

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur funktionellen Rolle von CD2BP2 in der CD2-  
vermittelten Signaltransduktion von T-Zellen**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Heinze

aus Nauen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Walter Rosenthal
2. Prof. Dr. med. Burkhard Schraven
3. PD Dr. rer. nat. Jens Kurreck

Datum der Promotion: 27.4.2007

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>VII</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Medizinische Relevanz der Erforschung der Signalübertragung in Immunzellen...	13
1.2 Immunmechanismen.....	14
1.3 Interaktion von T Zelle und antigenpräsentierender Zelle .....	18
1.4 CD2.....	19
1.5 CD2 als Signaltransduktor für T Zell Effektorfunktionen .....	20
1.6 Molekulare Grundlagen der intrazellulären Weiterleitung der CD2 Signale .....	21
1.7 Fyn.....	22
1.8 CD2BP1 und CD2BP2 .....	23
1.9 Herleitung der Fragestellung .....	26
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1 Verwendete siRNA-Oligonukleotide .....	27
2.1.1 siRNA-1 („CD2BP2-1“), Qiagen.....	27
2.1.2 siRNA-2 (“CD2BP2-2“), Qiagen.....	27
2.1.3 siRNA-3 („CD2BP2-17376“), Ambion .....	27
2.1.4 Negative Control siRNA, Qiagen: .....	27
2.1.5 Vorbereitung der siRNA Proben.....	28
2.2 Knockdown in Jurkat –T-Zellen.....	28
2.2.1 Kulturbedingungen für die Kultur der Jurkat-T-Zellen.....	28
2.2.2 Nukleofektion der Jurkat-T-Zellen.....	28
2.2.3 Herstellen der Zell-Lysate von Jurkat-T-Zellen.....	28

2.2.4	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Zell-Lysate.....	29
2.2.5	Western Blot von Zell-Lysaten .....	29
2.3	Charakterisierung der siRNA in PBMCs .....	30
2.3.1	Bestimmung der Nukleofektionseffizienz der siRNA .....	30
2.3.2	Exemplarische Überprüfung der Spezifität der CD2BP2-spezifischen siRNA ..	30
2.4	Zytokin-Durchflußzytometrie.....	31
2.4.1	Spezifische Materialien für die Zytokin-Durchflußzytometrie.....	31
2.4.2	Blutspender und Blutentnahme .....	32
2.4.3	Präparation humaner mononukleärer Blutzellen (PBMCs) .....	32
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer .....	33
2.4.5	Nukleofektion von PBMCs .....	33
2.4.6	Stimulation von PBMCs.....	34
2.4.7	Immunfärbung der PBMCs für die Zytokin-Durchflußzytometrie: IL-2 und CD69 ( $10^5$ untersuchte Zellen/ Probe) .....	34
2.4.8	Immunfärbung der PBMCs für die explorative Reihe der Zytokin- Durchflußzytometrie: IL-2, IFN $\gamma$ , IL-10 ( $10^4$ untersuchte Zellen/ Probe).....	36
2.4.9	Durchflußzytometrische Messung der mit fluoreszierenden Antikörpern markierten PBMCs .....	36
2.4.10	Fluorescence Minus One-Strategie .....	38
2.5	IL-2 ELISA.....	39
2.5.1	Stimulation der PBMCs in Löchern der 96-Loch Platte .....	39
2.5.2	Bestimmung der IL-2 Menge im Kulturüberstand mittels ELISA.....	40
2.6	Statistische Methoden.....	40
2.6.1	Vergleich der siRNA Behandlungsgruppen durch verbundenen t-Test.....	40
2.6.2	Charakterisierung der Schwankungsbreite und Reproduzierbarkeit der Experimente durch Berechnung eines Variationskoeffizienten .....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	Suche nach funktionell wirksamen CD2BP2-spezifischen siRNAs: Knockdown in Jurkat -T-Zellen .....	43
3.2	Charakterisierung der CD2BP2-spezifischen siRNAs in PBMCs:	

Nukleofektionseffizienz und Spezifität .....	44
3.2.1 Nukleofektionseffizienz .....	44
3.2.2 Spezifität.....	45
3.3 Exploration der IL-2 Antwort und weiterer Zytokine sowie des Aktivierungsmarkers CD69.....	47
3.3.1 Exploration der Zytokinantworten IL-2, IFN $\gamma$ und IL-10.....	47
3.3.2 Exploration der CD69-Expression .....	51
3.4 Analyse der IL-2 Antwort und der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 mit erhöhter Meßgenauigkeit.....	53
3.4.1 CFC Assay Precision.....	56
3.5 IL-2 ELISA.....	59
3.5.1 Etablierung IL-2 ELISA.....	59
3.5.2 Stimuluskombination CD2 Antikörper und PMA.....	63
3.5.3 Stimulus CD2 Antikörper.....	64
3.5.4 ELISA Assay Precision.....	65
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1 Methodische Aspekte .....	69
4.1.1 RNAi-Validierung.....	69
4.1.2 siRNA-Transfer.....	71
4.1.3 Meßgenauigkeit und Anwendbarkeit von Zytokindurchflußzytometrie und Zytokin-ELISA in Verbindung mit RNAi- Ansätzen .....	71
4.1.4 PBMCs als heterogene Population.....	79
4.2 Auffälligkeiten bei den funktionellen Tests .....	80
4.3 Zelluläre Funktionen von CD2BP2 .....	81
4.3.1 Rolle von CD2BP2 im CD2- Signalweg von T Zellen.....	81
4.3.2 CD2BP2 als Bestandteil des Spliceosomes.....	83
4.3.3 CD2BP2- Ein Protein mit diversen zellulären Funktionen ? .....	85
4.3.4 Ausblick .....	86
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>

---

<b>Publikationen .....</b>	<b>102</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>105</b>

---

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Promotion unterstützten !

Ich danke **Herrn PD Dr. Christian Freund** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Sicherstellung einer hervorragenden materiellen Ausstattung und die sehr lehrreiche und positive Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit !

Mein Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal** für seine Bereitschaft diese Arbeit grundsätzlich zu betreuen und zu unterstützen, sowie für die Bereitstellung einer hervorragenden wissenschaftlichen Infrastruktur am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie in Berlin !

Überdies danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der **AG Freund** für die Vermittlung von praktischem und theoretischem Wissen aus vielen Bereichen der biomedizinischen Grundlagenforschung ! Insbesondere danke ich **Herrn Dr. Kirill Piotukh** für die umfassende Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen! Überdies danke ich **Frau Ulrike Schneeweiss** für die sehr freundliche und herzliche Zusammenarbeit und die Hilfe in der Zellkultur! Ich danke allen Blutspendern für ihre Bereitschaft die vorliegende Studie zu ermöglichen, insbesondere danke ich **Herrn Marc Sylvester** für seine technisch vorzüglichen Blutentnahmen! Mein Dank gilt auch **Herrn Dr. Michael Kofler** und **Herrn Dr. Jürgen Zimmermann** für ihre wertvollen Hinweise im Umgang mit der Software zur Erstellung dieser Arbeit! Zudem möchte ich mich bei **Frau Kathrin Motzny** und **Frau Katharina Thiemke** für ihre technische Unterstützung bedanken!

Ich bedanke mich bei **Herrn Dr. Alexander Scheffold** (Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin), **Herrn Dr. Rahn** (MDC Berlin, AG Lipp), **Herrn Dr. Müller** (MDC Berlin, AG Lipp) für die Beratung in Fragen der Durchflußzytometrie sowie bei **Herrn Prof. Dr. Tuschl** (Rockefeller University New York, USA) und **Herrn PD Dr. Kurreck** (Freie Universität Berlin, Institut für Chemie/Biochemie) für die Beratung bezüglich der RNAi-Technik ! Ebenso möchte ich **Herrn PD Dr. Dr. Hopfenmüller** (Institut für Biometrie der Charité Berlin) für die statistische Beratung danken!

Ich danke **meiner Familie** für jegliche Form des Rückhalts und der Unterstützung !

In besonderer Weise möchte ich mich bei meiner Freundin **Manuela Senft** für ihr stets offenes Ohr und die Bestärkung auch und gerade in schwierigen Phasen sowie die stets anregenden wissenschaftlichen Diskussionen bedanken !

## **Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das Protein CD2BP2 an der CD2-vermittelten Weiterleitung von Signalen in humanen peripheren T Zellen beteiligt ist.

Dazu wurden in einem ersten Schritt siRNA-Oligonukleotide charakterisiert, die die Expression von FLAG CD2BP2 in Jurkatzellen suffizient unterdrückten.

Unter Verwendung fluorophormarkierter CD2BP2 siRNA wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie gezeigt, daß praktisch alle eingesetzten humanen peripheren Blutzellen (PBMCs) mit der CD2BP2 siRNA transfiziert werden konnten.

Die mit CD2BP2 siRNA transfizierten PBMCs wurden anschließend funktionellen Tests unterzogen. Dafür wurden die PBMCs mit CD2 Antikörpern in Anwesenheit von PMA stimuliert. Einerseits wurden die Zellen anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Hierbei wurden die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 sowie der Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die siRNA-behandelten Zellen keine Veränderungen bezüglich CD69, IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10. In dieser ersten Meßreihe sollte nach deutlichen funktionellen Defekten nach CD2BP2-Knockdown gesucht werden. Da hierbei keine deutlichen Veränderungen gefunden werden konnten, wurde in einer zweiten Meßreihe die Meßgenauigkeit der Durchflußzytometrie deutlich erhöht, um auch subtilere Veränderungen messen zu können. Hierbei wurde auf das Interleukin-2 fokussiert. Allerdings konnten auch hierbei keine Veränderungen gemessen werden.

Die gefundenen Ergebnisse hinsichtlich der Zytokinantwort der CD2BP2-defizienten T Zellen wurden mit einer alternativen Meßmethode überprüft. Dazu wurden CD2BP2 siRNA-Transfektanten entweder mit CD2 Antikörpern in Anwesenheit von PMA oder ausschließlich mit CD2 Antikörpern stimuliert und kultiviert. Die Menge an IL-2 in den Kulturüberständen wurde im ELISA bestimmt. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den CD2BP2-defizienten T Zellen.

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß keinerlei Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-vermittelten Signalweiterleitung hinsichtlich der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 sowie der Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 gefunden werden konnte. Damit muß in Frage gestellt werden, ob CD2BP2 überhaupt an der CD2-Signaltransduktion beteiligt ist und seine zelluläre Funktion nicht eher in anderen Kontexten wie dem Splicing zu suchen ist.



**Abkürzungsverzeichnis**

APC	antigen presenting cell	Antigen- präsentierende Zelle
APC	allophycocyanin	Allophycocyanin
BCA	bicinchoninic acid	Bicinchonininsäure
BFA	brefeldin A	Brefeldin A
BSA	bovine serum albumine	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation	-
CD2AP	CD2 associated protein	CD2 assoziiertes Protein
CD2BP1	CD2 binding protein 1	CD2 bindendes Protein 1
CD2BP2	CD2 binding protein 2	CD2 bindendes Protein 2
CFC	cytokine flow cytometry	Zytokindurchflußzytometrie
CV	coefficient of variation	Variationskoeffizient
DMSO	dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
EDTA	ethylene-diamine- N,N,N',N',-tetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
(E)GFP	(enhanced)	(verstärkt)
	green fluorescent protein	Grün fluoreszierendes Protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	Enzymgekoppelter Immunsorbenttest
FBS	fetal bovine serum	Kälberserum

---

FMO	fluorescence minus one - strategy	
FSC	forward scatter	Vorwärtsstreulicht
Fyn kinase	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn	Proto-Onkogen-Tyrosin-Protein Kinase Fyn
g		Zentrifugalbeschleunigung: 9,81 m/ s <sup>2</sup>
GST	gluthatione-S- transpherase	Gluthation-S-transferase
h	hour(s)	Stunde(n)
HRP	horse-radish-peroxidase	Meerrettich Peroxidase
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-2	interleukin 2	Interleukin 2
IL-10	interleukin 10	Interleukin 10
KDa	kilo Dalton	Kilo Dalton
l		Liter
mAb	monoclonal antibody	monoklonaler Antikörper
MAP kinase-1	mitogen-activated protein kinase 1	Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1
mg	milligramm	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitäts - komplex
mM	millimolar	millimolar

---

min	minute(s)	Minute(n)
mRNA	messenger RNA	Boten- RNA
NMR	nuclear magnetic resonance	Magnetische Kernresonanz
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-BSA	phosphate buffered saline- bovine serum albumine	PBS mit Rinderserumalbumin
PDB	protein database	Proteindatenbank( <a href="http://www.rcsb.org/pdb">www.rcsb.org/pdb</a> )
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein-cyanine 5	Peridinin Chlorophyll Cyanin 5
PE	R-phycoerythrin	R-Phycoerythrin
PMA	phorbol-12-myristate- 13-acetate	Phorbol-12-myristat-13-azetat
PRS	proline-rich sequence(s)	Prolinreiche Sequenz(en)
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute	Umdrehungen pro Minute
RPMI medium	Rosewell Park Memorial Institute medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	room temperature	Raumtemperatur
s	second(s)	Sekunde(n)
SD	standard deviation	Standardabweichung

---

SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH	src homology	Src Homologie
siRNA	small interfering RNA	kleine, interferierende RNA
SmB/B`	Smith protein B/B`	Smith Protein B/B`
SnRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle	Kleiner, nukleärer Ribonukleoproteinpartikel
SSC	side scatter	Seitwärtsstreulicht
TCR	T cell receptor	T-Zell-Rezeptor
V	volt	Volt

**Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen  
in der elektronischen Version meiner Arbeit  
nicht mit veröffentlicht.



**Erklärung**

„Ich, Matthias Heinze, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur funktionellen Rolle von CD2BP2 in der CD2-vermittelten Signaltransduktion von T-Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift