

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Immunologie
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Hünig

Mechanismen der Glukokortikoid-induzierten Apoptose in
T-Zellen

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

vorgelegt von
Marc Blank
aus Würzburg

Würzburg, Juni 2009

Referent: Professor Dr. Holger Reichardt

Korreferent: Professor Dr. Thomas Hünig

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Dezember 2009

Der Promovend ist Arzt.

1.	Einleitung	1
1.1	Die T-Zellentwicklung	1
1.1.1	T-Zell-Reifung	1
1.1.2	Positive und Negative Selektion	3
1.2.	Induktionswege der Apoptose	3
1.3	Die Rolle der Bcl-2 Familie bei der Induktion von Apoptose	4
1.4	Glukokortikoide	5
1.4.1	Allgemein	5
1.4.2	Die Rolle von Ceramid bei der Induktion von Apoptose durch Glukokortikoide	6
1.5	RNA-Interferenz / RNAi	6
1.6	Ziel der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Zelluläre Methoden	8
2.1.1	Zelllinien	8
2.1.2	Ermittlung der Zellzahl	9
2.1.3	Transfektion / Infektion	9
2.1.4	Anreicherung der infizierten Zellen	10
2.1.5	Apoptose-Assays	10
2.1.6	Behandlung mit Inhibitoren	11
2.2	Tierexperimente	12
2.2.1	Mauslinien	12
2.2.2	Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen	13
2.2.3	Zellsortierung durch magnetische Zellsortierung (Auto-MACS®)	13
2.2.4	in vivo Behandlungen	14
2.2.5	Rekonstitution mit transduzierten fötalen Leberzellen	15
2.3	Durchflusszytometrie	16
2.3.1	Allgemein	16
2.3.2	Färbungen zur Analyse an einem Durchflusszytometer	16
2.4	DNA-Techniken	18
2.4.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	18
2.4.2	Klonierungen	19
2.4.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen	22

2.4.4	Großpräparation von Plasmid-DNA	22
2.4.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	22
2.4.6	Sequenzierung mittels Fluorochrom markierter Nukleotide	23
2.5	Proteinbiochemische Methoden	24
2.5.1	Herstellung von Proteinextrakten	24
2.5.2	SDS PAGE	24
2.5.3	Western Blotting	26
3	Ergebnisse	29
3.1	Die Rolle des GR in GC-induzierter Apoptose	29
3.1.1	GR knockdown ist effizienter in WEHI231-Zellen	29
3.1.2	GR knockdown schützt vor GC-induzierter Apoptose in WEHI7.15a	31
3.1.3	GR knockout schützt vor GC-induzierter Apoptose ex vivo	32
3.1.4	GR knockdown im hämatopoetischen System führt zum Überlebensvorteil der DP Thymozyten	34
3.1.5	GR knockdown schützt vor GC-induzierter Apoptose ex vivo	37
3.2	Die Rolle von Bim in GC-induzierter Apoptose	39
3.2.1	Bim knockdown gelingt nicht in WEHI7.15a-Zellen	39
3.2.2	Bim knockdown und GR knockdown schützen WEHI231 in geringem Umfang vor BZR-induziertem Zelltod	41
3.2.3	Bim knockdown beeinflusst die Thymozytenentwicklung in vivo	43
3.2.4	Bim knockdown schützt nicht vor GC-induzierter Apoptose ex vivo	43
3.3	Die Rolle von Ceramid in GC-induzierter Apoptose	44
3.3.1	Einfluss von Inhibitoren der Ceramidsynthese auf GC-induzierte Apoptose	45
3.3.2	aSMase knockout schützt nicht vor GC-induzierter Apoptose	50
3.3.3	aSMase knockdown schützt WEHI7.15a nicht vor GC-induzierter Apoptose	52
4	Diskussion	54
4.1	Die Effizienz von „small interfering RNAs“ differiert je nach Zellklon	54
4.2	GR knockdown führt womöglich zu einer stärkeren Expression von Bim	56

4.3	Der Glukokortikoidrezeptor könnte bei der BZR-induzierten Apoptose eine Rolle spielen	56
4.4	Bim knockdown vs. Bim knockout: Thymozytenentwicklung und GC-induzierte Apoptose	57
4.5	Die Rolle der aSMase bei der GR-induzierten Apoptose	58
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Abkürzungsverzeichnis	69
8	Anhang	

1 Einleitung

Um zu überleben, sind Lebewesen auf einen ständigen Stoffaustausch mit ihrer Umgebung angewiesen, wodurch sich potentielle Eintrittspforten für Bakterien, Viren und Parasiten ergeben. Der durch diese Krankheitserreger entstehenden Gefahr begegnet der Körper mit einem Abwehrsystem, dem sogenannten Immunsystem. Diesem kommt die wichtige Funktion zu, die Integrität des Organismus zu erhalten. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, besitzt dieses System die Fähigkeit, Krankheitserreger auf verschiedene Arten zu bekämpfen. Zum einen gibt es die angeborene Immunität, welche schnell aber wenig spezifisch ist. Zum anderen gibt es die erworbene Immunität, eine verzögerte Immunantwort. Diese ermöglicht es, durch die Ausbildung spezieller Rezeptoren Fremdstoffe mit hoher Spezifität zu erkennen und so gezielt zu eliminieren. Aufgrund eines breiten Spektrums an extra- als auch intrazellulären Krankheitserregern kam es zusätzlich zu einer Spezialisierung der Immunzellen, den Lymphozyten. B-Zellen sind in der Lage mit ihren Rezeptoren (membranständige Immunglobuline) körperfremde Antigene zu erkennen, wodurch es zu deren Aktivierung und schließlich zu einer Immunglobulinsekretion entsprechender Spezifität kommt. Die T-Lymphozyten können mit ihren T-Zellrezeptoren (TZR) Antigene erkennen, welche über MHC-Moleküle auf der Oberfläche anderer Zellen, den sogenannten APZs (Antigen präsentierende Zellen) präsentiert werden (zelluläre Immunität).

1.1 Die T-Zellentwicklung

1.1.1 T-Zell-Reifung

T-Lymphozyten entwickeln sich aus Vorläuferzellen, die in der fetalen Leber und im adulten Knochenmark entstehen und im Thymus heranreifen (3). Die T-Zellen in der Entwicklung werden auch Thymozyten genannt.

Die unreifsten Thymozyten exprimieren weder den TZR noch CD4 oder CD8, sie werden als Doppelnegative (DN) Thymozyten bezeichnet. Dieses Entwicklungsstadium wird auch das pro-T-Zell Stadium genannt. Hier werden zunächst die Gensegmente, die für den variablen Teil der β -Kette kodieren, rearrangiert. Dabei wird ein D (Diversity) -Segment mit einem J (Joining) -Segment verknüpft, wofür die Proteine RAG-1 und RAG-2 erforderlich sind. Ein geringer Teil der Doppelnegativen Thymozyten entwickelt sich zu $\gamma\delta$ TZR exprimierenden Zellen, der Hauptteil jedoch entwickelt sich schließlich zu $\alpha\beta$ TZR exprimierenden, MHC-restringierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Im nächsten Stadium, dem sogenannten prä-T-Zell Stadium wird dem DJ-Segment ein V-Segment vorgelagert. Nachdem diese Umlagerung stattgefunden hat, wird die β -Kette mit einer Ersatz- α -Kette namens präT α zusammengelagert. Dieser prä-T-Zellrezeptor wird zusammen mit den CD3 Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert. Das führt dazu, dass die Genumlagerung für die β -Kette unterbunden wird. Es setzt eine rasche Zellproliferation in Gang und induziert schließlich die Expression der Corezeptorproteine CD4 und CD8, dem nächsten Stadium in der Entwicklung. Diese werden nun als Doppelpositive Thymozyten bezeichnet. In dieser Phase kommt es zum Rearrangement der α -Kette und zur Expression des TZR $\alpha\beta$ Heterodimers zusammen mit CD3 und ζ -Proteinen. Das Rearrangieren der α -Kette entspricht dem der β -Kette, nur dass das D-Segment in der α -Kette nicht existiert. Mit der Expression des kompletten TZR Komplexes werden die Doppelpositiven Thymozyten empfänglich für Antigene und unterliegen der Positiven und Negativen Selektion (siehe 1.1.2). Die Zellen, die diesen Selektionsprozess überleben, reifen weiter zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, den sogenannten Einzelpositiven (CD4-SP, CD8-SP) Thymozyten. $CD4^+$ T-Zellen erwerben die Fähigkeit Cytokine als Reaktion auf Antigenstimulation zu produzieren und exprimieren Effektormoleküle, welche B-Lymphozyten und Makrophagen „helfen“, während $CD8^+$ T-Zellen über direkten Zellkontakt andere Zellen töten können.

1.1.2 Positive und Negative Selektion

Da die Genumlagerung für den variablen Teil der TZRen durch Zufall entsteht, setzt sich der unselektierte Pool an unreifen Thymozyten auch aus Zellen zusammen, deren Rezeptoren keinen Peptid-MHC-Komplex erkennen, oder aber körpereigene Antigen-MHC-Komplexe erkennen können. Diese Thymozyten unterliegen nun der Positiven bzw. Negativen Selektion, wodurch sichergestellt wird, dass nur die nützlichen Thymozyten überleben, die spezifisch auf körperfremde Antigene reagieren.

Positive Selektion bedeutet, dass diejenigen Thymozyten, welche körpereigene Peptid-MHC-Komplexe mit niedriger Affinität binden, Überlebenssignale bekommen, während solche, die keine MHC-Komplexe erkennen, der Apoptose (siehe 1.2) unterliegen. Unter der Negativen Selektion versteht man, dass diejenigen Thymozyten in Apoptose gehen, deren TZRen zu stark an körpereigene Protein-MHC-Komplexe binden. Dies verhindert die Bildung von autoreaktiven Thymozyten.

1.2 Induktionswege der Apoptose

Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Wie dieser Name vermuten lässt, unterliegt sie einem genau geregelten Prozess, der zu spezifischen Veränderungen der Zelle führt. Dies wären beispielsweise Zellschrumpfung, Protein-Fragmentierung, DNA-Degradation und schließlich die Bildung von apoptotischen Vesikeln. Um eine Entzündungsreaktion zu verhindern, werden diese Vesikel von Makrophagen aufgenommen und verdaut (4).

Im Zentrum der Apoptose steht die Aktivierung einer Gruppe von Enzymen, den Caspasen. Es gibt zwei Arten von Caspasen, die Effektorcaspasen, welche für die eigentlichen morphologischen Veränderungen der Zelle verantwortlich sind, und die Initiatorcaspasen, welche die Apoptose auslösenden Signale auf die Effektorcaspasen übertragen (5), (6), (7).

Die Apoptose kann von einer Zelle in der Umgebung induziert (extrinsischer Weg) oder von der Zelle selbst eingeleitet werden (intrinsischer

Weg) (8). Beim extrinsischen Weg werden die Initiatorcaspasen direkt durch sogenannte Todesrezeptoren aktiviert, beim intrinsischen Weg führt eine Schädigung der Mitochondrien durch pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder zur Cytochrom c - Freisetzung, wodurch es zur Aktivierung einer Initiatorcaspase kommt (9).

1.3 Die Rolle der Bcl-2 Familie bei der Induktion von Apoptose

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind die entscheidenden Regulatoren der Apoptose. Sie bestehen aus einer bis vier homologen Regionen, welche auch als BH-(Bcl-2 Homology) Domänen bezeichnet werden (10). Die Bcl-2 Familie enthält sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Mitglieder. Die anti-apoptotischen Mitglieder, wie z.B. Bcl-2 oder Bcl-X_L bestehen meist aus vier BH-Domänen. Im Gegensatz hierzu kann man die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie aufgrund ihrer Struktur und Funktion weiter in drei Gruppen untergliedern, welche entweder die BH1-, BH2-, und BH3- (Multidomain, Bax und Bak) oder nur die BH3-Domäne (BH3-only) besitzen. Zu den „BH3-only“ Proteinen gehören unter anderem Bid, Bad, Puma, Noxa und Bim (11).

Eine zentrale Rolle beim intrinsischen Weg der Apoptose kommt den beiden „Multidomain“ Mitgliedern Bax und Bak zu. Die Aktivierung dieser Proteine führt zur Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch es zum Ausstrom von Cytochrom c und somit zur Aktivierung von Caspasen kommt (12), (13). Das Signal erhalten sie durch die „BH3-only“ Proteine, wie z.B. Bim (BCL-2-interacting mediator of cell death), welche durch unterschiedliche apoptotische Signale aktiviert werden können. So ist z.B. bekannt, dass Glukokortikoide (siehe 1.4) Apoptose durch einen Mechanismus zu induzieren vermögen, der Bim und Puma erfordert. Wie Puma und Bim genau aktiviert werden, ist noch nicht klar, aber es liegt nahe, dass der Glukokortikoidrezeptor daran beteiligt ist (10). Gleichzeitig lässt sich sagen, dass der Einfluss von Bim bzw. Puma auf die Glukokortikoid-

induzierte Apoptose vom Zelltyp abhängig ist. Während ihre Rolle in Thymozyten nahezu gleich ist, scheint Bim eine untergeordnetere Rolle in reifen T-Zellen zu spielen (14). Weiterhin ist bekannt, dass Glukokortikoide die Transkription von BH3-only Genen wie Bim induzieren können (15), (16), (17), (18), (19). Diese Induktion von Bim erfordert sowohl die de novo Transkription, als auch Translation (17).

1.4 Glukokortikoide

1.4.1 Allgemein

Glukokortikoide (GC) sind Steroidhormone, die in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet werden. Sie entfalten ihre Wirkung durch Bindung an den Glukokortikoid-Rezeptor (GR), der sich im Zytosol der Zellen befindet. Die Wirkungen der Glukokortikoide im Organismus sind vielfältig. Sie nehmen Einfluss auf den Stoffwechsel, den Kreislauf, die Elektrolytzusammensetzung und auf das Immunsystem. Gerade aufgrund ihrer Wirkung auf das Immunsystem werden sie gerne als Medikamente eingesetzt. Zum einen wirken sie immunsuppressiv, indem sie über die Interaktion des GR mit NF- κ B die Transkription proinflammatorischer Proteine reprimieren, zum anderen auch antiphlogistisch durch Induktion von Lipokortin (20). Glukokortikoide entfalten weiterhin potente immunmodulatorische Fähigkeiten, einschließlich der Möglichkeit in T-Lymphozyten Apoptose zu induzieren (21). Das gängige Modell diesbezüglich deutet darauf hin, dass hierfür ein funktionierender Glukokortikoid-Rezeptor oder genauer, dessen transaktivierende Fähigkeit vorhanden sein muss (22), (23), (24), (25). Zu den Genen, die hoch- bzw. runterreguliert werden, zählen c-myc, ttag, dig2, Puma und Bim. Untersuchungen bei knockout Mäusen haben gezeigt, dass insbesondere der Verlust von Bim die GC-induzierte Apoptose in Thymozyten stark beeinträchtigt (26).

Thymozyten sind in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstadium unterschiedlich sensitiv in Bezug auf Glukokortikoide. Eine Applikation von Glu-

Glukokortikoiden führt in vivo vermehrt zur Apoptose der CD4⁺CD8⁺ Lymphozyten (=doppelpositive Thymozyten; DP), während die CD4⁺ oder CD8⁺ einzelpositiven Thymozyten diesbezüglich nicht sehr sensibel sind. Dies ist laut Screpanti et al. darauf zurückzuführen, dass Glukokortikoide den physiologischen Prozess der Selektion im Thymus beschleunigen - von einem Zwischenstadium, den doppelpositiven Thymozyten, zu den reifen CD4⁺ oder CD8⁺ einzelpositiven Thymozyten (27).

1.4.2 Die Rolle von Ceramid bei der Induktion von Apoptose durch Glukokortikoide

Das Sphingosinderivat Ceramid ist Bestandteil unserer Zellmembranen. Es kann auf zwei verschiedene Wege gebildet werden: zum einen durch Hydrolyse von Sphingomyelin (katalysiert durch saure (a), oder neutrale (n) Sphingomyelinase (SMase)), zum anderen durch de novo Biosynthese (28). Ceramid spielt eine wesentliche Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und Inflammation (29). Es ist in der Lage eine Reihe von Enzymen zu aktivieren, die in der „Stress Signal Kaskade“ beteiligt sind, wie z.B. Kinasen und Phosphatasen (30). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Ceramid eine wichtige Rolle hinsichtlich der Auslösung von Apoptose spielt. Es wird angenommen, dass Ceramid unter anderem über Bax und Bak die äußere Mitochondrienmembran schädigt und damit zur Aktivierung von Caspasen führt (31). Verschiedene apoptotische Stimuli, wie z.B. Glukokortikoide, führen so über eine Erhöhung des endogenen Ceramid Levels zur Apoptose. Die Zunahme an Ceramid lässt sich unter anderem durch eine erhöhte Aktivität der Sphingomyelinase erklären, welche durch Glukokortikoide induziert wird (32).

1.5 RNA-Interferenz / RNAi

Ein wichtiger Bestandteil der Genexpression stellt die Kontrolle über Translation und mRNA-Degradation dar. Dieses posttranskriptionelle „Gene silencing“, wird auch als sogenannte RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Es wird durch kleine doppelsträngige RNA-Moleküle vermittelt, welche

endogen vorkommen, aber auch exogen eingebracht werden können (33), (34). So kann ein stabiler Gen knockdown durch die kontinuierliche Expression einer synthetischen „short hairpin“ RNA erreicht werden. Die Ribonuklease DICER prozessiert diese „Vorstufen“ zu den eigentlichen Effektoren der RNAi, den siRNAs (short interfering RNA). Ein Strang dieser doppelsträngigen siRNAs dient im sogenannten RISC (RNA induced silencing complex) als Template, um eine komplementäre mRNA zu binden, welche dadurch abgebaut wird. Hierdurch bietet RNAi eine hervorragende Möglichkeit, die Genexpression in Zellen zu beeinflussen.

1.6 Ziel der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand nun die Erforschung der Mechanismen der Glukokortikoid-induzierten Apoptose in T-Zellen, basierend auf „gene silencing“ durch RNAi. Die folgende Abbildung beinhaltet eine schematische Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit erforschten Aspekte dieser Form von Apoptose.

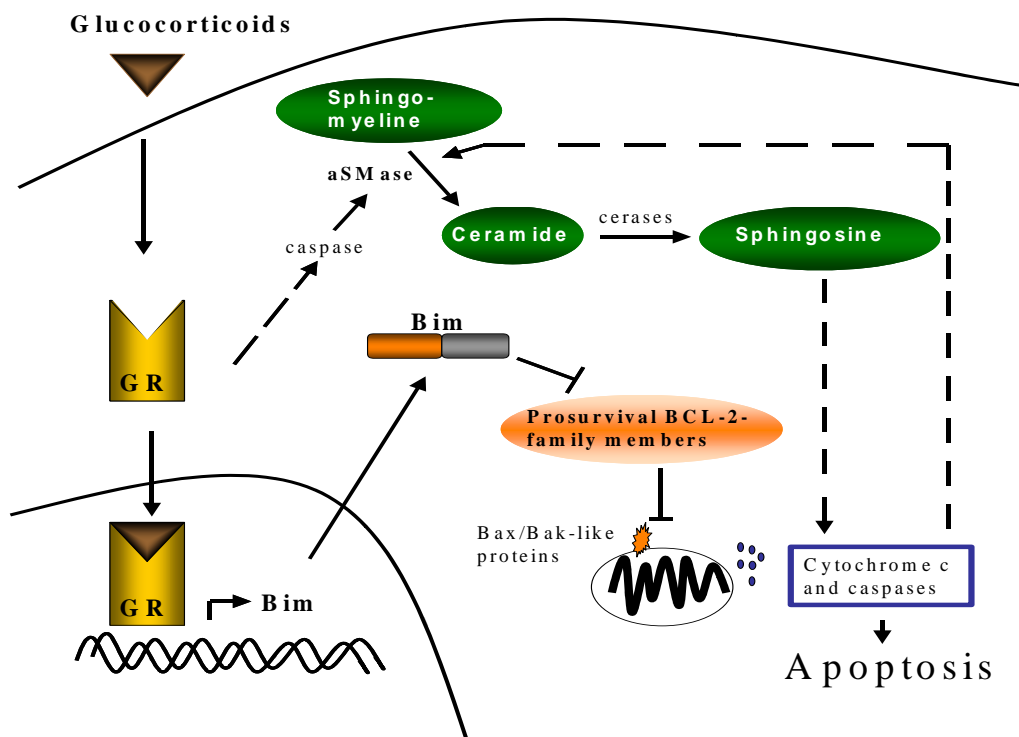


Abbildung 1: Hypothetische Wege der GC-induzierten Apoptose

2 Material und Methoden

2.1 Zelluläre Methoden

Die Arbeit mit Zellkulturen wurde in einer Sterilbank durchgeführt.

2.1.1 Zelllinien

Sämtliche Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ im angegebenen Medium (siehe Tabelle) kultiviert und alle zwei bis drei Tage 1:10 verdünnt.

Zelllinie	Anmerkung	Medium	Kultivierung
WEHI7.15a	murines T-Zelllymphom	DMEM-Medium (Fa. GibcoBRL Gaithersburg, supplementiert mit 10% FCS, Penicillin 0,025%, Streptomycin 0,025%)	Suspensionskulturzellen
WEHI231	murines B-Zelllymphom	RPMI 1640 (Haus, supplementiert mit 5% FCS, Glutamin 0,7%, NEAA (1:100), β -Mercaptoethanol (0,05 mM), Natriumpyruvat (1:100), Penicillin 0,025%, Streptomycin 0,025%)	Suspensionskulturzellen
293T-Zellen	humane embryonale Nieren Zelllinie	MEM (Haus, supplementiert mit 10% FCS, Penicillin 0,025%, Streptomycin 0,025%)	adhärente Zelllinie

Phoenix-Eco (35)	293T-Zellen, transduziert mit Adenovirus E1a	MEM (Haus, supplementiert mit 10% FCS, Penicillin 0,025%, Streptomycin 0,025%)	adhärente Zelllinie
------------------	--	--	---------------------

Suspensionskulturzellen wurden in 50ml Kulturflaschen (Fa. Greiner Bio-One, Solingen) in jeweils 5ml entsprechendem Medium kultiviert. Die adhärenen Zelllinien 293T und Phoenix-Eco wurden in einer 25ml Petrischale (Fa. Greiner Bio-One) in 10-15ml Medium (293T Zellen) bzw. 250ml Kulturflaschen in 25ml Medium (Phoenix-Eco) kultiviert und zum Verdünnen mit ATV (NaCl 80g, KCl 4g, Glucose 10g, NaHCO₃ 5,8g, Trypsin (1:250) 5g Versene 2g H₂O ad 1l) abgelöst.

2.1.2 Ermittlung der Zellzahl

Ein Aliquot der zu ermittelnden Zellen wurde mit einer Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Trypanblau dient dazu, tote Zellen von den Lebenden zu unterscheiden, da es nur von den toten Zellen aufgenommen wird. Anschließend wurden 20µl dieser Verdünnung unter das Deckglaschen einer Neubauer-Kammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2 Quadranten gezählt. Die zu ermittelnde Zellzahl ergab sich gemäß der Formel: (Mittelwert der gezählten Zellen pro Quadranten) x Verdünnungsfaktor x 10⁴ x ml⁻¹ = Zellzahl/ml.

2.1.3 Transfektion / Infektion

Rekombinante, replikationsdefekte retrovirale Partikel wurden unter Benutzung des pHIT Verpackungssystems wie von Soneoka et al. hergestellt (36). 293T-Zellen bzw. Phoenix-Eco-Zellen wurden transient mit dem Expressionskonstrukt für Gag/Pol (pHIT60) und Env (pHIT123 ekotropisch / VSV-G amphotropisch) des Murinen Leukämie Virus (MuLV) kotransfiziert. Die Kotransfektion wurde zusammen entweder mit dem leeren Vektorplasmid (LMP, siehe Abb. 2) oder mit dem Vektor der jeweiligen für das

angegebene Protein kodierenden cDNA durchgeführt.

Es wurde die Standard Calciumphosphat Methode verwendet. Nach 16h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Die viralen Überstände wurden 24 und 48 Stunden später abgenommen und filtriert (Porengröße 0,45µm, Fa. Schleicher&Schuell, Dassel). Zum Filtrat wurde Polybren (Fa. Sigma-Aldrich, Inc) zugegeben (Endkonzentration: 10µl/ml). 1×10^5 bis 2×10^5 WEHI-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 3-4 Stunden mit 5ml des ekotropen (WEHI231) bzw. amphotropen (WEHI7.15a), infektiösen Überstandes inkubiert, mit WEHI-Medium gewaschen und wieder in Kultur genommen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand zentrifugiert (3-4h bei 32°C mit 2200rpm).

Die Identifizierung EGFP exprimierender, d.h. erfolgreich infizierter Zellen, erfolgte mittels Durchflußzytometrie (siehe 2.3).

2.1.4 Anreicherung der infizierten Zellen

Eine Anreicherung transduzierter Zellen wurde durch Antibiotika-Selektion erreicht. Hierzu wurde dem Medium das Antibiotikum Puromycin (Endkonzentration 2,5 µg/ml) zugegeben, was der jeweils transduzierten Resistenz entspricht. Die Zellen wurden in Anwesenheit des Antibiotikums für 2-7 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Zellkultur normal fortgesetzt, wodurch es zur Ausdünnung des Antibiotikums kam.

2.1.5 Apoptose-Assays

Bei der Durchführung sämtlicher Apoptose-Assays befanden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase.

2.1.5.1 Dexamethason-induzierte Apoptose

2×10^5 (WEHI7.15a, transduziert siehe 2.1.3) bzw. 5×10^5 (Thymozyten; Milz-T-Zellen)/ml wurden in einer 48-Napf-Platte (Fa. Greiner Bio-One) für drei Tage (WEHI7.15a) bzw. 20 Stunden (Thymozyten; Milz-T-Zellen) mit

Dexamethason (Fa. Sigma-Aldrich, Inc), einem synthetischen Glukokortikoid mit hoher Glukokortikoidrezeptoraffinität, im Brutschrank (siehe 2.1) inkubiert (Konzentrationen zwischen 1×10^{-5} M und 1×10^{-10} M).

Nach dem Ernten der Zellen wurden diese zunächst gewaschen (siehe 2.2.2) und anschließend mittels Annexin und PI gefärbt (siehe 2.3.2). Die Oberflächenfärbung (siehe 2.3.2) von Lymphozyten erfolgte vor der Färbung mit Annexin/PI in einem separaten Färbeschritt.

Die Analyse erfolgte am FACSCalibur®.

2.1.5.2 Etoposid-Assay

2×10^5 (transduzierte (siehe 2.1.3) WEHI7.15a-Zellen)/ml wurden in einer 48-Napf-Platte (Fa. Greiner Bio-One) für zwei Tage mit Etoposidkonzentrationen zwischen $0,1 \mu\text{g/ml}$ und $3,0 \mu\text{g/ml}$ im Brutschrank (siehe 2.1) inkubiert.

Nach dem Ernten der Zellen wurden diese zunächst gewaschen (siehe 2.2.2) und anschließend mittels Annexin und PI gefärbt (siehe 2.3.2).

Die Analyse erfolgte am FACSCalibur®.

2.1.5.3 BZR-Assay

1×10^5 (transduzierte (siehe 2.1.3) WEHI231-Zellen)/ml wurden in einer 48-Napf-Platte (Fa. Greiner Bio-One) mit einem monoklonalen Anti-IgM Antikörper (Fab-Fragment, spezifisch für die schwere Kette von Maus IgM (37) in einer Konzentration von $7,5 \mu\text{g/ml}$ für null, drei bzw. vier Tage im Brutschrank (s.o.) inkubiert.

Die geernteten Zellen wurden zunächst gewaschen (siehe 2.2.2) und anschließend mittels Annexin und PI gefärbt (siehe 2.3.2).

Die Analyse erfolgte am FACSCalibur®.

2.1.6 Behandlung mit Inhibitoren

1×10^5 (WEHI7.15a-Zellen bzw. Lymphozyten)/ml wurden in einer 48-Napf-Platte (Fa. Greiner Bio-One) mit den verschiedenen Inhibitoren des

Sphingolipidstoffwechsels (siehe Tabelle) im Brutschrank (siehe 2.1) vorinkubiert.

Bezeichnung	Inhibition	Herkunft
Imipramin	Saure Sphingomyelinase (38)	Sigma-Aldrich, Inc
Myriocin	Serin Palmitoyl Transferase (2)	BIOMOL Research Laboratories, Inc, Plymouth
Fumonisin B1	Ceramid Synthase (39), (40)	Sigma-Aldrich, Inc
RU486	GR-Antagonist (41) (42)	Sigma-Aldrich, Inc

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde (Imipramin, Myriocin, RU486) bzw. drei Tagen (Fumonisin B1) wurde ein Dexamethason-Apoptose-Assay (siehe 2.1.5.1) durchgeführt.

2.2 Tierexperimente

2.2.1 Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien entstammen entweder aus der hausinternen Tierzucht des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg oder wurden freundlicherweise von Olaf Utermöhlen (Universität Köln) zur Verfügung gestellt.

Tierstamm	Herkunft
C57Bl/6 CD45.1	Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
C57Bl/6 CD45.2 (kongen)	
C57Bl/6 GR ^{-/-} (43), (44)	
C57Bl/6 aSMase ^{-/-}	Olaf Utermöhlen, Universität Köln, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

2.2.2 Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Die Präparation der einzelnen Organe erfolgte unmittelbar nachdem die zu analysierenden Mäuse mittels einer gesättigten CO₂-Atmosphäre getötet wurden. Es wurden Thymus und Milz entnommen und anschließend in 2-3ml balancierte Salzlösung (BSS/BSA) gegeben und auf Eis gekühlt.

Zur Herstellung der Einzelzellsuspensionen wurden die einzelnen Organe jeweils durch Nylon-Siebe (Maschengröße: 70µm; Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) gerieben und anschließend in BSS/BSA-Medium aufgenommen.

Um die in der Milz befindlichen Erythrozyten zu lysieren, wurden je 20ml TAC (Tris 20mM (pH7,5), NH₄Cl 0,83% ad H₂O 1l (pH7,2)) verwendet. Nach 15min wurde die Lyse durch Waschen (5min; 1550rpm) mit 30ml BSS/BSA gestoppt.

Nach Absaugen der Überstände wurden die Zell-Sedimente nochmals mit 20ml BSS/BSA gewaschen und anschließend gezählt (siehe 2.1.2).

2.2.3 Zelldepletion durch magnetische Zellsortierung (Auto-MACS®)

2.2.3.1 Prinzip der magnetischen Zellseparation

Mit dieser Methode können spezifisch bestimmte Lymphozytensubpopulationen aufgereinigt werden. Dabei wird eine Zellsuspension mit z.B. PE-konjugierten Antikörpern gegen einen Marker, z.B. B220 zur Sortierung von B-Zellen, inkubiert. Gibt man nun PE-gekoppelte magnetische Kügelchen (=beads) hinzu, so führt dies zur magnetischen Markierung der gewünschten Zellpopulation. Mittels einer magnetischen Säule, kann diese Subpopulation nun aus der Zellsuspension isoliert werden.

Die Isolation der peripheren T-Zellen aus der Milz, bzw. DN-Thymozyten aus dem Thymus erfolgte vollautomatisch mittels des Auto-MACS®-Gerätes (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach).

2.2.3.2 Isolation DN-Thymozyten aus dem Thymus

Hierzu wurden 3×10^8 Thymozyten in 500 μ l BSS/BSA aufgenommen und 10 μ l eines PE-konjugierten α -CD4-Ak (Fa. BD, Pharmingen™) sowie 20 μ l eines PE-konjugierten α -CD8-Ak (Fa. BD, Pharmingen™) hinzugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 20min bei 4°C erfolgten zwei Waschschrte mit 10ml BSS/BSA. Die Zellen wurden nun in 500 μ l BSS/BSA aufgenommen und es wurden 150 μ l Anti-PE-MicroBeads® (Fa. Miltenyi Biotec) beigemischt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubationsphase bei 4°C. Nach zwei weiteren Waschschrten mit jeweils 10ml BSS/BSA wurden die Zellen letztlich durch ein Zellsieb (Maschengröße: 70 μ m; Fa. BD Pharmingen™) gespült, um entstandene Zelltrümmer zu entfernen. Die Zelldepletion wurde nun vollautomatisch nach entsprechender Programmierung (DepleteS) des Auto-MACS®-Gerätes durchgeführt.

Die Überprüfung der Reinheit der isolierten DN-Zellen erfolgte mittels FACS-Färbung (siehe 2.3.2).

2.2.3.3 Isolation von peripheren T-Zellen aus der Milz

Hierzu wurden die Zellen einer Milz-Einzelzellsuspension mit 10 μ l eines PE-konjugierten α -B220 Ak (Fa. BD, Pharmingen™) inkubiert. Die anschließenden Schritte entsprechen denen der Isolierung DN-Thymozyten.

2.2.4 In vivo Behandlungen

2.2.4.1 In vivo Inhibition der sauren Sphingomyelinase

4-8 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse wurden zunächst mit Imipramin, 24 Stunden später mit Dexamethason behandelt. Die Injektion von Dexamethason (200 μ g) bzw. Imipramin (20mg) erfolgte intraperitoneal (i.p.) in den linken unteren Quadranten des Abdomens. Die Zeitdauer zwischen Injektion und Analyse der Organe betrug ebenfalls 24 Stunden. Den Kontrolltieren wurde jeweils steriles PBS injiziert.

2.2.4.2 In vivo Effekt von Dexamethason bei aSMase knockout Mäusen

4-8 Wochen alte aSMase knockout C57Bl/6 Mäuse wurden mit Dexamethason behandelt. Die Injektion von Dexamethason (200µg) erfolgte i.p. in den linken unteren Quadranten des Abdomens. Die Zeitdauer zwischen Injektion und Analyse der Organe betrug 24 Stunden. Den Kontrolltieren wurde steriles PBS injiziert.

2.2.5 Rekonstitution mit transduzierten fötalen Leberzellen

2.2.5.1 Isolation fötaler Lebern und Depletion der Proerythrozyten

Die Präparation der Föten am Tag 14 post conceptionem erfolgte unmittelbar nachdem die schwangeren Mäuse (C57Bl/6 CD45.1) mittels einer gesättigten CO₂-Atmosphäre getötet wurden. Die fötalen Lebern wurden entnommen, anschließend in 2-3ml balancierte Salzlösung (BSS/BSA) gegeben und auf Eis gekühlt.

Zur Herstellung der Einzelzellsuspensionen wurden die fötalen Lebern durch Nylon-Siebe (Maschengröße: 70µm; Fa. BD Pharmingen™) gerieben und anschließend in BSS/BSA-Medium aufgenommen. Nach Absaugen der Überstände wurden die Zell-Sedimente nochmals mit 20ml BSS/BSA gewaschen und anschließend gezählt (siehe 2.1.2).

Es folgte eine Inkubation mit 20µl eines PE-konjugierten Ter119-Ak (Fa. BD, Pharmingen™). Alle weiteren Schritte entsprechen denen der Isolierung DN-Thymozyten (siehe 2.2.3).

Die Überprüfung der Reinheit der Ter119 depletierten fötalen Leberzellen erfolgte mittels FACS-Färbung (siehe 2.3.2).

2.2.5.2 Infektion und Rekonstitution

Fötale Leberzellen mit einem Anteil von $>1 \times 10^5$ hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) (Anzahl nach FACS-Analyse berechnet) wurden mit einem ekotropen infektiösen Überstand (siehe 2.1.3) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand

zentrifugiert (1 Stunde bei 32°C mit 2200rpm).

Die infizierten Zellen wurden nun in 200µl PBS resuspendiert, in eine Spritze überführt und intravenös in die Schwanzvene kongener C57Bl/6 CD45.2 Mäuse injiziert.

Der Erfolg der Rekonstitution, d.h. Vorkommen EGFP-exprimierender Lymphozyten, wurde 4-6 Wochen später mittels Durchflußzytometrie festgestellt. Hierzu wurden Thymus und Milz entnommen (s.o.) und Einzelzellsuspensionen hergestellt (siehe 2.2.2).

2.2.5.3 Ex vivo Behandlung mit Dexamethason

Nach erfolgter Analyse der Einzelzellsuspensionen wurde ein Dexamethason-Apoptose-Assay (siehe 2.1.5.1) durchgeführt.

2.3 Durchflußzytometrie

2.3.1 Allgemein

Die Durchflußzytometrie ermöglicht es Zellen, die eine Farbfluoreszenz aufweisen, zu untersuchen. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung herrühren oder durch die Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Transfektion/Infektion in die Zelle eingeführt wurde, verursacht sein.

Zusätzlich liefert sie den Aufschluss über Größe („forward scatter“) und Granularität („side scatter“) der Zellen. Über diese Parameter können Anhaltspunkte des Überlebenszustandes der Zellen gewonnen werden.

Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest[®]-Software für Apple-Macintosh.

2.3.2 Färbungen zur Analyse an einem Durchflußzytometer

Es ist möglich, sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Strukturen, z.B. die Expression von Zelloberflächen-Molekülen, durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind,

auf Einzelzellniveau zu untersuchen.

2.3.2.1 Antikörper

Sämtliche Antikörper wurden in sättigender Konzentration verwendet, titriert auf 1×10^5 - 1×10^6 Zellen.

Zielantigen/Klon	Konjugation	Hersteller
CD4 (L3T4) (RM4-5)	PerCP	BD Pharmingen™
CD8 α (Ly-2) (53-6.7)	PE, APC	BD Pharmingen™
β TCR (H57-597)	FITC, PE	BD Pharmingen™
B220/CD45R (RA3-6B2)	PE	BD Pharmingen™
Ter119 (Ly-76)	PE	BD Pharmingen™
c-Kit/CD111 (2B8)	APC	BD Pharmingen™
Streptavidin (SA)	CY	BD Pharmingen™
Sca1 Ly6A/E (D7)	Bio	BD Pharmingen™
GR1 Ly6G and Ly6C (RB6-8C5)	APC	BD Pharmingen™
Annexin V	CY 5	BD Pharmingen™

2.3.2.2 Oberflächenfärbungen

1×10^5 - 1×10^6 der zu analysierenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) samt 3ml FACS-Puffer (PBS/ 0,1%BSA/ 0,01%NaN₃) überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1550rpm wurden die Überstände abgeschüttet (= Waschen) und je 20 μ l eines vorverdünnten Antikörpers hinzupipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C schloss sich ein Waschschriff an. Bei Verwendung biotinylierter Antikörper erfolgte ein weiterer Färbeprozess mit 20 μ l eines vorverdünnten CY-konjugierten Streptavidin-Antikörpers.

Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellsedimente in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und anschließend am FACSCalibur[®] analysiert.

2.3.2.3 Annexin/PI-Färbung

Apoptotische Zellen können mit Hilfe dieser Färbung in der Durchflußzytometrie sichtbar gemacht werden. Die entsprechenden Zellen wurden nach Induktion der Apoptose (siehe 1.2) in FACS-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt und einmal im FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 110 μ l eines Gemisches aus PI (10 μ l) und AnnexinV im 1x-Bindungspuffer (1 μ l:100 μ l) für 15min bei Raumtemperatur gefärbt.

Anschliessend wurden die gefärbten Zellen augenblicklich am FACSCalibur[®] analysiert.

2.4 DNA-Techniken

2.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

2.4.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Aufgrund ihrer negativen Ladung können DNA-Fragmente in einer als Molekularsieb wirkenden Gelmatrix entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, da sie sich in einem elektrischen Feld in Richtung Anode bewegen. Die Trennschärfe ist hierbei von der Porosität des Gels und damit von der Agarosekonzentration abhängig.

Durch Verwendung von Ethidiumbromid, eines zwischen die Basen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, können die Nukleinsäuren nach erfolgter Auftrennung unter UV-Licht visualisiert werden. Die Größe der Fragmente lässt sich durch Vergleich mit Nukleinsäure-Standards bekannter Größe bestimmen. Hierbei gilt, dass die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenpaare ist.

2.4.1.2 Durchführung

Unter Berücksichtigung der Länge der zu untersuchenden Fragmente variierte der Agarosegehalt der verwendeten Gele zwischen 1% und 3%. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Agarosemenge eingewogen, in 1x TAE (40mM Tris-Acetat, 10mM EDTA) 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 1x TAE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben, die zuvor mit Orange G (Fa. Sigma-Aldrich, Inc) versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 80-100 Volt.

Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert und im Bedarfsfall fotografiert.

2.4.2 Klonierungen

2.4.2.1 Vektor / Plasmide

Die shRNA für die verschiedenen Konstrukte wurde in das retrovirale Vektorplasmid LMP (siehe Abb. 2.) (1) kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen MSCV basierenden Vektor ohne U6-Promotor. Der Vektor enthält zwei Promotoren: LTR, einen starken RNA Polymerase II - Promotor für die shRNA, sowie einen PGK-Promotor, der für eine Puromycinresistenz und Expression eines fluoreszierenden Proteins (eGFP) kodiert.



Abbildung 2: Schema LMP nach (1)

Die in den Vektor einzusetzende shRNA für GR knockdown (shGRI, shGRII) wurde aus dem bereits existierenden Plasmid pSM2 ausgeschnitten („Umklonierung“), welches bei OpenBiosystems bestellt wurde.

Die shRNAs für Bim knockdown und aSMase knockdown (shBim1,

Material und Methoden

shBim2, shaSM1, shaSM2) wurden mittels OligoAnnealing hergestellt. Hierzu wurden die Oligonukleotide (siehe Tabelle) nach Bestimmen der jeweiligen Sequenz unter Zuhilfenahme der shRNA-Bibliothek (45) RNAi-Central (<http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/portal/scripts/main2.pl>) von der Firma Sigma-Aldrich, Inc bezogen.

Zum Annealen wurde äquimolaren Mengen des 5´ und 3´ Oligonukleotids NaCl (3M), MgCl₂(1M) und Tris (pH7,5, 1M) beigefügt. Der Ansatz wurde nun mit Öl überschichtet, für 5min bei 96°C erhitzt, bei 80°C für 1 Stunde inkubiert und dann sofort auf Eis gegeben.

Nach dem Annealing wurden die Oligonukleotide mit PNK-Kinase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in T4-Ligase-Puffer (Fermentas GmbH) (enthält 1mM ATP) gemäß den Herstellerangaben phosphoryliert.

shRNA	3´/5´	Oligonukleotid
LMP- ShBim1	3´	aattcCGAGGCAGTAGGCACACAAGGAGGGTGTTTG CAAATTACATCTGTGGCTTCACTAATTTGCAAACAC CCTCCTTGTTGCTCACTGTCAACAGCAc
	5´	tcgagTGCTGTTGACAGTGAGCGAACAAGGAGGGTG TTTGCAAATTAGTGAAGCCACAGATGTAATTTGCAA ACACCCTCCTTGTTGCTCACTGTCAACAGCAc
LMP- shBim2	3´	aattcCGAGGCAGTAGGCACCTCCAGTGGGTATTTT TCTTTTACATCTGTGGCTTCACTAAAAGAGAAATAC CCACTGGAGTCGCTCACTGTCAACAGCAc
	5´	tcgagTGCTGTTGACAGTGAGCGACTCCAGTGGGTA TTTCTCTTTTAGTGAAGCCACAGATGTAAAAGAGAA ATACCCACTGGAGGTGCCTACTGCCTCGG
LMP- shaSM1	3´	aattcTCCGAGGCAGTAGGCAGGCTTCCCTCCTCCC TTCATAATACATCTGTGGCTTCACTATTATGAAGGG AGGAGGGAAGCTCGCTCACTGTCAACAGCAc
	5´	tcgagTGCTGTTGACAGTGAGCGAGCTTCCCTCCTC CCTTATAATAGTGAAGCCACAGATGTATTATGAAG GGAGGAGGGAAGCCTGCCTACTGCCTCGGAg

LMP- shaSM2	3'	aattcTCCGAGGCAGTAGGCAAGGCTCTGTGGCCAT CAAGATATACATCTGTGGCTTCACTATATCTTGATG GCCACAGAGCCGCGCTCACTGTCAACAGCAc
	5'	tcgagTGCTGTTGACAGTGAGCGCGGCTCTGTGGCC ATCAAGATATAGTGAAGCCACAGATGTATATCTTGA TGGCCACAGAGCCTTGCCTACTGCCTCGGAg

2.4.2.2 Durchführung

Zur Vorbereitung des Vektors wurden die Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI (Fermentas GmbH) für entsprechende Schnittstellen in der „multiple cloning site“ (mcs) ausgewählt. Das Plasmid wurde damit gemäß den Angaben des Enzymherstellers behandelt. Die Restriktionsreaktion wurde durch Agaroseanalyse auf ihren Erfolg hin geprüft. Der Reaktionsansatz wurde dann elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde ausgeschnitten und eluiert. Die Elution bzw. Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des GENE CLEAN III KIT (MOBIO Laboratories Inc.) nach den Angaben des Herstellers.

Nach Restriktion wurde der Vektor mittels SAP (Fermentas GmbH) dephosphoryliert. Für die anschließende Ligation wurden geschnittenes Vektorplasmid und Fragment in einem molaren Verhältnis von eins zu drei eingesetzt und zusammen mit der T4-DNA-Ligase (Fermentas GmbH) in Ligationspuffer (Fermentas GmbH) für 8-12 Stunden bei 14°C inkubiert. Begleitend wurde zur Kontrolle die gleiche Menge an Vektorplasmid ohne Fragment angesetzt (Selbstligation). 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 Ligationansatz versetzt und für 30min inkubiert, dann 30s lang auf 42°C gebracht und für 1-2min auf Eis wieder abgekühlt. In der Folge wurden die Ansätze in 0,5ml LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C mit 200 U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigem (40µg/ml) Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Verhältnis der Koloniezahlen auf den beiden Platten gab

Aufschluss über den Erfolg der Ligation im Verhältnis zur Selbstligation. Aus mutmaßlichen positiven, d.h. Vektor/Fragment exprimierenden Kulturen wurde anschließend die DNA isoliert und mittels geeigneter Restriktion und Sequenzierung verifiziert (siehe 2.4.6).

2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Je 3ml LB/Ampicillin (40µg/ml) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (200U/min). Die Bakterien wurden pelletiert, in 300µl Puffer 1 (50mM Glukose, 25mM Tris-HCl pH 8.0 und 10mM EDTA) aufgenommen und durch Zugabe von 300µl Puffer 2 (0,2N NaOH und 1% SDS) lysiert. Nach Zugabe von 300µl Puffer 3 (3M Kaliumacetat und 2M Essigsäure) erfolgte die Neutralisation. Die Lysate wurden dann zentrifugiert und die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 600µl Isopropanol ausgefällt, durch Zentrifugation (10min, 14000rpm) sedimentiert und anschließend in Wasser aufgenommen.

Restriktionsanalysen wurden mit entsprechenden Endonukleasen nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung (siehe 2.4.6) des Vektors im Bereich des eingefügten Fragments überprüft.

2.4.4 Großpräparation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus 250ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des „Qiagen Maxi-Prep Kits“ der Firma Qiagen gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

2.4.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Mikroküvette unter Verwendung einer adäquaten Verdünnung (1:100 in H₂O, 200µl Volumen) gemessen. Hierbei entspricht eine A₂₆₀-Einheit einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

2.4.6 Sequenzierung mittels Fluorochrom markierter Nukleotide

Diese Methode der DNA-Sequenzierung basiert auf der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (46), erfordert aber keine getrennte, nukleotidspezifische Einzelreaktion mehr, da der basenspezifische Strangabbruch durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotide erfolgt und die so entstandenen Fragmente daher anhand ihrer Farbe am 3'-Ende identifizierbar sind. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion ist dabei eine lineare Polymerase Kettenreaktion (PCR), da nur ein Primer verwendet wird. Dieser wird matrizen-abhängig in jedem Zyklus von der eingesetzten Polymerase elongiert, welche sowohl unmarkierte Desoxyribonukleotide als auch markierte Didesoxynukleotide als Substrat akzeptiert. Nach der Sequenzierungs-PCR wird die DNA gereinigt und zur Analyse im Sequenziergerät in einem speziellen Puffer (TSR) aufgenommen. Im Sequenziergerät werden die Bruchstücke längenspezifisch aufgetrennt und die Farbmarkierung detektiert. Nach erfolgter Kapillarelektrophorese wird die Sequenz von der Software des Computers am Sequenziergerät als 4-Farbendiagramm ausgegeben, wobei jeder Base eine Farbe zugeordnet ist. Unter Optimalbedingungen können ca. 500 Basen gelesen werden.

2.4.6.1 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 0,5ml PCR-Reaktionsgefäß hergestellt, wobei die Menge einzusetzender DNA entsprechend des Richtwertes (500ng bei 3kb) auf die reale Plasmid- bzw. Fragmentgröße umgerechnet wurde:

DNA in H ₂ O	500ng
Primer (25µM)	1,5µl
„Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit (Perkin Elmer®)	2,5µl
H ₂ O	ad 10µl

Die Reaktion wurde 25 Zyklen, bestehend aus 25s bei 98°C und 8min bei 50°C, im PCR-Gerät inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt.

2.4.6.2 Reinigung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes

Die zu sequenzierende DNA wurde nach der PCR mit Hilfe von Sephadex-Beads (Sephadex™ G-50 DNA Grade Fine, Amersham, Buckinghamshire) gereinigt. 150-250µl der in Wasser gelösten Beads wurden in eine gestopfte Pipettenspitze überführt. Die Spitze wurde dann in ein 2ml Reaktionsgefäß, in ein Loch im Deckel, gesteckt und 3min bei 3000rpm zentrifugiert, um das Wasser zu entfernen. Danach wurde der komplette DNA-Ansatz auf die Säule gegeben und wiederum 3min bei 3000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde in 15µl TSR-Puffer (Perkin Elmer®) aufgenommen und in ein Eppendorf-Tube (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Vor der Analyse im Sequenziergerät (310 Genetic Analyzer, ABI PRISM™) wurde die Probe 2min bei 94°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in ein spezielles Sequenzanalyse-Reaktionsgefäß überführt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten

1x10⁶ Zellen wurden in Eppendorf-Tubes (Sarstedt) überführt und durch Zentrifugation sedimentiert (1min, 14000rpm). Das Medium wurde abgesaugt und die sedimentierten Zellen in 50µl 6x-Probenpuffer (Laemmli: 14ml Puffer B (siehe Tabelle) 6ml Glycerin, 2g SDS, 2,5mg Bromphenolblau, 1,85g DTT) aufgenommen und für 10min bei 95°C lysiert.

Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

2.5.2 SDS PAGE

Proteinproben wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (47) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Als Trägermatrix werden chemisch inerte, als Molekularsiebe wirkende Polyacrylamidgele verwendet. Damit alle SDS-Proteinkomplexe gleichzeitig ins Trenngel gelangen, ist diesem ein Sammelgel vorgelagert. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngele (15ml):

Acrylamidkonzentration in %	10	12,5
Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8% (ml)	5	6,25
Puffer A (1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,4%SDS) (ml)	3,75	3,75
H ₂ O (ml)	6,25	5
10% Ammoniumperoxodisulfat (μl)	150	150
TEMED (μl)	25	25

Sammelgel (5ml):

Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8% (μl)	650
Puffer B (0,5M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS) (ml)	1,25
H ₂ O (ml)	3
10% Ammoniumperoxodisulfat (μl)	50
TEMED (μl)	5

Hauseigene Minigelplatten wurden mit den zugehörigen Abstandshalter zusammengesetzt und in eine Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel bis ca. 2,5cm unter den oberen Rand gegossen und zur Ausbildung einer geraden Polymerisationskante vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngeles wurde das Wasser sorgfältig entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Geltaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Vertikallaufkammer gespannt. Sowohl das obere als auch das untere Pufferreservoir der Vertikallaufkammer wurden mit 1x-Laufpuffer gefüllt. Jeweils 10μl der Proteinextrakte wurden aufgetragen und stromkonstant bei 30mA aufgetrennt. Um eine nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden zu ermöglichen, wurden neben den Proben 3μl der „Bench Mark™ Prestained ProteinLadder“ (GibcoBRL) aufgetragen.

2.5.3 Western Blotting

Western Blotting dient zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine eines Gemisches. Dabei werden die in der 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.

2.5.3.1 Transfer der Proteine auf Blotmembranen

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel kurz mit Wasser gespült. Die Blotmembran (Immobilon™-P, PVDF-Membran, MILLIPORE) und Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Je 4 Whatman-Papiere dienten als Kathode bzw. Anode. Diese wurden hierzu mit Anodenpuffer (Roti-Blot® A, Roth) bzw. Kathodenpuffer (Roti-Blot® K, Roth) getränkt. Die Membran wurde in 100% Methanol aktiviert.

Der Aufbau zum Transfer in der Graphitkammer sah folgendermaßen aus:

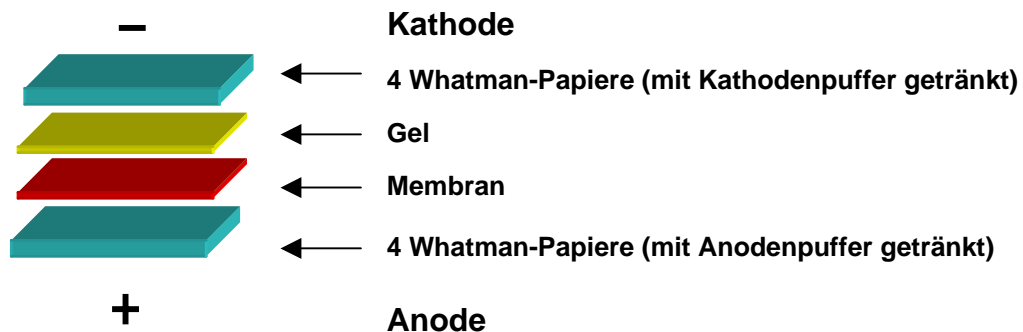


Abbildung 3: Schema Western Blot

Der Transfer erfolgte über 2 Stunden stromkonstant mit 70mA bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde die Membran kurz in 100% Methanol gewaschen und zur Fixierung der Proteine auf der Membran luftgetrocknet.

2.5.3.2 Immunologische Detektion

Gemäß den Herstellerangaben wurden die Antikörper in Blockpuffer (5% Magermilchpulver in PBS/TWEEN (Tween-20 (AppliChem GmbH, Darmstadt)) in einer Konzentration von 1:1000 -1:2000 gelöst. Die Detektion erfolgte mit folgenden Antikörpern.

Primärantikörper:

Antikörper	Herkunft
anti-GR (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Inc
anti-Bim (Kaninchen, polyklonal)	BD Pharmingen™
ASM (H-181) (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-βTubulin (Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc

Peroxidase-konjugierte Antikörper:

Antikörper	Herkunft
anti-Maus (Ziegen IgG)	Jackson, ImmunoResearch, West Grove
anti-Kaninchen (Ziegen IgG)	Santa Cruz Biotechnology, Inc

Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3x5min mit PBS/TWEEN) erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper. Zum Schluss wurde die Membran erneut gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des SuperSignal West Pico Chemilumi-

nescent-Systems (PIERCE Biotechnology) durchgeführt.

2.5.3.3 SuperSignal® West Pico Chemiluminescent

Gebundene Antikörper-Peroxidase-Konjugate können in der Dunkelkammer mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent-System (PIERCE Biotechnology) nachgewiesen werden. Bei der von der Peroxidase katalysierten Reaktion wird Licht erzeugt, welches einen Röntgenfilm („x-ray RETINA“ XBD, medizinischer Röntgenfilm Fotochemische Werke GmbH) belichtete.

Hierzu wurde die Membran gemäß den Herstellerangaben für 5min inkubiert. Anschließend wurde sie luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien gelegt. Es erfolgten dann verschieden lange Belichtungen (10s - 30min) des Röntgenfilms in einer lichtdichten Kassette. Der Röntgenfilm wurde sofort entwickelt und die auf der Blotmembran sichtbare Proteinleiter auf den Röntgenfilm übertragen, um eine Zuordnung der Banden zu ermöglichen.

3 Ergebnisse

Wenngleich die Glukokortikoid-induzierte Apoptose eine der zuerst entdeckten Formen des Programmierten Zelltodes war (48), ist sie dennoch kaum verstanden (18) und daher heute noch Teil vieler Forschungen.

Auch der Fokus dieser Arbeit gilt dem Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten Apoptose. Im Rahmen früherer Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe waren verschiedene Subklone der Zelllinie WEHI7.1, einem murinen T-Zelllymphom, generiert worden, welche unterschiedlich auf die Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason (Dex) reagieren. Während bei manchen Subklonen Dexamethason praktisch keine Apoptose induzierte, zeigten andere nach Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Überlebensraten von weniger als 5% (unveröffentlicht, Reichardt, HM und Heck, T).

Weitere Studien an diesem Subklon zeigten, dass dieser den Glukokortikoidrezeptor (GR) wesentlich höher exprimiert. Dies konnte sowohl auf Proteinebene, als auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (unveröffentlicht, Reichardt, HM und Alb, M).

Ziel dieser Arbeit war es nun den Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten Apoptose mittels dieses Zellklons näher zu charakterisieren.

3.1 Die Rolle des GR in GC-induzierter Apoptose

3.1.1 GR knockdown ist effizienter in WEHI231-Zellen

Das gängige Model über die GC-induzierte Apoptose deutet darauf hin, dass ein funktionierender Glukokortikoid-Rezeptor vorhanden sein muss (22), (23), (24), (25). Um dies zu bestätigen, wurde nun zunächst versucht, durch das Einbringen einer short hairpin RNA (shRNA) gegen den GR, dessen Expression zu unterbinden (GR knockdown). Für das folgende Experiment wurden zwei unterschiedliche Zelllinien mit rekombinanten

Ergebnisse

Retroviren transduziert, welche für eine shGR (LMP-shGRI, LMP-shGRII) kodierten. Zum einen die WEHI7.15a-Zellen, welche den Glukokortikoidrezeptor vermehrt exprimieren, zum anderen WEHI231-Zellen, eine murine B-Zelllymphom Zelllinie. Die Proteinanalyse belegte, dass die Proteinmenge der beiden GR knockdowns sowohl bei den WEHI7.15a-Zellen, als auch bei den WEHI231-Zellen im Vergleich zu den Kontrollpopulationen (LMP, LMP-shctrl) verringert war (Abb. 4A).

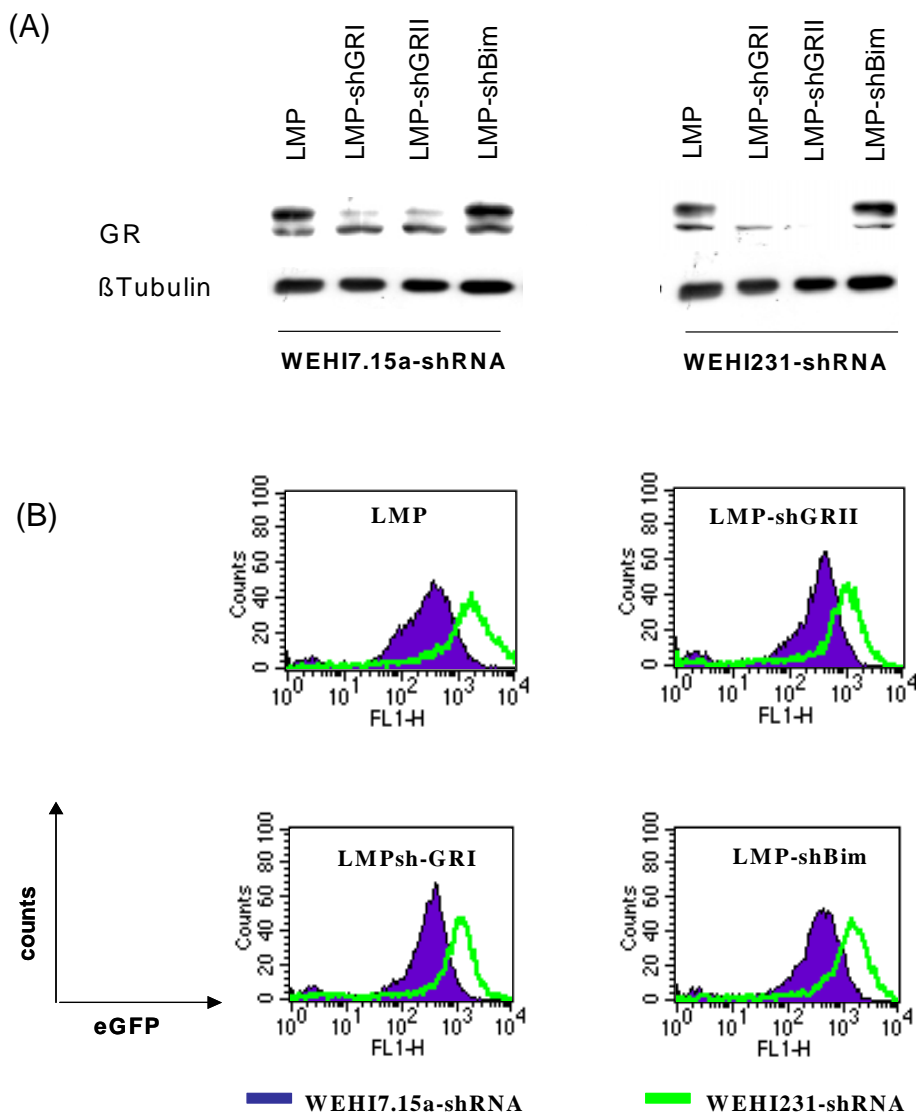


Abbildung 4: GR knockdown funktioniert besser in WEHI231-Zellen. (A) WEHI 7.15a- und WEHI231-Zellen wurden retroviral transduziert mit einer Kontrolle (LMP, LMP-shBim) oder knockdown Konstrukten für GR (LMP-shGRI, LMP-shGRII). Proteinlysate wurden durch Western Blot mit Ak gegen GR analysiert. Als Ladekontrolle diente β Tubulin. (B) FACS-Analyse von transduzierten WEHI7.15a- und WEHI231- Zellen (overlay). Dargestellt ist jeweils die lebende Zellpopulation.

Weiterhin zeigte sich, dass die Proteinmenge des Glukokortikoidrezeptors in shGR-transduzierten WEHI231 im Vergleich zu den shGR-transduzierten WEHI7.15a deutlich reduziert war (Abb. 4A). Auffällig war weiterhin, dass transduzierte WEHI231-Zellen eine wesentlich stärkere Expression von eGFP im Vergleich zu den transduzierten WEHI7.15a-Zellen aufwiesen, obwohl gleiche Mengen an infektiösem Überstand für die Infektion beider Zelllinien verwendet wurde (Abb. 4B). Selbst die Verwendung eines höher titrierten Virusüberstandes, oder eine erneute Infektion bereits transduzierter Zellen, führte nicht zu einer höheren Expression des transduzierten Konstruktes in WEHI7.15a-Zellen (Daten nicht gezeigt). Auch hatte eine Verdünnung des infektiösen Überstandes bei der Infektion von WEHI231-Zellen eine ebenfalls höhere Expression im Vergleich zu transduzierten WEHI7.15a zur Folge (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 GR knockdown schützt vor GC-induzierter Apoptose in WEHI7.15a

In einem nächsten Schritt wurde nun die Sensibilität der transduzierten WEHI7.15a-Zellen gegenüber Glukokortikoiden untersucht. Wie erwartet, hatten die shGR-transduzierten Populationen nach Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason einen Überlebensvorteil gegenüber den Kontrollpopulationen (Abb. 5A). Um in diesem Versuch ein Artefakt durch die shRNA auszuschließen, wurden die transduzierten Zellen ebenfalls mit Etoposid inkubiert, von dem bekannt ist, dass es die Aktivität der Topoisomerase II blockiert und so Apoptose (über den Weg der Mitochondrien) einleitet (49). Sowohl die transduzierten WEHI7.15a-Zellen (LMP, LMP-shctrl, LMP-shGRI, LMP-shGRII), als auch nicht transduzierte WEHI7.15a (wt) zeigten ein nahezu identisches Verhalten in Bezug auf die Behandlung mit Etoposid (Abb. 5B).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass der GR knockdown WEHI7.15a-Zellen spezifisch vor GC-induzierter Apoptose, und nicht vor dem programmierten Zelltod generell schützt.

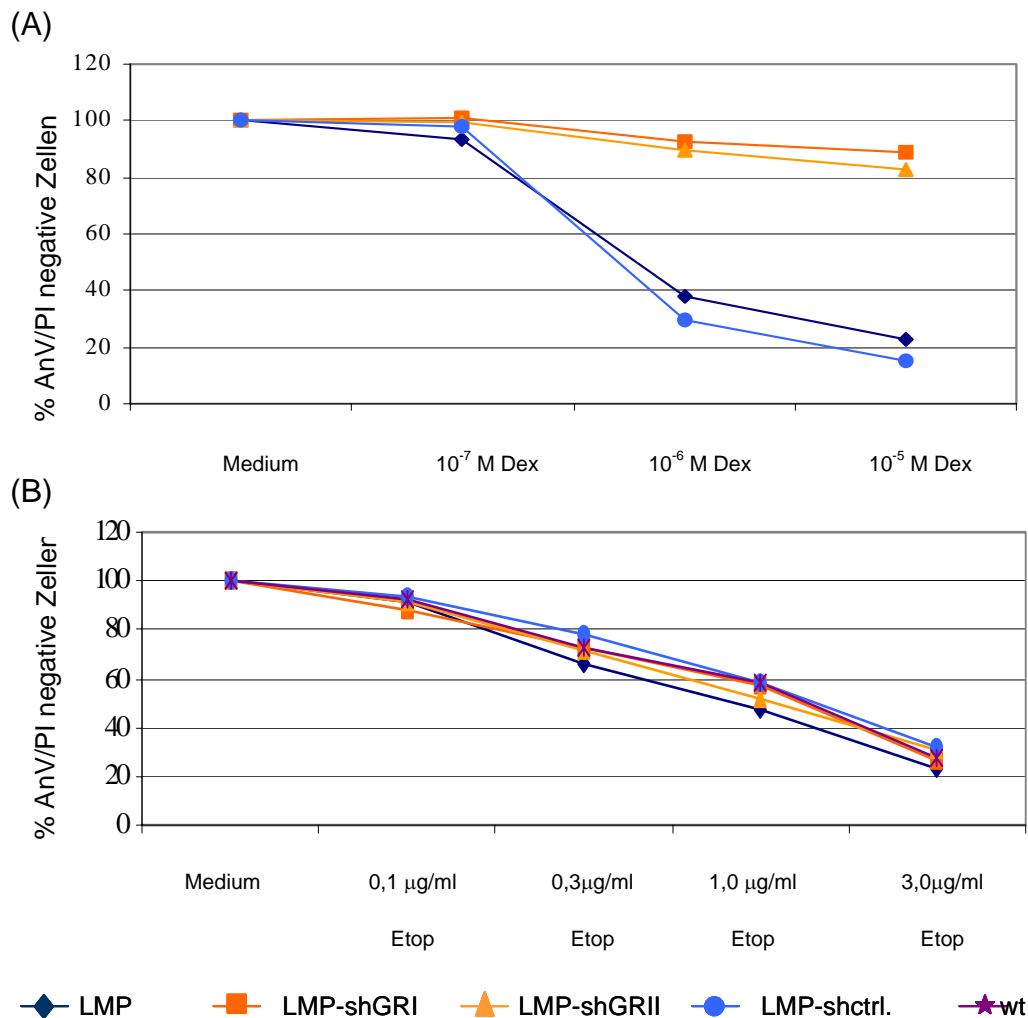


Abbildung 5: GR knockdown schützt WEHI7.15a-Zellen vor GC-induzierter Apoptose. WEHI7.15a-Zellen wurden retroviral transduziert mit einer Kontrolle (LMP, LMP-shctrl) oder knockdown Konstrukten für GR (LMP-shGRI, LMP-shGRII). **(A)** Transduzierte WEHI7.15a-Zellen wurden mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1×10^{-5} M und 1×10^{-7} M für 3 Tage inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV/PI negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach FACS-Analyse. **(B)** Wildtyp WEHI7.15a (wt) und transduzierte WEHI7.15a-Zellen wurden mit Etoposid in Konzentrationen zwischen 0,1 µg/ml und 3,0 µg/ml für 2 Tage inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV/PI negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS-Analyse.

3.1.3 GR knockout schützt vor GC-induzierter Apoptose ex vivo

GR knockout Mäuse wurden zum ersten Mal 1995 von Schütz und Kollegen beschrieben. Der GR knockout wurde durch eine Null-Mutation des Glukokortikoidrezeptor-Genes mittels „Gene Targeting“ in embryonalen Stammzellen erzeugt. Die hieraus entstehenden Glukokortikoidrezeptor-defizienten Mäuse können sich bis zu einem bestimmten Grad entwickeln,

Ergebnisse

die meisten aber sterben kurz nach der Geburt (44). Bis heute wurden viele weitere Stämme von Glukokortikoidrezeptor-defizienten Mäusen, mit verschiedenen Mutationen im Rezeptor und somit unterschiedlichen Phänotypen, beschrieben und im Hinblick auf die Funktion in T-Zellen untersucht (26).

Es wurde gezeigt, dass ein GR knockout, keinen signifikanten Einfluss auf die Thymozytenentwicklung *in vivo*, in Bezug auf Zellzahl, Verteilung sowie Selektion hat (50), (51).

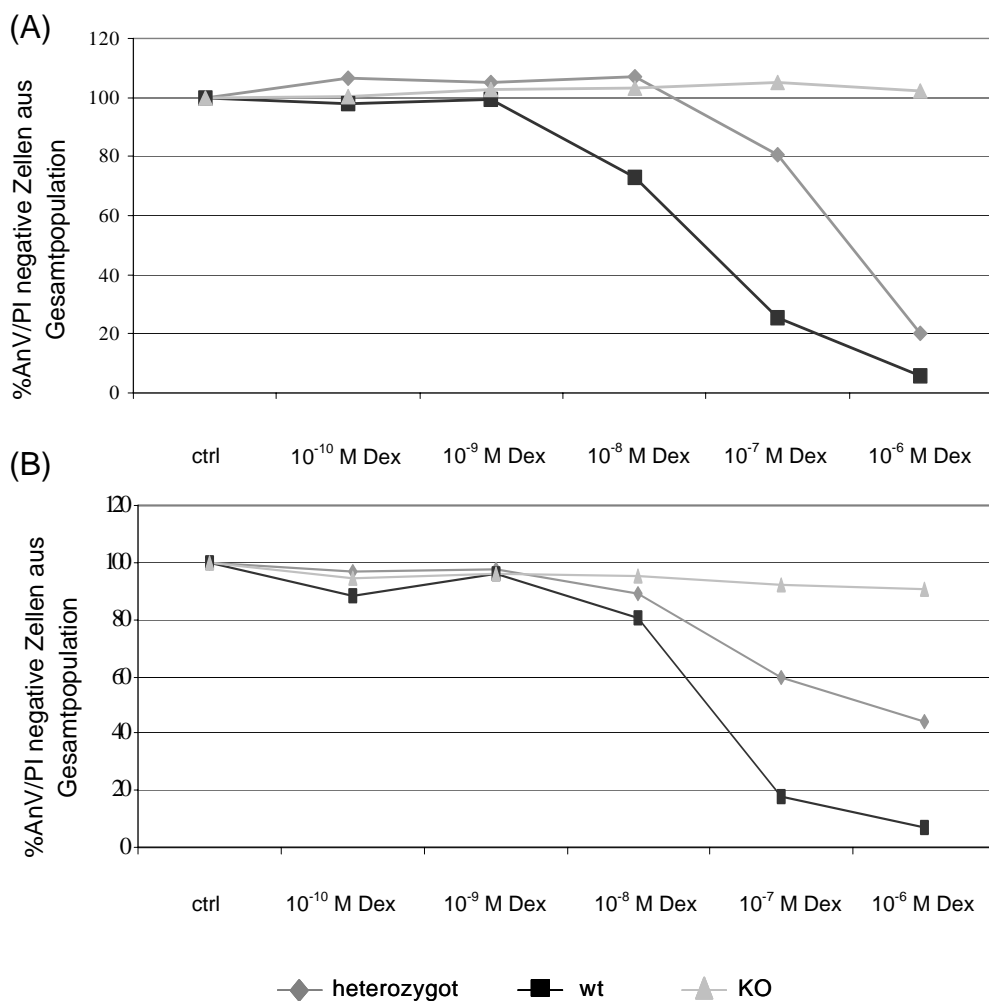


Abbildung 6: GR knockout schützt vor GC-induzierter Apoptose *ex vivo*. (A) Thymozyten einer GR-KO, bzw. einer in Bezug auf den GR heterozygoten, sowie einer C57/Bl6wt Maus wurden für 20 Stunden mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1×10^{-6} M und 1×10^{-10} M inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS-Analyse. (B) Milzzellen einer GR knockout (KO), bzw. einer in Bezug auf den GR heterozygoten, sowie einer C57/Bl6wt Maus wurden für 20 Stunden mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1×10^{-6} M und 1×10^{-10} M inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS-Analyse.

Um nun die Abhängigkeit des GR auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose ex vivo zu verdeutlichen, wurden nun Thymozyten und Milzzellen einer GR knockout Maus (44), einer im Bezug auf den GR heterozygoten Maus, sowie einer wt C57/Bl6 Maus für 20 Stunden mit Dexamethason inkubiert. Während knockout Thymozyten als auch -Milzzellen praktisch gänzlich resistent gegenüber dieser Art der Apoptose waren, lies sich sowohl bei den in Bezug auf den GR heterozygoten als auch wt-Zellen Apoptose induzieren, wobei die wt-Zellen vermehrt in Apoptose gingen (Abb. 6A, B). Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Menge an GR in umgekehrtem Maße für die Resistenz gegenüber Glukokortikoiden ex vivo verantwortlich ist.

3.1.4 GR knockdown im hämatopoetischen System führt zum Überlebensvorteil der DP Thymozyten

Ein kompletter GR knockout in Mäusen ist nicht möglich, da diese ohne den Glukokortikoidrezeptor aufgrund einer Lungenatelektase und der fehlenden Aktivierung glukoneogenetischer Gene kurz nach der Geburt versterben (52). Eine elegante Lösung zur Erforschung Glukokortikoidrezeptor-defizienter Mäuse bietet hier ein GR knockdown im hämatopoetischen System. Zunächst stellte sich die Frage, ob es mit den knockdown Konstrukten möglich sei, einen GR knockdown in vivo zu erzeugen. Demnach wurden Ter119 depletierte fötale Leberzellen mit den rekombinanten Retroviren (LMP, LMP-shGR1) transduziert und zur Rekonstitution bestrahlter, kongener Mäuse verwendet. 4-6 Wochen nach Rekonstitution zeigte die FACS-Analyse der Thymi und Milzen dieser Tiere, dass die Transduktion mit den knockdown Konstrukten im hämatopoetischen System zumindest teilweise funktionierte. So zeigten bis zu 2% der Thymozyten bzw. Milzzellen eine eGFP-Expression (Abb. 7A).

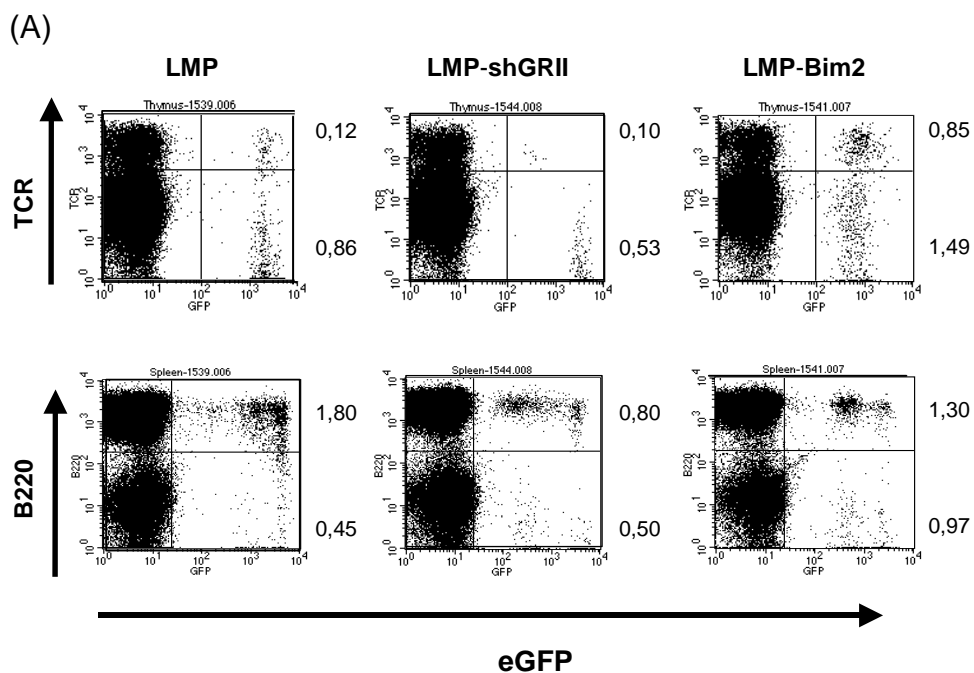
Es ist bekannt, dass Thymozyten, abhängig von ihrem Entwicklungsstadium unterschiedlich sensitiv auf Glukokortikoide reagieren. So wurde gezeigt, dass eine in vivo Applikation von Glukokortikoiden zu einem Abfall

Ergebnisse

der $CD4^+CD8^+$ (=Doppelpositive; DP) zugunsten der $CD4^+CD8^-$ (=CD4-SP), $CD4^-CD8^+$ (=CD8-SP) und $CD4^-CD8^-$ (=Doppelnegative; DN) Thymozyten führt (27). Dementsprechend gaben genauere Untersuchungen der Thymi der GR knockdown Mäuse, mithilfe der Oberflächenmarker CD4 und CD8, Hinweis darauf, dass der GR knockdown die Thymozytenentwicklung in vivo beeinflusst. So zeigte sich eine prozentuale Anreicherung der eGFP-exprimierenden Zellen im Stadium der unreifen $CD4^+CD8^+$ Thymozyten, dem wichtigen Checkpoint in der Thymozytenentwicklung (53) (Abb. 7B).

Der Phänotyp der Milz schien weitgehend unbeeinflusst von einem solchen knockdown (Abb. 7C).

Somit lässt sich festhalten, dass ein in vivo knockdown des GR im hämatopoetischen System zu einem Überlebensvorteil der Doppelpositiven Thymozyten führt, während er keinen Einfluss auf die peripheren T-Zellen in der Milz hat.



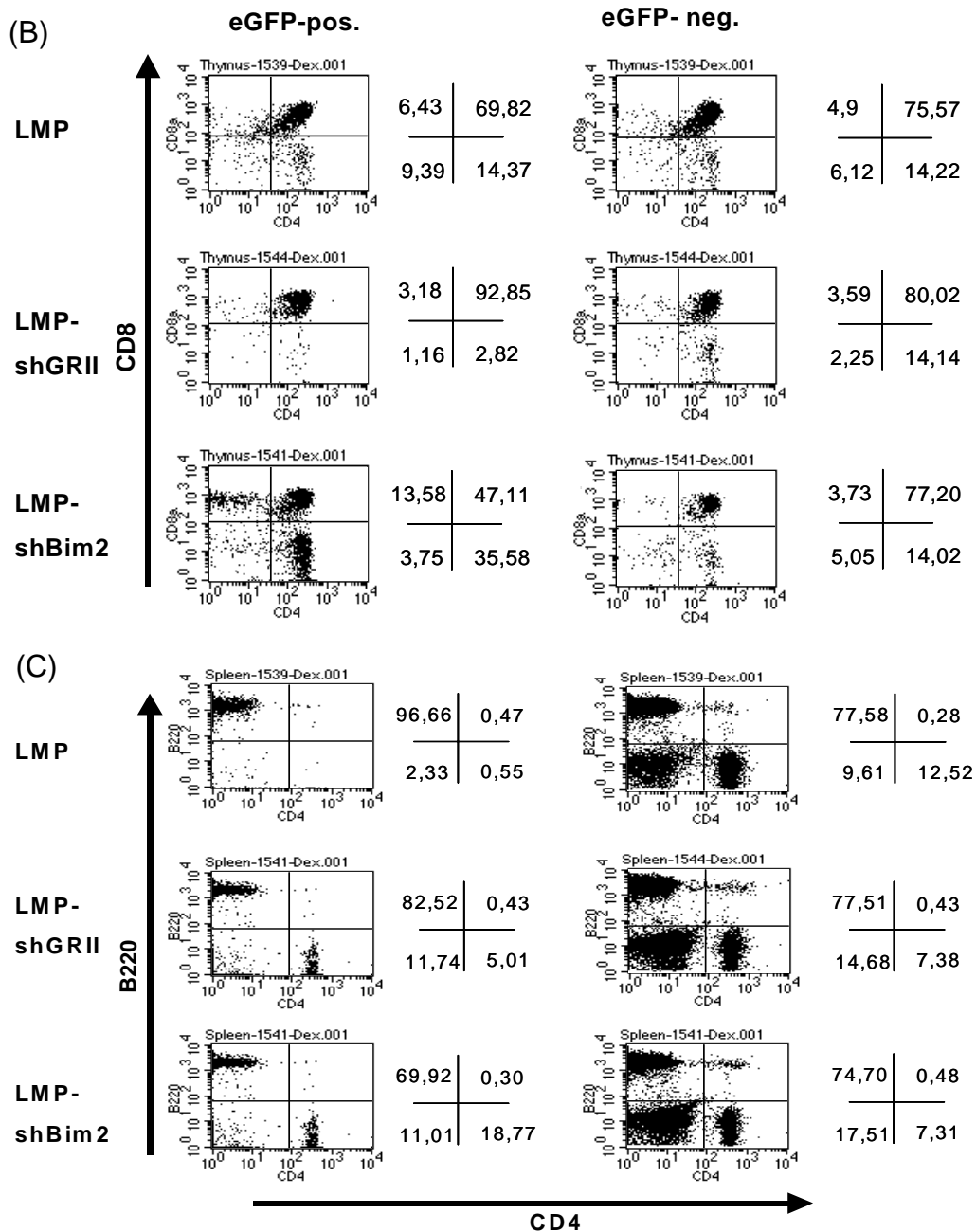


Abbildung 7: Bim knockdown und GR knockdown beeinflussen die Thymozytenentwicklung in vivo. (A) Ter119 depletierte fötale Leberzellen (E14) wurden mit den rekombinanten Retroviren (LMP, LMP-shGRII, LMP-shBim2) transduziert und zur Rekonstitution bestrahlter kongener Mäuse verwendet. 4-6 Wochen nach Rekonstitution erfolgte eine Untersuchung der Thymi (oben) und Milzen (unten) auf die Expression von eGFP mittels FACS-Analyse. Dargestellt ist jeweils die gesamte Population lebender Thymozyten bzw. Milzzellen. (B) zeigt eine weitere Untergliederung der in (A) definierten eGFP- positiven/-negativen Thymozyten anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8. Die angegebenen Zahlen repräsentieren den prozentualen Anteil unter den lebenden Thymozyten. (C) zeigt eine weitere Untergliederung der in (A) definierten eGFP- positiven/-negativen Milzzellen anhand der Oberflächenmarker B220 und CD4. Die angegebenen Zahlen zeigen den prozentualen Anteil unter den lebenden Milzzellen.

3.1.5 GR knockdown schützt vor GC-induzierter Apoptose ex vivo

Wie in 3.1.2 dargestellt, konnte ein GR knockdown den Glukokortikoid-sensitiven Zellklon WEHI7.15a spezifisch vor GC-induzierter Apoptose schützen. Nach erfolgreicher Rekonstitution der Mäuse mittels der GR knockdown Konstrukte (siehe 3.1.4), wurde nun das Verhalten der GR knockdown Thymozyten auf die Behandlung mit Dexamethason ex vivo untersucht. Hier gibt eine Anreicherung der eGFP-exprimierenden Thymozyten der knockdown Population (LMP-shGR11) im Gegensatz zur Kontrollpopulation (LMP) deutlichen Hinweis darauf, dass ein GR knockdown Thymozyten vor GC-induzierter Apoptose ex vivo schützt. (Abb. 8A) Auch periphere T-Zellen und B-Zellen aus der Milz rekonstituierter knockdown Mäuse zeigten eine Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose ex vivo im Gegensatz zur Kontrollpopulation (Abb. 8B).

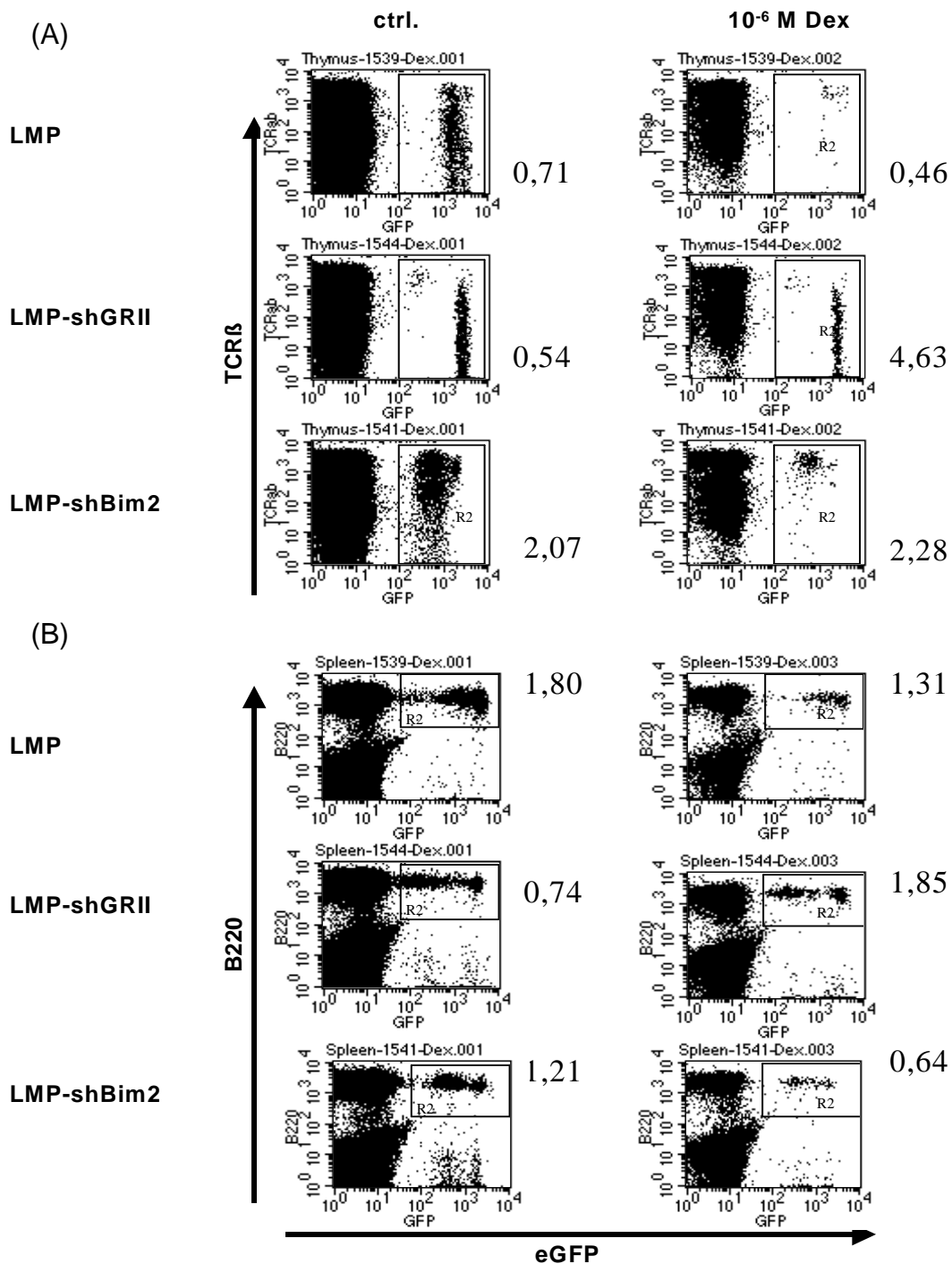


Abbildung 8: GR knockdown schützt vor GC-induzierter Apoptose ex vivo. (A) Die Thymi der mit knockdown Konstrukt (LMP-shGRII, LMP-shBim2) oder mit Kontrolle (LMP) rekonstituierten Mäuse, wurden mit Dexamethason der Konzentration 1×10^{-6} M oder PBS (ctrl.) für 20 Stunden ex vivo inkubiert. Dargestellt ist die FACS-Analyse nach Färbung der Zellen mit TCR β -PE. Die angegebenen Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil eGFP-positiver Zellen aus der lebenden Gesamtpopulation. **(B)** Die Milzen der mit knockdown Konstrukt (LMP-shGRII) oder Kontrolle (LMP) rekonstituierten Mäuse wurden mit Dexamethason der Konzentration 1×10^{-6} M oder PBS (ctrl.) für 20 Stunden ex vivo inkubiert. Dargestellt ist die FACS-Analyse nach Färbung der Zellen mit B220-PE. Die angegebenen Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil eGFP positiver Zellen aus der lebenden Gesamtpopulation.

3.2 Die Rolle von Bim in GC-induzierter Apoptose

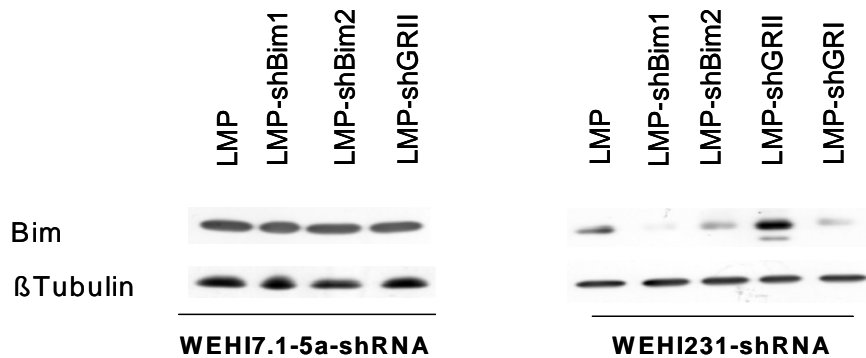
3.2.1 Bim knockdown gelingt nicht in WEHI7.15a-Zellen

Eine Bcl-2 Überexpression resultiert in einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose in einer Reihe von Zellen wie einigen Lymphomzelllinien, aber auch normalen Thymozyten, sowie reifen T- und B-Zellen (54), (55). Auch ist bekannt, dass Glukokortikoide die Transkription von BH3-only Genen, einer proapoptotischen Untergruppe der Bcl-2 Familie, wie zum Beispiel Bim (BCL-2-interacting mediator of cell death) und Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), induziert (15), (16), (17), (18), (19). Dies legt nahe, dass Bim und Puma somit wahrscheinliche Kandidaten sind, den Weg der GC-induzierten Apoptose zu initiieren.

Um nun die Rolle von Bim an unserem GC-sensitiven Zellklon zu untersuchen, wurde versucht, durch das Einbringen einer shRNA gegen Bim (gegen alle drei Isoformen: BimS, BimL, BimEL), Bim-mRNA und Bim-Proteinlevel zu reduzieren (Bim knockdown). Für das folgende Experiment wurden demnach WEHI7.15a-Zellen mit rekombinanten Retroviren transduziert, welche für eine shBim (LMP-shBim1, LMP-shBim2) kodierten. Als Kontrollpopulation wurden Zellen verwendet, welche nur das leere Vektorplasmid (LMP) exprimierten, oder für eine Kontroll-shRNA (LMP-shGR1) kodierten. Eine Proteinanalyse zeigte jedoch, dass die Proteinmenge der beiden Bim knockdowns im Vergleich zu den Kontrollpopulationen nicht reduziert war (Abb.9A).

Um trotzdem die Effizienz der Konstrukte zu testen, Bim-Proteinlevel zu reduzieren, wurden nun WEHI231-Zellen ebenfalls retroviral mit den Konstrukten (LMP-shBim1, LMP-shBim2, LMP, LMP-shGR1, LMP-shGR2) transduziert. Proteinanalysen zeigten, dass hier die Proteinmenge der Bim knockdowns in WEHI231 im Gegensatz zu denen von WEHI7.15a deutlich reduziert war (Abb. 9A). Weiterhin beobachtete man bei der Proteinanalyse, dass der GR knockdown mit dem LMP-shGR2-Vektorkonstrukt in WEHI231 zu einer stärkeren Expression von Bim führte (Abb. 9A).

(A)



(B)

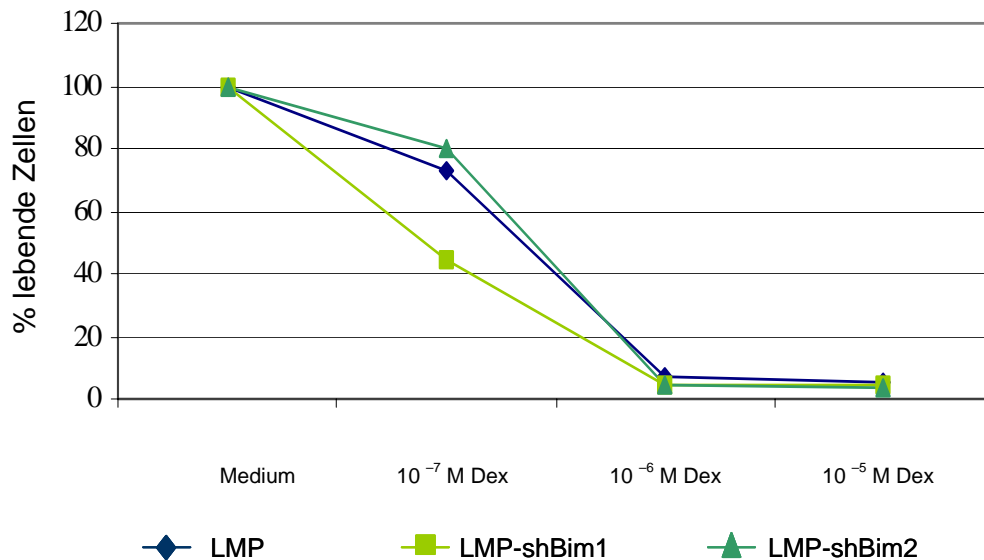


Abbildung 9: Bim knockdown gelingt nicht in WEHI7.15a. (A) WEHI7.15a- bzw. WEHI231-Zellen wurden retroviral transduziert mit einer Kontrolle (LMP, LMP-shGRI, LMP-shGR1/2) oder knockdown Konstrukten für Bim (LMP-shBim1, LMP-shBim2). Proteinlysate wurden durch Western Blot mit Ak gegen Bim analysiert. Als Ladekontrolle diente β Tubulin. (B) Transduzierte WEHI7.15a-Zellen wurden mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1×10^{-5} M und 1×10^{-7} M für 3 Tage inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der lebenden Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS-Analyse.

Um dennoch einen Effekt des vermeintlichen Bim knockdowns auf den GC-sensitiven Zellklon zu untersuchen, wurden die transduzierten WEHI7.15a-Zellen mit Dexamethason behandelt. Hier waren Bim knockdown (LMP-shBim1, LMP-shBim2) und Kontrolle (LMP) gleichmäßig sensitiv in Bezug auf die Behandlung mit dem synthetischen GC (Abb. 9B).

Der vermeintliche Bim knockdown konnte demnach WEHI7.15a-Zellen nicht vor GC-induzierter Apoptose schützen.

3.2.2 Bim knockdown und GR knockdown schützen WEHI231 in geringem Umfang vor BZR-induziertem Zelltod

Von Bim ist weiterhin bekannt, dass es über eine B-Zellrezeptor Stimulation aktiviert wird und somit in B-Zellen zu Apoptose führt (56). In einem nächsten Schritt wurde nun in WEHI231-Zellen, einem Modellsystem für unreife B-Zellen, der Effekt eines Bim knockdown auf BZR-induzierte Apoptose untersucht. Hierzu wurden mit Bim knockdown Konstrukt (LMP-shBim1, LMP-shBim2) oder Kontrolle (LMP, LMP-shGR11) transduzierte WEHI231- Zellen mit einem monoklonalen Anti-IgM Antikörper stimuliert. Über dessen Bindung am B-Zellrezeptor kommt es zur Stimulation des B-Zellrezeptors und somit über eine Induktion von Bim zur Apoptose (57). Hier zeigte sich, dass ein Bim knockdown (LMP-shBim1, LMP-shBim2) vor BZR-induzierter Apoptose schützt. Überraschenderweise konnte zudem beobachtet werden, dass ein GR knockdown (LMP-shGR11) ebenfalls die Tendenz zeigte, vor BZR-induzierter Apoptose zu schützen (Abb. 10A). Allerdings sei hierbei anzumerken, dass die ermittelten Werte hier sehr streuen und demnach große Standardabweichungen vorliegen (Abb. 10A). Interessanterweise konnte auch verifiziert werden, dass im Gegensatz zur Kontrolle beim Bim knockdown eine andere Form des Zelltodes statt fand, da hier die apoptotischen Zellen nicht das Stadium der zunächst nur AnV-Positiven durchliefen, sondern zugleich auch PI-positiv wurden (Abb. 10B).

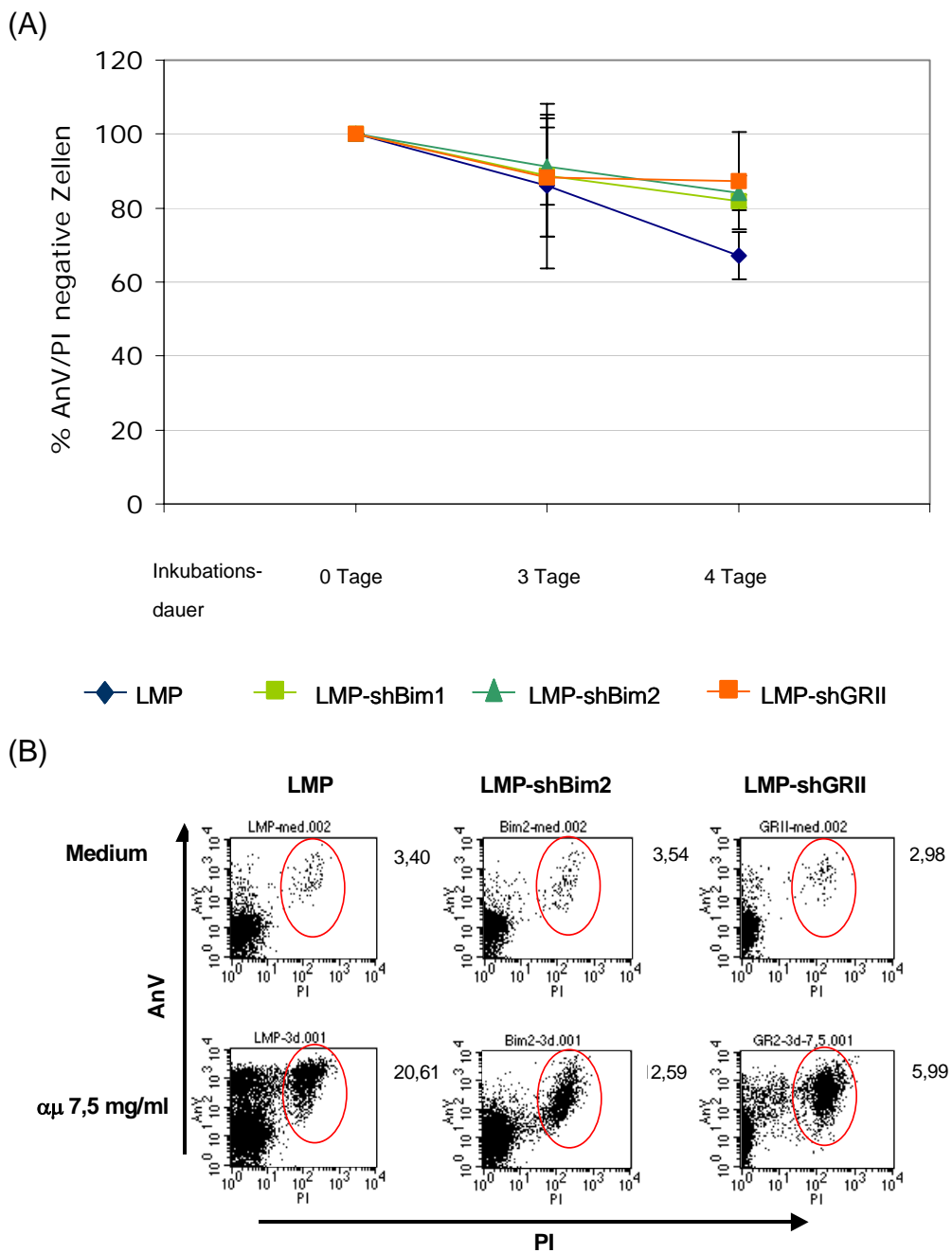


Abbildung 10: Bim knockdown und GR knockdown schützen WEHI231 vor BZR-induziertem Zelltod. (A) Die mit Kontrolle (LMP, LMP-shGR11) oder knockdown Konstrukten transduzierten WEHI231-Zellen wurden mit einem Anti-IgM Antikörper ($\alpha\mu$) in der Konzentration $\alpha\mu = 7,5\mu\text{g/ml}$ für 0, 3 bzw. 4 Tage inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Mediumwert (0 Tage Inkubation) mitbestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV/PI negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS-Analyse. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD dreier unabhängiger Experimente. **(B)** zeigt für knockdown und Kontroll-Gruppe repräsentative FACS-Analysen an Tag 3. Dargestellt sind AnV- und / bzw. PI-positive Zellen aus der gesamten Population.

3.2.3 Bim knockdown beeinflusst die Thymozytenentwicklung in vivo

Analog zu dem in 3.1.4 beschriebenen GR knockdown wurde ebenfalls der Einfluss eines Bim knockdown im hämatopoetischen System in vivo untersucht. FACS-Analysen konnten zeigen, dass sich beim Bim knockdown die eGFP-exprimierende Thymozytenpopulation zugunsten der CD4-SP und CD8-SP Zellen verschoben hat (Abb. 7B). Dies deutet auf eine Rolle von Bim in der Thymozytenentwicklung hin und ist mit der Beobachtung einer Anreicherung von einzelpositiven Zellen in Bim knockout Mäusen konsistent. Gegenwärtig wird angenommen, dass die Ursache hierfür in einer gestörten negativen Selektion durch fehlende Deletion autoreaktiver Zellen in Abwesenheit von Bim liegt. Entsprechend kam es in unseren Versuchen innerhalb der eGFP-exprimierenden Zellpopulation ebenfalls zu einer relativen Zunahme der CD4-SP und CD8-SP Zellen auf Kosten der DP Thymozyten (Abb. 7B). Der Phänotyp der Milz schien weitgehend unbeeinflusst von einem solchen knockdown (Abb. 7C).

Daher lässt sich schlussfolgern, dass ein Bim knockdown im hämatopoetischen System Einfluss auf die Thymozytenentwicklung in vivo hat, während er keinen Einfluss auf die peripheren T-Zellen in der Milz hat.

3.2.4 Bim knockdown schützt nicht vor GC-induzierter Apoptose ex vivo

In vivo Untersuchungen eines Bim knockout auf die Sensitivität gegenüber Glukokortikoiden konnten weiterhin zeigen, dass dieser Thymozyten nur teilweise vor GC-induzierter Apoptose schützt. Selbst die gegenüber Glukokortikoiden besonders sensitiven unreifen DP Thymozyten, wurden durch einen Bim knockout nur teilweise vor GC-induzierter Apoptose geschützt (14). Weiterhin konnten Erlacher, M et al. durch Untersuchungen an reifen peripheren Milzzellen feststellen, dass Bim in der Peripherie eine untergeordnete Rolle spielt (14).

Um nun den Einfluss des Bim knockdown auf GC-induzierte Apoptose ex vivo zu untersuchen, wurden die Thymozyten der mittels des Bim knockdown Konstrukt (LMP-shBim2) rekonstituierten Maus mit Dexamethason ex vivo inkubiert. FACS-Untersuchungen der Expression eGFP-positiver Thymozyten gaben keinen Anhalt auf eine Anreicherung und somit Resistenz der Bim knockdown Thymozyten gegenüber Glukokortikoiden (Abb. 8A).

Auch periphere eGFP-positive T- und B-Zellen aus der Milz der rekonstituierten Bim knockdown Maus zeigten keine Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose ex vivo im Vergleich zu den eGFP-negativen Zellen. (Abb. 8B)

Daraus lässt sich schließen, dass ein Bim knockdown im hämatopoetischen System Thymozyten sowie die peripheren T- und B-Zellen nicht vor GC-induzierter Apoptose ex vivo schützt.

3.3 Die Rolle von Ceramid in GC-induzierter Apoptose

Ceramid entsteht durch viele verschiedene Stimuli, welche zur Apoptose führen (31); (58). Glukokortikoide sind hier keine Ausnahme, da eine Behandlung von Thymozyten mit Dexamethason zu einer Zunahme des endogenen Ceramid Levels führt (32). Ceramid kann auf zwei verschiedenen Wegen gebildet werden: zum einen durch Hydrolyse von Sphingomyelin (katalysiert durch saure (a), oder neutrale (n) Sphingomyelinase (SMase)), zum anderen durch de novo Biosynthese (28) (Abb. 11).

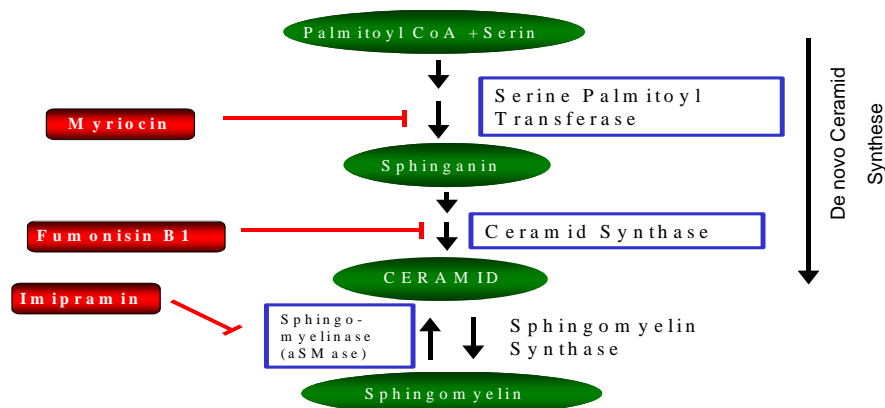


Abbildung 11: Wege der Sphingolipid-Biosynthese nach Solomon, JC (2)

3.3.1 Einfluss von Inhibitoren der Ceramidsynthese auf GC-induzierte Apoptose

Wenngleich Studien an Thymozyten zeigen, dass eine Inhibition von aSMase zu einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose führt, scheint die Inhibition der de novo Ceramid Synthese keinen Effekt auf diese Form der Apoptose zu haben (59).

3.3.1.1 Inhibitoren der Ceramid Biosynthese schützen nicht vor GC-induzierter Apoptose in vitro

Um die Rolle der aSMase im Rahmen der GC-induzierten Apoptose zu bestimmen, wurden WEHI7.15a Zellen mit den folgenden Inhibitoren behandelt (siehe auch Abb. 11): Imipramin, einem spezifischen Inhibitor der sauren Sphingomyelinase (aSMase) (38), und den Inhibitoren der de novo Ceramid Synthese Myriocin (inhibiert die Serin Palmitoyl Transferase (2)) und Fumonisin B1 (inhibiert die Ceramid Synthese (39) (40)). Hier zeigte sich, dass weder die Inhibitoren der de novo Ceramid-Synthese, noch die Inhibition der aSMase, (wie von Lépine et al. postuliert) im Gegensatz zum GR-Antagonist RU486 (41), (42), WEHI7.15a Zellen vor GC-induzierter Apoptose schützen konnten (Abb.12A).

Auch eine entsprechende Behandlung reifer peripherer T-Zellen aus der Milz mit oben genannten Inhibitoren der Ceramid-Synthese konnte diese nicht vor GC-induzierter Apoptose schützen (Abb.12B).

Anders als zuvor publizierte Daten zeigen meine eigenen Studien, dass eine Inhibition der aSMase keinen Schutz vor GC-induzierter Thymozyten-Apoptose bietet (59). Demnach führte die Behandlung von Thymozyten mit dem aSMase-Inhibitor Imipramin nicht zu einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose (Abb. 13).

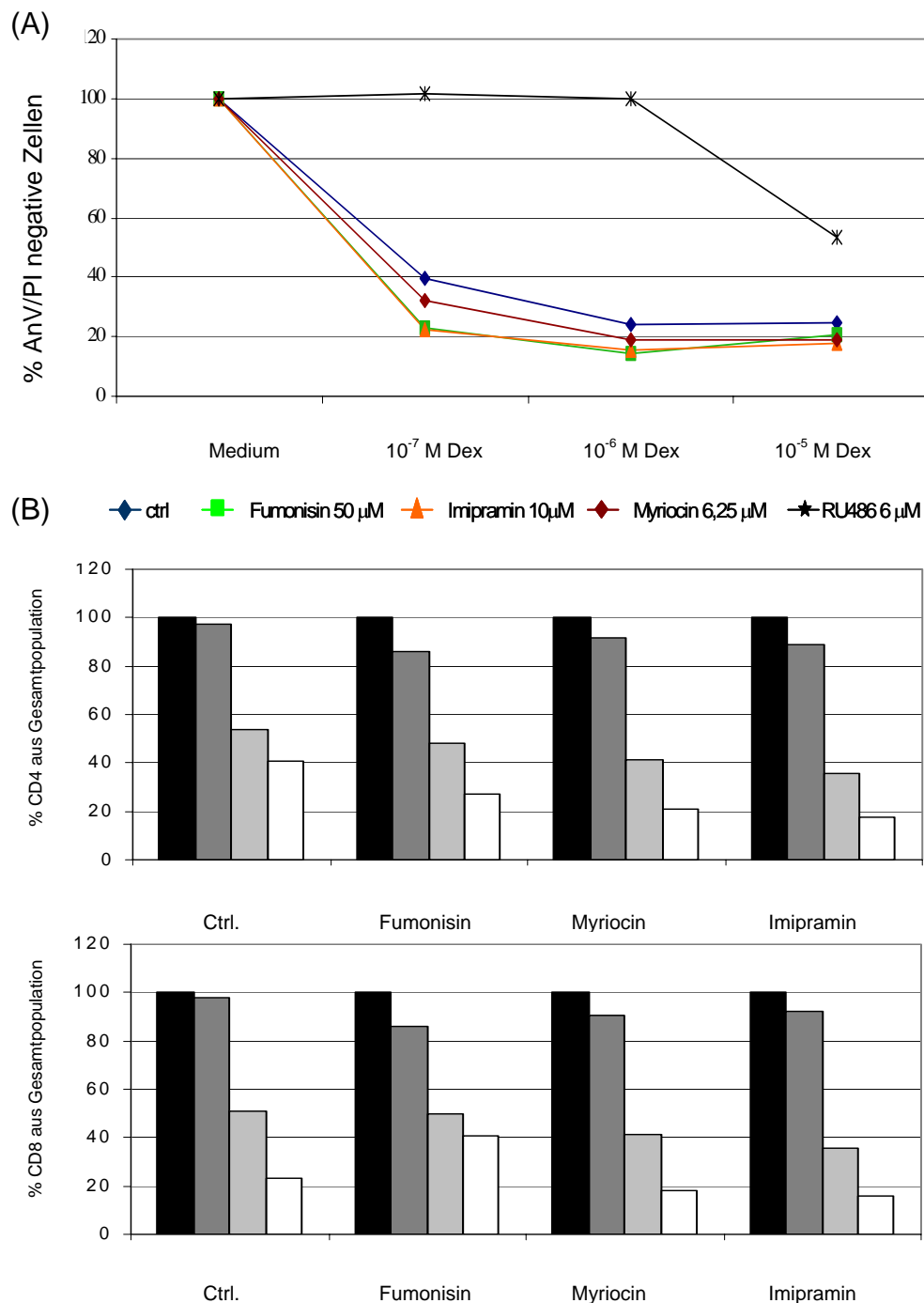


Abbildung 12: Inhibitoren der Ceramid Biosynthese schützen nicht vor GC-induzierter Apoptose in vitro. (A) WEHI7.15a-Zellen wurden mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1×10^{-5} M und 1×10^{-7} M in Abwesenheit (ctrl.) oder Anwesenheit von Imipramin (10 µM), Myriocin (6,25 µM), FumonisinB1 (50 µM) oder RU486 (6 µM) für 3 Tage inkubiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil der AnV/PI-negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach der FACS-Analyse. **(B)** Periphere T-Zellen wurden unmittelbar nach Isolation aus der Milz in Abwesenheit (ctrl.) oder Anwesenheit von Imipramin, Myriocin oder FumonisinB1 (in (A) genannten Konzentrationen) mit Dexamethason für 20 Stunden inkubiert und anschließend mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die ermittelten Mediumwerte wurden als 100% definiert.

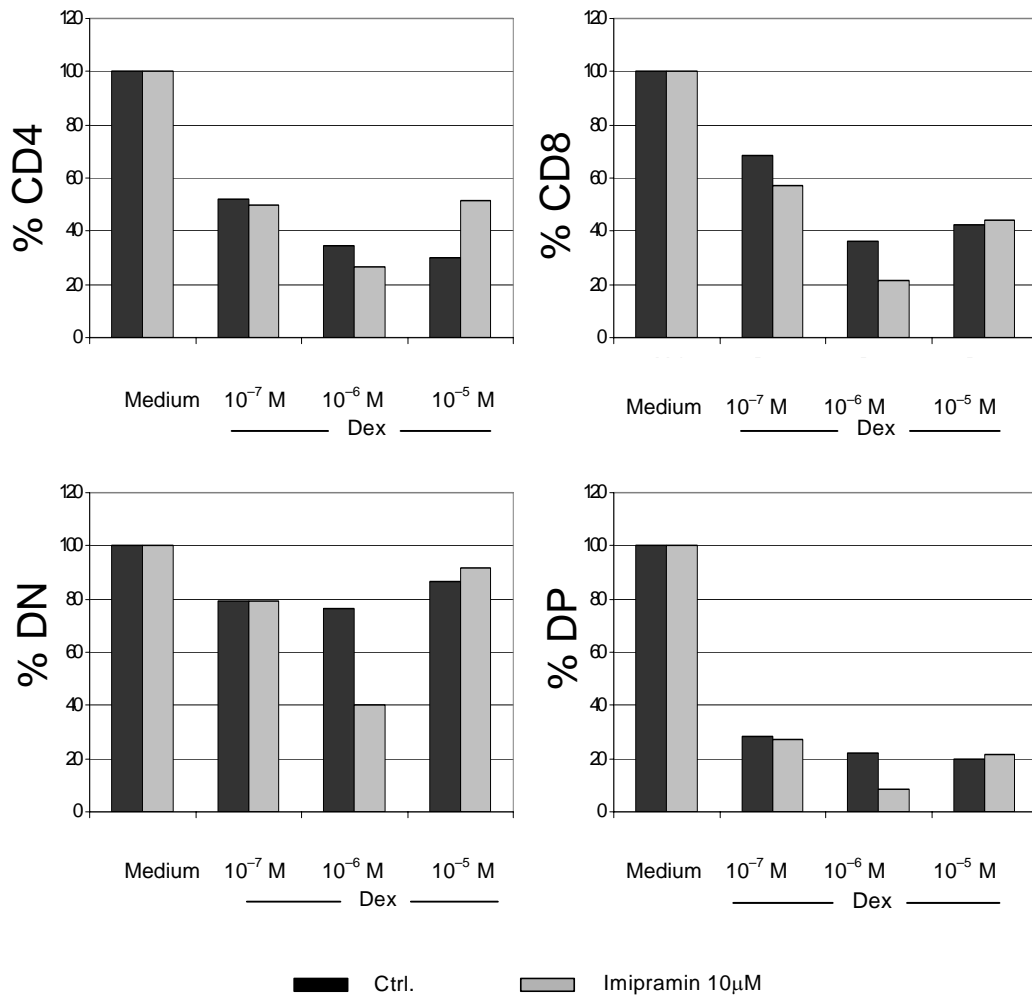


Abbildung 13: Imipramin schützt Thymozyten nicht vor GC-induzierter Apoptose in vitro. Thymozyten wurden unmittelbar nach Isolation aus dem Thymus in Abwesenheit (ctrl.) oder Anwesenheit von Imipramin 10 μM mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1x10⁻⁵ M und 1x10⁻⁷ M für 20 Stunden inkubiert und anschließend mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die ermittelten Mediumwerte wurden als 100% definiert.

3.3.1.2 Imipramin schützt nicht vor GC-induzierter Apoptose in vivo

Um weiterhin die Beteiligung der aSMase an der GC-induzierten Apoptose zu erforschen, wurde versucht, die aSMase in vivo zu inhibieren. Den Versuchstieren wurde hierzu zunächst Imipramin (400 μg) und 24 Stunden später Dexamethason (200 μg) intraperitoneal injiziert. Dabei belegten die FACS-Analysen, dass Imipramin keinen signifikanten Überlebensvorteil für

Ergebnisse

die Gesamtpopulation der Thymozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe bietet (Abb. 14A). Lediglich die weitere Aufgliederung der Thymozyten-subpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 könnte Hinweis darauf geben, dass Imipramin CD4-SP Thymozyten, sowie CD4⁺CD8⁺ Thymozyten vor GC-induzierter Apoptose zu schützen vermag (Abb. 14B). Anzumerken sei hierbei jedoch, dass statistische Analysen mittels Student's T-Test keine signifikanten Unterschiede ergaben. Auch die Verteilung der CD4- und CD8-definierten Populationen des Thymus unterschied sich nicht zwischen den verschiedenen Behandlungen (Abb. 14C).

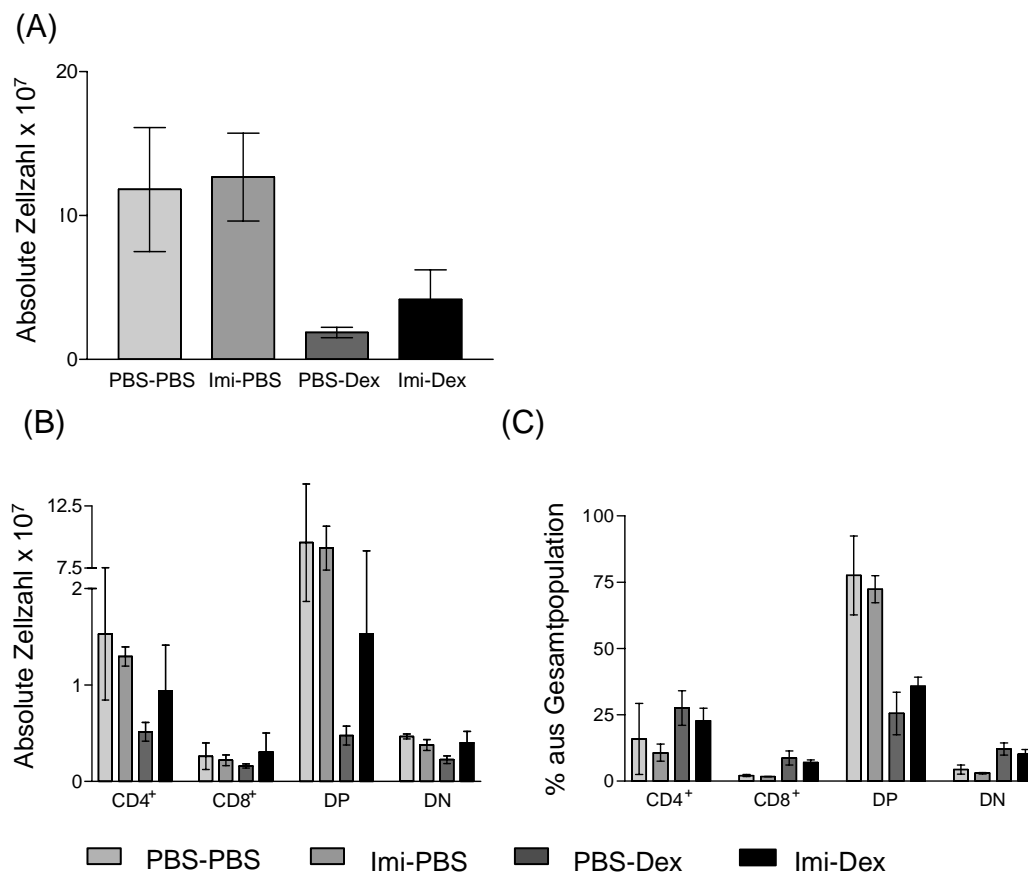


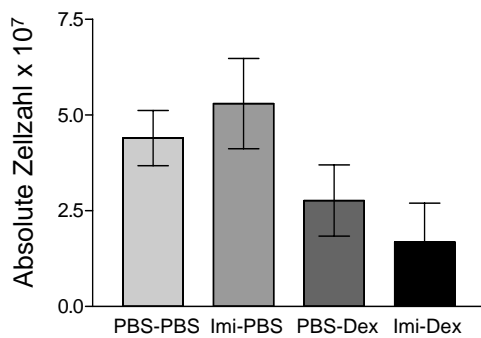
Abbildung 14: Die in vivo Applikation von Imipramin schützt Thymozyten nicht vor GC-induzierter Apoptose. 7 Wochen alte BL6 Mäuse erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 400µg Imipramin oder PBS zur Kontrolle. 24 Stunden nach Injektion erfolgte die Injektion von 200µg Dexamethason i.p. bzw. PBS als Kontrolle. Die Organentnahme und Analyse erfolgte 24 Stunden später. **(A)** zeigt die graphische Auswertung der FACS-Analysen. Dargestellt ist repräsentativ für jede Gruppe die gesamte Population lebender Thymozyten. **(B)** zeigt die weitere Untergliederung der Thymozyten anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8. **(C)** zeigt die prozentuale Verteilung der lebenden Thymozyten-subpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD von drei Tieren.

Ergebnisse

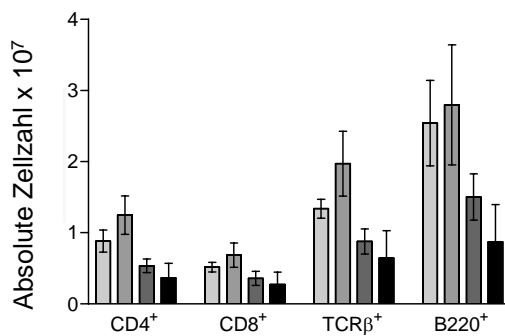
Eine Untersuchung der Milzzellen lieferte die gleichen Ergebnisse: Die Inhibition der aSMase mit Imipramin bietet weder einen Überlebensvorteil für die Gesamtpopulation der Milz (Abb. 15A), noch für eine der Subpopulationen (Abb. 15B). Auch die Verteilung der CD4-, CD8-, TCR β - und B220-definierten Populationen der Milz unterschied sich nicht zwischen den verschiedenen Behandlungen (Abb. 15C).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass weder die Inhibition der de novo Ceramid-Synthese, noch eine Inhibition der sauren Sphingomyelinase zu einem Überlebensvorteil gegenüber GC-induzierter Apoptose führte.

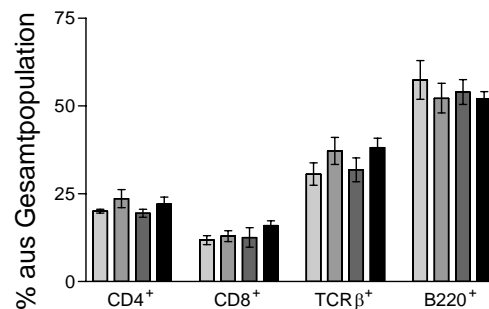
(A)



(B)



(C)



Legend: PBS-PBS (light gray), Imi-PBS (medium gray), PBS-Dex (dark gray), Imi-Dex (black)

Abbildung 15: Die in vivo Applikation von Imipramin schützt Milzzellen nicht vor GC-induzierter Apoptose. 7 Wochen alte B16 Mäuse erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 400 μ g Imipramin oder PBS zur Kontrolle. 24 Stunden nach Injektion erfolgte die Injektion von 200 μ g Dexamethason i.p. bzw. PBS als Kontrolle. Die Organentnahme und Analyse erfolgte 24 Stunden später. **(A)** zeigt die graphische Auswertung der FACS-Analysen. Dargestellt ist repräsentativ für jede Gruppe die gesamte Population lebender Milzzellen. **(B)** zeigt die weitere Untergliederung der Milzzellen anhand der Oberflächenmarker CD4, CD8, TCR β und B220. **(C)** zeigt die prozentuale Verteilung der lebenden Milzzellen anhand der Oberflächenmarker CD4, CD8, TCR β und B220. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD von drei Tieren.

3.3.2 aSMase knockout schützt nicht vor GC-induzierter Apoptose

Da eine in vivo Inhibition der aSMase durch Imipramin nicht zum Schutz vor GC-induzierter Apoptose führte, war der nächste Ansatzpunkt die Untersuchung, ob ein aSMase knockout zu einer Resistenz gegenüber Glukokortikoiden führt. Demnach wurden aSMase knockout Mäuse, durch i.p. Injektion mit Dexamethason (200 μ g) behandelt. 24 Stunden später wurden Thymozyten und Milzzellen auf ihr Überleben untersucht. FACS- Analysen konnten zeigen, dass ein aSMase knockout keinen Überlebensvorteil für die Gesamtpopulation der Thymozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe bietet (Abb. 16A).

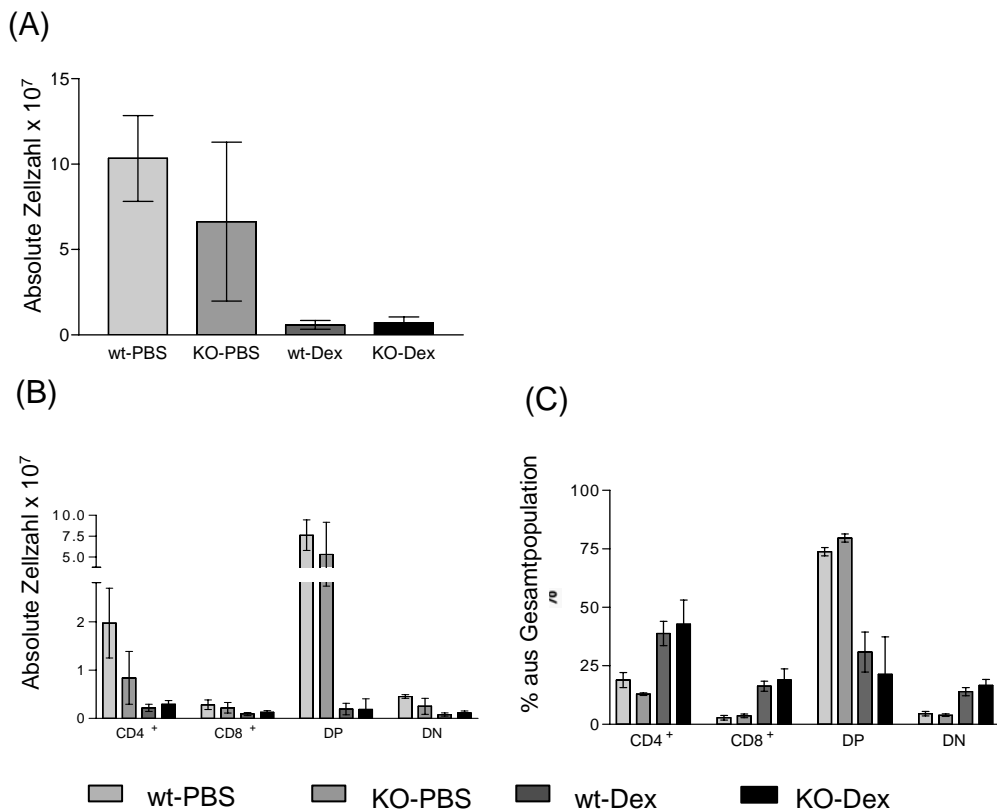


Abbildung 16: aSMase knockout schützt Thymozyten nicht vor GC-induzierter Apoptose. 7 Wochen alte B16 aSMase knockout (KO) oder wt Mäuse erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 200 μ g Dexamethason oder PBS zur Kontrolle. 24 Stunden nach Injektion erfolgte die Organentnahme und Analyse. **(A)** zeigt die graphische Auswertung der FACS-Analysen. Dargestellt ist repräsentativ für jede Gruppe die gesamte Population lebender Thymozyten. **(B)** zeigt die weitere Untergliederung der Thymozyten anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8. **(C)** zeigt die prozentuale Verteilung der lebenden Thymozytensubpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD von drei Tieren.

Ergebnisse

Selbst die weitere Aufgliederung der Thymozytensubpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 zeigte, dass der aSMase knockout Thymozyten nicht vor GC-induzierter Apoptose schützen konnte (Abb. 16B). Auch die Verteilung der CD4- und CD8-definierten Populationen des Thymus differierte nicht zwischen aSMase knockout und Kontroll-Tieren nach entsprechenden Behandlungen (Abb. 16C).

Die Untersuchung der Milzzellen lieferte ebenfalls die gleichen Ergebnisse: der knockout führte weder zu einem Überlebensvorteil für die Gesamtpopulation der Milz (Abb. 17A), noch für eine der Subpopulationen (Abb. 17B). So unterschied sich auch die Verteilung der CD4-, CD8-, TCR β - und B220-definierten Populationen der Milz nicht zwischen aSMase knockout und Kontroll-Tieren (Abb. 17C).

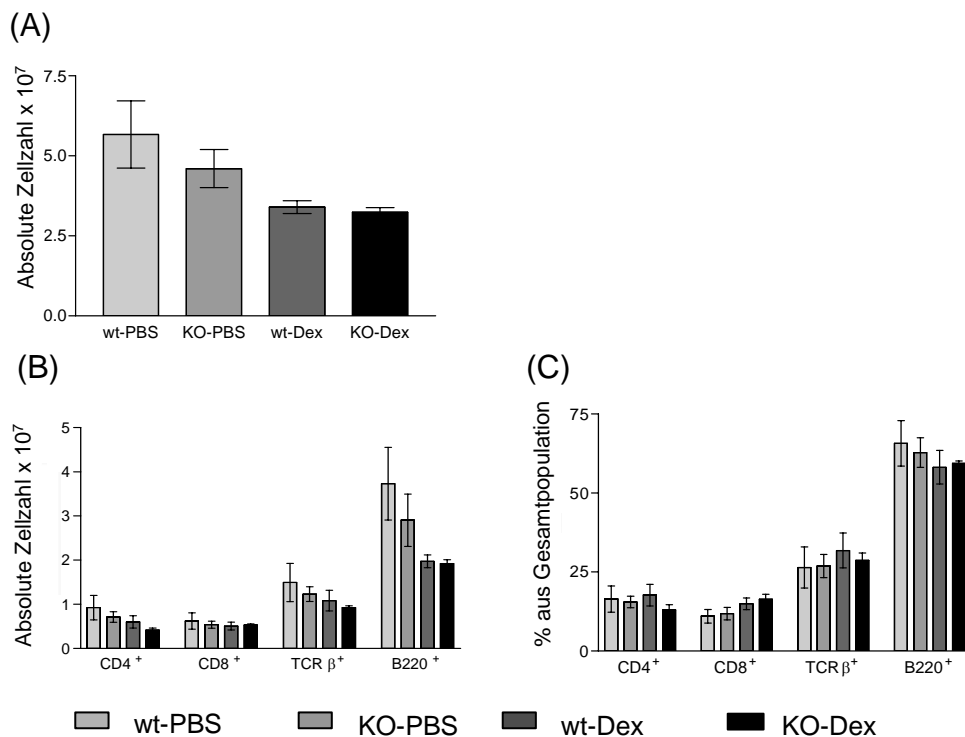


Abbildung 17: aSMase knockout schützt Milzzellen nicht vor GC-induzierter Apoptose. 7 Wochen alte Bl6 aSMase KO oder wt Mäuse erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 200 μ g Dexamethason oder PBS zur Kontrolle. 24 Stunden nach Injektion erfolgte die Organentnahme und Analyse. **(A)** zeigt die graphische Auswertung der FACS-Analysen. Dargestellt ist repräsentativ für jede Gruppe die gesamte Population lebender Milzzellen. **(B)** zeigt die weitere Untergliederung der Milzzellen anhand der Oberflächenmarker CD4, CD8, TCR β und B220. **(C)** zeigt die prozentuale Verteilung der lebenden Milzzellen anhand der Oberflächenmarker CD4, CD8, TCR β und B220. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD von drei Tieren.

3.3.3 aSMase knockdown schützt WEHI7.15a nicht vor GC-induzierter Apoptose

Eine weitere Möglichkeit, die Rolle der aSMase in GC-induzierter Apoptose zu studieren, bietet ein aSMase knockdown. Demnach wurden WEHI7.15a-Zellen mit rekombinanten Retroviren transduziert, welche für eine shaSMase (LMP-shaSM1, LMP-shaSM2) oder Kontrolle (LMP, LMP-shGRII) kodierten. Eine Proteinanalyse war nicht möglich, da kein geeigneter Antikörper gegen die saure Sphingomyelinase existiert. Lediglich Analysen mittels Realtime PCR zeigen, dass die Menge an aSMase-mRNA durch den knockdown in dem Zellklon reduziert ist (unveröffentlicht, Reichardt, HM und Herold, MJ).

Die Behandlung der transduzierten WEHI7.15a-Zellen mit Dexamethason zeigte einen leichten schützenden Effekt bei den aSMase knockdown Populationen gegenüber den Kontrollen. Allerdings sei hierbei anzumerken, dass die Werte hier sehr streuen und demnach große Standardabweichungen vorliegen (Abb. 18).

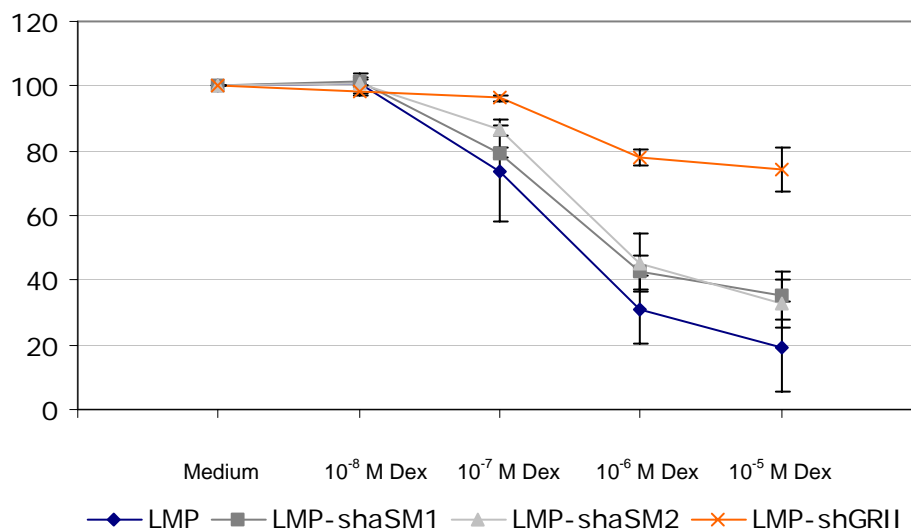


Abbildung 18: aSMase knockdown schützt nicht vor GC-induzierter Apoptose. WEHI7.15a-Zellen wurden retroviral transduziert mit einer Kontrolle (LMP, LMP-shGRII) oder knockdown Konstrukten für aSMase (LMP-shaSM1, LMP-shaSM2) und mit Dexamethason in Konzentrationen zwischen 1×10^{-5} M und 1×10^{-8} M für 3 Tage inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV/PI-negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach FACS-Analyse. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD je drei retroviral transduzierter Zellklone.

Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich daher schlussfolgern, dass sowohl eine Inhibition des Enzyms saure Sphingomyelinase (sowohl in vitro, als auch in vivo), als auch das völlige Fehlen dieses Enzyms (aSMase knockout) keinen Einfluss auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose nehmen. Lediglich ein knockdown in dem glukokortikoid-sensitiven Zellklon WEHI7.15a gab einen gewissen Hinweis darauf, dass die saure Sphingomyelinase bei der GC-induzierten Apoptose eine Rolle spielt.

4 Diskussion

Wenngleich die Rolle des Glukokortikoidrezeptors bei der GC-induzierten Apoptose unumstritten ist, ist der genaue molekulare Mechanismus dieser Form der Apoptose noch nicht verstanden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum einen, dass sich Thymozyten durch einen GR knockdown spezifisch vor GC-induzierter Apoptose schützen lassen (Abb. 8) und zum anderen, dass diese Form der Apoptose bei der Heranreifung der Thymozyten eine entscheidende Rolle spielt (Abb. 7).

Auch zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Bim ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Thymozyten zu spielen scheint (Abb. 7 und (60)). Eine tragende Rolle bei der GC-induzierten Apoptose ist jedoch nur im Zusammenspiel mit Puma zu sehen. Der alleinige knockdown von Bim kann Thymozyten nur teilweise vor GC-induzierter Apoptose schützen (siehe Abb. 8 und (14)).

Im Gegensatz zu den Studien von Lépine et al., deuten sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die saure Sphingomyelinase keinen Einfluss auf die GC-induzierte Apoptose zu nehmen scheint (Abbs. 13-17). Hier gibt lediglich der aSMase knockdown im WEHI7.15a-Zellklon einen gewissen Hinweis darauf, dass die saure Sphingomyelinase bei der GC-induzierten Apoptose eine Rolle spielen könnte (Abb. 18).

4.1 Die Effizienz von „small interfering RNAs“ differiert je nach Zellklon

„Small interfering RNAs“ sind ein hervorragendes Instrument, um die Genexpression in Zellen zu beeinflussen. Bereits kurz nach der Entdeckung der Möglichkeit, mithilfe dieser siRNA Duplexe einen spezifischen Gen knockdown in Zellen durchzuführen, ging man davon aus, dass man mit nahezu jeder „Target-komplementären“ siRNA einen effektiven und spezi-

fischen Gen knockdown des verwandten Target Genes erreichen kann (61). In der Praxis sieht dies jedoch ganz anders aus, denn nur ein Teil dieser „Target-komplementären“ siRNAs ist hocheffizient. So können siRNAs auch unspezifisch Gene beeinflussen, welche nur teilweise sequenzhomolog sind.

Analysen gut funktionierender siRNAs zeigen, dass deren Effizienz abhängig vom Anteil an Guanin und Cytosin ist. Während ein zu geringer Anteil an Guanin und Cytosin zu einer Destabilisierung des siRNA-Duplexes führt, und somit die Affinität zur Target mRNA reduziert, behindert ein zu hoher Anteil der beiden Basen den Eintritt in den RISC (62). Des Weiteren zeigen sich ebenfalls Präferenzen des Führungsstranges für bestimmte Basen an den Positionen 3, 10, 13, und 19.

Auch könnte es sein, dass schlichtweg die Sekundärstruktur der Target mRNA, welche auch die Sekundärstruktur des Führungsstranges der siRNA widerspiegelt, dessen Bindung beeinflusst (63).

Weiterhin ist die Regulation der Aktivität von siRNAs komplex und noch nicht hinreichend verstanden. Aufgrund von Palindromen oder „internal repeats“ innerhalb der siRNA-Sequenz kann es zur Ausbildung eines „Hairpin“ kommen, welcher mit der Duplex-Form im Gleichgewicht steht und somit die effektive Konzentration und demnach das „silencing Potential“ der siRNA reduzieren kann (62).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen gleichzeitig auch, dass es abhängig vom Zelltyp ist, in welcher ein Gen knockdown angestrebt wird. Obwohl das in der Arbeit verwendete Vektorplasmid (LMP) (1), als auch die verwendeten shRNAs (shGRI, shGRII, shBim1, shBim2, shaSM1, shaSM2) stets die gleichen waren, gelang ein Gen knockdown in WEHI231 Zellen stets besser als im WEHI7.15a Zellklon (Abbs. 4, 9). Da selbst eine Variation des Virustiters oder eine mehrmalige Infektion bereits transduzierter Zellen, stets die gleichen Ergebnisse lieferte (Daten nicht gezeigt), deutet dies darauf hin, dass im Vergleich zu den WEHI231 Zellen der shRNA-Pathway bei den WEHI7.15a Zellen gestört, beziehungsweise verlang-

samt sein muss oder aber weniger Integrationen der shRNA codierenden Retroviren im Genom der WEHI7.15a Zellen durch eine Transfektion erreicht werden können.

4.2 GR knockdown führt womöglich zu einer stärkeren Expression von Bim

Es ist bekannt, dass Glukokortikoide die Transkription der BH3-only Gene Bim und Puma induzieren (15) (16) (17) (18) (19). Diese führen dann entweder durch Inhibition anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine (64) (65), (66), oder aber durch Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak zur Apoptose (67) (68) (69) (70). Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Proteinanalyse shGR-transduzierter WEHI231 Zellen zeigte jedoch auch, dass der GR knockdown mit dem LMP-shGR11-Vektorkonstrukt in WEHI231 zu einer stärkeren Expression von Bim führte (Abb. 9A). Dies belegt, dass der Glukokortikoidrezeptor selbst zu einer Unterdrückung von anti-apoptotischen Bcl-2 Mitgliedern führen könnte (71). Durch den GR knockdown in den WEHI231 Zellen kommt es folglich zu einem relativen Übergewicht von anti-apoptotischen Bcl-2 Mitgliedern. Bedingt durch den GR knockdown könnte es dementsprechend aufgrund des „Übergewichtes“ an anti-apoptotischen Faktoren zu einer stärkeren Expression des pro-apoptotischen BH3-only Proteins Bim im „steady state Level“ kommen.

4.3 Der Glukokortikoidrezeptor könnte bei der BZR-induzierten Apoptose eine Rolle spielen

Durch die Ligation des B-Zellrezeptors kommt es infolge einer starken Expression des pro-apoptotischen BH3-only Proteins Bim zur Apoptose (57). Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass nicht nur ein Bim knockdown (LMP-shBim1, LMP-shBim2) WEHI231-Zellen vor BZR-induzierter Apoptose schützt, sondern überraschenderweise auch ein GR knockdown (LMP-shGR) eine gewisse Tendenz zeigte, WEHI231 vor dieser Form der Apoptose zu schützen (Abb. 10A). Die Tatsache, dass ein Bim knockout

kultivierte B-Zellen weniger effektiv vor BZR-induzierter Apoptose schützt, als die Überexpression von Bcl-2, lässt darauf schließen, dass andere BH3-only Proteine zusätzlich zu Bim bei dieser Form der Apoptose eine Rolle spielen (56). Dass nun auch ein GR knockdown B-Zellen vor dieser Art der Apoptose schützt (Abb. 10A), legt nahe, dass durch den Glukokortikoidrezeptor vermutlich pro-apoptische Faktoren hochreguliert werden (71), welche auch am Weg der B-Zellrezeptor induzierten Apoptose eine Rolle spielen.

Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch eine B-Zellrezeptor-Stimulation bei den Bim knockdown Zellen eine andere Form des Zelltodes vonstatten geht (Abb. 10B). Annexin V, welches spezifisch an Phosphatidylserin bindet, wenn dieses in apoptotischen Zellen externalisiert wird, markiert den Verlust der Lipid-Asymmetrie und ist somit ein spezifischer Marker für Apoptose (72). Die Bim knockdown Zellen durchliefen nach der B-Zellrezeptor Stimulation nicht wie es typisch für apoptotische Zellen ist, zunächst das Stadium der AnnexinV-Positiven, bevor sie auch PI positiv wurden, sondern sie zeigten das Bild des nekrotischen Zelltodes, indem sie sofort AnnexinV- und zugleich PI-positiv wurden, was eher auf ein Platzen der Zelle hinweist.

4.4 Bim knockdown vs. Bim knockout: Thymozytenentwicklung und GC-induzierte Apoptose

Die Studien dieser Arbeit hinsichtlich eines Bim knockdown im hämatopoetischen System lassen darauf schließen, dass dieser Thymozyten sowie periphere T- und B-Zellen nicht vor GC-induzierter Apoptose ex vivo schützt (Abb. 8). Dies steht im Einklang mit den Studien von Erlacher et al. im Hinblick auf die Sensitivität eines Bim knockout gegenüber Glukokortikoiden. Selbst die gegenüber Glukokortikoiden besonders sensitiven unreifen DP Thymozyten (54), (55) werden durch einen Bim knockout nur teilweise vor GC-induzierter Apoptose geschützt (14).

Im Gegensatz hierzu scheint Bim eine entscheidende Rolle bei der Negativen Selektion (siehe 1.1.2) zu spielen. Bouillet et al. beschreibt, dass Bim knockout Thymozyten resistent gegenüber Apoptose sind, welche durch eine TZR-CD3 Stimulation induziert wird (60), einem gängigen Model zur Untersuchung der Negativen Selektion (54), (55).

Entsprechend zeigten die Studien der vorliegenden Arbeit hinsichtlich eines Bim knockdowns im hämatopoetischen System, dass sich durch den Bim knockdown die Thymozytensubpopulation zu Gunsten der CD4-SP und CD8-SP Zellen verschoben hat (Abb. 7). Die Beobachtung, dass Bim knockout Mäuse ebenfalls eine Anreicherung einzelpositiver Thymozyten aufweisen deutet darauf hin, dass das Fehlen des proapoptotischen Proteins Bim tatsächlich zu einer verminderten negativen Selektion und damit einer gestörten Deletion autoreaktiver Zellen führen könnte.

Im Gegensatz zum Bim knockout bietet das vorliegende System den Vorteil, dass das BH3-only Protein wirklich nur im hämatopoetischen System reduziert ist, und so beispielsweise nicht in den Thymusepithelien vorkommt (wie beim Bim knockout), was ebenso Einfluss auf die Thymozytenentwicklung nehmen könnte.

Dieses System ließe sich auch auf weitere Mitglieder der Bcl-2 Familie übertragen, welche Bim entweder inhibieren (antiapoptotische Bcl-2 Proteine) (64) (65), (66) oder aktivieren können (Bax und Bak) (67) (68) (69) (70).

Somit lässt sich festhalten, dass dieses System eine hervorragende Methode bietet, die Thymozytenentwicklung noch genauer in vivo zu erforschen.

4.5 Die Rolle der aSMase bei der GR-induzierten Apoptose

Das Sphingosinderivat Ceramid ist Bestandteil unserer Zellmembranen. Es kann auf zwei verschiedene Wege gebildet werden: zum einen durch

Hydrolyse von Sphingomyelin (katalysiert durch saure (a), oder neutrale (n) Sphingomyelinase (SMase)), zum anderen durch de novo Biosynthese (28). Es wird angenommen, dass Ceramid unter anderem über Bax und Bak die äußere Mitochondrienmembran schädigt und damit zur Aktivierung von Caspasen führt (31). Verschiedene apoptotische Stimuli, wie z.B. Glukokortikoide, führen so über eine Erhöhung des endogenen Ceramid-Levels zur Apoptose. Studien an Thymozyten zeigen, dass von den beiden Möglichkeiten der Ceramidsynthese: de novo beziehungsweise durch Hydrolyse von Sphingomyelin (28), lediglich die Inhibition der aSMase zu einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose führt, während die Inhibition der de novo Ceramid Synthese keinen Effekt auf diese Form der Apoptose zu haben scheint (59).

Dennoch ist die Rolle von Ceramid, welches über die Hydrolyse von Sphingomyelin entsteht, bei der Apoptose im allgemeinen sehr umstritten (58). Tepper et al. vertritt zum Beispiel die Hypothese, dass die Hydrolyse von Sphingomyelin nicht darüber entscheidet ob, sondern viel mehr wie eine Zelle stirbt. Außerdem ist laut Tepper et al. eher der Verlust von Sphingomyelin, und nicht die Bildung von Ceramid dafür verantwortlich (73).

Dementsprechend zeigen auch die Studien der vorliegenden Arbeit an Thymozyten gegensätzliche Ergebnisse zu den Studien von Lépine et al.. Demnach führte die Behandlung von Thymozyten mit dem aSMase-Inhibitor Imipramin nicht zu einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose sowohl durch eine in vitro als auch in vivo Inhibition (Abbs. 12-14). Dies legt nun nahe, dass entweder der Inhibitor in den Modellversuchen nicht funktionell ist, oder aber, dass die Rolle der aSMase, wenn überhaupt, sehr gering bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose ist, entsprechend den Hypothesen von Tepper et al. (73). Hierfür spräche auch, dass ein aSMase knockout keinen Überlebensvorteil für Thymozyten in Bezug auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose bietet. Der aSMase knockout zeigte diesbezüglich weder einen Einfluss auf die Verteilung

der einzelnen Thymozytensubpopulationen, noch auf deren Überlebensraten (Abb. 16).

Anzustreben wäre dahin weitergehend die Kreierung effektiverer shRNAs für einen aSMase knockdown, welche Studien der Rolle der aSMase im Hinblick auf die Hämatopoese in vivo ermöglichen würden. Auch würden enzymatische Bestimmungen der Aktivität der aSMase einen besseren Einblick über deren Funktion bieten, besonders im Hinblick auf die Studien mit den Inhibitoren.

5 Zusammenfassung

Glukokortikoide induzieren Apoptose in vielen verschiedenen Zelltypen. Wenngleich die Glukokortikoid-induzierte Apoptose eine der zuerst entdeckten Formen des Programmierten Zelltodes war, ist sie dennoch kaum verstanden und daher heute noch Teil vieler Forschungen.

Eine Bcl-2 Überexpression resultiert in einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose in einer Reihe von Zellen wie einigen Lymphomzelllinien, aber auch normalen Thymozyten, sowie reifen T- und B-Zellen. Glukokortikoide können die Transkription der BH3-only Gene Bim (BCL-2-interacting mediator of cell death) und Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), einer proapoptotischen Untergruppe der Bcl-2 Familie, induzieren. Dies legt nahe, dass Bim und Puma am Weg der GC-induzierten Apoptose beteiligt sind.

Ceramid ist in der Lage über die Aktivierung der proapoptotischen Bcl-2 Mitglieder Bax und Bak die äußere Mitochondrienmembran zu schädigen und damit zur Aktivierung von Caspasen zu führen. Verschiedene apoptotische Stimuli, wie z.B. Glukokortikoide, führen so über eine Erhöhung des endogenen Ceramid Levels zur Apoptose. Ceramid kann auf zwei verschiedenen Wegen gebildet werden: zum einen durch Hydrolyse von Sphingomyelin (katalysiert durch saure (a), oder neutrale (n) Sphingomyelinase (SMase)), zum anderen durch de novo Biosynthese.

Studien an Thymozyten zeigen, dass von den beiden Möglichkeiten der Ceramidsynthese, lediglich die Inhibition der aSMase zu einer Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose führt.

Um nun die Rolle von Bim und der aSMase bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde die murine T-Zelllymphomlinie WEHI7.15a zu Hilfe genommen.

Während die Überexpression retroviral eingebrachter shRNAs gegen Bim und aSMase keine Wirkung auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose zeigten, führte der knockdown des Glukokortikoid-Rezeptors selbst zu ei-

ner Resistenz gegenüber Dexamethason. Auch der pharmakologische Inhibitor der Sphingomyelin-Hydrolyse, Imipramin, zeigte sowohl in vitro, als auch in vivo keine Wirkung auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose. Darüber hinaus waren sowohl Thymozyten, als auch periphere T-Zellen von aSMase knockout Mäusen genauso sensitiv auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose wie Wildtyp-Zellen. Die in vitro knockdown Ergebnisse von Bim und vom Glukokortikoid-Rezeptor selbst, konnten weiterhin ex vivo, durch das Einbringen der shRNAs in hämatopoetische Stammzellen, welche zur Rekonstitution bestrahlter Mäuse genutzt wurden, bestätigt werden. Während der Bim knockdown keinerlei Einfluss auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose ex vivo zeigte, konnte die verminderte Expression des Glukokortikoid-Rezeptors den Zelltod verhindern. Im Gegensatz hierzu zeigten sowohl der GR knockdown, als auch der Bim knockdown im hämatopoetischen System einen Einfluss auf die Thymozytenentwicklung in vivo.

6 Literaturverzeichnis

1. Dickins, R. A., Hemann, M. T., Zilfou, J. T., Simpson, D. R., Ibarra, I., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2005) *Nat Genet* **37**, 1289-1295
2. Solomon, J. C., Sharma, K., Wei, L. X., Fujita, T., and Shi, Y. F. (2003) *Cell Death Differ* **10**, 193-202
3. Abbas, A. K. (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (Saunders, E., Ed.)
4. Platt, N., da Silva, R. P., and Gordon, S. (1998) *Trends Cell Biol* **8**, 365-372
5. Hengartner, M. O. (2000) *Nature* **407**, 770-776
6. Kidd, V. J., Lahti, J. M., and Teitz, T. (2000) *Semin Cell Dev Biol* **11**, 191-201
7. Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998) *Science* **281**, 1312-1316
8. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998) *Embo J* **17**, 1675-1687
9. Gross, A. (2001) *IUBMB Life* **52**, 231-236
10. Strasser, A. (2005) *Nat Rev Immunol* **5**, 189-200
11. Opferman, J. T., and Korsmeyer, S. J. (2003) *Nat Immunol* **4**, 410-415
12. Green, D. R., and Kroemer, G. (2004) *Science* **305**, 626-629
13. Crompton, M. (1999) *Biochem J* **341 (Pt 2)**, 233-249
14. Erlacher, M., Michalak, E. M., Kelly, P. N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J. M., Strasser, A., and Villunger, A. (2005) *Blood* **106**, 4131-4138
15. Han, J., Flemington, C., Houghton, A. B., Gu, Z., Zambetti, G. P., Lutz, R. J., Zhu, L., and Chittenden, T. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11318-11323

16. Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S., and Kofler, R. (2004) *Cell Death Differ* **11 Suppl 1**, S45-55
17. Wang, Z., Malone, M. H., He, H., McColl, K. S., and Distelhorst, C. W. (2003) *J Biol Chem* **278**, 23861-23867
18. Distelhorst, C. W. (2002) *Cell Death Differ* **9**, 6-19
19. Tonko, M., Ausserlechner, M. J., Bernhard, D., Helmberg, A., and Kofler, R. (2001) *Faseb J* **15**, 693-699
20. Horn, F. e. a. (2002) *Biochemie des Menschen Thieme*, S.365 ff.
21. Tuckermann, J. P., Kleiman, A., McPherson, K. G., and Reichardt, H. M. (2005) *Crit Rev Clin Lab Sci* **42**, 71-104
22. Reichardt, H. M., Kaestner, K. H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wesely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., and Schutz, G. (1998) *Cell* **93**, 531-541
23. Brewer, J. A., Kanagawa, O., Sleckman, B. P., and Muglia, L. J. (2002) *J Immunol* **169**, 1837-1843
24. Reichardt, H. M. (2004) *Curr Pharm Des* **10**, 2797-2805
25. Reichardt, H. M., Umland, T., Bauer, A., Kretz, O., and Schutz, G. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 9009-9017
26. Herold, M. J., McPherson, K. G., and Reichardt, H. M. (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**, 60-72
27. Screpanti, I., Morrone, S., Meco, D., Santoni, A., Gulino, A., Paolini, R., Crisanti, A., Mathieson, B. J., and Frati, L. (1989) *J Immunol* **142**, 3378-3383
28. Marchesini, N., Luberto, C., and Hannun, Y. A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 13775-13783
29. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1485**, 63-99
30. Ruvolo, P. P. (2003) *Pharmacol Res* **47**, 383-392
31. Kolesnick, R. N., and Kronke, M. (1998) *Annu Rev Physiol* **60**, 643-665

32. Cifone, M. G., Migliorati, G., Parroni, R., Marchetti, C., Millimaggi, D., Santoni, A., and Riccardi, C. (1999) *Blood* **93**, 2282-2296
33. Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., and Parker, R. (2006) *Genes Dev* **20**, 515-524
34. Moffat, J., and Sabatini, D. M. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 177-187
35. Pouw, N. M., Westerlaken, E. J., Willemsen, R. A., and Debets, R. (2007) *J Gene Med* **9**, 561-570
36. Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995) *Nucleic Acids Res* **23**, 628-633
37. Carey, G. B., Donjerkovic, D., Mueller, C. M., Liu, S., Hinshaw, J. A., Tonnetti, L., Davidson, W., and Scott, D. W. (2000) *Immunol Rev* **176**, 105-115
38. Grassme, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F., and Meyer, T. F. (1997) *Cell* **91**, 605-615
39. Gamen, S., Hanson, D. A., Kaspar, A., Naval, J., Krensky, A. M., and Anel, A. (1998) *J Immunol* **161**, 1758-1764
40. Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., and Merrill, A. H., Jr. (1991) *J Biol Chem* **266**, 14486-14490
41. Moguilewsky, M., and Philibert, D. (1984) *J Steroid Biochem* **20**, 271-276
42. Jung-Testas, I., and Baulieu, E. E. (1983) *Exp Cell Res* **147**, 177-182
43. Bauer, A., Tronche, F., Wessely, O., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Steinlein, P., Schutz, G., and Beug, H. (1999) *Genes Dev* **13**, 2996-3002
44. Cole, T. J., Blendy, J. A., Monaghan, A. P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., and Schutz, G. (1995) *Genes Dev* **9**, 1608-1621

45. Silva, J. M., Li, M. Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M. C., Rickles, R. J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P. J., Schlabach, M. R., Sheth, N., Bradshaw, J., Burchard, J., Kulkarni, A., Cavet, G., Sachidanandam, R., McCombie, W. R., Cleary, M. A., Elledge, S. J., and Hannon, G. J. (2005) *Nat Genet* **37**, 1281-1288
46. Stryer, L. (1996) *Biochemie. 4ed.* (Verlag, S. A., Ed.)
47. Karlsson, J. O., Ostwald, K., Kabjorn, C., and Andersson, M. (1994) *Anal Biochem* **219**, 144-146
48. Wyllie, A. H. (1980) *Nature* **284**, 555-556
49. Hande, K. R. (1998) *Eur J Cancer* **34**, 1514-1521
50. Purton, J. F., Zhan, Y., Liddicoat, D. R., Hardy, C. L., Lew, A. M., Cole, T. J., and Godfrey, D. I. (2002) *Eur J Immunol* **32**, 3546-3555
51. Purton, J. F., Boyd, R. L., Cole, T. J., and Godfrey, D. I. (2000) *Immunity* **13**, 179-186
52. Schütz, P. D. m. G. (2004) *DKFZ; Abteilung Molekularbiologie der Zelle I*
53. Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T., and Reichardt, H. M. (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**, 263-280
54. Strasser, A., Harris, A. W., and Cory, S. (1991) *Cell* **67**, 889-899
55. Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., Kanagawa, O., and Korsmeyer, S. J. (1991) *Cell* **67**, 879-888
56. Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. (2003) *J Exp Med* **198**, 1119-1126
57. Craxton, A., Draves, K. E., Gruppi, A., and Clark, E. A. (2005) *J Exp Med* **202**, 1363-1374
58. Green, D. R. (2000) *J Cell Biol* **150**, F5-7
59. Lepine, S., Lakatos, B., Courageot, M. P., Le Stunff, H., Sulpice, J. C., and Giraud, F. (2004) *J Immunol* **173**, 3783-3790

60. Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002) *Nature* **415**, 922-926
61. Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002) *Methods* **26**, 199-213
62. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2004) *Nat Biotechnol* **22**, 326-330
63. Pei, Y., and Tuschl, T. (2006) *Nat Methods* **3**, 670-676
64. Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2007) *Science* **315**, 856-859
65. Coultas, L., Huang, D. C., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002) *Cell Death Differ* **9**, 1163-1166
66. O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., and Huang, D. C. (1998) *Embo J* **17**, 384-395
67. Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., and Letai, A. (2006) *Cancer Cell* **9**, 351-365
68. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2005) *Mol Cell* **17**, 525-535
69. Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J. (2002) *Cancer Cell* **2**, 183-192
70. Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N. R. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 3577-3589
71. Lepine, S., Sulpice, J. C., and Giraud, F. (2005) *Crit Rev Immunol* **25**, 263-288
72. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995) *J Exp Med* **182**, 1545-1556

73. Tepper, A. D., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P. J., Borst, J., and van Blitterswijk, W. J. (2000) *J Cell Biol* **150**, 155-164

7 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
aSMase	saure Sphingomyelinase
Bim	BCL-2-interacting mediator of cell death
Bio	biotinyliert
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balancierte Salzlösung
BZR	B-Zellrezeptor
CD	cluster of differentiation
CY	Cychrom
CY5	Cychrom5
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelnegativer/ CD4 ⁻ CD8 ⁻ Thymozyt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Doppelpositiver/ CD4 ⁺ CD8 ⁺ Thymozyt
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	Fluoreszenz-aktiverter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinthioisocyanat
GC	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoidrezeptor
HSC	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal

Abkürzungsverzeichnis

IRES	internal ribosomal entry site
KD	Knockdown
KO	Knockout
LTR	long terminal repeat
LB	Lennox Trockenagar
M	molar
MCS	Multiple cloning site
MEM	Minimum Essential Medium
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MSCV	murine stem cell virus
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
PAGE	Polyagrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PI	Probidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	runs per minute
sAP	shrimp alkaline phosphatase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin

8 Anhang

Danksagung

Am Zustandekommen dieser Arbeit hatten folgende Personen nachhaltig Anteil, denen ich an dieser Stelle danken möchte:

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. Holger Reichardt für seine ausgezeichnete Betreuung, für die vielen Anregungen und konstruktive Diskussionen, sowie für seine ständige Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. Marco Herold für die praktisch experimentellen Anleitungen sowie die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, aber auch für viele nette Stunden außerhalb des Labors.

Herrn PD Dr. Olaf Utermöhlen danke ich für das Bereitstellen der aSMase knockout Mäuse.

Ausserdem möchte ich mich noch bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Institutes für Virologie und Immunbiologie bedanken, deren großzügig gegebene Ratschläge und Reagenzien wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da waren und mir die Möglichkeit gaben, diese Arbeit zu beenden.