entsprechenden Genlisten im Verhältnis zu den berücksichtigten Genen für die verschiedenen Signalwege.

Der Abbildung kann entnommen werden, dass alternativ gespleißte Gene bevorzugt in den Prozessen Extrazelluläre Matrixorganisation und Muskelkontraktion gehäuft vorkommen, wohingegen differentiell regulierte Gene eher mit der DNA-Replikation in Verbindung gebracht werden können. Beide Gruppen sind - wie zu erwarten war - in den Prozessen Meiose, DNA-Reparatur und Zellzyklus angereichert, da die Veränderungen *downstream* der PI3K-Hemmung stattfinden.

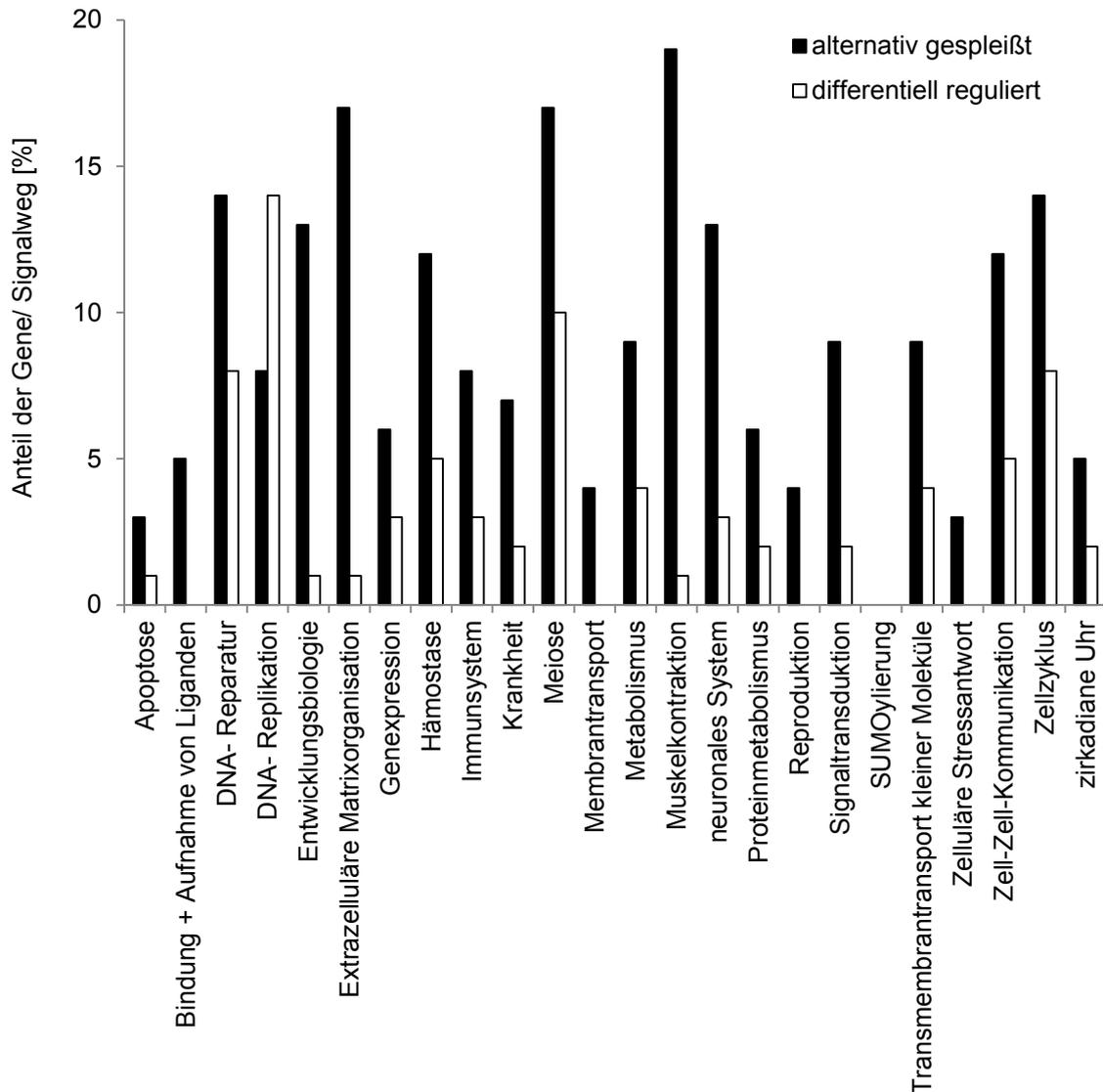


Abb. 4.6 Reactome-Überblick über Anreicherung von Genen in speziellen Signalwegen: Anteil der AS und RG Gene im Verhältnis zu den betrachteten Genen pro Signalweg in Prozent; schwarz – AS, weiß – RG (Originaldatensatz im Anhang Tabelle A1).

4.3.2 GENE SeT AnaLysis Toolkit V2

Über dieses Hilfsprogramm kann der KEGG-Mapper (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) verwendet werden. Diese Datenbank informiert unter anderem über den Metabolismus, enzymatische Signalwege, Stoffwechselwege, Medikamentenentwicklung, Gene und Proteine in verschiedenen Organismen.

Für die KEGG-Analyse über das GENE SeT AnaLysis Toolkit V2 wurden folgende Parameter verwendet: Anreicherungsanalyse - KEGG Analyse, Organismus - *homo sapiens*, Id Type - Gen Symbol, Ref Set - entrezgene, Signifikanzlevel - Top10, Statistischer Test - hypergeometrisch, Multipler Testabgleich - nach Benjamini und Hochberg (BH), Minimale Genanzahl für eine Kategorie - 2.

4.3.2.1 Alternativ gespleißte Gene

Die folgende Abbildung zeigt die Anzahl der beobachteten Gene aus der alternativ gespleißten Genliste zur Anzahl der statistisch erwarteten Gene in Signalwegen, in denen die entsprechenden Gencluster angereichert vorlagen.

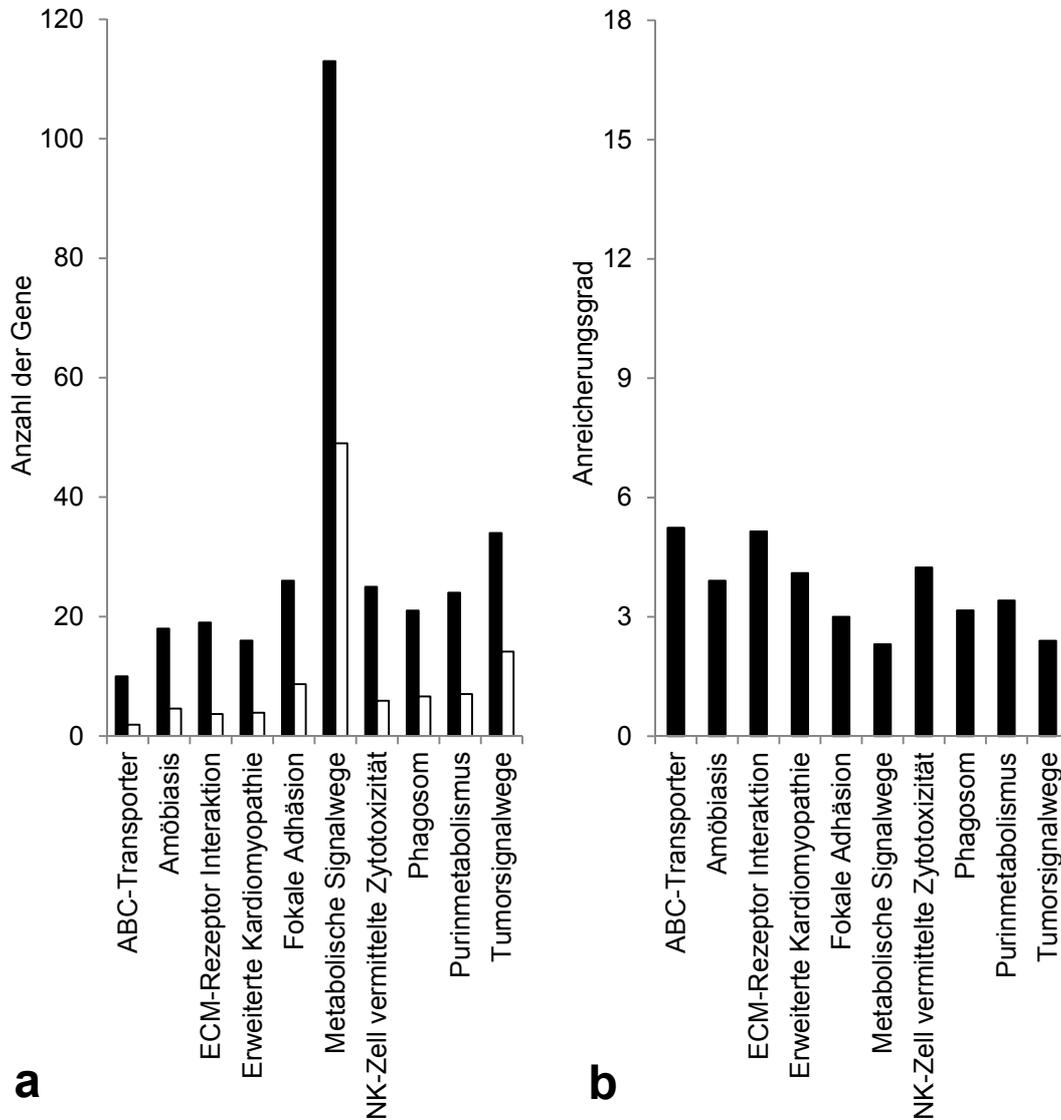


Abb. 4.7 KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der alternativ gespleißten Gene in speziellen Signalwegen: a) totale Anzahl der AS Gene im Verhältnis zu den erwarteten Genen für jeden Signalweg; schwarz – Anzahl der beobachteten Gene, weiß – Anzahl der statistisch erwarteten Gene; b) Anreicherungsgrad an AS Genen für die entsprechende Kategorie (Originaldatensatz im Anhang Tabelle A2).

Die zehn Treffer mit dem höchsten Anreicherungsgrad aus Abbildung 4.7 zeigen, dass entgegen der statistisch erwarteten Anzahl von Genen alternativ gespleißte Gene besonders in den Prozessen wie ABC-Transporter, extrazelluläre Matrixorganisation und NK-Zell vermittelte Zytotoxizität angereichert sind, aber auch bei der fokalen Adhäsion und in Tumorsignalwegen. Eine ausgesprochen große Anzahl von 113 Genen wurde bei den metabolischen Signalwegen beobachtet, wobei nur 49 Gene statistisch erwartet wurden.

4.3.2.2 Differentiell regulierte Gene

Die folgende Abbildung zeigt die Anzahl der beobachteten Gene aus der differentiell regulierten Genliste zur Anzahl der statistisch erwarteten Gene in Signalwegen, in denen die entsprechenden Gencluster angereichert vorlagen.

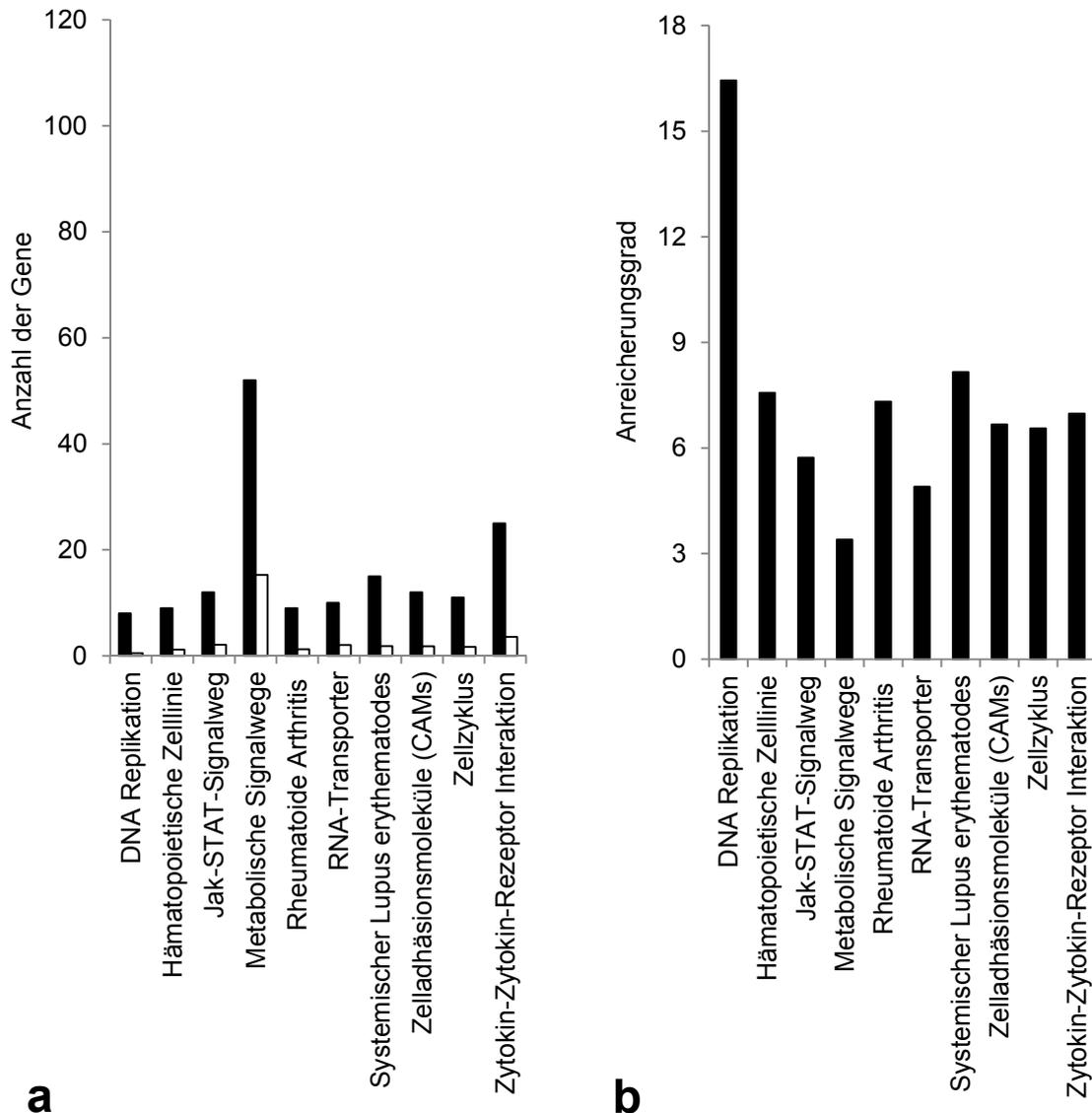


Abb. 4.8 KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der differentiell regulierten Gene in speziellen Signalwegen: a) totale Anzahl der RG Gene im Verhältnis zu den erwarteten Genen für jeden Signalweg; schwarz – Anzahl der beobachteten Gene, weiß – Anzahl der statistisch erwarteten Gene; b) Anreicherungsgrad an RG Genen für die entsprechende Kategorie (Originaldatensatz im Anhang Tabelle A3).

Die zehn Treffer mit dem höchsten Anreicherungsgrad aus Abbildung 4.8 zeigen, dass entgegen der statistisch erwarteten Anzahl von Genen differentiell regulierte Gene in allen zehn aufgeführten Prozessen wie z.B. Zellzyklus, Jak-STAT-Signalweg, Zelladhäsionsmoleküle und Zytokin-Zytokin-Rezeptor Interaktion drei- bis achtfach angereichert sind, jedoch besonders bei der DNA-Replikation mit einer ca. 16-fachen Anreicherung. Genauso wie bei den alternativ gespleißten Genen ist auch hier eine

deutlich größere Anzahl von 52 Genen bei den metabolischen Signalwegen zu beobachten, wobei nur 15 Gene statistisch erwartet wurden.

4.3.3 Blast2GO

Blast2GO ist ein umfassendes, bioinformatisches Hilfsprogramm, das für die automatisierte, funktionelle Annotation im Hochdurchsatz entwickelt wurde (Conesa, Götz, 2009). Diese Annotation ermöglicht eine Kategorisierung der Gene in funktionelle Klassen, um die physiologische Bedeutung großer Gengruppen zu verstehen und funktionelle Unterschiede zwischen verschiedenen Proben zu ermitteln (Conesa et al, 2005). Es verwendet den BLAST-Algorithmus (*Basic local alignment search tool*; Altschul et al, 1990), um homologe Sequenzen zu erkennen und mit der funktionellen Analyse bereits bekannter Sequenzen abzugleichen. Dieser Algorithmus vereint Gemeinsamkeit, Ausmaß der Homologie, eine Datenbank nach Wahl, die Gene Ontology (GO)-Hierarchie und die Qualität der ursprünglichen Annotation. Die ermittelten Informationen werden z.B. über das GO-Vokabular dargestellt, welches Gen und Genprodukt quer durch alle Spezies vereinheitlichen soll. Verschiedenste Funktionen können für die Visualisierung und die statistische Analyse verwendet werden (Conesa, Götz, 2008).

Blast2GO benutzt den statistischen *Fisher's Exact* Signifikanztest und erstellt statistische Baumdiagramme für den biologischen Prozess, die molekulare Funktion und zelluläre Komponenten für die Darstellung von Signalwegen, in denen Gene der Genlisten über- oder unterrepräsentiert sind. Des Weiteren ermöglicht es ebenso eine Anreicherungsanalyse. Die Funktion GOslim ist eine eingeschränkte Version von GO, die nur einen Teil der Konditionen der gesamten GOs beinhaltet. Daher ermöglicht GOslim deutlich schneller die Zusammenfassung der Ergebnisse der GO-Annotation der beiden Genlisten und wurde bei allen folgenden Blast2GO-Abbildungen verwendet. Für die Anreicherungsdiagramme wurde ein zweiseitiger Test verwendet, sodass sowohl positive (rot) als auch negative (grün) Anreicherungsanalysen dargestellt wurden. Um falsch-positive Werte zu kontrollieren, stehen verschiedene Signifikanzparameter zur Verfügung: die *false discovery rate* (FDR), die *family-wise error rate* (FWER) und der durch den *Fisher's Exact Test* ermittelte Fisher p-Value. Die FDR gibt den Signifikanzgrenzwert von 0,05 an, sodass nur signifikante Ergebnisse angezeigt werden (Conesa, Götz, 2008).

Die folgenden Abbildungen zeigen die Blast2GO-GOslim-Baumdiagramme für die alternativ gespleißten und differentiell regulierten Gene anhand von zellulären Komponenten (AS – Abbildung 4.9, RG – Abbildung 4.10), biologischem Prozess (AS – Abbildung 4.11, RG – Abbildung 4.12) und molekularer Funktion (AS – Abbildung 4.13, RG – Abbildung 4.14). Diese Darstellungsweise ermöglicht es auf einen Blick zu erkennen, in welchen Bereichen des Signalwegs AS bzw. RG Gene über- (rot) und unterrepräsentiert (grün) sind, weshalb man auch von Anreicherungsgraphen spricht.

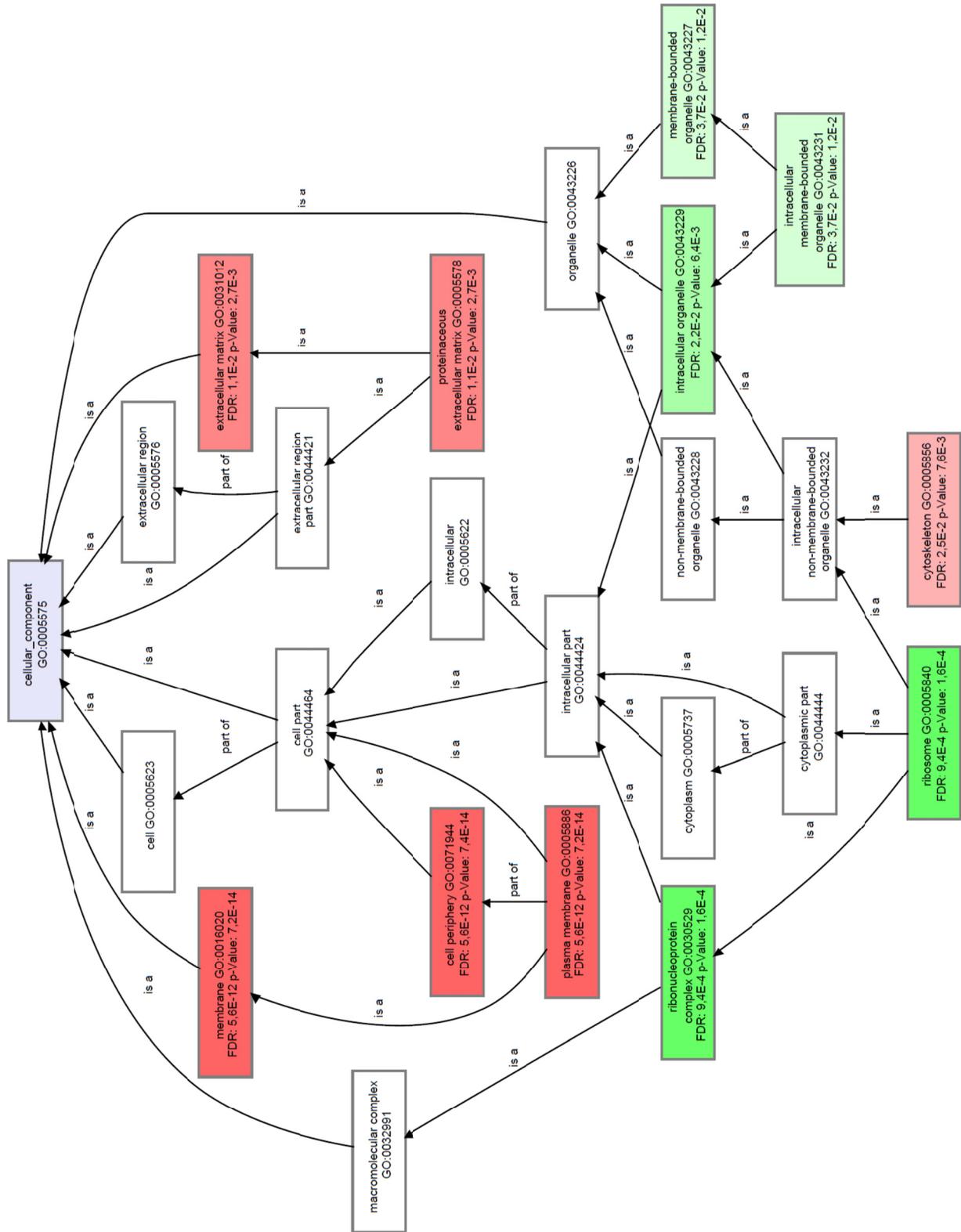


Abb. 4.9 Blast2GO-Überblick über die zellulären Komponenten der alternativ gespleißten Gene: grün – Signalwege, in denen AS Gene unterrepräsentiert sind; rot – Signalwege, in denen AS Gene überrepräsentiert sind; GO-Nummer, FDR – false discovery rate, p-Value.

4 Ergebnisse

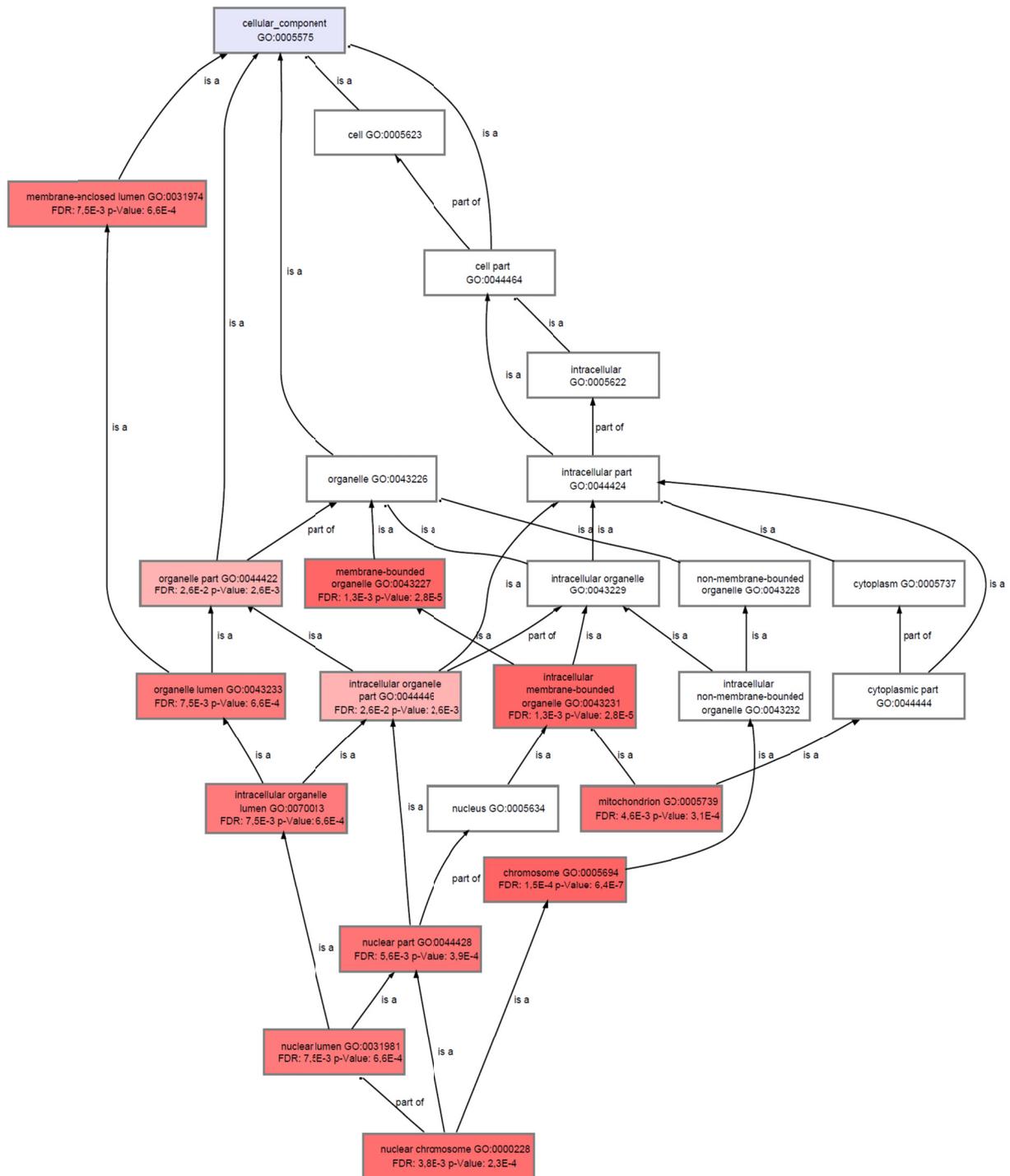


Abb. 4.10 Blast2GO-Überblick über die zellulären Komponenten der differentiell regulierten Gene: rot – Signalwege, in denen RG Gene überrepräsentiert sind; GO-Nummer, FDR – false discovery rate, p-Value.

Bei der Kategorie zelluläre Komponenten zeigen die zwei Genlisten die deutlichsten Unterschiede. In Abbildung 4.9 für zelluläre Komponenten kommen die alternativ gespleißten Gene hauptsächlich in den Bereichen extrazelluläre Matrix, Plasmamembran, Zellperipherie und im Zytoskelett vor und sind bei den intrazellulären Organellen sogar unterrepräsentiert. Die differentiell regulierten Gene in Abbildung 4.10 sind hingegen im nukleären, dem intrazellulären Lumen und den Organellen überrepräsentiert.

4 Ergebnisse

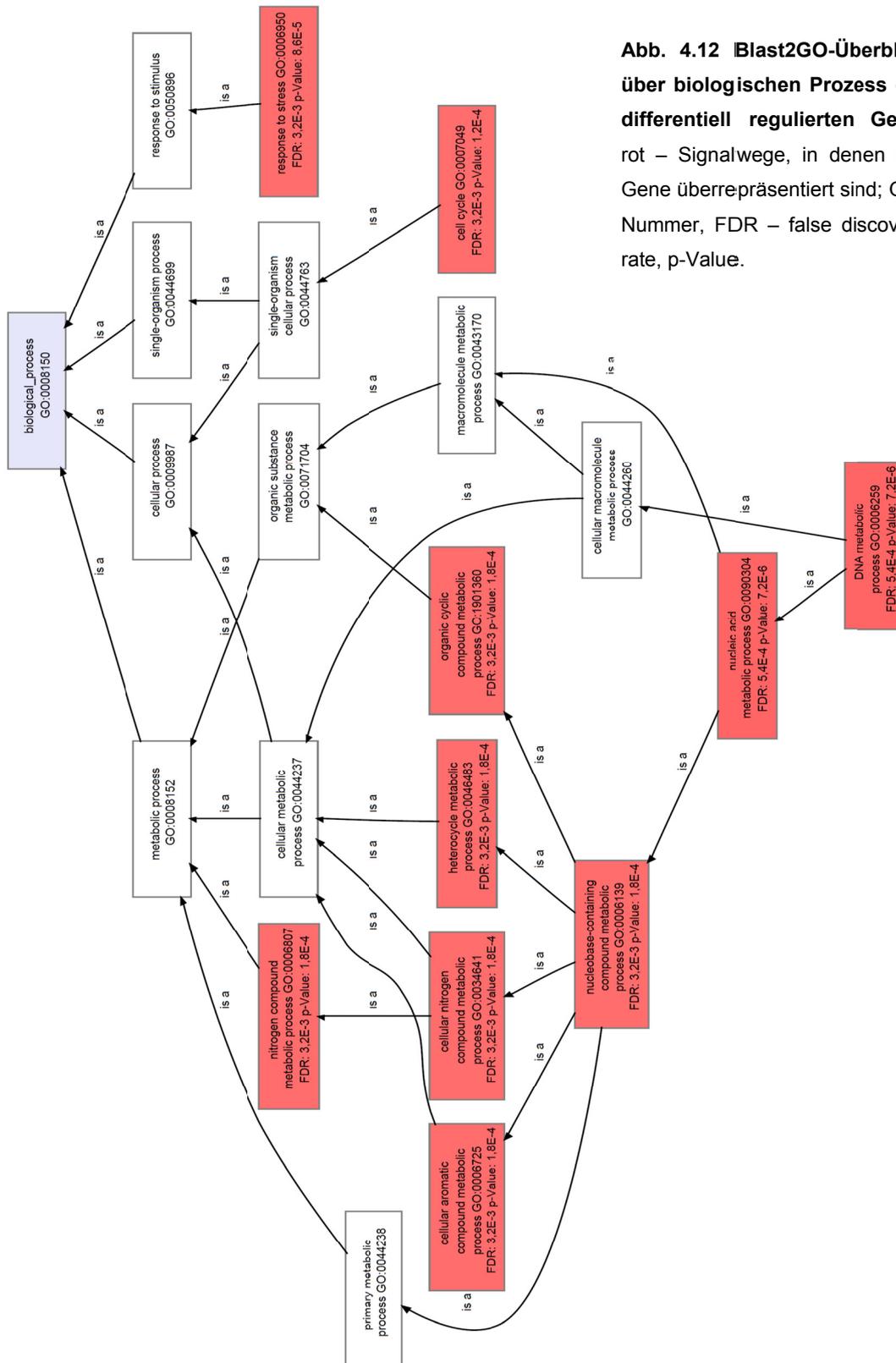


Abb. 4.12 Blast2GO-Überblick über biologischen Prozess der differentiell regulierten Gene: rot – Signalwege, in denen RG Gene überrepräsentiert sind; GO-Nummer, FDR – false discovery rate, p-Value.

Die Abbildung 4.11 für biologische Prozesse zeigt, dass alternativ gespleißte Gene primär an Prozessen wie Regulation, Zellproliferation, Signaltransduktion und Zytoskelettorganisation verstärkt beteiligt sind, sekundär aber auch an DNA-metabolischen Prozessen, Stressantwort und Zellzyklus. Letztere Bereiche sind ebenfalls in der Liste mit den differentiell regulierten Genen gehäuft anzufinden, was der Abbildung 4.12 entnommen werden kann.

4 Ergebnisse

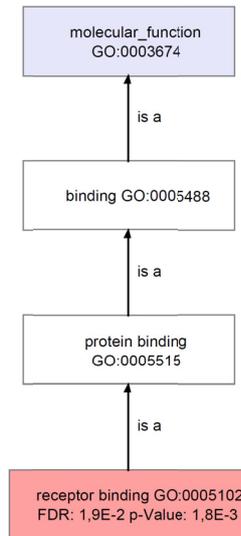


Abb. 4.14 Blast2GO-Überblick über die molekulare Funktion der differentiell regulierten Gene: rot – Signalwege, in denen RG Gene überrepräsentiert sind; GO-Nummer, FDR – false discovery rate, p-Value.

Die Abbildung 4.13 für molekulare Funktion zeigt, dass ein Großteil der alternativ gespleißten Gene in den Bereichen Rezeptoraktivität, Ionenbindung, Signaltransduktion und Zytoskelettorganisation vorhanden ist. Hingegen zeigt Abbildung 4.14, dass differentiell regulierte Gene ausschließlich im Bereich Rezeptorbindung angereichert sind.

4.4 Selektion einzelner alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene für funktionelle Tests

Aufgrund der funktionellen Annotation der Listen für alternativ gespleißte und differentiell regulierte Gene konnten funktionell interessante Gene selektiert werden, die auch hinsichtlich ihrer Expression und Regulation geeignet waren oder deren Spleißmuster direkt auf alternative Spleißprodukte hinwiesen (Tabelle 4.3).

Tab. 4.3 Selektion funktionell interessanter alternativ gespleißter und differentiell regulierter Genen: AS – alternativ gespleißt, RG – differentiell reguliert.

Gensymbol	Beschreibung	Funktion	kodierende Exons
FBXO6 (AS)	F-box only protein 6	Untereinheit des SKP1/ Cullin-F-box Komplexes der Ubiquitinierung	5
FAM184A (AS)	family with sequence similarity 184, member A	unbekannt	17
LAT2 (AS)	linker for activation of T cells family, member 2	LAT-ähnliches Transmembran-Adapterprotein	11
SLFN5 (RG)	Schlafen family member 5	Zellzyklusregulator	4

4 Ergebnisse

Beim Vergleich der Exonzusammensetzung alternativ gespleißter Gene fiel eine gewisse Diskrepanz zwischen der Anzahl der im Exon Array ermittelten Exons und der Anzahl auf, die beim BLAST gegen das humane Genom angezeigt wurde. Bei einem weiteren Sequenzabgleich konnte festgestellt werden, dass nicht alle beprobten Exons kodierend waren, sodass eine Selektion geeigneter Gene in Hinsicht auf Expressionsniveau und Regulation nicht alleine auf der Grundlage der Visualisierung im Diagramm durchgeführt werden konnte. Fielen einzelne Messpunkte des Exon Arrays weg, da sich diese in einem nichtkodierenden Exon befanden, so konnte sich das Spleißmuster zu dem differentiell regulierter Gene hin verändern. In Folge dessen wurde die Anzahl alternativ gespleißter Gene mit potentieller funktioneller Relevanz weiter eingeschränkt.

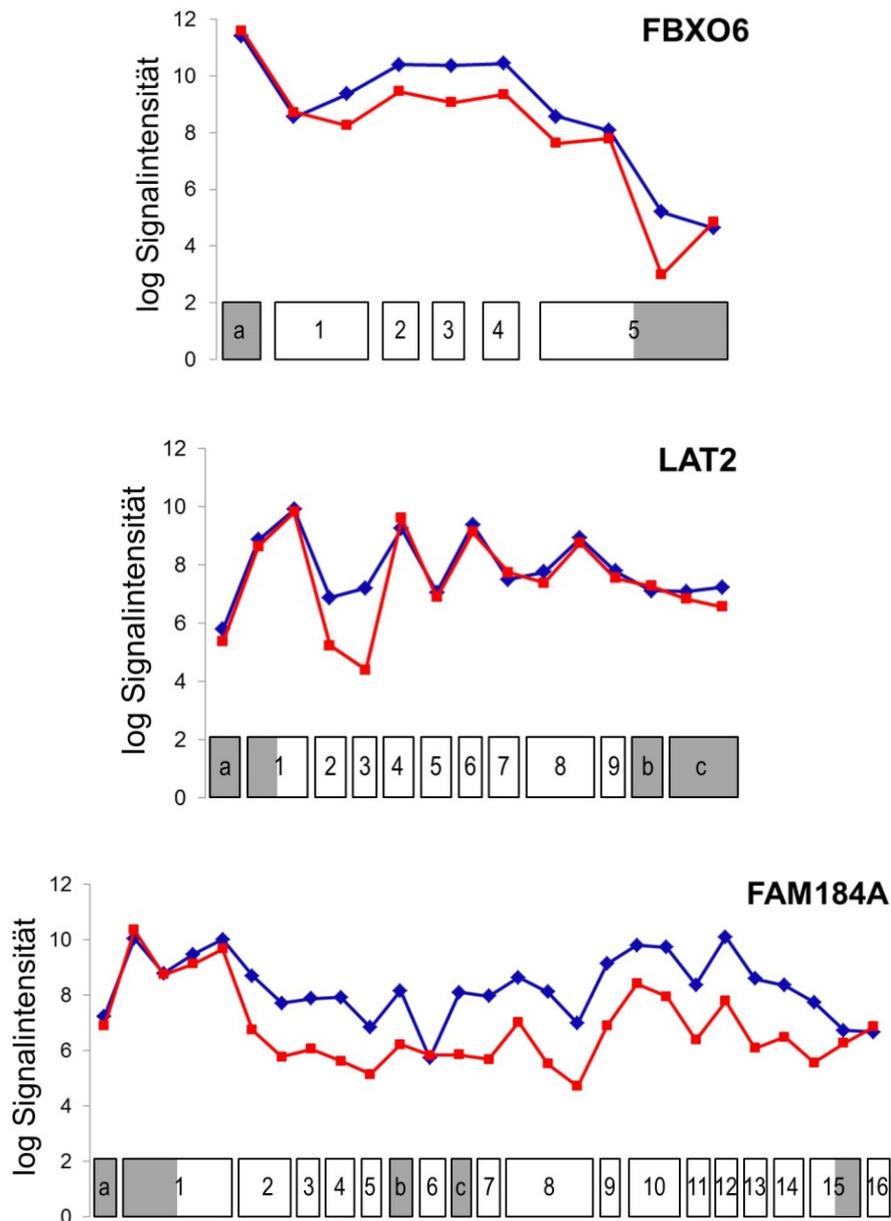


Abb. 4.15 Visualisierung selektierter alternativ gespleißter Gene auf Exonebene, geeignet hinsichtlich ihrer Expression und Regulation: auf der x-Achse sind die durchnummerierten Exons aufgetragen, a-c bzw. grau hinterlegt – nicht kodierende Exons/ Exonbereiche, 1 - 16 bzw. weiß hinterlegt – kodierende Exons/ Exonbereiche; blau (Raute) – stimulierte Probe, rot (Quadrat) – gepaarte inhihiert/ stimulierte Probe.

4 Ergebnisse

Auf dieser Grundlage wurden alternativ gespleißte Gene ausgewählt, die entweder funktionell interessant waren oder deren Spleißmuster eine eindeutige alternative Isoform versprachen. Die Abbildung 4.15 zeigt diese Selektion. Das Gen FBXO6 ist ein gutes Beispiel dafür, dass ein durch bioinformatische Analyse als alternativ gespleißt identifiziertes Gen bei weiteren Analysen bevorzugt als differentiell reguliertes Gen wahrgenommen werden würde. 3' und 5' Ende der beprobten Sequenz sind nicht kodierend, die Primer binden innerhalb der kodierenden Sequenz Exon 1 - 5 (weißer Bereich), sodass nunmehr keine alternativ gespleißte Isoform bei Gelanalysen zu erwarten war. Dennoch blieb das an der Ubiquitinierung beteiligte FBXO6 als potentieller Silencing Faktor für T-Zellen bzw. wegen seiner möglichen Beteiligung am Zellzyklus für funktionelle Analysen interessant, da es die Stabilität der Checkpoint Kinase 1 (Chk1) reguliert (Skaar et al, 2013; Zhang et al, 2009a). LAT2 hingegen zeigte ein typisches alternatives Spleißmuster, sodass mindestens eine eventuell sogar zwei alternativ gespleißte Isoformen erwartet werden konnten, da Exon 2 und/ oder Exon 3 aus der Sequenz gespleißt werden. Als LAT-ähnliches Transmembran-Adapterprotein kann es mit LAT um direkte Interaktionspartner konkurrieren, was dieses Gen ebenfalls für funktionelle Experimente interessant machte (Zhu et al, 2006). FAM184A ist ein funktionell nicht charakterisiertes Gen. Wegen seiner PI3K-Inhibition induzierten Regulation und einer möglichen größeren Spleißisoform blieb es in der engeren Auswahl. Das differentiell regulierte Gen SLFN5 (Abbildung 4.2) benötigte keinen Exonvergleich mittels BLAST, da es bei Inhibition auf der gesamten Transkriptebene hochreguliert wurde und keine Isoformen erwartet wurden. Dieses Gen wurde in die funktionellen Analysen miteinbezogen, da SLFN5 und andere Mitglieder der SLFN-Familie bei der Tumorsuppression vielversprechende Erkenntnisse zeigten (Mavrommatis et al, 2013; Katsoulidis et al, 2010).

4.5 Klonierung der selektierten Gene in den Expressionsvektor pEGFP-N1

Über PCRs mit sequenzspezifischen Primern (Tabelle 2.4) wurden die in Tabelle 4.4 aufgeführten Gene aus den RNAs von T-Zellen gewonnen, von denen eine Hälfte inhibiert/ stimuliert und die andere Hälfte nur stimuliert wurde. Für die inhibiert/ stimulierten RNA-Proben wurden bei der Agarosegelelektrophorese kürzere bzw. längere Fragmente erwartet, die auf alternativ gespleißte Genprodukte zurückgeführt werden konnten. Die Tabelle 4.4 zeigt die Länge der Hauptisoform, die der erwarteten alternativen Isoformen, soweit vorhanden, und die für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme.

Tab. 4.4 Klonierungsinformationen zu den selektierten Genen: RE – Restriktionsenzym.

Gensymbol	Hauptisoform	Isoformen (fehlende Exons)	RE
FBXO6	882 bp	---	<i>Xho I, Hind III</i>
FAM184A	3423 bp	3563 bp (Exon 6 – 140 bp)	<i>Xho I, EcoR I</i>
LAT2	732 bp	688 bp (Exon 2 – 44 bp) 688 bp (Exon 3 – 44 bp) 644 bp (Exon 2 und 3 – 88 bp)	<i>Xho I, Hind III</i>
SLFN5	2676 bp	---	<i>Xho I, Hind III</i>

4 Ergebnisse

In der Abbildung 4.16 sind repräsentative Beispiele für die Agarosegelelektrophorese der jeweiligen Gene mit den erwarteten Fragmenten dargestellt.

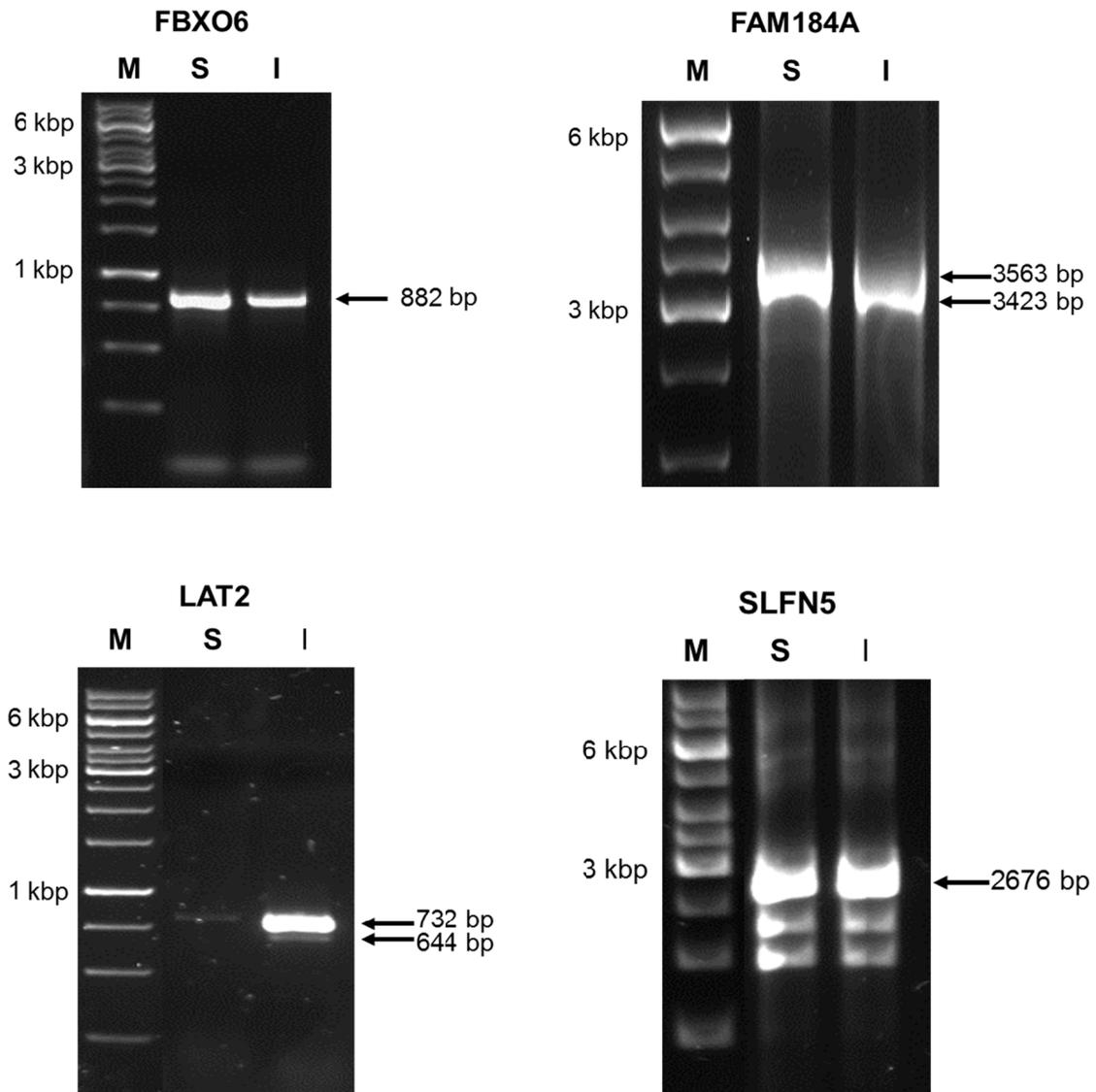


Abb. 4.16 Repräsentative Beispiele für die Agarosegelelektrophorese der ausgewählten Gene mit den erwarteten Fragmenten: M – Marker, S – stimulierte Probe, I – gepaarte inhibiert/ stimulierte Probe, (k)bp – (kilo-)Basenpaare.

Beim alternativ gespleißten Gen FBXO6 (882 bp) wurden nie Isoformen gesehen und die Bandenintensität ist in der inhibiert/ stimulierten Probe reduziert, was mit den Erwartungen übereinstimmt. SLFN5 zeigte neben der vollständigen Fragmentlänge von 2676 bp meist zwei weitere Isoformen, die in der Literatur bisher nicht beschrieben sind. FBXO6 und SLFN5 zeichneten sich durch ihre Konstanz der Ergebnisse über verschiedene Spender hinweg aus.

FAM184A hingegen zeigte neben der erwarteten Intensitätsreduktion in der inhibiert/ stimulierten Probe eine schwache Bande direkt über der Hauptisoform von 3423 bp. Bei dieser Bande kann man von der größeren Isoform von 3563 bp ausgehen, die Exon 6 beinhaltet (*exon inclusion*). Auch LAT2 weist eine

4 Ergebnisse

klare Bande unter der längsten Isoform von 732 bp auf. Bei dieser Band handelt es sich wahrscheinlich um die kürzeste Isoform von 644 bp, bei der Exon 2 und Exon 3 fehlen (normales Spleißen). Durch die stärkere Intensität der Hauptbande ist es möglich, dass die Isoformen, in denen nur ein Exon fehlt und die beide 688 bp lang sind, überstrahlt werden und folglich in der Abbildung nicht zu erkennen sind. FAM184A und LAT2 zeigten besonders bezüglich der alternativen Isoformen eine starke Spender-varianz. So konnte sich das Spleißmuster von Spender zu Spender unterscheiden oder auch gar keine alternativen Isoformen auftreten. Ein solches Beispiel ist für FAM184A in Abbildung 4.17 gezeigt. Die Haupt- und die alternative Isoform mit dem zusätzlichen Exon fehlen in der inhibiert/ stimulierten Probe vollständig, dafür wurde ein deutlich kleineres, wahrscheinlich unspezifisches Amplifikat bei ca. 700 bp hochreguliert.

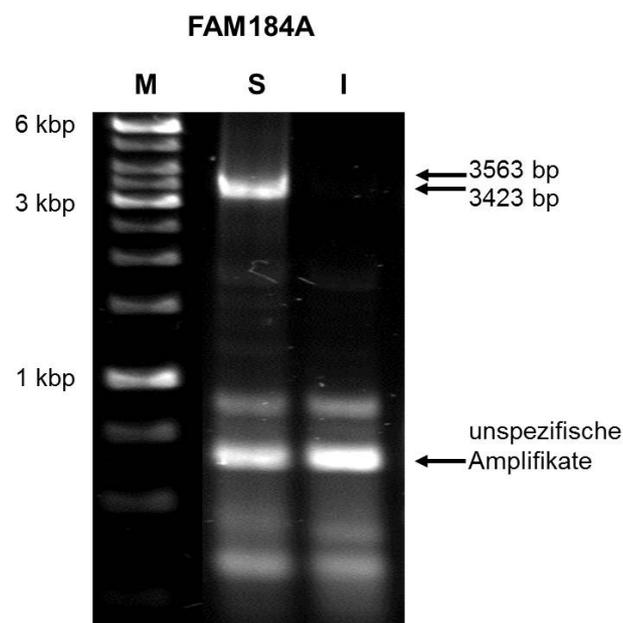


Abb. 4.17 Agarosegelelektrophoresebeispiel für ein variierendes Spleißmuster anhand von FAM184A: M – Marker, S – stimulierte Probe, I – gepaarte inhibiert/ stimulierte Probe, kbp – Kilobasenpaare.

Die detektierten Isoformen wurden aus den Gelen eluiert und dienten als Matrizen für PCRs mit Primern, die die Gen-spezifische CDS-Sequenz durch die verschiedenen Restriktionsschnittstellen am 3' bzw. 5' Ende erweiterten (Tabellen 2.5 und 4.4).

Bei der Überprüfung dieser Klonierungs-PCR mittels Agarosegelelektrophorese waren die Banden für die alternativ gespleißten Isoformen nicht mehr detektierbar oder stellten sich bei der Überprüfung mittels Sequenzierung als Hauptisoform heraus. Auch beim Auftragen des achtfachen PCR-Ansatzes konnten die gewünschten Isoformen nicht nachgewiesen werden, sodass für die weitere Klonierung immer die Hauptisoform isoliert und verwendet wurde.

Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden in den Leervektor pEGFP-N1 im Verhältnis 1:1 bzw. 1:3 ligiert und die so gewonnenen Plasmide in die kompetenten Bakterien XL10-Gold transformiert. Mittels Kolonie-PCR, Minipräparation, Verdau und Sequenzierung wurden positive Klone ermittelt und die entsprechende Plasmid-DNA über Maxipräparation in größeren Mengen gewonnen.

4.6 Transiente Expression der pEGFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen

Um erste Hinweise auf mögliche Auswirkungen der selektierten Genprodukte auf die Zellviabilität, Proliferation und Expansion zu erhalten, wurden die in Abschnitt 4.5 generierten Plasmide transient in HEK293T-Zellen exprimiert.

Wie anhand der unten dargestellten Histogramme (Abbildung 4.18) beispielhaft gezeigt, waren 48h nach Transfektion in allen Kulturen EGFP-positive Zellen detektierbar, wobei die durchschnittlichen Signalintensitäten für pEGFP bei 188, für pEGFP-SLFN5 bei 15, für pEGFP-FBXO6 bei 26 und für pEGFP-LAT2 bei 60 lagen.

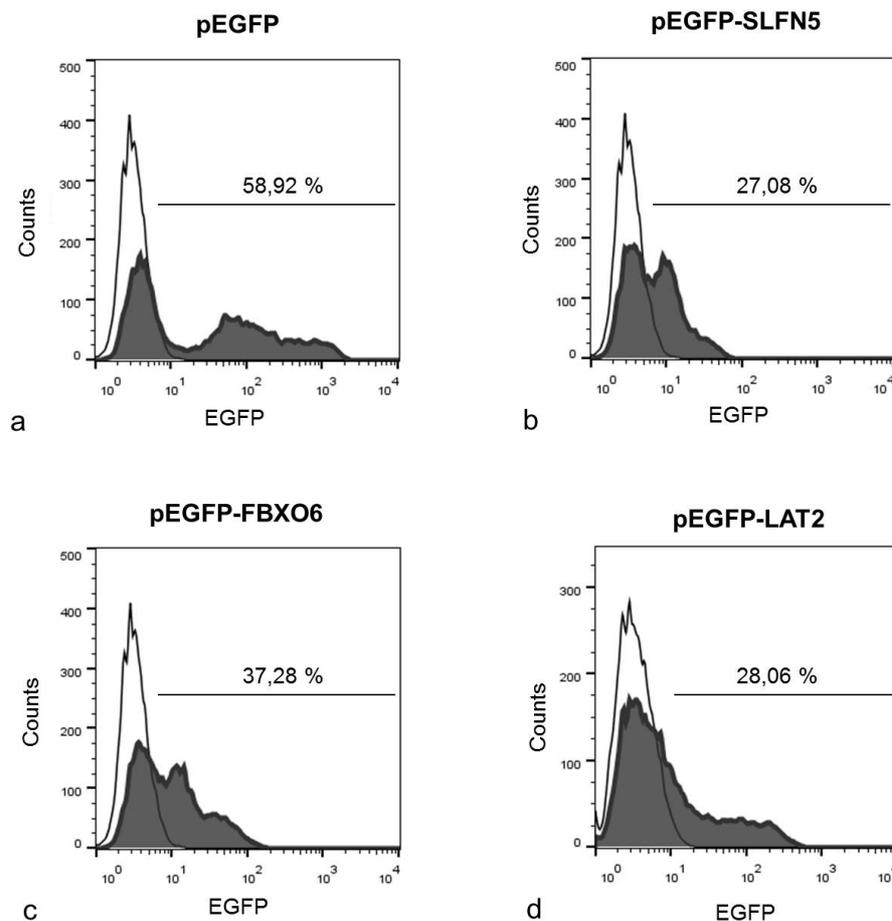


Abb. 4.18 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz der pEGFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen nach 48 h: offenes Histogramm – Negativkontrolle, gefülltes Histogramm – transfizierte HEK293T-Zellen mit prozentualer Angabe der EGFP-positiven Subpopulation.

4.6.1 Nachweis der Fusionsproteine mittels Western Blot

Die Fusionsproteine wurden im Western Blot mittels GFP-Antikörperfärbung nachgewiesen, um zu ermitteln, ob die translatierten Proteine den erwarteten Größen entsprachen. Dazu wurden Aliquots der Lysate aus transfizierten HEK293T-Zellen über ein Proteingel aufgetrennt. Die in Abbildung 4.19 ermittelten Proteingrößen stimmten mit den erwarteten überein.

4 Ergebnisse

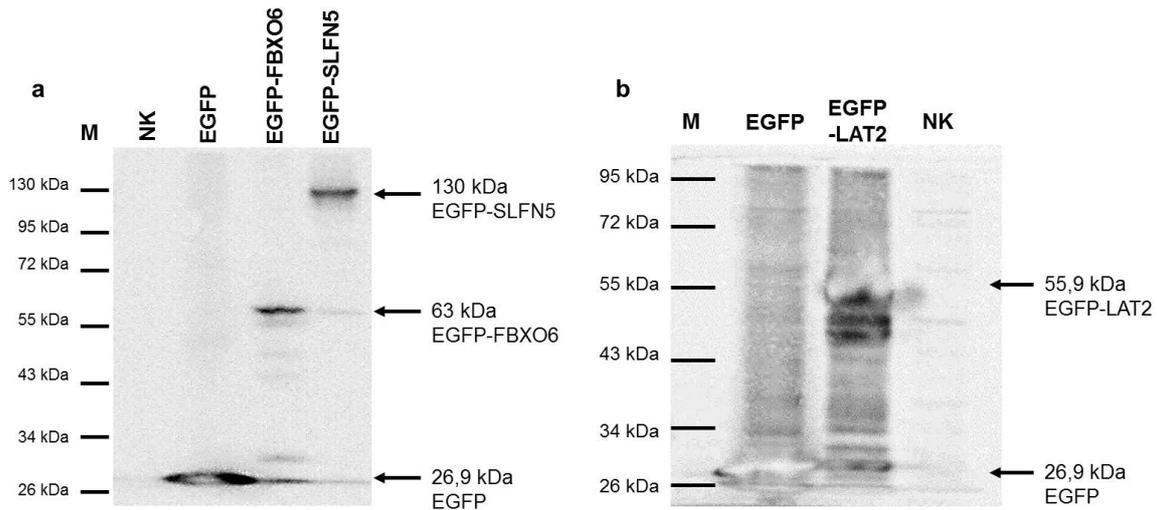


Abb. 4.19 Nachweis der Fusionsprotein im Western Blot: Fusionsproteine wurden über ein 12 % SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit α -GFP-Antikörper detektiert; die ermittelten Proteingrößen stimmen mit den erwarteten überein; M – Marker, NK – Negativkontrolle.

4.6.2 Effekt der Überexpression auf Zellviabilität und Apoptose

Zunächst wurde ein möglicher Einfluss der Transgene auf die Zellviabilität analysiert. Hierzu wurden die Zellen 24 h bzw. 48 h nach Transfektion mit 7AAD gefärbt und der Prozentsatz 7AAD positiver Zellen in der HEK-Population bzw. EGFP-7AAD-positiver Zellen in der EGFP-Population ermittelt. Wie in Abbildung 4.20 zu sehen, war in keiner der analysierten, Transgen exprimierenden Kulturen ein erhöhter Viabilitätsverlust zu verzeichnen.

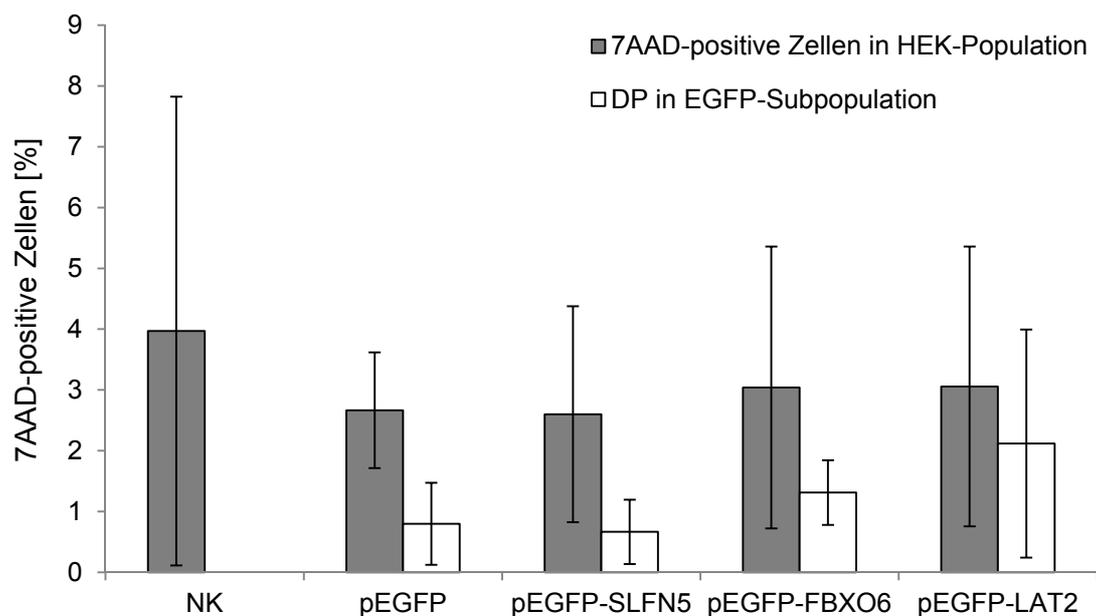


Abb. 4.20 Zellviabilität der HEK-Population: grau – prozentualer Anteil der toten, 7AAD-positiven Zellen zu der gesamten HEK-Population, weiß – prozentualer Anteil der 7AAD-EGFP-doppelt positiven Zellen (DP) zu der EGFP-Subpopulation, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung für jede Gruppe.

4 Ergebnisse

Nach einem ähnlichen Schema vorgehend, wurde mittels AnnexinV der Anteil apoptotischer Zellen in der HEK-Population bzw. EGFP-AnnexinV-positiver Zellen in der EGFP-Population ermittelt (Abbildung 4.21). Auch hier konnten keine statistisch relevanten Unterschiede in den untersuchten Kulturen dokumentiert werden.

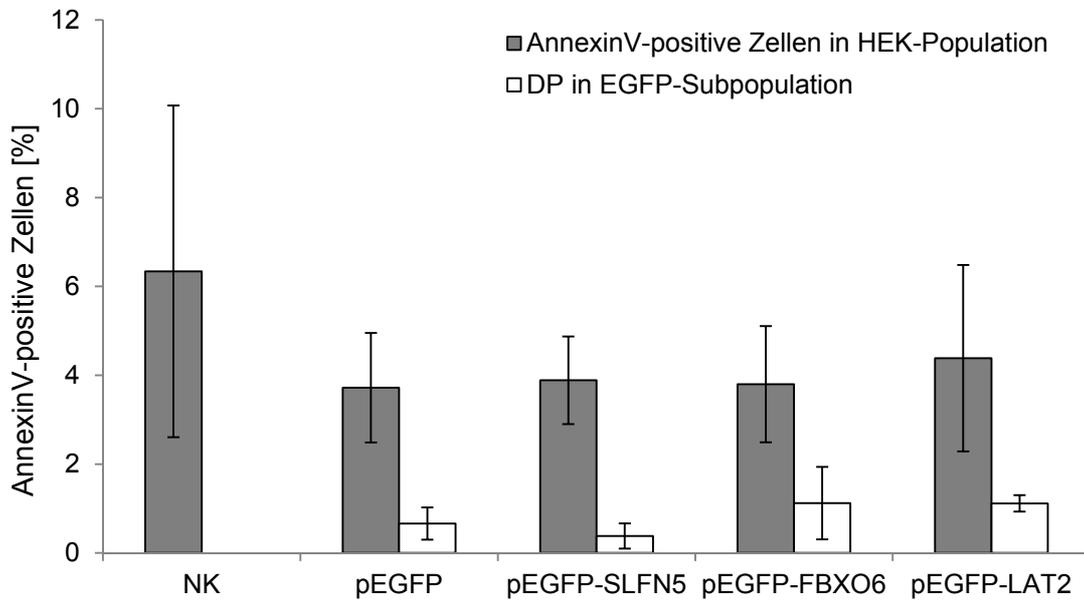


Abb. 4.21 Anteil der apoptotischen Zellen an der HEK-Population: grau – prozentualer Anteil der apoptotischen, AnnexinV-positiven Zellen zu der gesamten HEK-Population, weiß – prozentualer Anteil der AnnexinV-EGFP-doppelt positiven Zellen (DP) zu der EGFP-Subpopulation, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung für jede Gruppe.

Diese Befunde zeigten, dass die Überexpression von SLFN5, FBXO6 oder LAT2 nicht von einem Viabilitätsverlust der Zellen begleitet war.

4.6.3 Effekt der Überexpression auf die Proliferation

Zur Analyse eines möglichen Einflusses der Transgene auf die Zellproliferation wurden die mit den Fusionsplasmiden transfizierten HEK293T-Zellen mittels α -Ki67-PE gefärbt. Hierdurch lässt sich Zellproliferation nachweisen, da Ki67 im Nukleus von G₁-, S-, G₂-, M-Phase-, nicht aber der G₀-Phase-Zellen detektierbar ist (Scholzen, Gerdes, 2000). Wie in drei unabhängigen Experimenten ermittelt, beeinträchtigte keines der Transgene die Proliferation der Zellen (Abbildung 4.22). Vielmehr wurde eine statistisch allerdings nicht relevante leichte Erhöhung der Proliferation der EGFP-positiven Zellen beobachtet.

4 Ergebnisse

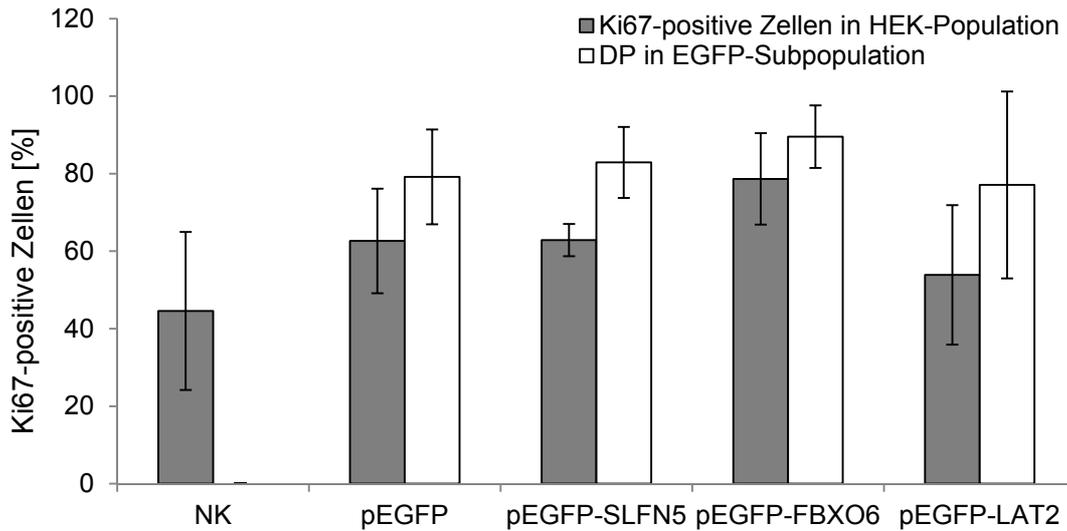


Abb. 4.22 Proliferationsrate der HEK293T-Population: grau – prozentualer Anteil der proliferierenden, Ki67-positiven Zellen zu der gesamten HEK293T-Population, weiß – prozentualer Anteil der Ki67-EGFP-doppelt positiven Zellen zu der EGFP-Subpopulation, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung für jede Gruppe.

4.6.4 Lokalisierung mittels konfokaler Mikroskopie

In diesem Abschnitt wird die Lokalisierung der überexprimierten Fusionsproteine in HEK293T-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt. Dazu wurden die transfizierten Zellen am Tag nach der Transfektion auf einen μ -Slide 8 Well ibiTreat Objektträger überführt und über Nacht adhärirt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf dem Objektträger ohne Fixierung und Färbung am konfokalen Mikroskop auf die Lokalisierung der pEGFP-Fusionsproteine hin untersucht. Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen für jeden Transfektionsansatz.

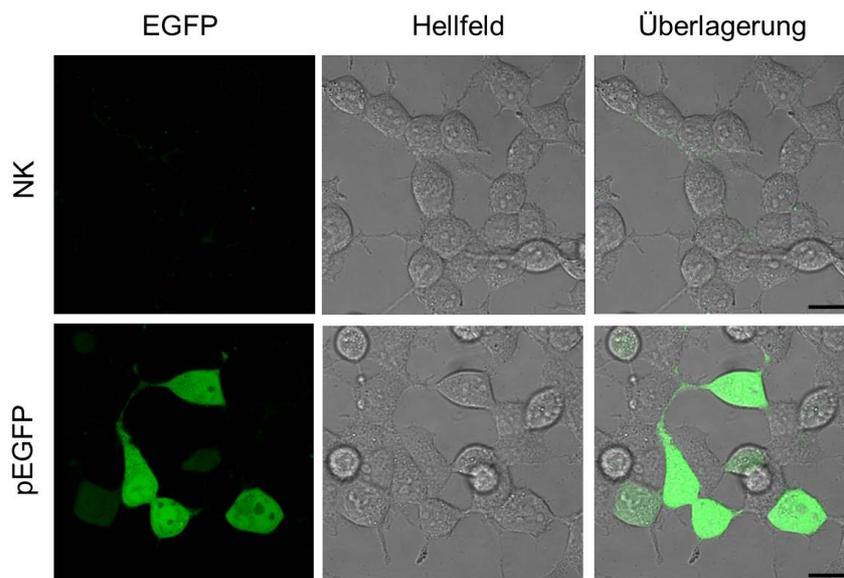


Abb. 4.23 Konfokalmikroskopische Aufnahme der Negativkontrolle und des Leervektors pEGFP: links – EGFP-Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm, Mitte – Bild vom Hellfeld, rechts – Überlagerungsaufnahme von Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm und Hellfeld, Balken - 10 μ m.

4 Ergebnisse

Die Verteilung des überexprimierten EGFP alleine gibt ein intensives Signal, das überwiegend homogen über die Zelle verteilt ist. Wie erwartet zeigt die Negativkontrolle ein sehr schwaches Hintergrundsignal (Abbildung 4.23).

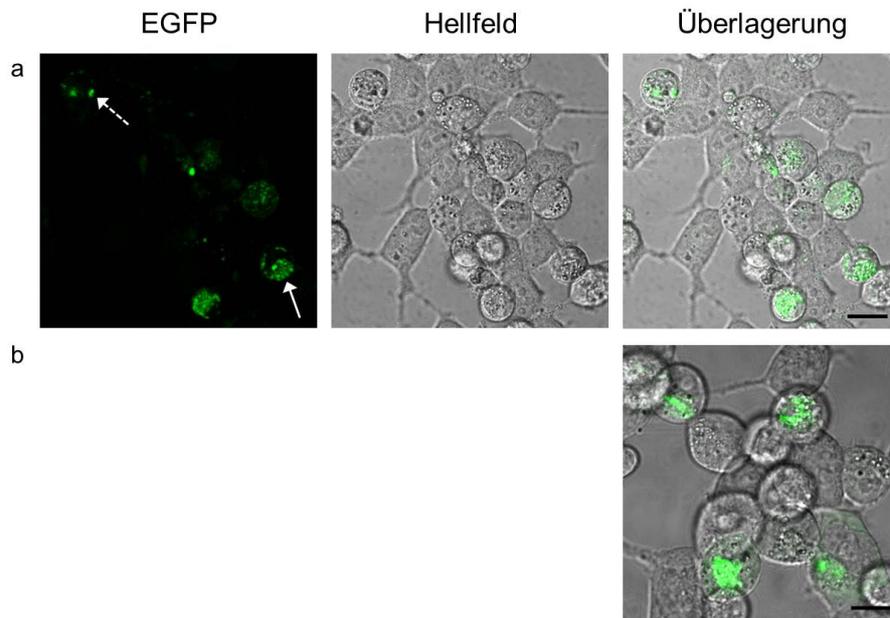


Abb. 4.24 Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Lokalisierung des Fusionsproteins von pEGFP-FBXO6: a) links – EGFP-Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm, Mitte – Bild vom Hellfeld, rechts – Überlagerungsaufnahme von Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm und Hellfeld, Pfeil - nukleäre Lokalisation, gestrichelter Pfeil - FBXO6-Cluster, b) Überlagerungsaufnahme von Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm und Hellfeld, Balken - 10 µm.

FBXO6-überexprimierende Zellen in Abbildung 4.24 zeigten eine verminderte Adhärenz, was in verstärkter Abrundung zu sehen war. Das Fusionsprotein wies ein mit einer vorwiegenden Kernlokalisierung vereinbares Signal auf (Pfeil in Abbildung 4.24 a), was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Zhang et al, 2009a). Cluster außerhalb des Zellkerns (gestrichelter Pfeil in Abbildung 4.24 a) können dadurch erklärt werden, dass FBXO6 auch an der Endoplasmatischen Retikulum (ER)-assoziierten Glykoproteinendegradation (GERAD) beteiligt ist und Glykoproteine mit hohem Mannoseglykoproteingehalt sowie sulfatierte Glykoproteine reguliert (Glenn et al, 2008).

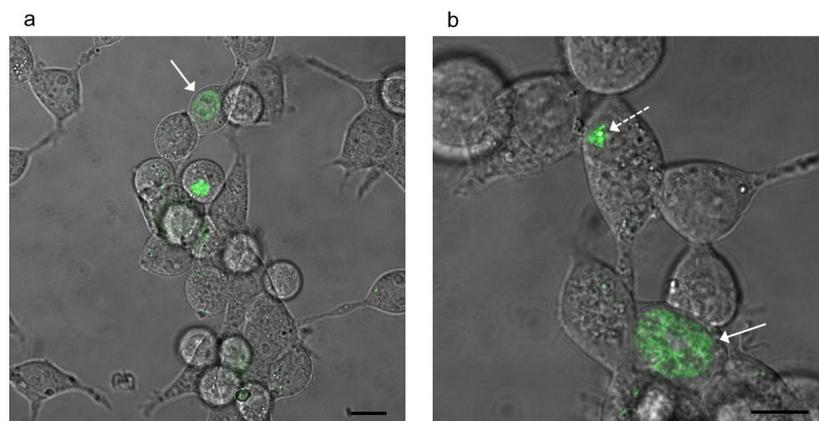


Abb. 4.25 Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Lokalisierung des Fusionsproteins von pEGFP-SLFN5: zwei Überlagerungsaufnahmen von Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm und Hellfeld, Pfeile - nukleäre Lokalisation, gestrichelter Pfeil - SLFN5-Cluster, Balken - 10 µm.

4 Ergebnisse

Im Vergleich zu FBXO6 zeigten EGFP-SLFN5 exprimierende Zellen in Abbildung 4.25 neben der runden (a) auch die normale, gestreckte Morphologie (b). In Bezug auf die Lokalisierung kann man erkennen, dass das SLFN5 sowohl im Zellkern (Pfeile in Abbildung 4.25) als auch geclustert vorkommt (gestrichelter Pfeil in Abbildung 4.25). Die nukleäre Lokalisierung wurde bereits bei Katsoulidis et al, 2010, und Mavrommatis et al, 2013, beschrieben.

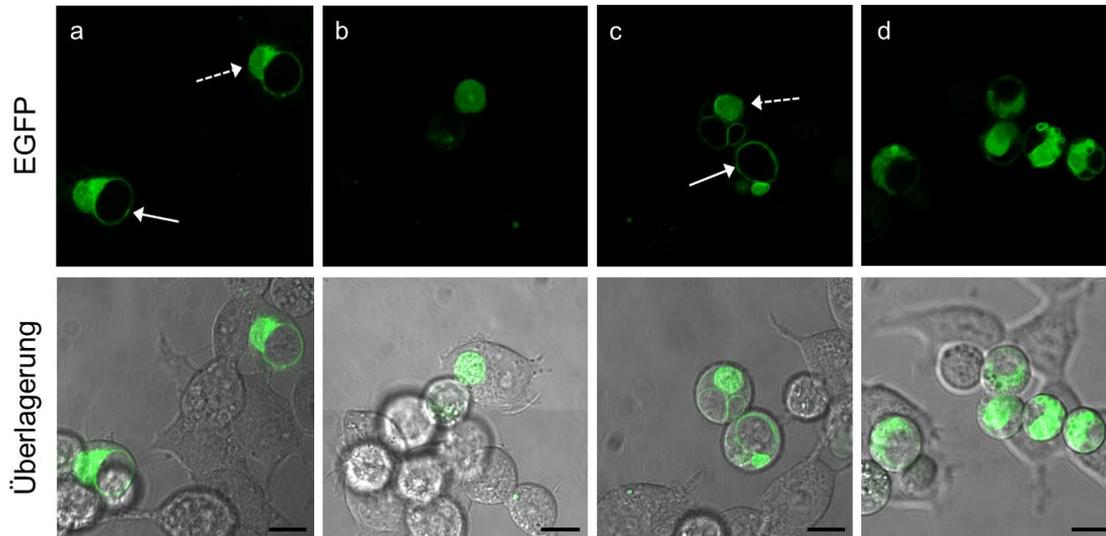


Abb. 4.26 Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisierung des Fusionsproteins von pEGFP-LAT2: jeweils oben - EGFP-Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm, unten - Überlagerungsaufnahmen von Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm und Hellfeld, Pfeile - perinukleäre Lokalisation, gestrichelte Pfeile - potentielle Einschlusskörperchen, Balken - 10 μ m.

Auch LAT2-überexprimierende Zellen in Abbildung 4.26 zeigten größtenteils eine verminderte Adhärenz in Form einer verstärkten Abrundung wie bei FBXO6-Überexpression. In Bezug auf die Lokalisierung wurde EGFP-LAT2 vorwiegend perinukleär detektiert (durchgehende Pfeile in Abbildung 4.26 a, c), zudem scheinen Einschlusskörperchen vorhanden zu sein (gestrichelte Pfeile in Abbildung 4.26 a, c).

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Transgene in HEK293T-Zellen in ihrem erwarteten Verteilungsmuster exprimiert werden, aber bei Überexpression die getesteten Funktionen nicht beeinträchtigen.

4.7 Knockdown des differentiell regulierten Gens SLFN5 in primären T-Zellen

Da die Transfektion der Transgene in primären T-Zellen sehr ineffizient war, wurde im Folgenden versucht, einen möglichen Einfluss der Genprodukte SLFN5 (RG) und FBXO6 (AS) auf die T-Zellen durch die Ausschaltung der jeweiligen endogenen Genprodukte mittels siRNA zu untersuchen. Der Knockdown von FBXO6 gelang nur einmal (Daten nicht gezeigt), weshalb sich in dieser Arbeit auf das differentiell regulierte SLFN5 beschränkt wurde.

4.7.1 Überprüfung des Knockdowns

Da die siRNA nicht markiert war und SLFN5-spezifische Antikörper nicht zur Verfügung standen, wurde der Knockdown vier bis fünf Tage nach der primären Transfektion mittels RT-PCR überprüft. Dazu wurde RNA aus den transfizierten Zellen isoliert, cDNA hergestellt und schließlich die PCR mit SLFN5-spezifischen Primern und einer Verdünnungsreihe der cDNA durchgeführt. Die Auftrennung über ein Agarosegel ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

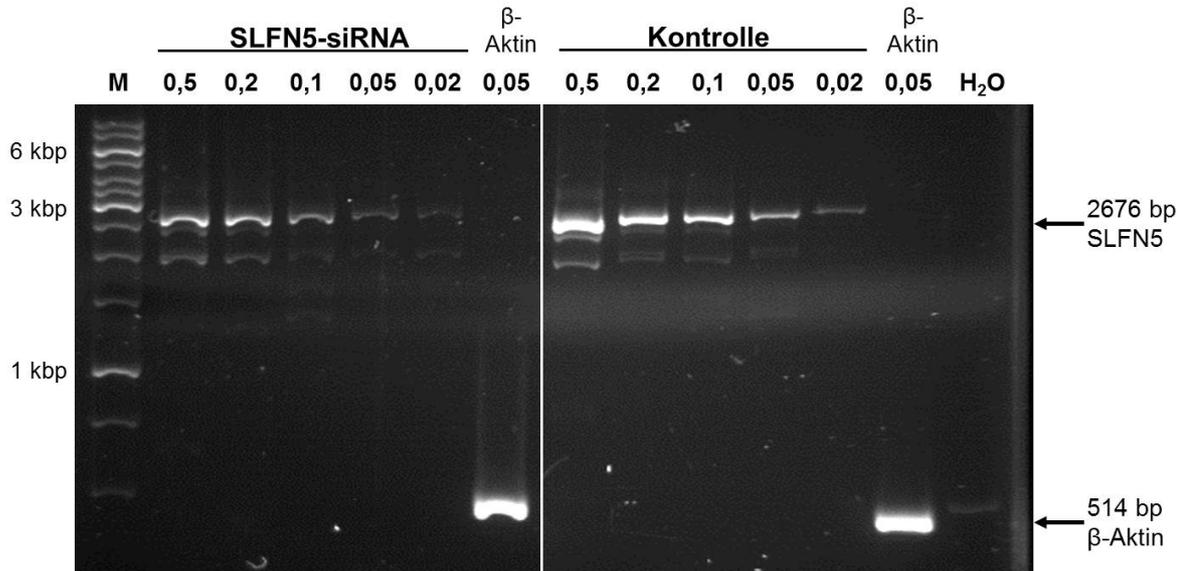


Abb. 4.27 Knockdown von SLFN5 in SLFN5-siRNA-transfizierten, primären T-Zellen: für die PCR wurden die Primer für die SLFN5-CDS-Sequenz (SLFN5 2676 bp FW und REV) verwendet; SLFN5-siRNA (an Position 1570 ntc der Gensequenz) und Kontrolle mit entsprechenden cDNA-Verdünnungen (0,5 μ l – 0,2 μ l – 0,1 μ l – 0,05 μ l – 0,02 μ l), für die β -Aktin-Kontrolle wurde immer die cDNA-Verdünnung von 0,05 μ l gewählt; M – 1 kbp Marker, H₂O – Negativkontrolle ohne Template.

Die Abbildung 4.27 bestätigt den Knockdown von SLFN5. Die Banden der SLFN5-siRNA-transfizierten cDNA-Verdünnungen zeigen im Vergleich zu den entsprechenden Banden der Kontrolle eine deutliche Intensitätsverringerng, wohingegen die Banden der β -Aktin-Kontrolle gleiche Intensitätsniveaus aufweisen. Nachdem der Knockdown erfolgreich bestätigt war, konnten weitere Tests mit den SLFN5-siRNA-transfizierten, primären T-Zellen durchgeführt werden.

4.7.2 Effekt des Knockdowns auf Zellviabilität und Apoptose

Zur Analyse der Zellapoptose und Zellviabilität wurden die siRNA-transfizierten, primären T-Zellen mittels AnnexinV-PE und 7AAD gefärbt. Da die transfizierten Zellen kein Fluoreszenzsignal emittierten, war es möglich beide Färbungen gleichzeitig durchzuführen. Wie in Abbildung 4.28 dargestellt, war die Ablation von SLFN5 nicht von einer prozentualen Erhöhung der Population toter oder apoptotischer Zellen begleitet.

4 Ergebnisse

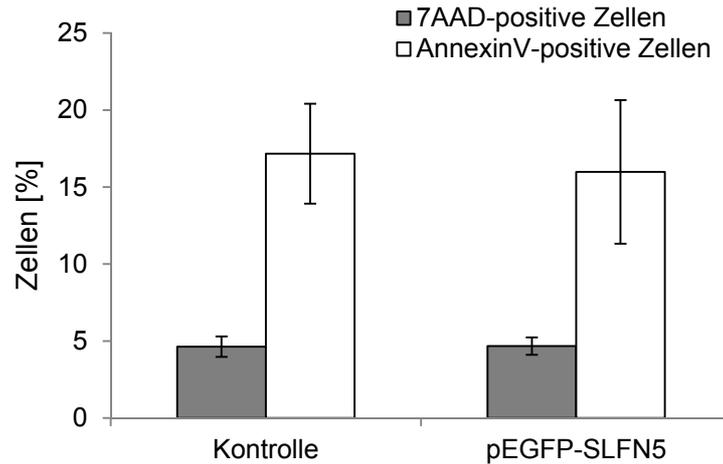


Abb. 4.28 Anteil der toten und apoptotischen Zellen an der T-Zell-Population: grau – prozentualer Anteil der toten, 7AAD-positiven Zellen zu der gesamten T-Zell-Population, weiß – prozentualer Anteil der apoptotischen, AnnexinV-positiven Zellen zu der gesamten T-Zell-Population, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung.

4.7.3 Effekt des Knockdowns auf die T-Zell-Proliferation

Da der Knockdown von SLFN5 keinen Effekt auf die Zellviabilität zu haben scheint, wurde im Folgenden die Zellproliferation betrachtet. Um diese zu analysieren, wurde fünf Tage nach der primären Transfektion eine allogene *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR) durchgeführt. Erkennung der präsentierten MHC-Peptid-Komplexe aktiviert T-Zellen zur Proliferation, die durch das hinzugefügte, radioaktiv markierte Thymidin bestimmt wurde.

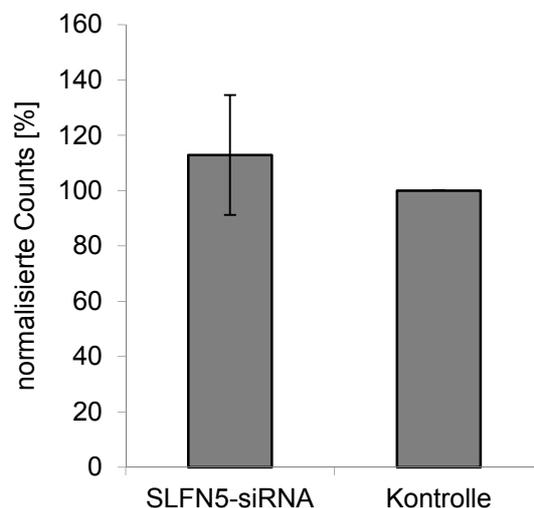


Abb. 4.29 Proliferationsfähigkeit der siRNA-transfizierten T-Zell-Population: dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Konjugate normalisiert gegen die entsprechenden Kontrollen in Prozent aus drei unabhängigen MLR-Experimenten mit der Standardabweichung (Triplet-Messung).

Der Abbildung 4.29 kann entnommen werden, dass nach dem Knockdown von SLFN5 die Zellen ihre Fähigkeit zu proliferieren nicht verlieren. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt der Knockdown mit 500 pmol SLFN5-siRNA keinen signifikanten Unterschied.

4.7.4 Effekt des Knockdowns auf stimulierte morphologische T-Zell-Veränderungen

4.7.4.1 Polarisation auf Fibronektin

Für die Analyse eines möglichen Einflusses des SLFN5-Knockdowns auf die T-Zell-Polarisation, wurden die transfizierten Zellen auf Fibronektin-beschichtete Ibidi-Slides aufgebracht, fixiert, permeabilisiert und das F-Aktin mit Phalloidin-Alexa 594 angefärbt. Als Bestandteil der extrazellulären Matrix induziert Fibronektin die T-Zell-Polarisation durch die Interaktion mit β -Integrinen auf der Oberfläche der T-Zelle. Abbildung 4.30 zeigt Übersichtsaufnahmen und Ausschnitte von polarisierten T-Zellen.

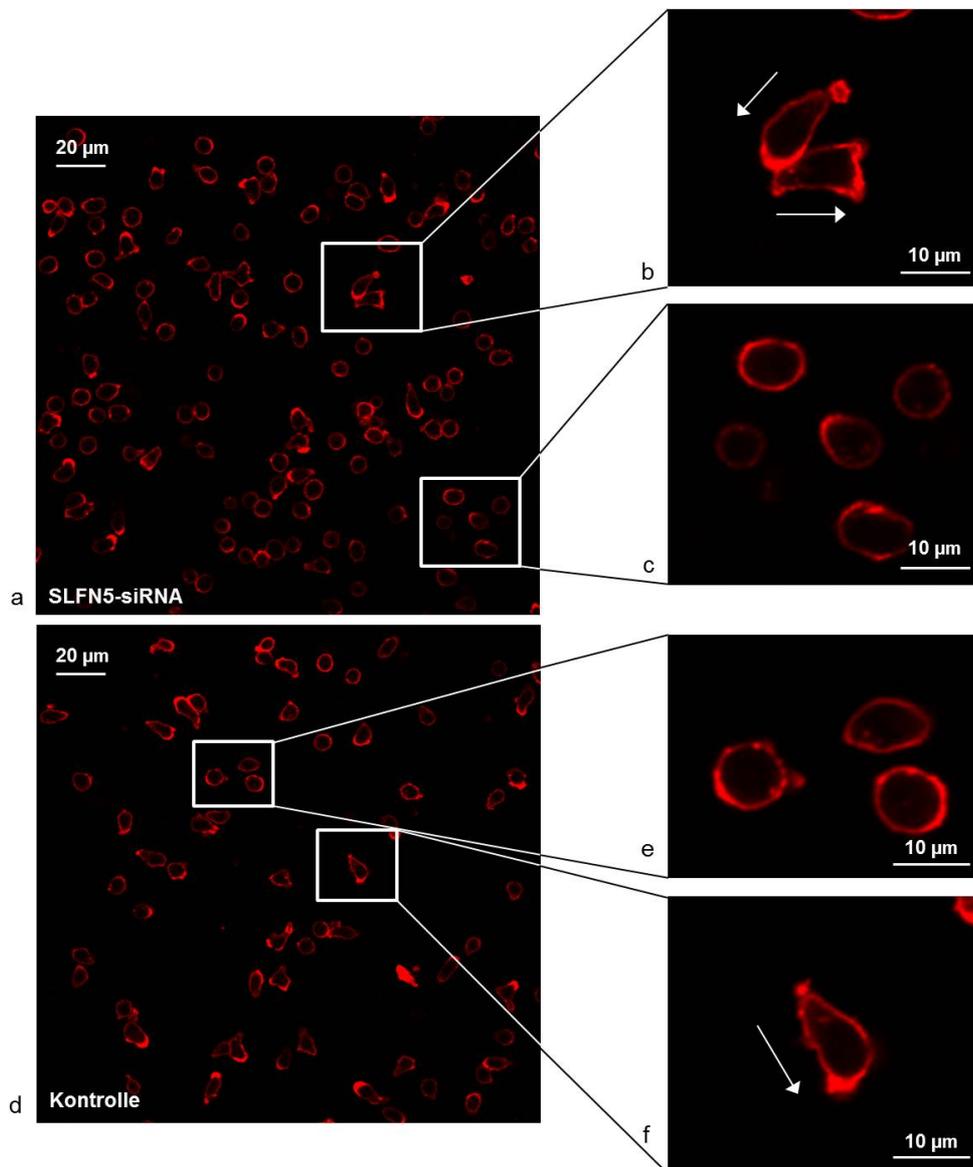


Abb. 4.30 Konfokalmikroskopische Aufnahme primärer T-Zellen auf Fibronektin: SLFN5-siRNA-transfizierte Zellen – Übersichtsaufnahme (a) mit einem Ausschnitt von polarisierten (b) und nicht polarisierten (c) T-Zellen, Kontrollzellen – Übersichtsaufnahme (d) mit einem Ausschnitt von nicht polarisierten (e) T-Zellen und einer polarisierten (f) T-Zelle, Pfeile geben die Polarisationsrichtung an.

4 Ergebnisse

Abbildungen 4.30 b und f zeigen die typische Form polarisierter T-Zellen, die auch als „Handspiegel“ bezeichnet wird, wobei die Pfeile die Bewegungsrichtung angeben. Diese Morphologie besteht aus den drei typischen Strukturen: dem Lamellipodium, dem Hauptkörper und dem Uropodium. Das Lamellipodium stellt die führende Front dar und hat einen hohen F-Aktin-Gehalt, der Hauptkörper enthält den Zellkern und der Uropod schiebt die motile Zelle voran.

Um eine quantitative Aussage über die jeweils polarisierten T-Zellen machen zu können, wurden drei bis fünf gleich große Mikroskopfelder ausgezählt und so die Anzahl der polarisierten T-Zellen und die Gesamtzahl der T-Zellen ermittelt, die als Maß der Adhäsion gewertet wurde. Die quantitative Auswertung der polarisierten T-Zellen kann der Abbildung 4.31 entnommen werden.

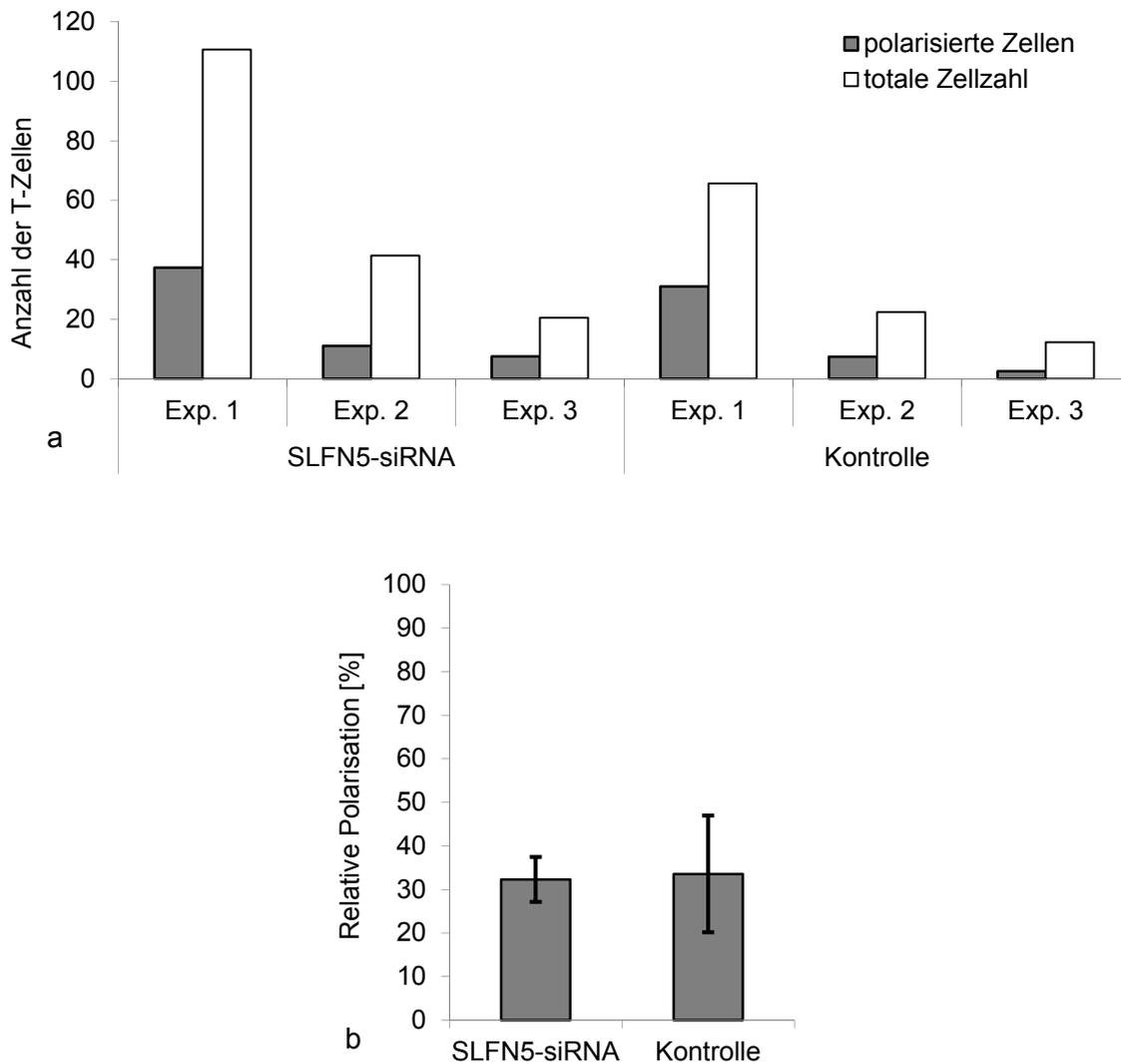


Abb. 4.31 Absolute und relative Quantifizierung der Polarisation von T-Zellen nach Transfektion von SLFN5-siRNA: a – Absolute Quantifizierung der polarisierten (grau) und totalen (weiß) T-Zellzahl, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 - 5 gleich großen Mikroskopfelder in drei unabhängigen Experimenten (Exp. 1 - 3) für jede Gruppe, b – Relative Quantifizierung der Polarisation in Prozent aus den polarisierten T-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der T-Zellen pro Ansatz, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung für jede Gruppe.

4 Ergebnisse

Abbildung 4.31 a zeigt die Quantifizierung der einzelnen Polarisationsexperimente. Um das Verhältnis der polarisierten T-Zellen zur Gesamtzahl der T-Zellen pro Experiment bewerten zu können, wurde in Abbildung 4.31 b die relative Anzahl der polarisierten zu den totalen T-Zellen ermittelt und der Mittelwert aus allen drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung errechnet. Diese Darstellung ermöglicht es zu erkennen, dass die relative Polarisation bei beiden untersuchten Gruppen vergleichbar ist.

SLFN5-siRNA-transfizierte Kulturen zeigten, wie in Abbildung 4.32 erkennbar, eine signifikant erhöhte Adhäsion ($p=0,006$).

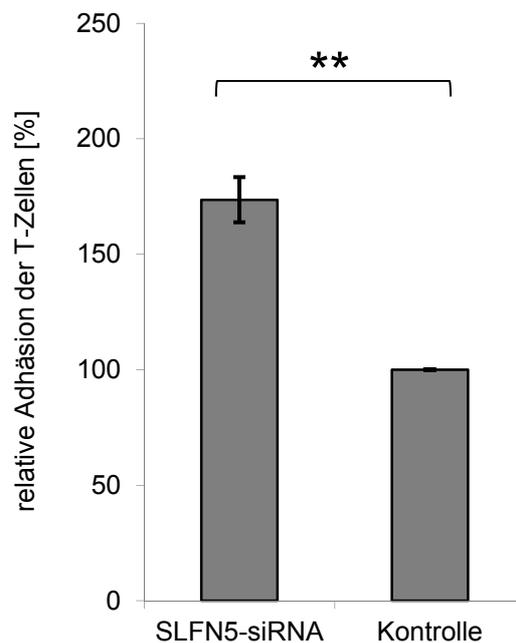


Abb. 4.32 Relative Adhäsion der SLFN5-siRNA-transfizierten T-Zellen: Gesamtzahl der adhären Zellen in Prozent normalisiert auf die Gesamtzahl der Kontrolle (100%), dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$) mit der Standardabweichung; Studentischer t-Test: zweiseitig, heteroskedastisch; p-Value $< 0,01$ (Daten im Anhang Tabelle A4).

Daraus lässt sich schließen, dass der Knockdown von SLFN5 zwar keinen Effekt auf die Polarisation auf Fibronectin hat, sehr wohl aber auf die Fähigkeit der T-Zellen zu adhären.

4.7.4.2 Costimulatorisches Slide

CD3- und CD28-Antikörper vermitteln der T-Zelle ein stimulatorisches Signal, das zur Ausprägung einer Immunsynapsen-ähnlichen Morphologie führt, die durch ein Ausbreiten der Zellen (*spreading response*) erkennbar ist.

Dazu wurden die siRNA-transfizierten Kulturen mit den CD3/ CD28-Antikörpern inkubiert und danach auf den beschichteten Objektträger gegeben. Nach dem angegebenen Zeitpunkt der Costimulation wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das F-Aktin mit Phalloidin-Alexa 594 angefärbt.

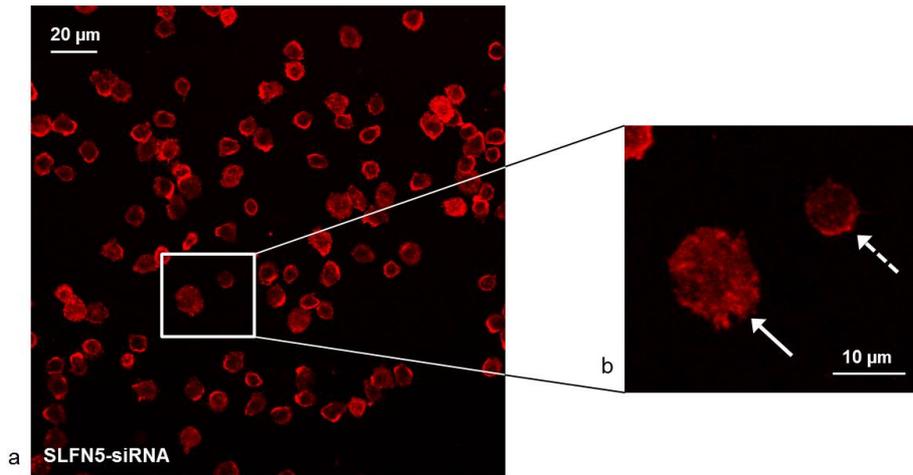


Abb. 4.33 Konfokalmikroskopische Aufnahme von T-Zellen nach Stimulation mit CD3/ CD28: SLFN5-siRNA-transfizierte Zellen – Übersichtsaufnahme (a) mit einem Ausschnitt einer polarisierten T-Zelle (b, Pfeil) und einer nicht polarisierten T-Zelle (b, gestrichelter Pfeil).

Abbildung 4.33 zeigt exemplarisch für SLFN5-siRNA-transfizierte Kulturen, dass stimulierte T-Zellen die für die CD3/ CD28-Stimulation typische Form mit einer sehr flachen und ausgebreiteten, runden Morphologie entwickelten, die einem „Spiegelei“ stark ähnelt. Diese Strukturen entstehen durch die Aktivierung des Zytoskeletts im Moment der Kontaktaufnahme der Zellen mit der beschichteten Platte, wobei radiale aktinreiche Bereiche gebildet werden (Pfeil in der Abbildung 4.33 b). Das Maximum dieser Ausdehnung wurde zum Zeitpunkt der Fixierung (20 min nach dem Transfer auf die IgG-beschichtete Platte) erreicht.

Zur Quantifizierung wurden jeweils die Prozentsätze sichtbar stimulierter T-Zellen im Vergleich zur Gesamt-T-Zellzahl in je drei gleich großen Mikroskopfeldern ausgezählt und so die Anzahl der polarisierten T-Zellen und die Gesamtzahl der T-Zellen ermittelt. Es konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Kulturen detektiert werden (Abbildung 4.34).

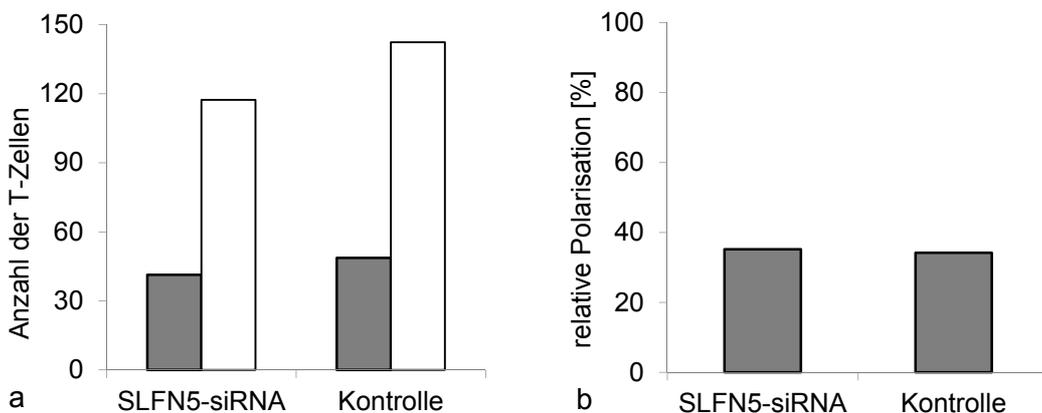


Abb. 4.34 Absolute und relative Quantifizierung der Polarisation von T-Zellen durch CD3/ CD28-Stimulation nach der Transfektion von SLFN5-siRNA: a – Absolute Quantifizierung der polarisierten (grau) und totalen (weiß) T-Zellzahl pro ausgezähltem Ausschnitt, dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei gleich großen Mikroskopfelder eines Experimenten für jede Gruppe, b – Relative Quantifizierung der Polarisation in Prozent aus den polarisierten T-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der T-Zellen pro Ansatz.

4.8 Expression ausgewählter Gene im Virus-inhibierten System

Nachdem der Exon Array eine geeignete Methode für die Ermittlung alternativen Spleißens infolge von PI3K-Inhibition darstellt, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die identifizierten Isoformen auch bei der T-Zell-Inhibition durch das Wildtyp-Masernvirus WTF zu finden sind.

4.8.1 Effekte auf die Regulation ausgewählter Gene nach Virus-Inhibition

Zur Inhibition von T-Zellen wurde gereinigtes WTF UV-inaktiviert und zusammen mit FIP ins Medium gegeben, um die Aufnahme viraler Partikel zu verhindern. Nach der Inhibition primärer T-Zellen für 24 h und weiteren 24 h der Stimulation mit PMA/ Ionomycin wurde RNA aus den Proben isoliert und mit sequenzspezifischen Primern (Tabellen 2.2 und 2.3) PCRs durchgeführt. Es wurden dieselben Primer verwendet, die auch für die Validierung des Exon Arrays benutzt wurden und in zwei verschiedenen Bereichen des jeweiligen Gens binden.

4.8.1.1 Alternativ gespleißte Gene

Wie für die Validierung wurden basierend auf der Verteilung der Signalintensitäten der gepaarten Proben (S und I) zwei alternativ gespleißte und funktionell interessante Gene für die Überprüfung der Expression im Virus-inhibierten System ausgewählt. In der folgenden Tabelle 4.5 sind die Regulationen zu sehen, die laut Exon Array im PI3K-inhibierten System erwartet, und die, die tatsächlich bei der MV-Inhibition detektiert wurden.

Tab. 4.5 Regulation zweier alternativ gespleißter Gene im Virus-inhibierten System: AS – alternativ gespleißter Bereich, C – konstanter Bereich, ↓ – herunterreguliert, ↑ – hochreguliert, = – gleich reguliert, detektierte Regulation aus vier unabhängigen Experimenten.

Gensymbol	Bereich der Primerbindung	Regulation	
		erwartet	detektiert
FBXO6	AS – 202 bp	↓	4/4 ↑
	C – 217 bp	=	3/4 ↑, 1/4 =
WRAP53	AS – 174 bp	↓	3/4 ↓, 1/4 =
	C – 184 bp	=	2/4 ↓, 2/4 =

Zur Veranschaulichung der Expression im Virus-inhibierten System sind diese Gene in der folgenden Abbildung 4.35 dargestellt.

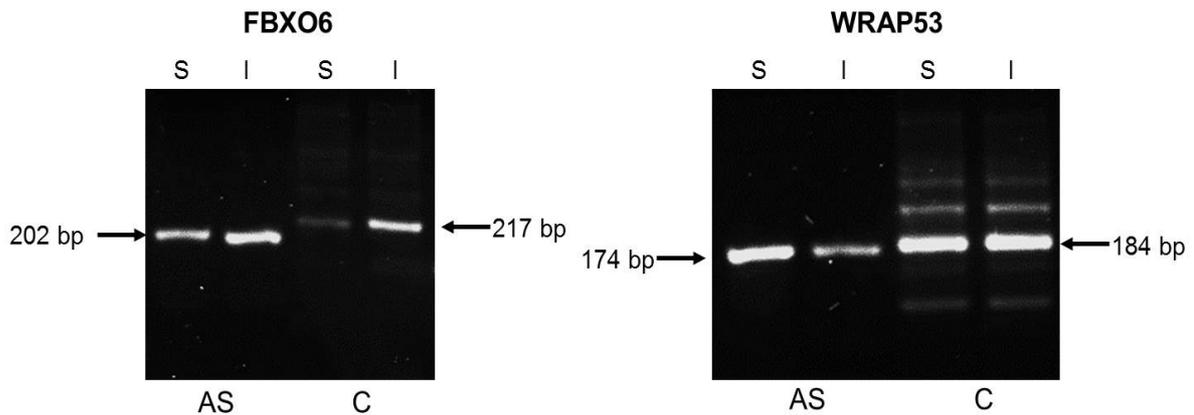


Abb. 4.35 Regulation der Expression alternativ gespleißter Gene im Virus-inhibierten System: Zwei Gene mit erwarteter Länge des DNA-Fragments, S – stimuliert, I – inhibiert/ stimuliert, AS – alternativ gespleißter Bereich, C – konstanter Bereich.

Erwartet wurde, dass FBXO6 wie bei der PI3K-Inhibition im alternativ gespleißten Bereich (Exon 4 auf Exon 5) herunterreguliert wird und im konstanten Bereich (Exon 1 auf Exon 2) eine vergleichbare Expression in beiden Proben zeigt. Jedoch sieht man in der Abbildung 4.35, dass im Virus-inhibierten System in beiden Bereichen eine Hochregulierung stattfindet. Im Gegensatz dazu kann man bei WRAP53 durch die Virus-Inhibition im alternativ gespleißten Bereich (Exon 4 auf Exon 5) und im konstanten Bereich (Exon 9 auf Exon 10) genau die Banden sehen, die eigentlich bei PI3K-Inhibition laut Exon Array erwartet wurden. Jedoch wurde bei der Hälfte der Versuche auch eine Herunterregulierung im konstanten Bereich beobachtet.

Im Virus-inhibierten System waren die Banden im konstanten Bereich eindeutig zu bestimmen, auch wenn mehrere Banden zu sehen waren, was bei der Validierung mit PI3K-Inhibition schwer zu beurteilen war. Damit kann die Virus-induzierte Inhibition nicht eindeutig das angenommene, durch PI3K-Inhibition induzierte alternative Spleißmuster bestätigen.

4.8.1.2 Differentiell regulierte Gene

Basierend auf der Verteilung der Signalintensitäten der gepaarten Proben (S und I) wurden zusätzlich zwei differentiell regulierte und funktionell interessante Gene für die Überprüfung der Expression im Virus-inhibierten System ausgewählt. In der folgenden Tabelle 4.6 sind die Regulationen zu sehen, die laut Exon Array im PI3K-inhibierten System erwartet und die, die tatsächlich bei der Inhibition mit dem MV detektiert wurden.

4 Ergebnisse

Tab. 4.6 Regulation zweier differentiell regulierter Gene im Virus-inhibierten System: ↓ – herunterreguliert, ↑ – hochreguliert, = – gleich reguliert, detektierte Regulation aus vier unabhängigen Experimenten.

Gensymbol	Bereich der Primerbindung	Regulation	
		erwartet	detektiert
SLFN5	Exon 4/5 – 227 bp	↑	4/4 ↑
	Exon 2/3 – 172 bp	↑	4/4 =
HELLS	Exon 10/11 – 246 bp	↓	3/4 ↑, 1/4 ↓
	Exon 20/21 – 169 bp	↓	2/4 =, 1/4 ↑, 1/4 ↓

Zur Veranschaulichung der Expression im Virus-inhibierten System sind diese Gene in der folgenden Abbildung 4.36 dargestellt.

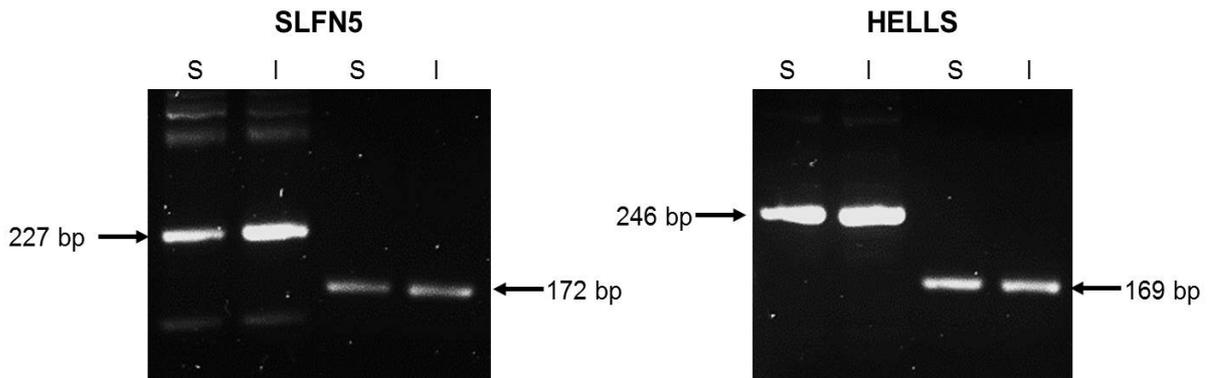


Abb. 4.36 Regulation der Expression differentiell regulierter Gene im Virus-inhibierten System: Zwei Gene mit erwarteter Länge des DNA-Fragments, S – stimuliert, I – inhibiert/ stimuliert.

Erwartet wurde, dass SLFN5 wie bei PI3K-Inhibition in beiden Bereichen hochreguliert wird, jedoch war in der Abbildung 4.36 im Virus-inhibierten System nur der Bereich von Exon 4 auf Exon 5 (227 bp) hochreguliert und der andere Bereich von Exon 2 auf Exon 3 (172 bp) von der Inhibition nicht beeinflusst, was eher auf ein alternativ gespleißtes Gen schließen ließ. Auch bei HELLS lässt sich dieses Verhalten im Bereich von Exon 20 auf Exon 21 (169 bp) beobachten. Hingegen zeigt HELLS entgegen der erwarteten Herunterregulation meistens eine Hochregulierung im Bereich von Exon 10 auf Exon 11 (246 bp).

Im Virus-inhibierten System waren die Banden bei den differentiell regulierten Genen deutlich schwieriger zu bewerten und inhomogener in Bezug auf die Regulation, was bei der Validierung mit direkter PI3K-Inhibition nicht der Fall war. Damit kann auch hier die Virus-induzierte Inhibition nicht eindeutig die angenommene, durch PI3K-Inhibition induzierte, differentielle Regulation auf der gesamten Transkriptebene bestätigen.

4.9 Expression ausgewählter Gene in verschiedenen Zelllinien

PI3K-Effektoren sind prinzipiell pro-mitotisch und daher in transformierten Zellen oft hochreguliert. Es sollte nun geprüft werden, ob dies auch auf ausgewählte Gene zutrifft, die sich im Exon Array als sensitiv gegenüber PI3K-Hemmung erwiesen. Das Primerdesign bediente sich des Prinzips der Validierungsprimer und für die PCR wurde das für die Validierung des Exon Arrays verwendete PCR-Programm benutzt. Pro Gen wurden also zwei verschiedene Bereiche betrachtet, bei den alternativ gespleißten Genen der alternativ gespleißte und der konstante Bereich, bei den differentiell regulierten zwei verschiedene Exon-übergreifende Bereiche. Die cDNA wurde hierfür aus jeder einzelnen Zelllinie gewonnen, wobei eine Hälfte PI3K-inhibiert und PMA/ Ionomycin-stimuliert und die andere Hälfte nur stimuliert wurde. Dadurch war es möglich eine Regulation zwischen den gepaarten cDNAs zu ermitteln.

Tab. 4.7 Regulation alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene in verschiedenen T-Zelllinien: Regulation von inhibiert/ stimulierten Proben im Vergleich zu stimulierten Proben, weiß – gleich reguliert, grau – anders reguliert als in analog behandelten, primären T-Zellen erwartet, schwarz – nicht reguliert, ↓ – herunterreguliert, ↑ – hochreguliert, = – gleiche Expression, AS – alternativ gespleißter Bereich, C – konstanter Bereich, detektierte Regulation aus einem Experiment.

Gen	erwartete Regulation	A301	HuT-78	H9	Jurkat	TAXI	MOLT-4
Alternativ gespleißt (im konstanten Bereich gleiche Expressionslevel)							
FBXO6	AS- ↓, C- =	■	■	■	■	■	■
WRAP53	AS- ↓, C- =	□	□	□	■	■	■
CHN1	AS- ↓, C- =	□	■	□	■	■	■
BRSK1	AS- ↓, C- =	■	■	■	■	■	■
HDAC9	AS- ↓, C- =	■	■	■	■	■	■
Differentiell reguliert (auf gesamter Transkriptebene)							
HELLS	↓	□	■	■	■	■	■
DNMBP	↑	■	□	■	□	■	□
ARHGEF6	↓	□	■	□	□	□	□
SESN3	↑	■	■	□	■	■	■
SLFN5	↑	■	■	□	■	□	■

Der Tabelle 4.7 kann entnommen werden, dass die Regulation der alternativ gespleißten Gene zu ca. 37 % von der in primären T-Zellen beobachteten Regulation abweicht und ca. 40 % der Gene überhaupt nicht reguliert werden. Besonders in den Zelllinien Jurkat und TAXI scheinen alternativ gespleißte Gene nicht reguliert zu sein. WRAP53 ist – bis auf die zwei gerade erwähnten Zelllinien – wie in primären T-Zellen reguliert. Die BR Serin/Threonin Kinase 1 (BRSK1) und die Histondeacety-

4 Ergebnisse

lase 9 (HDAC9) sind in allen untersuchten Zelllinien anders reguliert, als entsprechend dem Exon Array in primären T-Zellen gemessen und erwartet wurde. Über CHN1 lässt sich kein Trend in der Regulation in den untersuchten Zelllinien ermitteln.

Auch die Regulation der differentiell regulierten Gene weicht von der in primären T-Zellen beobachteten Regulation ab, wenn auch nicht so stark wie die alternativ gespleißten Gene (30 % anders als erwartet reguliert, ca. 27 % überhaupt nicht reguliert). Besonders ARHGEF6, ein bekannter Regulator des Aktinzytoskeletts, ist weitestgehend wie in primären T-Zellen reguliert. Für die anderen untersuchten Gene konnte in dieser Arbeit kein spezieller Trend durch die sechs untersuchten Zelllinien gesehen werden, die eine eindeutige Aussage zuließen.

Die Zelllinie HuT-78 scheint in Bezug auf alternativ gespleißte, aber auch differentiell regulierte Gene eine verstärkte, entgegengesetzte Regulation zu haben.

Aufgrund der beobachteten Varianz in der Regulation im Vergleich zu primären T-Zellen, wurde davon abgesehen eine der T-Zelllinien für Überexpressionsanalysen zu verwenden.

5 Diskussion

5.1 Identifikation von Spleißvarianten in T-Zellen mittels Exon Array

Die Regulation der Transkription in T-Zellen auf der Ebene des gesamten Genoms gewinnt zunehmend an Bedeutung. Dafür ist der Exon Array eine sehr effektive Methode im Hochdurchsatzverfahren, um für die T-Zell-Aktivierung essentielle, alternativ gespleißte Isoformen zu identifizieren (Whistler et al, 2010a; Martinez et al, 2012; Grigoryev et al, 2009; Modrek et al, 2001). Diese Arbeit konzentrierte sich auf die durch PI3K-Inhibition induzierte Regulation von Genen und deren alternativ gespleißten Isoformen sowie deren Auswirkungen auf die T-Zell-Suppression.

Für den Versuch wurden die primären T-Zellen stimuliert, dies konnte durch PMA-, Ionomycin-, kombinierte oder Antigenzugabe geschehen. Martinez et al (2012) haben gezeigt, dass in der T-Zelllinie JSL1 bei 40 % der PMA-induzierbaren Gene der für die Spleißmodulation verantwortliche Signalweg mit einer Kaskade überlappt, die von Ionomycin ausgelöst wird. PMA alleine ist in der Lage in JSL1-Zellen Transkriptionsereignisse zu induzieren, wie sie auch beim TCR-Signalweg vorkommen. Jedoch sind nicht alle alternativen Spleißereignisse in JSL1-Zellen, die ausschließlich durch PMA ausgelöst werden, auch in primären, TCR-stimulierten T-Zellen zu beobachten (und umgekehrt), was darauf schließen lässt, dass die PMA-/ Ionomycin-Stimulation nicht komplett mit der Antigenstimulation übereinstimmt. Da es sich bei der kombinierten Zugabe von PMA und Ionomycin jedoch um ein einfaches und gut reproduzierbares Stimulationsmodell handelt, wurde es in dieser Arbeit eingesetzt.

Um Veränderungen der frühen Transkription aufgrund der Inhibition der PI3K beurteilen zu können, wurde das MV mit dem kommerziellen PI3K-spezifischen Inhibitor LY294002 imitiert, welcher auf die ATP-Bindungsstelle der PI3K wirkt (Vlahos et al, 1994). Dadurch wurden Variationen in der Viruspräparation, wie Reinheit und Konzentration, aber auch potentielle Unterschiede im Expressionslevel und in der Membrandichte des unbekanntem Rezeptors vermieden, den das MV für die Inhibition der PI3K verwendet.

Die mittels Exon Array erhobene Datenmenge bedingt komplexe bioinformatische und statistische Methoden für die Auswertung, sodass neben der Durchführung durch Margarete Göbel (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) und der Validierung des Exon Arrays besonderen Wert auf die Verbesserung und Stringenz des Algorithmus zur Detektion alternativ gespleißter Gene gelegt wurde. Dadurch wurde die Zahl der falsch-positiven Gene reduziert sowie Selektivität und Empfindlichkeit gesteigert (Ha et al, 2009). Jedoch konnte im Vergleich zum 3' IVT Array eine ca. 2,2-fach höhere Variation ermittelt werden (Robinson, Speed, 2007). Die Analyse mit dem Exon Array liefert nur eine Momentaufnahme des Zellzustands mit allen Einflussfaktoren. Bei jedem Array sind der systematische Fehler durch die experimentelle Durchführung (RNA-Extraktion, reverse Transkription, Labeling und Scannen) und der stochastische Fehler durch den Array an sich (aufgespottete cDNA, Oligonukleotid-Qualität und unspezifische Hybridisierung) zu berücksichtigen. Ersteres hat einen Einfluss auf alle Spots eines Arrays und kann korrigiert werden, letzteres hingegen hat einen zufälligen Einfluss auf wenige Spots und führt zu einem Rauschsignal im Hintergrund der Messung. Die Analyse wurde von Dr. Susanne Kneitz (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) durchgeführt

und auf die *Core*-Probe Sets beschränkt, da sie eine bessere Signalintensität zeigten und auf bereits verifizierte Exons im Genom abzielen und die *Full*- und *Extended*-Probe Sets für gewöhnlich schwache Indikatoren für die Genexpression sind (Xing et al, 2006; Suzuki et al, 2011). Ein weiterer Aspekt der ausschließlichen Verwendung der *Core*-Probe-Sets ist eine Eingrenzung der Probe Sets pro Exon, sodass meistens ein Exon durch mindestens ein Probe Set beschrieben werden konnte. Des Weiteren wurde sich auf die Bereiche konzentriert, die eine Regulation über mehrere Probe Sets hinweg zeigten. Dazu wurde die Funktion „Sliding Window“ verwendet, mit der Extremwerte reduziert und über mehrere Probe Sets regulierte Bereiche betont wurden. Alleine durch diese Funktion wurde die Anzahl der alternativ gespleißten Gene auf ein Drittel der Ausgangsmenge reduziert.

Für die Identifikation differentiell regulierter Gene wurde der dekadische Logarithmus der Veränderung (*log fold change*) der gemittelten Intensitäten zum einen der Probe Sets und zum anderen der gesamten Transkripte verwendet. Dieses LIMMA (Lineare Modell für Microarrayanalysen) gebraucht einen verallgemeinerten, robusten t-Test unter der Vorannahme der Varianz und ist auch für eine geringe Zahl an Wiederholungen geeignet. Mindestens 90 % aller Probe Sets in allen Ansätzen mussten differentiell reguliert sein, sodass falsch-positive Gene, die alternativ gespleißt wurden und im AS Bereich starke log-fache Intensitätsunterschiede zeigten, nicht berücksichtigt wurden. Diese Vorgehensweise verbesserte die korrekte Einordnung in alternativ gespleißt (AS) und differentiell reguliert (RG) maßgeblich (Riedel et al, 2013).

Es wurden für die Validierung alternativ gespleißte und differentiell regulierte Gene ausgewählt, die bei den Signalintensitäten die größten Unterschieden zeigten, da die Daten verlässlicher sind, je größer die Expressionsdifferenzen sind (Xing et al, 2006). Wie schon in vorangegangenen Studien, die den GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array verwendet haben, wurde die Validierung für die einzelnen Gesamt-RNA-Proben mittels RT-PCR durchgeführt (Grigoryev et al, 2009). Hierzu wurde vom Einsatz der zufälligen Hexamerprimer abgesehen und sich ausschließlich auf oligo-d(T)-Primer beschränkt, um gezielt reife, polyadenylierte RNA revers zu transkribieren. Die 2-Schritt-RT-PCR teilt die reverse Transkription in zwei getrennte Schritte auf, wodurch eine höhere Kontaminationsgefahr entsteht (Bustin, 2000), jedoch sind die Amplifikate besonders im Hinblick auf alternativ gespleißte Isoformen deutlicher zu identifizieren. Allerdings war eine eindeutige Bestätigung der Isoformen oft nicht möglich. Für alternativ gespleißte Gene wurden häufig mehr als die vorhergesagten Isoformen amplifiziert. Daneben konnte bei der RT-PCR (wie z.B. bei Grigoryev et al, 2009, bereits beschrieben) auch eine gewisse Donorvarianz beobachtet werden, die aber auch wegen der potentiellen genetischen Unterschiede zu erwarten war. In der Studie von Grigoryev et al, 2009, konnten nur in der Hälfte der für die Validierung selektierten, alternativ gespleißten Gene die vorhergesagten Isoformen bestätigt werden (15 von 32 Genen), da gespleißte und ungespleißte Isoformen nicht gleichzeitig detektiert werden konnten. Dass der konstante Bereich alternativ gespleißter Gene schwer validierbar war und meistens nicht das erwartete gleiche Expressionsniveau zwischen den zwei gepaarten Proben zeigte, kann auch daran liegen, dass die Ergebnisse der RT-PCR nicht die des Exon Arrays reflektieren. Der Array verwendet 25 bp-Oligomere, die punktuell jedes Exon eines Gens beproben, jedoch nicht über einen größeren Bereich hinweg, wie es bei der Validierung mit der RT-PCR der Fall ist. Das würde erklären, warum oft gerade im konstanten Bereich keine eindeutige Bande bzw.

Regulation zwischen den gepaarten Proben gesehen werden konnte, wohingegen der alternativ gespleißte Bereich mit verschiedenen Expressionsniveaus meistens bestätigt wurde.

Zusätzlich wurde, wie auch in anderen Studien, eine semiquantitative qPCR-Analyse durchgeführt (Suzuki et al, 2011). Als Kontrollgene wurden dazu UBC und YWHAZ ausgewählt, die beide in T-Zellen die größte Expressionsstabilität zeigten (Vandesompele et al, 2002). Doch auch mit dieser Methode konnte in dieser Arbeit ausschließlich der alternativ gespleißte Bereich mit verschiedenen Expressionsniveaus sicher bestätigt werden, da der konstante Bereich keine eindeutige Aussage erlaubte. Zum einen könnte das, wie schon bei der RT-PCR, an der Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden liegen (Exon Array gegenüber qPCR), jedoch kann ein weiterer Grund für dieses Problem auch darin bestehen, dass die für die Auswertung verwendete $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode eine optimale und identische Amplifikationseffizienz der Ziel- und Referenzgene voraussetzt (Whistler et al, 2010a). Die Validierung der selektierten, differentiell regulierten Gene mittels RT-PCR und semiquantitativer qPCR verlief wie erwartet, da sie mit einem konventionellen Microarray gleichgesetzt werden können.

Eine Darstellung der Ergebnisse auf Exonebene, wie bei Whistler et al (2010b) und in der Auswahl von Genen in den Abbildungen 4.1 und 4.2, die eine systematische Zuordnung der Exons erlauben, musste bisweilen manuell erstellt werden, da kein entsprechender Algorithmus zur Exon-bezogenen Darstellung vorhanden ist. Whistler et al (2010b) beschreiben, dass bei der optischen Kontrolle der Daten verschiedene Möglichkeiten falsch-positiver alternativ gespleißter Ergebnisse auftreten. Dazu zählt einerseits der Randeffekt, bei dem im 5' oder 3' Exon eines Gens ein Probe Set nicht reagiert, andererseits die nicht-reagierenden Probe Sets in einem Transkriptcluster, bei denen in beiden Gruppen eine sehr geringe Signalintensität im Vergleich zu benachbarten Probe Sets vorliegt, wie auch die Probe Sets, die sich auf Intronsequenzen innerhalb des Gens abbilden und ein gleichermaßen geringes Signal zeigen. In 61 % der Fälle können falsch-positive Ergebnisse auf den Randeffekt zurückgeführt werden, in 30 % auf Probe Sets, die sich auf Intronsequenzen abbilden. In dieser Arbeit wurde die Prozessierung jedoch nicht wie bei Whistler et al (2010b) mit den Rohdaten, sondern mit den Signalintensitäten nach dem Herausfiltern der Probe Sets mit geringer Signalintensität durchgeführt, sodass der Randeffekt nicht zum Tragen kommt.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass für viele der identifizierten Gene die Datenlage bezüglich des Auftretens von Isoformen unzureichend ist oder diese, falls bekannt, teilweise von den neu vorhergesagten abwichen. Solche Unklarheiten können durch neue Algorithmen, wie in dieser Arbeit dargestellt, korrigiert werden, sodass eine Angleichung von Exoneinschluss bzw. -ausschluss und eine optimale Prozessierung der Informationen gewährleistet ist (Riedel et al, 2013).

Die funktionelle Analyse differentiell regulierter und alternativ gespleißter Gene zeigt für jede Gruppe Besonderheiten, aber auch Überlappungen in Signalwegen, wie z.B. dem Zellzyklus. Spezielle Genfamilien, wie z.B. die SHIP-Familie der Phosphatasen, beinhalteten Vertreter für AS und RG (Avota et al, 2006; Kavanaugh et al, 1996). Die Idee für dieses Projekt entstand aus der Entdeckung einer neuen Isoform der Lipidphosphatase SHIP1, die nur bei MV-Kontakt bzw. PI3K-Inhibition gebildet wurde. Im humanen System werden die PIP₃-Level und die Aktivität von PI3K-Effektoren durch die Expression von SHIP1 und seiner konstitutiven Aktivität bzw. seiner Bindungseigenschaft an aktivierte Rezeptoren beeinflusst (Freeburn et al, 2002). Im murinen System wurde *Ship1* identifiziert, welches

in dem Exon 6 vorangestellten Intron eine alternative Transkriptionsstartstelle enthält (Rohrschneider et al, 2000, 2005; Wolf et al, 2000). Das bereits beschriebene Auftreten von SIP110 bei PI3K-Inhibition (Avota et al, 2006) konnte im Exon Array nicht nachvollzogen werden, was vermutlich auf die sehr stringenten Ausschlusskriterien bei der Prozessierung zurückzuführen ist. Jedoch zeigt die PI3K-abhängige Regulation der SHIP-Familie sehr gut, dass eine Kombination von differentieller Regulation und alternativem Spleißen nötig ist, um die T-Zell-Suppression zu regulieren und „verwandte Prozesse“ zu modulieren (Grigoryev et al, 2009).

Durch PI3K-Inhibition induzierte differentiell regulierte Gene sollten auch solche Gene enthalten, die durch PI3-/Akt-Kinaseaktivierung aktiviert bzw. z.B. über FOXO reprimiert werden (Carrette et al, 2009). Dennoch waren nur wenige FOXO1-Zielgene in dieser Analyse betroffen. SESN3, CDKN1A, SAT1, und VCL wurden hochreguliert, während FASL und P27^{KIP} nicht betroffen waren. Ein Grund dafür könnte sein, dass diese Gene nicht den statistischen Anforderungen entsprochen haben, die wir für diese Analyse gesetzt hatten, z.B. wegen stark schwankenden Signalintensitäten. FOXOs induzieren die Expression von SESN3, was die Inhibition von mTORC1 und die Aktivierung von Akt zu Folge hat (Chen et al, 2010). Andere FOXO-Zielgene konnten in die Gruppe der alternativ gespleißten Gene eingeordnet werden. Sauer et al (2008) betrachteten die differentielle Anreicherung von Transkripten in TCR-stimulierten T-Zellen nach PI3K-Inhibition mittels eines konventionellen Microarrays. Diese identifizierten einige Gene, die auch in der vorliegenden Arbeit als differentiell reguliert erschienen, wie z.B. IL-2B und CTLA-4 (hochreguliert) bzw. IL-3 (herunterreguliert), während andere Gene, wie z.B. FoxP3, nicht vorkamen. Ein Grund für diese Diskrepanz können Faktoren wie Varianz im Donormaterial sowie im Stimulationsprotokoll sein. Gerade die nukleäre Akkumulation der Spleißregulatoren wird bei MV-Kontakt reduziert (Avota et al, 2006; Twyffels et al, 2011), sodass Zielgene in großer Zahl fehlreguliert werden, was sich mit den Ergebnissen des Exon Array deckt. Welche PI3K-Effektoren für das alternative Spleißen der im Exon Array detektierten Gene verantwortlich sind, ist nicht näher untersucht worden. Zur Lösung dieser Fragestellung wäre eine Proteomanalyse hilfreich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl differentiell regulierte als auch alternativ gespleißte Gene oft mit Prozessen des Zellzyklus assoziiert sind. Alternatives Spleißen konnte aber ebenfalls oft bei Genen gezeigt werden, die an Zytoskelett-abhängigen Prozessen wie Motilität und Chemotaxis auf Membranebene beteiligt sind (Abbildungen 4.7, 4.9, 4.11 und 4.13).

Da sich diese Arbeit auf T-Zellen fokussiert, sollten diese Ergebnisse mit Genen verglichen werden, die sich spezifisch auf Schlüsselfunktionen und die Viabilität von T-Zellen bezogen. Deshalb wurden von Boitumelo Mofolo (CBIO, University of Cape Town, ZA) die Überschneidungen der zwei Genlisten mit solchen untersucht, die wichtige Genfunktionen in den Kategorien Chemokin-Signaling, Leukozyten-Transendothel-Migration und TCR-Signaling beinhalteten. Es wurden 18 differentiell regulierte und 24 alternativ gespleißte Gene identifiziert.

Die Abbildung 5.1, die von Dr. Susanne Kneitz (Microarray Core Unit, Institut für Virologie) über das Programm Ingenuity Pathway Analysis erstellt wurde, zeigt, dass einige Genprodukte davon direkt in die TCR-Signalkaskade einbezogen sind. Die als alternativ gespleißt identifizierten Guanosinnukleotid-Austauschfaktoren VAV1 und VAV3 kamen in allen drei oben genannten Kategorien vor und spielen eine essentielle Rolle bei der Übersetzung von extrazellulären Signalen in die Dynamik des

5 Diskussion

Zytoskeletts, Proteinphosphatasen und Adapter. CD4 und CD3G, welches die γ -Untereinheit des CD3-TCR-Komplexes kodiert, konnten bei den Analysen als differentiell herunterregulierte Gene identifiziert werden, wohingegen LCK, eine für den TCR-Signalweg wichtige Kinase, alternativ gespleißt wird (Riedel et al, 2013). Die Herunterregulierung von CD3 γ im TCR-Komplex nach alleiniger T-Zell-Aktivierung wurde bereits in Microarraystudien identifiziert (Wang et al, 2008).

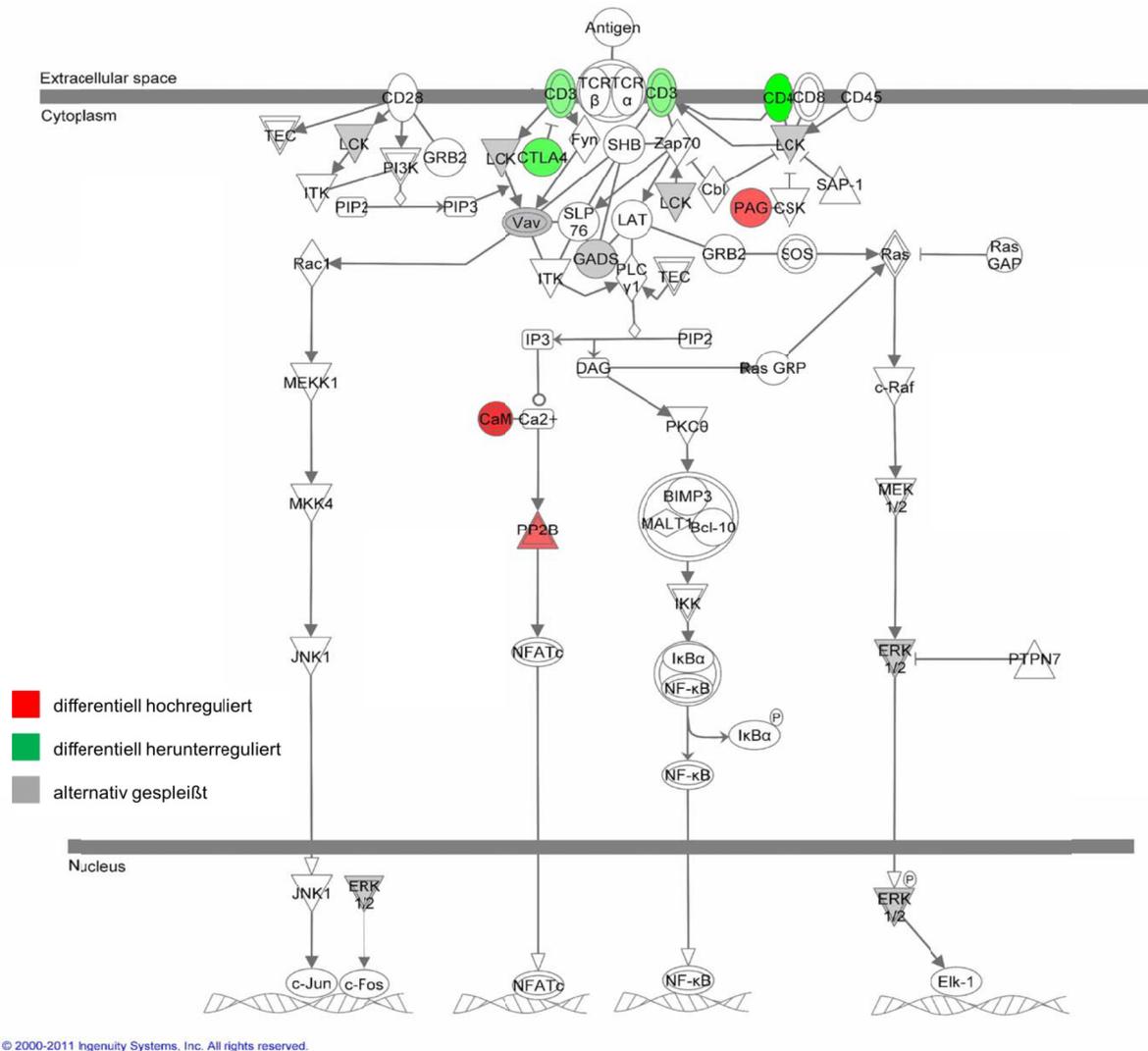


Abb. 5.1 Beteiligung alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene an der TCR-Signalkaskade: rot – differentiell hochregulierte Gene, grün – differentiell herunterregulierte Gene, grau – alternativ gespleißte Gene (verändert nach Riedel et al, 2013).

Auch wurden die Exon Array Genlisten mit bereits veröffentlichten Informationen aus Datenbanken zu alternativem Spleißen sowie Microarray- und EST-Analysen durch Boitumelo Mofolo verglichen. Dies ergab Überschneidungen bei der differentiellen Regulation, wie z.B. ATM (Serin/ Threonin Kinase) und VCL (Vinculin), aber auch beim alternativen Spleißen, wie z.B. LCK und Caldesmon-1 (CALD1). Bei Koexpressionsanalysen mittels STRING („Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Proteins“), sollten Interaktionen verschiedener Genprodukte mit der PI3-Kinase bewertet werden. Dabei konnte *in silico* eine direkte Interaktion der Kinasen ATM und LCK mit der PI3-Kinase festgestellt werden. Des Weiteren scheinen VCL und CALD1 miteinander zu interagieren, die jeweils

sowohl an der Regulation des Zytoskeletts als auch an der Stabilisierung während der fokalen Adhäsion, Migration und Proliferation beteiligt sind.

Viele weitere Gene können alternatives Spleißen in Immunzellen regulieren, wie Oberflächenrezeptoren, Kinasen, Phosphatasen und Adapterproteine (z.B. CD3 ζ , CD45 oder VAV1), aber auch Transkriptionsfaktoren (z.B. LEF1). Das Exon 8 des Oberflächenrezeptors CD3 ζ wird alternativ gespleißt und die 3' UTR enthält ein Intron, das nach T-Zell-Aktivierung in die mRNA mit eingeschlossen wird, wodurch eine höhere Stabilität, Proteinexpression und folglich ein aktiverer T-Zell-Signalweg gewährleistet wird (Martinez, Lynch, 2013). Der Transkriptionsfaktor LEF1 (*lymphocyte enhancer factor 1*) fördert die Expression der TCR α -Kette, indem es mit der von Exon 6 kodierten regulatorischen Domäne an den TCR α -Enhancer bindet. PMA-Behandlung führt zu einem häufigeren Einschluss dieses Exons und hat daher eine erhöhte TCR α -Expression zur Folge (Mallory et al, 2011). Eine weitere Spleißregulation im Hinblick auf die Immunantwort stellt der Einfluss von Signalkaskaden auf die Aktivität von Spleißfaktoren dar. Beispielsweise induziert die T-Zell-Aktivierung vielfältige Änderungen auf Transkriptionsebene, die auch Spleißfaktoren betreffen können. So können auch alternativ gespleißte Proteine, die RNA binden oder an der Regulation der mRNA-Prozessierung beteiligt sind, deren Aktivität und folglich das alternative Spleißen von Zielgenen beeinflussen (Martinez, Lynch, 2013). SAM68 gehört zur STAR (*signal transduction and RNA*)-Familie, die in der Regulation der mRNA-Stabilität und Translation aktiv ist. Dieser Vertreter reguliert auch das durch T-Zell-Aktivierung induzierte Spleißen von CD44. Dabei interagieren SAM68 und das SR-verwandte Protein SRm160 durch die Ras-Signalkaskade und bilden einen Komplex, der an *Exonic Splicing Enhancer* bindet und zum Exoneinschluss führt (Matter et al, 2002).

Das Verständnis der Spleißregulation im Immunsystem ermöglicht es, sowohl grundlegende Immunfunktionen, als auch mechanistische Angriffspunkte für verschiedenste Erkrankungen zu erkennen.

5.2 Selektion, Klonierung und funktionelle Effekte ausgewählter Gene auf HEK293T-Zellen (transiente Expression) und primäre T-Zellen (Knockdown)

Bei der Selektion funktionell interessanter Gene konnte eine Diskrepanz zwischen den über den Exon Array gemessenen und den mit BLAST ermittelten, tatsächlich kodierenden Exons erkannt werden. Der Exon Array beprobt alle vorhandenen Exons, ungeachtet dessen, ob sie kodierend sind oder nicht. Für die Identifizierung alternativer Spleißisoformen ist aber hauptsächlich die Berücksichtigung der kodierenden Exons nötig (Abbildung 4.15). Die Beschränkung auf diese veränderte die Spleißmuster der für funktionelle Tests selektierten Gene, sodass z.B. FBXO6 nur noch als differentiell reguliert betrachtet werden konnte. Dies schränkte die Zahl der alternativ gespleißten Gene weiter ein, konnte aber nicht auf Genomebene überprüft werden, da entsprechende Algorithmen bzw. Zuordnungen der Affymetrix Probe Sets in kodierende und nicht kodierende Exons fehlen.

Es wurden teils funktionell interessante Gene für die Klonierung ausgewählt, die im Exon Array mindestens zwei log-Stufen Differenz in der Signalintensität zeigten, teils Gene, die laut Exon Array auf eine eindeutige alternative Isoform hinwiesen.

Der FBXO6-Ubiquitinligasekomplex unterstützt den ER-assoziierten Abbau von Glykoproteinen durch Ubiquitinierung (Liu et al, 2012) und ist über die Regulation der Stabilität der Checkpoint Kinase 1 (CHK1, Schlüsselproteinkinase im Replikationskontrollsystem) am Zellzyklus beteiligt (Zhang et al, 2009 a). DNA-Schäden aktivieren die CHK1 und führen zur Exposition einer Degron-ähnlichen Struktur am Carboxyterminus der Kinase, was zur Ubiquitinierung und zum Abbau von CHK1 führt, wodurch der Kontrollpunkt beendet wird. Folglich könnte eine reduzierte CHK1-Expression ein bestimmender Faktor für die Empfindlichkeit bei Antitumorthérapien sein, die starken Replikationsstress induzieren, sodass ein irreversibler Replikationsarrest, ein Bruch des DNA-Strangs und letztendlich der Zelltod eingeleitet werden können (Zhang et al, 2009 a). Daher liegt die Vermutung nahe, dass FBXO6 bei Fehlregulation auch als Silencing Faktor für T-Zellen agieren kann.

Das alternativ gespleißte LAT2 ist ein Transmembran-Adapterprotein, das eine LAT-ähnliche Struktur und, wie auch LAT, eine positive Funktion im FC ϵ RI-vermittelten Signalweg aufweist. Dieser ist essentiell für die Entwicklung, die Aktivierung und die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen (Horejsí et al, 2004). Brdicka et al (2002) haben bereits das Spleißmuster im Vergleich zu LAT dargestellt, Exon 3 ist als alternatives Exon bekannt. Diese Aussage wird in dieser Arbeit durch die Exon Array Analyse bestätigt und erweitert. Die PI3K-Inhibition induziert *in silico* einen weiteren alternativen Spleißvorgang bei Exon 2. Svojc et al (2012) zeigen, dass LAT2 als Tumorsuppressor fungiert, welcher die proximalen Signalwege leukämischer „Blasts“ verstärkt. Bei TCR-Stimulation wird die LAT2-Expression hochreguliert, wodurch die Phosphorylierung von ERK und Akt vermindert wird, was wiederum zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung führt.

Bei der Klonierung der funktionell interessanten Gene wurde für FBXO6 erwartungsgemäß immer nur eine Isoform gesehen. Bei LAT2 und FAM184A konnten hingegen die erwarteten alternativen Isoformen detektiert werden, jedoch bestand zwischen den einzelnen Spendern eine große Varianz, die von der Präsenz keiner bis hin zu mehreren Isoformen oder auch sehr kurzen Amplifikaten reichte. FAM184A zeigte oft eine Bande bei ca. 700 bp (Abbildung 4.17), jedoch gelang die Sequenzierung dieser Bande nicht, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ein unspezifisches Amplifikat handelte. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, sich auf die laut Exon Array zu erwartenden Isoformen zu beschränken. Die Sequenzierung der aus dem Gel isolierten, alternativ gespleißten Isoformen von FAM184A und LAT2 zeigte jeweils, dass es sich immer um die längste Isoform handelte. Das lässt darauf schließen, dass bei der Gelextraktion eine Kontamination mit der größeren Bande auftrat, die bei folgenden PCRs die kürzere Isoform vollständig überlagerte. Da eine erfolgreiche Isolation der alternativen Isoformen nicht gelang, wurde sich auf die Hauptisoform konzentriert und ausschließlich diese für die Klonierung und die darauffolgenden funktionellen Experimenten eingesetzt. Das differentiell regulierte Gen SLFN5 zeigte interessanterweise neben der Isoform mit vollständiger Länge immer zwei weitere Amplifikate, die aufgrund der Exon Array Analyse nicht erwartet wurden. Sowohl in Datenbanken als auch in Veröffentlichungen sind diese Transkripte nicht bekannt.

Die transiente Expression der generierten Plasmide in primären und immortalisierten T-Zellen erwies sich als wenig geeignet, da die Transfektionseffizienzen sogar für den Leervektor nicht ausreichend hoch waren. Das kann zum einen durch die Elektroporation erklärt werden, die für die transiente

5 Diskussion

Transfektion von Plasmiden in primäre T-Zellen als Methode zwar etabliert, jedoch nicht sehr effizient ist (Freeley, Long, 2013). Um bessere Transfektionseffizienzen und Signalintensitäten zu erhalten, wurden die Überexpressionsexperimente in der Zelllinie HEK293T durchgeführt, wozu JetPEI als Transfektionsreagenz verwendet wurde. In dieser Arbeit wurden die Effekte der generierten Plasmide pEGFP-N1-FBXO6/ -LAT2 und -SLFN5 auf die Zellviabilität, auf die Induktion von Apoptose und auf die Proliferation überprüft. Ein signifikanter Effekt auf Zellviabilität, Apoptose bzw. Zellproliferation in den EGFP-positiven Populationen konnte nicht festgestellt werden (Abbildungen 4.20, 4.21 und 4.22).

Für die Überprüfung der Lokalisation wurden Überlagerungsbilder von lebenden, unfixierten HEK293T-Zellen aus Hellfeld und EGFP-Signal erstellt, da die Fixierung, Färbung der Aktinfilamente mit Phalloidin-Rot und das Eindecken zu sehr großen Signaleinbußen des EGFP-Fusionsproteins führte (Stadler et al, 2013), was besonders beim schwachen Signal von EGFP-SLFN5 nicht tolerierbar war. Zur Kontrolle wurde der Leervektor pEGFP-N1 verwendet und bestätigte die per FACS bereits ermittelten Ergebnisse der guten Transfektionsrate und Signalintensität (Abbildung 4.23).

Die generierten Fusionsproteine mit pEGFP ermöglichen eine bessere Visualisierung in endomembranen Strukturen, jedoch besteht das Risiko der falschen Lokalisierung zu diesen Strukturen hin aufgrund der ektopischen Überexpression des Proteins. Des Weiteren zeigen Stadler et al (2013), dass die Mehrheit der untersuchten Proteine in mehreren zellulären Bereichen lokalisierbar war, wobei auffiel, dass die sekundäre Lokalisierung im Zellkern und Zytoplasma detektierbar war. Um diesen Artefakten entgegenzuwirken, kann man spezifische Antikörper gegen die selektierten Genprodukte verwenden, jedoch standen solche nicht zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit, um lediglich die Lokalisierung der Fusionsproteine zu überprüfen, ist die Verwendung eines kurzen Tags, wie z.B. des HA-Tags mit neun Aminosäuren (YPYDVPDYA, 1 kDa). Für diese Art der Lokalisierung muss die Zelle jedoch fixiert und permeabilisiert werden, weshalb sich diese Methode für die in dieser Arbeit untersuchten funktionellen Tests nicht eignete.

Bereits Liu et al (2012) haben die subzelluläre Verteilung von FBXO6 über die Gene Ontology Klassifizierung in Hinblick auf die zellulären Komponenten bestimmt. Dabei wurde der größte Anteil von ca. 44 % im ER gefunden, was wahrscheinlich als Cluster in Abbildung 4.24 a zu sehen ist. Diese Aussage hätte durch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefestigt werden können. Die bereits ermittelte Lokalisierung im Nukleus (Liu et al, 2012) konnte ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 4.24 a und b) und stimmt damit überein, dass FBXO6 die Stabilität der CHK1 reguliert (Zhang et al, 2009a). Die EGFP-FBXO6 exprimierenden HEK293T-Zellen zeigten hauptsächlich eine runde Morphologie, die auf Überexpressionseffekte oder eine Fehlregulation des Zytoskeletts deuten.

Das Transmembran-Adapterprotein LAT2 hat eine Vielzahl von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne. Aufgrund eines Palmitoylierungsmotivs ist LAT2, wie auch LAT, in der Plasmamembran und den *lipid rafts* lokalisierbar und stellt Bindungsstellen für Effektorsignalmoleküle zur Verfügung, um eine Signalübertragung von den Immunrezeptoren zum Nukleus zu gewährleisten. Da LAT2 teilweise die Funktionen von LAT übernehmen kann, teilen sich beide Gene anscheinend auch einen Teil der Funktionen in verschiedenen Signalwegen und konkurrieren darum (Brdicka et al, 2002; Zhu et al, 2004; Janssen et al, 2004; Fuller et al, 2011). In der vorliegenden Arbeit ließ sich die Lokalisation nicht verifizieren, das Protein wurde scheinbar in Einschlusskörperchen perinukleär angereichert (Abbildung 4.26 a und c). Diese Diskrepanz kann einerseits auf eine zu starke Über-

expression, andererseits aber auch auf die verwendeten H293T-Zellen zurückgeführt werden. Die EGFP-LAT2 exprimierenden HEK293T-Zellen zeigen eine weitgehend runde Morphologie, die auch auf Überexpressionseffekte oder eine Fehlregulation des Zytoskeletts deuten.

Der genaue Funktionsmechanismus von SLFN5 ist noch nicht ausreichend untersucht, jedoch weist die Aminosäuresequenz auf eine RNA-Helikase- oder eine RNA-Strukturformungsaktivität hin, auch scheint die entsprechende SLFN-Subfamilie III an der Regulation und der Differenzierung hämatopoetischer Zellen beteiligt zu sein (Geserick et al, 2004). Mavrommatis et al (2013) konnten in primären Melanozyten mittels Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisierung von IFN- α -induziertem SLFN5 im Nukleus und in nukleären Lysat-Fractionen nachweisen. In Abbildung 4.25 a und b können diese nukleäre Lokalisierung sowie zusätzliche SLFN5-Cluster beobachtet werden, die möglicherweise, wie bei LAT2 erwähnt, Einschlusskörperchen aufgrund der Überexpression sein könnten.

Für den Einsatz von siRNA in primären T-Zellen eignete sich die Nukleofektion. Der erfolgreiche Knockdown konnte danach mittels RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 4.27). Die Transfektion von siRNA induziert nur vorübergehend einen Knockdown des zu untersuchenden Gens in T-Zellen (McManus et al, 2002). Die Wiederholung der Transfektion nach 48h erhöhte den Effekt der siRNA auf den Knockdown, was bereits von Freeley und Long (2013) gezeigt werden konnte.

Mavrommatis et al (2013) konnten zeigen, dass der Knockdown von SLFN5 die Proliferation von Nierenkarzinom-Zellen (RENCA) auf 300 % des Wertes der unbehandelten Kontrollzellen ansteigen lässt. Diese Studie zeigte auch, dass dieser Knockdown zu einer grundlegenden Vergrößerung der malignen Zellkolonieformation führt. Demzufolge scheint SLFN5 als Proliferationsinhibitor zu agieren. Im Gegensatz dazu zeigen meine Ergebnisse keinen signifikanten Effekt des Knockdowns auf Proliferation (Abbildung 4.29), Zellviabilität und die Induktion von Apoptose (Abbildung 4.28). Diese Diskrepanz kann auf die Verwendung primärer humaner T-Zellen bzw. die Untersuchung der TCR-stimulierten Proliferation zurückgeführt werden. Des Weiteren können auch experimentelle Probleme oder eine zu geringe Probenzahl als Gründe aufgeführt werden. Dass der positive Trend der Proliferation nicht signifikant ist, kann an den großen Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten liegen. Eine erhöhte Probenzahl könnte diese Schwankungen minimieren und zeigen, ob der Knockdown von SLFN5 die Proliferation verbessert.

Betrachtet man die relative Polarisation der SLFN5-siRNA-transfizierten T-Zellen auf Fibronektin kann kein Unterschied zur Kontrolle gesehen werden (Abbildung 4.31 b). Es ist möglich, dass nur in einer Subpopulation der T-Zellen SLFN5 herunterreguliert wurde, was dazu führen könnte, dass das fehlende Signal von der nicht beeinflussten Subpopulation überdeckt wird. Diese Problematik zwischen der Überprüfung des Knockdowns auf Populationsebene und der Funktionalität auf Einzelzellebene, sowie der schwierigen Transfektion von primären T-Zellen (McManus et al, 2002) ist bereits bekannt.

Jedoch fiel bei den Polarisationsexperimenten auf, dass ein signifikant höherer Prozentsatz von Zellen in der SLFN5-ablatierten Kultur an Fibronektin adhärierte (Abbildung 4.32). Änderungen in dieser Integrin-vermittelten Adhärenz sind zusammen mit der Aktin-Dynamik verantwortlich für die Zellmotilität. Dafür interagiert unter anderem das Zytoskelett mit Adhäsionsmolekülen der extrazellulären Matrix (ECM), was mit der Aktivierung von Integrinen verbunden ist (Samstag et al, 2003). Als Bestandteil der ECM wird durch die Interaktion von Fibronektin mit β -Integrinen auf der Oberfläche

von T-Zellen die T-Zell-Polarisation ausgelöst. Die in dieser Arbeit beobachtete verbesserte Adhäsion der SLFN5-herunterregulierten T-Zell-Kulturen lässt daher darauf schließen, dass SLFN5 ein regulatorisches Element für die Adhärenz von T-Zellen auf Fibronectin darstellt. Sánchez-Martín et al (2004) haben bereits gezeigt, dass Vav, das in der vorliegenden Arbeit als alternativ gespleißt identifiziert wurde, und PI3K/AKT die Aktivität der GTPase Rac-1 entgegengesetzt regulieren und folglich Veränderungen in der Polarisierung und Migration von T-Zellen induzieren.

5.3 Genexpression im Virus-inhibierten System und in Zelllinien

Nachdem der Exon Array alternatives Spleißen infolge der PI3K-Inhibition erfasst, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die ermittelten Isoformen auch bei der T-Zell-Inhibition durch das Wildtyp-Masernvirus WTF auftreten. Das alternativ gespleißte Gen FBXO6 erschien entgegen der Erwartung im Virus-inhibierten System als differentiell reguliertes Gen. Das alternativ gespleißte Gen WRAP53 hingegen zeigte teilweise genau die erwarteten, aber spenderspezifisch varianten Ergebnisse (Tabelle 4.5 und Abbildung 4.35). Zusätzlich waren im Virus-inhibierten System im Vergleich zur PI3K-Inhibition eindeutige Banden der erwarteten Fragmentlängen detektierbar.

Die differentiell regulierten Gene SLFN5 und HELLS zeigten hingegen sehr variierende Resultate. SLFN5 erschien bei Virus-Inhibition immer als alternativ gespleißtes Gen mit eindeutiger, gleicher Signalintensität beider gepaarter Proben im Bereich von Exon 2 auf Exon 3 (172bp) bei allen Donoren. HELLS zeigte überwiegend ein RT-PCR-Ergebnis wie ein alternativ gespleißtes Gen mit eindeutigen Banden, jedoch war die Donorvarianz bei diesem Gen deutlich höher (Tabelle 4.6 und Abbildung 4.36). Bei den differentiell regulierten Genen waren im Virus-inhibierten System im Vergleich zur PI3K-Inhibition die Banden schwieriger zu bewerten und inhomogener bezüglich der Regulation.

Dieses entgegengesetzte Verhalten vieler Gene kann zum einen auf die Varianz der Donorspezifität zurückgeführt werden, zum anderen darauf, dass das Virus-inhibierte System viel komplexer ist und auf viel mehr regulatorischen Ebenen wirkt, als die alleinige Inhibition des PI3K-Signalwegs. Daher sollte für folgende Studien verifiziert werden, ob die alleinige PI3K-Inhibition ein geeignetes Modell ist, um das MV-inhibierte System darzustellen. Des Weiteren können zusätzliche Faktoren wie Virusqualität, UV-Inaktivierung des Virus oder Virusmenge Veränderungen in der Regulation der Zielgene in T-Zellen provozieren.

Bei der Überprüfung der PI3K-induzierten Expression ausgewählter Gene in verschiedenen T-Zelllinien konnten Veränderung im Vergleich zur erwarteten Regulation festgestellt werden. Inwieweit die beobachteten Abweichungen in der Regulation der untersuchten Gene auf die Immortalisierung zurückzuführen sind, bleibt zu klären.

Während der Regeneration des Kontrollpunkts für die DNA-Schädigung im Zellzyklus reguliert FBXO6 die Stabilität der Checkpoint-Kinase1, weshalb ihm auch eine Rolle für zukünftige Therapien von Tumorzellen zugesagt wird (Merry et al, 2010). Betrachtet man sich die Expression in den verschiedenen Zelllinien (Tabelle 4.7), so ist es auffällig, dass FBXO6 in den meisten Zelllinien nicht exprimiert wird. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Proteingehalte von FBXO6 und

CHK1 eine gegenläufige Korrelation in Krebszellen und Tumorgewebe zeigen. Die stressinduzierte CHK1-Degradation durch die Unterdrückung der Replikation konnte mit der Resistenz von Krebszellen auf Chemotherapeutika in Verbindung gebracht werden. Hierzu wurde vorgeschlagen, dass eine defekte Ubiquitinierungsmaschinerie eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber Krebsmedikation, die starken Zellstress hervorruft, bedingt und somit die FBXO6-Expression als Biomarker für die Empfindlichkeit des Tumors auf ein Antikrebsmedikament dienen könnte (Zhang et al, 2009a).

WRAP53 ist – außer in den Zelllinien Jurkat und TAXI – wie in primären T-Zellen reguliert. Als natürliches p53 *antisense*-Transkript reguliert es den p53-induzierten Schutz der DNA vor Degradation und ist folglich in den analysierten Linien nicht transformationsrelevant.

BRSK1 ist für die Regulation präsynaptischer Neurotransmitterfreisetzung über die *lipid rafts* und der Phosphorylierung der Zellzyklus-Kontrollpunktkinase Wee1 wichtig (Rodríguez-Asiain et al, 2011). HDAC9 ist für die homologe Rekombination (Kotian et al, 2011) sowie für die Entwicklung und Differenzierung vieler Zellarten, inklusive regulatorischer T-Zellen (Yan et al, 2011), von grundlegender Bedeutung. BRSK1 und HDAC9 sind in allen untersuchten Zelllinien anders reguliert, als entsprechend dem Exon Array in primären T-Zellen gemessen und erwartet wurde. Dies deutet darauf hin, dass sowohl BRSK1 als auch HDAC9 in den analysierten Zelllinien transformationsrelevant sind.

CHN1 wurde in die Zelllinienuntersuchung eingeschlossen, da es das einzige Rho GTPase-aktivierende Protein ist, das den Phorbolster-Tumorpromotor bindet und über die Regulation von Rac bzw. anderen Rho GTPasen an der Tumorentwicklung beteiligt sein kann (Yang et al, 2007). Die katalytische Aktivität von CHN1 inhibiert die TCR- und Vav1-abhängige Stimulation des Transkriptionsfaktors NF-AT (Caloca et al, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine einheitliche Regulation von CHN1 gezeigt werden, weshalb es in den untersuchten Zelllinien nicht grundsätzlich transformationsrelevant zu sein scheint.

Bei den differentiell regulierten Genen hat SLFN5 das Potential als Tumorsuppressor zu agieren, da es in malignen Melanomen infolge von Interferonbehandlung hochreguliert wird und eine proliferationsinhibitorische Wirkung hat (Katsoulidis et al, 2010; Mavrommatis et al, 2013). ARHGEF6 wird mit Integrin-abhängigen Signalkaskaden in Verbindung gebracht, was darauf schließen lässt, dass es an grundlegenden zellulären Prozessen wie der fokalen Adhäsion beteiligt ist (Rosenberger, Kutsche, 2006). In dieser Arbeit gibt es keine Hinweise auf Transformationsrelevanz, da es weitestgehend wie in primären T-Zellen reguliert ist. HELLS wird in lymphoiden Vorläuferzellen stark exprimiert. Andere Mitglieder dieser Helikasefamilie konnten in den Bereichen Genomstabilität, DNA-Reparatur und Transkriptionskontrolle identifiziert werden. Die chromosomale Lokalisierung von HELLS fällt in eine Region, von der bereits bekannt ist, dass sie häufig bei Leukämie betroffen ist (Geiman et al, 1998). DNMBP bindet Dynamin und Aktin-regulatorische Proteine und aktiviert den Rho GTPase Signalweg (Salazar et al, 2003). Jedoch konnte in dieser Arbeit kein spezieller Trend für die in der Exon Array Analyse als differentiell reguliert identifizierten Gene - außer ARHGEF6 - in den sechs untersuchten Zelllinien gesehen werden, der eine eindeutige Aussage zuließe.

Bereits durch diese kleine Auswahl an untersuchten Genen kann man große Unterschiede zwischen primären und immortalisierten bzw. lymphoiden T-Zellen feststellen, sodass sich interessante Ansatzpunkte für zukünftige Projekte zur Charakterisierung von Krebs-relevanten Genen sowie des einzigartigen Verhaltens gesunder primärer T-Zellen ergeben.

6 Zusammenfassung

Die Interaktion des Masernvirus mit T-Zellen stört die Aktivierung der TCR-Signalkaskade durch die Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die zur Einstellung der T-Zell-Funktionen führt und dadurch nachgeschaltete (*downstream*) Signalwege sowie den Eintritt in den Zellzyklus, aber auch die Genexpression reguliert. Infolgedessen können die Aktivität spleißregulatorischer Faktoren sowie die Spleißmuster von mRNAs verändert werden, wie zum Beispiel bei der alternativ gespleißten SHIP1-Isoform SIP110, die eine T-Zell-inhibitorische Aktivität zeigt. Um alternativ gespleißte (AS) und differentiell regulierte (RG) Transkripte in T-Zellen infolge von PI3K-Inhibition zu erfassen, wurde ein Human Exon 1.0 ST Array an RNA-Proben von humanen T-Zellen, 24 h stimuliert und stimuliert/ PI3K-inhibiert, durchgeführt. Durch die Anwendung geeigneter bioinformatischer Algorithmen konnten spezifisch in PI3K-inhibierten Zellen angereicherte Transkripte nachgewiesen und in die Kategorien AS (2192 Gene) und RG (619 Gene) eingeteilt werden. Ausgewählte Gene wurde mittels RT-PCR und qPCR validiert, gefolgt von der funktionellen Annotation beider Genlisten. AS Gene konnten verstärkt in ECM-Rezeptor Interaktionen, fokaler Adhäsion, Proliferation, Zytoskelettorganisation und Tumorsignalwegen gefunden werden, während RG Gene eher in der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Stressantwort vertreten waren. Gene beider Gruppen konnten auf Signalwege bezogen werden, die essentiell für den TCR-Signalweg, die Zytoskelettdynamik und den Zellzykluseintritt waren. Das stützt die Annahme, dass die Außerkraftsetzung der PI3K-Schlüsselprozesse der T-Zell-Aktivierung sowohl auf der Ebene der RG als auch der AS Gene wirkt. Über die Ingenuity Pathway Analyse konnten wir unsere Genlisten mit Genen vergleichen, die bereits auf solche Schlüsselprozesse und die Viabilität bezogen werden können. In der Überschneidung wurden z.B. die AS GTP-Austauschfaktoren Vav1 und Vav3 gefunden, die für die Übersetzung extrazellulärer Signale in Zytoskelettdynamik, Proteinphosphatasen und Adapter von Bedeutung sind.

Ausgewählte Gene (AS - FBXO6 und LAT2, RG - SLFN5) wurden aus PI3K-arretierten T-Zellen kloniert und deren Effekt auf grundlegende zelluläre Funktionen durch Überexpression in HEK293T-Zellen überprüft. Die Fusionsproteine veränderten weder die Zellviabilität noch die Proliferation dieser Zellen. Über einen auf siRNA basierenden Knockdown wurde überprüft, ob das RG Gene SLFN5 als Suppressor auf die T-Zell-Aktivierung agiert. Der Knockdown in primären T-Zellen zeigte keinen Einfluss auf die Zellviabilität, Proliferation und Polarisation. Jedoch konnte ein signifikanter Effekt auf die T-Zell-Adhärenz auf Fibronectin gezeigt werden, was darauf schließen lässt, dass SLFN5 die T-Zell-Adhärenz negativ reguliert.

Des Weiteren wurde die MV-induzierte Regulation selektierter Gene betrachtet und Unterschiede in der Regulation im Vergleich zur direkten PI3K-Inhibition festgestellt. Ein Grund dafür könnte sein, dass das MV eine Inhibition auf vielen Ebenen induziert, anstelle der alleinigen PI3K-Inhibition.

Abschließend wurde untersucht, ob ausgewählte Gene an der Regulation in verschiedenen T-Zelllinien beteiligt sind und als Tumorsuppressoren agieren könnten. FBXO6 als Regulator der CHK1-Stabilität wurde in den meisten Zelllinien nicht exprimiert. Die Annahme, dass eine Stress-induzierte defekte Ubiquitinierungsmaschinerie an der Resistenz von Tumorzellen auf Chemotherapeutika beteiligt ist, macht FBXO6 zu einem interessanten Kandidaten als Biomarker für Tumorsensitivität gegenüber Krebsmedikamenten. Diese Annahme bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

7 Summary

The interaction of measles virus (MV) with T cells interferes with the activation of the TCR-signaling by the inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), leading to the termination of T cell functions and consequently to the regulation of downstream signaling as well as cell cycle entry. PI3K-inhibition also affects the activity of splice regulatory elements and the splicing pattern of mRNAs, as for example the alternatively spliced SHIP1 isoform SIP110 that shows T cell inhibitory activity. To integrate early alternatively spliced (AS) and differentially regulated (RG) transcripts in response to PI3K interference in T cells at a general level, we performed a Human Exon 1.0 ST Array analysis on RNAs isolated from human T cells PI3K-inhibited or not prior to 24h stimulation. Applying suitable bioinformatic algorithms, transcripts detected specifically in PI3K-inhibited cells were assigned to categories defining RG (619 genes) and AS species (2192 genes). A selection of genes was validated by RT-PCR and qPCR followed by functional annotation of both gene lists. AS genes were found to be enriched in ECM-receptor interactions, focal adhesion, proliferation, cytoskeleton organization and tumor signaling, while RG genes were rather related to processes as DNA-replication, DNA-repair and stress response. Some genes that belonged to both groups target pathways essential for TCR-signaling, cytoskeletal dynamics and cell cycle entry, strongly support the notion that PI3K abrogation interferes with key T cell activation processes at the level of differential regulation as well as alternative splicing. Using Ingenuity Pathway Analysis we compared our gene lists to genes already known to specifically relate to key T cell functions and viability. In the overlap we found for example AS GTP-exchange factors Vav1 and Vav3 important for translating extracellular signals into cytoskeletal dynamics, protein phosphatases and adaptors.

Selected candidate genes (AS - FBXO6 und LAT2, RG - SLFN5) were cloned from PI3K-arrested T cells into the pEGFP-vector and tested by overexpression in HEK293T for their effect on basic cell functions. These fusion proteins did not affect viability and proliferation of these cells. Using siRNA-based knockdown the potential of the RG gene SLFN5 to act as suppressors of key steps in T cell activation was tested. Its knockdown in primary T cells did not affect cell viability, proliferation and polarization. However, T cell adherence on fibronectin was significantly enhanced indicating that SLFN5 negatively regulates T cell adhesion to the ECM.

Additionally we had a look at the MV induced regulation of selected genes and found a difference of the regulation in comparison to direct PI3K-inhibition. A reason for these unexpected results could be that MV induces a multi-level inhibition, rather than PI3K-inhibition only.

Finally we wanted to find out, if selected genes were also implicated in the regulation of different T cell lines and therefore could act as tumor suppressors. FBXO6, a regulator of CHK1 stability, for example was not expressed in most investigated cell lines. Assuming that a stress-induced defective ubiquitination complex is involved in the resistance of tumor cells to chemotherapeutic agents FBXO6 might be an interesting candidate as biomarker for tumor sensitivity to cancer medication. If some of these differences in regulation are the result of immortalization, corresponding genes could consequently act as tumor suppressor. This issue has to be subject to further research.

8 Literaturverzeichnis

Abt, M.; Gassert, E.; Schneider-Schaulies, S. (2009): Measles virus modulates chemokine release and chemotactic responses of dendritic cells. In: *J. Gen. Virol* 90 (Pt 4), S. 909–914.

Affymetrix (Technical Note II): GeneChip Exon Array Design.

Affymetrix (Technical Note III): GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array and GeneChip® WT Sense Target Labeling Assay for Genome-Wide, Exon-Level Expression Analysis.

Affymetrix (Technical Note IV): Guide to Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER) Estimation.

Affymetrix (Technical Note I): Identifying and Validating Alternative Splicing Events.

Alberts, B. (2004): Molekularbiologie der Zelle. Kapitel 6.1.10-6.1.19. 5., vollst. überarb. Weinheim: Wiley-VCH.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *J. Mol. Biol* 215 (3), S. 403–410.

Astoul, E.; Edmunds, C.; Cantrell, D. A.; Ward, S. G. (2001): PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. In: *Trends Immunol* 22 (9), S. 490–496.

Avota, E.; Avots, A.; Niewiesk, S.; Kane, L. P.; Bommhardt, U.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, S. (2001): Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. In: *Nat. Med* 7 (6), S. 725–731.

Avota, E.; Gassert, E.; Schneider-Schaulies, S. (2010): Measles virus-induced immunosuppression: from effectors to mechanisms. In: *Med. Microbiol. Immunol* 199 (3), S. 227–237.

Avota, E.; Harms, H.; Schneider-Schaulies, S. (2006): Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation. In: *Cell Microbiol* 8 (11), S. 1826–1839.

Avota, E.; Müller, N.; Klett, M.; Schneider-Schaulies, S. (2004): Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. In: *J. Virol* 78 (17), S. 9552–9559.

Barthel, A.; Schmoll, D.; Unterman, T. G. (2005): FoxO proteins in insulin action and metabolism. In: *Trends Endocrinol. Metab* 16 (4), S. 183–189.

Bellini, W. J.; Englund, G.; Rozenblatt, S.; Arnheiter, H.; Richardson, C. D. (1985): Measles virus P gene codes for two proteins. In: *J. Virol* 53 (3), S. 908–919.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. (2003): Biochemie. Kapitel 28.3. 5. Aufl. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum-Lehrbuch).

Black, D. L. (2000): Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. In: *Cell* 103 (3), S. 367–370.

Blaustein, M.; Pelisch, F.; Srebrow, A. (2007): Signals, pathways and splicing regulation. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol* 39 (11), S. 2031–2048.

Bolstad, B. M.; Irizarry, R. A.; Astrand, M.; Speed, T. P. (2003): A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. In: *Bioinformatics* 19 (2), S. 185–193.

Brdicka, T.; Imrich, M.; Angelisová, P.; Brdicková, N.; Horváth, O.; Spicka, J. et al. (2002): Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. In: *J. Exp. Med* 196 (12), S. 1617–1626.

8 Literaturverzeichnis

- Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In: *J. Mol. Endocrinol* 25 (2), S. 169–193.
- Caloca, M. J.; Delgado, P.; Alarcón, B.; Bustelo, X. R. (2008): Role of chimaerins, a group of Rac-specific GTPase activating proteins, in T-cell receptor signaling. In: *Cell. Signal* 20 (4), S. 758–770.
- Carrette, F.; Fabre, S.; Bismuth, G. (2009): FOXO1, T-cell trafficking and immune responses. In: *Adv. Exp. Med. Biol* 665, S. 3–16.
- Cattaneo, R.; Kaelin, K.; Baczko, K.; Billeter, M. A. (1989): Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. In: *Cell* 56 (5), S. 759–764.
- Chen, C.; Jeon, S.; Bhaskar, P. T.; Nogueira, V.; Sundararajan, D.; Tonic, I. et al. (2010): FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. In: *Dev. Cell* 18 (4), S. 592–604.
- Conesa, A.; Götz, S. (2008): Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. In: *Int J Plant Genomics* 2008, S. 619832.
- Conesa, A.; Götz, S. (2009): Blast2GO Tutorial. Valencia, SPAIN.
- Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. (2005): Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. In: *Bioinformatics* 21 (18), S. 3674–3676.
- Engelman, J. A.; Luo, J.; Cantley, L. C. (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. In: *Nat. Rev. Genet* 7 (8), S. 606–619.
- Freeburn, R. W.; Wright, K. L.; Burgess, S. J.; Astoul, E.; Cantrell, D. A.; Ward, S. G. (2002): Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. In: *J. Immunol* 169 (10), S. 5441–5450.
- Freeley, M.; Long, A. (2013): The two hit hypothesis: An improved method for siRNA-mediated gene silencing in stimulated primary human T cells. In: *J. Immunol. Methods*.
- Fuller, D. M.; Zhu, M.; Ou-Yang, C.; Sullivan, S.; Zhang, W. (2011): A tale of two TRAPs: LAT and LAB in the regulation of lymphocyte development, activation, and autoimmunity. In: *Immunol. Res* 49 (1-3), S. 97–108.
- Gassert, E.; Avota, E.; Harms, H.; Krohne, G.; Gulbins, E.; Schneider-Schaulies, S. (2009): Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. In: *PLoS Pathog* 5 (10), S. e1000623.
- Geiman, T. M.; Durum, S. K.; Muegge, K. (1998): Characterization of gene expression, genomic structure, and chromosomal localization of Hells (Lsh). In: *Genomics* 54 (3), S. 477–483.
- Geserick, P.; Kaiser, F.; Klemm, U.; Kaufmann, S. H. E.; Zerrahn, J. (2004): Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. In: *Int. Immunol* 16 (10), S. 1535–1548.
- Glenn, K. A.; Nelson, R. F.; Wen, H. M.; Mallinger, A. J.; Paulson, H. L. (2008): Diversity in tissue expression, substrate binding, and SCF complex formation for a lectin family of ubiquitin ligases. In: *J. Biol. Chem* 283 (19), S. 12717–12729.
- Graveley, B. R. (2000): Sorting out the complexity of SR protein functions. In: *RNA* 6 (9), S. 1197–1211.
- Graveley, B. R. (2005): Small molecule control of pre-mRNA splicing. In: *RNA* 11 (3), S. 355–358.
- Griffin, D. E. (2010): Measles virus-induced suppression of immune responses. In: *Immunol. Rev* 236, S. 176–189.

8 Literaturverzeichnis

- Grigoryev, Y. A.; Kurian, S. M.; Nakorchevskiy, A. A.; Burke, J. P.; Campbell, D.; Head, S. R. et al. (2009): Genome-wide analysis of immune activation in human T and B cells reveals distinct classes of alternatively spliced genes. In: *PLoS ONE* 4 (11), S. e7906.
- Ha, K. C.; Coulombe-Huntington, J.; Majewski, J. (2009): Comparison of Affymetrix Gene Array with the Exon Array shows potential application for detection of transcript isoform variation. In: *BMC Genomics* 10, S. 519.
- Han, J.; Ding, J.; Byeon, C. W.; Kim, J. H.; Hertel, K. J.; Jeong, S.; Fu, X. (2011): SR proteins induce alternative exon skipping through their activities on the flanking constitutive exons. In: *Mol. Cell. Biol* 31 (4), S. 793–802.
- Harris, S. J.; Parry, R. V.; Westwick, J.; Ward, S. G. (2008): Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes. In: *J. Biol. Chem* 283 (5), S. 2465–2469.
- Hertel, K. J.; Graveley, B. R. (2005): RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly. In: *Trends Biochem. Sci* 30 (3), S. 115–118.
- Hirsch, R. L.; Griffin, D. E.; Johnson, R. T.; Cooper, S. J.; Lindo Soriano, I. de; Roedenbeck, S.; Vaisberg, A. (1984): Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. In: *Clin. Immunol. Immunopathol* 31 (1), S. 1–12.
- Horejsí, V.; Zhang, W.; Schraven, B. (2004): Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. In: *Nat. Rev. Immunol* 4 (8), S. 603–616.
- Horikami, S. M.; Moyer, S. A. (1995): Structure, transcription, and replication of measles virus. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 191, S. 35–50.
- Janssen, E.; Zhu, M.; Craven, B.; Zhang, W. (2004): Linker for activation of B cells: a functional equivalent of a mutant linker for activation of T cells deficient in phospholipase C-gamma1 binding. In: *J. Immunol* 172 (11), S. 6810–6819.
- Joshi-Tope, G.; Gillespie, M.; Vastrik, I.; D'Eustachio, P.; Schmidt, E.; Bono, B. de et al. (2005): Reactome: a knowledgebase of biological pathways. In: *Nucleic Acids Res* 33 (Database issue), S. D428–32.
- Katsoulidis, E.; Mavrommatis, E.; Woodard, J.; Shields, M. A.; Sassano, A.; Carayol, N. et al. (2010): Role of interferon {alpha} (IFN{alpha})-inducible Schlafen-5 in regulation of anchorage-independent growth and invasion of malignant melanoma cells. In: *J. Biol. Chem* 285 (51), S. 40333–40341.
- Kavanaugh, W. M.; Pot, D. A.; Chin, S. M.; Deuter-Reinhard, M.; Jefferson, A. B.; Norris, F. A. et al. (1996): Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. In: *Curr. Biol* 6 (4), S. 438–445.
- Kim, E.; Goren, A.; Ast, G. (2008): Alternative splicing: current perspectives. In: *Bioessays* 30 (1), S. 38–47.
- Klagge, I. M.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, S. (2000): Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. In: *Eur. J. Immunol* 30 (10), S. 2741–2750.
- Köthe, S. (2012): Masernvirus-Infektion von Dendritischen Zellen und Virus-Transmission an T-Zellen. Dissertation. Universität Würzburg, Würzburg. Virologie & Immunbiologie.
- Kotian, S.; Liyanarachchi, S.; Zelent, A.; Parvin, J. D. (2011): Histone deacetylases 9 and 10 are required for homologous recombination. In: *J. Biol. Chem* 286 (10), S. 7722–7726.
- Liu, B.; Zheng, Y.; Wang, T.; Xu, H.; Xia, L.; Zhang, J. et al. (2012): Proteomic identification of common SCF ubiquitin ligase FBXO6-interacting glycoproteins in three kinds of cells. In: *J. Proteome Res* 11 (3), S. 1773–1781.

8 Literaturverzeichnis

- Liu, Y.; Russell, S. P.; Ayala-Breton, C.; Russell, S. J.; Peng, K. (2014): Ablation of nectin4 binding compromises CD46 usage by a hybrid vesicular stomatitis virus/measles virus. In: *J. Virol* 88 (4), S. 2195–2204.
- Long, J. C.; Caceres, J. F. (2009): The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. In: *Biochem. J* 417 (1), S. 15–27.
- Ludlow, M.; Allen, I.; Schneider-Schaulies, J. (2009): Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers. In: *Thromb. Haemost* 102 (6), S. 1050–1056.
- Ludlow, M.; Lemon, K.; Vries, R. D. de; McQuaid, S.; Millar, E. L.; van Amerongen, G. et al. (2013): Measles virus infection of epithelial cells in the macaque upper respiratory tract is mediated by sub-epithelial immune cells. In: *J. Virol*.
- Lynch, K. W. (2004): Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. In: *Nat. Rev. Immunol* 4 (12), S. 931–940.
- Mallory, M. J.; Jackson, J.; Weber, B.; Chi, A.; Heyd, F.; Lynch, K. W. (2011): Signal- and development-dependent alternative splicing of LEF1 in T cells is controlled by CELF2. In: *Mol. Cell. Biol* 31 (11), S. 2184–2195.
- Mantei, A.; Rutz, S.; Janke, M.; Kirchhoff, D.; Jung, U.; Patzel, V. et al. (2008): siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. In: *Eur. J. Immunol* 38 (9), S. 2616–2625.
- Martinez, N. M.; Lynch, K. W. (2013): Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn. In: *Immunol. Rev* 253 (1), S. 216–236.
- Martinez, N. M.; Pan, Q.; Cole, B. S.; Yarosh, C. A.; Babcock, G. A.; Heyd, F. et al. (2012): Alternative splicing networks regulated by signaling in human T cells. In: *RNA* 18 (5), S. 1029–1040.
- Matlin, A. J.; Clark, F.; Smith, C. W. J. (2005): Understanding alternative splicing: towards a cellular code. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6 (5), S. 386–398.
- Matter, N.; Herrlich, P.; König, H. (2002): Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. In: *Nature* 420 (6916), S. 691–695.
- Mavrommatis, E.; Arslan, A. D.; Sassano, A.; Hua, Y.; Kroczyńska, B.; Plataniotis, L. C. (2013): Expression and regulatory effects of murine schlafen (slfn) genes in malignant melanoma and renal cell carcinoma. In: *J. Biol. Chem* 288 (46), S. 33006–33015.
- McManus, M. T.; Haines, B. B.; Dillon, C. P.; Whitehurst, C. E.; van Parijs, L.; Chen, J.; Sharp, P. A. (2002): Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. In: *J. Immunol* 169 (10), S. 5754–5760.
- Merry, C.; Fu, K.; Wang, J.; Yeh, I.; Zhang, Y. (2010): Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy. In: *Cell Cycle* 9 (2), S. 279–283.
- Modrek, B.; Resch, A.; Grasso, C.; Lee, C. (2001): Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. In: *Nucleic Acids Res* 29 (13), S. 2850–2859.
- Modrow, S.; Falke, D.; Schätzl, H.; Truyen, U. (2010): Molekulare Virologie. Kapitel 15.3. In: *Molekulare Virologie*, S. 284–313.
- Moss, W. J.; Ryon, J. J.; Monze, M.; Griffin, D. E. (2002): Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. In: *J. Infect. Dis* 186 (7), S. 879–887.
- Mühlebach, M. D.; Mateo, M.; Sinn, P. L.; Prüfer, S.; Uhlig, K. M.; Leonard, V. H. J. et al. (2011): Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. In: *Nature*.

8 Literaturverzeichnis

- Müller, N. (2006): Masern Virus Interferenz mit T-Zell-Aktivierung - Einfluss auf Zytoskelettdynamik, Mobilität und Interaktion mit Dendritischen Zellen. Dissertation. Universität Würzburg, Würzburg. Virologie & Immunbiologie.
- Müller, N.; Avota, E.; Schneider-Schaulies, J.; Harms, H.; Krohne, G.; Schneider-Schaulies, S. (2006): Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodeling associated with spreading, polarization, and CD3 clustering. In: *Traffic* 7 (7), S. 849–858.
- Nambiar, M. P.; Enyedy, E. J.; Warke, V. G.; Krishnan, S.; Dennis, G.; Kammer, G. M.; Tsokos, G. C. (2001): Polymorphisms/mutations of TCR-zeta-chain promoter and 3' untranslated region and selective expression of TCR zeta-chain with an alternatively spliced 3' untranslated region in patients with systemic lupus erythematosus. In: *J. Autoimmun* 16 (2), S. 133–142.
- Niewiesk, S.; Eisenhuth, I.; Fooks, A.; Clegg, J. C.; Schnorr, J. J.; Schneider-Schaulies, S.; ter Meulen, V. (1997): Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. In: *J. Virol* 71 (10), S. 7214–7219.
- Noyce, R. S.; Bondre, D. G.; Ha, M. N.; Lin, L.; Sisson, G.; Tsao, M. et al. (2011): Tumor Cell Marker PVRL4 (Nectin 4) Is an Epithelial Cell Receptor for Measles Virus. In: *PLoS Pathog* 7 (8), S. e1002240.
- Nussbaum, O.; Broder, C. C.; Moss, B.; Stern, L. B.; Rozenblatt, S.; Berger, E. A. (1995): Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. In: *J. Virol* 69 (6), S. 3341–3349.
- Okada, H.; Sato, T. A.; Katayama, A.; Higuchi, K.; Shichijo, K.; Tsuchiya, T. et al. (2001): Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. In: *Arch. Virol* 146 (5), S. 859–874.
- Pirquet, C. von (1908): Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. In: *Dtsch med Wochenschr* 34 (30), S. 1297–1300.
- Pozzoli, U.; Sironi, M. (2005): Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. In: *Cell. Mol. Life Sci* 62 (14), S. 1579–1604.
- Purves, W. K.; Markl, J. (2006): Biologie. Kapitel 14. 7. Aufl., [1. Aufl. der dt. Übers.]. München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
- Racaniello, V. (2011): Virology. An exit strategy for measles virus. In: *Science* 334 (6063), S. 1650–1651.
- Richardson, C. J.; Schalm, S. S.; Blenis, J. (2004): PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. In: *Semin. Cell Dev. Biol* 15 (2), S. 147–159.
- Riedel, A.; Mofolo, B.; Avota, E.; Schneider-Schaulies, S.; Meintjes, A.; Mulder, N.; Kneitz, S. (2013): Accumulation of splice variants and transcripts in response to PI3K inhibition in T cells. In: *PLoS ONE* 8 (2), S. e50695.
- Robinson, M. D.; Speed, T. P. (2007): A comparison of Affymetrix gene expression arrays. In: *BMC Bioinformatics* 8, S. 449.
- Rodríguez-Asiain, A.; Ruiz-Babot, G.; Romero, W.; Cubí, R.; Erazo, T.; Biondi, R. M. et al. (2011): Brain specific kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (12), S. 1124–1135.
- Rohrschneider, L. R.; Custodio, J. M.; Anderson, T. A.; Miller, C. P.; Gu, H. (2005): The intron 5/6 promoter region of the ship1 gene regulates expression in stem/progenitor cells of the mouse embryo. In: *Dev. Biol* 283 (2), S. 503–521.
- Rohrschneider, L. R.; Fuller, J. F.; Wolf, I.; Liu, Y.; Lucas, D. M. (2000): Structure, function, and biology of SHIP proteins. In: *Genes Dev* 14 (5), S. 505–520.

8 Literaturverzeichnis

- Rosenberger, G.; Kutsche, K. (2006): AlphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. In: *Eur. J. Cell Biol* 85 (3-4), S. 265–274.
- Salazar, M. A.; Kwiatkowski, A. V.; Pellegrini, L.; Cestra, G.; Butler, M. H.; Rossman, K. L. et al. (2003): Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. In: *J. Biol. Chem* 278 (49), S. 49031–49043.
- Samstag, Y.; Eibert, S. M.; Klemke, M.; Wabnitz, G. H. (2003): Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. In: *J. Leukoc. Biol* 73 (1), S. 30–48.
- Sánchez-Martín, L.; Sánchez-Sánchez, N.; Gutiérrez-López, M. D.; Rojo, A. I.; Vicente-Manzanares, M.; Pérez-Alvarez, M. J. et al. (2004): Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. In: *J. Biol. Chem* 279 (16), S. 16194–16205.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74 (12), S. 5463–5467.
- Sauer, S.; Bruno, L.; Hertweck, A.; Finlay, D.; Leleu, M.; Spivakov, M. et al. (2008): T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (22), S. 7797–7802.
- Schlender, J.; Schnorr, J. J.; Spielhoffer, P.; Cathomen, T.; Cattaneo, R.; Billeter, M. A. et al. (1996): Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (23), S. 13194–13199.
- Schneider-Schaulies, S.; Dittmer, U. (2006): Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. In: *J. Gen. Virol* 87 (Pt 6), S. 1423–1438.
- Schneider-Schaulies, S.; ter Meulen, V. (2009): Measles Virus. Buch - Kap. 22 - Principles & Practice of Clinical Virology Sixth Edition, S. 529–551.
- Scholzen, T.; Gerdes, J. (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *J. Cell. Physiol* 182 (3), S. 311–322.
- Shepard, P. J.; Hertel, K. J. (2009): The SR protein family. In: *Genome Biol* 10 (10), S. 242.
- Shin, C.; Manley, J. L. (2004): Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 5 (9), S. 727–738.
- Shishkova, Y.; Harms, H.; Krohne, G.; Avota, E.; Schneider-Schaulies, S. (2007): Immune synapses formed with measles virus-infected dendritic cells are unstable and fail to sustain T cell activation. In: *Cell. Microbiol* 9 (8), S. 1974–1986.
- Sieling, P. A.; Abrams, J. S.; Yamamura, M.; Salgame, P.; Bloom, B. R.; Rea, T. H.; Modlin, R. L. (1993): Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. In: *J. Immunol* 150 (12), S. 5501–5510.
- Skaar, J. R.; Pagan, J. K.; Pagano, M. (2013): Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 14 (6), S. 369–381.
- So, L.; Fruman, D. A. (2012): PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. In: *Biochem. J* 442 (3), S. 465–481.
- So, T.; Croft, M. (2013): Regulation of PI-3-Kinase and Akt Signaling in T Lymphocytes and Other Cells by TNFR Family Molecules. In: *Front Immunol* 4, S. 139.
- Srivastava, N.; Sudan, R.; Kerr, W. G. (2013): Role of Inositol Poly-Phosphatases and Their Targets in T Cell Biology. In: *Front Immunol* 4, S. 288.

8 Literaturverzeichnis

- Stadler, C.; Rexhepaj, E.; Singan, V. R.; Murphy, R. F.; Pepperkok, R.; Uhlén, M. et al. (2013): Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. In: *Nat. Methods* 10 (4), S. 315–323.
- Suzuki, H.; Osaki, K.; Sano, K.; Alam, A. H. M. K.; Nakamura, Y.; Ishigaki, Y. et al. (2011): Comprehensive analysis of alternative splicing and functionality in neuronal differentiation of P19 cells. In: *PLoS ONE* 6 (2), S. e16880.
- Svojgr, K.; Kalina, T.; Kanderova, V.; Skopcova, T.; Brdicka, T.; Zuna, J. (2012): The adaptor protein NTAL enhances proximal signaling and potentiates corticosteroid-induced apoptosis in T-ALL. In: *Exp. Hematol* 40 (5), S. 379–385.
- Swart, R. L. de; Ludlow, M.; Witte, L. de; Yanagi, Y.; van Amerongen, G.; McQuaid, S. et al. (2007): Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. In: *PLoS Pathog* 3 (11), S. e178.
- Tamashiro, V. G.; Perez, H. H.; Griffin, D. E. (1987): Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. In: *Pediatr. Infect. Dis. J* 6 (5), S. 451–454.
- Twyffels, L.; Gueydan, C.; Kruys, V. (2011): Shuttling SR proteins: more than splicing factors. In: *FEBS J* 278 (18), S. 3246–3255.
- van Haastert, P. J. M.; Devreotes, P. N. (2004): Chemotaxis: signalling the way forward. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 5 (8), S. 626–634.
- Vandesompele, J.; Preter, K. de; Pattyn, F.; Poppe, B.; van Roy, N.; Paepe, A. de; Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome Biol* 3 (7), S. RESEARCH0034.
- Vanhaesebroeck, B.; Guillermet-Guibert, J.; Graupera, M.; Bilanges, B. (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 11 (5), S. 329–341.
- Vastrik, I.; D'Eustachio, P.; Schmidt, E.; Joshi-Tope, G.; Gopinath, G.; Croft, D. et al. (2007): Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. In: *Genome Biol* 8 (3), S. R39.
- Vivanco, I.; Sawyers, C. L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (7), S. 489–501.
- Vlahos, C. J.; Matter, W. F.; Hui, K. Y.; Brown, R. F. (1994): A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). In: *J. Biol. Chem* 269 (7), S. 5241–5248.
- Waal Malefyt, R. de; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G.; Vries, J. E. de (1991 a): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. In: *J. Exp. Med* 174 (5), S. 1209–1220.
- Waal Malefyt, R. de; Haanen, J.; Spits, H.; Roncarolo, M. G.; te Velde, A.; Figdor, C. et al. (1991 b): Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. In: *J. Exp. Med* 174 (4), S. 915–924.
- Wang, M.; Windgassen, D.; Papoutsakis, E. T. (2008): Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation. In: *BMC Genomics* 9, S. 225.
- Ward, B. J.; Johnson, R. T.; Vaisberg, A.; Jauregui, E.; Griffin, D. E. (1991): Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. In: *Clin. Immunol. Immunopathol* 61 (2 Pt 1), S. 236–248.

8 Literaturverzeichnis

- Whistler, T.; Chiang, C.; Lin, J.; Lonergan, W.; Reeves, W. C. (2010 b): The comparison of different pre- and post-analysis filters for determination of exon-level alternative splicing events using Affymetrix arrays. In: *J Biomol Tech* 21 (1), S. 44–53.
- Whistler, T.; Chiang, C.; Lonergan, W.; Hollier, M.; Unger, E. R. (2010 a): Implementation of exon arrays: alternative splicing during T-cell proliferation as determined by whole genome analysis. In: *BMC Genomics* 11, S. 496.
- WHO (2009): Position paper: Measles vaccines. In: *Wkly. Epidemiol. Rec* 84 (35), S. 349–360.
- WHO, Regionalbüro für Europa (2013): RC63 Fact sheet Measles and rubella elimination (Ger).
- Wipf, P.; Halter, R. J. (2005): Chemistry and biology of wortmannin. In: *Org. Biomol. Chem* 3 (11), S. 2053–2061.
- Wolf, I.; Lucas, D. M.; Algate, P. A.; Rohrschneider, L. R. (2000): Cloning of the genomic locus of mouse SH2 containing inositol 5-phosphatase (SHIP) and a novel 110-kDa splice isoform, SHIPdelta. In: *Genomics* 69 (1), S. 104–112.
- Xing, Y.; Kapur, K.; Wong, W. H. (2006): Probe selection and expression index computation of Affymetrix Exon Arrays. In: *PLoS ONE* 1, S. e88.
- Yan, K.; Cao, Q.; Reilly, C. M.; Young, N. L.; Garcia, B. A.; Mishra, N. (2011): Histone deacetylase 9 deficiency protects against effector T cell-mediated systemic autoimmunity. In: *J. Biol. Chem* 286 (33), S. 28833–28843.
- Yanagi, Y.; Takeda, M.; Ohno, S. (2006): Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. In: *J. Gen. Virol* 87 (Pt 10), S. 2767–2779.
- Yang, C.; Kazanietz, M. G. (2007): Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. In: *Biochem. J* 403 (1), S. 1–12.
- Yoshida, R.; Numata, K.; Imoto, S.; Nagasaki, M.; Doi, A.; Ueno, K.; Miyano, S. (2006): A statistical framework for genome-wide discovery of biomarker splice variations with GeneChip Human Exon 1.0 ST Arrays. In: *Genome Inform* 17 (1), S. 88–99.
- Zhang, T.; Li, H.; Cheung, S. M.; Costantini, J. L.; Hou, S.; Al-Alwan, M.; Marshall, A. J. (2009 b): Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation. In: *Immunol. Rev* 232 (1), S. 255–272.
- Zhang, Y.; Brognard, J.; Coughlin, C.; You, Z.; Dolled-Filhart, M.; Aslanian, A. et al. (2009 a): The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. In: *Mol. Cell* 35 (4), S. 442–453.
- Zhu, J.; Mayeda, A.; Krainer, A. R. (2001): Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. In: *Mol. Cell* 8 (6), S. 1351–1361.
- Zhu, M.; Koonpaew, S.; Liu, Y.; Shen, S.; Denning, T.; Dzhagalov, I. et al. (2006): Negative regulation of T cell activation and autoimmunity by the transmembrane adaptor protein LAB. In: *Immunity* 25 (5), S. 757–768.
- Zhu, M.; Liu, Y.; Koonpaew, S.; Granillo, O.; Zhang, W. (2004): Positive and negative regulation of FcepsilonRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL. In: *J. Exp. Med* 200 (8), S. 991–1000.
- Zuckerman, A. J. (2009): Principles and practice of clinical virology. Kapitel 22. 6. Aufl. Chichester, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

9 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	E4-Bindungsprotein
7AAD	7-Aminoactinomycin
Akt	Serin/Threonin Proteinkinase
APC	antigen presenting cell, antigenpräsentierende Zelle
APE 1	Endonuklease 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	Adjusted Trypsin Versene
BCA	Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure
BD	Becton Dickinson
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CCPM	Corrected Counts Per Minute, korrigierte Ereignisse pro Minute
CD	cluster of differentiation
CPE	cytopathic effect, zytopathischer Effekt
(c)cpm	(corrected) counts per minute
Ctrl	control, Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
(m)DC	(mature) dendritic cell, (reife) dendritische Zelle
Dia Erde	Diatomaceaus Earth
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	extracellular matrix, extrazelluläre Matrix
ED	MV-Impfstamm Edmonston
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
FACS	fluorescence-activated cell sorting
F-Aktin	filamentöses Aktin

9 Abkürzungsverzeichnis

FIP	fusionsinhibitorisches Peptid
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
FSC	forward scatter
FW	forward, vorwärts
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GEF	<i>guanosine triphosphate exchange factor</i> , Guanosintriphosphat-Austauschfaktor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GO	Gene Ontology
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	human leucocyte antigen, humane Leukozytenantigene
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	horseradish peroxidase
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
I (I+S)	inhibiert/ stimuliert
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IS	immunologische Synapse
ISE	Intronic Splicing Enhancer
ISS	Intronic Splicing Silencer
l	Liter
LIMMA	Linear Models for Microarray Data
L-Protein	large-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MCP	membrane cofactor protein, CD46
MCS	Multiple Cloning Site, multiple Klonierungsstelle
MFI	mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute

9 Abkürzungsverzeichnis

MLR	mixed lymphocyte reaction
MOI	multiplicity of infection
M-Protein	Matrix-Protein
mTOR	mammalian target of rampamycin
MV	Masernvirus
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ntc	nucleotide(s)/ Nukleotid(e)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PDK1	3-Phosphoinositol-abhängige Kinase 1
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PH	pleckstrin homology
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphat
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
P-Protein	Phospho-Protein
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RE	Restriktionsenzym
REV	reverse, rückwärts
RIN	RNA-integrity number, RNA -Integritätsnummer
(m) RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	stimuliert
SI	splicing index, Spleißindex
SDF-1 α	stromal cell-derived factor 1 α
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SHIP	SH2-containing inositol phosphatase 1
SLAM	signalling lymphocyte activation molecule, CD150
SRE	spleißregulatorische Elemente

9 Abkürzungsverzeichnis

SSC	sideward scatter
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
SUMO	small ubiquitin-like modifier, kleine, ubiquitinähnliche Modifizierungsmoleküle
TCID50	tissue culture infectious dosis 50
TCR	T cell receptor, T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UBC	Ubiquitin C
UV	Ultraviolett
VIM	Institut für Virologie und Immunbiologie
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
WB	Western Blot
WTF	Wildtyp Fleckenstein
YWHAZ	Tyrosin-3-monooxygenase/tryptophan5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
z.B.	zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematischer Aufbau eines Masernviruspartikels	3
Abb. 1.2 Bedeutung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg in der T-Zell-Biologie	7
Abb. 1.3 MV-induzierte Expression von SIP110 in primären T-Zellen	9
Abb. 1.4 Spleißsignale und Spleißmechanismus	10
Abb. 1.5 Verschiedene Spleißmuster für alternatives Spleißen	11
Abb. 1.6 Regulation des alternativen Spleißens	12
Abb. 2.1 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pEGFP-N1	17
Abb. 3.1 Saccharosegradient zur Gewinnung gereinigter Viruspartikel	35
Abb. 3.2 Western Blot zur Abschätzung des Virusmenge des gereinigten Virus	35
Abb. 3.3 System des GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array	36
Abb. 3.4 Bestimmung der RNA-Qualität anhand der RIN	37
Abb. 3.5 Whole Transcript Sense Target Labeling Assay	38
Abb. 3.6 Visualisierungsbeispiel	40
Abb. 4.1 Visualisierung geeigneter Gene auf Exonebene repräsentativ für alternatives Spleißen ...	53
Abb. 4.2 Visualisierung geeigneter Gene auf Exonebene repräsentativ für differentielle Regulation	54
Abb. 4.3 Validierung geeigneter Gene repräsentativ für alternatives Spleißen	56
Abb. 4.4 Validierung geeigneter Gene repräsentativ für differentielle Regulation	57
Abb. 4.5 Validierung der Expression alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene mittels qPCR	58
Abb. 4.6 Reactome-Überblick über Anreicherung von Genen in speziellen Signalwegen	60
Abb. 4.7 KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der alternativ gespleißten Gene in speziellen Signalwegen	61
Abb. 4.8 KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der differentiell regulierten Gene in speziellen Signalwegen	62
Abb. 4.9 Blast2GO-Überblick über die zellulären Komponenten der alternativ gespleißten Gene	64
Abb. 4.10 Blast2GO-Überblick über die zellulären Komponenten der differentiell regulierten Gene	65
Abb. 4.11 Blast2GO-Überblick über biologischen Prozess der alternativ gespleißten Gene	66
Abb. 4.12 Blast2GO-Überblick über biologischen Prozess der differentiell regulierten Gene	67
Abb. 4.13 Blast2GO-Überblick über die molekulare Funktion der alternativ gespleißten Gene	68
Abb. 4.14 Blast2GO-Überblick über die molekulare Funktion der differentiell regulierten Gene	69
Abb. 4.15 Visualisierung selektierter alternativ gespleißter Gene auf Exonebene, geeignet hinsichtlich ihrer Expression und Regulation	70
Abb. 4.16 Repräsentative Beispiele für die Agarosegelelektrophorese der ausgewählten Gene mit den erwarteten Fragmenten	72
Abb. 4.17 Agarosegelelektrophoresebeispiel für ein variierendes Spleißmuster anhand von FAM184A	73
Abb. 4.18 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz der pEGFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen nach 48 h	74
Abb. 4.19 Nachweis der Fusionsprotein im Western Blot	75

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.20 Zellviabilität der HEK-Population	75
Abb. 4.21 Anteil der apoptotischen Zellen an der HEK-Population	76
Abb. 4.22 Proliferationsrate der HEK293T-Population	77
Abb. 4.23 Konfokalmikroskopische Aufnahme der Negativkontrolle und des Leervektors pEGFP ...	77
Abb. 4.24 Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Lokalisierung des Fusionsproteins von pEGFP-FBXO6	78
Abb. 4.25 Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Lokalisierung des Fusionsproteins von pEGFP-SLFN5	78
Abb. 4.26 Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisierung des Fusionsproteins von pEGFP-LAT2	79
Abb. 4.27 Knockdown von SLFN5 in SLFN5-siRNA-transfizierten, primären T-Zellen	80
Abb. 4.28 Anteil der toten und apoptotischen Zellen an der T-Zell-Population	81
Abb. 4.29 Proliferationsfähigkeit der siRNA-transfizierten T-Zell-Population	81
Abb. 4.30 Konfokalmikroskopische Aufnahme primärer T-Zellen auf Fibronektin	82
Abb. 4.31 Absolute und relative Quantifizierung der Polarisierung von T-Zellen nach der Transfektion von SLFN5-siRNA	83
Abb. 4.32 Relative Adhäsion der SLFN5-siRNA-transfizierten T-Zellen	84
Abb. 4.33 Konfokalmikroskopische Aufnahme von T-Zellen nach Stimulation mit CD3/ CD28	85
Abb. 4.34 Absolute und relative Quantifizierung der Polarisierung von T-Zellen durch CD3/ CD28-Stimulation nach der Transfektion von SLFN5-siRNA	85
Abb. 4.35 Regulation der Expression alternativ gespleißter Gene im Virus-inhibierten System	87
Abb. 4.36 Regulation der Expression differentiell regulierter Gene im Virus-inhibierten System	88
Abb. 5.1 Beteiligung alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene an der TCR-Signalkaskade	95
Abb. A1 Validierung zusätzlicher Gene für alternatives Spleißen	X
Abb. A2 Validierung zusätzlicher Gene für differentielle Regulation	XI

11 Tabellen- und Formelverzeichnis

11.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Übersicht charakteristischer Vertreter der Familie der Paramyxoviridae	1
Tab. 2.1 verwendete Zelllinien	16
Tab. 2.2 Primer für die Validierung des Exon Arrays	17
Tab. 2.3 zusätzliche Primer für die Validierung und die Überprüfung der Regulation in Zelllinien	19
Tab. 2.4 Primer für die CDS-Sequenz, der zu klonierenden Gene	21
Tab. 2.5 Primer für die Klonierung in den Expressionsvektor pEGFP-N1	21
Tab. 2.6 Primer für Überprüfung der Regulation ausgewählter Gene im Virus-inhibierten System ..	22
Tab. 2.7 verwendete siRNAs	23
Tab. 2.8 verwendete Antikörper und Farbstoffe	27
Tab. 2.9 verwendete Zytokine und Chemokine	28
Tab. 3.1 Zusammensetzung der Phusion-PCR-Ansätze	43
Tab. 3.2 Verwendete PCR-Programme	43
Tab. 3.3 Verwendete Ansätze für den Restriktionsverdau	44
Tab. 4.1 Ausgewählte alternativ gespleißte Gene für die Validierung	55
Tab. 4.2 Ausgewählte differentiell regulierte Gene für die Validierung	57
Tab. 4.3 Selektion funktionell interessanter alternativ gespleißter und differentiell regulierter Genen	69
Tab. 4.4 Klonierungsinformationen zu den selektierten Genen	71
Tab. 4.5 Regulation zweier alternativ gespleißter Gene im Virus-inhibierten System	86
Tab. 4.6 Regulation zweier differentiell regulierter Gene im Virus-inhibierten System	88
Tab. 4.7 Regulation alternativ gespleißter und differentiell regulierter Gene in verschiedenen T-Zelllinien	89
Tab. A1 Datensatz zur Abb. 4.6: Reactome-Überblick über Anreicherungsdaten in speziellen Signalwegen	XII
Tab. A2 Datensatz zur Abb. 4.7: KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der alternativ gespleißten Gene in speziellen Signalwegen	XIII
Tab. A3 Datensatz zur Abb. 4.8: KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der differentiell regulierten Gene in speziellen Signalwegen	XIII
Tab. A4 Datensatz zur Abb. 4.32: Relative Adhäsion der SLFN5-siRNA-transfizierten T-Zellen	XIII

11.2 Formelverzeichnis

Formel 3.1 Berechnung der Lebendzellzahl	31
Formel 3.2 Formel zur Bestimmung der 50 % Endpunkttitration	34
Formel 3.3 Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID50	34

12 Veröffentlichungen/ Publikationen/ Vorträge/ Poster

12.1 Publikation

Riedel, A.; Mofolo, B.; Avota, E.; Schneider-Schaulies, S.; Meintjes, A.; Mulder, N.; Kneitz, S. (2013): Accumulation of splice variants and transcripts in response to PI3K inhibition in T cells. In: PLoS ONE 8 (2), S. e50695.

12.2 Vorträge

Rein A, Meintjes A, Kneitz S, Mulder N, Schneider-Schaulies S. Accumulation of splice variants and transcripts in response to PI3K inhibition in T cells: potential role of their gene products in cell silencing. 23th Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel, März 06-09, 2013.

4th International Symposium of the International Research Training Group (IRTG) "HIV/AIDS and Associated Infectious Diseases in South Africa". Accumulation of splice variants and transcripts in response to PI3K inhibition in T cells. Stellenbosch (ZA), Februar 21-23, 2013.

Annual Meeting of the International Research Training Group (IRTG) "HIV/AIDS and Associated Infectious Diseases in Southern Africa". Regulated T cell pre-mRNA splicing as genetic marker of T cell suppression. Würzburg, Juni 24-25, 2012.

XXI. Measles Meeting. Regulated T cell pre-mRNA splicing as genetic marker of T cell suppression. Würzburg, September 29 – Oktober 01, 2011.

3rd International Symposium of the International Research Training Group (IRTG) "HIV/AIDS and Associated Infectious Diseases in Southern Africa". Regulated T cell pre-mRNA splicing as genetic marker of T cell suppression. Stellenbosch (ZA), Februar 24-27, 2011.

XX. Measles Meeting. Regulated T cell pre-mRNA splicing as genetic marker of T cell suppression - How we got to the idea. Würzburg, Oktober 07-09, 2010.

2nd International Symposium of the International Research Training Group (IRTG) "HIV/AIDS and Associated Infectious Diseases in Southern Africa". Regulated T cell pre-mRNA splicing as genetic marker of T cell suppression - How we got to the idea. Banz, Mai 14-15, 2010.

12.3 Poster

Rein A, Mofolo B, Meintjes A, Mulder N, Kneitz S, Schneider-Schaulies S (2014). Identification of splice variants in response to PI3K inhibition in T cells using an Exon Array approach and their potential effect on key T cell functions and viability. 24th Annual Meeting of the Society for Virology, Alpbach (A), März 26-29, 2014.

Riedel A, Mofolo B, Meintjes A, Nadj S, Mulder N, Kneitz S, Schneider-Schaulies S (2012). Targets, mechanisms and consequences of regulated T cell pre-mRNA splicing and their relevance as genetic markers of virally induced T cell suppression. Essen, März 14-17, 2012.

International Meeting entitled "HIV and associated infectious diseases" organized by the IRTG 1522 – students. Targets, mechanisms and consequences of regulated T cell pre-mRNA splicing and their relevance as genetic markers of virally induced T cell suppression. Würzburg, Januar 19-20, 2012.

13 Anhang

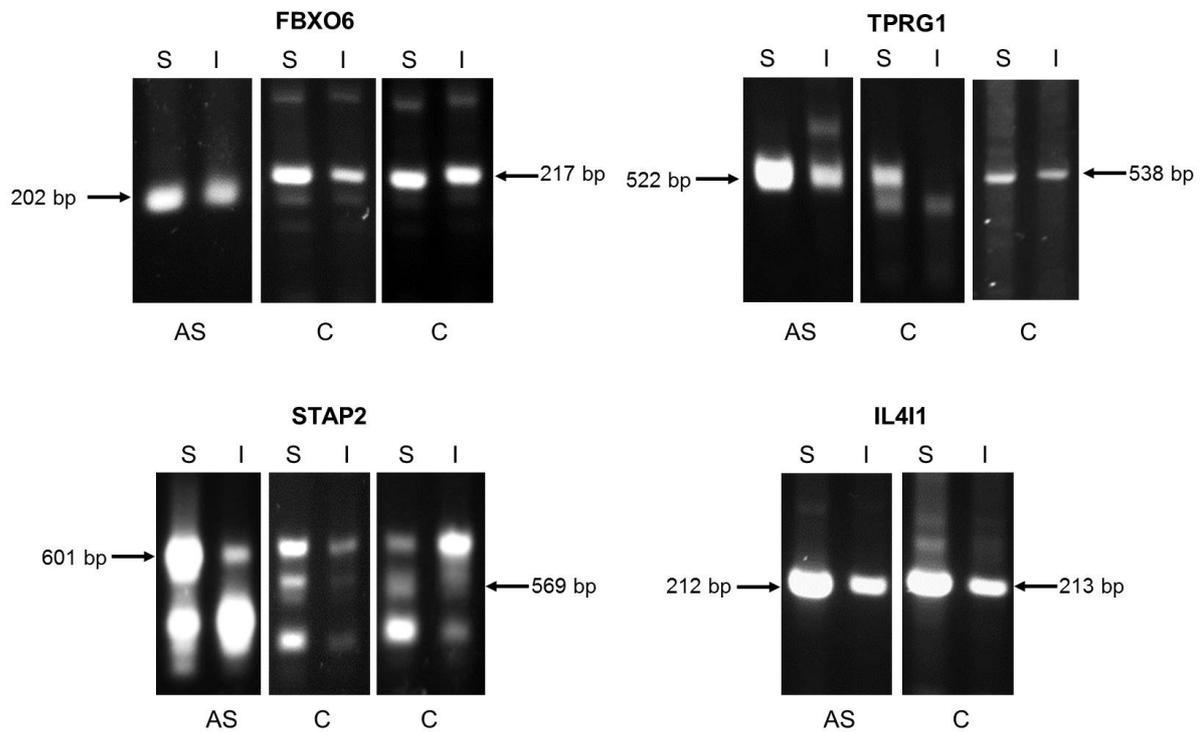


Abb. A1 Validierung zusätzlicher Gene für alternatives Spleißen: vier ausgewählte Gene mit erwarteter Länge des DNA-Fragments (Primerlokalisierung in Abbildung 4.1) S – stimuliert, I – inhibiert/stimuliert, AS – alternativ gespleißter Bereich, C – konstanter Bereich (links - unterschiedliche Expressionsniveaus bzw. mehrere Banden, rechts - gleiches Expressionsniveau).

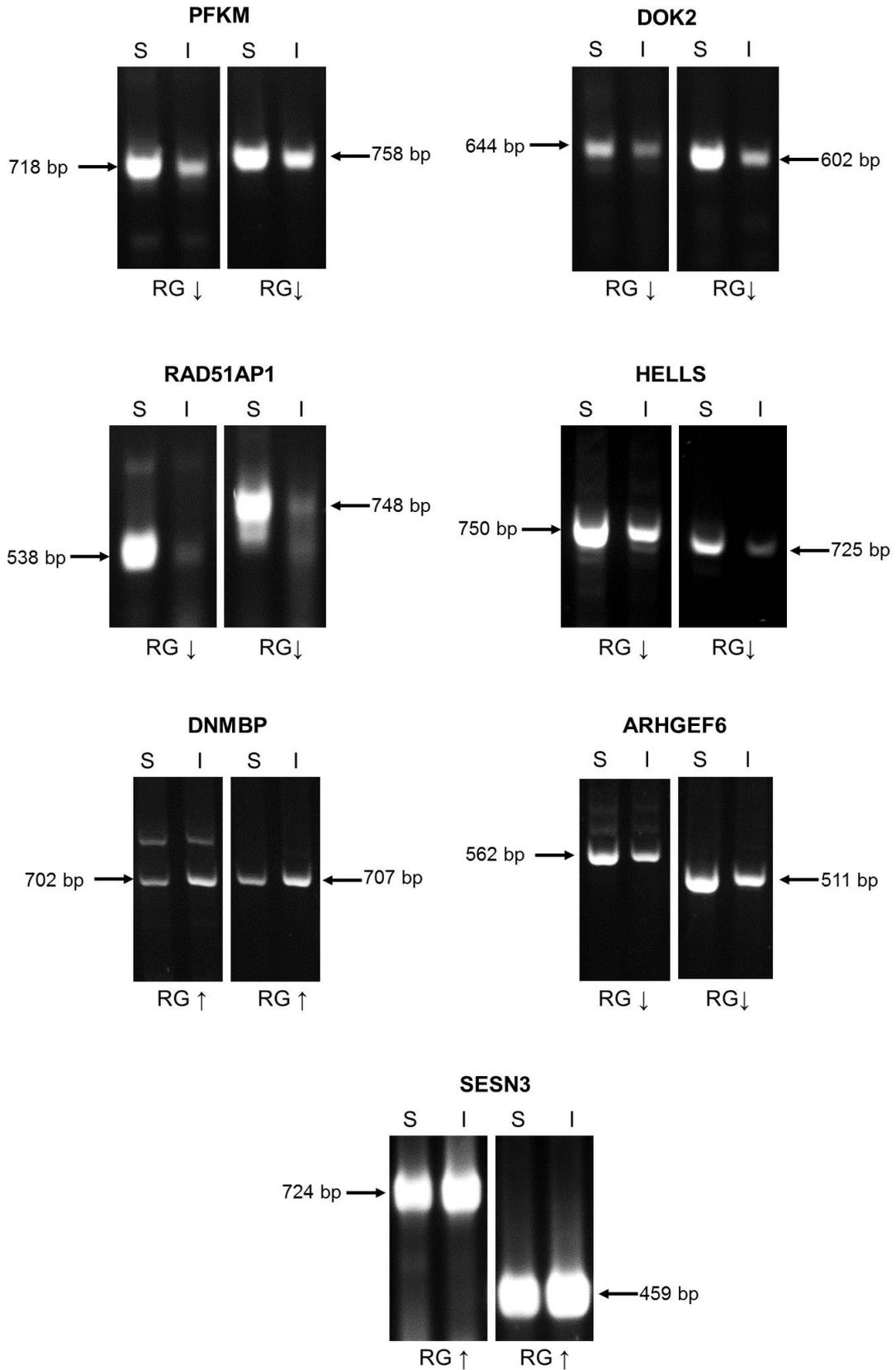


Abb. A2 Validierung zusätzlicher Gene für differentielle Regulation: sieben ausgewählte Gene mit erwarteter Länge des DNA-Fragments (Primerlokalisierung in Abbildung 4.3), S – stimuliert, I – inhibiert/stimuliert, RG – differentiell regulierter Bereich, ↓ – herunterreguliert, ↑ – hochreguliert.

13 Anhang

Tab. A1 Datensatz zur Abb. 4.6: Reactome-Überblick über Anreicherungsdaten in speziellen Signalwegen.

Signalweg	Alternativ gespleißt			Differentiell reguliert		
	totale Anzahl der beteiligten Gene/ Signalweg	Anteil der Gene/ Signalweg [%]	x-fache Veränderung	totale Anzahl der beteiligten Gene/ Signalweg	Anteil der Gene/ Signalweg [%]	x-fache Veränderung
nicht zugeordnet	1368	0	1,1	391	0	2,1
Apoptose	5	3	1,2	2	1	1,8
Bindung/ Aufnahme von Liganden	10	5	0,9	0	0	---
DNA-Reparatur	15	14	0,9	9	8	2,3
DNA-Replikation	8	8	0,9	14	14	2,6
Entwicklungsbiologie	50	13	1,0	6	1	2,5
Extrazelluläre Matrixorganisation	35	17	1,1	4	1	2,0
Genexpression	42	6	0,9	21	3	2,2
Hämostase	52	12	1,0	23	5	2,6
Immunsystem	105	8	1,1	41	3	2,8
Krankheit	68	7	1,0	25	2	2,1
Meiose	10	17	1,0	6	10	1,8
Membrantransport	6	4	0,6	0	0	---
Metabolismus	130	9	0,9	62	4	2,0
Muskelkontraktion	10	19	1,3	1	1	1,8
neuronaes System	36	13	1,1	8	3	2,9
Proteinmetabolismus	31	6	0,9	14	2	2,1
Reproduktion	1	4	0,3	0	0	---
Signaltransduktion	166	9	1,1	51	2	3,0
SUMOylierung	0	0	---	0	0	---
Transmembrantransport kleiner Moleküle	45	9	1,0	22	4	1,9
Zelluläre Stressantwort	1	3	0,9	0	0	---
Zell-Zell-Kommunikation	15	12	1,1	7	5	2,6
Zellzyklus	62	14	0,9	37	8	2,7
zirkadiane Uhr	2	5	0,9	1	2	1,8

Tab. A2 Datensatz zur Abb. 4.7: KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der alternativ gespleißten Gene in speziellen Signalwegen: #Gene – Anzahl der Gene im Signalweg, Ref – Anzahl der Referenzgene in der Kategorie, $n_{\text{beobachtet}}$ – Anzahl der Gene im Genset und in der Kategorie, n_{erwartet} – Anzahl der erwarteten Gene in der Kategorie, Anreicherungsverhältnis, p-Value vom hypergeometrischen Test und adj p-Value – angepasster p-Value.

Signalweg	#Gene	Ref	$n_{\text{beobachtet}}$	n_{erwartet}	Anreicherung	p-Value	adj p-Value
ABC-Transporter	<u>10</u>	44	10	1,91	5,24	1.48e-05	0.0002
Amöbiasis	<u>18</u>	106	18	4,6	3,91	6.94e-07	2.13e-05
ECM-Rezeptor Interaktion	<u>19</u>	85	19	3,69	5,15	3.23e-09	1.98e-07
Erweiterte Kardiomyopathie	<u>16</u>	90	16	3,9	4,1	1.52e-06	4.00e-05
Fokale Adhäsion	<u>26</u>	200	26	8,68	3	6.52e-07	2.13e-05
Metabolische Signalwege	<u>113</u>	1130	113	49,02	2,31	1.86e-16	3.42e-14
NK-Zell vermittelte Zytotoxizität	<u>25</u>	136	25	5,9	4,24	9.35e-10	8.60e-08
Phagosom	<u>21</u>	153	21	6,64	3,16	3.15e-06	6.44e-05
Purinmetabolismus	<u>24</u>	162	24	7,03	3,41	1.53e-07	7.04e-06
Tumorsignalwege	<u>34</u>	326	34	14,14	2,4	2.53e-06	5.82e-05

Tab. A3 Datensatz zur Abb. 4.8: KEGG-Mapper-Überblick über Anreicherungsdaten der differentiell regulierten Gene in speziellen Signalwegen: #Gene – Anzahl der Gene im Signalweg, Ref – Anzahl der Referenzgene in der Kategorie, $n_{\text{beobachtet}}$ – Anzahl der Gene im Genset und in der Kategorie, n_{erwartet} – Anzahl der erwarteten Gene in der Kategorie, Anreicherungsverhältnis, p-Value vom hypergeometrischen Test und adj p-Value – angepasster p-Value.

Signalweg	#Gene	Ref	$n_{\text{beobachtet}}$	n_{erwartet}	Anreicherung	p-Value	adj p-Value
DNA Replikation	<u>8</u>	36	8	0,49	16,44	2.31e-08	7.33e-07
Hämatopoetische Zelllinie	<u>9</u>	88	9	1,19	7,57	3.14e-06	4.98e-05
Jak-STAT-Signalweg	<u>12</u>	155	12	2,1	5,73	1.50e-06	2.72e-05
Metabolische Signalwege	<u>52</u>	1130	52	15,28	3,4	2.44e-14	2.69e-12
Rheumatoide Arthritis	<u>9</u>	91	9	1,23	7,32	4.15e-06	5.86e-05
RNA-Transporter	<u>10</u>	151	10	2,04	4,9	4.31e-05	0.0005
Systemischer Lupus erythematodes	<u>15</u>	136	15	1,84	8,16	5.93e-10	2.51e-08
Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)	<u>12</u>	133	12	1,8	6,67	2.90e-07	7.37e-06
Zellzyklus	<u>11</u>	124	11	1,68	6,56	1.07e-06	2.26e-05
Zytokin-Zytokin-Rezeptor Interaktion	<u>25</u>	265	25	3,58	6,98	4.23e-14	3.42e-14

Tab. A4 Datensatz zur Abb. 4.32: Relative Adhäsion der SLFN5-siRNA-transfizierten T-Zellen: Gesamtzahl der ausgezählten T-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten zur Errechnung der adhärenierten Zellen in Prozent nach der Normalisierung auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle (100%), daraus errechnet der Mittelwert, die Standardabweichung und der zweiseitige, heteroskedastische Studentische t-Test.

Gesamtzellzahl:	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
SLFN5-siRNA 1570ntc	110,67	41,40	20,50
Kontrolle	65,67	22,40	12,25
normalisiert auf Kontrolle:	100 %		
SLFN5-siRNA 1570ntc	168,53 %	184,82 %	167,35 %
Mittelwert	173,57 %		
Standardabweichung	9,77 %		
Studentischer t-Test (2-seitig, heteroskedastisch)	0,0058		

14 Danksagung

Letztendlich möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich während der Doktorarbeit mit Rat und Tat unterstützt haben:

- bei Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Überlassung des interessanten Themas und die Freiheit bei dessen Bearbeitung sowie die Betreuung und das Vertrauen, das sie mir geschenkt hat.
- bei Prof. Dr. Gabriele Pradel für die Bereitschaft, mein Zweitbetreuer zu sein.
- Thanks also to my third supervisor Prof. Dr. Nicola Mulder for taking care of me during my stay at the CBIO laboratory in Cape Town.
- bei Prof. Dr. Axel Rethwilm für die Betreuung über das IRTG 1522.
- bei Prof. Dr. Thomas Hünig für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- bei der Frauenförderung der Universität Würzburg für das Stipendium vom „Programm Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ und der Vectoria Stiftung e.V. für die finanzielle Unterstützung während meines letzten Forschungsjahres.
- bei der DAAD der Universität Würzburg für das Stipendium zur akademischen Aus- und Fortbildung im Ausland während meines Forschungsaufenthaltes in Südafrika.
- bei meiner Kollegin Dr. Elita Avota für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.
- bei Dr. Susanne Kneitz für das Verständnis des verwendeten Algorithmus und die stets guten Ratschläge.
- bei Dr. Jochen Bodem für die Bereitstellung des pEGFP-Leervektors und des Antikörpers gegen EGFP sowie für die sehr guten Ratschläge und Ideen bezüglich des Projekts.
- beim PD Dr. Thomas Kerkau für die Bereitstellung des konjugierten Primäantikörpers Ki67.
- bei der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg für die Bereitstellung der Leukozytendepletionsfilter.
- Thanks to Ayton Meintjes for supporting me with a lot of bioinformatic knowledge during my stay in Cape Town.

14 Danksagung

- Dr. Nora Müller für die Hilfe am konfokalen Mikroskop.
- Margarete Göbel für die Ermittlung der RINs und die Durchführung des Exon Arrays.
- Thanks to Tumi Mofolo for supporting me, but especially for being a good friend and for showing me around during my stay in Cape Town.
- bei Carolin Götz und Rebekka Springel für die tatkräftige, direkte Unterstützung bei meiner Arbeit.
- bei meinen Kollegen Dr. Evelyn Gassert, Dr. Hieu Tran-Van, Dr. Ibrahim Boussaad, Dr. Susanne Köthe, Jonas Hummel, Charlene Börtlein, Belinda Aul, Stefanie Nagj, Sarah Daßen, Nitish Gulve, Julia Miller und Jennifer Kreckel für die tolle Arbeitsatmosphäre, die netten Gespräche und die Unterstützung.
- bei Anne Horn, Eva Gschmack, Maria Bieringer, Christiane Prifert, Sonja Kern für die wunderbare Zeit im Institut.
- Thanks to my colleagues Victoria Nembaware, Jean-Michel Safari and Kenneth Babu at the University of Cape Town for the nice time.
- bei der IRTG-Klasse und den zahlreichen GSLS Freunden für die vielen gemeinsamen Erlebnisse und Erfahrungen.
- bei meiner Freundin Lisa Schwarz für die beständige Freundschaft.
- bei meinen Eltern für den Rückhalt und die Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ziele sowie Justin Brückner, mein Quell der Freude.

Zuletzt, und gleichzeitig allen voran, danke ich meinem Mann für seine unendliche Geduld, seine strenge Kritik, seine zahlreichen Anregungen und seine ausdauernde Ermutigung.

Ich danke Euch allen *von Herzen.*

Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen!

15 Lebenslauf

Angaben zur Person

Nachname, Vornamen **REIN, Alice Felicitas**
geborene Riedel

E-Mail alice.rein@gmx.de

Staatsangehörigkeit Deutsch

Geburtsdatum, -ort 18 Januar 1985, Bayreuth

Familienstand verheiratet

Promotion

Zeitraum 15. März 2010 – 31. März 2014

Graduiertenkolleg Graduate School of Life Sciences-assoziert,
Mitglied des internationalen Graduiertenkollegs IRTG 1522

Name und Art der Bildungs-
oder Ausbildungseinrichtung Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Virologie und Immunbiologie
AG Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies
Versbacher Straße 7, 97078 Würzburg

16 Erklärung der Selbstständigkeit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Identifizierung von durch PI3K-Inhibition induzierten Spleißvarianten in T-Zellen mittels Exon Array und die Effekte funktionell relevanter Gene auf T-Zell-Funktionen und Viabilität“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled “Identification of splice variants in response to PI3K inhibition in T cells using an Exon Array approach and effects of functional relevant genes on key T cell functions and viability” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical or similar form.

Würzburg,

Date

Signature