

Aus dem
Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
Vorstand Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig
Arbeitsgruppe Professor Dr. rer. nat. Holger M. Reichardt

Die Rolle des 1A-Promotors
in der
glukokortikoidinduzierten T-Zell-Apoptose

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tobias Johannes Heck
aus Weikersheim

Würzburg im Mai 2009

Referent: Professor Dr. rer. nat. Holger M. Reichardt

Koreferent: Professor Dr. med. Bruno Allolio

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2009

Der Promovend ist Arzt

Abbildungsverzeichnis

Material

- Abb. 2-1: siRNA-exprimierender lentiviraler Vektor pLL3.7 8

Ergebnisse

- Abb. 4-1: FACS Scan-Analyse: WEHI 7.1-Zellen zeigen geringe Sensitivität gegenüber DEX-induzierter Apoptose. 19
- Abb. 4-2: FACS Scan-Analyse: WEHI 7.1 Subklone zeigen unterschiedliche Sensitivität gegenüber GICD. 20
- Abb. 4-3: FACS Scan-Analyse: WEHI 7.1-5A Zellen reagieren auf Dexamethason- bzw Etoposidbehandlung mit Apoptose. 21
- Abb. 4-4: Assay-Auswertung: WEHI 7.1 Zellklone zeigen unterschiedliche Sensitivität gegenüber Dexamethason- bzw. Etoposidbehandlung. 22
- Abb. 4-5: Western Blot Analyse auf GR in WEHI 7.1 Zellen 23
- Abb. 4-6: Vorkommen von UTR1A-Transkript in WEHI 7.1-5A Zellen. 24
- Abb. 4-7: Teilausschnitt des untranslatierten Bereichs des Glukokortikoidrezeptor ausgehend vom 1A-Promoter. 24
- Abb. 4-8: Klonierungsschema für pLLoxg/siUTR. 25
- Abb. 4-9: WEHI 7.1-5A Zellen nach Transduktion mit Lentiviren. 26
- Abb. 4-10: WEHI 7.1-5A Zellen wurden nach der Transfektion auf eGFP-Fluoreszenz mittels FACS-DiVa sortiert. 27
- Abb. 4-11: Western Blot Analysen zeigen die GR-Proteinexpression der WEHI 7.1 Zellen nach Transfektion mit siUTR. 28
- Abb. 4-12: Densitometrischer Scan des Western Blots (s. Abb. 4-11). 28
- Abb. 4-13: Statistische Auswertung dreier identischer Dexamethason-Dose-Response-Assays. 29
- Abb. 4-14: Auswertung eines Dexamethason-Dose-Response-Assays der transfizierten WEHI 7.1-5A- Zellen. 30

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glukokortikoide	2
1.2 Apoptose	3
1.3 RNA-Interferenz	3
1.4 Vektoren	4
1.5 Ziel der Arbeit	5
2. Material	6
2.1 Chemikalien	6
2.2 Enzyme	6
2.3 Analyse- und Synthese-Kits	6
2.4 Größenmarker	6
2.5 Antikörper	6
2.6 Filmmaterial	6
2.7 Zelllinien	6
2.8 Bakterienstämme	6
2.9 Oligonukleotide	7
2.10 Nährmedien für Bakterien	7
2.11 Nährmedien für eukariotische Zelllinien	7
2.12 Puffer und Lösungen	8
2.13 Virenkonstrukte und Plasmide	8
3. Methoden	9
3.1 Zellkulturen und Zellinfektionen	9
3.1.1 Ermittlung der Zellzahl	9
3.1.2 Kultivierung adhärenter und Suspensionszellen	9
3.1.3 Transfektion zur Virenproduktion	9
3.1.4 Transduktion von Suspensionszellen	10
3.2 Durchflusszytometrie	10
3.2.1 Dexamethason-Apoptose-Assay	11
3.2.2 Propidiumiodid-AnnexinCy5-Färbung	11
3.2.3 Single-Clone-Assay	11

3.3	DNA- und RNA-Analysen	12
3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	12
3.3.2	Synthese von phosphorylierten Oligonukleotiden	12
3.3.3	Klonierung, Ligation und Transformation	12
3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen	13
3.3.5	Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion	14
3.3.6	RNA-Isolation	14
3.3.7	cDNA-Synthese	15
3.3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
3.4	Proteinanalytik	17
3.4.1	Proteinlysate	17
3.4.2	Western-Blot	17
4.	Ergebnisse	19
4.1	Dexamethason-Apoptose-Assay mit WEHI 7.1 Zellen	19
4.2	Single-Clone-Experiment	19
4.3	Dexamethason-Assay bzw. Etoposide-Assay mit WEHI 7.1-5A Zellen	20
4.4	Western-Blot Analyse der WEHI 7.1-5A Zellen auf GR	22
4.5	PCR-Analyse der WEHI 7.1-5A Zellen auf das GR-1A Transkript	23
4.6	Generierung der Vektoren und Auswahl der RNAi-Sequenzen	24
4.7	Produktion von Lentiviren und Infektion der WEHI 7.1-5A Zellen	25
4.8	Sortierung der transfizierten WEHI 7.1-5A Zellen	27
4.9	Western Blot-Analyse transfizierter WEHI 7.1-5A Zellen auf GR	27
4.10	DEX-Apoptose-Assays mit WEHI 7.1-5A Zellen	28
5.	Diskussion	31
5.1	WEHI 7.1-5A Zellen	31
5.2	Glukokortikoidrezeptor-Promotor-1A	33
6.	Zusammenfassung	36
7.	Literaturverzeichnis	38

1. Einleitung

Höhere Organismen wie der Mensch benötigen zur Erhaltung ihrer Existenz ein Verteidigungssystem. Diese körpereigene Abwehr wird in ihrer Gesamtheit als Immunsystem bezeichnet. Es wirken sowohl äußere (z.B. Infektionserreger), als auch innere schädliche Einflüsse (z.B. Zellentartung) auf den Organismus ein. Das Immunsystem hat gegen diese Störungen vielfältige Schutzmechanismen entwickelt, die von einem Repertoire an zellulären und nicht-zellulären, spezifischen und unspezifischen Faktoren wahrgenommen werden.

Es lassen sich verschiedene Zellen des Immunsystems abgrenzen. Im folgenden soll nur auf die Gruppe der T-Zellen eingegangen werden. Diese Zellen werden im Knochenmark gebildet, durchlaufen im Thymus entscheidende Reifungsprozesse und nehmen dann vielfältige Abwehraufgaben wahr. Üblicherweise unterscheidet man CD4- und CD8-positive T-Zellen. CD4-positive T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet und in TH₁- und TH₂-Zellen eingeteilt. Die TH₁-Zellen besitzen die Fähigkeit, unspezifische Zellen der Immunantwort (wie z.B. Makrophagen) zu aktivieren, im Gegenzug hemmen sie die B-Zell-Funktion [1]. Die Hauptaufgabe der TH₂-Zellen hingegen ist es, nach spezifischer Aktivierung B-Zellen zur Differenzierung in Plasmazellen und anschließender Antikörpersynthese zu stimulieren [1]. Die CD8-positiven T-Zellen unterscheiden zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen, beseitigen entartete Körperzellen und werden daher auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Neben diesen Hauptgruppen der T-Zellen gibt es einige kleinere Populationen, die aufgrund von Oberflächenproteine in Unterklassen eingeteilt werden. Allen T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor gemein. Dieses Molekül ist von entscheidender Bedeutung für die Erkennung von Antigenen.

Diese komplexen Interaktionsmechanismen lassen die Notwendigkeit einer exakten Kommunikation zwischen den einzelnen Bestandteilen des Immunsystems für deren Balance erkennen. Wie eine überschießende, ungerichtete Immunreaktion im Organismus Schaden anrichten kann, so führt eine verspätete oder zu schwache Immunreaktion zu Störungen der körperlichen Integrität.

Neben direkten Zell-Zell-Kontakten steuern Hormone die Funktionen des Immunsystems. Hormone sind Botenstoffe, die von spezifischen Zellen gebildet werden und oft weit entfernt vom Produktionsort an ihren Erfolgsorganen wirken. Sie werden durch den Blutstrom oder

den Lymphfluss transportiert und binden an spezifische Zellrezeptoren. Die Aktivierung beziehungsweise Hemmung eines solchen Rezeptors führt zu einer Reaktion der betreffenden Zelle, z.B. zu einer Stoffwechselsteigerung. Eine Hormonuntergruppe sind die Glukokortikoide, die seit Jahrzehnten ein unverzichtbarer Bestandteil der Therapie von Erkrankungen des Immunsystems sind. Im Folgenden wird auf diesen Hormontyp gesondert eingegangen.

1.1 Glukokortikoide

Die in der Nebennierenrinde gebildeten Glukokortikoide (GCs) gehören zur Klasse der Steroidhormone. Cholesterol stellt das gemeinsame Grundgerüst dar. Aufgrund ihrer Lipophilie können GCs zelluläre Membranen mittels einfacher Diffusion passieren und befinden sich im Blutstrom meist an Plasmaproteine gebunden, zu ca. 80% an Transcortin [2].

Im Zytosol docken die GCs an den Glukokortikoidrezeptor (GR) an. Dieser ist im Ruhezustand mit Stabilisatorproteinen assoziiert (z.B. dem Chaperon Hsp90). Nach Bindung des Hormons dissoziiert der Rezeptor-Chaperon-Komplex und das homodimere Ligand-Rezeptor-Paar wandert in den Zellkern. Dort wird die Regulation bestimmter Gene beeinflusst: Zum einen geschieht dies direkt rezeptorvermittelt an positiven bzw. negativen GREs (glucocorticoid-receptor responsive elements) der DNA, zum anderen mittels Transrepression über zwischengeschaltete Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, NFAT, NF- κ B) [3]. Es wurden auch nichtgenomische Mechanismen der GC-Wirkung beschrieben. Diese vergleichsweise schnell ablaufenden Vorgänge werden nicht über die Transkription bestimmter Gene erzielt, sondern über direkte Interaktion zwischen dem GR und weiteren Rezeptoren wie dem T-Zell-Rezeptor [4].

Unter physiologischen Konzentrationen spielen GCs insbesondere als Stresshormone bei der Aktivierung kataboler Stoffwechselfvorgänge (z.B. der Gluconeogenese) eine Rolle. In therapeutisch hohen Konzentrationen besitzen GCs jedoch eine anti-entzündliche und immunsuppressive Wirkung. Dies beruht auf einer Reduktion der Konzentration immunmodulatorischer Hormone, z.B. von Interleukinen oder von Cytokinen, die an der Aktivierung und Aufrechterhaltung von Entzündungsvorgängen beteiligt sind. Weiterhin

können GCs in Zellen des Immunsystems den programmierten Zelltod induzieren [3]. Dieser als Apoptose bezeichnete Vorgang führt zu einem kontrollierten Untergang von Zellen.

1.2 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, d.h. eine geordnete Selbsttötung der Zelle. Man unterscheidet einen extrinsischen und einen intrinsischen Apoptoseweg. Bei der extrinsischen Variante reagiert die Zelle auf einen äußeren Stimulus, z.B. die Bindung von apoptoseinduzierenden Liganden an Oberflächenproteine der Zelle. Der intrinsische Weg führt durch zellinterne Prozesse (z.B. DNA-Schäden) zu einer Aktivierung des Apoptosevorgangs. Beide Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke: Proteolytische Enzyme, sogenannte Caspasen [5], führen zu einem kontrollierten Abbau der Zelle. Im Unterschied zur Zellnekrose wird in der Apoptose die Zellmembran nicht eröffnet und es tritt keine Entzündungsreaktion ein [3, 6].

Glukokortikoide können unter bestimmten Voraussetzungen Apoptose in T-Lymphozyten auslösen. Es gilt als gesichert, dass der GC-induzierten Zelltod (GICD, GC-induced cell death) über die genomische GC-Wirkung vermittelt wird. Zu den diskutierten Vorgängen des GICD zählt unter anderem die Regulation pro- und antiapoptotischer Proteine (z.B. Bcl-2, Bim, Bax, etc.), die Aktivierung von Caspasen, die Zerstörung der mitochondrialen Integrität, die Interaktion mit Oberflächenproteinen (z.B. CD28) und die Änderung des Zellmilieus (z.B. Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies) [2, 3, 7, 8].

1.3 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) mittels siRNA-Molekülen (small interfering RNA) ist ein seit 1999 bekannter Mechanismus zur Steuerung der Genexpression. In der Molekularbiologie spielt RNAi eine bedeutende Rolle für die Genfunktionsanalyse [9]. Anfangs nur in pflanzlichen Zellen bekannt [10], konnte RNAi später in *C. elegans* [11] und 2001 ebenfalls in Säugetierzellen [12] nachgewiesen werden. Unter siRNA versteht man kleine RNA-Doppelstrang-Moleküle mit einem 3'-Überhang von 2 Nukleotiden und einem Phosphatrest am 5'-Ende [13]. Diese Oligonukleotide sind entscheidend für Steuerungsvorgänge von

spezifischen Genen mittels RNAi. siRNA kann durch verschiedene Transfektionsmethoden in Zellen eingebracht werden. Durch virale Vektoren lässt sich die siRNA-Information permanent in die Zell-DNA einbauen und durch Transkription dieser Information werden funktionelle siRNA-Moleküle gebildet, die den RNAi-Prozess aufrechterhalten.

Vorläufer der siRNA-Moleküle werden noch im Zellkern durch das Enzym Drosha prozessiert und über das Transportprotein Exportin-5 in das Zytoplasma exportiert. Dort werden sie durch Dicer, ein RNase-III-Enzym, auf die Länge von 21-24 Nukleotiden gekürzt. Der Multi-Enzym-Komplex RISC (RNA-induced silencing complex) spaltet durch seine Helikaseaktivität den Doppelstrang auf. Der nun entwundene antisense-siRNA-Strang lagert sich dem komplementären Teil seiner Ziel-mRNA an. Durch Aktivierung einer RNase wird die betreffende Ziel-mRNA zerstört und die Translation verhindert [14, 15]. Grundsätzlich ist für jedes Gen mit bekannter Sequenz eine passende siRNA herstellbar, die dessen Genexpression hemmen kann.

1.4 Vektoren

Im Gegensatz zur Generierung von Knockout-Tieren mittels homologer Rekombination stellt die RNAi-Technik ein zeit- und kostensparendes Verfahren dar. Damit eine effiziente und permanente Funktion der siRNA in einer Zelle gewährleistet ist, muss diese stabil in das Genom integriert werden. Hierzu haben sich virale Vektoren bewährt [16]. Rubinson et. al. [17] entwickelten einen lentiviralen Vektor, der die Fähigkeit besitzt, eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen zu infizieren. Beispielsweise kann man durch die Infektion embryonaler Stammzellen einen transgenen Organismus entwickeln. Es können aber auch Zellen, die den Zellzyklus bereits verlassen haben, infiziert werden.

Der lentivirale Vektor pLL3.7 exprimiert die siRNA unter der Kontrolle des U6 Promotors. Dieser Promotor gehört zur Klasse der RNA-Polymerase-III-Promotoren, die für sogenannte small-nuclear-RNA kodieren [18]. Bei dieser RNA-Form handelt es sich nicht um kodierende, sondern um strukturelle RNA. Ein U6-Promoter ist ideal für kleine Sequenzen von weniger als 400 Nukleotiden, wie z.B. siRNAs. In die multiple cloning site hinter dem U6-Promotor können durch Klonierung verschiedene siRNA-Sequenzen eingebaut werden. Weiterhin koexprimiert der Vektor mit Hilfe eines Cytomegalievirus-Promotor eGFP (enhanced green fluorescent protein). Über dieses Reportergen können infizierte Zellen mittels der

Durchflusszytometrie detektiert werden. Rubinson et. al. [17] konnten mit einem pLL3.7-Vektor siRNA stabil in eine T-Zell-Reihe integrieren und mit Hilfe der eGFP-Detektion infizierte Zellen sortieren.

1.5 Ziel der Arbeit

Glukokortikoide spielen eine wichtige Rolle in der Therapie von Erkrankungen des Immunsystems, dennoch sind viele Aspekte des genauen Wirkmechanismus noch unverstanden.

Das Ansprechen verschiedener muriner Lymphozytenpopulationen auf den glukokortikoid-induzierten Zelltod (GICD) variiert sehr stark. Die Gruppe um Timothy J. Cole konnte zeigen, dass die Aktivität der fünf verschiedenen GR-Promotoren mit dem Ansprechen auf GICD korreliert [19]. Während in Zellen mit überwiegender Aktivität der Promotoren 1B-1E kaum GICD ausgelöst werden konnte, war dies in Zellen mit hoher Aktivität des 1A-Promoters umgekehrt. Die Hypothese ist, dass der durch den 1A-Promotor exprimierte Anteil an GR (GR-1A) das Ansprechen von T-Zellen auf GICD determiniert. Zudem konnte die Expressionsstärke des GR-1A durch die Gabe von Glukokortikoidhormonen in Thymozyten (jedoch z.B. nicht in Splenozyten) erhöht werden. Insgesamt lässt sich daraus eine besondere Bedeutung des GR-1A für die glukokortikoidinduzierte Apoptose in unreifen T-Zellen ableiten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des GR-1A in der glukokortikoidinduzierten Apoptose zu untersuchen. Mittels RNAi soll selektiv der GR-1A in einer murinen T-Zell-Lymphomlinie (WEHI 7.1-Zellen) ausgeschaltet werden. Hierzu werden mehrere siRNA gegen den untranslatierten Bereich (UTR) der GR-mRNA entwickelt. Der UTR ist nur an mRNA zu finden, die über den 1A-Promotor entsteht. Er ist daher spezifisch. Die siRNA-Information soll mit Hilfe eines lentiviralen Vektors stabil in das Genom der WEHI 7.1-Zellen integriert werden. Die zellinterne Aktivierung der siRNA führt zu einem gene-silencing des GR-1A. Anschließend soll auf Proteinebene untersucht werden, ob die siRNA eine Veränderung der GR-Expression bewirkt. Weiterhin werden die Zellen auf ihr Ansprechen gegenüber glukokortikoidinduzierter Apoptose in Dexamethason-Dose-Response-Assays getestet.

2. Material

2.1 Chemikalien	Vertrieb durch	2.2 Enzyme	Vertrieb durch
Acrylamide (Gel 30)	Roth	Alkalische Phosphatase	Promega
Agarose	Roth	DNase (RNase-frei)	Roche
Ampicillin	Sigma	Iodacetamid	Roche
β -Mercaptoethanol	SigmaAldrich	Leupeptin	Calbiochem
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth	Pefabloc	Roche
Calciumchlorid	Roth	Proteinkinase K	Roche
Chloroform	AppliChem	Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
Dexamethason	SigmaAldrich	Reverse Transkriptase	Invitrogen
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	SigmaAldrich	T4-DNA-Ligase	Promega
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Roth	Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas
dNTPs	MBI Fermentas		
Ethanol	AppliChem	2.3 Analyse-/Synthese-Kits	Vertrieb durch
Ethidiumbromid	SigmaAldrich	BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Etoposide	SigmaAldrich	Calciumphosphat Transfektionskit	Invitrogen
Fetales Kälber Serum (FCS)	Gibco	Gel-Extraktions-Kit	Qiagen
HEPES	SigmaAldrich	QIAFilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
Isopropanol	SigmaAldrich	RNeasy-Kit	Qiagen
LB Kulturmedium	Invitrogen	SuperSignal	Pierce
Milchpulver	Roth		
Penicillin-Streptomycin	Gibco	2.4 Größenmarker	Vertrieb durch
Ponceau S	SigmaAldrich	DNA Marker 1kb-Leiter	Invitrogen
Propidiumiodid	SigmaAldrich	Protein Marker Full range	MBI Fermentas
SDS	AppliChem	Rainbow MW	
TEMED	Roth		
Tris	AppliChem		
Trizol	Invitrogen		

2.5 Antikörper	Vertrieb durch
Beta-Tubulin Mouse (1:2000)	SigmaAldrich
Glukokortikoidrezeptor Rabbit (1:1000)	Santa Cruz Biotech
Mouse IgG-HRP Goat (1:5000)	Santa Cruz Biotech
Rabbit IgG-HRP Goat (1:5000)	Santa Cruz Biotech
Annexin V Cy5	BD Biosciences

2.6 Filmmaterial	Vertrieb durch
Medical x rayfilm Super RX	Fuji

2.7 Zelllinien
293T: Humane embryonale Nierenzelllinie, ATCC CCRL 11268
WEHI 7.1: Murines T-Zell-Lymphom
WEHI 231: Murines B-Zell-Lymphom, ATCC CRL 1702

2.8 Bakterienstämme
Top F: Hitze-kompetente E-coli, zur DNA Aufnahme fähig

2. Material

2.9 Oligonukleotide	Vertrieb durch Firma Sigma
UTR11 sense	5'-CCT CTG GTC TGA AAT GGT CT-3'
UTR12 antisense	5'-CAT TCT TAC GCA GAG TAG CT-3'
β -Actin sense	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'
β -Actin antisense	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG-3'
siUTR1 sense	5'-TGG ACT ATC TGC TGA ATC AGT ATA TTC AAG AGA GAT ACT GAT TCA GCA GAT AGT CCT TTT TTC-3
siUTR1 antisense	5'-TCG AGA AAA AAG GAC TAT CTG CTG AAT CAG TAT CTC TCT TGA ATA TAC TGA TTC AGC AGA TAG TCC A-3'
siUTR2 sense	5'-TGC TCG TCA AAC GAG GTG TTA ATT CAA GAG ATT CAC ACC TCG TTT GAC GAG CTT TTT TC-3'
siUTR2 antisense	5'-TCG AGA AAA AAG CTC GTC AAA CGA GGT GTG AAT CTC TTG AAT TAA CAC CTC GTT TGA CGA GCA-3'
siUTR3 sense	5'-TTC CTC TGG TCT GAA ATG GTC TAT TCA AGA GAG AGA CCA TTT CAG ACC AGA GGA TTT TTT C-3
siUTR3 antisense	5'-TCG AGA AAA AAT CCT CTG GTC TGA AAT GGT CTC TCT CTT GAA TAG ACC ATT TCA GAC CAG AGG AA-3'
siUTR4 sense	5'-TGA TGT TTC AGA TCC TGC TTA TTT CAA GAG ACG AAG CAG GAT CTG AAA CAT CTT TTT TC-3'
siUTR4 antisense	5'- TCG AGA AAA AAG ATG TTT CAG ATC CTG CTT CGT CTC TTG AAA TAA GCA GGA TCT GAA ACA TCA-3'
siCD8rat sense	5'-TCG GAG CAA GCT GAA CGA TAT ATT TCA AGA GAG TAT ATC GTT CAG CTT GCT CCG TTT TTT C-3'
siCD8rat antisense	5'- TCG AGA AAA AAC GGA GCA AGC TGA ACG ATA TAC TCT CTT GAA ATA TAT CGT TCA GCT TGC TCC GA-3'

2.10 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium	20g LB Broth Base auf 1l H ₂ O aufgefüllt, autoklaviert
Ampicillinplatten	LB-Medium mit 1,5% Agar-Agar + 50 μ g/ml Ampicillin
SOC-Medium	190ml H ₂ O + 4g Bacto-Pepton + 1g Hefeextrakt + 0,1g NaCl + 2ml 250 mM KCl, pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen + 1 μ l 2M MgCl ₂ und auf 200ml mit H ₂ O auffüllen, autoklavieren und 10ml Aliquots mit 200 μ l 1M Glucose versetzen

2.11 Nährmedien für eukariotische Zelllinien

Lentivirale Transfektion

DMEM Gibco/BRL + FCS (10%) + Penicillin (0,025%) + Streptomycin (0,025%) + 25mM HEPES

WEHI 7.1 Zellen

DMEM Gibco/BRL + FCS (10%) + Penicillin (0,025%) + Streptomycin (0,025%)

293T Zellen

MEM Eigenprodukt + FCS (10%) + Penicillin (0,025%) + Streptomycin (0,025%)

2.12 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	
NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	2g
CaCl ₂	1,67g
MgCl ₂	1g
BSA	0,1g
H ₂ O	ad 10l

ATV	
NaCl	80g
KCl	4g
Glucose	10g
NaHCO ₃	5,8g
Trypsin(1:250)	5g
Versene	2g
H ₂ O	ad 1l

TBE (10x, pH 8,0)	
Tris	108g
Borsäure	55g
EDTA	(0,5M)
H ₂ O	ad 1l

TAE (50x)	
Tris	108g
EDTA	(0,5M)
Essigsäure	60ml
H ₂ O	ad 1l

Transferpuffer für Western Blot:	
Glycin 150mM	11,26g
Tris 25mM	3,02g
Methanol	100ml
H ₂ O	ad 1l

Ponceau-S Lösung	
Ponceau S	2g
Tricholacetic acid	30g
Sulfosalicylic acid	30g
H ₂ O	ad 100ml

PBS/T (0,1%)	
PBS	1l
Tween 20	1ml

5% Milchpulverlösung	
Milchpulver	1g
PBS/T 0,05%	20ml

RIPA Puffer	
SDS 0,1% (w/v)	
NaCl 150mM	
NP-40 1% (v/v)	
Deoxycholat 0,5% (w/v)	
EDTA 5mM	
Tris/HCl (pH=8.0) 50mM	

TGS (5x)	
Tris	3,02g
Glycin	18,7g
10% SDS	10ml
H ₂ O	ad 1l

FACS Puffer	
PBS/BSA/Azid PBS	
mit 0,2% BSA und 0,02% NaN ₃	

2.13 Virenkonstrukte und Plasmide

Für die Herstellung des konstitutiven RNAi-Konstrukts wurde der pLL3.7, wie von Rubinson *et al.* [17] beschrieben und in Abbildung 2-1 zu sehen, verwendet. Der lentivirale Vektor besteht aus dem Polymerase III Promotor U6 aus der Maus, gefolgt von einer Multiple Cloning Site (MCS), in die die RNAi-Sequenz kloniert wird. Flankiert von zwei loxP-sites folgt eine CMV-eGFP-Expressionskassette. Weitere für die Genintegration verantwortliche Bestandteile sind das SIN-LTR (self-inactivating long terminal repeats), das Packaging-Signal ψ , das WRE (woodchuck hepatitis virus response element), sowie das cPPT (central polypurine track).

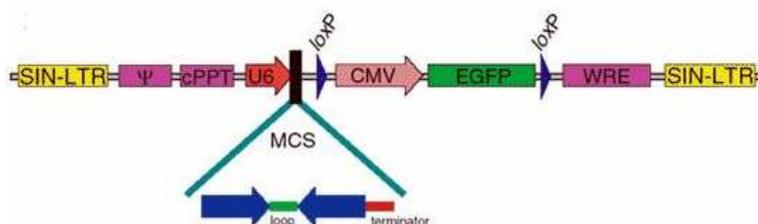


Abbildung 2-1 siRNA-exprimierender lentiviraler Vektor pLL3.7
Quelle: Rubinson *et al.* (2003)

3. Methoden

3.1 Zellkulturen und Zellinfektionen

Sämtliche zellulären Arbeiten wurden auf einer Sterilbank durchgeführt. Generell gilt beim Umgang mit Zellkulturen, dass die Medien auf 37°C vorgewärmt wurden.

3.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Suspensionszellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde nach dem Vortexen unter das Deckgläschen der Zähl-Kammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2-3 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß (Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant) x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml berechnet.

3.1.2 Kultivierung adhärenter und Suspensionszellen

Adhärenente Zellen (293T-Zellen) wurden in MEM (Hausinterne Produktion) mit 10% FCS, 0,025% Penicillin/Streptomycin für 293T-Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit ATV von der Platte abgelöst und in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Suspensionszellen (WEHI 7.1-Zellen) wurden in D-MEM (Gibco) mit 10% FCS und 0,025% Penicillin/Streptomycin bei gleichen Bedingungen kultiviert. Sie wurden dreimal wöchentlich auf eine Zellzahl von 1×10^5 /ml eingestellt.

3.1.3 Transfektion zur Virenproduktion

Zur Herstellung rekombinanter, replikationsdefekter lentiviraler Partikel wurden 293T Zellen transient mit dem Expressionskonstrukt für Gag/Pol ($\Delta 8.9$) und Env (VSV-G) kotransfiziert. Die Kotransfektion wurde zusammen entweder mit dem leeren Vektorplasmid, oder dem Vektor, in den die siUTR-Sequenz inkloniert war, durchgeführt. Dafür wurden am Vortag $1,8 \times 10^6$ Zellen in ein 6 cm-Kulturschale ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und 4ml frisches DMEM (Gibco +10% FCS, 0,025% Penicillin/Streptomycin, plus HEPES) hinzugegeben. Nach 4 Stunden wurde die Transfektionslösung mit dem „Calcium Phosphate Transfection Kit“ von Invitrogen entsprechend den Angaben der Firma hergestellt und vorsichtig auf die Zellen geträufelt.

Die Transfektionslösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 7 µg Plasmid-DNA
- 3 µg Δ8.9
- 2 µg VSV-G
- 18 µl 2M CaCl₂
- ad 150 µl steriles H₂O + 150 µl 2xHBS (Hepes Buffered Saline)

Nach 16 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die viralen Überstände wurden 24 Stunden später abgenommen und filtriert (0,45µm). Anschließend wurde dem Filtrat Polybren (Sigma) zugegeben (Endkonzentration 10µg/ml) und die WEHI-7.1 Zellen transduziert.

3.1.4 Transduktion von Suspensionszellen

Bei der Transduktion von Suspensionszellen wurden 1×10^5 WEHI 7.1-Zellen für 3-4 Stunden mit 3-4ml Virusüberstand inkubiert. Um hohe Infektionsraten zu erzielen wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand plus Polybrene (10µg/ml) bei 32°C mit 2200rpm zentrifugiert. Der Virusüberstand wurde anschließend verworfen und die Zellen in 2ml frischem Suspensionszellmedium (s.o.) in Kultur genommen. Die Analyse der Transduktion erfolgte nach drei bis vier Tagen mittels Messung der eGFP-Expression in der Durchflusszytometrie.

3.2 Durchflusszytometrie

Zellen, die eine Farbfluoreszenz aufweisen, können mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im FACS Scan (Fluorescence Activated Cell Scan, Fa. Becton-Dickinson) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, welches von dem Gerät detektiert wird. Das verwendete Gerät ist in der Lage, bis zu drei verschiedene Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren. Zusätzlich zu den drei Fluoreszenzen gibt das Laserlicht, das direkt an den Zellen gestreut wird, Aufschluss über deren Größe (forward scatter) und Granularität (side scatter). Über diese Parameter können Anhaltspunkte des Überlebenszustandes der Zellen gewonnen werden.

Die Zellen wurden auf grüne Fluoreszenz für eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) und bei speziellen Untersuchungen auch auf die Fluoreszenz der Farbstoffe Propidiumiodid und AnnexinCy5 getestet. Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

3.2.1 Dexamethason-Apoptose-Assay

Die Reaktion transduzierter WEHI 7.1-Zellen auf Glukokortikoide wurde mit Hilfe eines Dexamethason(DEX)-Apoptose-Assay getestet. WEHI-Zellen (1×10^5 Zellen pro „Well“) wurden für 48 Stunden mit 500µl DEX-Medium (Dexamethasonkonzentration 10^{-6} M) kultiviert. Als Negativkontrolle wurde statt Dexamethason PBS eingesetzt. Anschließend wurde der Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl im FACS bestimmt. Das Messverfahren beinhaltete sowohl Messungen mittel FSC und SSC, als auch Spezialfärbungen toter und apoptotischer Zellen. Anstatt DEX wurde in bestimmten Experimenten Etoposid (Exposition für 6h, Konzentration 0,05µg/ml) verwendet.

3.2.2 Propidiumiodid-AnnexinCy5-Färbung

Diese Färbung ermöglicht die Detektion toter (PI-Aufnahme) und apoptotischer (Annexin V Cy5-Bindung) Zellen. Auf die gewaschenen Zellen wurde je 10µl Propidiumiodid und 100µl AnnexinVCy5 (1:100 in Annexin-1x-Puffer) gegeben und anschließend bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Analyse am FACS Scan.

3.2.3 Single-Clone-Assay

Zur Testung einzelner Zellklone aus dem WEHI 7.1-Zellpool wurde wie folgt vorgegangen: Die WEHI 7.1-Zellsuspension wurde mit Nährmedium so weit verdünnt, dass pro ausplattiertem Well nur eine Zelle zu erwarten ist, d.h. in 250µl Medium befand sich voraussichtlich nur eine Zelle. Es wurden 96-well-Zellkulturplatten mit der verdünnten Zellsuspension befüllt und für zwei Wochen im Brutschrank inkubiert. Wells, in denen Zellwachstum stattfand, konnten mittels Indikatorumschlag des Mediums identifiziert werden. Diese Zellen wurden jeweils einzeln auf ihr Ansprechen gegenüber DEX mittels eines Dexamethason-Apoptose-Assays getestet.

3.3 DNA- und RNA-Analysen

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Agarosemenge wurde eingewogen, in 0,5x TBE aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C mit Ethidiumbromidlösung (10mg/ml in H₂O) versetzt (1:10000) und in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 0,5x TBE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben, die zuvor mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 80-100 Volt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

3.3.2 Synthese von phosphorylierten Oligonukleotiden

Für die Herstellung von Virus-Plasmiden, die eine spezifische interferierende RNA in ihre jeweilige Wirtszelle integrieren können, müssen zuvor komplementäre Einzelstrang-Oligonukleotide zu DNA-Doppelsträngen verbunden werden. Dieser Vorgang wird im Folgenden als „Oligo-Annealing“ bezeichnet. Je 10µl beider Oligo-Lösungen (Konzentration 1pmol) werden mit 10µl (T4-Ligase-Puffer und 20µl Wasser zuerst bei 96°C für 5 Minuten inkubiert und anschließend für 1 Stunde bei 80°C belassen um anschließend sofort auf Eis gekühlt zu werden. Am Folgetag werden 5µl der Oligo-Annealing-Reaktion zusammen mit 12µl Wasser, 2µl T4-Ligase-Puffer und 1µl PKC-Enzym für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird die Phosphorylierungsreaktion durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten gestoppt.

3.3.3 Klonierung, Ligation und Transformation

Das Plasmid pLloxGFP/siUTR wurde durch Umklonierung des existierenden Konstrukts pLL3.7GFP generiert. Hierzu wurde der Vektor mit Hilfe der Restriktionsenzyme XhoI und KspA1 geschnitten. Der gesamte Reaktionsansatz wurde elektrophoretisch über ein 1%iges präparatives Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Fragment ausgeschnitten und eluiert. Elution bzw. Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des MoBio-Kits nach den Angaben des Herstellers.

Für die anschließende Ligation wurden geschnittenes Vektorplasmid und phosphoryliertes Doppelstang-Oligonukleotid in einem molaren Verhältnis von eins zu drei eingesetzt und zusammen mit der T4 DNA Ligase (MBI) in Ligationspuffer (MBI) für 8-12 Stunden bei 16°C inkubiert. Begleitend wurde zur Kontrolle die gleiche Menge an Vektorplasmid ohne Fragment angesetzt. Beide Ansätze wurden dann parallel in kompetente E.coli Bakterien (Top10F⁺) transformiert. Hierzu wurden 50µl Suspension kompetenter Bakterien auf Eis mit 1,5µl aus einem 10µl Ligationsansatz versetzt und für 15 min inkubiert, dann 30sec lang auf 42°C gebracht und für 1-2 Minuten auf Eis wieder abgekühlt. In der Folge wurden die Ansätze in 250µl SOC-Medium (4g Bacto-Peptone, 1g Yeast-Extract, 0,1g NaCl, 2ml 250mM KCl, 1µl 2M MgCl₂, 4ml 1M Glucose ad 200ml H₂O) aufgenommen und für 1h bei 37°C mit 200U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigem (100µg/ml) Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus mutmaßlichen positiven, d.h. Vektor/ Fragment exprimierenden Kolonien wurde anschließend die DNA isoliert und mittels geeigneter Restriktion und Sequenzierung verifiziert.

3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Je 2ml LB/Ampicillin (150µg/ml) wurden mit einer Kolonie geimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (200U/min). Die Bakterien wurden bei 14000rpm pelletiert, in 300µl Resuspensionspuffer (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA und 100µg/ml RNase A) aufgenommen und durch Zugabe von 300µl Puffer P2 (200mM NaOH und 1% SDS) lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Neutralisation durch 300µl Puffer P3 (3,0M Kaliumacetat, mit Essigsäure auf pH5,5). Die Lysate wurden nach fünf Minuten Inkubation auf Eis bei 14000rpm zehn Minuten zentrifugiert, die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 600µl Isopropanol ausgefällt und bei 14000rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und in 40µl TE pH=8,0 (2ml Tris/HCl, 400µl 0,5M EDTA ad 200ml H₂O) aufgenommen. Die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus 50ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Midi-Prep-Kit der Firma QIAGEN gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

3.3.5 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 0,5ml PCR-Reaktionsgefäß hergestellt:

- 500ng DNA in H₂O
- 2µl Primer
- 2,5µl Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ad 10µl H₂O

Die Reaktion wurde für 25 Zyklen, bestehend aus 30s bei 96°C, 15s bei 50°C und 2min 30s bei 60°C im PCR-Gerät inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt.

Die Sequenzierreaktion wurde für zwei verschiedene Primer (50ng/µl) durchgeführt:

- U6-Primer: 5' GAAACTCACCTAACTG 3'
- FUW 2: 5' TAGCATGATACAAAGGC 3'

Zur Aufreinigung der Sequenzierproben wurde der 10µl-Ansatz mit 90µl H₂O auf 100µl aufgefüllt. Es wurde 2,5-faches Volumen 100%iger Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat zugegeben. Die gefällte DNA wurde für 20 Minuten bei 14000rpm abzentrifugiert, das Pellet anschließend mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen, trocknen lassen und nach Zugabe von 25µl Hi-DiTM-Formamide (Applied Biosystems) für zwei Minuten bei 94°C erhitzt. Die Proben wurden in PCR-Tubes überführt und auf Eis gestellt, fertig zur Analyse mit dem ABI Prism[®] 377 DNA Sequencer.

3.3.6 RNA-Isolation

Generell gilt für das Arbeiten mit RNA, dass RNase-freie Materialien und DEPC-H₂O verwendet wird. Auch der 70%ige Ethanol wurde mit DEPC-H₂O angesetzt. Gelschlitten und Kämmen sind vor Gießen von RNA-Gelen mit 100%igem Ethanol zu säubern. Die Elektrophoresekammer sollte gereinigt und mit frischem 0,5xTBE befüllt werden.

2-3x10⁶ Zellen wurden pelletiert (1600 rpm, fünf Minuten), der Überstand abgesaugt und in 1ml Trizol mit Hilfe einer Spritze resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 200µl Chloroform dazugegeben, 15 Sekunden gevortext und erneut fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation (3500 rpm, zehn Minuten, 4°C) wurde die obere farblose Phase in ein neues Cap überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine

anschließende Zentrifugation (3500rpm, zehn Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 89µl DEPC-H₂O gelöst. Es wurden 10µl DNase-Puffer und 1µl DNase (10 Units) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C verdaut und anschließend eine Säulenreinigung mit dem RNeasy-Kit von QIAGEN durchgeführt. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration im Fotometer bestimmt. Um die Qualität der Präparation zu beurteilen, wurde 500ng RNA in 10µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 2µl Orange G versetzt und auf ein 0,5xTBE-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 80 Volt. Die 18S und 28S rRNA wurde anschließend unter UV-Licht visualisiert.

3.3.7 cDNA-Synthese

1µg RNA wurde mit 2µl dNTP's (5mM) und 1µl Oligo(dT)-Primer (PDT-Primer, 500µg/ml, Roche) versetzt, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Es wurden 4µl 5xPuffer und 2µl 0,1M DTT (beides von Invitrogen) zugegeben. Es folgten zwei Minuten bei 42°C. Nun wurde 1µl Reverse Transkriptase Superscript II (Roche) zugegeben und der Ansatz 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Zum Schluss wurde das Enzym zehn Minuten bei 70°C inaktiviert. Die Effizienz der cDNA-Synthese wurde in einer PCR für den Zytoskelettbestandteil β-Actin und für GFP überprüft (Primer s.u.).

3.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technologie erlaubt DNA-Amplifikationen in vitro mittels einer Hitzestabilen DNA-Polymerase. Es können sowohl Gene, Genabschnitte als auch nicht kodierende Erbgutsequenzen vervielfältigt werden. Die DNA-Produkte stehen dann für weitere Aufgaben, z.B. für das Klonieren von Genen oder einer Genanalyse, zur Verfügung.

Die PCR besteht aus verschiedenen Bestandteilen:

- einer sogenannten Template-DNA, welche die zu amplifizierende Information enthält
- einem Primer-Paar, welche den Startpunkt des Syntheseschritts von beiden Seiten des gewählten DNA-Bereichs festlegen
- einer hitzestabilen DNA-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*), welche die Primer durch Anlagerung der dNTPs verlängert
- Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), den Bausteinen der DNA
- Mg²⁺ Ionen und Pufferlösung die für die Taq-Polymerase ein optimales Arbeitsmilieu schaffen

Der Ablauf des PCR-Prozesses gestaltet sich wie folgt:

- Denaturierung (Trennung) des DNA-Doppelstrangs bei 95°C
- Annealing (Primeranlagerung) bei 50-65°C
- Elongation (Verlängerung des DNA-Strangs) bei 72°C
- Erneute Denaturierung, Annealing, usw.

Ein kompletter Durchlauf der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wird als Zyklus bezeichnet. Üblicherweise besteht nach ca. 25-40 Zyklen ausreichend DNA-Material. Die PCR wurde mit dem Eppendorf mastercycler gradient durchgeführt.

Folgender Ansatz wurde gewählt:

- 1µl Template-DNA (entspricht cDNA aus transfizierten WEHI 7.1 Zellen)
- 1µl Primermix (10pmol) UTR11/12 bzw. β-Actin (beide Sigma-Aldrich)
- 1µl Nukleosidtriphosphatmix (je 5mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 2,5µl 10xPCR-Puffer (Fermentas)
- 0,3µl Taq-Polymerase 5U/µl (Fermentas)
- Aqua dest. ad 25µl

PCR-Programm:

1x	2min	95°C
35x	30sec	95°C
35x	30sec	60°C
35x	30sec	72°C
1x	5min	72°C

3.4 Proteinanalytik

3.4.1 Proteinlysate

3×10^6 Zellen wurden pelletiert (1600rpm, 5min), der Überstand abgesaugt. Die sedimentierten Zellen wurden in 150 μ l RIPA-Puffer (50mM Tris pH=7,2, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis lysiert. Der RIPA-Puffer wurde unmittelbar vorher mit 1:100 Proteaseinhibitoren (Iodoacet Amid, Leupeptin 1mg/ml, Pefabloc 100mM; alle von Roche) versetzt. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (14000rpm, 10min, 4°C), die Proteinextrakte im Überstand befanden, in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C gelagert.

3.4.2 Western Blot

Mittels Western Blot können bestimmte Proteine eines Gemisches spezifisch nachgewiesen werden. Dabei werden die in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Blotmembran transferiert, damit sie für einen spezifischen Antikörper zugänglich werden. Dieser wird dann in einem zweiten Inkubationsschritt detektiert.

SDS-PAGE

Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend folgender Angaben hergestellt:

	Trenngel 7,5%	Sammelgel 3%
Acrylamide Gel 30	1,9ml	780 μ l
1,5M Tris/HCl pH=8,8	1,9ml	-
1,0M Tris/HCl pH=6,8	-	750 μ l
10% SDS	75 μ l	60 μ l
H ₂ O	3,6ml	3,7ml
TEMED	7,5 μ l	14 μ l
10% Ammoniumperoxodisulfat	75 μ l	60 μ l

Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer (0,72ml 1M Tris pH=6,8, 3ml Glycerol, 2,4ml 10% SDS, 0,6ml β -Mercaptoethanol, 1,2ml 1% Bromphenolblau ad 10ml H₂O) versetzt und vor dem Auftragen 10 Minuten bei 95°C gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte stromkonstant bei 35mA. Um eine nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden zu ermöglichen, wurden neben den Proben 10 μ l des Standards Protein MW

Marker (peqLab) aufgetragen, einem Gemisch von sieben Proteinen bekannten Molekulargewichts zwischen 14 und 116 kDa.

Blotting

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und das (Trenn-)Gel kurz mit Transferpuffer (150mM Glycin, 25mM Tris, 10% Methanol) gespült. Die Blotmembran (Immunblot, PVDF-Membran, BioRad) und sechs Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten, die Membran kurz in 100%iges Methanol getaucht, mit H₂O abgespült und direkt in Transferpuffer überführt. Anschließend erfolgte der Aufbau des Transfers in einer semi dry-Blottingkammer wie folgt:

Anode

3 mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere

Blotmembran

Gel

3 mit Transferpuffer getränkte Whatman Papiere

Kathode

Der Transfer erfolgte über eine Stunde stromkonstant mit 55mA bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran mit Ponceau S (2g Ponceau S, 30ml Trichloressigsäure, 30ml Sulfosalicylsäure ad 1l H₂O) gefärbt. Hierbei wurden die Proteinbanden auf der Membran sichtbar, so auch die des Markers, die nun mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet werden konnten. Vor der anschließenden Antikörperfärbung wurde die Membran zunächst für 1,5-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer (3% Magermilchpulver in PBS/TWEEN 0,1%) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Immunologische Detektion

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen der Membran (3x10min mit PBS/TWEEN) erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Pierce) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Dexamethason-Apoptose-Assay mit WEHI 7.1-Zellen

Die Zellen des Typs WEHI 7.1 wurden auf ihre Eignung für Apoptoseexperimente anhand ihrer Überlebensrate in einem Dexamethason-Apoptose-Assay (s. Abb. 4-1) überprüft. Nach 96 Stunden Inkubation in dem hochpotenten Glukokortikoid Dexamethason (DEX) zeigten die Zellen keine erhöhte Apoptoserate. Die eingesetzten WEHI 7.1-Zellen sind überwiegend resistent gegenüber dexamethasoninduzierter Apoptose.

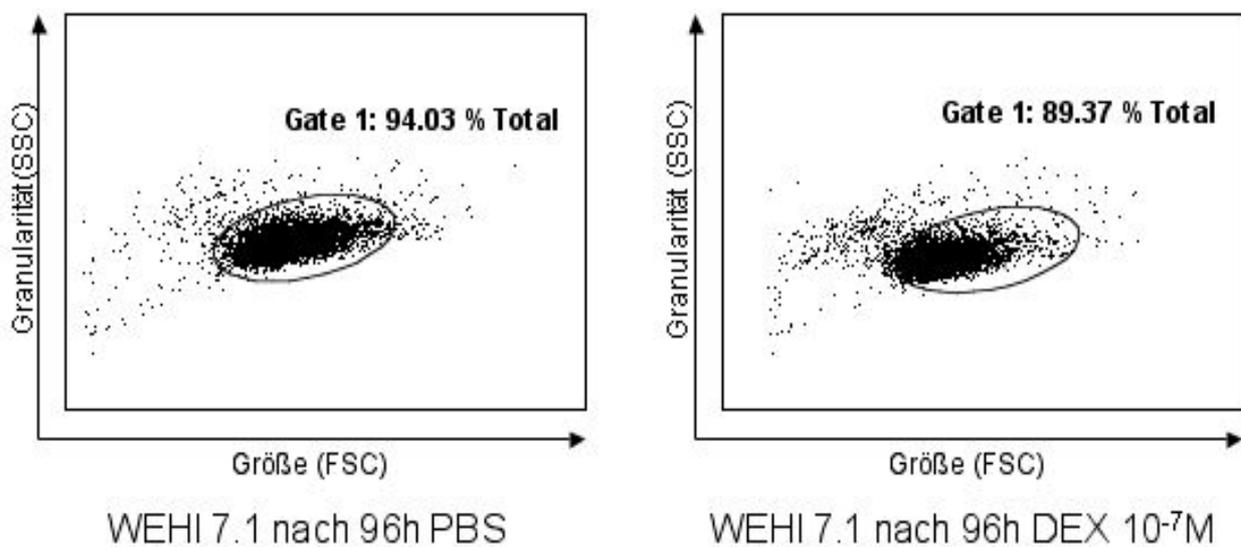


Abbildung 4-1 FACS Scan-Analyse: WEHI 7.1-Zellen zeigen geringe Sensitivität gegenüber DEX-induzierter Apoptose. Die Zellen wurden mit PBS bzw. DEX behandelt. Konzentration DEX im Medium: 10^{-7} M. Inkubationsdauer: 96 Stunden. Gate 1 erfasst die vitalen Zellen basierend auf Größe (FSC) und Granularität (SSC).

4.2 Single-Clone-Experiment

In den unter 4.1 vorgestellten Experimenten zeigten die WEHI 7.1-Zellen eine nahezu vollständige Resistenz gegenüber Dexamethason. Ein geringer (ca. 3-4%) Anteil der Zellen starb jedoch regelmäßig in DEX-Apoptose-Assays ab. Es wurde daher untersucht, ob sich innerhalb des WEHI 7.1-Zellpools glukokortikoidsensitive Subklone befinden.

In einer Neubauer-Kammer wurde die Zellzahl der WEHI 7.1-Zellsuspension ermittelt. Anschließend wurde die Suspension mit Zellkulturmedium auf statistisch eine Zelle pro 250 μ l Medium verdünnt. Daraufhin folgte eine zweiwöchige Inkubation der vereinzelt Zellen im Brutschrank. Der Indikatorumschlag des Kulturmediums zeigte das Zellwachstum an. Die Zellsuspensionen, die jeweils aus nur einer einzigen Zelle hervorgehen, wurden nun auf ihr

Ansprechen gegenüber DEX mittels eines DEX-Apoptose-Assays getestet. Es stellte sich heraus, dass der WEHI 7.1-Zellpool sowohl dexamethasonsensibel, als auch dexamethasonresistente Zellklone enthält. Zehn der insgesamt 47 vereinzelt Zellklone besaßen nahezu vollständige Resistenz gegenüber DEX, d.h. mehr als 80% dieser Zellen überlebten den Assay bei einer DEX-Konzentration von 10^{-6} M (Klon #10B; Abb. 4-2). Weitere sechs von 47 waren dauerhaft sensibel und gingen zu über 80% in Apoptose (Klon #5A, Abb. 4-2). Die Mehrzahl (31 von 47) der Klone war teilsensibel (Klon #9A, Abb. 4-2), d.h. ca. 20-80% der Zellen überlebten die DEX-Inkubation. Die Ursachen der verschiedenen Reaktionen der WEHI 7.1-Subklone auf die Dexamethasonbehandlung wurden in späteren Experimenten untersucht. Zunächst sollte der Ablauf der Zellschädigung analysiert werden.

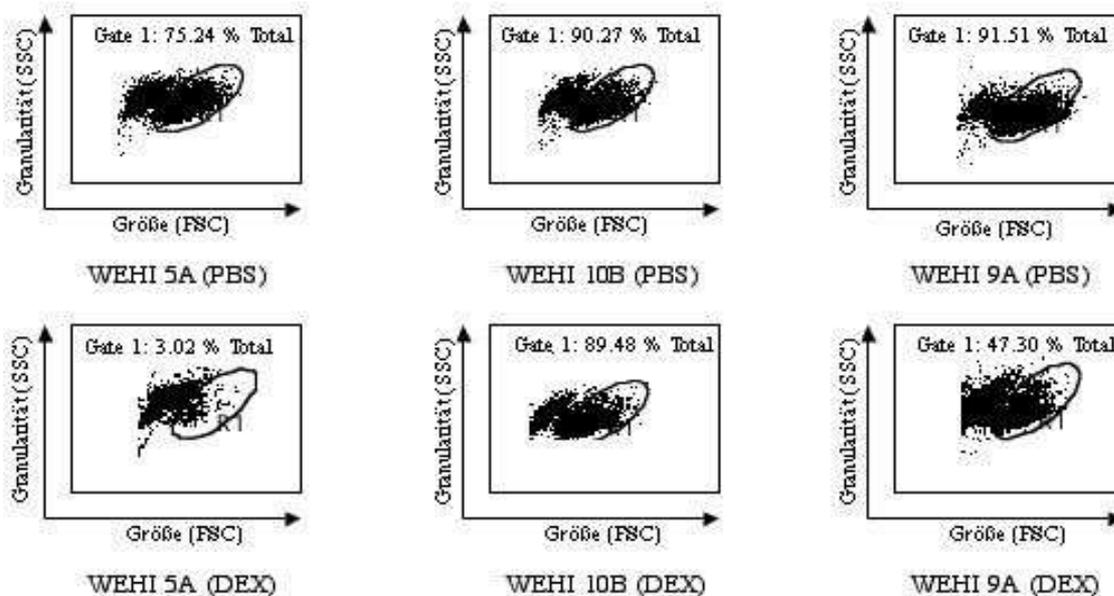
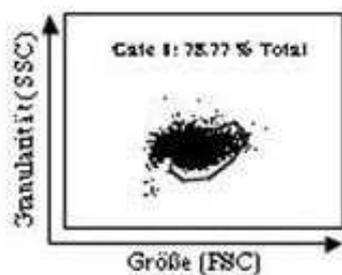


Abbildung 4-2 FACS Scan-Analyse: WEHI 7.1-Subklone zeigen unterschiedliche Sensitivität gegenüber GICD. Die Zellen wurden mit PBS (Negativkontrolle bzw. Dexamethason behandelt. Konzentration DEX im Medium: 10^{-6} M. Inkubationsdauer: 48h. „Gate 1“ (G1) erfasst die vitalen Zellen in Prozent, basierend auf Größe (FSC) und Granularität (SSC).

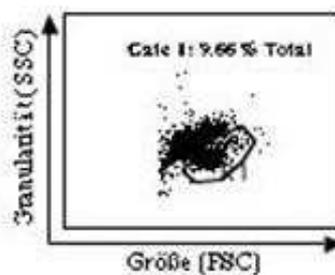
4.3 Dexamethason-Assays bzw. Etoposid-Assays mit WEHI 7.1-Subklonen

In den vorausgegangenen Apoptoseexperimenten (s. 4.1 und 4.2) wurde ausschließlich die Zellreaktion nach Glukokortikoidbehandlung untersucht. Im folgenden wurde die Apoptoserate der WEHI 7.1-5A-Zellen unter Dexamethasonbehandlung mit der unter Etoposidbehandlung verglichen. Bei Etoposid handelt es sich um ein apoptoseinduzierendes Chemotherapeutikum, das einen vom Glukokortikoidrezeptor unabhängigen Apoptoseweg initiiert. Das Überleben der verschiedenen WEHI-Subklone wurde ausgewertet um so die Ursache des WEHI 7.1-Zelltods besser charakterisieren zu können. Nach Etoposid- bzw. DEX-Inkubation zeigten sich vergleichbare Werte für Größe und Granularität der

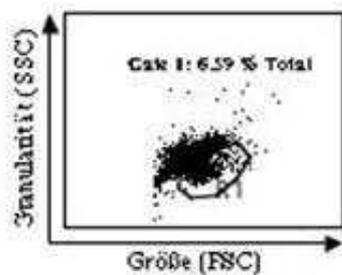
Zellsuspensionen im FACS Scan. Aus Abbildung 4-3 ist zu entnehmen, dass Zellen nach Etoposid- bzw. DEX-Gabe an Granularität (*SSC*) zunahm, die Zellgröße hingegen (*FSC*) abnahm. Als Negativkontrolle diente eine Zellbehandlung mit PBS. Die genannten zellmorphologischen Veränderungen sind für apoptotische Zellen typisch und lassen darauf schließen, dass Etoposid und Glukokortikoide Apoptose in WEHI 7.1-5A-Zellen induzieren. DEX erwies sich in den verwendeten Konzentrationen als äußerst potente zytotoxische Substanz. DEX besitzt über 48h ein ähnlich starken zytotoxischen Effekt auf die WEHI 7.1-5A-Zellen besitzt, wie die verwendete Menge Etoposid über 6h (Überlebensanteil von 7 bzw. 9% bei DEX im Vergleich zu 14% bei Etoposidgabe).



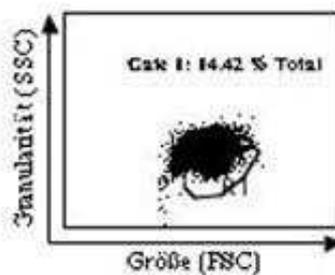
PBS für 48h



DEX 10⁻⁶M für 48h



DEX 10⁻⁵M für 48h



Etoposid für 6h

Abbildung 4-3 FACS Scan-Analyse: WEHI 7.1-5A Zellen reagieren auf Dexamethason- bzw Etoposidbehandlung mit Apoptose. Inkubation in PBS (Negativkontrolle) bzw. Dexamethason für ca. 48 Stunden in den angegeben Konzentrationen. Etoposid 0,05µg/ml Zellsuspension über 6 Stunden.

Die Erkenntnisse dieses Experimentes wurden mit den Reaktionen weiterer WEHI 7.1-Subklone verglichen, die zuvor eine Resistenz gegenüber DEX gezeigt hatten. Unklar ist, ob eine Glukokortikoidresistenz in Zusammenhang mit einer Etoposidresistenz steht. Hierzu wurden DEX- und Etoposid-Apoptose-Assays mit drei verschiedenen WEHI 7.1-Subklonen im FACS Scan ausgewertet.

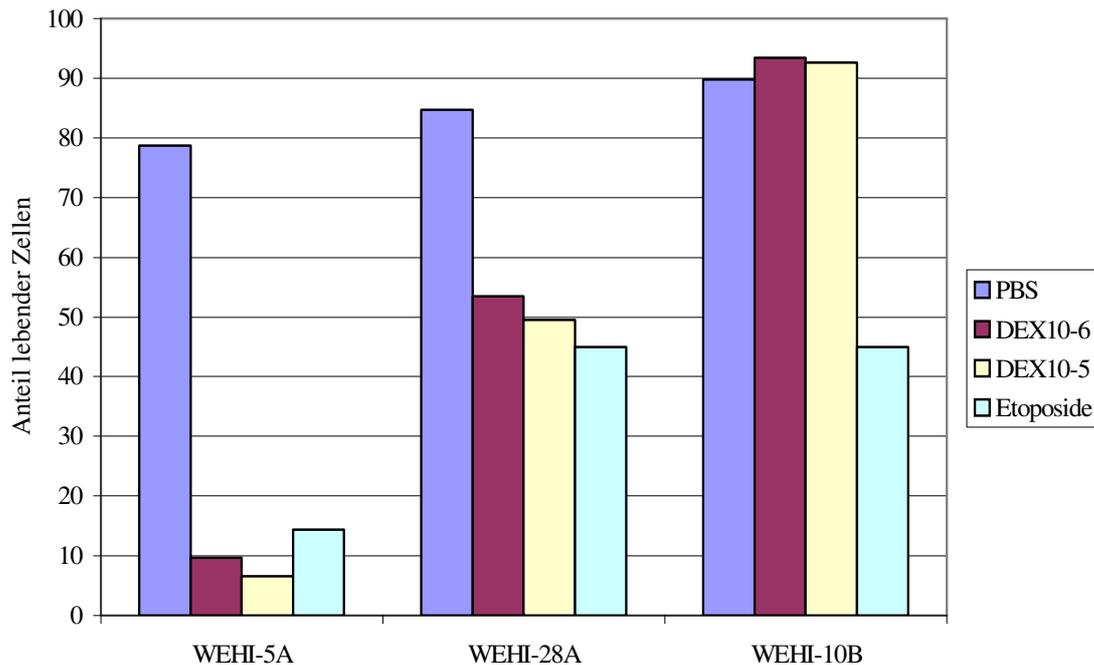


Abbildung 4-4 Assay-Auswertung: WEHI 7.1-Zellklone zeigen unterschiedliche Sensitivität gegenüber Dexamethason- bzw. Etoposidbehandlung. WEHI 7.1-5A-Zellen wurden für weitere Experimente herangezogen. WEHI-28A- und WEHI-10B-Zellen stellen Beispiele für wenig GICD-sensitive WEHI 7.1-Klone dar. Der Anteil an lebenden Zellen wurde durch Bestimmung des life-gate im FSC und SSC des FACS Scan ermittelt.

In Abbildung 4-4 ist dargestellt, dass nicht nur das Ansprechen (im Sinne einer Apoptose) der WEHI-Subklone auf Glukokortikoide äußerst unterschiedlich ist, sondern auch deren Sensitivität gegenüber anderen Zellgiften wie Etoposid variiert. Der Klon 5A zeigt einen deutlichen Zellverlust (6-15% lebende Zellen) sowohl unter DEX-, als auch unter Etoposidgabe. Klon 28A besitzt für DEX und Etoposid vergleichbare Überlebensraten (44-53%). Der DEX-resistente Klon 10B spricht im Vergleich zu Klon 5A auch auf Gabe von Etoposid wenig an (ca. 45% lebende Zellen), während DEX hier nahezu keine apoptotische Wirkung entfaltet. Gutes Ansprechen auf GICD (glukokortikoidinduzierter Zelltod) der Zellen war eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Experimente, weshalb im Folgenden der Klon WEHI 7.1-5A verwendet wurde.

4.4 Western Blot-Analyse der WEHI 7.1-5A-Zellen auf das Vorhandensein des GR

Die Ursachen der erhöhten Zelltodneigung der WEHI 7.1-5A-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Miriam Alb (ebenfalls Arbeitsgruppe Prof. H. Reichardt) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit [20] analysiert. Western Blot-Untersuchungen des WEHI 7.1-5A-Zellproteins (s. Abb. 4-5) ergaben, dass WEHI 7.1-5A-Zellen mehr Glukokortikoidrezeptor-

protein (GR) als WEHI 7.1-Zellen (WEHI 7.1-Zellpool) besitzen. Anhand der Proteinverdünnungsreihe in Abb. 4-5 erkennt man, dass die GR-Proteinbanden der unverdünnten WEHI 7.1-Spur und die der 1:3 verdünnten WEHI 7.1-5A-Spur ähnlich starke Signale liefern. Es befindet sich folglich ca. die dreifache Menge GR in den WEHI 7.1-5A-Zellen. Dies ist vermutlich eine Ursache für das unterschiedliche Ansprechen der verschiedenen Zellklone auf GICD, es erklärt aber unzureichend die hohe Sensitivität gegenüber Etoposid, das GR-unabhängig wirkt.

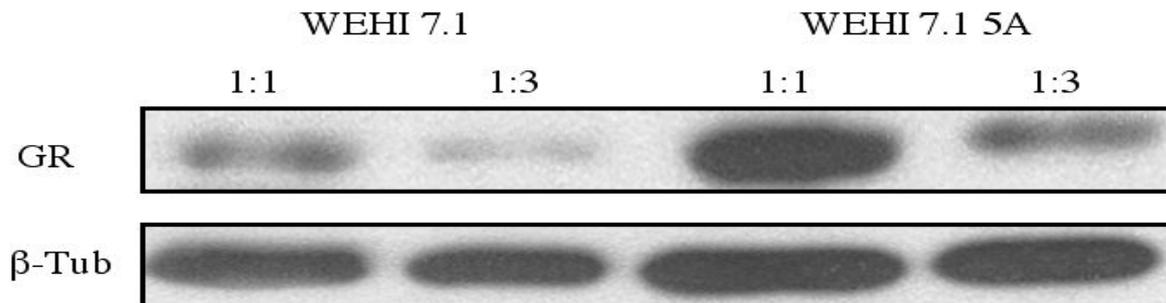


Abbildung 4-5 Western Blot Analyse auf GR in WEHI 7.1 Zellen. Protein von je 3×10^6 WEHI 7.1 bzw. 7.1-5A Zellen wurde in je 150 μ l Proteinpuffer gelöst. Aufgetragen wurden 10 μ l Proteinlösung pro Spur bzw. 10 μ l Lösung 1:3 verdünnt. Der Ansatz wurde über einem 7,5%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte erst mit einem Anti-GR-Antikörper und anschließend mit einem Anti- β -Tubulin(β -Tub)-Antikörper.

4.5 PCR-Analyse der WEHI 7.1-5A-Zellen auf die Expression des GR-1A-Transkripts

Purton et al. [19] konnten zeigen, dass doppelpositive T-Zellen (CD4/CD8-positiv), die ein hohes Expressionsniveau des vom 1A-Promotor ausgehenden Glukokortikoidrezeptors GR-1A besitzen, besonders empfindlich auf Glukokortikoidbehandlung mit Apoptose reagieren. Diese Daten wurden an der Thymomzelllinie WEHI 7.2 gewonnen. Die vorliegende Arbeit soll die Auswirkungen eines GR-1A-knockdown auf WEHI 7.1-5A-Zellen zeigen. Die von Purton et al. verwendeten WEHI 7.2-Zellen sind den WEHI 7.1-Zellen ähnlich, ohne identisch zu sein. Zunächst wurden die WEHI 7.1-Zellen auf das Vorhandensein von GR-1A untersucht. Hierzu wurde cDNA aus WEHI-7.1-5A und WEHI-231 (Negativkontrolle, B-Zell-Lymphomzellen) gewonnen. Eine PCR-Analyse (s. Abb. 4-6) mit Primern für die untranslatierte Region des GR-1A (UTR), die spezifisch für diesen GR-Typ ist, zeigt, dass das GR-1A-Transkript in den WEHI 7.1-5A-Zellen vorhanden ist. In der Kontrollgruppe WEHI-231 ist es jedoch deutlich reduziert.

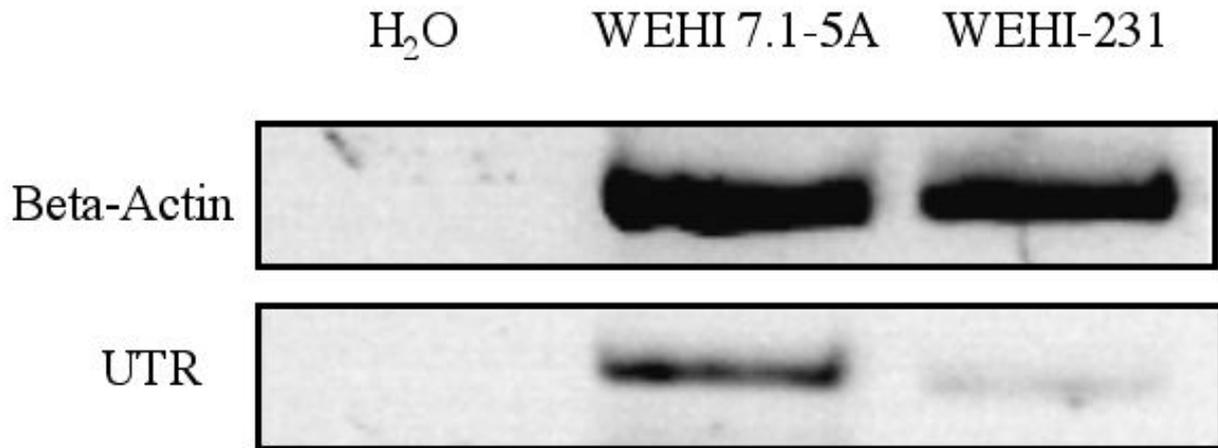


Abbildung 4-6 Vorkommen von UTR1A-Transkript in WEHI 7.1-5A Zellen. Nach 30 Zyklen wurde das PCR-Produkt auf ein 1,5%igen Agarosegel aufgetragen. Die Detektion erfolgt mittels Ethidiumbromid und UV-Licht-Bestrahlung. H₂O und WEHI-231 (B-Zell-Lymphomzellen) als Kontrolle.

4.6 Generierung der Vektoren und Auswahl der RNAi-Sequenzen

Die Bedeutung des GR-1A sollte an Zellen mit einem Mangel an GR-1A untersucht werden. Hierzu wurde die Expression des GR-1A in den WEHI 7.1-5A Zellen selektiv gesenkt. Die Zellen wurden mit siRNA-exprimierenden Viren infiziert, die ein spezifisches gene-silencing des GR-1A durch Inhibition der mRNA im untranslatierten Bereich der RNA (UTR) ermöglichen. Dieser Bereich ist spezifisch für den GR-1A. Die RNA-Interferenz-Technik mittels siRNA erlaubt ein selektives knock-down bestimmter Gene, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese relativ kleinen RNA-Doppelstrang-Moleküle besitzen in ihrem ansonsten durchgehend komplementären Verlauf eine RNA-Schleife, die sog. stem loop. Diese Haarnadelstruktur ist wichtig für die weitere Prozessierung der siRNA. Außerdem wurden den siRNA-Strängen an ihren 5'-Enden ein sog. Basen-Paar-Mismatch eingebaut, das die siRNA-Effizienz erhöht [21]. Die vier siUTR-RNAi-Konstrukte wurden, wie in Abbildung 4-7 und 4-8 dargestellt, generiert. Für den verwendeten Kontrollvektor pLLoxgz/siCD8rat gilt selbiges Schema. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

```
5'...CCCTCTCGTGCATGATGCAACACCTGACTTTAACCCCTCTTGCTATGGTTTCTATTTGGGTCTGA
CTTGGGGACTATCTGCTGAATCAGTATCTCTGAGCAGAACCAAGAAATTCACCCCCAAAGAGGA
GTCACTGTATTAGTCAGGGTCTCTGAACAAAGTTAGACCCAAGAAACAGAAATCCTCTGGTCTGA
AATGGTCTCTTGTGTGAAATTCTCTGCTTTGTACGCAAAGGAAAGAACATGCCGGTAGGAGCCTG
CTCGTCAAACGAGGTGTGAAATCTAGCTTCTTCTAGAAAAAGCAGCCTGCGTCACATCGAAGCCA
GATTGGTTCTTTGCTCTGAGAGCGGTTAGGCTAGTGGAGGGCAGGCTTCCGTGACAACCTGGTACA
GGGACAGGTGCAGTGTGGGTCCCACAGATATGAACTCTGATAAATCGTGCATGAGCTACTCTGCG
TAAGAATGGAGAAGAGAGCAGCCCAGCTCCCACCCTCCTGGGGTTCCCATCGCAGCCTGATCATC
TGCAGCCTTCTCAGCCAGGAAATGATGTTTCAGATCCTGCTTCGTTAAGATGTCTGGGAGGAAG...3'
```

Abbildung 4-7 Teilausschnitt des untranslatierten Bereichs des Glukokortikoidrezeptor ausgehend vom 1A-Promoter. Die Abschnitte, gegen die eine siRNA gewählt wurde, sind farblich hervorgehoben: siUTR1, siUTR2, siUTR3, siUTR4.

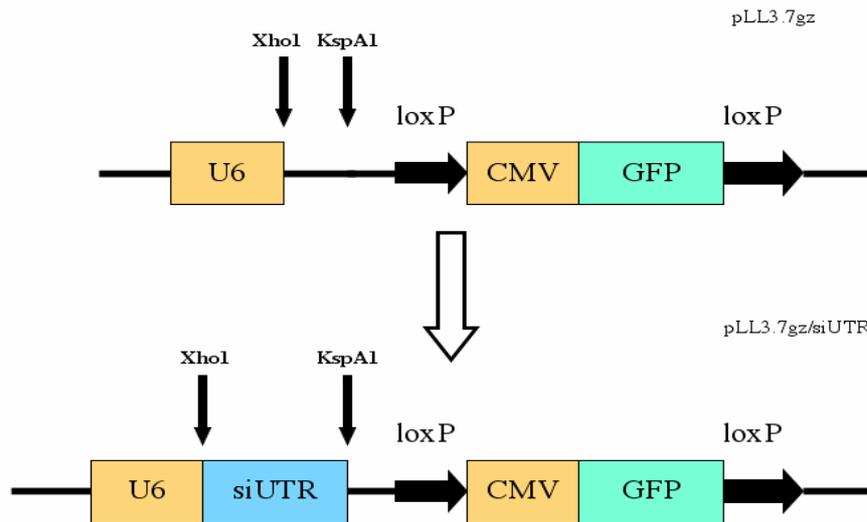


Abbildung 4-8 Klonierungsschema für pLLoxgz/siUTR.

4.7 Produktion von Lentiviren und Infektion der WEHI 7.1-5A-Zellen

Für die Induktion stabiler RNAi in WEHI 7.1-5A-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Konstrukten rekombinante, replikationsdefekte Lentiviren generiert. Anschließend wurden die Vektoren in die Zellen transduziert. Nach der Infektion exprimierten die Zielzellen unter der Kontrolle des Polymerase-III-Promotors U6 eine siRNA gegen den GR-1A-UTR (im Weiteren als siUTR bezeichnet). Der untranslatierte Bereich der GR-mRNA wurde als Ziel der siRNA ausgewählt, da dieser spezifisch für den 1A-Promoter ist. Das Ziel war es, ausschließlich ein Silencing des GR-1A zu erreichen, ohne den GR anderer Promotoren zu unterdrücken. Das eingebaute Konstrukt enthält zusätzlich eine loxP-CMV-eGFP-loxP-Kassette, die unabhängig von der siRNA-Transkription ist. Die erfolgreiche Infektion der Zellen konnte im FACS-Scan durch die Expression des lentiviral kodierten, grünfluoreszierenden Reportergens eGFP nachgewiesen werden. Abbildung 4-9 zeigt den Erfolg der Transduktion. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls WEHI 7.1-5A-Zellen eingesetzt, die mit Virus transduziert wurden, das den lentiviralen Vektor mit einer siRNA gegen das CD8-Transkript der Ratte exprimiert. Die siRNA gegen das CD8-Molekül der Ratte zeigt keine komplementären Sequenzen im Genom der Maus und stellt daher eine ideale Kontrolle für die weiteren Experiment an den UTR-defizienten Zellen dar.

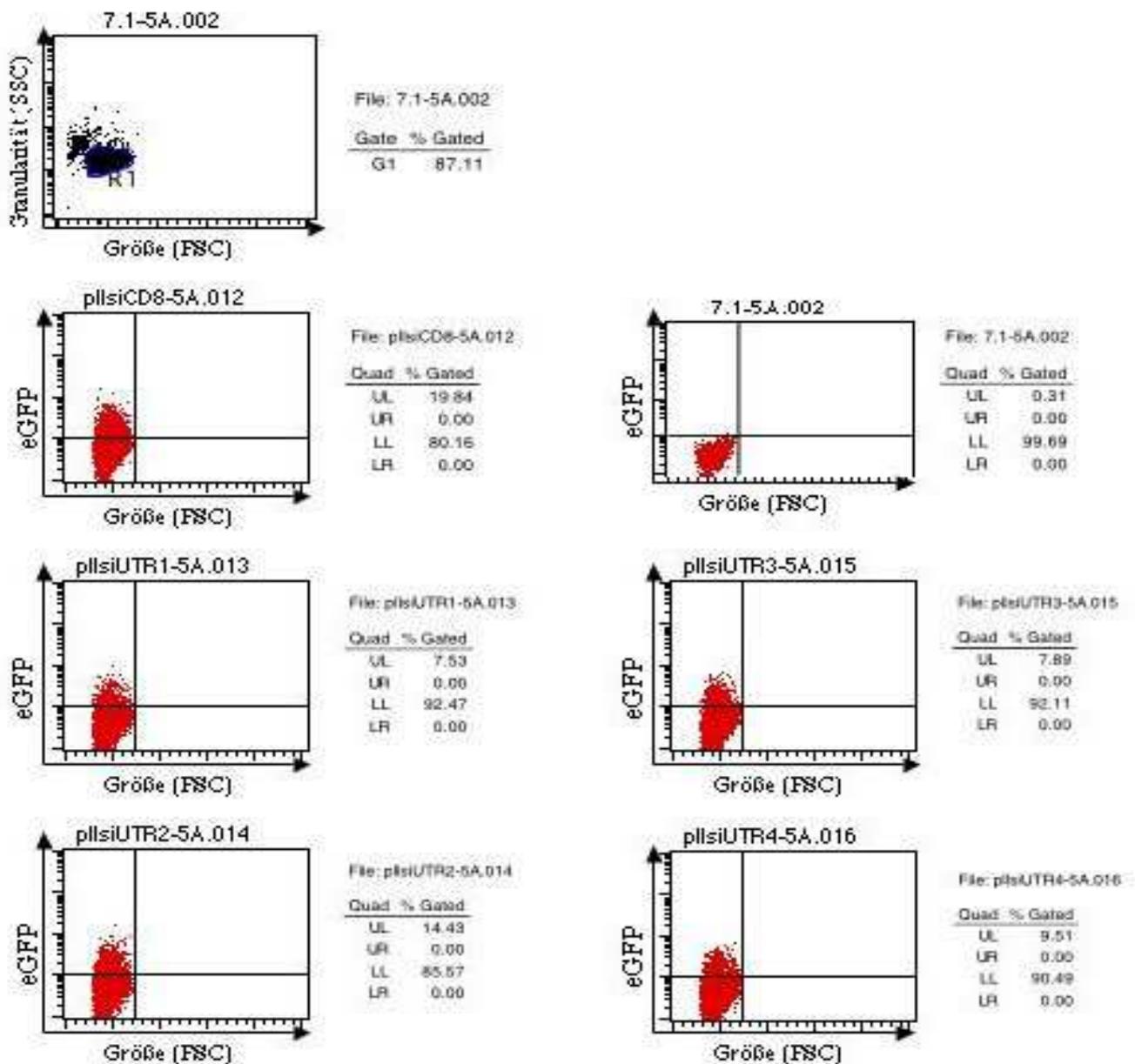


Abbildung 4-9 WEHI 7.1-5A Zellen nach Transduktion mit Lentiviren. x-Achse: Zellgröße im Forward-Side-Scatter (FSC); y-Achse: Intensität der grünen Fluoreszenz eGFP

Mit pIlsiCD8- bzw. pIlsiUTR-transfizierte WEHI 7.1-5A-Zellen wurden mit nicht-transfizierten WEHI 7.1-5A-Zellen in ihrer Intensität der eGFP-Fluoreszenz verglichen. Zur Beurteilung einer erfolgreichen Transfektion wurde ein eGFP-Signal über dem Fluoreszenzmaximum der nichttransfizierten Zellen herangezogen. Es ergaben sich Anteile von eGFP-positiven, d.h. erfolgreich transfizierten Zellen, im Bereich von 7-20%.

4.8 Sortierung der transfizierten WEHI 7.1-5A-Zellen

Um die Rate eGFP-positiver Zellen zu erhöhen, wurden die transfizierten Zellen mittels eines präparativen FACS-DiVa-Gerätes sortiert. Eine hohe Reinheit von über 94% eGFP-positiver Zellen ergab sich daraus für die Zelllinien WEHI-pII-siUTR-2, -3 und -4. Für WEHI-pII-siUTR-1 und WEHI-pII-siCD8 konnte eine maximale Reinheit von ca. 54% bzw. ca. 77% erzielt werden (s. Abb. 4-10). Auch mehrmaliges Wiederholen des Sortierungsprozesses führte bei den zuletzt genannten Zellpopulationen nicht zu einem deutlichen Zugewinn an Reinheit. In den folgenden FACS-Analysen wurde daher auf eGFP-positive Zellen gated und dadurch eine spezifische Analyse der transfizierten Zellen ermöglicht.

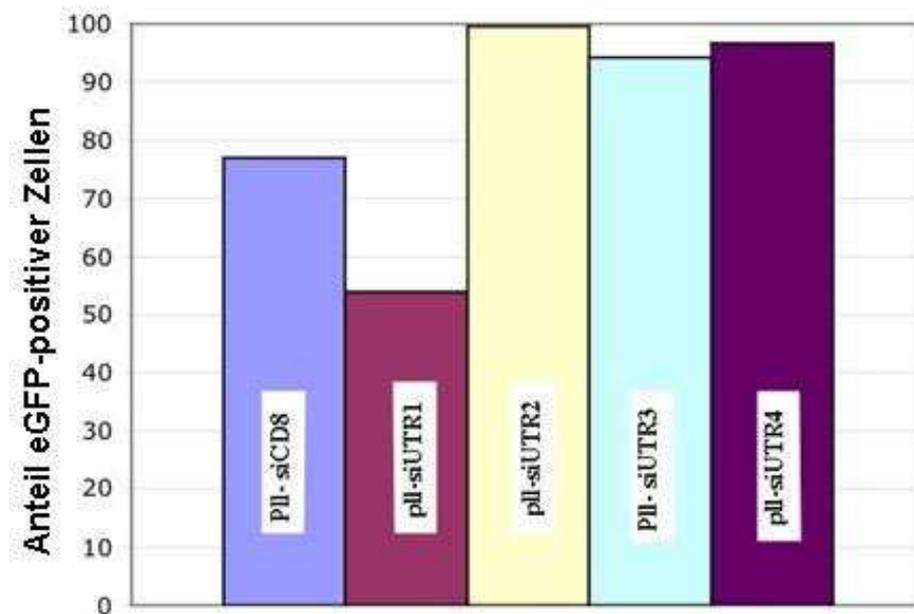


Abbildung 4-10 WEHI 7.1-5A Zellen wurden nach der Transfektion auf eGFP-Fluoreszenz mittels FACS-DiVa sortiert.

4.9 Western Blot Analyse transfizierter WEHI 7.1-5A-Zellen auf GR

Auf Proteinebene wurde untersucht, ob pII-siUTR-transfizierte WEHI Zellen eine verminderte Expression des GR-Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe WEHI 7.1-pII-siCD8 aufweisen. Das Proteinlysate wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Blotmembran transferiert. Mit Anti-GR und Anti- β -Tubulin-Antikörpern wurden die jeweiligen Proteine über eine Farbstoffreaktion detektiert (s. Abb. 4-11). Mithilfe eines densitometrischen Scans (s. Abb. 4-12) gelang ein quantitativer Nachweis und Vergleich der Proteinbanden. Zellen des Typs WEHI 7.1-pII-siUTR2, -3 und -4 zeigen einen Verlust von 34-47% des GR, während Zellen des Klons WEHI 7.1-pII-siUTR1 einen unerwarteten Zuwachs an GR von 222% gegenüber der Kontrollgruppe WEHI 7.1-pII-siCD8 verzeichnen.

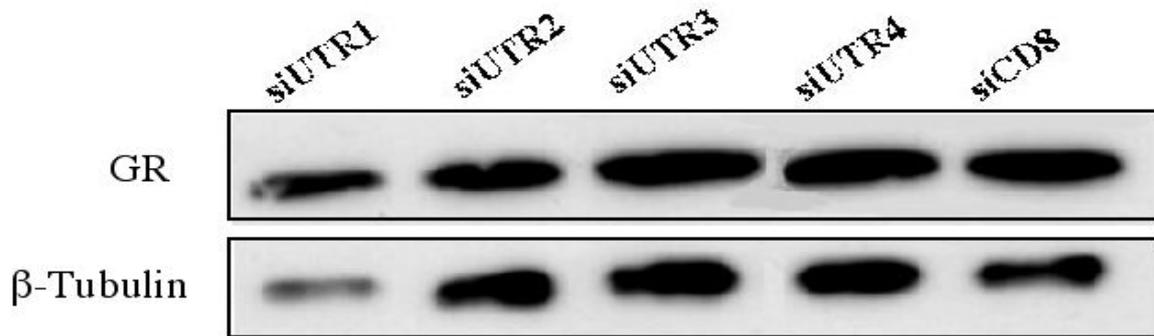


Abbildung 4-11 Western Blot Analysen zeigen die GR-Proteinexpression der WEHI 7.1-Zellen nach Transfektion mit siUTR. Protein von je 3×10^6 Zellen wurde in $150 \mu\text{l}$ Proteinpuffer gelöst. Aufgetragen wurden $10 \mu\text{l}$ Proteinlösung pro Spur. Der Ansatz wurde über einem 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte erst mit einem Anti-GR-Antikörper und anschließend mit einem Anti- β -Tubulin-Antikörper. Das Experiment wurde viermalig wiederholt.

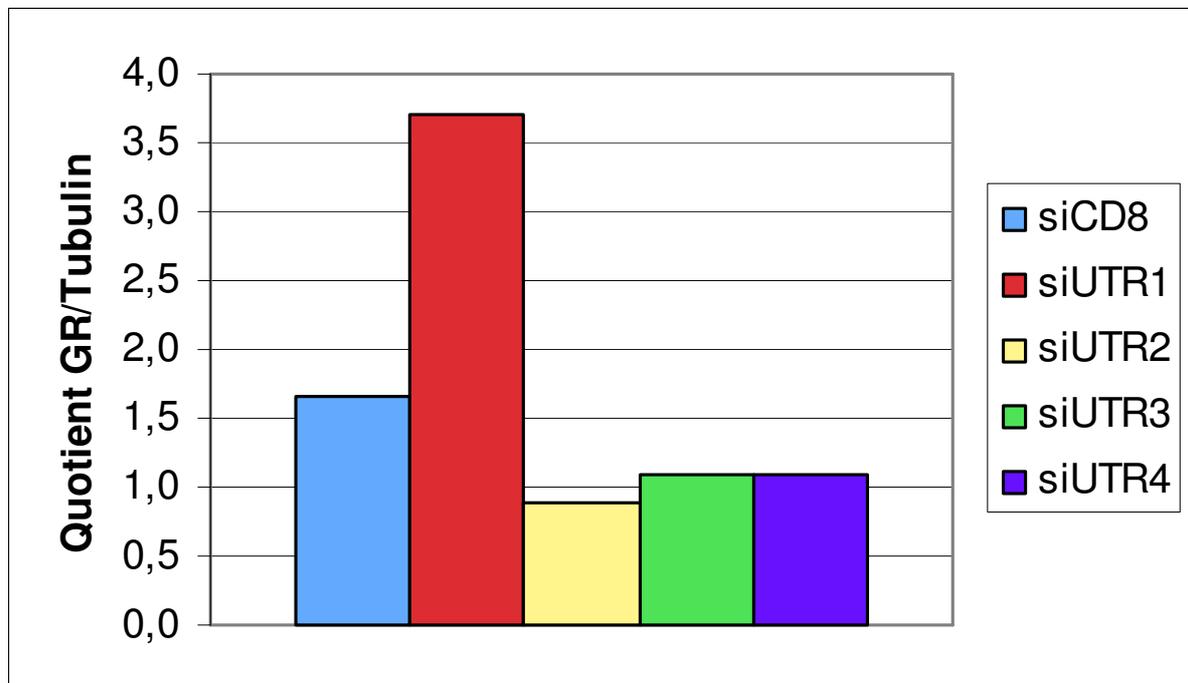


Abb. 4-12 Densitometrischer Scan des Western Blots (s. Abb. 4-11). Die einzelnen WEHI 7.1-pllsiUTR-Zellklone wurden mit der Kontrolle WEHI 7.1-pllsiCD8 verglichen. Angegeben ist der Quotient aus Proteinexpression von Glukokortikoidrezeptor (GR) und Beta-Tubulin.

4.10 DEX-Apoptose-Assays mit WEHI 7.1-5A-Zellen

Im Folgenden wurden die transfizierten Zellen auf GICD untersucht. Die Zellen WEHI 7.1-5A-pllsiUTR-1, -2, -3, -4 und WEHI 7.1-5A-pllsiCD8 $_{rat}$ wurden mit DEX bzw. PBS (Negativkontrolle) inkubiert. Nach Ablauf von 48 Stunden wurden die Zellen im FACScan auf Größe (forward scatter) und Granularität (side scatter) untersucht. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal in derselben Weise durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-13 dargestellt. Bei allen fünf Zellpopulationen zeigte sich unter PBS keine Veränderung der

Überlebensrate (alle Populationen weisen über 90% lebende Zellen auf). Für WEHI 7.1-5A-pllsiUTR3 und –siUTR2 Zellen beträgt der Anteil lebender Zellen nach DEX-Behandlung ca. 75% bzw. 68%, während bei der Kontrollpopulation WEHI 7.1-5A-pllsiCD8rat nur 65% der Zellen überleben. Die Zellen WEHI 7.1-5A-pllsiUTR-1 (55%) und -4 (64%) weisen im Vergleich schlechteres Überleben auf. Zu erwähnen ist das insgesamt gute Überleben der transfizierten Zellen im Vergleich zu nichttransfizierten WEHI 7.1-5A-Zellen (hier ca. 65%iges Überleben bei WEHI 7.1-5A-pllsiCD8 Zellen nach DEX-Behandlung in Abbildung 4-13, vgl. ca. 10%iges Überleben bei nichttransfizierten WEHI 7.1-5A-Zellen in Abbildung 4-3).

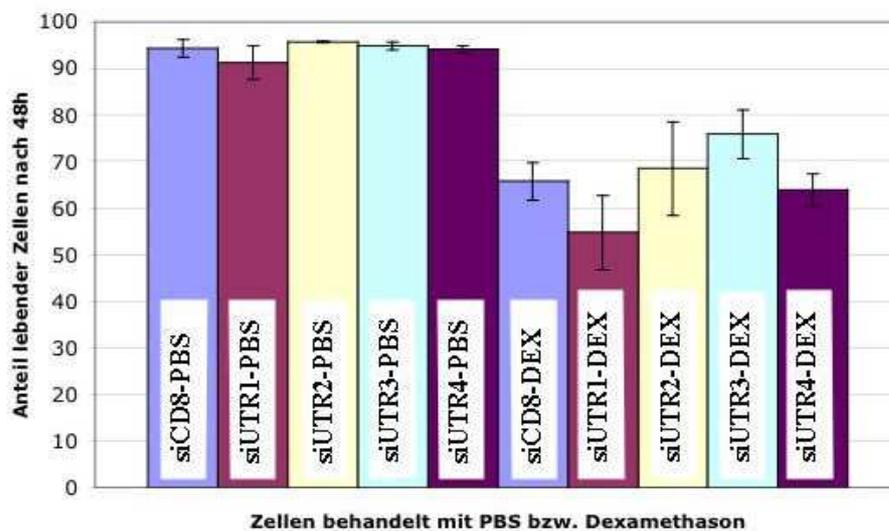


Abbildung 4-13 Statistische Auswertung dreier identischer Dexamethason-Dose-Response-Assays. Die Konzentration PBS/DEX im Medium betrug 10^{-6} M. Die Zellen wurden über 48h inkubiert. Angegeben ist jeweils eine Standardabweichung des Mittelwerts der drei Assays. Die siUTR-transfizierten Zellen zeigen keinen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der Negativkontrolle WEHI 7.1-pllsiCD8rat.

Um die vorausgegangen Ergebnisse zu bestätigen, wurde der DEX-dose-response-Assay mit einer speziellen Zellfärbung durchgeführt. Die WEHI 7.1-Zellen wurden vor ihrer Analyse im FACS Scan mit Propidiumiodid (PI) und AnnexinCy5 (Anx) gefärbt, um apoptotische Zellen direkt zu erfassen. Abbildung 4-14 zeigt, dass der Anteil toter PI- und Anx-positiver Zellen in der Kontrollpopulationen (siCD8) und Population (siUTR-2 und -3) ähnliche Werte um 10-12% annimmt. Eine erhöhte Überlebensrate konnte für die siUTR-transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden.

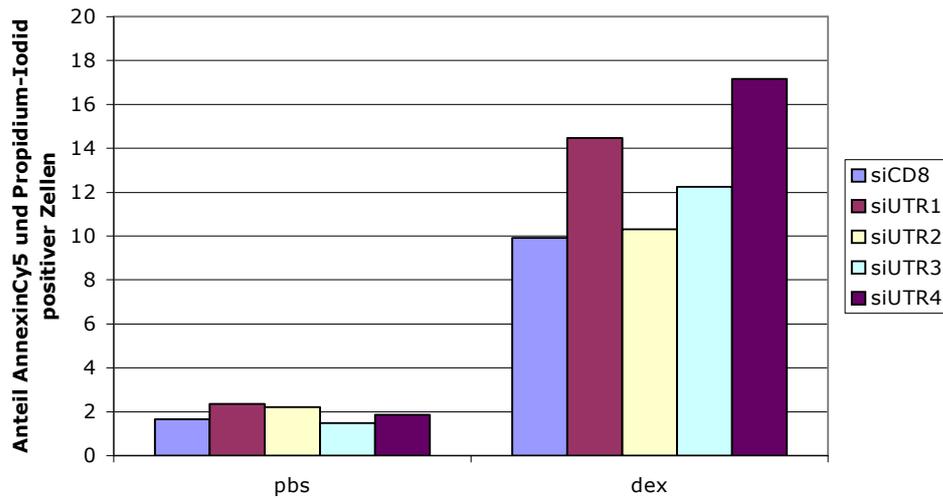


Abbildung 4-14
Auswertung eines Dexamethason-Dose-Response-Assays der transfizierten WEHI 7.1-5A-Zellen. Tote Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinCy5 gefärbt: Die Konzentration PBS/DEX im Medium betrug 10^{-6} M. Inkubationszeit: 48h.

5. Diskussion

5.1 WEHI 7.1–5A-Zellen

Die zellbiologischen und genetischen Experimente dieser Arbeit wurden an WEHI 7.1–5A-Zellen durchgeführt. Diese von einem murinen Thymom stammende immortale Zellreihe kann ohne größeren technischen Aufwand für Zellkulturexperimente verwendet werden [22]. Murine Thymuskulturen wären für die Darstellung von physiologischen Abläufen besser geeignet als murine Lymphomzelllinien, da sie keine Mutation des Erbguts aufweisen [23]. Für die zeitaufwendigen Experimente mit siRNA-tragenden Lentiviren sind Thymuszellkulturen jedoch ungeeignet. Lymphomzellkulturen erlauben hingegen die Planung längerfristiger Zelltodexperimente. Die Isolation glukokortikoidsensitiver Klone durch das Single-Clone-Experiment (siehe 4.2) aus dem WEHI-Zellpool war ein entscheidender Schritt zur Fortführung solcher Apoptosestudien.

Die Dexamethason-Apoptose-Assays (Experimente 4.1 bis 4.3) wiesen gravierende Unterschiede in der Glukokortikoidsensitivität verschiedener WEHI 7.1-Subklone auf. Western Blot Studien, die zusammen mit Miriam Alb durchgeführt wurden (siehe 4.3) zeigten eine erhöhte Expressionsrate des Glukokortikoidrezeptorproteins (GR) in glukokortikoidsensitiven WEHI 7.1-5A [20]. Die Überexpression des GR scheint daher mit einer hohen Apoptoserate positiv zu korrelieren. Außerdem variiert das Ansprechen der verschiedenen WEHI 7.1-Zellklone auf den Topoisomerase 2-Hemmer Etoposid. Dieses Chemotherapeutikum initiiert einen Glukokortikoid-unabhängigen Apoptoseweg, der auf einer Blockade der DNA-Entspiralisierung beruht [24, 25]. Vermutlich sind neben der GR-Überexpression noch weitere Apoptosemechanismen in den WEHI 7.1-5A-Zellen verändert, da auch das Ansprechen der Zellen auf Etoposid unterschiedlich ausfällt. Ursache hierfür sind möglicherweise Störungen oder Mutationen wichtiger Enzyme der Apoptosereaktion, z.B. der Caspasen [26]. Diese Proteinfamilie gehört zur Gruppe der Zysteinproteasen, die sowohl zu Beginn, als auch in der gemeinsamen Endstrecke der Apoptose eine zentrale Rolle spielt.

Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen Apoptoseweges ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von Procaspase 9 zu Caspase 9. Letztere spaltet ein breites Spektrum an intrazellulären Proteinen und zerstört dadurch die zelluläre Integrität. Einer der wichtigsten Auslöser dieser Aktivierung ist Zytochrom C, ein Schlüsselenzym der Atmungskette aus dem intermembranösen Mitochondrialraum. Im Zytosol bildet es das sog. Apoptosom durch

Bindung an Apaf1 (Apoptotic-protease-activating factor 1). Dieser Proteinkomplex wiederum aktiviert die Caspase 9. Die Freisetzung von Zytocrom C ist daher ein wichtiger und entscheidender Apoptosestimulus. Der durch Etoposid ausgelöste Ausstrom von Zytocrom C läuft vermutlich wie folgt ab: Durch die Hemmung der Topoisomerase 2 häufen sich Doppelstrangbrüche in der DNA an, wodurch DNA-abhängige Proteinkinasen aktiviert und das Tumorsuppressorgen p53 phosphoryliert wird. P53 stimuliert die Synthese des proapoptischen BH3-only Protein Bax, das in die Mitochondrien transloziert und dort zu einer Permeabilitätszunahme für Zytocrom C und weitere zytotoxische Proteine (z.B. SMAC, Diabolo) führt [24].

Die glukokortikoidinduzierte Apoptose wird im Gegensatz zur etoposidinduzierten Apoptose über den GR vermittelt und erfordert eine funktionierende Proteinbiosynthese. Im Zytosol liegt der GR im Ruhezustand u.a. an das Hitzeschockprotein HSP-90 gebunden vor, das nach Hormonbindung dissoziiert, worauf der Rezeptor eine DNA-bindende Zinkfingerkonfiguration einnimmt. Im Zellkern werden an den glucocorticoid-responsive elements (GRE) der DNA, oder über zwischengeschaltete Transkriptionfaktoren, wie AP-1 oder NF- κ B, verschiedene Gene reguliert. Diese Genprodukte sind wichtige Faktoren der zytocromvermittelten Apoptose, wie das antiapoptische Proteine Bcl-2 oder auch die proapoptischen Faktoren Bim, Bax und Puma [27, 28].

Das Bcl-2/Bax-Verhältnis einer Zelle entscheidet maßgeblich über deren Eintritt in die Apoptose oder das Fortbestehen der Zelle [29, 30]. Proapoptische BH3-only Proteine wie Bax führen über eine Destabilisierung und Permeabilitätserhöhung der mitochondrialen Membran zu einem Ausstrom von Zytocrom C und damit zur Bildung des Apoptosoms [24]. Bcl-2 hingegen kann die Bax-induzierte Zytocrom C-Freisetzung durch eine Hemmung des Poreneinbaus in die mitochondriale Membran abwenden. Dies wird dadurch erklärt, dass Bcl-2 den glukokortikoidinduzierten Zelltod (GICD) in T-Zellhybridomen verhindern kann, jedoch keinen Einfluss auf den extrinsischen Apoptoseweg hat [31]. Dennoch reicht das Gleichgewicht von Bcl-2 zu Bax nicht als alleinige Erklärung für intrinsische Apoptosemechanismen aus, da diese Proteine auch unabhängig von ihrem Gegenspieler einen Einfluss auf das Überleben von Zellen haben. Es existieren nur wenig gesicherte Daten über Unterschiede im Ablauf der Apoptose in verschiedenen Gewebearten. Die Bedeutung von Bax in der T-Zell-Apoptose wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. Einige Autoren halten die Anwesenheit dieses Proteins für die Fortführung der Apoptose für unbedeutend

[32, 33], während andere Autoren Bax eine zentrale Rolle in der DEX-regulierten Apoptose zuschreiben [34, 35].

Die erhöhte Expression des GR in den WEHI 7.1-Zellen ist eine Erklärung für deren Sensitivität auf glukokortikoidinduzierten Zelltod. Die verschiedenen WEHI 7.1-Zellklone weisen allerdings eine unterschiedliche Etoposidsensitivität auf, welche nicht durch die GR-Ausstattung der Zellen erklärbar ist, sondern auf anderweitige Veränderungen im Apoptoseapparat zurückgeführt werden muss. Die WEHI 7.1-5A-Zellen sterben sowohl bei Glukokortikoid-, als auch bei Etoposidinkubation ab. Daher ist eine Veränderung in den für beide Substanzen wichtigen Apoptoseprozessen wahrscheinlich. Der Permeabilitätsverlust der mitochondrialen Membran ist in diesem Zusammenhang eine mögliche Erklärung. Denkbar wäre auch ein relativer Mangel an apoptosehemmenden Proteinen bzw. ein Überwiegen proapoptotischer Faktoren. Der Etoposid- und der Glukokortikoidweg der Apoptose weisen viele Gemeinsamkeiten auf, wie z.B. die Aktivierung von BH3-only Proteinen, die Blockierung von antiapoptotischer Faktoren, die Freisetzung von Zytochrom C, etc. Die pro- bzw. antiapoptotische Wirksamkeit der einzelnen Mitglieder dieser Proteinfamilien ist höchst unterschiedlich. Es ist belegt, dass sich die Affinität zwischen verschiedenen BH3-only Proteinen (z.B. Bim, Puma, Bad, Bid, Noxa) und dem antiapoptotischen Bcl-2 um den Faktor 10000 unterscheiden kann [36].

Weitere Studien sind notwendig, um die komplexen Apoptosevorgänge in WEHI 7.1-5A-Zellen im Detail zu verstehen und diese mit den Ergebnissen anderer Zell- und Gewebearten zu vergleichen.

5.2 Glukokortikoidrezeptor-Promotor-1A

Der Glukokortikoidrezeptor (GR) wird in murinen Zellen ausgehend von fünf verschiedenen Promotoren transkribiert [19]. Purton et al. bewiesen, dass in Thymozyten vorwiegend der GR ausgehend von dem 1A-Promotor (GR-1A) exprimiert wird. Die mRNA dieses Promotorbereiches unterscheidet sich von anderen GR-Transkripten durch das Vorhandensein einer spezifischen untranslatierten Region im 5'-Bereich (UTR). Ausschließlich die UTR-GR-1A-positiven Lymphozyten waren in Purtons Experimenten GICD-sensitiv. Cole vermutete daher, dass zwischen GICD und GR-1A ein ursächlicher Zusammenhang bestehen müsse. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob GICD tatsächlich an das Vorhandensein von UTR-GR-1A-Expression gekoppelt ist. Hierbei konnte die prinzipielle

Potenz für GICD (Experiment 4.3) und das Vorliegen des GR-1A-Transkripts (Experiment 4.5) in WEHI-7.1-5A Zellen belegt werden. Durch einen gene-knockdown mittels RNA-Interferenz (RNAi) sollte die Apoptose-Signaltransduktion über den GR-1A ausgeschaltet werden, um die Glukokortikoidresistenz der Zellen zu untersuchen. Nach erfolgreicher Klonierung RNAi-tragender Lentiviren wurden diese in die WEHI-7.1-5A Zellen (Experimente 4.6-4.8) transduziert. In Western Blot Studien wurde die Effektivität des GR-1A-gene-silencing anhand von Messungen der GR-Expression bestimmt (Experiment 4.9). Es zeigten sich unterschiedliche GR-Mengen in den verschiedenen siUTR-Klonen. Während die Klone siUTR-2, -3 und -4 eine mäßige Reduktion der GR-Expression aufwiesen, wurde bei siUTR-1-transfizierten Zellen ein deutlicher Zuwachs an GR-Protein verzeichnet. Möglicherweise ist dieser Effekt durch den geringen Reinheitsgrad der WEHI 7.1-5A-siUTR1 Zellen zu erklären. Dieser konnte trotz mehrfacher Sortierung durch das FACS DiVa nicht wesentlich verbessert werden. Weiterhin ist anzumerken, dass der eingesetzte GR-Antikörper nicht in der Lage ist, zwischen den Proteinprodukten der einzelnen GR-Promotoren zu unterscheiden. Theoretisch denkbar erscheint daher eine kompensatorische Erhöhung der GR-Expression durch die nichtsupprimierten GR-Varianten (s.u.) bei einer hohen GR-1A-Suppression.

Die RealTime-PCR-Daten zur Analyse des tatsächlichen Transkriptionslevels des GR-1A-Transkripts waren nicht schlüssig. Die siUTR-transfizierten Zellen zeigten kein signifikant verlängertes Überleben nach Behandlung mit Glukokortikoiden (Experiment 4.10), obwohl zuvor bei einigen Klonen eine mäßige GR-Expression belegt werden konnte (s. o.). GICD ist ein komplex ablaufender Prozess, der durch verschiedene GR-Varianten vermittelt wird. Es wurden bereits fünf verschiedene GR-Splicevarianten beschrieben: GR- α , GR- β , GR- γ , GR-P und GR-A [37-40]. Die GR- α Isoform ist verantwortlich für glukokortikoidvermittelte Transkriptionsaktivität, während die anderen Isoformen strukturelle Unterschiede ihrer Hormonbindungs-Domäne besitzen. Ein Einfluß der verschiedenen GR-Isoformen auf die Aktivität der GR- α Isoform wird diskutiert. Cidlowski et. al. zeigten, dass allein die GR- α Isoform sich in acht weitere Isoformen (A, B, C1-3, D1-3) aufteilen lässt [41]. Dies ist durch eine unterschiedliche Translation bedingt [42]. Interessant ist die variable Regulation der Apoptose durch die GR-Isoformen: Während Zellen mit GR-C-Überexpression frühzeitig nach DEX-Inkubation starben, war dieser Prozess bei den GR-D-Isoformen deutlich verlangsamt. Diese Effekte werden durch die erhöhte Expression proapoptotischer Gene (z.B. GZMA und Caspase 6) in den Zellen mit GR-C-Überexpression begründet. Die Frage, welche

der GR-Isoformen in den von Cole et al. eingesetzten WEHI 7.2-Zellen aktiv sind, und ob diese in ihrer GR-Ausstattung mit den eingesetzten WEHI 7.1-Zellen identisch sind, bleibt offen.

Weiterhin stellt sich die Frage nach der Qualität der ausgewählten siRNA-Sequenzen, und inwiefern diese eine ausreichende Reduktion des GR-1A-Transkripts erreichen konnten. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Sequenzabschnitte innerhalb des untranslatierten Bereichs (UTR) der GR-1A-RNA ausgewählt, da sich der GR-1A nur durch diese UTR von den anderen GR-mRNAs unterscheidet. Hier sei auf die von Elbashir und Tuschl postulierten Probleme der RNAi-Bindung außerhalb des Opening Reading Frame in untranslatierten Bereichen verwiesen [12]. Eine Theorie ist, dass RNA-bindende Proteine (RBP) vorzugsweise in den untranslatierten mRNA-Abschnitten das Andocken von siRNA verhindern können und dadurch das gene-silencing blockieren. Weiterhin ist bekannt, dass RBP im 5'-UTR-Bereich der mRNA sowohl als Bindungsstelle für die 40S-Untereinheit des Ribosoms dienen, als auch eine Bindungsstelle für bestimmte Proteine sind, die das Andocken des Ribosoms verhindern (z.B. iron regulatory proteins) [43]. Der 5'-UTR-Bereich erscheint als ein für weitere Bindungspartner (z.B. siRNA) schwer zugänglicher Bereich. 2007 entdeckten Agami et. al. für den 3'-UTR verschiedener mRNA-Stränge ein RBP (Dnd1), das selektiv das Andocken von microRNA (miRNA) blockiert [44]. miRNA ist, ähnlich wie siRNA, ein Oligonukleotid (ca. 22nt), das die Genexpression reguliert. Es bestehen jedoch Unterschiede zwischen dem siRNA- und dem miRNA-Bindungsverhalten. In den von Agami durchgeführten Experimenten wurde die für den 3'-UTR spezifische siRNA im Gegensatz zur miRNA nicht durch Dnd1 verdrängt und führte zu einer effizienten mRNA-Reduktion.

Weitere Untersuchungen mit neuen experimentellen Ansätzen erscheinen nötig, um den von Cole postulierten Zusammenhang von UTR-GR-1A-Expression und GICD zu klären.

6. Zusammenfassung

Glukokortikoide (GCs) gehören zur Familie der Steroidhormone. Unter physiologischen Bedingungen haben GCs eine bedeutende Funktion als Stresshormone in der Aktivierung kataboler Stoffwechselforgänge. In hohen, therapeutischen Konzentrationen spielen zusätzlich antientzündliche und immunsuppressive Wirkungen eine bedeutende Rolle. Diese Modulation des Immunsystems geschieht unter anderem durch Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) in T-Lymphozyten. Die Erforschung der Mechanismen dieses glukokortikoidinduzierten Zelltodes (GICD) trägt zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise von Glukokortikoiden innerhalb des Immunsystems bei.

Timothy J. Cole et. al. [19] konnten belegen, dass die Aktivität des Glukokortikoidrezeptor-Promotor 1A (GR-1A) mit einem Ansprechen von T-Lymphozyten auf GICD korreliert. Es ist das Ziel dieser Arbeit, den Zusammenhang von GR-1A-Promotor-Expression und GICD im Detail zu untersuchen. Sämtliche Zellexperimente wurden an WEHI 7.1 Zellen durchgeführt, einer murinen, unreifen T-Zell-Lymphomlinie. In ersten Untersuchungen der WEHI 7.1-Zellen zeigte sich, dass nur bestimmte Zellklone nach Glukokortikoidbehandlung in Apoptose gingen, während andere vollständig resistent gegenüber GCs erschienen. In weiterführenden Experimenten wurden ausschließlich die GICD-sensible Zellen eingesetzt. Für diesen Typ der WEHI 7.1 Zellen wurde sowohl das Vorhandensein des GR-1A-Transkripts, als auch ein deutliches Ansprechen auf GICD nachgewiesen. In den folgenden Experimenten WEHI 7.1-5A Zellen mit WEHI 7.1-5A Zellen supprimierter GR-1A-Ausstattung verglichen. Die erwünschte Reduktion des GR-1A-Transkripts wurde über RNA-Interferenz (RNAi) mittels small interfering RNA (siRNA) erzielt. RNAi ist eine Technik, die durch kleine siRNA-Ketten selektiv den Abbau bestimmter mRNA bewirkt und dadurch zu einer Verringerung der Proteinbiosynthese eines bestimmten Gens führt. Der Zusammenhang von GR-1A und glukokortikoidinduzierter Apoptose sollte an WEHI 7.1-Zellen mit einer reduzierten GR-1A-Expression untersucht werden. Durch das Einschleusen siRNA-tragender lentiviraler Vektoren gegen das GR-1A-Transkript sollten Zellen generiert werden, die eine erhöhte Resistenz gegen die glukokortikoidinduzierte Apoptose aufweisen. Diejenigen Zellen, die siRNA-Information in das Genom integriert hatten, konnten durch Detektion eines grün fluoreszierenden Markergens (eGFP) isoliert werden. Anschließend wurden die Zellen auf eine Änderung der GR-Proteinmenge analysiert. Western Blot Analysen zur Quantifizierung des GR ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Expression des GR-Proteins in den erfolgreich GR-1A-defizienten WEHI 7.1-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Es

wurden Dexamethason-Dose-Response-Assays durchgeführt, um den Anteil von GICD an den transfizierten Zellen zu erfassen. Nach Behandlung mit dem hochpotenten Glukokortikoid Dexamethason ergaben sich keine signifikanten Überlebensvorteile für Zellen, die aufgrund von RNAi einen Mangel an GR-1A-Transkript besitzen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnten den von Cole et al. postulierten Zusammenhang zwischen GR-1A-Expression und GICD nicht beweisen. Es bleibt ungeklärt, ob es nach erfolgreicher Transfektion der WEHI 7.1-Zellen tatsächlich zu einer signifikanten Abnahme der GR-1A-Transkription gekommen ist, beziehungsweise ob tatsächlich eine korrekte Synthese von siRNA in den Zellen stattgefunden hat. Weitere Untersuchungen erscheinen daher nötig, um die Rolle des 1A-Promotor besser zu verstehen.

7. Literaturverzeichnis

1. Janeway, C.A., *Immunobiology the immune system in health and disease*. 6th ed. 2005, New York: Garland. 823.
2. Reichardt, H.M., *Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting*. *Curr Pharm Des*, 2004. 10 (23): p. 2797-805.
3. Tuckermann, J.P., et al., *Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2005. 42(1): p. 71-104.
4. Lowenberg, M., et al., *Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression*. *Trends Mol Med*, 2007. 13(4): p. 158-63.
5. Grutter, M.G., *Caspases: key players in programmed cell death*. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. 10(6): p. 649-55.
6. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 770-6.
7. Distelhorst, C.W., *Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2002. 9(1): p. 6-19.
8. Schmidt, S., et al., *Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance*. *Cell Death Differ*, 2004. 11 Suppl 1: p. S45-55.
9. Hannon, G.J. and J.J. Rossi, *Unlocking the potential of the human genome with RNA interference*. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 371-8.
10. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. *Science*, 1999. 286(5441): p. 950-2.
11. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. 391(6669): p. 806-11.
12. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 2001. 411(6836): p. 494-8.
13. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. 409(6818): p. 363-6.
14. Rychahou, P.G., et al., *RNA interference: mechanisms of action and therapeutic consideration*. *Surgery*, 2006. 140(5): p. 719-25.
15. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 343-9.
16. Tuschl, T., *RNA interference and small interfering RNAs*. *Chembiochem*, 2001. 2(4): p. 239-45.
17. Rubinson, D.A., et al., *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference*. *Nat Genet*, 2003. 33(3): p. 401-6.
18. Tuschl, T., *Expanding small RNA interference*. *Nat Biotechnol*, 2002. 20(5): p. 446-8.
19. Purton, J.F., et al., *Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death*. *J Immunol*, 2004. 173(6): p. 3816-24.
20. Alb, M., in *Institut für Virologie und Immunbiologie*. 2006, Würzburg: Würzburg.
21. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell*, 2003. 115(2): p. 199-208.
22. Gruol, D.J., E.S. Kempner, and S. Bourgeois, *Characterization of the glucocorticoid receptor. Comparison of wild type and variant receptors*. *J Biol Chem*, 1984. 259(8): p. 4833-9.
23. Travers, H., et al., *Protocols for high efficiency, stage-specific retroviral transduction of murine fetal thymocytes and thymic epithelial cells*. *J Immunol Methods*, 2001. 253(1-2): p. 209-22.

24. Karpinich, N.O., et al., *The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c*. J Biol Chem, 2002. 277(19): p. 16547-52.
25. Lin, C.F., et al., *Bcl-2 rescues ceramide- and etoposide-induced mitochondrial apoptosis through blockage of caspase-2 activation*. J Biol Chem, 2005. 280(25): p. 23758-65.
26. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(11): p. 897-907.
27. Kofler, R., et al., *Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia*. J Endocrinol, 2003. 178(1): p. 19-27.
28. Almawi, W.Y., O.K. Melemedjian, and M.M. Jaoude, *On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis*. J Leukoc Biol, 2004. 76(1): p. 7-14.
29. Murphy, K.M., et al., *Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells*. Cell Death Differ, 2000. 7(1): p. 102-11.
30. Del Poeta, G., et al., *Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2003. 101(6): p. 2125-31.
31. Memon, S.A., et al., *Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma*. J Immunol, 1995. 155(10): p. 4644-52.
32. Yin, X.M., et al., *Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis*. Nature, 1999. 400(6747): p. 886-91.
33. Knudson, C.M., et al., *Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death*. Science, 1995. 270(5233): p. 96-9.
34. Hoijman, E., et al., *Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin*. Endocrinology, 2004. 145(1): p. 418-25.
35. Tan, Y.J., E. Teng, and A.E. Ting, *A small inhibitor of the interaction between Bax and Bcl-X(L) can synergize with methylprednisolone to induce apoptosis in Bcl-X(L)-overexpressing breast-cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 2003. 129(8): p. 437-48.
36. Chen, L., et al., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. Mol Cell, 2005. 17(3): p. 393-403.
37. Bamberger, C.M., et al., *Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans*. J Clin Invest, 1995. 95(6): p. 2435-41.
38. Rivers, C., et al., *Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(11): p. 4283-6.
39. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. 318(6047): p. 635-41.
40. Moalli, P.A., et al., *Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells*. Cancer Res, 1993. 53(17): p. 3877-9.
41. Lu, N.Z., et al., *Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor*. Mol Cell Biol, 2007. 27(20): p. 7143-60.
42. Lu, N.Z. and J.A. Cidlowski, *Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes*. Mol Cell, 2005. 18(3): p. 331-42.
43. Wilkie, G.S., K.S. Dickson, and N.K. Gray, *Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors*. Trends Biochem Sci, 2003. 28(4): p. 182-8.
44. Kedde, M., et al., *RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA*. Cell, 2007. 131(7): p. 1273-86.

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. rer. nat. Holger Michael Reichardt bedanke ich mich sehr für das Ermöglichen dieser Arbeit. Er begleitete mich stets mit seinen wertvollen Ratschlägen und seiner wissenschaftlichen Erfahrung über die vergangenen vier Jahre.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern Irmgard und Jürgen Heck für Ihre Unterstützung während meines Studiums und die aufbauenden Worte.

Den gesamten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für Ihre Geduld beim Einführen in das wissenschaftliche Arbeiten sowie für Ihre Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Bei Marco Herold und Peer Hendrik Otte möchte ich mich neben der fachspezifischen Hilfe und kritischen Durchsicht der Arbeit vor allem für unsere, diese Arbeit überdauernde, jahrelange Freundschaft bedanken.

Frau Dorothee Kühner danke ich für das genaue Korrekturlesen und Ihre Motivation.

Lebenslauf von Tobias Johannes Heck

Geboren 21. August 1981 in Bad Mergentheim

Schulausbildung

1988 bis 2001
2001 Grundschole und Gymnasium Weikersheim
Abitur

Studium

WS 2001/2002
ab SS 2002
März 2004
November 2008
Chemiestudium an der Fachhochschule Aalen
Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
Ärztliche Vorprüfung
Ärztliche Prüfung und Approbation als Arzt

Famulaturen

September 2004
März 2006
September 2006
März 2007
Anästhesie (Caritas Krankenhaus Bad Mergentheim)
Chirurgie (Teaching Hospital Peradeniya, Sri Lanka)
Urologie (Universitätsklinikum Tübingen)
Neurologie (Jüdisches Krankenhaus Berlin)

Praktisches Jahr 2007/08

1. Tertial
2. Tertial
3. Tertial
Innere Medizin (Universitätsklinik Würzburg)
Neurochirurgie (Universitätsklinik Würzburg)
Chirurgie (Inselspital Bern, Schweiz)

Berufliche Laufbahn

seit Februar 2009
Assistenzarzt (Klinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Tübingen)

- Tübingen im Mai 2009 -