

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**RNA-Interferenz humaner Natürlicher Killer-Zellen
unter Einführung von siRNA mittels Lipofektion und Elektroporation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Caroline Mourad

aus Osnabrück

Würzburg, Februar 2019

Referent: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Korreferent: Professor Dr. med. Matthias Eyrich

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2019

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Immunsystem	1
1.1.1. Angeborene Immunität	1
1.2. Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen).....	4
1.2.1. Charakterisierung und Funktion	4
1.2.2. Die Rolle von CD56	8
1.2.3. Interaktion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
1.2.4. NK-92-Zelllinie	11
1.3. Allogene Stammzelltransplantation	11
1.4. Infektionen mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
1.4.1. Invasive pulmonale Aspergillose	14
1.4.1.1. Pathogenese und Klinik	14
1.4.1.2. Diagnostik	14
1.4.1.3. Therapie	15
1.5. Transfektion.....	15
1.5.1. Definition und Anwendung	15
1.5.1.1. RNA-Interferenz (RNAi)	16
1.5.2. Verfahren	16
1.5.2.1. Lipofektion	16
1.5.2.2. Elektroporation	17
1.5.2.3. Virale Transfektion	17
1.5.3. Transfektion von NK-Zellen	18
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material.....	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	20

2.1.3.	Reagenzien.....	21
2.1.4.	Zellen.....	22
2.1.5.	Durchflusszytometrie-Antikörper und -Isotypkontrollen.....	22
2.1.6.	Transfektionsreagenzien.....	22
2.1.7.	siRNA.....	22
2.1.8.	Primer.....	23
2.1.9.	Kits.....	23
2.1.10.	Software.....	23
2.2.	Methoden.....	24
2.2.1.	Kultivierung der NK-92-Zelllinie.....	24
2.2.1.1.	Ansetzen des Kulturmediums.....	24
2.2.1.2.	Auftauen der NK-92-Zellkultur.....	24
2.2.1.3.	Zählen der vitalen Zellen.....	25
2.2.1.4.	Zentrifugieren der NK-92-Zellen.....	26
2.2.1.5.	Berechnung und Hinzugabe von Nährmedium und IL-2.....	26
2.2.1.6.	Auswahl des Kulturgefäßes.....	26
2.2.1.7.	Kulturbedingungen.....	27
2.2.1.8.	Ernten der NK-92-Zellen.....	27
2.2.1.9.	Wechsel des Nährmediums und Anlegen von Subkulturen.....	27
2.2.1.10.	Verwerfen der NK-92-Zellkultur.....	27
2.2.2.	NK-Zell-Isolation aus peripheren mononukleären Blutzellen.....	28
2.2.2.1.	Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	28
2.2.2.2.	Magnetische NK-Zell-Isolation.....	30
2.2.3.	Transfektion.....	32
2.2.3.1.	Verwendete siRNA.....	32
2.2.3.2.	Chronologie der durchgeführten Experimente.....	34
2.2.3.3.	Lipofektion.....	35
2.2.3.3.1.	ScreenFect siRNA®.....	35

2.2.3.3.2. HiPerfect Transfection Reagent®	40
2.2.3.3.3. Lipofectamine RNAiMAX®.....	42
2.2.3.4. Elektroporation	44
2.2.4. Analyse der Zelloberflächenmarker-Expression	47
2.2.4.1. Durchflusszytometrie	47
2.2.4.2. Analyse der Oberflächenmarker-Expression von NK-Zellen.....	49
2.2.5. Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene	50
2.2.5.1. RNA-Extraktion	50
2.2.5.2. RNA-Quantifizierung	51
2.2.5.3. cDNA-Umschrieb	52
2.2.5.4. Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	53
2.2.6. Fluoreszenzmikroskopie	55
2.2.7. Statistik	56
3. Ergebnisse	57
3.1. Lipofektion	57
3.1.1. NK-92-Zellen.....	57
Transfektionseffizienz.....	57
CD56-Gen-Knockdown	67
3.1.2. Primäre NK-Zellen.....	71
Transfektionseffizienz.....	71
CD56-Gen-Knockdown	82
3.2. Elektroporation	86
Transfektionseffizienz	86
CD56-Gen-Knockdown	89
4. Diskussion	93
4.1. Transfektionseffizienz und Zellviabilität	93
4.2. CD56-Gen-Knockdown.....	96
4.3. Ausblick.....	97

5. Zusammenfassung	99
6. Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis.....	101
6.1. Literaturverzeichnis.....	101
6.2. Abbildungs-, Formel- und Tabellenverzeichnis	105
6.3. Abkürzungsverzeichnis	107
Danksagung	1
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1. Immunsystem

Das Immunsystem hat die Funktion Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Helminthen abzuwehren. Es teilt sich in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem auf. Beim Eindringen von Pathogenen in den Körper reagiert das angeborene Immunsystem sofort. Es ist jedoch unspezifisch und besitzt kein Gedächtnis. Das adaptive Immunsystem reagiert hingegen langsamer, aber es ist spezifisch und besitzt ein Gedächtnis, sodass die Immunantwort bei einer Reinfektion schneller und stärker ausfällt. Zu den zellulären Bestandteilen des adaptiven Immunsystems zählen B- und T-Zellen und zu den löslichen Komponenten zählen Antikörper, welche von aktivierten B-Zellen gebildet werden. (vgl. [1]). Die Komponenten des angeborenen Immunsystems werden im Kapitel 1.1.1. beschrieben.

1.1.1. Angeborene Immunität

Durch das angeborene Immunsystem werden Pathogene mithilfe von Barrieren, löslichen Faktoren und Zellen abgewehrt.

Zu den Barrieren gehören die Haut, die Lungenschleimhaut und die Schleimhäute des Verdauungstraktes. Diese Epithelien bieten neben ihrer passiven Barrierefunktion auch einen aktiven Schutz. Zum aktiven Schutz gehören die Mucinproduktion, der gerichtete Transport von Pathogenen aus dem Respirationstrakt durch Flimmerepithelien und die Inaktivierung von Pathogenen durch extreme pH-Werte im Verdauungstrakt (vgl. [1]).

Zu den löslichen Faktoren gehören antimikrobielle Peptide, wie Defensine, Cathelicidine und Lysozym. Die antimikrobielle Aktivität richtet sich bei den Defensinen gegen Bakterien, Pilze und Viren und beim Lysozym insbesondere gegen grampositive Bakterien. Cathelicidine inhibieren bakterielle Proteasen und spielen eine Rolle in der Chemotaxis von Leukozyten. Außerdem gehören zu den löslichen Faktoren

Interferone und Akute-Phase-Proteine, wie das C-reaktive Protein (CRP). Interferone werden von infizierten Zellen freigesetzt zur Aktivierung des Schutzes benachbarter Zellen. Das CRP aktiviert Phagozyten und das Komplementsystem durch die Bindung an Pathogene und geschädigte Zellen. Das Komplementsystem kann über drei Wege aktiviert werden: den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Mithilfe des am Ende der drei Wege gebildeten Membranangriffskomplexes (MAC, *membrane attack complex*) können Pathogene direkt lysiert werden. Um eine Lyse körpereigener Zellen zu verhindern, exprimieren diese auf ihrer Oberfläche die Komplementinhibitoren CD46, CD55 und CD59. Weitere Funktionen des Komplementsystems bestehen in der Opsonisierung der Pathogene für die Phagozyten und in der Rekrutierung der Zellen über Chemotaxis zum Ort der Komplementreaktion mit resultierender Auslösung einer Entzündung (vgl. [1]).

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören die aus der myeloiden Zellreihe stammenden Granulozyten, Mastzellen und Monozyten und die aus der lymphoiden Zellreihe stammenden natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen). Im Folgenden wird der Fokus auf die Rolle der Zellen im Rahmen der Immunantwort auf Pathogene gelegt.

Die Granulozyten teilen sich auf in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, wobei die neutrophilen Granulozyten mit über 95% im Blut den größten Anteil ausmachen. Von ihrem Produktionsort, dem Knochenmark, werden sie ins Blut abgegeben, wo sie chemotaktischen Signalen folgend zum Standort des Pathogens gelangen. Dort angekommen, haben sie zwei Aufgaben. Diese bestehen zunächst in der Phagozytose des Pathogens und dann im intrazellulären Abtöten des Pathogens. Hierzu findet im Zellinneren eine Verschmelzung des Phagosoms mit Granula statt, welche mikrobizide Substanzen enthalten. Zudem wird durch die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Inneren des Phagosoms eine direkte Oxidation mikrobieller Proteine bewirkt. Gleichzeitig setzen sie chemotaktische Substanze wie

Interleukin (IL)-8 frei. Die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten beläuft sich auf 2-4 Tage. Nach ihrer Apoptose werden ihre Überreste u.a. von Makrophagen phagozytiert. Alternativ zur Apoptose können neutrophile Granulozyten, nach Auflösung der Chromatinstruktur im Zellkern, ihre DNA aus der Zelle freisetzen. Hieraus und aus den ebenfalls freigesetzten Granula werden extrazellulär netzförmige NET-Strukturen (*neutrophil extracellular traps*, neutrophile extrazelluläre Fallen) gebildet, in denen sich Pathogene verfangen und abgetötet werden. Eosinophile Granulozyten haben die Aufgabe parasitäre Würmer abzuwehren. Da diese nicht phagozytierbar sind, schütten die eosinophilen Granulozyten den mikrobiziden Inhalt ihrer Granula und Sauerstoffradikale in den extrazellulären Raum neben dem Pathogen aus. Deswegen kommt es neben der Schädigung des Pathogens, zusätzlich zur Schädigung körpereigener Zellen. Die Aufgabe der basophilen Granulozyten wird ebenfalls in der Abwehr von parasitären Würmern vermutet, ist aber noch nicht abschließend geklärt. Am Ort der Entzündung können basophile Granulozyten IgE-abhängig Histamin und Leukotriene freisetzen. Sowohl die eosinophilen, als auch die basophilen Granulozyten werden von den Mastzellen an den Ort der Entzündung geführt und stimulieren vor Ort ihrerseits die Mastzellen (vgl. [1]).

Die Mastzellen befinden sich nicht im Blut, sondern im Bereich der Haut und Schleimhäute, den oben beschriebenen Barrieren. Hier wehren sie, ähnlich wie die eosinophilen und basophilen Granulozyten, nicht phagozytierbare große Pathogene ab. Eine Aktivierung der Mastzellen kommt durch die Vernetzung der FcεRI-Rezeptoren zustande. Die Vernetzung entsteht bei Kontakt mit einem passenden Antigen an das an die Rezeptoren gebundene IgE (vgl. [1]).

Nach einer Zirkulationsphase im Blut von 20-30 Stunden, wandern die Monozyten in Organe und Gewebe ein, wo sie zu Makrophagen oder myeloiden dendritischen Zellen reifen. Die Hauptaufgabe der myeloiden dendritischen Zellen besteht in der Antigenpräsentation an T-Zellen mit

daraus resultierender Aktivierung der T-Zellen. Es existieren neben den myeloiden dendritischen Zellen auch plasmazytoide dendritische Zellen, welche aus der lymphatischen Zellreihe abstammen. Die Monozyten und Makrophagen sind in erster Linie, wie die neutrophilen Granulozyten, für die Phagozytose und Lyse von Pathogenen durch die Verschmelzung mit intrazellulären Granula mit mikrobiziden Inhalten und durch die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies zuständig. Zudem produzieren sie u.a. proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL)-6 und Tumornekrose Faktor (TNF)- α , und inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandine und sind für die Beseitigung apoptotischer Zellüberreste zuständig. Auch Monozyten und Makrophagen präsentieren Antigene an T-Zellen, allerdings in nicht so effektiver Weise wie die dendritischen Zellen (vgl. [1]).

Erkannt werden die Pathogene durch die Zellen des angeborenen Immunsystems durch pathogenspezifische molekulare Strukturen (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*), wie Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Nucleinsäuren. Binden die PAMP an ihre entsprechenden Rezeptoren, die PRR (*pathogen recognition receptor*), führt dies zur Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems. Die Art der Aktivierung ist auf das Pathogen zugeschnitten (vgl. [1]).

Die NK-Zellen werden ausführlich im Kapitel 1.2. beschrieben.

1.2. Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)

1.2.1. Charakterisierung und Funktion

Die einzigen Zellen, die aus der lymphoiden Zellreihe stammen und dem angeborenen Immunsystem angehören, sind die natürlichen Killerzellen. Charakteristisch ist die Expression von CD56 (=NCAM, neural cell

adhesion molecule) und die fehlende Expression von CD3 auf ihrer Zelloberfläche. Neben den zuvor genannten besitzen die NK-Zellen auf ihrer Oberfläche weitere Rezeptoren, welche sie sowohl aktivieren als auch inhibieren können.

NK-Zellen teilen sich abhängig von der Dichte der CD56-Rezeptoren und dem Vorhandensein von CD16-Rezeptoren auf der Zelloberfläche in zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Arten auf: CD56^{dim}CD16⁺ und CD56^{bright}CD16⁻ (vgl. [2]).

Im Blut befinden sich CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen, welche sich der unspezifischen Auslösung von Apoptose in Zielzellen widmen und über 90% der NK-Zellen ausmachen. Bei Kontakt mit den

Oberflächenmolekülen einer Zielzelle, wird eine immunologische Synapse ausgebildet, welche definiert wird „als die Kontaktstelle zweier Zellen, von denen mindestens eine zum Immunsystem gehört und bei der es auf einer begrenzten Fläche zur Freisetzung von Proteinen kommt“ [1]. Die immunologische Synapse und eine Voraktivierung der NK-Zelle werden durch die Bindung von

Lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen (LFA)-1, einem Komplex aus CD11a und CD18, auf der NK-Zelle an interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1, -2, -3 und -4 auf der Zielzelle hergestellt. Überwiegen die aktivierenden Signale in dieser Synapse, kommt es zur Aktivierung der NK-Zelle und damit zur Tötung der Zielzelle. Bei einem Überwiegen der inhibierenden Signale wird der Kontakt zur Zielzelle wieder gelöst.

Die MHC(*major histocompatibility complex*)-Klasse-I-Expression auf der Zielzelle spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunreaktion der NK-Zelle. Virusinfizierte und Tumor-Zellen zeigen oft eine verminderte MHC-I-Expression, wodurch sie der Überprüfung des zellulären Inhalts auf virale oder Tumorproteine und einer Vernichtung durch cytotoxische T-Lymphozyten entgehen. Zielzellen mit fehlendem MHC-I-Molekülen (*missing self*) führen innerhalb der immunologischen Synapse zur Aktivierung der NK-Zelle. Die Rezeptoren NKp44 und NKp46 auf NK-

Zellen führen bei der Bindung an beispielsweise virales Hämagglutinin ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zelle. Ein weiterer aktivierender Rezeptor ist CD16. Bindet dieser an spezifische Antikörper, welche ihrerseits an virale oder Tumor-Proteine auf der Zielzelle gebunden sind, kommt es zur antikörpervermittelten Zelltoxizität (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) seitens der NK-Zelle. Die bereits oben erwähnte MHC-Klasse-I-Expression auf der Zielzelle spielt auch bei der Inhibierung der NK-Zelle eine Rolle. Binden die Rezeptoren der KIR(killer cell immunoglobulin-like receptor)-Familie bzw. der CD94/NKG2A-Komplex auf der NK-Zelle an die klassischen antigenpräsentierenden Moleküle HLA-A,-B und -C bzw. HLA-E auf der Zielzelle, dann kommt es zur Inhibierung der NK-Zelle. Dieser Mechanismus dient dem Schutz vor der Zerstörung körpereigener gesunder Zellen. Aus diesem Grund sind nur die NK-Zellen funktionell aktiv, welche mindestens einen spezifischen Rezeptor der KIR-Familie auf ihrer Oberfläche tragen (vgl. [3]).

Die NK-Zelle tötet ihre Zielzelle mithilfe von intrazellulären cytotoxischen Granula, welche auf unterschiedliche Weise Apoptose auslösen. Das Signal zur Degranulierung wird durch ITAM(*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)-Sequenzen in ihrem intrazellulären Teil ausgelöst. Die inhibierenden Rezeptoren enthalten stattdessen ITIM(*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)-Sequenzen. Bei der Degranulierung verschmelzen die Granula mit der Plasmamembran und die enthaltenen cytotoxischen Proteine Perforin, Granzyme, FAS-Ligand (TNF-Rezeptorfamilie) und TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) werden in die immunologische Synapse kontrolliert in Richtung der Zielzelle freigesetzt. Dabei schützt die NK-Zelle sich selbst durch Cathepsin B bzw. Serpin, welche Perforin bzw. Granzyme inaktivieren.

Die CD56^{bright}CD16⁻ NK-Zellen finden sich eher in den lymphatischen Geweben als im Blut. Sie machen im Blut etwa 10% der NK-Zellen aus.

Im Gegensatz zu den CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen weisen sie intrazellulär nur wenige bis gar keine zytotoxischen Granula auf, da sie andere Aufgaben übernehmen als die Auslösung von Apoptose in den Zielzellen. In den lymphatischen Geweben aktivieren sie durch die Freisetzung von u.a. Interferon (IFN)- γ , TNF- α und GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) Makrophagen, dendritische und naive T-Helfer-Zellen und werden wiederum selbst von Makrophagen und dendritischen Zellen aktiviert. Des Weiteren locken sie unreife dendritische und T-Helfer-Zellen mithilfe von Chemokinen wie CCL-3, -4 und -5 an. Somit spielen die NK-Zellen auch eine Rolle in der Einleitung der adaptiven Immunantwort (vgl. [1], [2], [3]).

Es existieren Hinweise darauf, dass CD56^{dim}-NK-Zellen von CD56^{bright}-NK-Zellen abstammen. Einer davon ist, dass die Telomere bei CD56^{dim}-NK-Zellen kürzer sind als bei CD56^{bright}-NK-Zellen. Da bei jeder Replikation Telomersequenzen verloren gehen, korreliert eine kürzere Telomerlänge mit einem höheren Alter der Zelle. Ein weiterer Hinweis ist, dass ältere Menschen höhere Anzahlen von CD56^{dim}-NK-Zellen aufweisen. CD56^{bright}-NK-Zellen sind CD16⁻ und KIR⁻. CD56^{dim}-NK-Zellen sind wiederum KIR⁺ und CD16⁺. Möglich ist eine im reaktiven lymphatischen Gewebe stattfindende Reifung von aktivierten CD56^{bright}-NK-Zellen zu CD56^{dim}-NK-Zellen, welche anschließend in das periphere Blut wandern. Im Rahmen dessen findet eine Erhöhung der Expression von KIR und CD16 und Erniedrigung der Expression von CD56 auf den NK-Zellen statt. Abgesehen hiervon, findet im Rahmen der Reifung auch eine Erniedrigung der Expression von CD62L statt. Eine einzigartige Zwischenstufe ist hier hervorzuheben, nämlich die CD56^{dim} CD62L⁺ KIR⁻-NK-Zellen. Diese weisen eine mittlere Telomerlänge zwischen den CD56^{bright} CD16⁻ KIR⁻ CD62L⁺-NK-Zellen und den CD56^{dim} CD16⁺ KIR⁺ CD62L⁻-NK-Zellen auf und zeigen sowohl die CD56^{dim}-typische Funktion der Apoptoseauslösung, als auch die CD56^{bright}-typische Funktion der Produktion von IFN- γ mit nachfolgender Aktivierung von weiteren Zellen des Immunsystems. 30 Tage nach hämatopoetischer

Stammzelltransplantation, haben die CD56^{bright} als auch größtenteils die CD56^{dim}-NK-Zellen im peripheren Blut des Patienten CD62L exprimiert. Die Zahl von CD56^{dim} CD62L⁺-NK-Zellen nahm kontinuierlich ab, bis sie nach etwa 100 Tagen vergleichbar mit der von gesunden Blutspendern war. Auch diese Erkenntnis könnte ein weiterer Hinweis auf eine Reifung von CD56^{bright}-NK-Zellen zu CD56^{dim}-NK-Zellen über die Zwischenstufe von CD56^{dim} CD62L⁺-NK-Zellen sein (vgl. [4], [5]).

1.2.2. Die Rolle von CD56

CD56, auch als NCAM1 bezeichnet, ist eine 140 kDa-Isoform von NCAM (*neural cell adhesion molecule*) und gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Die genaue Rolle von CD56 für NK-Zellen ist noch nicht geklärt. Eine Notwendigkeit für die cytotoxische Funktion oder für die Antigen-spezifische Interaktion mit den Zielzellen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (vgl. [6]). Aktuellere Untersuchungen zeigen eine Korrelation zwischen der CD56-Expression auf NK-Zellen und der Schnelligkeit und Streckenlänge der Migration der NK-Zellen im Stroma. Hierfür wurde zunächst bei NK92-Zellen und dann bei NK-Zellen eine CRISPR-Cas9-vermittelte Deletion von CD56 vorgenommen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen blieb die Fähigkeit zur Adhäsion im Stroma erhalten, aber die Streckenlänge und Schnelligkeit der Migration der NK-Zellen waren deutlich vermindert. Dies deutet darauf hin, dass eine Expression von CD56 mit einer höheren Streckenlänge und Schnelligkeit der Migration im Stroma verbunden ist. Allerdings zeigten CD56^{dim}-NK-Zellen im Vergleich zu CD56^{bright}-NK-Zellen trotz geringerer CD56-Expression eine schnellere und zielgerichtetere Migration. CD56^{bright}-NK-Zellen zeigten eher multidirektionale Bewegungen und verharren öfter im Stillstand. Vermutlich werden diese Stillstandzeiten zur Bildung einer „developmental synapse“ [7] genutzt, welche eine Rolle in der NK-Zell-Reifung spielen könnte. Zudem konnte mithilfe von fluoreszierenden CD56-Antikörpern eine Akkumulation von CD56 am

Adhäsionsort im Bereich der „developmental synapse“ dargestellt werden (vgl. [7]).

Neue Untersuchungen deuten darauf hin, dass CD56 ein PRR (*pathogen recognition receptor*) für *Aspergillus (A.) fumigatus* ist und eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort gegen den Pilz spielt. Bei der Kokultivierung von NK-Zellen mit lebenden *A. fumigatus*-Keimschläuchen wurde neben einer NK-Zell-Aktivierung durch Hochregulation des CD69-Rezeptors, eine Reduktion der CD56-Fluoreszenz-Positivität der NK-Zellen beobachtet im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen. Potentielle Mechanismen dieser Reduktion wie Apoptoseauslösung, Inhibierung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von CD56 durch Mykotoxine und CD56-Ausscheidung von der Zelloberfläche konnten widerlegt werden. Somit wurde vermutet, dass nach Kontakt mit *A. fumigatus* nicht die Gesamtzahl der CD56-Rezeptoren vermindert war, sondern die Zahl der freien CD56-Rezeptoren. CD56 dient dabei als Erkennungs- und Interaktionsrezeptor für *A. fumigatus* im direkten Kontakt mit diesem. Zeitabhängig wird CD56 im Interaktionsbereich zwischen NK-Zelle und *A. fumigatus* über Aktinfilamente neu angeordnet. Nach 12 Stunden Kokultivierung von NK-Zellen mit *A. fumigatus* zeigte sich die höchste Anzahl und die größte Länge an Interaktionsbereichen und gleichzeitig die stärkste Reduktion der CD56-Fluoreszenz-Positivität der NK-Zellen. Zudem wurde nach Hinzugabe von CD56-blockierenden Antikörpern zu NK-Zell-*A. fumigatus*-Kokulturen eine Reduktion der Pilz-vermittelten NK-Zell-Aktivierung und Zytokinsekretion von CC-Chemokinliganden (CCL) 3, 4 und 5 durch NK-Zellen beobachtet. CCL 3,4 und 5 sind an der Rekrutierung weiterer NK-Zellen und anderer Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen beteiligt. Somit spielt CD56 sowohl eine Rolle in der Erkennung von *A. fumigatus*, als auch in der nachfolgenden Aktivierung der NK-Zelle mit resultierender Zytokinsekretion zur Rekrutierung weiterer Zellen des Immunsystems zu den *A. fumigatus*-Infektionsherden (vgl. [8]).

Es bedarf noch weiterer Untersuchungen um die Rolle von CD56 für die NK-Zellen auch im Hinblick auf andere Zielzellen noch besser zu verstehen.

1.2.3. Interaktion mit *Aspergillus fumigatus*

Wie in Kapitel 1.2.2. beschrieben, spielt CD56 bei direktem Kontakt von NK-Zellen mit *A. fumigatus*-Keimschläuchen eine Rolle als PRR in der frühen Erkennung von *A. fumigatus* und ist auch beteiligt an der Zytokinsekretion von CCL 3, 4 und 5 zur Rekrutierung weiterer Immunzellen zur Pilzbekämpfung. Dass NK-Zellen eine wichtige Rolle in der antifungalen Immunantwort spielen, zeigte sich bereits bei Versuchen mit einem neutropenen Mausmodell mit invasiver Aspergillose, bei dem ein frühes Einführen von NK-Zellen in die Lungen der Mäuse mit einer Zunahme von CCL2 verbunden war. Eine Neutralisierung von CCL2 führte zu einem Stoppen der NK-Zell-Rekrutierung mit konsequenter Erhöhung der Mortalität (vgl. [9]). In einem ähnlichen Modell wurde IFN- γ , welches in der Lunge von NK-Zellen produziert wurde, eine wichtige Rolle zugesprochen in der Triggerung von antifungalen Mechanismen, wie u.a. die Erhöhung der Fähigkeit von Makrophagen die Konidien-Auskeimung zu hemmen (vgl. [10]). IFN- γ spielt wohl auch eine Rolle in der Perforin-vermittelten Zerstörung von Hyphen (aber nicht Konidien), welche nicht in direktem Kontakt mit NK-Zellen stehen. Allerdings ist für eine Ausschüttung von IFN- γ ein vorheriger Kontakt mit *A. fumigatus*-Hyphen zur Aktivierung der NK-Zellen notwendig (vgl. [11], [12]).

A. fumigatus seinerseits reagiert auf den Kontakt mit NK-Zellen mit einer Überexpression von mehreren Stress-bezogenen Pilzgenen wie u.a. heat shock protein (hsp)90 und Alkalinprotease 1, welche wichtig sind für Reparaturmechanismen der Zellwand, für invasives Wachstum und für das Ausweichen vor dem Komplementsystem. In Anwesenheit von *A. fumigatus* wird bei NK-Zellen die Genexpression von IFN- γ und GM-CSF hochreguliert. Die Translation in Proteine findet zwar noch statt, aber *A.*

fumigatus bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation und somit eine verminderte extrazelluläre Verfügbarkeit der Immunmodulatoren. Über diesen Mechanismus übt *A. fumigatus* einen immunsuppressiven Effekt auf NK-Zellen aus (vgl. [13]).

1.2.4. NK-92-Zelllinie

Die NK-92-Zelllinie ist eine humane NK-Zelllinie, welche im Jahre 1992 aus dem peripheren Blut eines 50-jährigen männlichen Patienten mit einem schnell fortschreitendem Non-Hodgkin-Lymphom (großgranulär lymphozytisch) aufgebaut wurde. Das Wachstum der Zelllinie ist Interleukin (IL)-2 abhängig. Wird den Zellen kein rekombinantes IL-2 hinzugefügt, sterben diese innerhalb von 72 Stunden. Typisch ist ein Wachstum in großen Clustern in Suspension. Außerhalb der Cluster befindet sich eine hohe Anzahl an toten Zellen und Zelltrümmern. Eine genaue Anleitung zur Kultur der NK-92-Zelllinie findet sich im Kapitel 2.2.1. Die NK-92-Zellen haben u.a. die folgende Oberflächenexpression: CD34⁻, CD3⁻, CD16⁻, CD2⁺, CD7⁺ und CD56^{bright} (vgl. [14], [15]). Aufgrund ihrer funktionell und phänotypisch ähnlichen Charakterisierung wie aktivierte NK-Zellen eignet sich die NK-92-Zelllinie gut zur Erforschung der NK-Zellbiologie. Zudem macht ihre hohe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen sie interessant für eine adoptive Immuntherapie (vgl. [16]).

1.3. Allogene Stammzelltransplantation

Das Ziel der allogenen Stammzelltransplantation ist die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen eines Familien- oder eines Fremdspenders zur Wiederherstellung der Knochenmarksfunktion.

Indikationen sind u.a. einige Leukämien, Lymphome, myelodysplastische Syndrome und das Multiple Myelom.

Die hämatopoetischen Zellen werden aus Spenderblut (Peripheral Blood Stem Transplant, PBSCT) nach G-CSF-Gabe, aus Spenderknochenmark (Bone Marrow Transplant, BMT) oder Nabelschnurblut (Umbilical Cord Blood Transplant, UCBT) gewonnen.

Bei der Auswahl des Spenders ist die Histokompatibilität entscheidend.

Zunächst findet die so genannte „Konditionierung“ statt. Diese beinhaltet eine intensive Zytostatikatherapie mit nachfolgender hoch dosierter Ganzkörperbestrahlung und hat das Ziel die Leukämie auszulöschen und das Immunsystem zu supprimieren. Anschließend erfolgt die Infusion der Spender-Stammzellen, welche sich in den Knochenmarkräumen des Patienten ansiedeln. Eine Langzeitremission ist durch einen Graft-versus-Leukämie(GVL)-Effekt möglich.

Zu den häufigsten Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation zählen toxische Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie, Infektionen und Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Bei den toxischen Nebenwirkungen wird unterschieden zwischen einer Frühtoxizität mit dem möglichen Auftreten von Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Mukositis, Diarrhoe, hämorrhagischer Zystitis, Kardiomyopathie und hepatischer Venenverschlusskrankheit und einer Spättoxizität mit dem möglichen Auftreten von Gonadeninsuffizienz, Wachstumsstörungen bei Kindern und sekundären Malignomen. Besonders in den ersten 3 Monaten nach Stammzelltransplantation sind die Patienten besonders empfänglich für septische Infektionen mit Bakterien und für interstitielle Pneumonien durch Cytomegalievirus (CMV) und andere opportunistische Erreger, wie beispielsweise *A. fumigatus*. Eine Erholung des Immunsystems findet erst nach etwa einem Jahr statt. Die GvHD wird in eine akute und in eine chronische GvHD unterteilt. Die akute umfasst die ersten 100 Tage nach Stammzelltransplantation. Pathogenetisch liegt dieser eine Schädigung der

3 Organe Haut, Darm und Leber durch alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders zugrunde. Sie wird in 4 Schweregrade eingeteilt. Die chronische GvHD tritt später als 100 Tage auf und imponiert klinisch wie eine Kollagenose mit Beteiligung der Organe Haut, Schleimhaut, Leber, Lunge und Darm. Die Therapie der GvHD besteht in einer verstärkten Immunsuppression, welche ihrerseits wiederum Infektionen begünstigt (vgl. [17]).

Um einer Tumorregression und einer GvHD vorzubeugen, besteht die Möglichkeit, Patienten im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation zusätzlich alloreaktive, reife, KIR⁺ NK-Zellen eines haploidentischen Spenders zu infundieren. Dabei nutzt man die fehlende Inhibierung der NK-Zellen durch die HLA-Klasse I-Moleküle des Patienten um patienteneigene leukämische Blasten und T-Zellen und dendritische Zellen zu töten. Da KIR⁺-NK-Zellen zunächst reifen müssen und erst nach etwa 6-8 Wochen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation auftreten, ist ihr antileukämischer Effekt und ihr anti-GvHD-Effekt verzögert (vgl. [3], [18]).

1.4. Infektionen mit *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus ist ein ubiquitär vorkommender Fadenpilz, welcher 2 bis 4 µm breite septierte Hyphen aufweist. Meist findet er sich auf verrottenden Pflanzen. Zur Infektion kommt es hauptsächlich durch Einatmung der Konidien. In seltenen Fällen stellen die verletzte Haut und Schleimhaut auch mögliche Eintrittspforten dar. Eine Infektion mit *A. fumigatus* kann sich u.a. manifestieren als allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), als Aspergillom, als invasive pulmonale Aspergillose und als extrapulmonale Aspergillose mit Lokalisation z.B. im zentralen Nervensystem, Auge und Herz (vgl. [19], [17]). Auf die invasive pulmonale Aspergillose wird im folgenden Kapitel 1.4.1. näher eingegangen.

1.4.1. Invasive pulmonale Aspergillose

1.4.1.1. Pathogenese und Klinik

Die invasive pulmonale Aspergillose betrifft vor allem immundefiziente Patienten z.B. mit Neutropenie und/oder nach allogener Stammzelltransplantation. Sie beginnt mit der Inhalation der Konidien. Diese können mit einer Größe von 2-3 µm ihren Weg bis in die Alveolen bahnen. *A. fumigatus* wächst sehr gut bei einer Temperatur von 37°C. In gesunden Individuen werden Konidien, welche nicht bereits durch die mukoziliäre Clearance aus der Lunge entfernt wurden, von alveolaren Makrophagen phagozytiert und getötet. Gleichzeitig werden durch die Makrophagen Neutrophile rekrutiert, welche die Hyphen von ausgekeimten Konidien zerstören können. Eine Dysfunktion dieser Schutzmechanismen resultiert in der Entwicklung einer invasiven pulmonalen Aspergillose. Die Hyphen können anschließend über das Endothel in das Lumen von Lungengefäßen hineinwachsen und zu einer hämatogenen Streuung in andere Organe führen. Diese Streuung führt zu Embolien mit nachfolgender Nekroseentwicklung in den versorgenden Gebieten, welche wiederum einen guten Nährboden für das Wachstum von *A. fumigatus* bieten (vgl. [20]).

Klinisch präsentiert sich die invasive pulmonale Aspergillose mit unspezifischen Symptomen wie antibiotikaresistentes Fieber, Husten, Dyspnoe und Schleimbildung. Zusätzlich entwickeln manche Patienten auch Thoraxschmerzen oder Hämoptysen (vgl. [20]).

1.4.1.2. Diagnostik

Als Methoden zur Diagnose einer invasiven pulmonalen Aspergillose dienen die Mikroskopie von Gewebeproben, die Anlage von Pilzkulturen und die serologische Untersuchung auf die *Aspergillus*-Antigene Galactomannan und 1,3-β-D-Glucan. Galactomannan und 1,3-β-D-Glucan sind Polysaccharide, welche als Bestandteile der Zellwand bei *Aspergillus* vorkommen und bei dessen Wachstum

freigesetzt werden. Bei fieberhaften neutropenen Patienten sollte zudem eine hochauflösende Computertomographie des Thorax erfolgen. Außerdem kann eine Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) sinnvoll sein. Eine weitere vielversprechende diagnostische Methode ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Detektion von *Aspergillus*-DNA im Serum und in der durch BAL gewonnenen Flüssigkeit (vgl. [20], [21]).

1.4.1.3. Therapie

Als Erstlinientherapie bei invasiver pulmonaler Aspergillose gilt Voriconazol aus der Gruppe der Triazol-Antimykotika. Bei Unverträglichkeit erfolgt die Therapie mit liposomalen Amphotericin B aus der Gruppe der Polyen-Antimykotika. Bei Therapieversagen werden als Zweitlinientherapie Posaconazol (Triazol-Antimykotikum) oder Caspofungin (Echinocandin-Antimykotikum) angewandt (vgl. [22]).

Ein möglicher vielversprechender Ansatz für die Prophylaxe und Therapie von invasiven Pilzkrankungen bei immunsupprimierten Patienten wie allogenen Stammzelltherapie-Empfängern wäre ein adoptiver NK-Zell-Transfer (vgl. [23]).

1.5. Transfektion

1.5.1. Definition und Anwendung

Die Transfektion stellt eine Methode dar zur Einführung fremder Nukleinsäuren in eine Zelle mit dem Ziel genetisch modifizierte Zellen herzustellen. Mittels Transfektion ist es möglich die Genfunktion und -regulation und die Proteinfunktion in Zellen zu analysieren und mit diesem Wissen u.a. Erkrankungen zu verhindern, zu heilen oder

zumindest die Symptome der Erkrankungen zu lindern. Als Nucleinsäuren werden sowohl DNA als auch RNA verwendet. Zum Knockdown bzw. Knockout bestimmter Zielgene wird beispielsweise siRNA (*small interfering ribonucleic acid*) verwendet; s. Kapitel 1.5.1.1.

Es wird zwischen einer stabilen und einer transienten Transfektion unterschieden. Bei der stabilen Transfektion wird das genetische Material in das Wirtgenom integriert und die transgene Expression wird auch nach Zellreplikation aufrechterhalten. Bei der transienten Transfektion wird das eingeführte genetische Material nur temporär exprimiert. Es wird nicht in das Wirtgenom integriert und geht u.a. durch Zellteilung verloren.

Es existieren verschiedene biologische, chemische und physikalische Methoden der Transfektion. Ideal ist eine Methode, die eine hohe Transfektionseffizienz bei gleichzeitig geringer Zelltoxizität erreicht, die einfach anzuwenden und die reproduzierbar ist (vgl. [24]).

1.5.1.1. RNA-Interferenz (RNAi)

Mithilfe der RNA-Interferenz, auch RNAi genannt, ist es möglich die Expression bestimmter Gene in Zellen herunter zu regulieren und die daraus resultierenden Phänotypveränderungen zu beobachten. Hierfür bildet die eingeführte siRNA einen RISC (RNA-induced silencing complex), welcher die Expression des Zielgens inhibiert durch Abbau der Ziel-messenger RNA (mRNA) (vgl. [24]).

1.5.2. Verfahren

1.5.2.1. Lipofektion

Bei der Lipofektion, welche eine chemischen Transfektion darstellt, werden positiv geladene Fette verwendet. Diese umhüllen die negativ geladenen Nucleinsäuren und bilden somit einen Komplex. Die positiv geladenen Nucleinsäure-Chemikalien-Komplexe werden von der negativ geladenen Zellmembran angezogen. Der exakte Mechanismus, wie die Komplexe die Membran durchwandern ist bisher unbekannt. Vermutet werden Mechanismen wie Endozytose

oder Phagozytose. Genauso unbekannt ist bisher der Translokationsmechanismus der transfizierten DNA in den Nukleus. Die Transfektionseffizienz ist bei der chemischen Transfektion stark abhängig von Faktoren wie dem Nukleinsäuren-Chemikalien-Verhältnis, dem pH der Nährlösung, dem Zelltyp und den Zellmembranverhältnissen. Diese Transfektionsmethode hat eine geringere Effizienz als die biologische Methode. Vorteile der chemischen Methode sind die geringe Toxizität, die fehlende Mutagenese und die fehlende Größenlimitierung der Nukleinsäure (vgl. [24]).

1.5.2.2. Elektroporation

Die Elektroporation zählt mit weiteren Methoden wie die Mikroinjektion und die Laser-basierte Transfektion zu den physikalischen Methoden. Der exakte Mechanismus bei der Elektroporation ist noch unbekannt. Angenommen wird, dass kurze elektrische Impulse die Integrität der Zellmembran stören und Löcher in ihr erzeugen, durch welche die Nukleinsäuren passieren können. Die Elektroporation stellt eine schnelle und einfache Methode dar, mit der große Zellzahlen in kurzer Zeit transfiziert werden können, sobald die optimalen Elektroporationsbedingungen definiert worden sind (vgl. [24]).

1.5.2.3. Virale Transfektion

Die Virus-vermittelte Transfektion, auch als Transduktion bekannt, gehört zu den biologischen Methoden. Vorteile sind eine hohe Effizienz und die Einfachheit eine nachhaltige transgene Expression zu erreichen dank der natürlichen viralen Eigenschaft, sich in das Wirtsgenom zu integrieren. Nachteile sind die Immunogenität, die Zytotoxizität und der fehlende Einfluss auf die Lokalisation der Integration ins Genom. Dies kann zu Mutationen führen, welche möglicherweise essentielle Gene unterbrechen, Tumorsuppressor-Gene stören oder Onkogene aktivieren können. Zudem haben die

Viruspakete nur einen limitierten Platz für fremdes Genmaterial, wenn sie ihre Infektiosität bewahren sollen (vgl. [24]).

1.5.3. Transfektion von NK-Zellen

NK-Zellen gelten als schwer transfizierbar im Vergleich zu anderen Zellen. Dennoch ist es gelungen sie mit unterschiedlichen Verfahren zu transfizieren.

Im Jahre 1998 wurde erstmals berichtet von einer erfolgreichen retroviralen Transduktion von NK-92-Zellen mit einem Murinen Leukämievirus (MuLV)-basierten Vektor, der humanes IL-2 exprimiert (vgl. [25]). NK-92-Zellen wurden auch mit short hairpin (sh)RNA enthaltenden retroviralen Vektoren mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® (Invitrogen) erfolgreich transfiziert (vgl. [26]).

Primäre NK-Zellen wurden bereits erfolgreich mit microRNA per Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz HiPerfect® (Qiagen) transfiziert (vgl. [27]). Zudem konnten primäre NK-Zellen erfolgreich per Transduktion transfiziert werden mit einem RD-114-Retrovirus, der einen für das Gangliosid GD2 spezifischen Antigenrezeptor codiert. Die Transfektionseffizienz lag dabei bei über 90% (vgl. [28]). Auch per Elektroporation konnten primäre NK-Zellen erfolgreich mit mRNA transfiziert werden mit dem Elektroporationsprotokoll NK2-OC des MaxCyte® GT transfection system mit einer Transfektionseffizienz von etwa 100%. Die Zellviabilität war dabei nicht vermindert, einzig eine leichte Reduktion der Proliferationskapazität der NK-Zellen wurde beobachtet (vgl. [29]). Ebenfalls per Elektroporation wurden primäre NK-Zellen erfolgreich mit siRNA transfiziert mit dem Elektroporationsprogramm X-01 des Amaxa Nucleofector™ 2b device (vgl. [30]).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

NK-Zellen spielen eine entscheidende Rolle sowohl in der angeborenen Immunantwort als auch in der Auslösung der angeborenen Immunantwort bei der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen und Tumoren.

Das Ziel dieser Arbeit ist eine einfache Transfektionsmethode zu finden, mit der NK-Zellen erfolgreich mit siRNA transfiziert werden können mit dem Resultat einer hohen Transfektionseffizienz bei gleichzeitig hoher Zellviabilität. Angewandt wurden in dieser Arbeit die Lipofektion und die Elektroporation als Transfektionsmethoden. Als genetisches Material wurde siRNA ausgewählt, mit welcher eine RNA-Interferenz mit resultierender Herunterregulation der Expression ausgesuchter Gene in NK-Zellen erreicht werden kann.

Mit der erfolgreichen Herunterregulation der Expression ausgesuchter Gene in NK-Zellen eröffnen sich neue Möglichkeiten, die genaue Funktion der NK-Zellen besonders im Hinblick auf ihre Rolle in der Interaktion mit Tumoren und Pathogenen wie dem opportunistischen Pilz *A. fumigatus* zu untersuchen. Hieraus könnten sich neue Ansätze zur Prävention und Therapie der invasiven Aspergillose entwickeln, welche vor allem bei immunsupprimierten Patienten auftritt.

Gelingt die transiente Herunterregulation der Expression ausgesuchter Gene, kann als nächster Schritt eine stabile Transfektion versucht werden.

Weitere interessante Ansätze der Transfektion sind beispielsweise die genetische Manipulation von NK-Zellen durch Expression von chimären Antigen-Rezeptoren (CAR), durch welche sie Tumorzellen noch gezielter erkennen und angreifen können. Diese NK-Zellen können den Patienten mittels adoptivem Zelltransfer zugeführt werden im Rahmen einer Tumor-Immuntherapie (vgl. [31], [32]).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
4D-Nucleofector™ System	Lonza
CO ₂ -Inkubator HERAcCell® 240	Thermo Fisher Scientific
DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR	Biosan
FACSCalibur	BD
Fluoreszenzmikroskop AxioCam IC	Zeiss
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Heraeus
Inkubationsschüttler Minitron	Infors
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Magnethalter QuadroMACS	Miltenyi Biotec
Manueller Zellzähler	Hartenstein
Mastercycler	Eppendorf
Mikroskop TS100 Eclipse	Nikon
Pipetten Eppendorf Reference ®10,20,100,1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand
Sicherheitswerkbank HERAsafe® KS18	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkbank MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab
StepOnePlus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
Stickstofftank Cryostorage System 10K	Taylor-Wharton Cryogenics
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR
Tischzentrifuge Microcentrifuge 5415R	Eppendorf
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
10 ml Spritze	BD
10 und 100 µl Filter Tip	Sarstedt
1000 µl Filter Tip	StarLab
6-, 12- und 24-Well-Zellkulturplatten	Corning Inc. LifeSciences
8-Well Zellkulturkammer auf Glasobjektträger	Sarstedt
96-Well Multiply Fast PCR-Platte	Sarstedt
96-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One

CellStar® Centrifuge Tubes 15 und 50 ml	Greiner Bio-One
CellStar® Serologische Pipetten 2, 10 und 25 ml	Greiner Bio-One
CellStar® Zellkulturflasche 75 cm²	Greiner Bio-One
Cryotube™ Vials 1.0 ml	Thermo Fisher Scientific
FACS-Röhrchen Falcon Round Bottom Tubes 5ml	BD
Filtrationssäule MACS LS Column	Miltenyi Biotec
Kanüle Hypodermic Needle-Pro® 20 G	Braun
Klebefolie 96-well-Format	Sarstedt
Pasteur Plastikpipetten 3 ml	Hartenstein
PCR single Cap 8er-soft strips 0,2 ml	Biozym Scientific
Pipettenspitzen für 10 µl Pipette ohne Filter	Sarstedt
Pipettenspitzen für 100 und 1000 µl Pipette ohne Filter	StarLab
Safe-Lock Tubes 1,5 und 2 ml	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

2.1.3. Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua destilliert 1000 ml	Braun
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH
DMSO	Carl Roth
EDTA acid disodium salt solution	Sigma-Aldrich
FACS Clean Solution	BD
FACS Flow Sheath Fluid	BD
FACS Rinse Solution	BD
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Horse Serum	Thermo Fisher Scientific
Human IL-2 IS research grade	Miltenyi Biotec
iTaq Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad
L-Glutamine	Sigma-Aldrich
MACS Buffer	Miltenyi Biotec
MEM alpha Medium	Thermo Fisher Scientific
NaOH	Sigma-Aldrich
OPTI-MEM® I (1x) Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific
Proleukin S (IL-2)	Novartis
Refobacin® (Gentamicinsulfat) 80 mg	Merck
RNAprotect Cell Reagent	Qiagen
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich

2.1.4. Zellen

Bezeichnung	Hersteller
PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus Leukocyte Reduction Chambers (LRCs) Zelllinie NK-92 (ATCC 488)	Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Würzburg DSMZ

2.1.5. Durchflusszytometrie-Antikörper und -Isotypkontrollen

Bezeichnung	Hersteller
anti-CD2 APC IgG1	Biolegend
anti-IgG1 APC	BioLegend
anti-CD3 perCP IgG1	BD
anti-IgG1 perCP	BD
anti-CD56 FITC IgG1	BD
anti-IgG1 FITC	BD
anti-CD69 APC IgG1	Miltenyi Biotec
anti-IgG1 APC	Miltenyi Biotec
anti-CD7 FITC IgG1	BioLegend
anti-IgG1 FITC	BioLegend
anti-Nkp30 PE IgG1	Miltenyi Biotec
anti-IgG1 PE	Miltenyi Biotec
anti-NKp46 PE IgG1	BD
anti-IgG1 PE	BD

2.1.6. Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
HiPerfect®	Qiagen
Lipofectamine RNAiMAX®	Thermo Fisher Scientific
ScreenFect siRNA®	InCella

2.1.7. siRNA

Bezeichnung	Hersteller
Allstars Negative Control siRNA	Qiagen
Allstars Negative siRNA AF 488	Qiagen
NCAM1 Gene Solution siRNA (Cat. No. 1027415)	Qiagen
NCAM1 Gene Solution siRNA (Cat. No. 1027416)	Qiagen

2.1.8. Primer

Bezeichnung	Sequenz
ALAS 1	fw: GGCAGCACAGATGAATCAGA
	rv: CCTCCATCGGTTTTCACT
CD56	fw: GAACGACGAGGCTGAGTACA
	rv: ACGAAGCCTTTTCTTCGCTG

2.1.9. Kits

Bezeichnung	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec
P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit	Lonza
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

2.1.10. Software

Bezeichnung	Hersteller
CellquestPro	BD
Fiji	Image J
FlowJo	Tree Star Inc.
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
NanoDrop 3.1.0	Peqlab
StepOne Software v2.2.2	Applied Biosystems
Zen 2 lite	Zeiss

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der NK-92-Zelllinie

Zunächst wurden die Experimente mit der NK-92-Zelllinie durchgeführt, da die NK-92-Zellen schon eine Woche nach Beginn der Kultivierung zahlreich und ohne viel Aufwand zur Verfügung standen.

2.2.1.1. Ansetzen des Kulturmediums

Das Kulturmedium „ α MEM complete ohne IL-2“ wurde nach dem folgenden Schema in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorbereitet und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kulturmediums für NK-92-Zellen

Gesamtvolumen des Kulturmediums „ α MEM complete ohne IL-2“		10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
Zusammensetzung aus	MEM alpha Medium	7,5 ml	15 ml	22,5 ml	30 ml	37,5 ml
	FCS	1,25 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6,25 ml
	Horse Serum	1,25 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6,25 ml
	L-Glutamine	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml
IL-2-Zugabe (bereits 1:10 verdünnt):		0,5 μ l IL-2 pro 1 ml Gesamtvolumen der Zell-Kulturmedium-Suspension				

Vor dem Gebrauch des Kulturmediums wurde dieses für 10 min in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt.

Die IL-2-Zugabe zur Zell-Kulturmedium-Suspension erfolgte stets kurz vor dem Aussäen der Zellen.

2.2.1.2. Auftauen der NK-92-Zellkultur

Die NK-92-Zellkultur wurde in gefrorenem Zustand erworben und im -184 °C Stickstofftank gelagert. Beim Anlegen der Subkulturen wurden regelmäßig Zellen aus verschiedenen Passagen eingefroren.

Hierzu haben u.a. Zellen aus den Passagen 3 und 5 gehört. Diese wurden bei den Versuchen verwendet.

Zum Auftauen der NK-92-Zellen wurden die Kryoröhrchen zunächst für 1 min in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend wurden die darin enthaltenen Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml 37 °C warmem MEM alpha Medium geerntet. Das Röhrchen wurde 5 min lang mit 200 g und accel/decel (Beschleunigen/Abbremsen) =3 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 5 ml 37 °C warmem MEM alpha Medium resuspendiert. Dann wurden die vitalen Zellen gezählt.

2.2.1.3. Zählen der vitalen Zellen

In einer 96-Well-Platte wurden jeweils 10 µl Trypanblau und 10 µl der Zellsuspension vermischt (1:2-Verdünnung). Hiervon wurden wiederum 10 µl in eine mit Deckglas bedeckte Neubauer improved Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der nur die Membran von abgestorbenen Zellen passiert, im Zytoplasma an Proteine bindet und die Zelle dunkelblau anfärbt. Lichtmikroskopisch kann man diese gut abgrenzen von den lebenden hell leuchtenden Zellen (vgl. [33]). So wurden die vitalen Zellen in den vier Leukozytenfeldern der Zählkammer gezählt und hieraus ein Mittelwert (MW) ermittelt (Formel 1). Anschließend wurde die Gesamtzahl der vitalen Zellen mit der folgenden Formel ermittelt:

Formel 1: Gesamtzahl der vitalen Zellen

Gesamtzellzahl = MW [Zellen] * 10⁴ * Gesamtvolumen [in ml] * Verdünnung

MW Mittelwert

2.2.1.4. Zentrifugieren der NK-92-Zellen

Die NK-92-Zellen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen 5 min lang mit 200 g und accel/decel (Beschleunigen/Abbremsen) =3 zentrifugiert.

2.2.1.5. Berechnung und Hinzugabe von Nährmedium und IL-2

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml ausgesät und in einer Konzentration von $0,4 - 0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml weiterkultiviert (je nach den Zeitabständen zwischen dem Anlegen von Subkulturen; Formel 2 und 3).

Formel 2: Berechnung des Nährmediumvolumens

$$\text{Nährmediumvolumen [ml]} = \text{Gesamtzellzahl} * \left[\frac{\text{ml}}{0,5 * 10^6 \text{ Zellen}} \right]$$

Nährmediumvolumen \triangleq Volumen von „ α MEM-complete ohne IL-2“

Formel 3: Berechnung des IL-2-Volumens

$$\text{IL-2-Volumen } [\mu\text{l}] = [0,5 \mu\text{l} * \text{Nährmediumvolumen [ml]}]$$

Nährmediumvolumen \triangleq Volumen von „ α MEM-complete ohne IL-2“; s. Formel 2

2.2.1.6. Auswahl des Kulturgefäßes

Zu Beginn, nach dem Auftauen der Zellen, wurden die NK-92-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Nach Erreichen einer Gesamtzellzahl von mindestens $6 \cdot 10^6$ Zellen wurden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen weiterkultiviert.

2.2.1.7. Kulturbedingungen

Die NK-92-Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.1.8. Ernten der NK-92-Zellen

Die NK-92-Zellen wurden aus den Zellkulturplatten und -flaschen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geerntet. Die geleerten wells der Zellkulturplatten und die geleerten Zellkulturflaschen wurden jeweils mit HBSS mit 1 ml/ well bzw. 10 ml/ Flasche gespült. Auch diese Spüllösung wurde ins Zentrifugenröhrchen pipettiert. So wurde eine möglichst große Zahl an Zellen geerntet.

2.2.1.9. Wechsel des Nährmediums und Anlegen von Subkulturen

Anfangs, nach dem Auftauen der Zellen, wurde das Nährmedium täglich gewechselt (eine Woche lang) und das Volumen angepasst an die neue Gesamtzellzahl. Nach einer Woche verdoppelte sich die Gesamtzellzahl ungefähr alle 48 h. Bei größer werdender Kultur wurde diese auf die Ausgangskonzentration verdünnt bzw. es wurden Subkulturen angelegt. D.h., dass ein Teil der Kultur mit einer neuen Passage stets weiterkultiviert wurde und der Rest der Kultur für Versuche genutzt oder verworfen wurde.

2.2.1.10. Verwerfen der NK-92-Zellkultur

Sobald eine höhere Passage (ab Passage 20) von der NK-92-Zellkultur erreicht wurde, wurde diese verworfen und es wurde eine neue NK-92-Zellkultur aufgetaut.

2.2.2. NK-Zell-Isolation aus peripheren mononukleären Blutzellen

2.2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Als Vergleich zu einer Zelllinie wurden ebenfalls primäre Zellen zur Analyse herangezogen.

Die verwendeten NK-Zellen wurden aus humanen peripheren mononukleären Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) isoliert. Diese wiederum wurden aus Leukozytenreduktionskammern gewonnen, welche bei der Aufbereitung von leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentraten im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg als Nebenprodukt entstanden sind. Die Verwendung dieses Nebenprodukts aus den Thrombozytenspenden gesunder Freiwilliger wurde durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Würzburg genehmigt (#302/15). Die schriftliche Einwilligung wurde eingeholt und die Datenanalyse wurde anonymisiert durchgeführt.

Zunächst wurden der Puffer und das Kulturmedium für die isolierten primären NK-Zellen vorbereitet. Für den Puffer wurden 5 ml inaktiviertes FCS und 2 ml EDTA zu 500 ml HBSS hinzu pipettiert. Für das Kulturmedium wurden 60 mg Refobacin zu einer 500 ml RPMI 1640 Medium hinzu pipettiert. Hiervon wurden 45 ml entnommen und mit 5 ml FCS in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vermischt.

Anschließend erfolgte die Isolierung der PBMCs aus dem in den Leukozytenreduktionskammern enthaltenen Blut mit der Trennlösung Biocoll mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde die Leukozytenreduktionskammer auf ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gesetzt und das herausgetropfte Vollblut wurde auf 50 ml mit Puffer verdünnt. Je 25 ml dieser Vollblutpufferlösung wurden vorsichtig über je 20 ml Biocoll in zwei neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Dann wurden beide Zentrifugenröhrchen für 20 min bei 2000 rpm und

accel/decel=1 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich eine spezifische Schichtung (s. Abb. 1). Biocoll besteht aus einem Polymer namens Polysucrose und weist eine Dichte von 1,077 g/ml auf (vgl. [34]). Erythrozyten und Eosinophile bilden die unterste Schicht, da sie eine höhere Dichte als Biocoll haben. Darauf folgen die Neutrophile, welche auch eine höhere Dichte als Biocoll haben aber eine niedrigere als Erythrozyten und Eosinophile. Oberhalb des Biocolls befinden sich Lymphozyten, Basophile und Monozyten, welche eine geringere Dichte als Biocoll haben. Die oberste Schicht bilden Thrombozyten und Plasma.

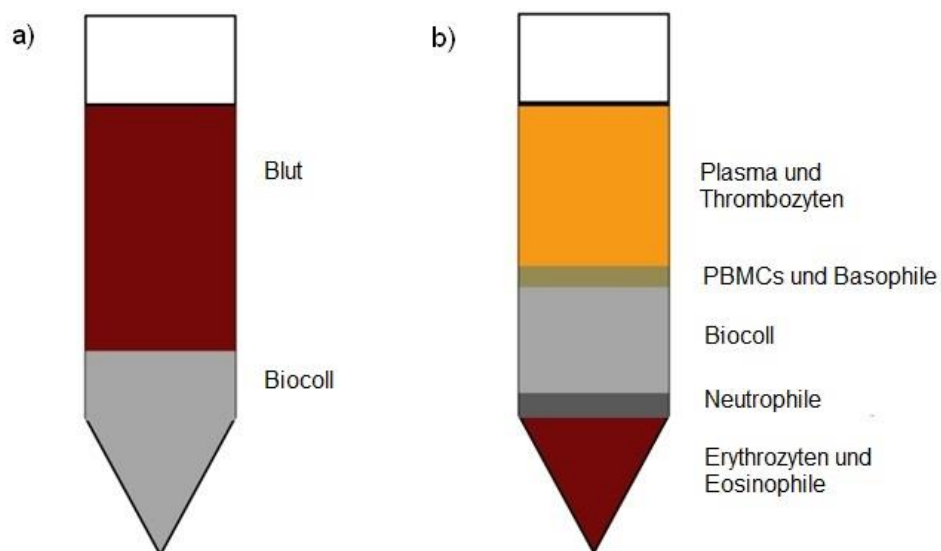


Abbildung 1: Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll

Darstellung der Blutzellschichten in a) vor und in b) nach der Dichtegradientenzentrifugation, modifiziert nach [35].

Mit einer Pasteurpipette wurde die weißliche PBMCs-Schicht zwischen Plasma und Biocoll aus beiden Zentrifugenröhrchen in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und mit Puffer auf 50 ml verdünnt. Zur Thrombozytenelimination wurde die PBMCs-Pufferlösung zweimal gewaschen für 15 min bei 120 g und

accel/decel=1. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit Puffer auf 50 ml verdünnt. Nach der zweiten Zentrifugation wurden je 50 µl PBMCs-Pufferlösung und je 50 µl Puffer in zwei FACS-Röhrchen pipettiert. Der Inhalt eines Röhrchens wurde mit 2,5 µl NKp46 PE BD und der Inhalt des zweiten Röhrchens mit IgG1 PE BD gefärbt. Die Röhrchen wurden für 15 min bei 4 °C inkubiert, danach gewaschen für 5 min bei 1800 rpm und accel/decel=9. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde mit 200 µl Puffer verdünnt. Hiernach wurde mithilfe der Durchflusszytometrie festgestellt, wieviel Prozent NKp46-positive Zellen sich unter den PBMCs befinden. Dies half bei der Auswahl der Anzahl der Säulen für die spätere magnetische NK-Zell-Isolation.

2.2.2.2. Magnetische NK-Zell-Isolation

Für die magnetische NK-Zell-Isolation wurde das NK Cell Isolation Kit, der Magnethalter QuadroMACS und LS-Filtrationssäulen von Miltenyi Biotec verwendet. Die weiteren Schritte erfolgten modifiziert nach dem Herstellerprotokoll [36].

Zunächst erfolgte eine Zellzahlbestimmung. Hierzu wurden in einer 96-Well-Platte 10 µl Trypanblau in einem well vorgelegt. In einem zweiten well wurden je 90 µl Puffer und 10 µl PBMCs vermischt (1:10 Verdünnung) und hiervon wurden 10 µl zu dem vorgelegten Trypanblau im ersten well pipettiert und vermischt (1:2 Verdünnung). Hiervon wiederum wurden 10 µl in die vorbereitete Zählkammer pipettiert. Während des Auszählens der lebenden Zellen unter dem Mikroskop und der Gesamtzellzahlbestimmung (s. 2.2.1.3.) wurde die PBMCs-Pufferlösung für 5 min bei 300 g und accel/decel=9 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vollständig dekantiert und das Zellpellet in 400 µl Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Je nachdem, wie viele NK-Zellen für die Experimente gebraucht wurden, wurde mit einer bestimmten Zahl an PBMCs

weitergearbeitet und eine entsprechende Anzahl an Säulen vorbereitet. Pro Säule wurden 10^8 PBMCs benötigt. Die Berechnung der erwarteten Anzahl an NK-Zellen erfolgte mit der oben beschriebenen Bestimmung der NKp46-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie. Wurde beispielsweise innerhalb der PBMCs ein Anteil von 10 % NKp46-positiver Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmt, dann wurde nach der NK-Zell-Isolation pro 10^8 PBMCs bzw. pro Säule eine Ausbeute von 10^7 NK-Zellen erwartet. Für eine Säule wurden 400 μ l aus der Zell-Pufferlösung (das entspricht 10^8 PBMCs) in ein neues Falcon pipettiert. 100 μ l NK Cell Biotin-Antibody aus dem NK Cell Isolation Kit wurden hinzugefügt, gut vermischt und bei 4 °C für 10 min inkubiert. Dann wurden nacheinander 300 μ l Puffer und 200 μ l NK Cell MicroBead Cocktail hinzugefügt, gut vermischt und bei 4 °C für 15 min inkubiert. Abgesehen von den NK-Zellen wurden somit alle anderen Nichtzielzellen magnetisch markiert. Währenddessen wurde eine LS-Filtrationssäule in den Magnethalter eingehängt und mit 3 ml Puffer gespült. Nach der Inkubationszeit wurde die Zelllösung für 10 min bei 300 g und accel/decel=9 zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde in 1 ml Puffer resuspendiert und in die Säule pipettiert. Die gefilterte Zelllösung wurde in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Diese enthält die magnetisch unmarkierten Zellen, welche die NK-Zellen repräsentieren. Um mögliche in der Säule verbliebene NK-Zellen zu mobilisieren, wurde die Säule anschließend dreimal mit je 3 ml Puffer gespült und die Spüllösung wurde ebenfalls aufgefangen. Danach wurde die NK-Zelllösung für 10 min bei 300 g und accel/decel=9 zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium (Zubereitung s. 2.2.2.1.) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Gesamtzellzahlbestimmung. Hierzu wurden in einer 96-well-Platte je 10 μ l NK-Zelllösung und Trypanblau in einem Well vermischt (1:2 Verdünnung) und 10 μ l davon in eine vorbereitete Zählkammer

pipettiert. Die lebenden Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt und die Gesamtzellzahl wurde berechnet (s. 2.2.1.3.). 10^6 Zellen wurden in je 1 ml Kulturmedium aufgenommen und pro ml wurden je 1000 IU Proleukin zur Stimulierung der NK-Zellen hinzugefügt. Die NK-Zellsuspension wurde zu 2,5 ml/Well auf eine 6-Well-Platte verteilt und bei 37 °C und 5% CO₂ im CO₂-Inkubator gelagert bis zur Verwendung in den Experimenten.

2.2.3. Transfektion

Für allgemeine Informationen zur Transfektion s. Kapitel 1.5.

2.2.3.1. Verwendete siRNA

Es wurde eine an Alexa Fluor (AF) 488-gekoppelte negative Kontroll-siRNA (20 µM Lösung) verwendet, um die Transfektionseffizienz der verschiedenen Transfektionsreagenzien und der Elektroporation zu analysieren. Einfachheitshalber wurde diese in der vorliegenden Arbeit als Neg. siRNA AF 488 abgekürzt. Die Detektion der erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie über den FITC-Kanal.

Es wurden insgesamt sechs verschiedene CD56-siRNAs (10 µM Lösungen) mit unterschiedlicher Zielsequenz verwendet, um eine Herunterregulierung der Genexpression von CD56 zu erreichen. Die Detektion der Zellen mit erfolgreich herunterregulierter Expression des CD56-Gens erfolgte auf mRNA-Ebene mittels PCR und auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle wurde eine negative Kontroll-siRNA verwendet (20 µM Lösung). Auch diese wurde einfachheitshalber als Neg. siRNA abgekürzt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten siRNAs

Produktname bei Qiagen		Bezeichnung in dieser Arbeit
FlexiTube Gene Solution siRNA (Cat. No. 1027416)	Hs_NCAM1_2	CD56-siRNA #2
	Hs_NCAM1_3	CD56-siRNA #3
	Hs_NCAM1_4	CD56-siRNA #4
	Hs_NCAM1_5	CD56-siRNA #5
FlexiTube Gene Solution siRNA (Cat. No. 1027415)	Hs_NCAM1_8	CD56-siRNA #8
	Hs_NCAM1_9	CD56-siRNA #9
Allstars Negative Control siRNA		Neg. siRNA
Allstars Negative siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488

2.2.3.2. Chronologie der durchgeführten Experimente

Es folgt die Chronologie der durchgeführten Experimente.

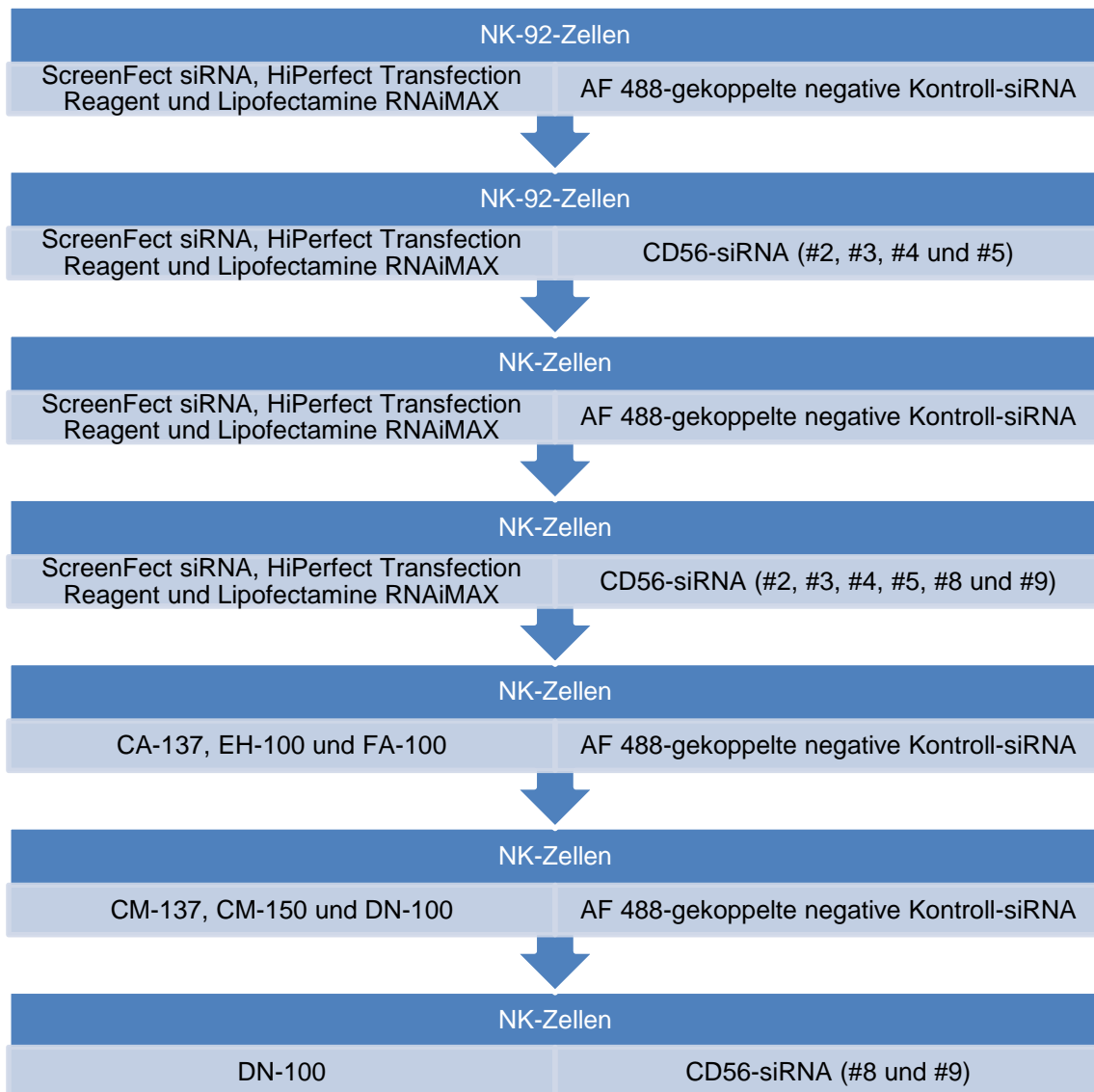


Abbildung 2: Chronologie der durchgeführten Experimente

Jedes Experiment setzte sich individuell aus den drei Hauptkomponenten zusammen: Zellart, Transfektionsreagenz bzw. Elektroporationsprogramm und siRNA.

2.2.3.3. Lipofektion

Primäre NK-Zellen und NK-92-Zellen wurden per Lipofektion transfiziert. Für die Zubereitung des Kulturmediums s. Kapitel 2.2.1.1. für NK-92-Zellen und Kapitel 2.2.2.1. für primäre NK-Zellen.

Es wurden drei Transfektionsreagenzien von drei unterschiedlichen Firmen verwendet: ScreenFect siRNA® von InCella, HiPerfect Transfection Reagent® von Qiagen und Lipofectamine RNAiMAX® von Thermo Fisher Scientific. Initial wurden bei jedem Transfektionsreagenz die NK-Zellen mit je drei verschiedenen Konzentrationen des Transfektionsreagenzes und der Neg. siRNA AF 488 transfiziert. Insgesamt bestand jedes Experiment somit aus neun verschiedenen Ansätzen. Diese wurden durch zwei Kontrollen ergänzt: 1. Zellen und Transfektionsreagenz ohne siRNA und 2. Zellen ohne Transfektionsreagenz mit siRNA.

Als Format wurden für die Analyse per Durchflusszytometrie eine 24-Well-Platte mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ Well und für die Analyse per PCR eine 12-Well-Platte mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ Well gewählt. Für die Analyse per PCR wurden die Volumina der Reagenzien, angepasst an die erhöhte Zellzahl, ebenfalls um das 2,5-fache erhöht.

2.2.3.3.1. ScreenFect siRNA®

Die Transfektion mit dem Reagenz ScreenFect siRNA® erfolgte modifiziert nach dem Herstellerprotokoll, vgl. [37].

Einfachheitshalber wurde der Produktname ScreenFect siRNA® in dieser Arbeit als ScreenFect abgekürzt. In dem Lipofektionsschema für ScreenFect wurden je drei verschiedene ScreenFect-Volumina und siRNA-Konzentrationen verwendet (s. Tabelle 3).

Zunächst wurden die NK-Zellen geerntet und gezählt. Für die Berechnung der benötigten Zellzahl wurde die Zahl der Ansätze mit $2 \cdot 10^5$ Zellen multipliziert. Primäre NK-Zellen wurden für 10 min bei 300 g und accel/decel =9 zentrifugiert und NK-92-Zellen für 5 min bei 200 g und accel/decel =1. Dann wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in $420 \mu\text{l} / 2 \cdot 10^5$ Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach bis zu ihrem Gebrauch im CO_2 -Inkubator gelagert. Hiernach wurden pro Ansatz je zwei 1,5 ml Safe-Lock-Röhrchen benötigt. In dem ersten Röhrchen wurde ScreenFect mit Puffer auf $40 \mu\text{l}$ verdünnt und im zweiten wurde die siRNA mit Puffer auf $40 \mu\text{l}$ verdünnt. Der Puffer wurde vom Hersteller bereitgestellt. Anschließend wurde die ScreenFect-Lösung schnell zur siRNA-Lösung hinzugefügt und per Pipette vermischt. Zur ScreenFect/siRNA-Komplexbildung wurde das Gemisch 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden $420 \mu\text{l}$ der Zellsuspension (entsprach $2 \cdot 10^5$ Zellen) zu jedem Ansatz hinzu pipettiert. Bei den Kontrollansätzen, bei denen je eine Komponente (entweder ScreenFect oder siRNA) fehlte, wurden stattdessen $40 \mu\text{l}$ Kulturmedium hinzugefügt. Die ScreenFect/siRNA-Zellsuspensionen wurden in eine 24-Well-Platte transferiert. Jedes Well hatte somit ein Endvolumen von $500 \mu\text{l}$ (s. Tabelle 3). Die 24-Well-Platte mit den transfizierten NK-Zellen wurde für 24 Stunden im CO_2 -Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen teilweise mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie sofort analysiert und teilweise zunächst in $400 \mu\text{l}$ RNeasy Protect Cell Reagent bei -20°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt mittels PCR analysiert.

Aus den neun verschiedenen ScreenFect-Ansätzen wurde ein Ansatz ausgewählt. Die Konzentrationen dieses Ansatzes für ScreenFect ($1,5 \mu\text{l}$) und siRNA (100 nM) wurden für die Lipofektion von NK-Zellen mit ScreenFect und CD56-siRNA

weiterverwendet. In Tabelle 4 wurde als Beispiel das Lipofektionsschema für die zwei CD56-siRNAs #8 und #9 und die Neg. siRNA als Kontrolle dargestellt.

Tabelle 3: Lipofektionsschema mit ScreenFect und Neg. siRNA AF 488

Lipofektion mit ScreenFect und Neg. siRNA AF 488														
1			2			3			4			5		
Name der Probe	Neg. siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488		ScreenFect ohne		Neg. siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488	
	100nM		20nM		10nM								ohne ScreenFect	
Format	24-Well-Platte													
Schritt 1	Verdünnen von ScreenFect mit Puffer													
Safe-Lock-Röhrchen Nr.	1.1a	1.1b	1.1c	2.1a	2.1b	2.1c	3.1a	3.1b	3.1c	4.1a	4.1b	/		
ScreenFect	1,5 µl	1 µl	0,75 µl	1,5 µl	1 µl	0,75 µl	1,5 µl	1 µl	0,75 µl	1,5 µl	1,5 µl	/		
Puffer	38,5 µl	39 µl	39,25 µl	38,5 µl	39 µl	39,25 µl	38,5 µl	39 µl	39,25 µl	38,5 µl	38,5 µl	/		
Endvolumen	40 µl				40 µl				40 µl				/	
Schritt 2	Verdünnen der siRNA in Puffer													
Safe-Lock-Röhrchen Nr.	1.2a	1.2b	1.2c	2.2a	2.2b	2.2c	3.2a	3.2b	3.2c	/		/		
Neg. siRNA AF 488	50 pmol bzw 2,5 µl (100 nM)	37,5 µl	37,5 µl	10 pmol bzw 0,5 µl (20 nM)	39,5 µl	39,5 µl	5 pmol bzw 0,25 µl (10 nM)	39,75 µl	39,75 µl	/		50 pmol bzw 2,5 µl (100 nM)		
Puffer	37,5 µl	37,5 µl	37,5 µl	39,5 µl	39,5 µl	39,5 µl	39,75 µl	39,75 µl	39,75 µl	/		37,5 µl		
Endvolumen	40 µl			40 µl			40 µl			/			40 µl	
Schritt 3	Schnelles Hinzufügen der ScreenFect-Lösung zur siRNA-Lösung und Vermischen per Pipette													
Volumen der Komplexe	80 µl			80 µl			80 µl			/			40 µl	
Schritt 4	Nach 20 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur, Hinzufügen von frisch resuspendierten Zellen zu den Transfektionskomplexen und Transfer des Gemisches in die 24-Well-Platte													
Well Nr.	1.4a	1.4b	1.4c	2.4a	2.4b	2.4c	3.4a	3.4b	3.4c	4.4a	4.4b	5.4a		
Zellsuspension	2x 10 ⁵ cells in 420 µl			2x 10 ⁵ cells in 420 µl			2x 10 ⁵ cells in 420 µl			2x 10 ⁵ cells in 460 µl			2x 10 ⁵ cells in 460 µl	

Tabelle 4: Lipofektionsschema mit ScreenFect und CD56-siRNA

Lipofektion mit ScreenFect und CD56-siRNA			
	1	2	3
Name der Probe	CD56-siRNA #8 (100 nM)	CD56-siRNA # 9 (100 nM)	Neg. siRNA (100 nM)
Format	24-Well		
Schritt 1	Verdünnen von ScreenFect mit Puffer		
Safe-Lock-Röhrchen Nr.	1.1.	2.1.	3.1.
ScreenFect	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Puffer	38,5 µl	38,5 µl	38,5 µl
Endvolumen	40 µl	40 µl	40 µl
Schritt 2	Verdünnen der siRNA mit Puffer		
Safe-Lock-Röhrchen Nr.	1.2.	2.2.	3.2.
siRNA	50 pmol bzw 5 µl (100 nM)	50 pmol bzw 5 µl (100 nM)	25 pmol bzw 2,5 µl (100nM)
Puffer	35 µl	35 µl	37,5 µl
Endvolumen	40 µl	40 µl	40 µl
Schritt 3	Schnelles Hinzufügen der ScreenFect-Lösung zur siRNA-Lösung und Vermischen per Pipette		
Volumen der Komplexe	80 µl	80 µl	80 µl
Schritt 4	Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, Hinzufügen von frisch resuspendierten Zellen zu den Transfektionskomplexen und Transfer des Gemisches in die 24-Well-Platte		
Well Nr.	1.4.	2.4.	3.4.
Zellsuspension	2x 10 ⁵ cells in 420 µl	2x 10 ⁵ cells in 420 µl	2x 10 ⁵ cells in 420 µl
ScreenFect ohne siRNA			4

2.2.3.3.2. HiPerfect Transfection Reagent®

Auch die Transfektion mit dem Reagenz HiPerfect Transfection Reagent® erfolgte modifiziert nach dem Herstellerprotokoll, vgl. [38]. Einfachheitshalber wurde der Produktname HiPerfect Transfection Reagent® in dieser Arbeit als HiPerfect abgekürzt. Das Lipofektionsschema für HiPerfect (s. Tabelle 5) wurde nach dem Vorbild des ScreenFect-Transfektionsschemas zusammengestellt, vgl. [37]. Es wurden je drei verschiedene HiPerfect-Volumina und siRNA-Konzentrationen verwendet.

Zunächst wurden die NK-Zellen geerntet und gezählt. Für die Berechnung der benötigten Zellzahl wurde die Zahl der Ansätze mit $2 \cdot 10^5$ Zellen multipliziert. Primäre NK-Zellen wurden für 10 min bei 300 g und accel/decel =9 zentrifugiert und NK-92-Zellen für 5 min bei 200 g und accel/decel =1. Dann wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in $100 \mu\text{l} / 2 \cdot 10^5$ Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in der 24-Well-Platte ausplattiert mit je $100 \mu\text{l} / \text{Well}$. Pro Ansatz wurde je ein 1,5 ml Safe-Lock-Röhrchen verwendet, in dem zunächst die siRNA mit $100 \mu\text{l}$ serumreduziertem Kulturmedium (OPTI-MEM I Medium) verdünnt wurde. Anschließend wurde HiPerfect zu dieser hinzu pipettiert und per Vortex vermischt. Zur HiPerfect/siRNA-Komplexbildung wurde das Gemisch für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Komplexe tropfenweise zu den bereits ausplattierten Zellen pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde vorsichtig geschwenkt und im CO_2 -Inkubator für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Ablauf der 6 Stunden wurden $400 \mu\text{l}$ zu jedem Ansatz hinzu pipettiert und die Platte wurde für weitere 18 Stunden inkubiert. Somit hatten die Zellen in den ersten 6 Stunden einen viel engeren Kontakt zu den Komplexen als nach Zugabe des Mediums. Das Endvolumen/ Well betrug $600 \mu\text{l}$. Im Anschluss an die 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Tabelle 5: Lipofektionsschema mit HiPerfect und Neg. siRNA AF 488

Lipofektion mit HiPerfect und Neg. siRNA AF 488											
	1		2		3		4		5		
Name der Probe	Neg. siRNA AF 488 100 nM		Neg. siRNA AF 488 50 nM		Neg. siRNA AF 488 25 nM		HiPerfect ohne Neg. siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488 ohne HiPerfect		
Format	24-Well-Platte										
Schritt 1	Ausplattieren der Zellen										
Zellsuspension/ Well	2x 10 ⁵ cells in 100 µl		2x 10 ⁵ cells in 100 µl		2x 10 ⁵ cells in 100 µl		2x 10 ⁵ cells in 100 µl		2x 10 ⁵ cells in 100 µl		
Schritt 2	Verdünnen der siRNA in serumreduziertem Kulturmedium										
Safe-Lock-Röhrchen Nr.	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	3c	4a	5a
Neg. siRNA AF 488	60 pmol bzw 3 µl (100 nM)	30 pmol bzw 1,5 µl (50 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)
Opti-MEM I Medium	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Schritt 3	Hinzufügen von HiPerfect zur verdünnten siRNA, Vermischen mittels Vortex und Inkubation für 5-10 min bei Raumtemperatur										
HiPerfect	9 µl	6 µl	3 µl	9 µl	6 µl	3 µl	9 µl	6 µl	3 µl	9 µl	/
Schritt 4	Tropfenweise Hinzufügen der Komplexe zu den Zellen, vorsichtiges Schwenken der Platte und Inkubation für 6h bei 37 °C und 5% CO ₂										
Schritt 5	Nach 6 h Hinzufügen von 400 µl Kulturmedium zu den Zellen										

2.2.3.3.3. Lipofectamine RNAiMAX®

Die Transfektion mit dem Reagenz Lipofectamine RNAiMAX® erfolgte ebenfalls modifiziert nach dem Herstellerprotokoll, vgl. [39]. Einfachheitshalber wurde in dieser Arbeit der Produktname Lipofectamine RNAiMAX® als Lipofectamine abgekürzt. Das Lipofektionsschema für Lipofectamine (s. Tabelle 6) wurde nach dem Vorbild des ScreenFect-Transfektionsschemas zusammengestellt, vgl. [37]. Es wurden je drei verschiedene Lipofectamine-Volumina und siRNA-Konzentrationen verwendet.

Zunächst wurden die NK-Zellen geerntet und gezählt. Für die Berechnung der benötigten Zellzahl wurde die Zahl der Ansätze mit $2 \cdot 10^5$ Zellen multipliziert. Primäre NK-Zellen wurden für 10 min bei 300 g und accel/decel =9 zentrifugiert und NK-92-Zellen für 5 min bei 200 g und accel/decel =1. Dann wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 500 µl/ $2 \cdot 10^5$ Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach bis zu ihrem Gebrauch im CO₂-Inkubator gelagert. Pro Ansatz wurde je ein 1,5 ml Safe-Lock-Röhrchen verwendet, in dem zunächst die siRNA mit 100 µl serumreduziertem Kulturmedium (OPTI-MEM I Medium) verdünnt wurde. Anschließend wurde Lipofectamine zu dieser hinzu pipettiert und per Pipette vermischt. Zur Lipofectamine/siRNA-Komplexbildung wurde das Gemisch für 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl der Zellsuspension (entsprach $2 \cdot 10^5$ Zellen) zu jedem Ansatz hinzu pipettiert. Die Lipofectamine/siRNA-Zellsuspensionen wurden in eine 24-Well-Platte transferiert. Jedes Well hatte somit ein Endvolumen von 600 µl. Die 24-Well-Platte mit den transfizierten NK-Zellen wurde für 24 Stunden im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Tabelle 6: Lipofektionsschema mit Lipofectamine und Neg. siRNA AF 488

Lipofektion mit Lipofectamine und Neg. siRNA AF 488												
		1		2		3		4		5		
Name der Probe		Neg. siRNA AF 488 100 nM		Neg. siRNA AF 488 50 nM		Neg. siRNA AF 488 25 nM		Lipofectamine ohne Neg. siRNA AF 488		Neg. siRNA AF 488 ohne Lipofectamine		
Format		24-Well-Platte										
Schritt 1		Verdünnen der siRNA in serumreduziertem Medium										
Safe-Lock-Röhrchen Nr.		1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	3c	4a	5a
Neg. siRNA AF 488		60 pmol bzw 3 µl (100 nM)	30 pmol bzw 1,5 µl (50 nM)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	25 pmol bzw 0,75 µl (25 nM)	100 µl	100 µl	100 µl	60 pmol bzw 3 µl (100 nM)
Opti-MEM I Medium		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Schritt 2		Hinzufügen von Lipofectamine zur verdünnten siRNA, Vermischen per Pipette und Inkubation für 10-20 min bei Raumtemperatur										
Lipofectamine		1,5 µl	1 µl	0,5 µl	1,5 µl	1 µl	0,5 µl	1,5 µl	1 µl	0,5 µl	1,5 µl	/
Schritt 3		Hinzufügen der frisch resuspendierten Zellen zu den Transfektionskomplexen und Transfer des Gemisches in die 24-Well-Platte										
Zellsuspension		2x 10 ⁵ cells in 500 µl		2x 10 ⁵ cells in 500 µl		2x 10 ⁵ cells in 500 µl		2x 10 ⁵ cells in 500 µl		2x 10 ⁵ cells in 500 µl		2x 10 ⁵ cells in 500 µl

2.2.3.4. Elektroporation

Per Elektroporation wurden ausschließlich primäre NK-Zellen transfiziert. Zum Zeitpunkt der Anfertigung der Experimente war für das verwendete 4D-Nucleofector™ System von Lonza noch kein Protokoll speziell für primäre NK-Zellen vorhanden. Somit wurde anhand eines Protokolls für primäre NK-Zellen vom Vorgängermodell Nucleofector® Device und anhand einer Anleitung zum Aufbau eines RNAi Experiments ein neues Protokoll zusammengestellt und ausprobiert, vgl. [40], [41]. Die Empfehlungen zur Wahl des passenden Kits und der initialen Elektroporationsprogramme CA-137, EH-100 und FA-100 wurden von einer Ansprechperson bei Lonza ausgesprochen.

Das P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit enthielt eine Nucleofector-Lösung und ein Supplement, Küvetten und einzeln steril verpackte Pasteurpipetten. Zunächst musste das Supplement mit der Nucleofector-Lösung vermischt werden. Danach wurde das Kulturmedium für die NK-Zellen angesetzt und bei 37 °C im Wasserbad warmgehalten, s. Kapitel 2.2.2.1. Eine 12-Well-Platte wurde mit je 1,5 ml Kulturmedium/Well befüllt und im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die am Vortag isolierten und mit Proleukin stimulierten NK-Zellen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geerntet und gezählt. Je 2 *10⁶ Zellen pro Ansatz wurden in je ein 2 ml Safe-Lock-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden für 10 min bei 300 g und accel/decel =9 zentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig dekantiert und die Zellpellets in 100 µl raumwarmer supplementierter Nucleofector-Lösung resuspendiert. Diese Lösung durfte nicht länger als 20 min in Kontakt mit den Zellen stehen, da sonst eine verminderte Zellviabilität und Transfektionseffizienz aufgetreten wäre. Falls für den Ansatz vorgesehen, wurden noch 1,5 µl (bei einer 20 µM siRNA-Lösung) bzw. 3 µl siRNA (bei einer 10 µM siRNA-Lösung) zu der Zelllösung hinzu pipettiert. Auf das Reaktionsvolumen von 100 µl gesehen ergab

dies eine siRNA-Konzentration von 300 nM. Danach wurde die gesamte Lösung von den Safe-Lock-Röhrchen auf den Boden der im Kit enthaltenen Küvetten luftblasenfrei transferiert. Die verschlossenen Küvetten wurden in den 4D-Nucleofector™ System gestellt und das zuvor ausgewählte Programm wurde angewandt. Anschließend wurden je 500 µl Kulturmedium direkt zu den frisch elektroporierten Zellen in jede Küvette hinzu pipettiert. Direkt danach wurden die Proben von den Küvetten in die Wells der im Inkubator vorgewärmten 12-Well-Platte transferiert. Somit hatte jedes Well ein Endvolumen von 2 ml. Die 12-Well-Platte mit den elektroporierten NK-Zellen wurde für 24 Stunden im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen teilweise mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie sofort analysiert und teilweise zunächst in 400 µl RNAProtect Cell Reagent bei -20 °C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt mittels PCR analysiert.

Für die Auswahl der weiteren Elektroporationsprogramme wurde eine Optimierungstabelle von Lonza angewendet, anhand derer man das optimale Programm für jeden Zelltyp finden kann, vgl. [42]. Aus dieser Tabelle wurden die drei neuen Elektroporationsprogramme CM-137, CM-150 und DN-100 gewählt, bei denen im Vergleich zu den ersten drei Programmen eine gesteigerte Transfektionseffizienz bei einer ebenfalls gesteigerten Viabilität erwartet wurde. Von allen sechs Programmen wurde das Programm weiterverwendet, welches die höchste Transfektionseffizienz und gleichzeitig eine hohe Viabilität aufwies.

Zusammengestellt wurde das Elektroporationsschema (s. Tabelle 7) nach dem Vorbild des ScreenFect-Transfektionsschemas, vgl. [37]. In Tabelle 7 wurde als Beispiel die Elektroporation mit dem Programm DN-100 und mit AF 488-gekoppelter und nichtfluoreszierender Negative Kontroll-siRNA und CD56-siRNA #8 dargestellt.

Tabelle 7: Elektroporationsschema mit dem Programm DN-100

Elektroporation mit dem Programm DN-100				
	1	2	3	4
Name der Probe	DN-100 + Neg. siRNA AF 488	DN-100	DN-100 + CD56 siRNA # 8	DN-100 + Negative siRNA
Format	12-Well-Platte			
Schritt 1	Befüllen der Wells mit Kulturmedium und Hineinstellen der Platte in den CO ₂ Inkubator			
Kulturmedium	1500 µl	1500 µl	1500 µl	1500 µl
Schritt 2	Resuspension des Zellpellets in Nucleofector-Lösung			
Zellsuspension	2x 10 ⁶ Zellen in 100 µl	2x 10 ⁶ Zellen in 100 µl	2x 10 ⁶ Zellen in 100 µl	2x 10 ⁶ Zellen in 100 µl
Schritt 3	Vermischen der Zellsuspension mit siRNA			
siRNA	30 pmol = 1,5 µl (300 nM)	/	60 pmol = 3 µl (300 nM)	30 pmol = 1,5 µl (300 nM)
Schritt 4	Transfer der Zell-siRNA-Suspension in die Küvette			
Programm	Hineinstellen der Küvette in das Nucleofector System und Anwendung des Programms DN-100			
Schritt 5	Hinzufügen des Kulturmediums zur Küvette			
Kulturmedium	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Endvolumen/ Well	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl

2.2.4. Analyse der Zelloberflächenmarker-Expression

2.2.4.1. Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zellpopulationen u.a. anhand ihrer Größe, Granularität und Oberflächenmarkerexpression charakterisiert werden. Das Durchflusszytometer besteht aus drei Teilen: dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System und dem Signalverarbeitungssystem. Im Flüssigkeitssystem passieren die Zellen durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung einzeln einen definierten Messpunkt. An diesem Messpunkt trifft der Laserstrahl, zugehörig zum Anregungsteil des optischen Systems, auf die Zelle. Das optische System besteht, zusätzlich zu diesem Anregungsteil, aus einem Detektionsteil, welcher das von Linsen gesammelte Streulicht und die Fluoreszenz misst. Im Signalverarbeitungssystem findet die Konvertierung von optischen Signalen in elektrische Pulse statt. Als zusätzliche Funktion verfügen einige Durchflusszytometer über das FACS (Fluorescence activated cell sorting), welches Zellen nach gewünschten Kriterien sortieren und quantifizieren kann.

Die Lichtstreuung erfolgt an der Zellmembran, dem Zellkern und an jedem granulärem Material innerhalb einer Zelle. Dabei wird vorwärts gestreutes Licht (FSC, forward-scattered light) von seitwärts gestreutem Licht (SSC, side-scattered light) unterschieden. FSC ist proportional zur Zellgröße und wird gegenüber dem Laserstrahl detektiert. SSC ist proportional zur Zellgranularität und wird ca. 90° zum Laserstrahl detektiert. Die Zusammenschau von FSC und SSC ermöglicht die Unterscheidung von Subpopulationen in einer heterogenen Zellpopulation. Um bestimmte Oberflächenmarker der Zellpopulation zu untersuchen, nutzt man die Bindung von mit Fluoreszenzfarbstoff versehenen Antikörpern an diese Oberflächenmarker. Die Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Lichtenergie einer jeweils charakteristischen Wellenlänge. Die Lichtabsorption führt zu einer Anregung der Elektronen auf ein

höheres Energieniveau. Beim Übergang der Elektronen zum Grundniveau wird Energie frei in Form von Photonen. Diese Energieübertragung nennt man Fluoreszenz. Den Wellenlängenbereich, in dem ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt wird, nennt man Absorptionsspektrum. Den Wellenlängenbereich, in dem ein Fluoreszenzfarbstoff Energie abgibt, nennt man Emissionsspektrum. Meist wird ein Argon-Laser verwendet, da er mit seinem 488-nm-Licht mehr als einen Fluoreszenzfarbstoff anregen kann. So können gleichzeitig mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, wenn die Spitzen ihrer Emissionsspektren nicht allzu nah beieinanderliegen. Nun können die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe von verschiedenen Detektoren des optischen Systems erfasst werden.

Nach der Konvertierung der optischen Signale in elektrische Pulse, können diese in verschiedenen Graphen dargestellt werden. Ein einzelner Parameter in der Zellanalyse kann als Histogramm dargestellt werden, dabei befindet sich auf der x-Achse der Parameter und auf der y-Achse die Zahl der Ereignisse. Mehrere Parameter werden als Plot dargestellt, wobei die x- als auch die y-Achse je einen Parameter darstellen. Möchte man nur eine bestimmte Subpopulation in einer heterogenen Zellpopulation untersuchen, dann kann man diese in einem FSC- und SSC-Plot durch ein Gate definieren. Mithilfe von Quadranten-Markern kann man Zwei-Parameter-Plots in vier Teile einteilen um Populationen innerhalb der definierten Subpopulation anhand ihrer Positivität bzw. Negativität hinsichtlich der Parameter zu unterscheiden. Der untere linke Quadrant zeigt Ereignisse, die negativ sind für beide Parameter. Der obere linke Quadrant zeigt Ereignisse, die positiv für den y-Achsen-Parameter sind, aber negativ für den x-Achsen-Parameter. Der untere rechte Quadrant enthält Ereignisse, die positiv sind für den x-Achsen-Parameter, aber negative für den y-Achsen-Parameter.

Und der obere rechte Quadrant enthält Ereignisse, die positiv sind für beide Parameter (vgl. [33], [43]).

2.2.4.2. Analyse der Oberflächenmarker-Expression von NK-Zellen

Die zuvor berechnete benötigte Menge an NK-Zellen wurde in ein 50 ml Zentrifugierröhrchen pipettiert und zentrifugiert.

Währenddessen wurden die FACS-Röhrchen vorbereitet. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde in MACS-Buffer resuspendiert mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml. In jedes FACS-Röhrchen wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen bzw. 500 μ l Zellsuspension pipettiert. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen 5 min lang mit 1800 rpm und accel/decel (Beschleunigen/Abbremsen) = 9 bzw. 1 (bei NK-92-Zellen) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei jedem FACS-Röhrchen dekantiert. Danach wurden den Zellpellets in 100 μ l Restüberstand die Antikörper bei ausgeschaltetem Licht hinzugefügt. Die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Isotypkontrollen werden tabellarisch in dem Kapitel 2.1.5 dargestellt. Pro FACS-Röhrchen wurde mit jeweils bis zu vier Antikörpern, die an bis zu vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, gefärbt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet. Anschließend wurde der Inhalt der FACS-Röhrchen mithilfe des Vortex vermischt. Die FACS-Röhrchen wurden für 20 min bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nach dieser Zeit wurden jedem FACS-Röhrchen 2 ml MACS-Buffer zugegeben und danach wurden die Röhrchen ein weiteres Mal zentrifugiert für 5 min mit 1800 rpm und accel/decel (Beschleunigen/Abbremsen) = 9 bzw. 1 (bei NK-92-Zellen). Die Überstände wurden dekantiert und zu jedem Röhrchen wurden je 200 μ l MACS-Buffer hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben am FACSCalibur vermessen. Am Durchflusszytometer wurden zunächst im FSC- und SSC-PLOT die

lebenden NK-Zellen von den Zelltrümmern durch ein Gate definiert. Hierzu wurde die Isotypkontrolle verwendet. Danach wurden die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe in Zwei-Parameter-Plots so kompensiert, dass die nah beieinanderliegenden Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe sich nicht überschneiden und spezifisch waren für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff. Hierzu wurden die Fluoreszenzfarbstoffkontrollen verwendet. Nachdem die Einstellungen vorgenommen wurden, konnte mit der Messung der Proben begonnen werden. Mithilfe der Software FlowJo wurde, innerhalb von Plots mit den Parametern FSC, SSC und den Fluoreszenzfarbstoffen, die Expression jedes gemessenen Oberflächenmarkers graphisch dargestellt und in Prozent bzw. als geometrischer Mittelwert ausgerechnet.

2.2.5. Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene

2.2.5.1. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit und dem dazugehörigen Protokoll von Qiagen; vgl. [44].

Die zuvor bei -20 °C eingefrorenen NK-Zellen wurden für 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und um die Zellen zu lysieren und homogenisieren wurde das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 350 µl 70%iges Ethanol hinzu pipettiert. Die Zellsuspension wurde dann auf eine im Kit bereitgestellte Zentrifugensäule pipettiert. Dort banden nur RNA-Moleküle mit mehr als 200 Basen an die Membran in der Zentrifugensäule. Das zuvor hinzugefügte Ethanol sorgte für optimale Bedingungen für diese Bindung. RNA-Moleküle mit weniger als 200 Basen wurden in den folgenden Schritten gewaschen, sodass am Ende aufgereinigte mRNA angereichert wurde. Zunächst wurde die Säule zentrifugiert für 30 sec bei 8000 g. Die Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt und das alte Sammelröhrchen wurde

mit dem Durchfluss verworfen. Dann wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Die Säule wurde wieder für 30 sec bei 8000 g zentrifugiert und danach auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Danach wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Die Säule wurde nochmals für 30 sec bei 8000 g zentrifugiert und dann auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Anschließend wurden ein zweites Mal 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Diesmal wurde die Säule jedoch für 2 min bei 8000 g zentrifugiert und dann auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Um noch vorhandene Pufferreste zu eliminieren, wurde die Säule nun für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und danach auf ein 1,5 ml Safe-Lock-Röhrchen gesetzt. Mit einer letzten Zentrifugation für 1 min bei 8000 g wurde die aufgereinigte RNA schließlich in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.5.2. RNA-Quantifizierung

Nach der RNA-Extraktion erfolgte gleich im Anschluss die Konzentrationsbestimmung der RNA mithilfe des Spektralphotometers Nanodrop. Dabei werden die RNA-Moleküle mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 260 nm belichtet. Dieses Licht absorbiert die RNA stärker, wenn sie eine höhere Konzentration aufweist (vgl. [33]). Die berechnete RNA-Konzentration wird in ng/µl von der Nanodrop-Software angegeben. Zusätzlich wird auch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm angegeben. Bei einem Absorptionsverhältnis von 2,0, kann von einer reinen, weitgehend proteinfreien RNA-Lösung ausgegangen werden (vgl. [33], [45]). Die quantifizierte RNA wurde entweder direkt im Anschluss in cDNA umgeschrieben oder erst einmal bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3. cDNA-Umschrieb

Da in der PCR mithilfe der DNA-abhängigen Polymerase nur DNA vervielfältigt werden kann, erfolgte der Umschrieb der isolierten RNA in komplementäre DNA, auch cDNA genannt. Der cDNA-Umschrieb erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit und dem dazugehörigen Protokoll von Thermo Fisher Scientific; vgl. [46].

Die im Kit enthaltene M-MuLV Reversen Transkriptase synthetisiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase einen zur RNA komplementären DNA-Strang. Nach dem Abbau des RNA-Stranges, wird der komplementäre DNA-Strang zu einem doppelsträngigen DNA-Molekül ergänzt (vgl. [33]). Für die Synthese werden des Weiteren Nukleotide und Primer benötigt, welche ebenfalls im Kit enthalten sind.

Pro Ansatz wurden bei primären NK-Zellen je 100 ng und bei NK-92-Zellen je 400 ng der zuvor vermessenen RNA in ein 0,2 ml PCR-Röhrchen pipettiert und mit Nuklease-freiem Wasser auf 8,8 µl aufgefüllt. Hierzu wurden 11,2 µl des Mastermix hinzu pipettiert. Dieser bestand pro Ansatz aus 4 µl Reaktionspuffer, 0,2 µl Oligo(dT) Primer, 1 µl Random Hexamer Primer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl dNTP Mix, 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase und 1 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Reagenzien wurden in der aufgezählten Reihenfolge zum Mastermix zusammengestellt. Das Endvolumen betrug 20 µl. Anschließend wurde das PCR-Röhrchen kurz an zentrifugiert. Die Transkription im Mastercycler von Eppendorf erfolgte für 5 min bei 25 °C, für 60 min bei 37 °C, für 5 min bei 70 °C und wurde schließlich bei 4 °C beendet. Die fertig umgeschriebene cDNA mit einer Endkonzentration von 5 ng/µl (bei primären NK-Zellen) bzw. 20 ng/µl (bei NK-92-Zellen) wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

2.2.5.4. Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA, welche das Reaktionsprinzip der DNA-Replikation als Vorbild hat. Benötigt werden für diese Reaktion u.a. eine DNA-Polymerase, Nukleotide, Primer und eine DNA-Matrize. Jeder PCR-Zyklus besteht aus den drei Teilschritten Denaturierung, Annealing (Hybridisierung) und Elongation (Verlängerung). Nach jedem Zyklus liegt die doppelte Menge des von Primern begrenzten DNA-Abschnittes vor. Da in jedem neuen Zyklus auch die Reaktionsprodukte der vorherigen Zyklen als Matrizen dienen, verdoppelt sich die Anzahl der Reaktionsprodukte exponentiell mit der Zykluszahl. Bei der Real-time quantitativen PCR (RT-qPCR) kann nach jedem Zyklus, also in Echtzeit, die Menge der vervielfältigten DNA bestimmt werden. Als Hilfsmittel dienen hierbei in die doppelsträngige DNA interkalierende Farbstoffe, die bei Lichtanregung fluoreszieren. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Zunahme der doppelsträngigen DNA zu; vgl. [33].

Die RT-qPCR erfolgte mit dem iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix und dem dazugehörigen Protokoll von Bio-Rad; vgl. [47]. Dieser Supermix enthält u.a. die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, Nukleotide, den interkalierenden Farbstoff SYBR Green und MgCl₂, welches für optimale Aktivitätsbedingungen für die Polymerase sorgt.

Im Fokus stand die Untersuchung der Genexpression von CD56 in den transfizierten NK-Zellen. Als Referenz wurde dabei das Housekeeping-Gen ALAS1, welches unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert wird, verwendet. Jede NK-Zell-Probe wurde im Zweifachansatz auf die Expression beider Gene untersucht. Zunächst wurden die Mastermixe für die beiden zu untersuchenden Gene pipettiert. Dieser bestand pro Ansatz aus 10 µl iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, je 1 µl der 10 µM forward- und reverse-Primer von CD56 bzw. ALAS1 und 4 µl H₂O. Zusammen ergab dies

ein Volumen von 16 µl pro Ansatz. Der Mastermix wurde in ein Well einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurde die cDNA, welche als DNA-Matrize diente, so verdünnt, dass bei primären NK-Zellen eine Endkonzentration von 1 ng/µl und bei NK-92-Zellen eine Endkonzentration von 2 ng/µl vorlag. Je 4 µl der verdünnten cDNA wurden zu dem Mastermix hinzu pipettiert. Dies ergab ein Endvolumen von 20 µl pro Well. Als Negativkontrolle wurde pro Gen je ein Doppelansatz mit 4 µl H₂O statt cDNA verwendet. Die Oberfläche der 96-Well-PCR-Platte wurde mit einer Folie beklebt. Nach kurzem Anzentrifugieren der Platte, wurde diese im StepOnePlus Real-Time PCR-System von Applied Biosystems analysiert. Das ausgeführte Programm begann zunächst für 30 s bei 95 °C mit der primären Polymeraseaktivierung und DNA-Denaturierung. Anschließend erfolgten bei jedem Zyklus bei zunächst 95 °C für 3 s die Fortsetzung der DNA-Denaturierung und dann bei 60 °C für 30 s das Annealing, die Elongation und das Auslesen der Platte. Zum Schluss erfolgte noch bei einer Temperaturerhöhung um 0,5 °C alle 2 bis 5 s eine Schmelzkurvenanalyse. Insgesamt wurden 35 PCR-Zyklen mit anschließender Fluoreszenzmessung durchgeführt.

In der StepOne Software wurde im Amplifikationsgraphen die Fluoreszenz bei steigender Anzahl der Zyklen dargestellt. Im Bereich des Fluoreszenzanstiegs wird ein Ct-Wert festgelegt. Dies ist der Schwellenwert, ab dem die Fluoreszenz bei allen Ansätzen einen exponentiellen Anstieg zeigt. Für jeden Ansatz wurde errechnet, in welchem Zyklus dieser Ct-Wert erreicht wurde. Je höher die anfängliche CD56-DNA-Konzentration im Ansatz war, desto weniger Zyklen wurden benötigt, um den Ct-Wert zu erreichen. Die relative Expression von CD56 wurde mit der folgenden Formel berechnet:

Formel 4: Relative Expression von CD56

$$\text{Relative Expression CD56 (n)} = \frac{E^{Ct_{CD56}(\text{ctrl}) - Ct_{CD56}(n)}}{E^{Ct_{ALAS1}(\text{ctrl}) - Ct_{ALAS1}(n)}}$$

n	Bedingung; in dieser Arbeit: NK-Zellen nach Transfektion
E	Effizienz der PCR; in dieser Arbeit = 2
Ct	Ct-Wert; in dieser Arbeit wurde der Ct-Mittelwert aus dem Doppelansatz verwendet
Ctrl	Kontrolle mit der Bedingung: nichttransfizierte NK-Zellen

2.2.6. Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioCam IC von Zeiss und der Software Zen 2 lite wurden Aufnahmen von den transfizierten NK-Zellen gemacht.

Hierfür wurden die NK-Zellen entweder in eine 24-Well-Platte transferiert oder in einer 8-Well Zellkulturkammer auf einem Glasobjektträger fixiert. Die Zellkulturkammer wurde schon am Tag der Transfektion vorbereitet. In jedes Well wurden 500 µl NaOH pipettiert. Die Zellkulturkammer wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde ihr Inhalt entnommen. Jedes Well wurde insgesamt drei Mal mit 500 µl destilliertem H₂O gewaschen. Danach wurde jedes Well mit 125 µl Poly-D-Lysin 0,01% befüllt und die Zellkulturkammer wurde lichtgeschützt für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Überstand in den Wells abpipettiert und jedes Well mit 500 µl HBSS befüllt. Die Zellkulturkammer wurde bei +4 °C gelagert bis zum Gebrauch am nächsten Tag. Dann wurden der Überstand aus den Wells abpipettiert und in jedes Well wurden 500 µl Kulturmedium pipettiert und wieder abpipettiert. Anschließend wurden 500 µl der transfizierten Zellen in jedes Well der Zellkulturkammer pipettiert.

Die Aufnahmen wurden im Anschluss mit der Software Fiji von Image J analysiert. Dabei konnten die angefertigten lichtmikroskopischen und fluoreszenzlichtmikroskopischen Aufnahmen (FITC-Kanal) in einer einzigen Aufnahme zusammengeführt werden. Auf dieser Aufnahme wurden schließlich die erfolgreich transfizierten NK-Zellen gezählt.

2.2.7. Statistik

Der Großteil der Transfektionsversuche wurde je zweimal wiederholt. Bei allen Ergebnissen ist die Anzahl der Wiederholungen angegeben. Bei den Versuchen, die zweimal wiederholt wurden, wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen mit dem Programm Excel berechnet und mit dem Programm GraphPadPrism 5 als Säulendiagramme dargestellt. Die Signifikanz wurde ebenfalls mit dem Programm Excel mit einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde dabei als signifikant definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Lipofektion

3.1.1. NK-92-Zellen

Bei den NK-92-Zellen wurde 24 Stunden nach Transfektion auf der einen Seite die Transfektionseffizienz per Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie und auf der anderen Seite der CD56-Gen-Knockdown per Durchflusszytometrie und PCR untersucht.

Transfektionseffizienz

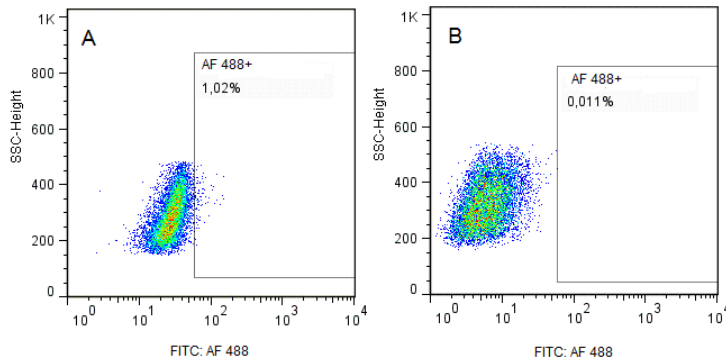
Die Transfektionseffizienz der drei Transfektionsreagenzien ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine wurde mithilfe von Neg. siRNA AF 488 analysiert. Die Detektion der erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie über den FITC-Kanal. Die Zahl der AF 488-positiven Zellen wurde dabei der Zahl der erfolgreich transfizierten Zellen gleichgesetzt.

Durchflusszytometrie

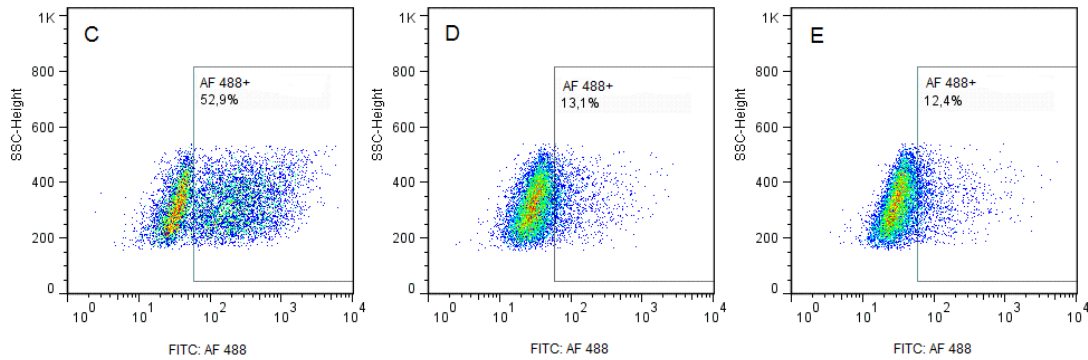
Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind nachfolgend für jedes Transfektionsreagenz exemplarisch als Grafik mit Zwei-Parameter-Plots (Abb. 3 bis 5) und zusammenfassend ($n = 3$; Abb. 6) als Säulendiagramm dargestellt.

In der Zusammenschau zeigten die mit ScreenFect transfizierten NK-92-Zellen den höchsten Prozentanteil an AF 488-positiven Zellen (vgl. Abb. 3 bis 6). Dabei lag der maximale mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen bei dem höchsten ScreenFect-Volumen von 1,5 μl und gleichzeitig der höchsten Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 100nM bei 43,6%. Bei niedrigeren ScreenFect-Volumina und Neg. siRNA AF 488-Konzentrationen lag der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen niedriger und bis auf zwei Ausnahmen unter 10% (vgl. Abb. 6). Im Vergleich hierzu lag der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen bei HiPerfect und Lipofectamine in allen neun Kombinationen aus je drei verschiedenen HiPerfect- bzw. Lipofectamine-Volumina und Neg.

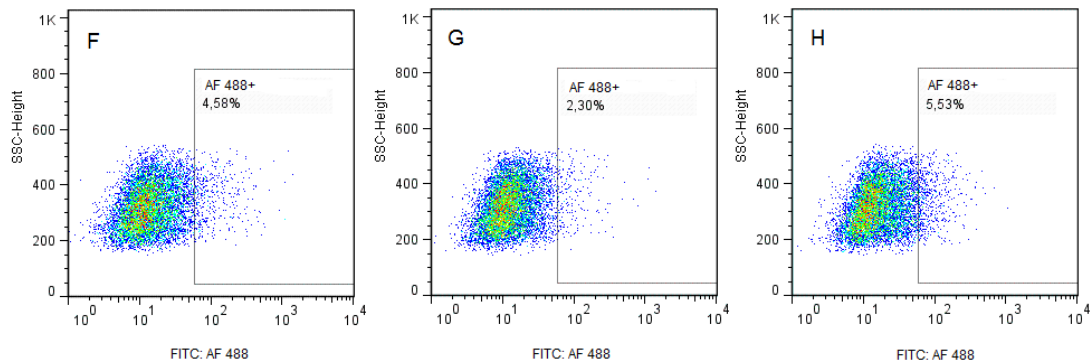
siRNA AF 488-Konzentrationen bei unter 5% (vgl. Abb. 4 bis 6). Somit zeigte ScreenFect in dieser Versuchsreihe bei NK-92-Zellen die höchste Transfektionseffizienz unter den drei Transfektionsreagenzien.



A: NK-92-Zellen und 100 nM Neg. siRNA AF 488 ohne ScreenFect
 B: NK-92-Zellen und 1,5 µl ScreenFect ohne Neg. siRNA AF 488



C-E: NK-92-Zellen, 100 nM Neg. siRNA AF 488 und
 C: 1,5 µl ScreenFect D: 1 µl ScreenFect E: 0,75 µl ScreenFect



F-H: NK-92-Zellen, 20 nM Neg. siRNA AF 488 und
 F: 1,5 µl ScreenFect G: 1 µl ScreenFect H: 0,75 µl ScreenFect

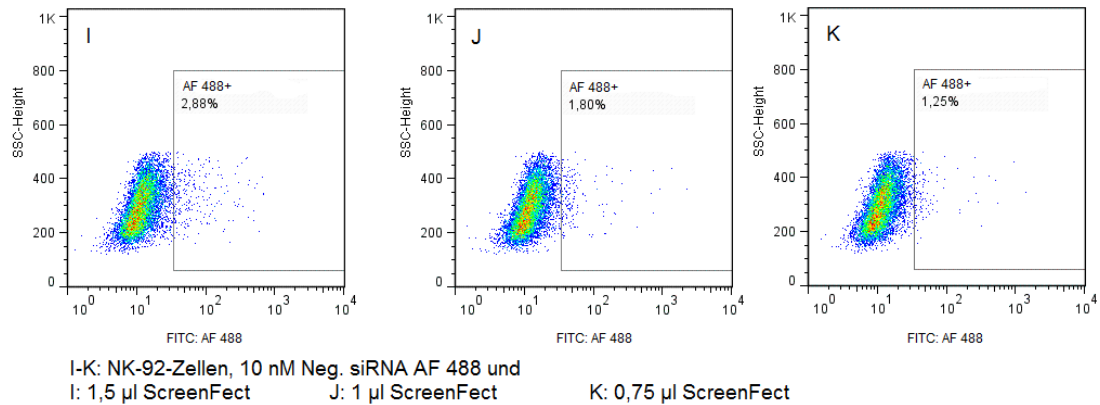
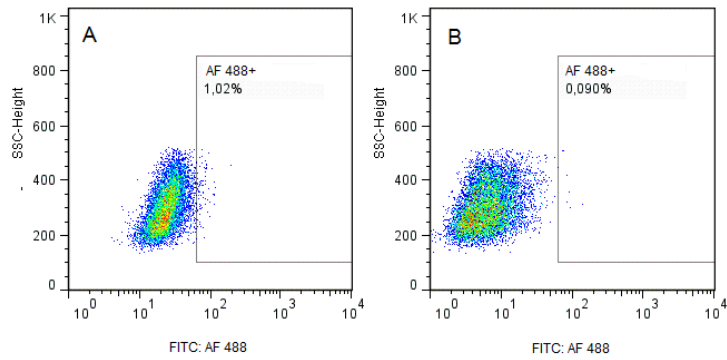
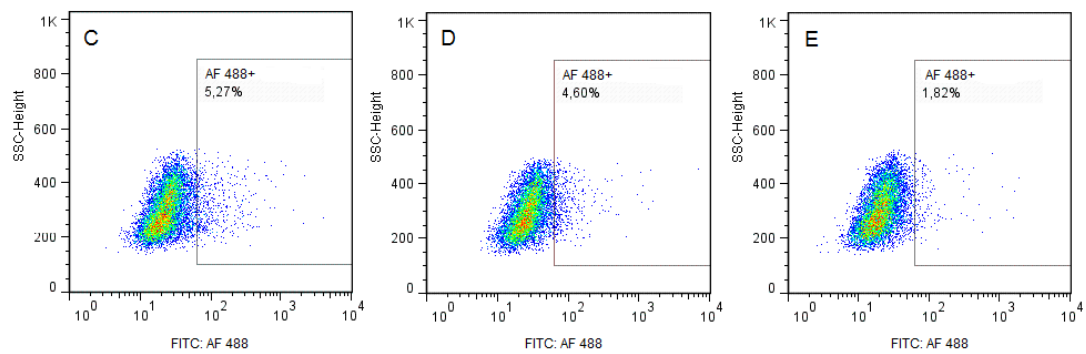


Abbildung 3: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect

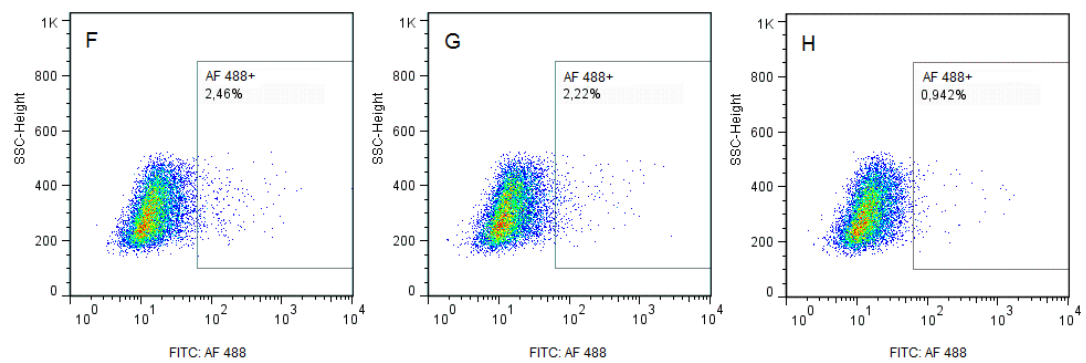
NK-92-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transfektionsreagenzes ScreenFect (100 nM [C, D, E], 20 nM [F, G, H] und 10 nM [I, J, K]) und mit unterschiedlichen Konzentrationen Neg. siRNA AF 488 (1,5 µl [C, F, I], 1 µl [D, G, J] und 0,75 µl [E, H, K]) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 100 nM Neg. siRNA AF 488 und ohne ScreenFect behandelte Zellen (A) und mit 1,5 µl ScreenFect und ohne Neg. siRNA AF 488 behandelte Zellen (B). Mithilfe des Kontroll-Ansatzes A wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-92-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-K angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-92-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Ansatz C zeigt mit 52,9% den höchsten Prozentanteil an AF 488-positiven Zellen. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.



A: NK-92-Zellen und 100 nM Neg. siRNA AF 488 ohne HiPerfect
B: NK-92-Zellen und 9 μ l HiPerfect ohne 100 nM Neg. siRNA AF 488



C-E: NK-92-Zellen, 100 nM Neg. siRNA AF 488 und
C: 9 μ l HiPerfect **D:** 6 μ l HiPerfect **E:** 3 μ l HiPerfect



F-H: NK-92-Zellen, 50 nM Neg. siRNA AF 488 und
F: 9 μ l HiPerfect **G:** 6 μ l HiPerfect **H:** 3 μ l HiPerfect

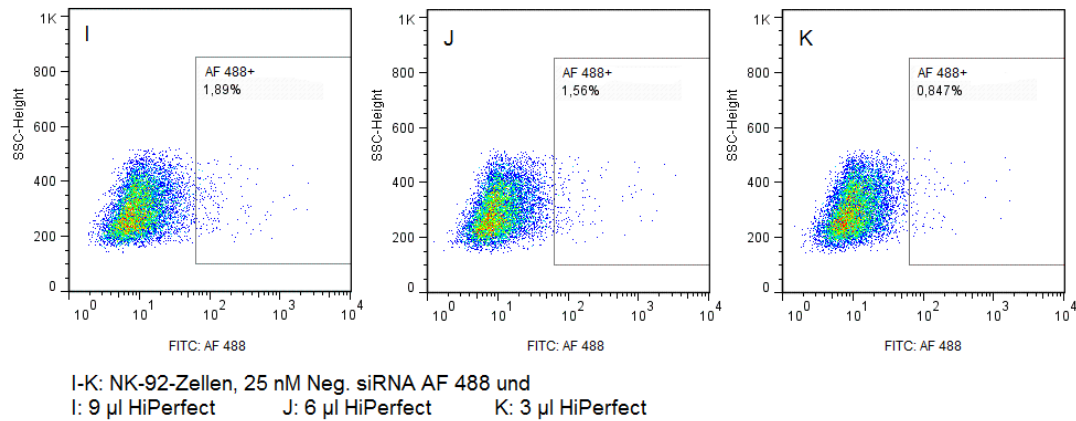
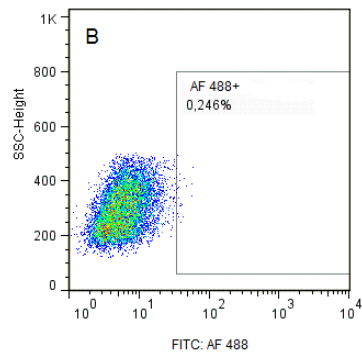
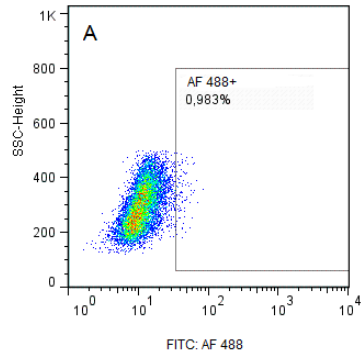
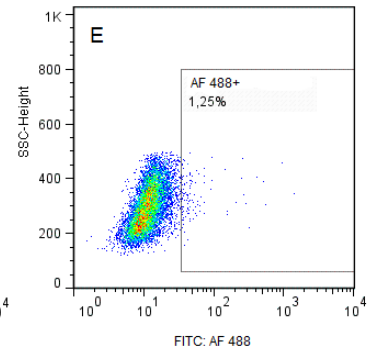
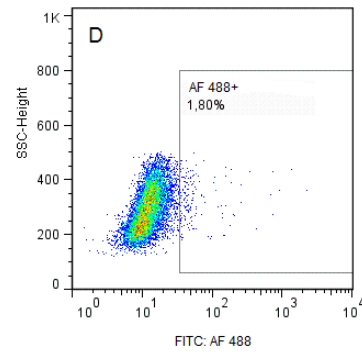
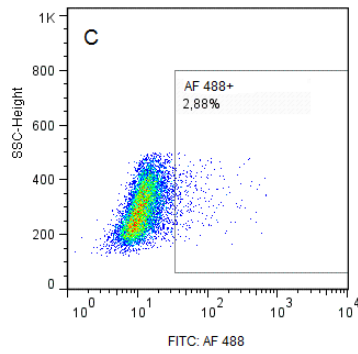


Abbildung 4: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und HiPerfect

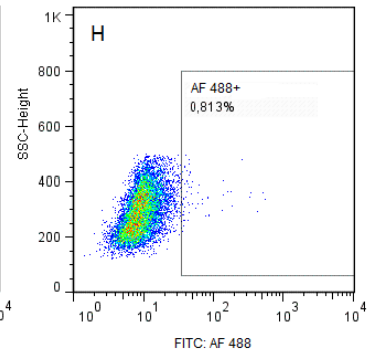
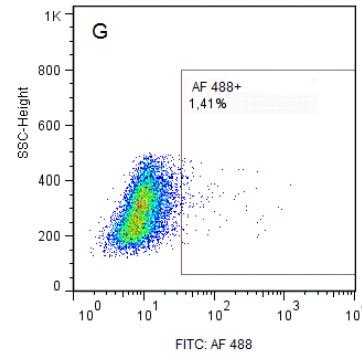
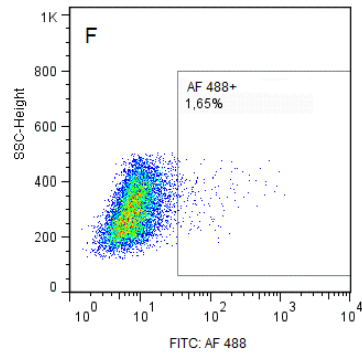
NK-92-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transfektionsreagenzes HiPerfect (100 nM [C, D, E], 50 nM [F, G, H] und 25 nM [I, J, K]) und mit unterschiedlichen Konzentrationen Neg. siRNA AF 488 (9 µl [C, F, I], 6 µl [D, G, J] und 3 µl [E, H, K]) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 100 nM Neg. siRNA AF 488 und ohne HiPerfect behandelte Zellen (A) und mit 9 µl HiPerfect und ohne Neg. siRNA AF 488 behandelte Zellen (B). Mithilfe des Kontroll-Ansatzes A wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-92-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-K angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-92-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. In den Ansätzen C bis K zeigte sich ein Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen von unter 5%. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.



A: NK-92-Zellen und 100 nM Neg. siRNA AF 488 ohne Lipofectamine
 B: NK-92-Zellen und 1,5 µl Lipofectamine ohne Neg. siRNA AF 488



C-E: NK-92-Zellen, 100 nM Neg. siRNA AF 488 und
 C: 1,5 µl Lipofectamine D: 1 µl Lipofectamine E: 0,5 µl Lipofectamine



F-H: NK-92-Zellen, 50 nM Neg. siRNA AF 488 und
 F: 1,5 µl Lipofectamine G: 1 µl Lipofectamine H: 0,5 µl Lipofectamine

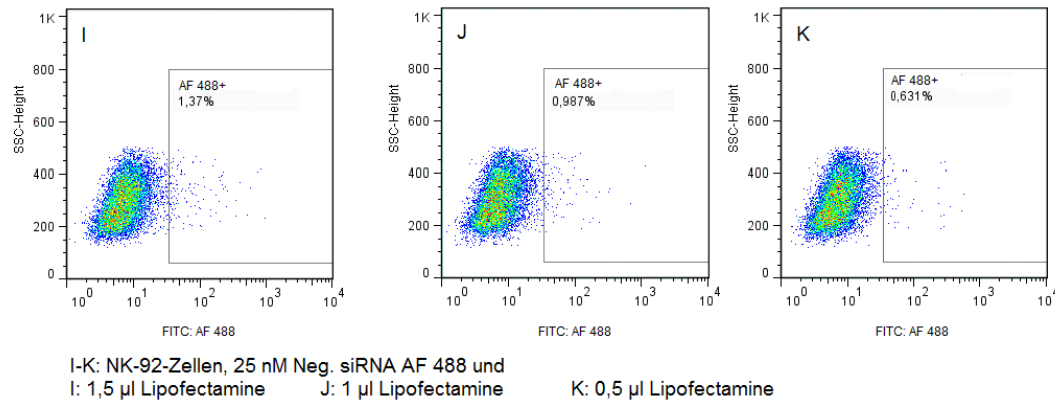
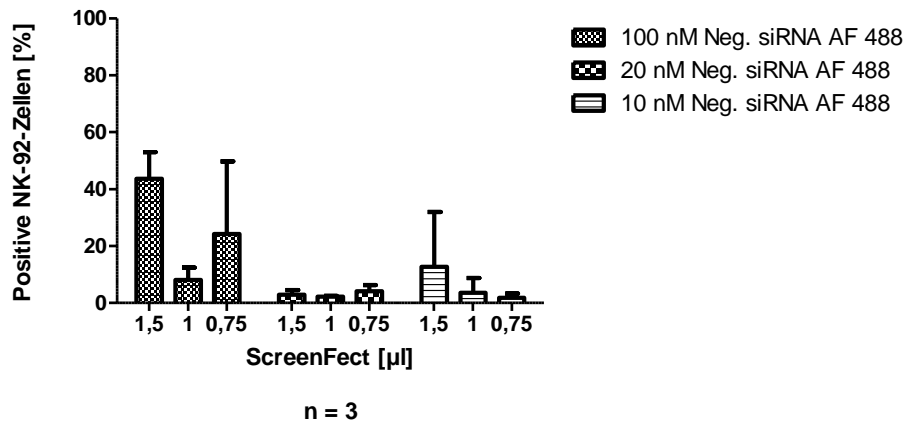


Abbildung 5: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und Lipofectamine

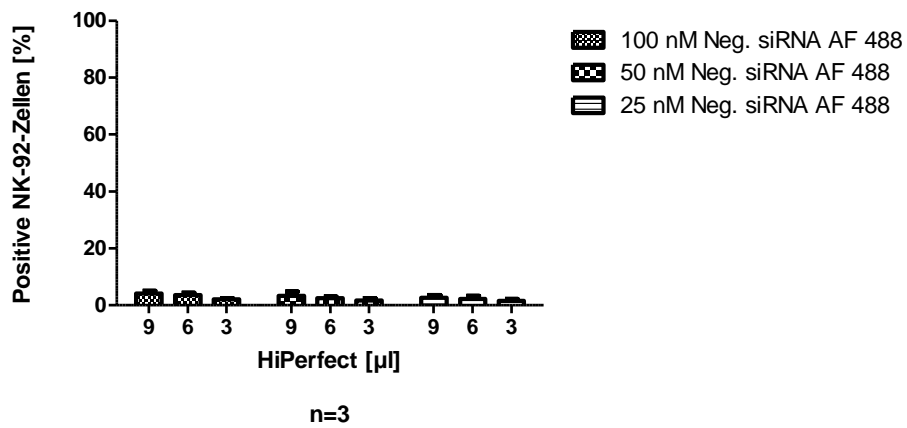
NK-92-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transfektionsreagenzes Lipofectamine (100 nM [C, D, E], 50 nM [F, G, H] und 25 nM [I, J, K]) und mit unterschiedlichen Konzentrationen Neg. siRNA AF 488 (1,5 µl [C, F, I], 1 µl [D, G, J] und 0,5 µl [E, H, K]) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 100 nM Neg. siRNA AF 488 und ohne Lipofectamine behandelte Zellen (A) und mit 1,5 µl Lipofectamine und ohne Neg. siRNA AF 488 behandelte Zellen (B). Mithilfe des Kontroll-Ansatzes A wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-92-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-K angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-92-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. In den Ansätzen C bis K zeigte sich ein Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen von unter 5%. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.

AF 488

A



B



C

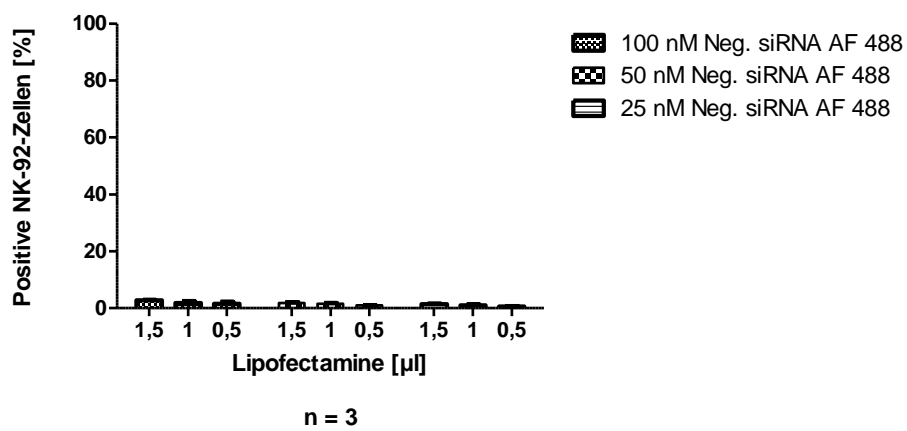


Abbildung 6: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine

Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Transfektion mit:

A: drei verschiedenen ScreenFect-Volumina (1,5 µl, 1 µl und 0,75 µl) in Kombination mit drei verschiedenen Neg. siRNA AF 488- Konzentrationen (100 nM, 20 nM und 10 nM),

B: drei verschiedenen HiPerfect-Volumina (9 µl, 6 µl und 3 µl) in Kombination mit drei verschiedenen Neg. siRNA AF 488- Konzentrationen (100 nM, 50 nM und 25 nM) und

C: drei verschiedenen Lipofectamine-Volumina (1,5 µl, 1 µl und 0,5 µl) in Kombination mit drei verschiedenen Neg. siRNA AF 488- Konzentrationen (100 nM, 50 nM und 25 nM).

Bei ScreenFect (A) lag der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen bei dem höchsten ScreenFect-Volumen von 1,5 µl und gleichzeitig der höchsten Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 100nM bei 43,6%. Bei HiPerfect (B) und Lipofectamine (C) zeigte sich in allen Ansätzen ein mittlerer Prozentanteil an AF 488-positiven NK-92-Zellen von unter 5%. Die Daten zeigen für jedes Transfektionsreagenz jeweils Ergebnisse von n = 3 Spendern.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Transfektionseffizienz per Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nur bei dem Transfektionsreagenz ScreenFect, da dieses bei den NK-92-Zellen die höchste Transfektionseffizienz in der Durchflusszytometrie zeigte (vgl. Abb. 6).

In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte ScreenFect, verglichen mit den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie, eine niedrigere Transfektionseffizienz. 24 Stunden nach Transfektion erschienen

fluoreszierend und damit erfolgreich transfiziert 7,7% der mit 1,5 μ l ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA AF 488 transfizierten NK-92-Zellen (vgl. Abb. 7).

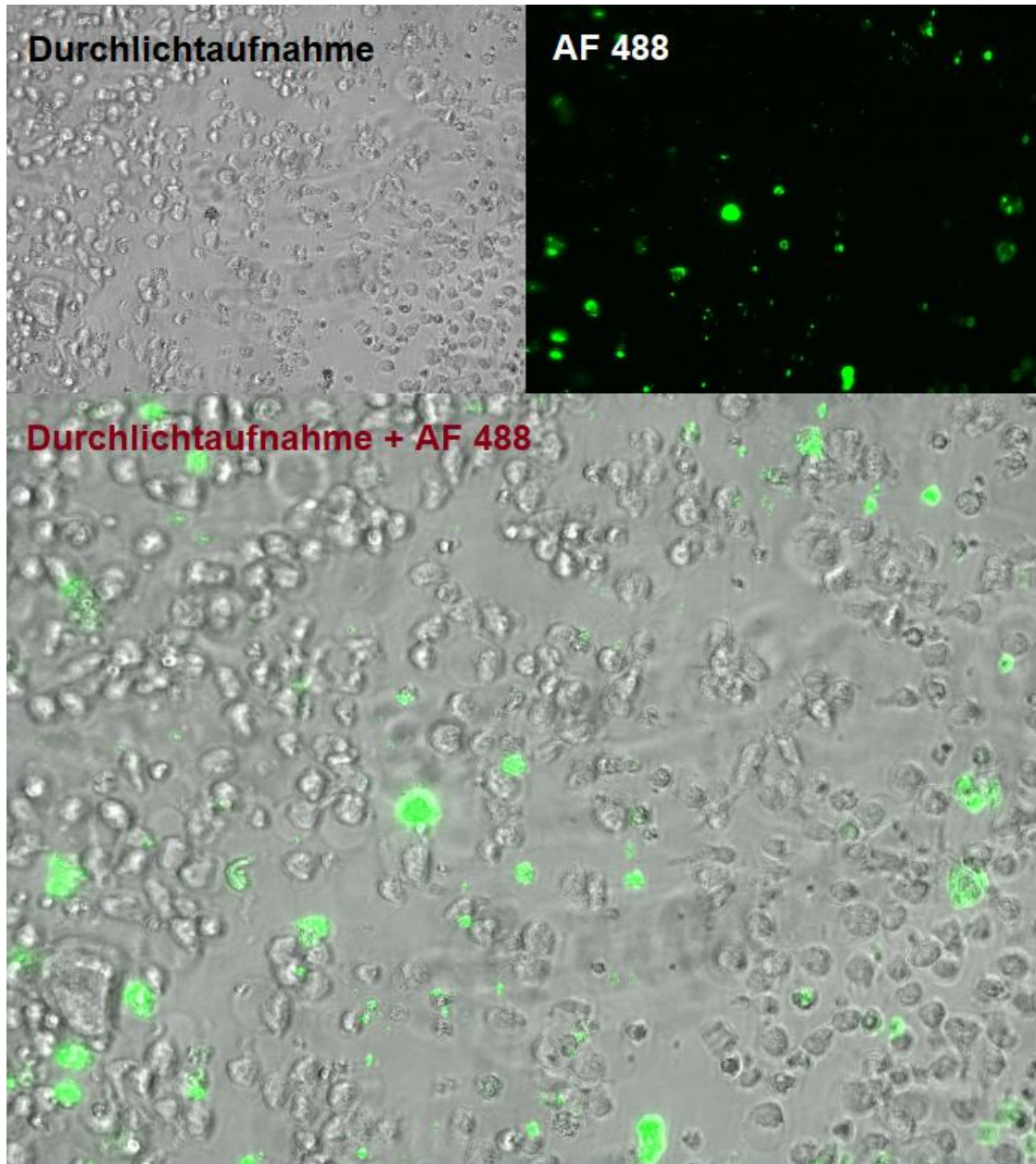


Abbildung 7: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect

NK-92-Zellen wurden mit 1,5 μ l ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA AF 488 transfiziert. Die Aufnahmen erfolgten 24 Stunden nach Transfektion. Es wurde je eine

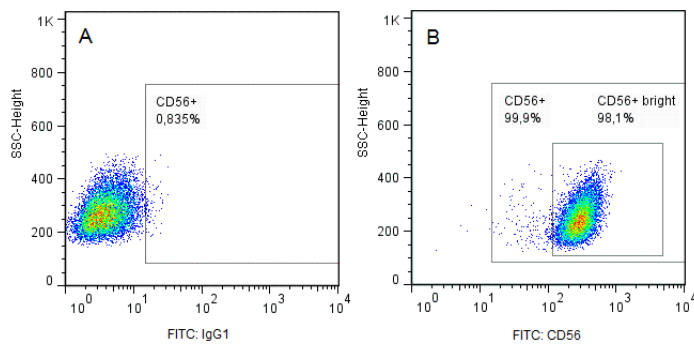
Aufnahme per Durchlichtmikroskopie (oben links) und eine per Fluoreszenzmikroskopie (oben rechts) erstellt. Im Kompositbild aus Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie (unten) erschienen fluoreszierend und damit erfolgreich transfiziert 7,7% der transfizierten NK-92-Zellen. Die Aufnahmen zeigen Ergebnisse von n = 1 Spendern.

CD56-Gen-Knockdown

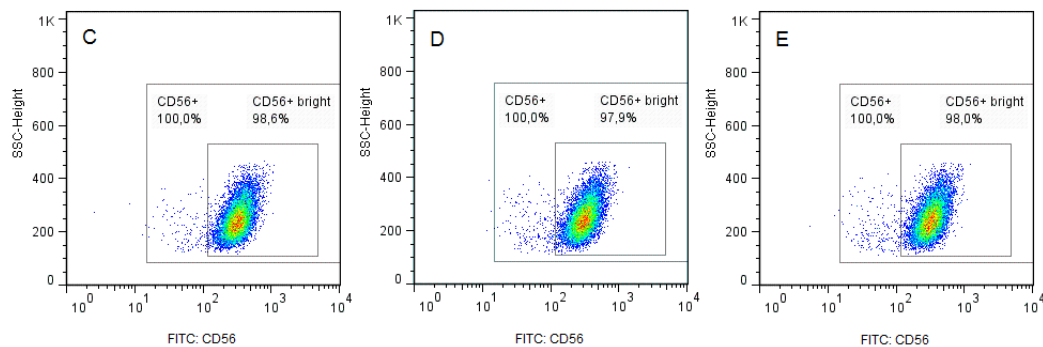
Die Untersuchung der Expression des CD56-Gens nach Transfektion erfolgte nur mit dem Transfektionsreagenz ScreenFect, da dieses bei den NK-92-Zellen die höchste Transfektionseffizienz in der Durchflusszytometrie zeigte. Die Detektion der NK-92-Zellen mit erfolgreich herunterregulierter Expression des CD56-Gens erfolgte auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und auf mRNA-Ebene mittels PCR.

Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind nachfolgend exemplarisch als Grafik mit Zwei-Parameter-Plots (Abb. 8) und zusammenfassend (n=2; Abb. 9) als Säulendiagramm dargestellt. Bei den mit 1,5 µl ScreenFect und mit je 100 nM der vier verschiedenen CD56-siRNAs transfizierten NK-92-Zellen zeigte sich in der Durchflusszytometrie auf Proteinebene keine erfolgreich herunterregulierte Expression des CD56-Gens (vgl. Abb. 8 und 9).



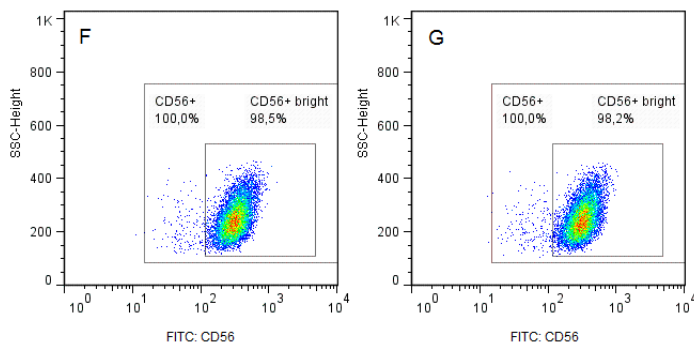
A-B: NK-92-Zellen ohne ScreenFect und ohne siRNA



C-E: NK-92-Zellen, 1,5 μ l ScreenFect und
C: 100 nM CD56-siRNA #2

D: 100 nM CD56-siRNA #3

E: 100 nM CD56-siRNA #4



F-G: NK-92-Zellen, 1,5 μ l ScreenFect und
F: 100 nM CD56-siRNA #5

G: 100 nM Neg. siRNA

Abbildung 8: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, CD56-siRNA bzw. Neg. siRNA und ScreenFect

NK-92-Zellen wurden mit 1,5 μ l ScreenFect und mit 100 nM der vier verschiedenen CD56-siRNA (#2 [C], #3 [D], #4 [E] und #5 [F]) bzw. mit 100 nM Neg. siRNA (G) transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (A-B). Mithilfe des Isotyps in A wurde ein Gate mit CD56-positiven Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-G angewandt. Innerhalb des Gates wurden die CD56-positiven NK-92-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Zusätzlich wurde innerhalb dieses Gates ein Gate mit hell leuchtenden (bright) CD56-positiven NK-92-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt.

Die Definition dieses Gates erfolgte mithilfe des Ansatzes B. Es zeigte sich bei den transfizierten Zellen keine veränderte CD56-Oberflächenexpression im Vergleich zum Ansatz B. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 2 Spendern.

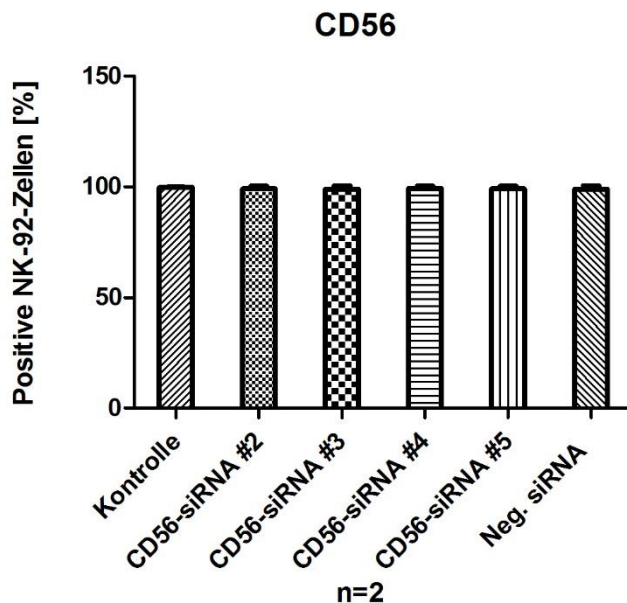


Abbildung 9: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-92-Zellen, CD56-siRNA und ScreenFect

Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an CD56-positiven NK-92-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Transfektion mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM der vier verschiedenen CD56- (#2, #3, #4 und #5) bzw. Neg. siRNA. Als Kontrolle dienten NK-92-Zellen, die weder mit ScreenFect, noch mit siRNA behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei den transfizierten Zellen keine Veränderung der Oberflächenexpression von CD56. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 2 Spendern.

PCR

Bei den mit 1,5 µl ScreenFect und mit 100 nM der vier verschiedenen CD56-siRNA transfizierten NK-92-Zellen zeigte sich in der PCR auf mRNA-Ebene eine minimal herunterregulierte Expression des CD56-Gens. Am stärksten wurde die CD56-Expression mit der CD56-siRNA #4 herunterreguliert auf 81,72% (vgl. Abb. 10).

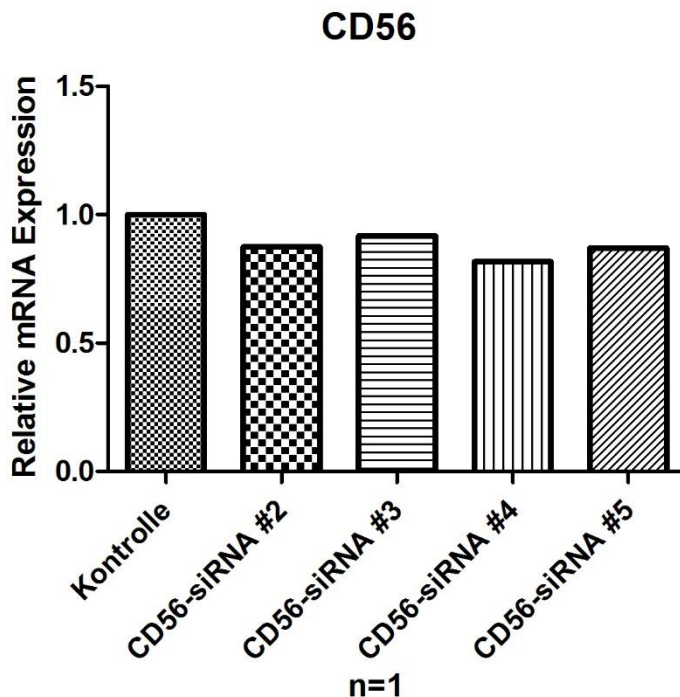


Abbildung 10: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: NK-92-Zellen, 100 nM CD56-siRNA (#2, #3, #4 und #5) und 1,5 µl ScreenFect

Dargestellt wurde die CD56-mRNA-Expression in NK-92-Zellen mit 24 Stunden nach der Transfektion mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM der vier verschiedenen CD56-siRNAs (#2, #3, #4 und #5) in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle dienten mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA transfizierte Zellen. Die Kontrolle wurde mit eins gleichgesetzt. Die CD56-Expression wurde im Vergleich zur Kontrolle am stärksten mit der CD56-siRNA #4 auf 81,72% gesenkt. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 1 Spendern.

3.1.2. Primäre NK-Zellen

Auch bei den primären NK-Zellen wurde 24 Stunden nach Transfektion auf der einen Seite die Transfektionseffizienz per Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie und auf der anderen Seite der CD56-Gen-Knockdown per Durchflusszytometrie und PCR untersucht.

Transfektionseffizienz

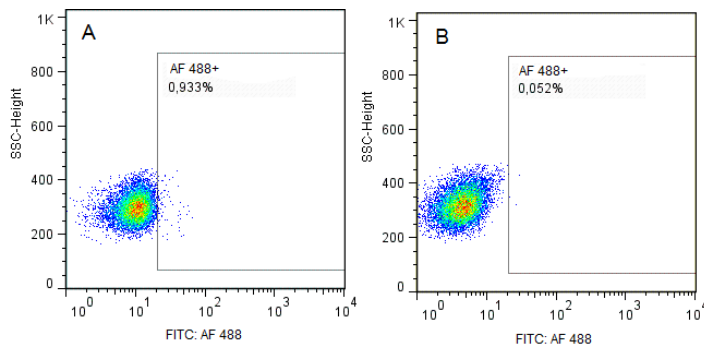
Die Transfektionseffizienz der drei Transfektionsreagenzien ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine wurde mithilfe von Neg. siRNA AF 488 analysiert. Die Detektion der erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie über den FITC-Kanal. Die Zahl der AF 488-positiven Zellen wurde dabei der Zahl der erfolgreich transfizierten Zellen gleichgesetzt.

Durchflusszytometrie

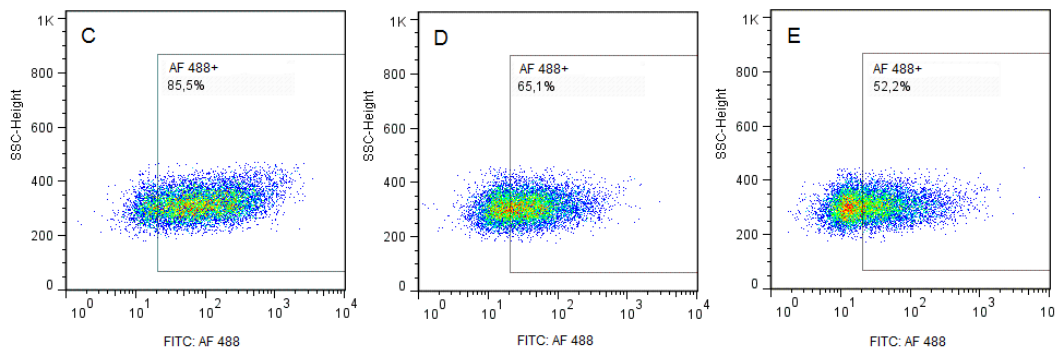
Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind nachfolgend für jedes Transfektionsreagenz exemplarisch als Grafik mit Zwei-Parameter-Plots (Abb. 11, 12 und 13) und zusammenfassend (n=3; Abb. 14) als Säulendiagramm dargestellt.

Insgesamt zeigte sich bei den primären NK-Zellen eine bessere Transfektionseffizienz aller drei Transfektionsreagenzien im Vergleich zu den NK-92-Zellen (vgl. Abb. 11 bis 14). Auch bei den primären NK-Zellen zeigte ScreenFect von den drei Transfektionsreagenzien die höchste Transfektionseffizienz. Der maximale mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven primären NK-Zellen lag bei dem höchsten ScreenFect-Volumen von 1,5 µl und gleichzeitig der höchsten Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 100nM bei 70%. Auch bei niedrigeren ScreenFect-Volumina (1 µl und 0,75 µl) bzw. niedrigeren Neg. siRNA-Konzentrationen (20 nM und 10 nM) wurde eine höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu den NK-92-Zellen erreicht (vgl. Abb. 11 und 14). HiPerfect zeigte im Vergleich zu den NK-92-Zellen eine deutlich höhere Transfektionseffizienz. Der maximale mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven primären NK-Zellen lag bei dem

höchsten HiPerfect-Volumen von 9 μ l und gleichzeitig der höchsten Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 100nM bei 62,4%. Und auch bei HiPerfect wurde bei niedrigeren HiPerfect-Volumina (6 μ l und 3 μ l) bzw. niedrigeren Neg. siRNA-Konzentrationen (50 nM und 25 nM) eine höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu den NK-92-Zellen erreicht (vgl. Abb. 12 und 14). Bei Lipofectamine lag der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven primären NK-Zellen unter 13% statt unter 5% bei den NK-92-Zellen (vgl. Abb. 13 und 14).



A: NK-Zellen und 100 nM Neg. siRNA AF 488 ohne ScreenFect
B: NK-Zellen und 1,5 μ l ScreenFect ohne Neg. siRNA AF 488



C-E: NK-Zellen, 100 nM Neg. siRNA Af 488 und
C: 1,5 μ l ScreenFect **D:** 1 μ l ScreenFect **E:** 0,75 μ l ScreenFect

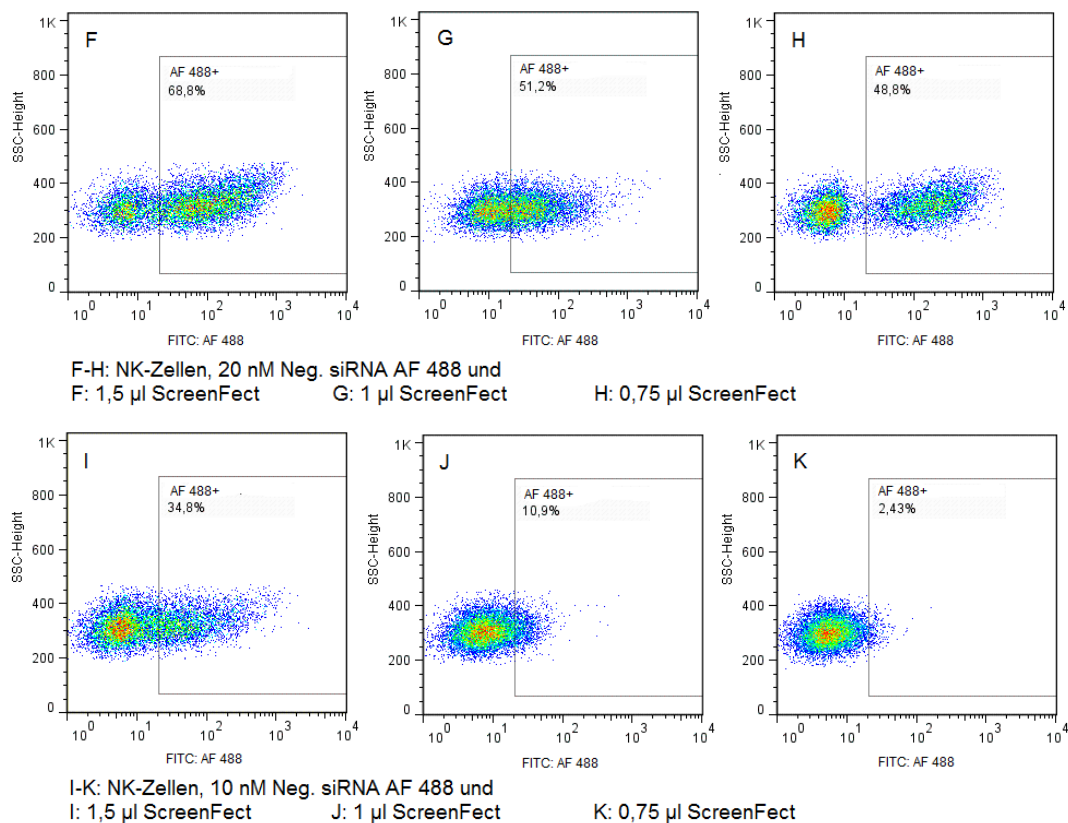
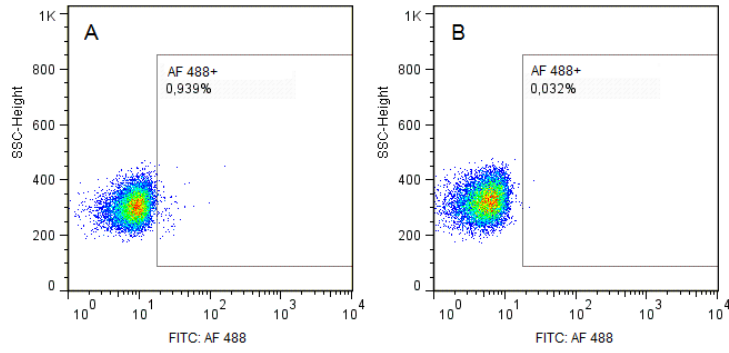
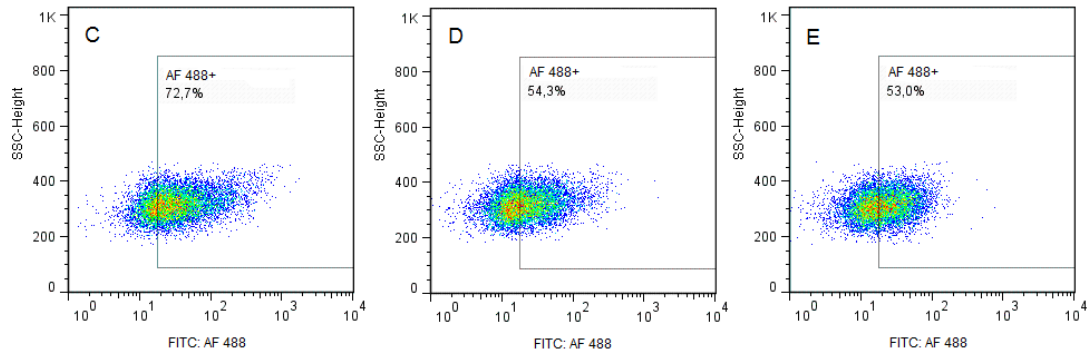


Abbildung 11: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect

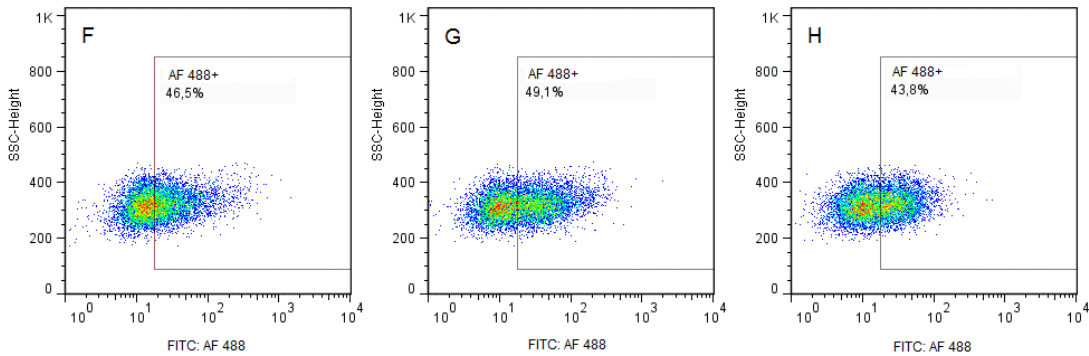
NK-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transfektionsreagenzes ScreenFect (100 nM [C, D, E], 20 nM [F, G, H] und 10 nM [I, J, K]) und mit unterschiedlichen Konzentrationen Neg. siRNA AF 488 (1,5 µl [C, F, I], 1 µl [D, G, J] und 0,75 µl [E, H, K]) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 100 nM Neg. siRNA AF 488 und ohne ScreenFect behandelte Zellen (A) und mit 1,5 µl ScreenFect und ohne Neg. siRNA AF 488 behandelte Zellen (B). Mithilfe des Kontroll-Ansatzes in A wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-K angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Ansatz C zeigt mit 85,5% den höchsten Prozentanteil an AF 488-positiven Zellen. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.



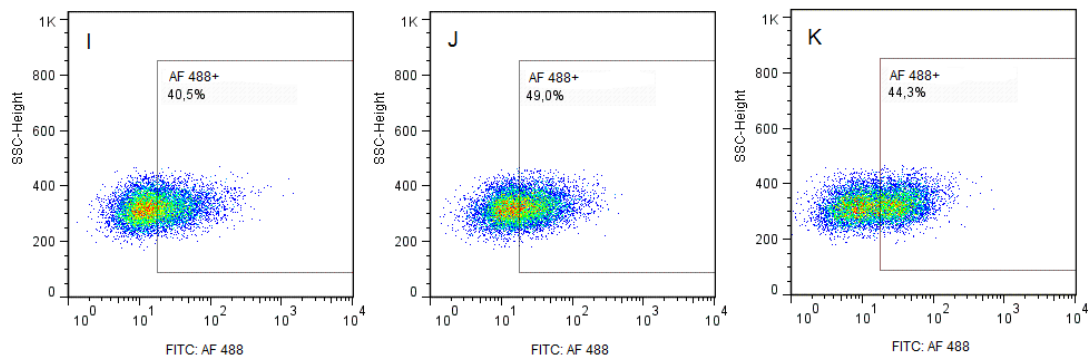
A: NK-Zellen und 100 nM Neg. siRNA AF 488 ohne HiPerfect
B: NK-Zellen und 9 µl HiPerfect ohne Neg. siRNA AF 488



C-E: NK-Zellen, 100 nM Neg. siRNA AF 488 und
C: 9 µl HiPerfect **D:** 6 µl HiPerfect **E:** 3 µl HiPerfect



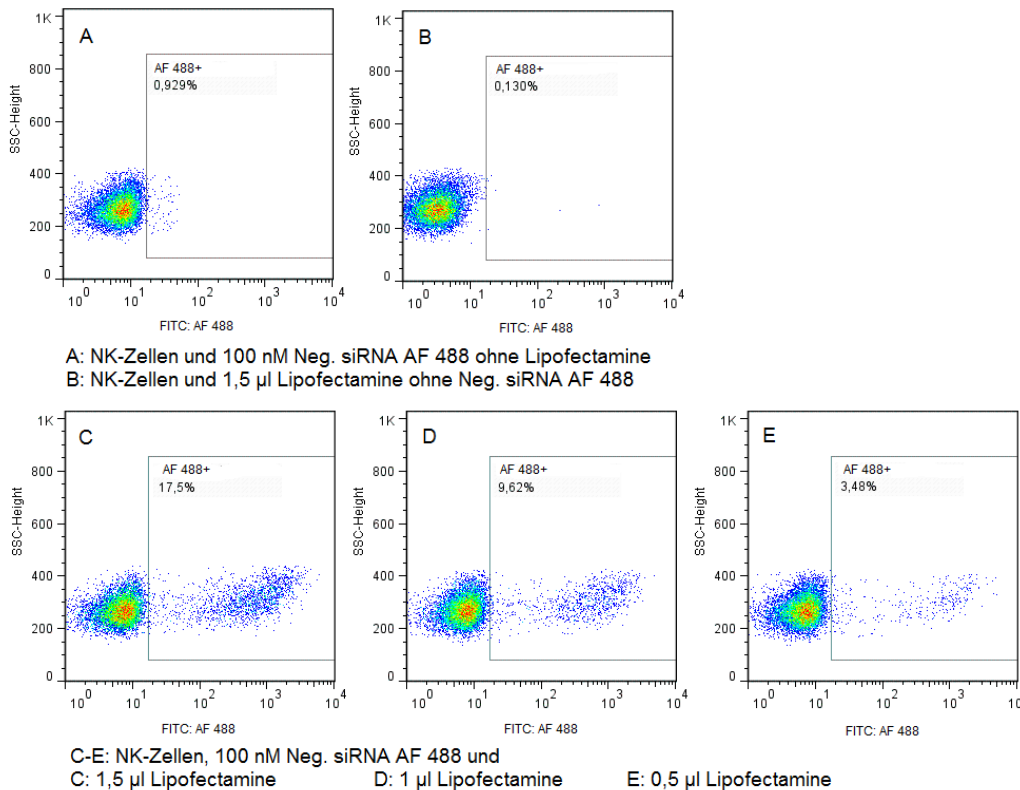
F-H: NK-Zellen, 50 nM Neg. siRNA AF 488 und
F: 9 µl HiPerfect **G:** 6 µl HiPerfect **H:** 3 µl HiPerfect



I-K: NK-Zellen, 25 nM Neg. siRNA AF 488 und
I: 9 µl HiPerfect **J:** 6 µl HiPerfect **K:** 3 µl HiPerfect

Abbildung 12: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und HiPerfect

NK-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transfektionsreagenzes HiPerfect (100 nM [C, D, E], 50 nM [F, G, H] und 25 nM [I, J, K]) und mit unterschiedlichen Konzentrationen Neg. siRNA AF 488 (9 μ l [C, F, I], 6 μ l [D, G, J] und 3 μ l [E, H, K]) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 100 nM Neg. siRNA AF 488 und ohne HiPerfect behandelte Zellen (A) und mit 9 μ l HiPerfect und ohne Neg. siRNA AF 488 behandelte Zellen (B). Mithilfe des Kontroll-Ansatzes in A wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-K angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Ansatz C zeigt mit 72,7% den höchsten Prozentanteil an AF 488-positiven Zellen. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.



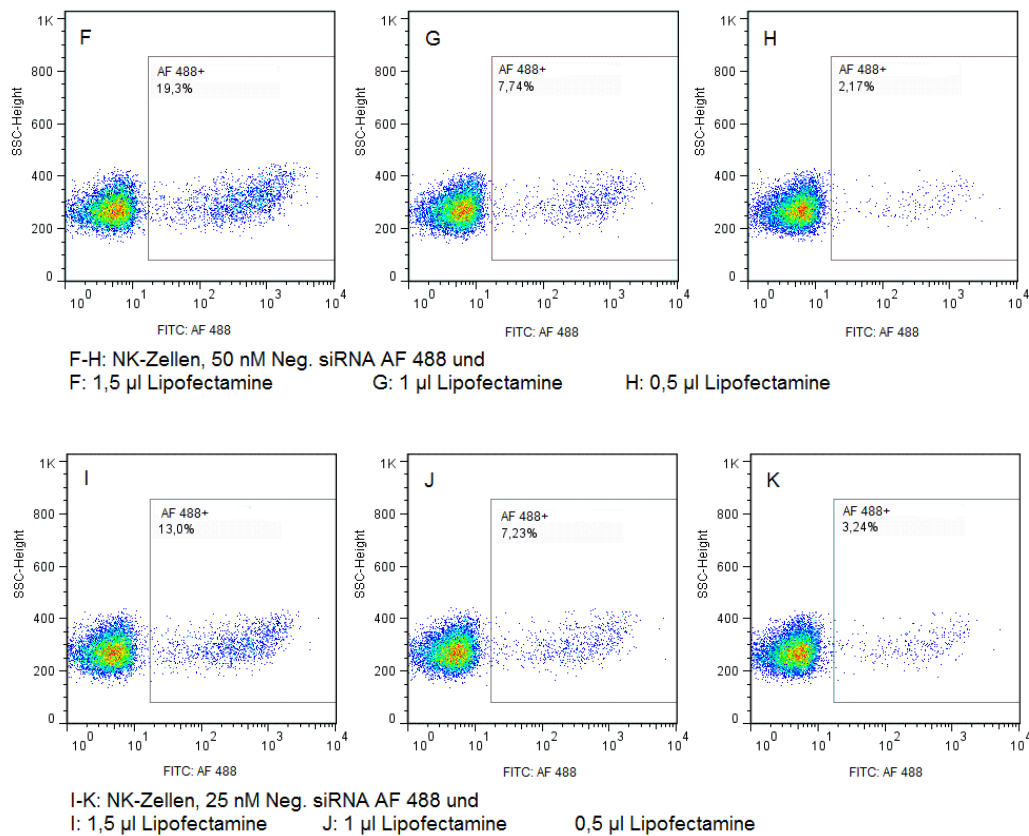
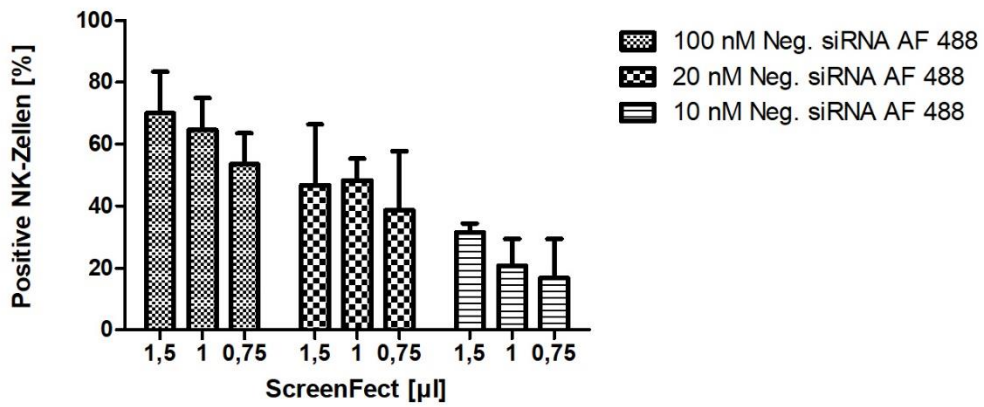


Abbildung 13: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und Lipofectamine

NK-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transfektionsreagenzes Lipofectamine (100 nM [C, D, E], 50 nM [F, G, H] und 25 nM [I, J, K]) und mit unterschiedlichen Konzentrationen Neg. siRNA AF 488 (1,5 µl [C, F, I], 1 µl [D, G, J] und 0,5 µl [E, H, K]) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 100 nM Neg. siRNA AF 488 und ohne Lipofectamine behandelte Zellen (A) und mit 1,5 µl Lipofectamine und ohne Neg. siRNA AF 488 behandelte Zellen (B). Mithilfe des Kontroll-Ansatzes in A wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-K angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Ansatz F zeigt mit 19,3% den höchsten Prozentanteil an AF 488-positiven Zellen. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.

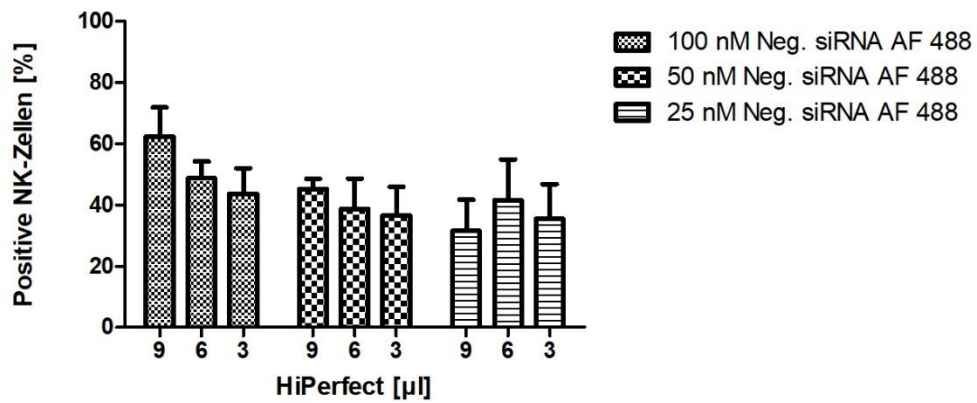
AF 488

A



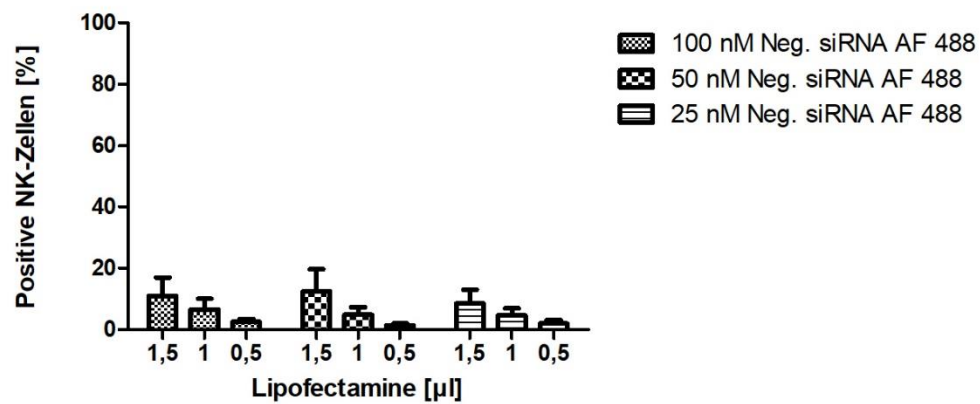
n = 3

B



n=3

C



n = 3

Abbildung 14: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine

Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Transfektion mit:

A: drei verschiedenen ScreenFect-Volumina (1,5 µl, 1 µl und 0,75 µl) in Kombination mit drei verschiedenen Neg. siRNA AF 488- Konzentrationen (100 nM, 20 nM und 10 nM),

B: drei verschiedenen HiPerfect-Volumina (9 µl, 6 µl und 3 µl) in Kombination mit drei verschiedenen Neg. siRNA AF 488- Konzentrationen (100 nM, 50 nM und 25 nM) und

C: drei verschiedenen Lipofectamine-Volumina (1,5 µl, 1 µl und 0,5 µl) in Kombination mit drei verschiedenen Neg. siRNA AF 488- Konzentrationen (100 nM, 50 nM und 25 nM).

Bei ScreenFect (A) lag der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-Zellen bei dem höchsten ScreenFect-Volumen von 1,5 µl und gleichzeitig der höchsten Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 100nM bei 70%. Bei HiPerfect (B) lag der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven NK-Zellen bei dem höchsten HiPerfect-Volumen von 9 µl und gleichzeitig der höchsten Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 100nM bei 62,40%. Bei Lipofectamine (C) zeigte sich in allen Ansätzen ein mittlerer Prozentanteil an AF 488-positiven NK-Zellen von unter 13%. Die Daten zeigen für jedes Transfektionsreagenz jeweils Ergebnisse von n = 3 Spendern.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Transfektionseffizienz per Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nur bei dem Transfektionsreagenz ScreenFect, da dieses auch bei den primären NK-Zellen die höchste Transfektionseffizienz in der Durchflusszytometrie zeigte (vgl. Abb. 14).

In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte ScreenFect, verglichen mit den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie, eine niedrigere

Transfektionseffizienz. Fluoreszierend und damit erfolgreich transfiziert erschienen 26,83% der mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA AF 488 transfizierten primären NK-Zellen (vgl. Abb. 15). Die im Hintergrund der Abb. 15 sichtbaren kleineren fluoreszierenden Strukturen, hielten wir für Komplexe aus Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect. Diese Vermutung konnten wir in einem Kontroll-Ansatz aus 100 nM Neg. siRNA AF 488 und 1,5 µl ScreenFect ohne primäre NK-Zellen bestätigen (vgl. Abb. 16).

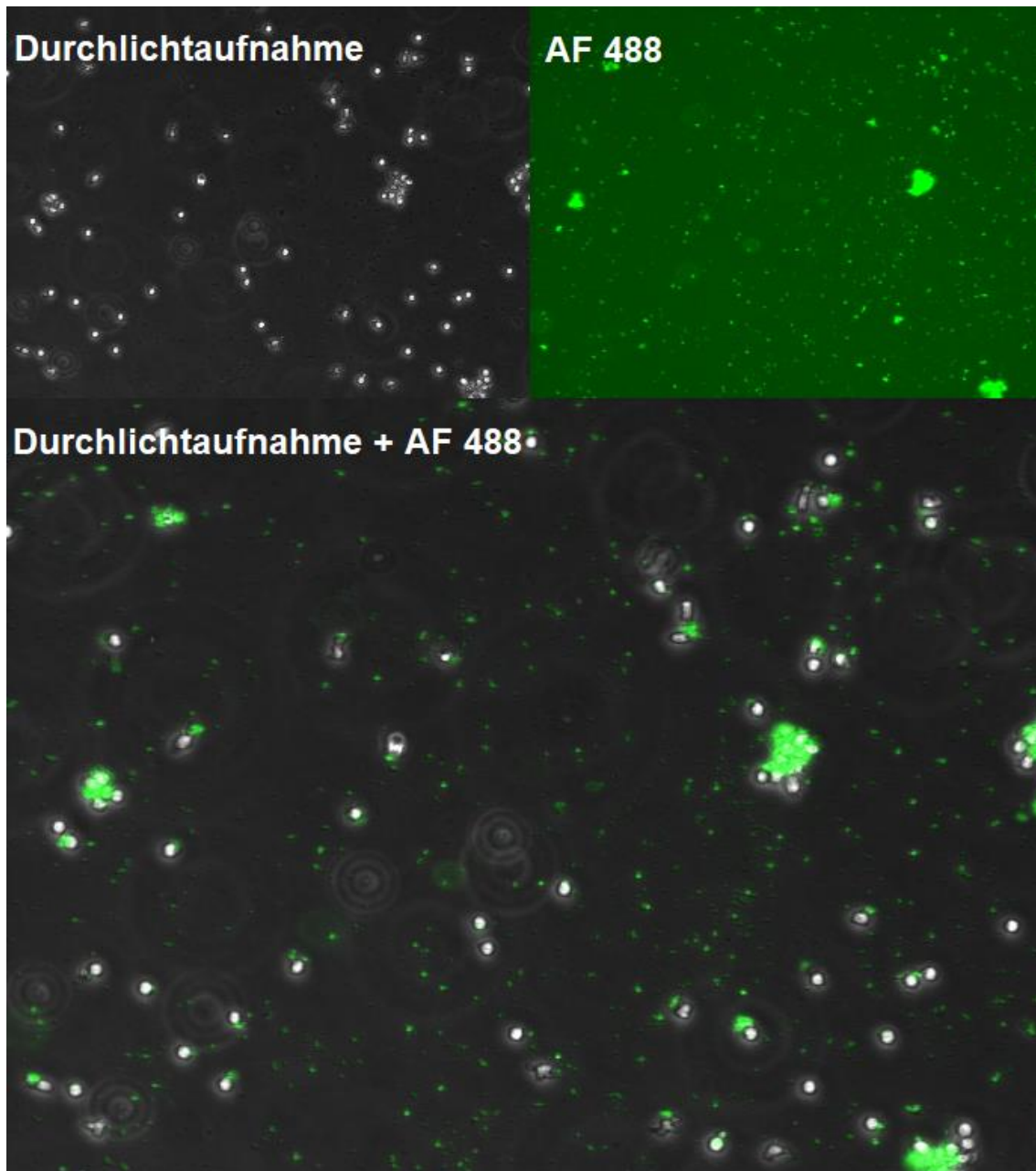


Abbildung 15: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie: primäre NK-Zellen, 100 nM Neg. siRNA AF 488 und 1,5 μ l ScreenFect

NK-Zellen wurden mit 1,5 μ l ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA AF 488 transfiziert. Die Aufnahmen erfolgten 24 Stunden nach Transfektion. Es wurde je eine Aufnahme per Durchlichtmikroskopie (oben links) und eine per Fluoreszenzmikroskopie (oben rechts) erstellt. Im Kompositbild aus Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie (unten) erschienen fluoreszierend und damit erfolgreich transfiziert 26,83% der transfizierten NK-Zellen. Die Aufnahmen zeigen Ergebnisse von n = 1 Spendern.

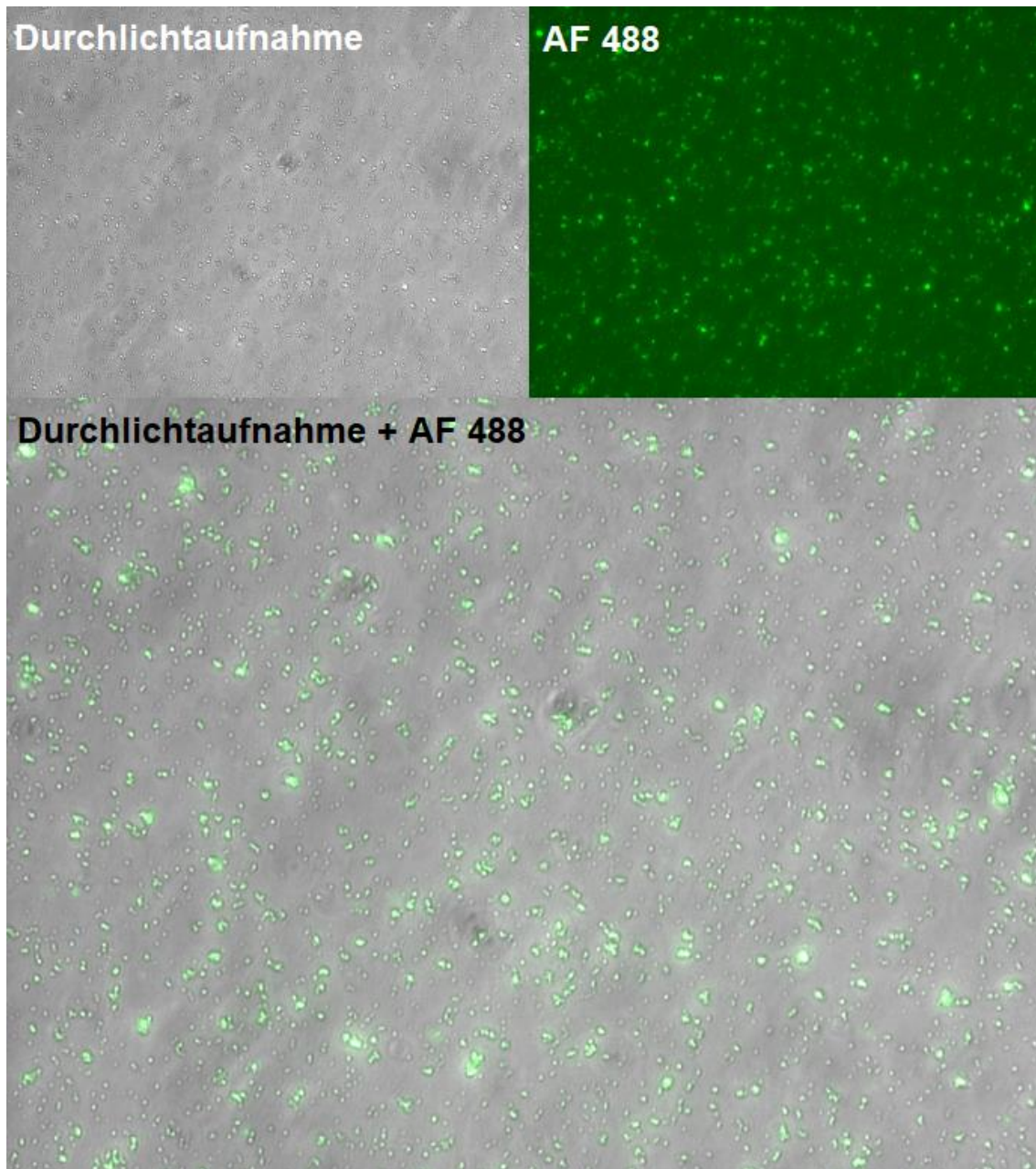


Abbildung 16: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie: 100 nM Neg. siRNA AF 488 und 1,5 μ l ScreenFect ohne primäre NK-Zellen

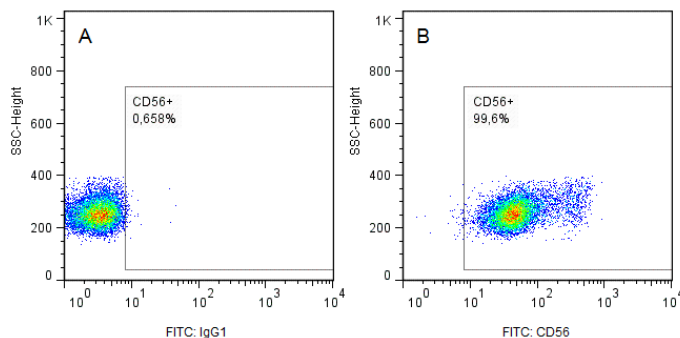
Die Aufnahmen erfolgten 24 Stunden nach Inkubation von 1,5 μ l ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA AF 488. Es wurde je eine Aufnahme per Durchlichtmikroskopie (oben links) und eine per Fluoreszenzmikroskopie (oben rechts) erstellt. Im Kompositbild aus Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie (unten) erschienen fast alle winzigen Strukturen fluoreszierend. Sie stellen am ehesten Komplexe aus Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect dar. Die Aufnahmen zeigen Ergebnisse von n = 1 Spendern.

CD56-Gen-Knockdown

Die Detektion der transfizierten primären NK-Zellen mit erfolgreich herunterregulierter Expression des CD56-Gens erfolgte nur für das Transfektionsreagenz ScreenFect auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und auf mRNA-Ebene mittels PCR.

Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind nachfolgend exemplarisch als Grafik mit Zwei-Parameter-Plots (Abb. 17) und zusammenfassend in zwei Säulendiagrammen dargestellt. Die Versuche mit den CD56-siRNAs #2, #3, #4 und #5 wurden zwei Mal durchgeführt (n=2; Abb. 18 A) und die Versuche mit den CD56-siRNAs #8 und #9 wurden drei Mal durchgeführt (n=3; Abb. 18 B). Bei den mit 1,5 µl ScreenFect und mit 100 nM der sechs verschiedenen CD56-siRNAs transfizierten primären NK-Zellen zeigte sich in der Durchflusszytometrie auf Proteinebene keine erfolgreich herunterregulierte Expression des CD56-Gens (vgl. Abb. 18).



A-B: NK-Zellen ohne ScreenFect und ohne siRNA

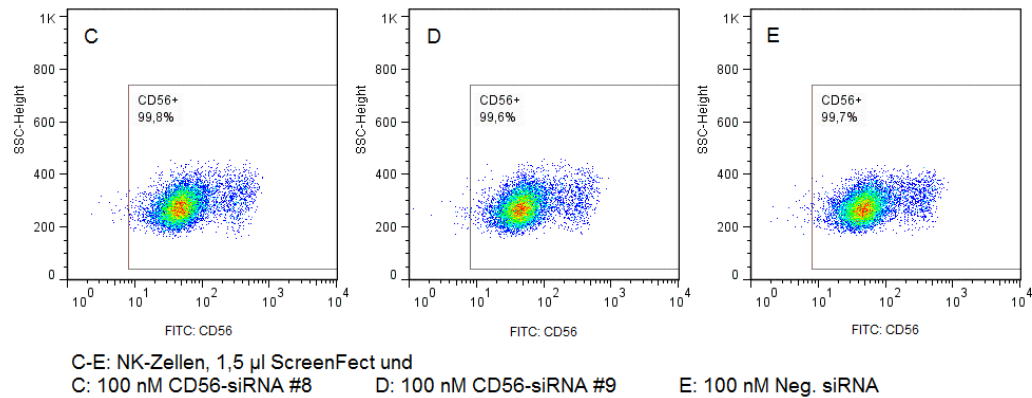


Abbildung 17: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, 100 nM CD56-siRNA bzw. Neg. siRNA und 1,5 μ l ScreenFect

NK-Zellen wurden mit 1,5 μ l ScreenFect und mit 100 nM der zwei verschiedenen CD56-siRNA (#8 [C], #9 [D]) bzw. mit 100 nM Neg. siRNA (E) transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (A-B). Mithilfe des Isotyps in A wurde ein Gate mit CD56-positiven Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-E angewandt. Innerhalb des Gates wurden die CD56-positiven primären NK-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Es zeigte sich keine veränderte CD56-Oberflächenexpression im Vergleich zum Ansatz B. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.

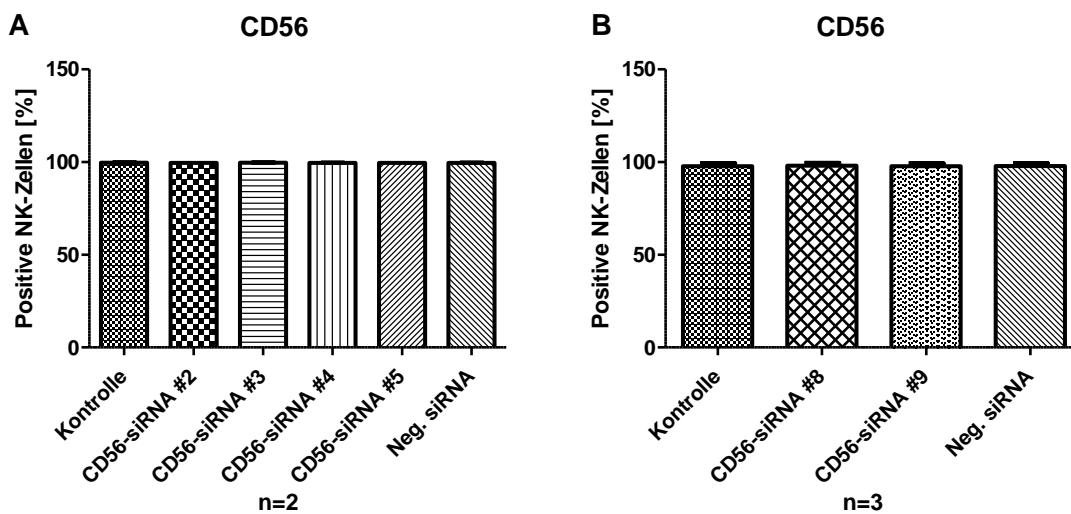


Abbildung 18: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-Zellen, 100 nM CD56-siRNA (#2, #3, #4, #5, #8 und #9) und 1,5 µl ScreenFect

A: Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an CD56-positiven NK-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Transfektion mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM der vier verschiedenen CD56- (#2, #3, #4 und #5) bzw. Neg. siRNA. Als Kontrolle dienen NK-Zellen, die weder mit ScreenFect, noch mit siRNA behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich keine Veränderung der Oberflächenexpression von CD56. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 2 Spendern.

B: Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an CD56-positiven NK-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Transfektion mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM der zwei verschiedenen CD56- (#8 und #9) bzw. Neg. siRNA. Als Kontrolle dienen NK-Zellen, die weder mit ScreenFect, noch mit siRNA behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich keine Veränderung der Oberflächenexpression von CD56. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 3 Spendern.

PCR

Bei den mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM CD56-siRNA transfizierten primären NK-Zellen zeigte sich in der PCR auf mRNA-Ebene eine minimal herunterregulierte Expression des CD56-Gens nur mit den

CD56-siRNAs #8 und #9. Am stärksten wurde die CD56-Expression mit der CD56-siRNA #9 nichtsignifikant (P-Wert = 0,6) herunterreguliert auf 93,68% (vgl. Abb. 19).

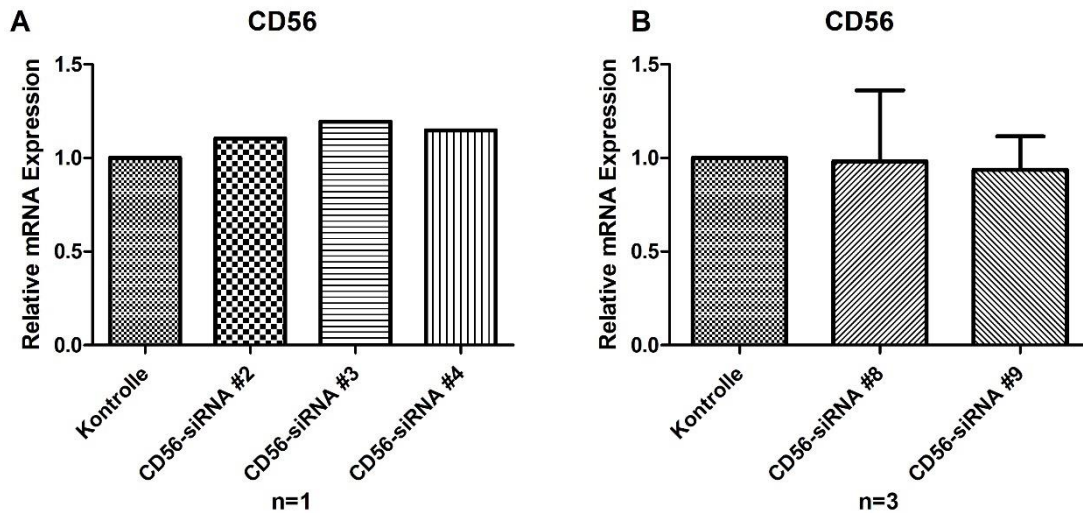


Abbildung 19: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: NK-Zellen, 100 nM CD56-siRNA (#2, #3, #4, #8 und #9) und 1,5 µl ScreenFect

- A: Dargestellt wurde die CD56-mRNA-Expression in NK-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM der vier verschiedenen CD56-siRNAs (#2, #3, #4 und #5) in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle dienten mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA transfizierte Zellen. Die Kontrolle wurde mit eins gleichgesetzt. Es zeigt sich in keinem Ansatz eine Herunterregulation der CD56-Expression. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 1 Spendern.
- B: Dargestellt wurde die mittlere CD56-mRNA-Expression in NK-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Transfektion mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM der zwei verschiedenen CD56-siRNAs (#8 und #9) in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle dienten mit 1,5 µl ScreenFect und 100 nM Neg. siRNA transfizierte Zellen. Die Kontrolle wurde mit eins gleichgesetzt. Die CD56-Expression wurde im Vergleich zur Kontrolle am stärksten mit der CD56-siRNA #9 nichtsignifikant (P-Wert = 0,6) auf 93,68% gesenkt. Statistische Analysen wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten t-Test durchgeführt. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 3 Spendern.

3.2. Elektroporation

Per Elektroporation wurden ausschließlich primäre NK-Zellen transfiziert. Es wurde 24 Stunden nach Transfektion auf der einen Seite die Transfektionseffizienz per Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie und auf der anderen Seite der CD56-Gen-Knockdown per Durchflusszytometrie und PCR untersucht.

Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz der Elektroporation wurde mithilfe von Neg. siRNA AF 488 analysiert. Die Detektion der erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie über den FITC-Kanal. Die Zahl der AF 488-positiven Zellen wurde dabei der Zahl der erfolgreich transfizierten Zellen gleichgesetzt.

Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind nachfolgend exemplarisch als Grafik mit Zwei-Parameter-Plots für das Elektroporationsprogramm DN-100 (Abb. 20) und zusammenfassend als Säulendiagramm für alle Elektroporationsprogramme dargestellt (Abb. 21).

Da das Programm DN-100 im Vergleich zu den anderen fünf Elektroporationsprogrammen die höchste Transfektionseffizienz von 94,50% bei gleichzeitig hoher Zellviabilität von 78,90% zeigte, wurden die Ansätze mit diesem Programm noch zweimal wiederholt (vgl. Abb. 21). Der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven primären NK-Zellen lag bei dem Programm DN-100 und einer Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 300nM bei 95,93% bei einer mittleren Zellviabilität von 59,07%.

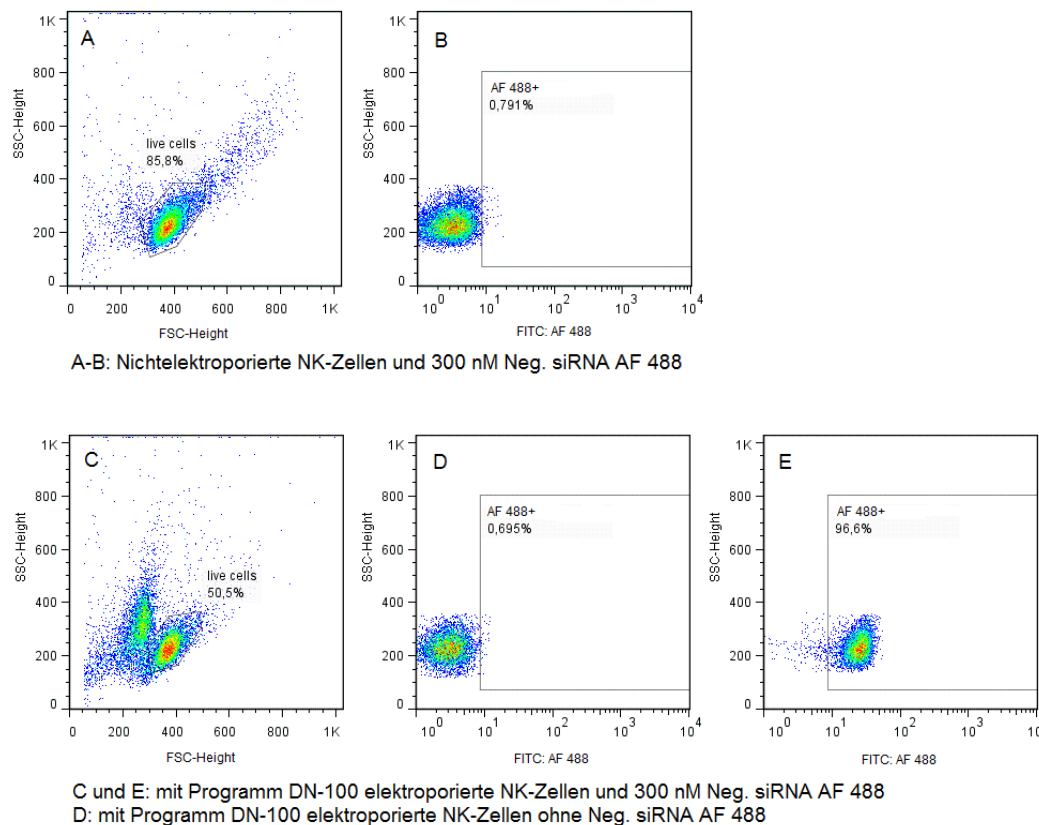


Abbildung 20: Durchflusszytometrie: mit Programm DN-100 elektroporierte primäre NK-Zellen und 300 nM Neg. siRNA AF 488

NK-Zellen wurden mit dem Elektroporationsprogramm DN-100 und mit 300 nM Neg. siRNA AF 488 (C, E) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 300 nM Neg. siRNA AF 488 nichtelektroporierte Zellen (A, B) und ohne Neg. siRNA AF 488 elektroporierte Zellen (D). In A und C wurde der Prozentanteil der viablen NK-Zellen dargestellt. Mithilfe des Kontroll-Ansatzes in B wurde ein Gate mit AF 488-positiven NK-Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze D-E angewandt. Innerhalb des Gates wurden die AF 488-positiven NK-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Ansatz C bzw. E zeigt mit 96,6% einen sehr hohen Prozentanteil an AF 488-positiven Zellen bei einer Zellviabilität von 50,5%. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Elektroporation. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.

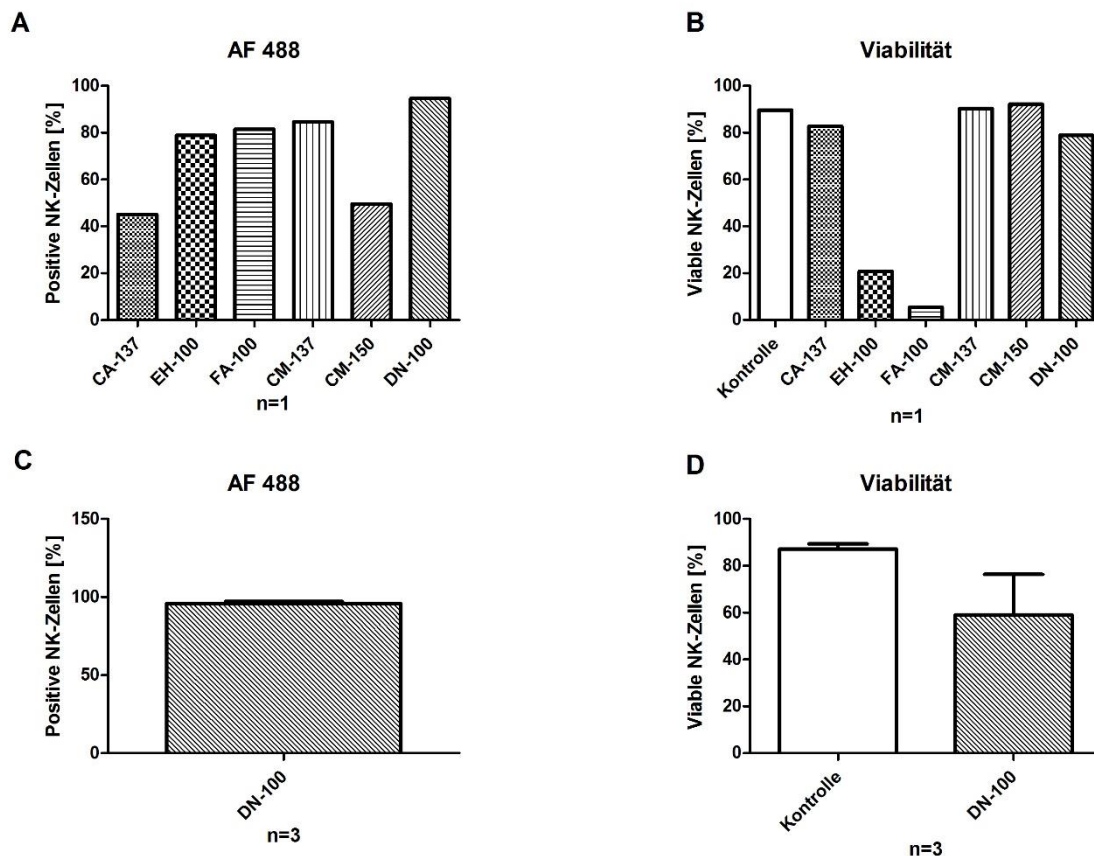


Abbildung 21: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: Mit sechs verschiedenen Programmen elektroporierte NK-Zellen und 300 nM Neg. siRNA AF 488

Dargestellt wurde der Prozentanteil an AF 488-positiven NK-Zellen (A) und an viablen NK-Zellen (B) 24 Stunden nach der Elektroporation mit sechs verschiedenen Programmen (CA-137, EH-100, FA-100, CM-137, CM-150 und DN-100) und 300 nM Neg. siRNA AF 488. Da das Programm DN-100 die höchste Transfektionseffizienz von 94,50% bei gleichzeitig hoher Zellviabilität von 78,90% zeigte, wurden die Ansätze mit diesem Programm noch zweimal durchgeführt. Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an AF-488-positiven NK-Zellen mit Standardabweichung (C) und an viablen primären NK-Zellen (D) mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Elektroporation mit DN-100. Der mittlere Prozentanteil an AF 488-positiven primären NK-Zellen lag bei dem Programm DN-100 und einer Neg. siRNA AF 488-Konzentration von 300nM bei 95,93% bei einer mittleren Zellviabilität von 59,07%. Als Kontrolle für die Viabilität dienten unbehandelte NK-Zellen. Bei den unbehandelten Zellen zeigte sich in B eine Viabilität von 89,60% und in D eine mittlere Viabilität von 87,23%. Die Daten zeigen für das Programm DN-100 Ergebnisse von n = 3 Spendern und für die

Programme CA-137, EH-100, FA-100, CM-137, CM-150 Ergebnisse von n = 1 Spendern.

Fluoreszenzmikroskopie

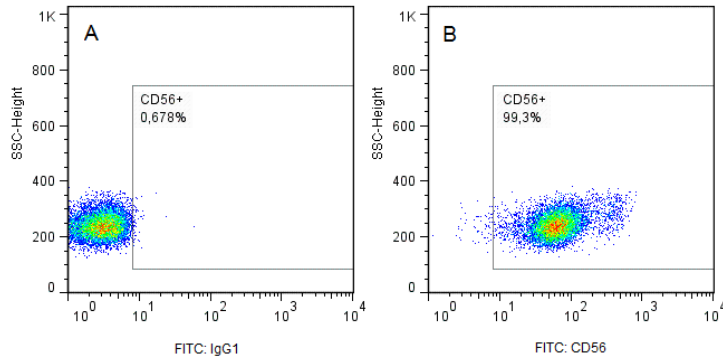
In der Fluoreszenzmikroskopie zeigten die mit dem Elektroporationsprogramm DN-100 und mit 300 nM Neg. siRNA AF 488 transfizierten primären NK-Zellen kein detektierbares fluoreszierendes Signal im FITC-Kanal.

CD56-Gen-Knockdown

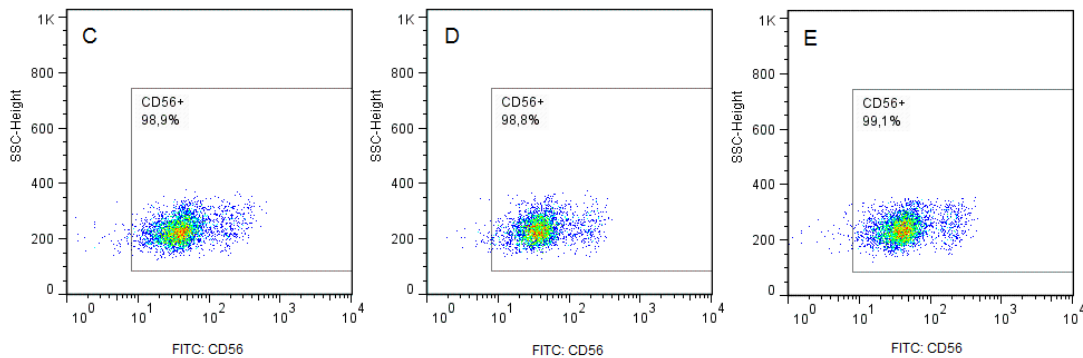
Die Detektion der elektroporierten primären NK-Zellen mit erfolgreich herunterregulierter Expression des CD56-Gens erfolgte auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und auf mRNA-Ebene mittels PCR nur für das Programm DN-100.

Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind nachfolgend exemplarisch als Grafik mit Zwei-Parameter-Plots (Abb. 22) und zusammenfassend als Säulendiagramm dargestellt (n=3; Abb. 23). Bei den mit 300 nM CD56-siRNA und mit dem Elektroporationsprogramm DN-100 transfizierten primären NK-Zellen zeigte sich in der Durchflusszytometrie auf Proteinebene keine erfolgreich herunterregulierte Expression des CD56-Gens (vgl. Abb. 22 und 23).



A-B: Nichtelektroporierte NK-Zellen ohne siRNA



C-E: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und
 C: 300 nM CD56-siRNA # 8 D: 300 nM CD56-siRNA #9 E: 300 nM Neg. siRNA

Abbildung 22: Durchflusszytometrie: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und 300 nM CD56-siRNA bzw. Neg. siRNA

NK-Zellen wurden mit dem Programm DN-100 und mit 300 nM der zwei verschiedenen CD56-siRNA (#8 [C], #9 [D]) bzw. mit 300 nM Neg. siRNA (E) elektroporiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (A-B). Mithilfe des Isotyps in A wurde ein Gate mit CD56-positiven Zellen definiert. Dieses wurde auf die Ansätze B-E angewandt. Innerhalb des Gates wurden die CD56-positiven NK-92-Zellen mit ihrem Prozentanteil dargestellt. Es zeigte sich keine veränderte CD56-Oberflächenexpression im Vergleich zum Ansatz B. Die Durchflusszytometrie erfolgte 24 Stunden nach Elektroporation. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von n = 3 Spendern.

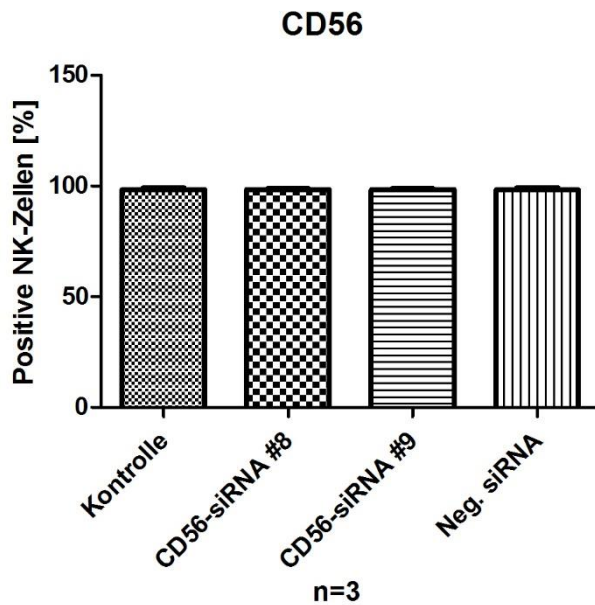


Abbildung 23: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und 300 nM CD56-siRNA (#8 und #9)

Dargestellt wurde der mittlere Prozentanteil an CD56-positiven NK-Zellen mit Standardabweichung 24 Stunden nach der Elektroporation mit dem Programm DN-100 und 300 nM der zwei verschiedenen CD56- (#8 und #9) bzw. Neg. siRNA. Als Kontrolle dienten NK-Zellen, die weder elektroporiert noch mit siRNA behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich keine Veränderung der Oberflächenexpression von CD56. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 3 Spendern.

PCR

Bei den mit 300 nM CD56-siRNA und dem Elektroporationsprogramm DN-100 transfizierten primären NK-Zellen zeigte sich in der PCR auf mRNA-Ebene eine herunterregulierte Expression des CD56-Gens bei beiden CD56-siRNAs #8 und #9. Am stärksten wurde die CD56-Expression mit der CD56-siRNA #9 nichtsignifikant (P-Wert = 0,07) herunterreguliert auf 64,43% (vgl. Abb. 24).

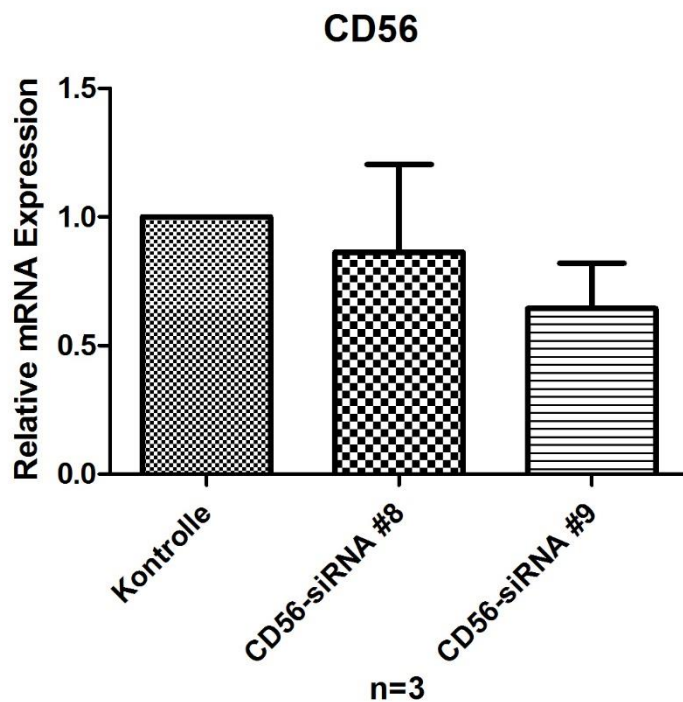


Abbildung 24: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und 300 nM CD56-siRNA (#8 und #9)

Dargestellt wurde die mittlere CD56-mRNA-Expression mit Standardabweichung in NK-Zellen 24 Stunden nach der Elektroporation mit dem Programm DN-100 und 300 nM der zwei verschiedenen CD56-siRNAs (#8 und #9) in Relation zur Kontrolle. Als Kontrolle dienten mit 300 nM Neg. siRNA elektroporierte Zellen. Die Kontrolle wurde mit eins gleichgesetzt. Die CD56-Expression wurde im Vergleich zur Kontrolle am stärksten mit der CD56-siRNA #9 nichtsignifikant (P-Wert = 0,07) auf 64,43% gesenkt. Statistische Analysen wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten t-Test durchgeführt. Die Daten zeigen Ergebnisse von n = 3 Spendern.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Effizienz der Transfektion von NK-92- und primären NK-Zellen mit siRNA per Lipofektion und Elektroporation untersucht. Anschließend wurde mit dem erfolgreichsten Lipofektionsreagenz bzw. mit dem erfolgreichsten Elektroporationsprogramm versucht mit verschiedenen CD56-siRNAs einen CD56-Gen-Knockdown in primären NK-Zellen zu erreichen.

4.1. Transfektionseffizienz und Zellviabilität

Zunächst wurde Neg. siRNA AF 488 verwendet und der Anteil der AF 488-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie mit der Transfektionseffizienz gleichgesetzt. Dabei zeigte sich die höchste mittlere Transfektionseffizienz von den sechs ausgewählten Programmen bei der Elektroporation von NK-Zellen mit dem Elektroporationsprogramm DN-100 mit 95,93% der Zellen. Bei der Lipofektion von NK-92- und primären NK-Zellen zeigte von den drei ausgewählten Transfektionsreagenzien jeweils das Reagenz ScreenFect die höchste mittlere Transfektionseffizienz mit 43,6% bei den NK-92-Zellen und mit 70% bei den primären NK-Zellen. Im Vergleich ließen sich primäre NK-Zellen mit allen drei Transfektionsreagenzien besser transfizieren als NK-92-Zellen.

Im Vergleich der erfolgreich transfizierten NK-Zell-Populationen in der Durchflusszytometrie fällt eine unterschiedliche Morphologie der per Lipofektion transfizierten Zellen gegenüber den per Elektroporation transfizierten Zellen auf. Die NK-Zell-Population nach Elektroporation ist eindeutig in den AF 488-positiven Bereich verschoben und gut begrenzt. Im Vergleich hierzu zeigt sich die NK-92-/NK-Zell-Population nach Lipofektion eine Verschiebung in den AF 488-positiven Bereich ohne eindeutige Abgrenzung der Population im AF 488-negativen Bereich. Außerdem bildet sich in der Peripherie der Zellpopulationen nach Lipofektion eine Art Schleier, welcher eher Komplexe aus Neg. siRNA AF 488 und den Lipofektionsreagenzen als Zellen darstellen könnte. Es bleibt offen, ob sich die Neg. siRNA AF 488 bei den per Lipofektion

erfolgreich transfizierten NK-Zellen tatsächlich im Zellinnerem befindet oder nur an ihrer Zelloberfläche haftet. Auch per Fluoreszenzmikroskopie lässt sich die exakte Lokalisation der Neg. siRNA AF 488 nicht eindeutig belegen. Auffällig ist eine viel niedrigere Transfektionseffizienz der mit ScreenFect und Neg. siRNA AF 488 transfizierten NK-92- und primären NK-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur Durchflusszytometrie. In der Fluoreszenzmikroskopie erscheinen die mit ScreenFect und Neg. siRNA AF 488 im FITC-Kanal erfolgreich transfizierten NK-92- und primären NK-Zellen als nicht intakt in der Durchlichtmikroskopie. Möglich ist, dass die Zellen nach der erfolgreichen Transfektion geplatzt sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Zellen bereits vor der Transfektion nicht mehr viabel waren und dass die Neg. siRNA AF 488 affiner an nichtviablen Zellen bzw. Zelltrümmern haftet als an den Wänden intakter Zellen. Dies würde gegen eine erfolgreiche Transfektion sprechen. Bei den per Elektroporation mit dem Programm DN-100 erfolgreich mit Neg. siRNA AF 488 transfizierten NK-Zellen ließ sich in der Fluoreszenzmikroskopie im FITC-Kanal kein fluoreszierendes Signal darstellen. Unklar ist, ob die NK-Zellen tatsächlich erfolgreich transfiziert worden sind oder ob die Mikroskopeinstellungen nicht optimal gewählt wurden zur Darstellung eines Fluoreszenzsignals.

Zudem fällt auf, dass bei der Durchflusszytometrie bereits im Kontrollansatz mit NK-/NK-92-Zellen und Neg. siRNA AF 488 ohne Transfektionsreagenz eine höhere Zahl AF 488-positiver Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz mit NK-/NK-92-Zellen mit Transfektionsreagenz und ohne Neg. siRNA AF 488 detektiert werden kann. Eine mögliche Ursache könnte ein Haften der Neg. siRNA AF 488 an der Zelloberfläche sein. Alternativ wäre auch eine spontane Aufnahme der Neg. siRNA AF 488 in das Zellinnere möglich. Diese Beobachtung zeigt sich bei der Lipofektion stärker ausgeprägt als bei der Elektroporation. Die Zahl AF 488-positiver Zellen ist nur leicht höher im Kontrollansatz mit nichtelektroporierten NK-Zellen und Neg. siRNA

AF 488 im Vergleich zum Kontrollansatz mit elektroporierten NK-Zellen und ohne Neg. siRNA AF 488. Der Unterschied zwischen der Lipofektion und Elektroporation ist nicht gut erklärbar. Bei einer höheren Zellkonzentration (1000 Zellen/ μl bei der Elektroporation und 400 Zellen/ μl bei dem Transfektionsreagenz ScreenFect) und einer höheren Konzentration von Neg. siRNA AF 488 (300 nM bei der Elektroporation und max. 100 nM bei den Lipofektionsreagenzien) in den Ansätzen der Elektroporation würde man sogar eine höhere Anzahl AF 488-positiver Zellen erwarten.

Bei den in der Fluoreszenzmikroskopie im Hintergrund dargestellten winzigen fluoreszierenden Strukturen handelt es sich am ehesten um Komplexe aus Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect. Dies konnten wir bei einem Versuch, in dem nur Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect ohne NK-Zellen inkubiert wurden, zeigen.

Die mittlere Zellviabilität lag bei den mit 1,5 μl ScreenFect und 100nM Neg. siRNA AF 488 behandelten NK-Zellen bei 86,20% im Vergleich zu 76,57% bei der Kontrolle mit unbehandelten NK-Zellen. Bei den mit 300 nM Neg. siRNA AF 488 und dem Elektroporationsprogramm DN-100 transfizierten NK-Zellen lag die mittlere Zellviabilität bei 59,07% im Vergleich zu 87,23% bei der Kontrolle mit unbehandelten NK-Zellen. Im ersten Elektroporationsversuch mit dem Programm DN-100 lag die Zellviabilität bei 78,90%, bei den zwei nachfolgenden Wiederholungen des Versuchs bei 50,50% und bei 59,70%. Die Kontaktzeit der NK-Zellen mit der Nucleofector-Lösung war in den beiden wiederholten Versuchen wenige Minuten länger als in dem ersten Versuch. Die verminderte Zellviabilität könnte somit auf die erhöhte Toxizität der Nucleofector-Lösung bei längerer Kontaktzeit mit den NK-Zellen zurückgeführt werden.

Wie im Kapitel 1.5.3. zuvor beschrieben, wurden Lipofectamine bei NK-92-Zellen (vgl. [26]) und HiPerfect bei primären NK-Zellen schon erfolgreich zur Transfektion genutzt (vgl. [27]). Zudem wurden NK-Zellen

erfolgreich transfiziert mit den Elektroporatorsystemen Amaxa Nucleofector™ 2b device (vgl. [30]) und MaxCyte® GT transfection system. Bei letzterem konnte mit dem Elektroporationsprogramm NK2-OC eine Transfektionseffizienz von etwa 100% erreicht werden. Die Zellviabilität war dabei nicht vermindert, nur die Proliferationskapazität der NK-Zellen war vermindert (vgl. [32]).

In Anbetracht der erreichten hohen Transfektionseffizienz kann man zusammenfassend sagen, dass die Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz ScreenFect und noch stärker die Elektroporation geeignete Methoden darstellen, um NK-Zellen erfolgreich zu transfizieren. Die Zellviabilität zeigte sich bei der Elektroporation deutlich vulnerabler als bei der Lipofektion. Doch unter optimierten Versuchsbedingungen könnte diese verbessert werden.

4.2. CD56-Gen-Knockdown

Die nach RNA-Interferenz mit verschiedenen CD56-siRNAs erreichte Herunterregulation von CD56 wurde 24 Stunden nach Transfektion sowohl auf Proteinebene per Durchflusszytometrie als auch auf mRNA-Ebene per PCR gemessen. Verwendet wurden für die Experimente jeweils das Lipofektionsreagenz und das Elektroporationsprogramm mit der höchsten Transfektionseffizienz, nämlich ScreenFect und DN-100.

Auf Proteinebene in der Durchflusszytometrie zeigte sich bei den mit ScreenFect und verschiedenen CD56-siRNAs transfizierten Zellen weder bei NK-92- noch bei den primären NK-Zellen eine erfolgreich herunterregulierte CD56-Gen-Expression. Auf mRNA-Ebene in der PCR zeigte sich in NK-92-Zellen eine Herunterregulation des CD56-Gens auf 81,72% bei der CD56-siRNA #4 und in primären NK-Zellen eine mittlere Herunterregulation des CD56-Gens auf 93,68% bei der CD56-siRNA #9. Letztere ist mit einem P-Wert von 0,6 nicht signifikant. Bei den NK-92-

Zellen wurde der Versuch nicht mindestens zwei Mal wiederholt, sodass hier kein P-Wert vorliegt.

Bei den mit dem Elektroporationsprogramm DN-100 und CD56-siRNA #8 und #9 transfizierten primären NK-Zellen zeigte sich in der Durchflusszytometrie auf Proteinebene ebenfalls keine erfolgreich herunterregulierte CD56-Gen-Expression. Auf mRNA-Ebene in der PCR zeigte sich eine mittlere Herunterregulation des CD56-Gens auf 64,43% bei der CD56-siRNA #9. Auch diese ist mit einem P-Wert von 0,07 nicht signifikant.

In der Zusammenschau der Ergebnisse stellt man sich die Frage, ob es überhaupt möglich ist, CD56 per RNA-Interferenz mit CD56-siRNAs herunter zu regulieren. Publierte Versuche anderer Arbeitsgruppen zu dieser Fragestellung sind schwer zu finden. Wie in Kapitel 1.2.2. beschrieben, wurde eine CRISPR-Cas9-vermittelte Deletion von CD56 bei NK92- und NK-Zellen bereits erfolgreich durchgeführt, um die Rolle von CD56 zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen mit einem pCMV-Cas9-GFP Plasmid transfiziert per Elektroporation über den Amaxa Nucleofector™ von Lonza (vgl. [7]).

4.3. Ausblick

In dieser Arbeit konnten sowohl NK-92- als auch primäre NK-Zellen sowohl per Lipofektion als auch per Elektroporation mit siRNA transfiziert werden. Somit eignen sich beide Methoden für eine Transfektion von NK-Zellen. Es bedarf weiterer Versuche, um die Bedingungen der bereits durchgeführten Versuche zu optimieren und die Aussagekraft der bereits gewonnenen Ergebnisse zu erhöhen. Wichtig ist ein Beweis, dass die Zellen tatsächlich erfolgreich transfiziert worden sind. In neue Versuche sollten auch die Evaluation des CD56-Gen-Knockdowns zu anderen Zeitpunkten abgesehen von 24 Stunden nach Transfektion und das Ausprobieren von CD56-siRNA mit anderen Zielsequenzen miteinfließen. Bei fehlendem Erfolg der Herunterregulation von CD56 per RNA-Interferenz kann eine CRISPR-Cas9-vermittelte Deletion von CD56 in

Erwägung gezogen werden. Zudem können natürlich auch neue Lipofektionsreagenzien und andere Elektroporationsprogramme oder -systeme ausprobiert werden.

Zum Zeitpunkt des Designs der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gab es weder für die drei ausgewählten Lipofektionsreagenzien ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine, noch für das 4D-Nucleofector™ System ein Transfektionsprotokoll speziell für NK-92- oder für primäre NK-Zellen. In dieser Arbeit wurde die Transfektionseffizienz verschiedener Lipofektionsreagenzien und verschiedener Elektroporationsprogramme bei NK-92- und NK-Zellen erstmals direkt verglichen. Ein Zukunftsziel wäre der Entwurf eines standardisierten NK-Zell-Transfektionsprotokolls für die Elektroporation und/oder für die Lipofektion. Die hierüber mögliche RNA-Interferenz würde Untersuchungen zu der Funktion von NK-Zellen im Hinblick auf die Interaktion mit Pathogenen, mit Tumorzellen und mit anderen Zellen des Immunsystems erheblich voranbringen.

5. Zusammenfassung

Als Teil des angeborenen Immunsystems spielen NK-Zellen eine entscheidende Rolle in der Interaktion mit dem opportunistischen Schimmelpilz *A. fumigatus*, aber auch mit anderen Pathogenen und mit Tumorzellen. Mithilfe einer RNA-Interferenz bestimmter Gene wie beispielsweise CD56 könnten Hinweise auf die genaue Funktionsweise der NK-Zellen und auf die Bedeutung der Oberflächenrezeptoren gewonnen werden. Dieses Wissen wiederum könnte sowohl neue Möglichkeiten in der Prävention und Therapie von invasiven Aspergillosen als auch in der Krebsimmuntherapie eröffnen. Ziel dieser Arbeit war daher eine geeignete Transfektionsmethode zum Einführen von siRNA in NK-92- und primäre NK-Zellen zu finden, welche eine hohe Transfektionseffizienz bei gleichzeitig hoher Zellviabilität aufweist.

Zur Transfektion wurden die drei Lipofektionsreagenzien ScreenFect (InCella), HiPerfect (Qiagen) und Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) und sechs verschiedene Elektroporationsprogramme des 4D-Nucleofector™ System (Lonza) verwendet. Für die Evaluation der Transfektionseffizienz wurde zunächst Neg. siRNA AF 488 transfiziert um die erfolgreich transfizierten Zellen im FITC-Kanal der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie darzustellen. Anschließend wurden jeweils das Lipofektionsreagenz und das Elektroporationsprogramm mit der höchsten Transfektionseffizienz ausgewählt. Mithilfe dieser wurden NK-Zellen mit sechs CD56-siRNAs mit unterschiedlicher Zielsequenz transfiziert mit dem Ziel der Herunterregulation von CD56. Die CD56-Gen-Expression wurde jeweils auf Proteinebene per Durchflusszytometrie und auf mRNA-Ebene per PCR gemessen.

Das Lipofektionsreagenz ScreenFect hat in der Durchflusszytometrie die höchste Transfektionseffizienz gezeigt bei primären NK-Zellen mit 70% bei einer Zellviabilität von 86,20% und bei den NK-92-Zellen mit 43,6% bei einer Zellviabilität von 66,53%. Unter den Elektroporationsprogrammen hat DN-100 in der Durchflusszytometrie die höchste Transfektionseffizienz gezeigt bei primären NK-Zellen mit 94,5% bei einer Zellviabilität von 78,9%. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich vergleichsweise eine niedrigere

Transfektionseffizienz. Die CD56-Gen-Expression in NK-Zellen konnte per RNA-Interferenz auf Proteinebene nicht herunterreguliert werden und auf mRNA-Ebene nicht signifikant herunterreguliert werden.

Zur Bestätigung der Transfektionseffizienz und zur Optimierung der Transfektionsmethoden bedarf es noch weiterer Experimente. Wünschenswert wäre die Etablierung eines standardisierten NK-Zell-Transfektionsprotokolls sowohl für die Lipofektion als auch für die Elektroporation. Ebenfalls bedarf es weiterer Experimente für das Erreichen einer erfolgreichen Herunterregulation von CD56 und anderer Gene in NK-Zellen.

6. Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

6.1. Literaturverzeichnis

1. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2015: Springer Spektrum.
2. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. *Blood*, 2001. 97(10): p. 3146-51.
3. Moretta, L., et al., *Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2014. 164(4): p. 253-64.
4. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. *J Immunol*, 2007. 178(8): p. 4947-55.
5. Juelke, K., et al., *CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells*. *Blood*, 2010. 116(8): p. 1299-307.
6. Lanier, L.L., et al., *Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56)*. *J Immunol*, 1991. 146(12): p. 4421-6.
7. Mace, E.M., et al., *Human NK cell development requires CD56-mediated motility and formation of the developmental synapse*. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 12171.
8. Ziegler, S., et al., *CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells*. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 6138.
9. Morrison, B.E., et al., *Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis*. *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1862-70.
10. Park, S.J., et al., *Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis*. *J Immunol*, 2009. 182(7): p. 4306-12.
11. Schmidt, S., et al., *Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia*. *J Infect Dis*, 2011. 203(3): p. 430-5.
12. Bouzani, M., et al., *Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN- γ release*. *J Immunol*, 2011. 187(3): p. 1369-76.
13. Schneider, A., et al., **Aspergillus fumigatus* responds to natural killer (NK) cells with upregulation of stress related genes and inhibits the immunoregulatory function of NK cells*. *Oncotarget*, 2016. 7(44): p. 71062-71071.

14. DSMZ, L.I. NK-92. [cited 2018 Apr 16]; Available from: <https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-488.html>.
15. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. *Leukemia*, 1994. 8(4): p. 652-8.
16. Maki, G., et al., *Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. 10(3): p. 369-83.
17. Herold, G., *Innere Medizin*. 2016: Gerd Herold.
18. Locatelli, F., et al., *Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells*. *Front Immunol*, 2013. 4: p. 15.
19. Kayser, F.H., E.C. Böttger, and R.M. Zinkernagel, *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 12. Auflage ed. 2010: Thieme.
20. Kousha, M., R. Tadi, and A.O. Soubani, *Pulmonary aspergillosis: a clinical review*. *Eur Respir Rev*, 2011. 20(121): p. 156-74.
21. Onkologie, D.G.f.H.u.m. *Invasive Pilzinfektionen - Diagnostik*. 2014 [cited 2018 May 10]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/invasive-pilzinfektionen-diagnostik/@@view/html/index.html>.
22. Onkologie, D.G.f.H.u.m. *Invasive Pilzinfektionen - Therapie*. 2014 [cited 2018 May 10]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/invasive-pilzinfektionen-therapie/@@view/html/index.html>.
23. Schmidt, S., et al., *Natural killer cells and antifungal host response*. *Clin Vaccine Immunol*, 2013. 20(4): p. 452-8.
24. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 397(8): p. 3173-8.
25. Nagashima, S., et al., *Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo*. *Blood*, 1998. 91(10): p. 3850-61.
26. Purdy, A.K. and K.S. Campbell, *Introduction of shRNAs into human NK-like cell lines with retrovirus*. *Methods Mol Biol*, 2010. 612: p. 223-31.
27. El Sobky, S.A., et al., *Contradicting roles of miR-182 in both NK cells and their host target hepatocytes in HCV*. *Immunology Letters*, 2016. 169: p. 52-60.
28. Kellner, J.N., et al., *Gene Modification of Human Natural Killer Cells Using a Retroviral Vector*. *Methods Mol Biol*, 2016. 1441: p. 203-13.
29. Levy, E.R., M. Carlsten, and R.W. Childs, *mRNA Transfection to Improve NK Cell Homing to Tumors*. *Methods Mol Biol*, 2016. 1441: p. 231-40.

30. Phatarpekar, P.V., D.A. Lee, and S.S. Somanchi, *Electroporation of siRNA to Silence Gene Expression in Primary NK Cells*. *Methods Mol Biol*, 2016. 1441: p. 267-76.
31. Carlsten, M. and R.W. Childs, *Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications*. *Front Immunol*, 2015. 6: p. 266.
32. Carlsten, M., et al., *Efficient mRNA-Based Genetic Engineering of Human NK Cells with High-Affinity CD16 and CCR7 Augments Rituximab-Induced ADCC against Lymphoma and Targets NK Cell Migration toward the Lymph Node-Associated Chemokine CCL19*. *Front Immunol*, 2016. 7: p. 105.
33. Joppien, S., S.L. Maier, and D. Wendling, *BASICS Experimentelle Doktorarbeit*. 2010: Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH.
34. Biochrom_GmbH. *Trennlösungen und Lektine*. [cited 2017 Jan 24]; Available from: http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/produktinformation/deutsch/BC_Katalog_72_73_Biocoll.pdf.
35. Zhonghua, L., *Ficoll density gradient of leukopac for the separation of PBMCs*. 2014, *Nature Protocols*.
36. Miltenyi_Biotec_GmbH. *NK Cell Isolation Kit human*. 2013 [cited 2017 Jan 24]; Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/nk-cells/nk-cell-isolation-kit-human.aspx>.
37. InCella. *ScreenFect siRNA Transfection Reagent_Product Information & Instruction Manual*. [cited 2017 Feb 2]; Available from: [http://www.incella.com/?redirect=getfile.php&cmd\[getfile\]\[uid\]=305](http://www.incella.com/?redirect=getfile.php&cmd[getfile][uid]=305).
38. Qiagen. *Quick-Start Protocol HiPerfect Transfection Reagent*. [cited 2017 Feb 2]; Available from: <https://www.qiagen.com/no/resources/resourcedetail?id=d757d039-b61b-437d-a49d-1611a720d056&lang=en>.
39. Thermo_Fisher_Scientific. *Lipofectamine RNAiMAX*. [cited 2017 Feb 2]; Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/pdf.par.34731.file.dat/transfecting-stealth-using-lipofectamine-rnaimax.pdf>.
40. Lonza. *Amaxa Human NK Cell Nucleofector Kit_For human Natural Killer Cells (NK Cells)*. [cited 2017 Feb 3]; Available from: http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_74.pdf.
41. Lonza. *Designing an RNAi Experiment Using Nucleofection_Technical Reference Guide*. [cited 2017 Feb 3]; Available from: http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_Designing_an_RNAi_Experiment_using_Nucleofection__Technical_Reference_Guide.pdf.

42. Lonza. *Optimization of Nucleofection Conditions_A Short guideline*. [cited 2017 Feb 3]; Available from: http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductionInstructions_4D_Nucleofector_optimization_scheme.pdf.
43. BD_Biosciences. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. 2000 [cited 2017 Jan 24]; Available from: <http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>.
44. Qiagen. *RNeasy Mini Handbook*. 2012 [cited 2017 Jan 24]; Available from: <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>.
45. Thermo_Fisher_Scientific. *T009-Technical Bulletin Nanodrop 1000 & 8000: 260/280 and 260/230 Ratios*. [cited 2017 Jan 24]; Available from: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>.
46. Thermo_Fisher_Scientific. *User Guide: First Strand cDNA Synthesis Kit*. [cited 2017 Jan 24]; Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012612_FirstStrand_cDNA_Synthesis_Kit_UG.pdf.
47. Bio-Rad. *iTaq Universal SYBR Green Supermix*. [cited 2017 Feb 1]; Available from: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10041157.pdf>.

6.2. Abbildungs-, Formel- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kulturmediums für NK-92-Zellen	24
Formel 1: Gesamtzahl der vitalen Zellen	25
Formel 2: Berechnung des Nährmediumvolumens.....	26
Formel 3: Berechnung des IL-2-Volumens	26
Abbildung 1: Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll	29
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten siRNAs.....	33
Abbildung 2: Chronologie der durchgeführten Experimente	34
Tabelle 3: Lipofektionsschema mit ScreenFect und Neg. siRNA AF 488.....	38
Tabelle 4: Lipofektionsschema mit ScreenFect und CD56-siRNA	39
Tabelle 5: Lipofektionsschema mit HiPerfect und Neg. siRNA AF 488	41
Tabelle 6: Lipofektionsschema mit Lipofectamine und Neg. siRNA AF 488.....	43
Tabelle 7: Elektroporationsschema mit dem Programm DN-100	46
Formel 4: Relative Expression von CD56.....	55
Abbildung 3: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect	59
Abbildung 4: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und HiPerfect	61
Abbildung 5: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und Lipofectamine	63
Abbildung 6: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine	65
Abbildung 7: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie: NK-92-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect.....	66
Abbildung 8: Durchflusszytometrie: NK-92-Zellen, CD56-siRNA bzw. Neg. siRNA und ScreenFect	68
Abbildung 9: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-92-Zellen, CD56-siRNA und ScreenFect	69
Abbildung 10: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: NK-92-Zellen, 100 nM CD56- siRNA (#2, #3, #4 und #5) und 1,5 µl ScreenFect	70
Abbildung 11: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect..	73
Abbildung 12: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und HiPerfect	75

Abbildung 13: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und Lipofectamine	76
Abbildung 14: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-Zellen, Neg. siRNA AF 488 und ScreenFect, HiPerfect und Lipofectamine	78
Abbildung 15: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie: primäre NK-Zellen, 100 nM Neg. siRNA AF 488 und 1,5 µl ScreenFect.....	80
Abbildung 16: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie: 100 nM Neg. siRNA AF 488 und 1,5 µl ScreenFect ohne primäre NK-Zellen	81
Abbildung 17: Durchflusszytometrie: NK-Zellen, 100 nM CD56-siRNA bzw. Neg. siRNA und 1,5 µl ScreenFect.....	83
Abbildung 18: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: NK-Zellen, 100 nM CD56-siRNA (#2, #3, #4, #5, #8 und #9) und 1,5 µl ScreenFect	84
Abbildung 19: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: NK-Zellen, 100 nM CD56-siRNA (#2, #3, #4, #8 und #9) und 1,5 µl ScreenFect.....	85
Abbildung 20: Durchflusszytometrie: mit Programm DN-100 elektroporierte primäre NK-Zellen und 300 nM Neg. siRNA AF 488	87
Abbildung 21: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: Mit sechs verschiedenen Programmen elektroporierte NK-Zellen und 300 nM Neg. siRNA AF 488	88
Abbildung 22: Durchflusszytometrie: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und 300 nM CD56-siRNA bzw. Neg. siRNA.....	90
Abbildung 23: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und 300 nM CD56-siRNA (#8 und #9)..	91
Abbildung 24: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: mit Programm DN-100 elektroporierte NK-Zellen und 300 nM CD56-siRNA (#8 und #9)	92

6.3. Abkürzungsverzeichnis

ALAS1	5' Aminolävulinatsynthase Typ 1
A. fumigatus	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Abb.	Abbildung
accel/decel	<i>acceleration/deceleration</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> , antikörpervermittelten Zelltoxizität
AF	Alexa Fluor
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bzw.	beziehungsweise
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> , chimärer Antigen-Rezeptor
CCL	<i>CC-chemokine ligand</i> , CC-Chemokinligand
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>cycle threshold</i>
ctrl	Kontrolle
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FcεRI	<i>high-affinity IgE receptor</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	<i>Forward Scatter</i>
fw	<i>forward</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> , Spender-gegen-Empfänger-Reaktion
GvL	<i>Graft-versus-Leukämie</i> , Spender-gegen-Leukämie
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
hsp	heat shock protein, Hitzeschockprotein
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> , Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>

ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1, Lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen-1</i>
MAC	<i>membrane attack complex, Membranangriffskomplex</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex, Hauptkompatibilitätskomplex</i>
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
Neg.	Negative
NET	<i>neutrophil extracellular traps, neutrophile extrazelluläre Fallen</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
Nr.	Nummer
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns, Pathogen-assoziierte molekulare Muster</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRR	<i>pathogen recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor</i>
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i>
rv	<i>reverse</i>
s.	siehe
shRNA	<i>short hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand</i>
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche

Danksagung

Von Herzen bedanken möchte ich mich bei:

- Herrn Professor Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit, an seiner Klinik meine erste wissenschaftliche Arbeit zu verfassen.
- Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die Vergabe des spannenden Themas, für die Möglichkeit, in einem modernen Labor arbeiten zu können und für die exzellente Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.
- Frau Anna-Lena Schmitt und Frau Esther Weiß für die Einführung in die interessante Welt des wissenschaftlichen Arbeitens und für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.
- allen weiteren Mitgliedern der AG Löffler für eine sehr angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre und viele anregende Gespräche.
- Herrn Dr. Michael Hudecek für die Bereitstellung des Elektroporationssystems in seinem Labor und Frau Razieh Monjezi für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Elektroporation.
- Herrn Univ. Professor Dr. Dr. med. univ. Andreas Beilhack für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops in seinem Labor.
- meiner Familie und meinen Freunden für die wunderbare Unterstützung und Ermutigung während meines Studiums, der Arbeit an meiner Doktorarbeit und meines Berufseinstiegs.