

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete siRNA-Oligonukleotide

2.1.1 siRNA-1 („CD2BP2-1“), Qiagen

Target Sequence	ACG GTT GGC TAT GCG TCT GAA
Sense	r(GGU UGG CUA UGC GUC UGA A)dTdT
Antisense	r(UUC AGA CGC AUA GCC AAC C)dGdT

2.1.2 siRNA-2 (“CD2BP2-2“), Qiagen

Target Sequence	ACG CAT TGA CTT TGA CCT CTA
Sense	r(GCA UUG ACU UUG ACC UCU A)dTdT
Antisense	r(UAG AGG UCA AAG UCA AUG C)dGdT

2.1.3 siRNA-3 („CD2BP2-17376“), Ambion

Target Sequence	GGC AAA CAC TCT TTG GAT A
Sense	5`-GGC AAA CAC UCU UUG GAU Att-3`
Antisense	5`-UAU CCA AAG AGU GUU UGC C tt-3`

2.1.4 Negative Control siRNA, Qiagen:

Target Sequence	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT
Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U dT dT
Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA A dT dT

2.1.5 Vorbereitung der siRNA Proben

Die von der Firma Qiagen in lyophilisierter Form gelieferten siRNA-Oligonukleotide wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers in „siRNA Suspension Buffer“ zu einer Lösung der Konzentration 20 μM gelöst, für eine Minute auf 90°C erhitzt, anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und dann bei -20 °C gelagert.

Die von der Firma Ambion in lyophilisierter Form gelieferten siRNA-Oligonukleotide wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers in nuklease-freiem Wasser zu einer Lösung der Konzentration 20 μM gelöst und dann bei -20 °C gelagert.

2.2 Knockdown in Jurkat –T-Zellen

2.2.1 Kulturbedingungen für die Kultur der Jurkat-T-Zellen

Die Jurkat-T-Zellen wurden in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 mit einer Zugabe von 100 U/ml Penicillin und Streptomycin, 0,3 mg/ml Glutamin und 10 % fetalem Rinderserum in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5,5 % CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert.

Gemäß den Empfehlungen der Firma Amaxa zur Vorbereitung einer optimalen Nukleofektion wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert und nach Passage auf eine Zelldichte von 1×10^5 Zellen eingestellt. Insgesamt befanden sich die Zellen nicht länger als über 10 Passagen in Kultur. Danach wurden sie verworfen und ein neuer Stock wurde aufgetaut und kultiviert.

2.2.2 Nukleofektion der Jurkat-T-Zellen

Die Jurkat T Zellen wurden entsprechend dem Protokoll der Firma Amaxa mit den siRNA – Nukleotiden nukleofektiert („General Protocol for Nukleofektion of suspension cell lines“).

Dazu wurden für eine Probe 3×10^6 Zellen in 100 μl Nukleofektionslösung aufgenommen und mit 5 μl der 20 μM siRNA Lösung gemischt, in eine Transfektionsküvette transferiert und mit dem Programm T-14 im Amaxa-Nukleofektor-Gerät behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml RPMI-Vollmedium aufgenommen und in einem Loch einer 6-Loch Platte kultiviert.

2.2.3 Herstellen der Zell-Lysate von Jurkat-T-Zellen

Nach Kultivierung wurden die Zellen aus jedem Loch der 6-Loch Platte (zirka 3×10^6 Zellen)

zweimal in PBS gewaschen (1200 U/ 5 min), in jeweils 30 µl auf Eis vorgekühlten Lysepuffer aufgenommen, über 30 Minuten auf Eis gelagert und zwischendurch mehrmals gevortext. Abschließend wurden die Probenröhrchen mit dem Zell-Lysat kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und dann bei -80°C zwischengelagert.

1% Natriumcholat		
1 mM DTT		
2 mM EDTA		
Complete	mini	(Protease Inhibitoren)
Zu 10 ml mit PBS		

Tabelle 2-1 Zusammensetzung des Zell-Lyse-Puffers. Der Zell-Lyse Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch mit PMSF versetzt (100-fach Konzentrat, lichtgeschützt gelagert)

2.2.4 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Zell-Lysate

Um im Western Blot der Zell-Lysate im Vergleich der unterschiedlichen siRNA-Behandlungsgruppen abschätzen zu können wie sich die FLAG CD2BP2 Menge pro Zelle unter Einfluß der siRNA verändert hat, wurde der Gesamtproteingehalt der Zell-Lysate bestimmt. Dadurch konnten im Folgenden jeweils vergleichbare Proteinmengen über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und später per Western Blot analysiert werden. Die Stärke der FLAG-CD2BP2 Bande sollte dann lediglich von der Menge FLAG CD2BP2 pro Zelle abhängen und nicht von variierenden Mengen an eingesetzten Zellen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Zell-Lysate wurde der „BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce gemäß den Anweisungen des Herstellers für die „Microplate Procedure“ eingesetzt.

2.2.5 Western Blot von Zell-Lysaten

Die Proteine der Zell-Lysate wurden über ein 10 %iges SDS-Gel aufgetrennt und anschließend

vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran innerhalb von 45 Minuten bei 18 V transferiert („Trans-Blot SD“ System, Bio-Rad). Der Erfolg des Protein-Transfers wurde grob durch Anfärben der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau-Lösung überprüft. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran anschließend unter Schütteln über Nacht bei 4°C in einer PBS- BSA -Milch- Lösung (PBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver, 2 % BSA) inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran mit einer anti-FLAG Antikörper –Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (anti-FLAG Antikörper F-3165, SIGMA, 1:600 verdünnt in PBS/ 5 % -Milch- Lösung). Nach dreimaligem Waschen in PBS-Puffer (jeweils 10 min) wurde die Nitrozellulose-Membran mit einer anti-HRP Antikörper –Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (anti-mouse HRP- Antikörper, 1:2000 verdünnt in PBS/ 5 % -Milch- Lösung) und wiederum dreimal in PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Abschließend wurde der Blot mit Hilfe des Super-Signal Kits (PIERCE) entwickelt und die Chemiluminiszenz wurde am „LumiImager“ (Boehringer Mannheim) detektiert.

2.3 Charakterisierung der siRNA in PBMCs

2.3.1 Bestimmung der Nukleofektionseffizienz der siRNA

Zur Bestimmung der Nukleofektionseffizienz der siRNA wurden humane mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wie beschrieben (2.4.3) aufgereinigt und mit Alexa-488 markierter CD2BP2-1 siRNA oder unmarkierter Negativ-Kontroll-siRNA wie beschrieben (2.4.5) nukleofektiert.

Direkt nach der Nukleofektion wurde jeweils ein Aliquot der PBMCs entnommen, in FACS-Waschpuffer gewaschen (200 x g, 10 min), in 200 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und durchflußzytometrisch analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte in Histogramm-Format, wobei auf der X-Achse der Parameter „Fluoreszenz des Detektorkanals-1“ aufgetragen wurde, da das Emissionsspektrum von Alexa-488 im entsprechenden Wellenlängenbereich zu erwarten ist. Die Hintergrundfluoreszenzsignale der mit unmarkierter siRNA nukleofektierten Zellen wurden durch den Marker M1 eingegrenzt.

2.3.2 Exemplarische Überprüfung der Spezifität der CD2BP2-spezifischen siRNA

Zunächst wurden humane mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wie beschrieben (2.4.3)

aufgereinigt, mit CD2BP2-17376 siRNA oder Negativ-Kontroll-siRNA wie beschrieben nukleofektiert (2.4.5) und 2 Tage in RPMI-Vollmedium kultiviert.

Zur Markierung der Oberflächenantigene wurden die Zellen mit FACS-Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation 500 x g, 5 Minuten) und entweder mit 5 µl CD2 FITC (CALTAG) und 10 µl CD3 PerCP-Cy5.5 (BD) oder 10 µl CD4 FITC (BD) und 10 µl CD3 PerCP-Cy5.5 (BD) für 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert, mit FACS-Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation 500 x g, 5 Minuten) und abschließend durchflußzytometrisch analysiert.

2.4 Zytokin-Durchflußzytometrie

2.4.1 Spezifische Materialien für die Zytokin-Durchflußzytometrie

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % NaN ₃

Tabelle 2-1 Puffer und Lösungen für die Zytokin-Durchflußzytometrie- selbst hergestellt

Bezeichnung	Hersteller
FACSTM Lysing Solution	BD Biosciences, San Jose USA
FACSTM Permeabilizing Solution	BD Biosciences, San Jose USA

Tabelle 2-2 Puffer und Lösungen für die Zytokin- Durchflußzytometrie- gekauft

Spezifität	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller
CD2	S 5.5	mIgG2a	FITC	CALTAG, Burlingame USA
CD3	UCHT-1	IgG1	PE	Sigma
	SK7	mIgG ₁	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences, San Jose USA
	S4.1	mIgG _{2a}	APC	CALTAG, Burlingame USA
CD4	SK3	mIgG ₁	FITC	BD Biosciences, San Jose USA
CD69	L78	mIgG ₁	APC	BD Biosciences, San Jose USA

Tabelle 2-3 Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle

Spezifität	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller
IL-2	5344.111	mIgG ₁	PE	BD Biosciences, San Jose USA
IFN γ	25723.11	mIgG _{2b}	PE	BD Biosciences, San Jose USA
IL-10	JES3-9D7	Rat	PE	CALTAG, Burlingame USA
		IgG ₁		

Tabelle 2-4 Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Zytokine

2.4.2 Blutspender und Blutentnahme

Humanes Vollblut wurde von gesunden, freiwilligen Spendern in „Heparin-Blut Röhrchen“ unter hygienisch-sterilen Bedingungen entnommen und umgehend weiterverarbeitet.

2.4.3 Präparation humaner mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

50 ml -„Leucosep-Röhrchen“ wurden mit 15 ml Ficoll Paque Plus befüllt und für 30 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert, um das Ficoll vollständig am Boden des Leucosep-Röhrchens unter der

Barriere –Membran zu platzieren. Anschließend wurden 20 ml PBS Puffer mit 0,5 % BSA in das Leucosepröhrchen eingefüllt und 10 ml des Heparin-Vollblutes hinzupipettiert. Das blut- und ficollbefüllte Leucosepröhrchen wurde für 20 Minuten bei 750 x g und 20 °C zentrifugiert (Swinging bucket rotor, Beschleunigungs – und Bremsstärke jeweils 1) (Dichtegradientenzentrifugation).

Nach Ausführung der Dichtegradientenzentrifugation wurde die die PBMCs enthaltende weißliche Interphase mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube transferiert. Das 50 ml Tube wurde anschließend mit PBS –Puffer (0,5% BSA) aufgefüllt und dann bei 350 x g, 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Puffer-Überstand entfernt und das Zellpellet in 25 ml mit PBS –Puffer (0,5% BSA) überführt .Nach Zentrifugation bei 160 x g, 15 Minuten, 4°C wurde wiederum der Pufferüberstand entfernt und das Zellpellet erneut in 25 ml mit PBS –Puffer (0,5 % BSA) aufgenommen und anschließend bei 160 x g, 15 Minuten, 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Pufferüberstandes wurde das Zellpellet in 4,25 ml PBS –Puffer (0,5 % BSA) aufgenommen und gut resuspendiert. Sofort nach Resuspension der Zellen wurde ein Aliquot von 5 µl abgenommen und die Zahl der enthaltenen Zellen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 5 µl der Zellsuspension mit 45 µl PBS gemischt (Verdünnung 1:10). 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden unter das Deckblatt der Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter dem Mikroskop vier mal sechzehn Felder der Neubauer-Zählkammer auf die Anzahl der vorhandenen Zellen ausgezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu ermitteln, wurde der Mittelwert pro sechzehn Felder berechnet und abschließend mit dem Verdünnungsfaktor 10 und 10^4 multipliziert.

2.4.5 Nukleofektion von PBMCs

Direkt nach der Aufreinigung aus Vollblut wurden die PBMCs mit siRNA –Nucleotiden nukleofektiert. Dazu wurde die PBS-PBMC-Suspension in Aliquots mit jeweils 1×10^6 Zellen aufgeteilt. Jedes Aliquot wurde als Behandlungsgruppe definiert und mit Negativ-Kontroll-siRNA oder den CD2BP2-spezifischen siRNAs nukleofektiert.

Die Aliquots der PBS-PBMC-Suspension wurden bei 200 x g, 10 min, 20°C zentrifugiert und die

Zellpellets in jeweils 100 µl Nukleofektionslösung aufgenommen. Jeweils 5 µl der jeweiligen 20 µM siRNA-Lösung wurden dem Ansatz hinzugefügt. Der Nukleofektionsansatz aus PBMCs, siRNA und Nukleofektionslösung wurde in eine Kuvette transferiert und im Amaxa-Elektroporator mit dem Programm U-14 behandelt. Nach Nukleofektion wurden die Zellen in vorgewärmtes (37°C) RPMI-Medium (1 % FBS, 0,1% L-Glutamin, 0,1 % Penicillin/Streptomycin) überführt und anschließend bei 200 x g, 10 Minuten, 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 1ml frisches RPMI-Medium (1% FBS, 0,1% L-Glutamin, 0,1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt, um die Nukleofektionslösung aus dem Ansatz zu entfernen. Die nukleofektierten PBMCs wurden dann im frischen RPMI in FACS-Röhrchen transferiert und bei 37°C, 5 % CO₂ und angefeuchteter Luft für 2 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.4.6 Stimulation von PBMCs

Zu den nach siRNA-Nukleofektion im Brutschrank in 1ml RPMI-Medium kultivierten PBMCs wurden zu jeder Probe/Behandlungsgruppe 20 µl des CD2/CD2R Antikörpers der Firma Becton and Dickinson, sowie 25 µl einer PMA Lösung (1ng/µl) hinzugefügt. Die Zellen wurden für insgesamt 5 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und angefeuchteter Luft kultiviert, wobei dies für die letzten 3 Stunden in Anwesenheit des Transportinhibitors Brefeldin A (Endkonzentration 10 µg/ml) geschah.

2.4.7 Immunfärbung der PBMCs für die Zytokin-Durchflußzytometrie: IL-2 und CD69 (10⁵ untersuchte Zellen/ Probe)

Nach der Stimulation wurden die PBMCs in den FACS-Röhrchen bei 500xg, 5 min, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets der einzelnen siRNA-Behandlungsgruppen wurden in FACS-Waschpuffer aufgenommen.

Von zwei siRNA-Behandlungsgruppen, die mit Negativ-Kontroll-siRNA behandelt worden waren, wurde eine Behandlungsgruppe verwendet, um die für die Durchflußzytometrie notwendigen Kontrollen zu färben (Kompensationsproben, Proben für die „Fluorescence Minus One -Strategie“, FMO). Dazu wurde diese siRNA Behandlungsgruppe in die für die Kontrollen notwendige Anzahl von Aliquots unterteilt. Die Zellen der zweiten Negativ-siRNA Behandlungsgruppe sowie der CD2BP2-siRNA-Behandlungsgruppen wurden nicht weiter

aufgeteilt, sondern vollständig innerhalb einer Probe angefärbt.

Zunächst wurde mit der Markierung zelloberflächlicher Antigene begonnen. Zu den Zellen der Kompensationsproben wurden jeweils singular 10 µl CD3-PE, 10 µl CD3-PerCP-Cy5.5 oder 5 µl CD3-APC fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben. Zu den Zellen der Proben für die „Fluorescence Minus One“-Strategie“ wurden entweder keine CD3 Antikörper (1 Probe) oder 20 µl CD3-PerCP-Cy5.5 Antikörper gegeben (2 Proben). Zu den Zellen der zweiten Negativ-siRNA Behandlungsgruppe sowie der CD2BP2-siRNA-Behandlungsgruppen wurden jeweils 20 µl CD3-PerCP-Cy5.5 Antikörper gegeben. Die Ansätze wurden anschließend in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 15 Minuten wurden die Proben zur FMO-Strategie und die Proben der siRNA-Behandlungsgruppen zur intrazellulären Färbung entnommen und weiterbehandelt, während die Kompensationsproben zunächst weiter in Dunkelheit inkubiert wurden.

Für die intrazelluläre Färbung wurden zu jeder Probe 2 ml der FACS-Lyse Lösung gegeben. Der Ansatz wurde für 10 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 2ml Waschpuffer versetzt und bei 500xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und zum verbliebenen Zellpellet wurden jeweils 500 µl FACS Perm2 –Puffer hinzugesetzt. Der Ansatz wurde dann für 10 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 2 ml Waschpuffer versetzt und bei 500xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Zu den Zellen der zweiten Negativ-siRNA Behandlungsgruppe sowie der CD2BP2-siRNA-Behandlungsgruppen wurden jeweils 20 µl IL-2-PE und 5 µl CD69-APC hinzugegeben. Die Zellen der FMO-Proben wurden wie folgt behandelt: Zu der oberflächlich CD3-ungefärbten Probe wurden 20 µl IL-2-PE sowie 5 µl CD69-APC hinzugegeben, zu den beiden oberflächlich CD3 gefärbten Proben wurden entweder 20 µl IL-2 PE oder 5 µl CD69 hinzugefügt. Alle Proben wurden gevortext und anschließend für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden alle Probengruppen (Kompensationsproben, FMO Proben, siRNA-Behandlungsproben) zusammengeführt und mit 2 ml Waschpuffer versetzt und mit 500xg, 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand aller Proben wurde entfernt und die Zellpellets wurden in 200 –300 µl Waschpuffer aufgenommen, per Vortexen resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert. Für eine Probe wurden jeweils 10^5 Zellen gemessen.

2.4.8 Immunfärbung der PBMCs für die explorative Reihe der Zytokin-Durchflußzytometrie: IL-2, IFN γ , IL-10 (10⁴ untersuchte Zellen/ Probe)

Die PBMCs wurden wie oben beschrieben (2.4.7) behandelt, mit folgenden Abweichungen:

Für die explorative Messung wurde nicht die FMO-Strategie angewendet, stattdessen wurden unstimulierte Zellen als Vergleich zum Setzen der Marker (zytokinpositive Zellen versus zytokinnegative Zellen) benutzt.

Die Zytokine IL-2, IFN γ und IL-10 wurden nicht parallel an einer Probe/Zelle markiert. Für jedes Zytokin sollte das hellste zur Verfügung stehende Fluorophor, PE, benutzt werden, um auch etwaige schwache Zytokinantworten detektieren zu können. Dazu wurden die PBMCs einer jeden siRNA-Behandlungsgruppe zunächst oberflächlich mit CD3 PerCP-Cy5.5 gefärbt, dann in 3 gleich große Aliquots aufgeteilt, intrazellulär mit CD69 APC und IL-2 PE oder IFN γ PE oder IL-10 PE gefärbt und abschließend durchflußzytometrisch analysiert. Für eine Probe wurden jeweils 10⁴ Zellen gemessen.

2.4.9 Durchflußzytometrische Messung der mit fluoreszierenden Antikörpern markierten PBMCs

Unter Verwendung der angefertigten Kontrollproben wurden zunächst die Voreinstellungen des Durchflußzytometers festgelegt.

Die fluoreszenzmarkierten Antikörper sind mit Fluorophoren konjugiert, deren Emissionsspektren in bestimmten Wellenlängenbereichen überlappen. Das hier verwendete Durchflußzytometer FACSCalibur verfügt über 4 Fluoreszenzdetektionskanäle, die das Emissionsspektrum eines Fluorophors detektieren sollen. Durch die Überlappung der Emissionsspektren können jedoch in den einem bestimmten Fluorophor zugeordneten Detektionskanal Anteile eines zweites, emissionspektral benachbarten Fluorophors hinüberstrahlen. Dieses Hinüberstrahlen des zweiten Fluorophors kann durch das Durchflußzytometer elektronisch kompensiert werden.

Singulär gefärbte Proben werden durchflußzytometrisch gemessen. Dabei wird bestimmt, welche Fluoreszenzsignale nicht nur im erwünschten und zugeordneten Detektionskanal registriert werden, sondern auch inwieweit Fluoreszenzsignale in die anderen Detektionskanäle hinüberstrahlen. Aufgrund des so bestimmten Ausmaßes des Hinüberstrahlens werden die Einstellungen der elektronischen Kompensation des Durchflußzytometers vorgenommen.

In einem zweiten Schritt wurde durch die „Fluorescence Minus One“-Strategie der Anteil der unspezifischen Hintergrundsignale in den bereits aktivierten Zellen ermittelt. Die unspezifischen Hintergrundsignale wurden durch das Setzen von Markern in den Analysefenstern abgegrenzt.

2.4.10 Fluorescence Minus One-Strategie

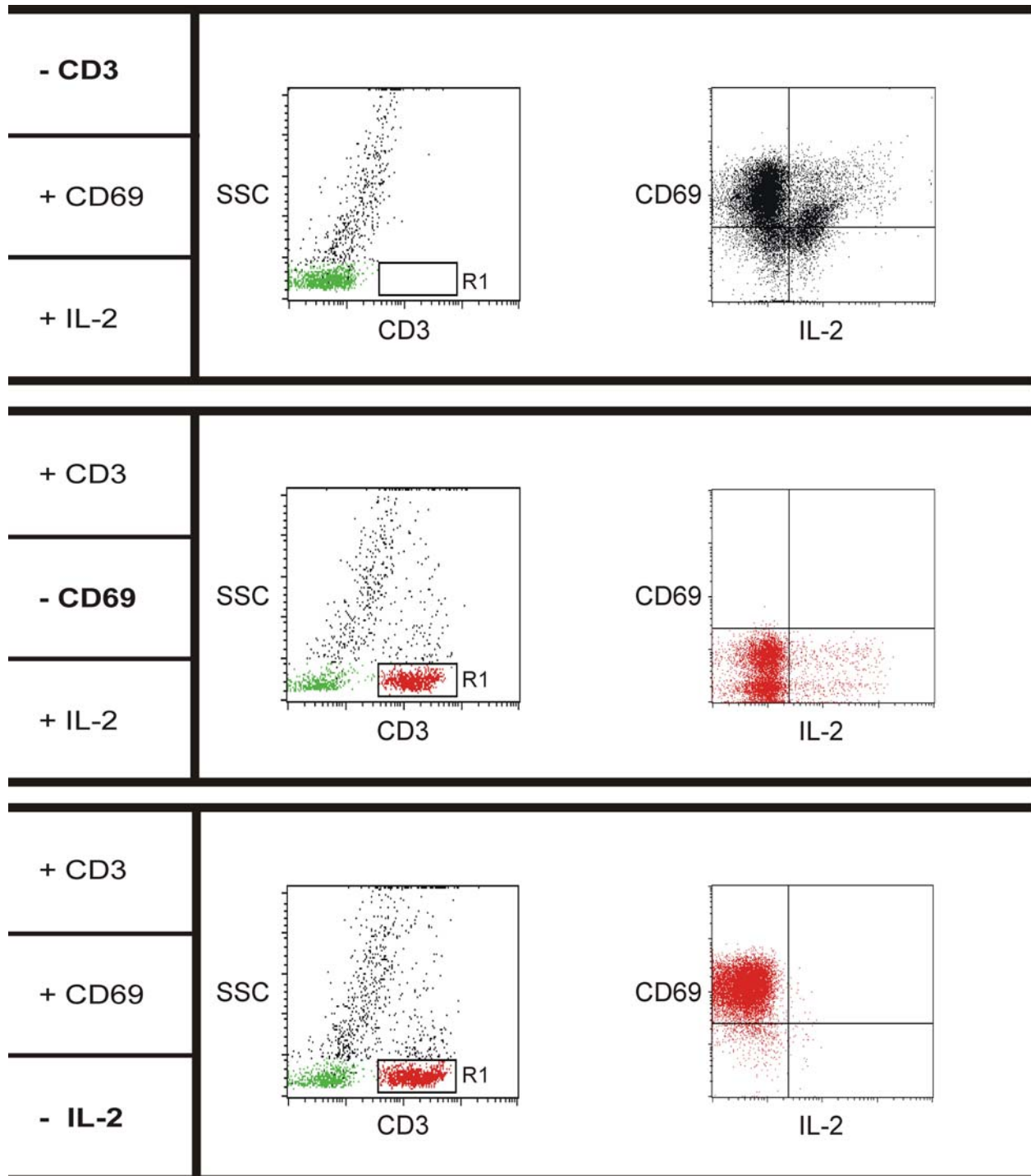


Abbildung 2-1 Fluorescence Minus One Strategie. In jeder Kontrollprobe wird einer der drei Antikörper weggelassen (von oben nach unten: Antikörper gegen CD3, CD69 und IL-2). Die trotz Abwesenheit eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gemessene Hintergrundfluoreszenz wird durch Setzen eines Markers abgegrenzt. (In den Punkt-Diagrammen der rechten Spalte der zweiten und dritten Reihe ist jeweils die Zellsubpopulation aus der Region R1 dargestellt.)

Um die unspezifische Fluoreszenz noch präziser von den spezifischen Fluoreszenzsignalen abgrenzen zu können, hat Mario Roederer die „Fluorescence Minus One-Strategie“ vorgeschlagen (Baumgarth and Roederer, 2000; Roederer, 2001; Tung et al., 2004).

Dazu werden Kontrollen von bereits stimulierten Zellen angefertigt und jeweils mit allen beabsichtigten Antikörpern markiert außer einem. Es wird nun überprüft, wie viel Hintergrundfluoreszenz in dem Detektionskanal des Durchflußzytometers auftritt, in dem normalerweise die spezifische Fluoreszenz des in dieser Kontrolle fehlenden fluoreszierenden Antikörpers erwartet wird. Diese trotz Abwesenheit des spezifischen Antikörpers vorhandene Hintergrundfluoreszenz wird durch Setzen eines Markers abgegrenzt (Abbildung 2-1).

Für die Drei- Farben- Durchflußzytometrie dieser Arbeit wurden drei FMO-Kontrollen angefertigt. In jeder Probe wurde jeweils einer der drei fluoreszierenden Antikörper weggelassen.

2.5 IL-2 ELISA

Die Präparation der humanen PBMCs und die Zellzahlbestimmung erfolgten wie oben beschrieben (Kapitel Zytokindurchflußzytometrie). Die Nukleofektion der aufgereinigten PBMCs erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben, mit folgenden Modifikationen: für eine Probe zu nukleofektierender PBMCs wurden 6×10^5 Zellen (außer Versuch zur Bestimmung der optimalen Zellzahl) eingesetzt. Innerhalb einer siRNA- Behandlungsgruppe wurden drei Aliquots (für PMA und CD2/CD2R-Antikörper-Stimulation) beziehungsweise zwei Aliquots (für alleinige CD2/CD2R-Antikörper-Stimulation) gleicher Zellzahl parallel mit der gleichen siRNA nukleofektiert und später stimuliert und auf IL-2 Produktion untersucht, um die Schwankungen zwischen gleichbehandelten Proben eines Experimentes zu kontrollieren. Die nukleofektierten Zellen wurden anschließend in einzelnen Löchern einer 96-Loch Platte in 200 μ l RPMI-Vollmedium für einen Tag kultiviert.

2.5.1 Stimulation der PBMCs in Löchern der 96-Loch Platte

Nach einem Tag Kultur der nukleofektierten PBMCs in Löchern einer 96-Loch Platte wurden zu jedem Loch 5 μ l der BD CD2/CD2R-Antikörper und 5 μ l einer PMA-Lösung (1ng/ μ l, Endkonzentration in 200 μ l Kulturmedium 25 ng/ml) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für einen weiteren Tag kultiviert.

2.5.2 Bestimmung der IL-2 Menge im Kulturüberstand mittels ELISA

Aus dem Kulturüberstand der in 200 µl kultivierten, siRNA-transfizierten PBMCs wurden 50 µl entnommen. Die Menge des in diesem 50 µl-Aliquot enthaltenen IL-2 wurde mit dem Human IL-2 ELISA Kit der Firma Endogen nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Zunächst wurde eine IL-2 Standard-Verdünnungsreihe angefertigt, wobei jeder Probe eine definierte Konzentration IL-2 zwischen 0 ng/ml IL-2 und 1500 ng/ml IL-2 zugeordnet wurde.

Die 50 µl des Kulturüberstandes beziehungsweise der IL-2 Standardreihe wurden in ein Loch der ELISA-Platte überführt, mit 50 µl des „Biotinylated Antibody Reagent“ gemischt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Löcher der ELISA-Platte entleert und dreimal mit Waschpuffer aus einer Spritzflasche gründlich gewaschen. Anschließend wurden in jedes benutzte Loch der ELISA-Platte 100 µl der „Streptavidin-HRP Solution“ pipettiert und die ELISA-Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um abschließend in jedes Loch 100 µl „TMB Substrate Solution“ zu pipettieren. Danach wurde die ELISA-Platte für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden pro Loch 100 µl „Stop Solution“ hinzugefügt und die Absorption bei 450 nm pro Loch in einem Plate Reader gemessen.

2.6 Statistische Methoden

2.6.1 Vergleich der siRNA Behandlungsgruppen durch verbundenen t-Test

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende, komplementäre Hypothesen aufgestellt:

Nullhypothese: Die siRNA-Behandlungsgruppen (Negativ Kontroll siRNA versus CD2BP2-spezifische siRNA) unterscheiden sich hinsichtlich eines gemessenen funktionellen Parameters (zum Beispiel IL-2 Antwort oder CD69-Expression) *nicht*.

Alternativhypothese: Die siRNA-Behandlungsgruppen (Negativ Kontroll siRNA versus CD2BP2-spezifische siRNA) unterscheiden sich hinsichtlich eines gemessenen funktionellen Parameters (zum Beispiel IL-2 Antwort oder CD69-Expression)

Der jeweilige funktionelle Parameter wurde für die siRNA-Behandlungsgruppen experimentell in stichprobenartigem Umfang gemessen.

Es wurde dann die Frage gestellt, ob die gemessenen Stichproben die Annahme der Nullhypothese (kein Unterschied) oder die Annahme der Alternativhypothese (vorhandener

Unterschied) unterstützen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein statistischer Test durchgeführt (im vorliegenden Fall ein t-Test für zwei verbundene Stichproben). Jeder statistische Test kann prinzipiell dazu führen, daß man sich fälschlicherweise für die Alternativhypothese entscheidet (Unterschied vorhanden), obwohl in Wirklichkeit die Nullhypothese (kein Unterschied vorhanden) zutrifft (Weiß 2001). Dieses Risiko einer Fehlentscheidung (Irrtumswahrscheinlichkeit) kann jedoch durch den α -Fehler quantifiziert werden. Prinzipiell kann der Anwender eines statistischen Tests die maximale Größe des α -Fehlers beliebig festlegen. Zur Ermöglichung einer besseren Vergleichbarkeit statistisch abgesicherter Entscheidungen hat sich jedoch in den Biowissenschaften ein Schwellenwert von 5% eingebürgert (Weiß 2001). Der α -Fehler wird auch als Signifikanzniveau bezeichnet. In diesem Zusammenhang ist die Berechnung eines weiteren Test-Parameters weit verbreitet. Statistische Computerprogramme berechnen den sogenannten p-Wert. Er quantifiziert die Wahrscheinlichkeit, dass das gefundene Testergebnis zustande kommt, wenn in Wirklichkeit die Nullhypothese richtig ist. Wenn p kleiner ist als das festgelegte Signifikanzniveau, wird die Alternativhypothese angenommen (Weiß 2001). Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, daß der p-Wert die Wahrscheinlichkeit angibt, daß die Alternativhypothese (Unterschied zwischen siRNA-Behandlungsgruppen vorhanden) angenommen wird, obwohl die Nullhypothese (*kein* Unterschied zwischen siRNA-Behandlungsgruppen vorhanden) zutrifft.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Alternativhypothese (Unterschied zwischen siRNA-Behandlungsgruppen vorhanden) zunächst nur dann angenommen, wenn der im t-Test berechnete p-Wert kleiner als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau von 5 % (0,05) war.

2.6.2 Charakterisierung der Schwankungsbreite und Reproduzierbarkeit der Experimente durch Berechnung eines Variationskoeffizienten

Die Firma Becton and Dickinson (BD) verwendet zur Charakterisierung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ihres Messsystems zur Zytokindurchflußzytometrie („BD FastImmune CFC“) die Begriffe „Intra-Assay Precision“ und „Inter- Assay Precision“.

Die „Intra-Assay Precision“ beschreibt die Streuung der Meßergebnisse bei wiederholten Messungen innerhalb eines Experimentes, die „Inter- Assay Precision“ hingegen die Streuung der Messergebnisse über mehrere unabhängige Experimente hinweg (BD FastImmune CFC

Handbook).

Als Streuungsmaß wird der Variationskoeffizient (CV) verwendet, der nach folgender Formel berechnet wird:

Variationskoeffizient (in %) = (Standardabweichung/ arithmetischer Mittelwert) x 100

Für die Versuche der Zytokindurchflußzytometrie dieser Arbeit wurde die „Inter Assay Precision“ bestimmt, um die vorliegenden Schwankungen abschätzen und mit den Daten von BD vergleichen zu können.

„Intra Assay Precision“ und „Inter Assay Precision“ wurden darüber hinaus für die IL-2 ELISA Versuche dieser Arbeit bestimmt.

Ein Variationskoeffizient von bis zu 30% kann in den Biowissenschaften als akzeptabel angesehen werden (Weiß 2001).