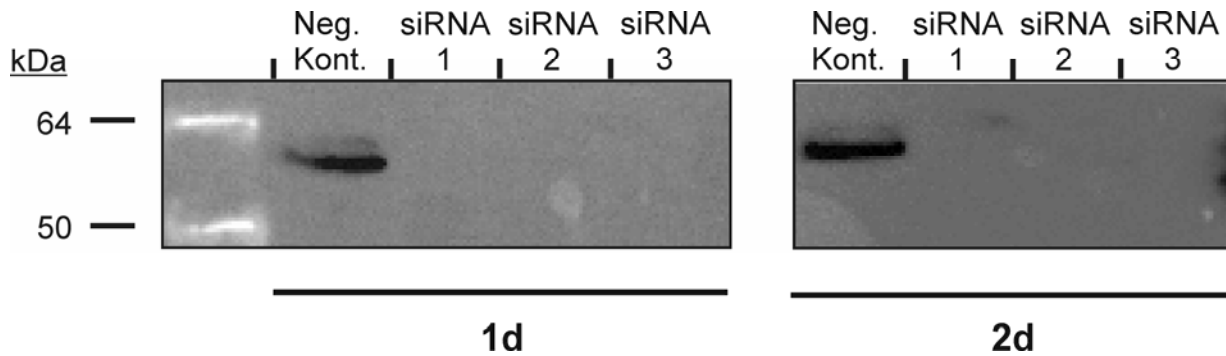


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Suche nach funktionell wirksamen CD2BP2-spezifischen siRNAs: Knockdown in Jurkat -T-Zellen

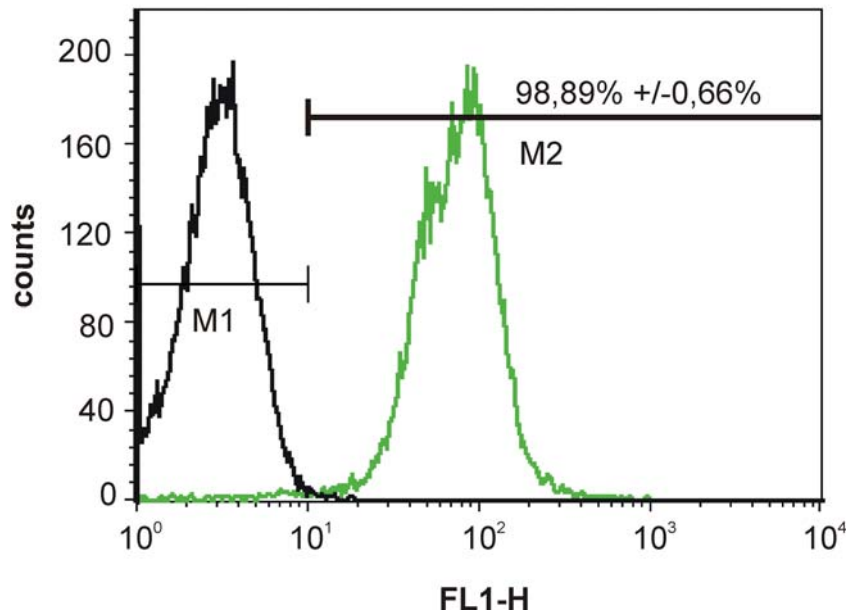


**Abbildung 3-1 Knockdown von FLAG CD2BP2 in Jurkat-T-Zellen.** FLAG-CD2BP2 stabil überexprimierende Jurkatzellen wurden mit 3 verschiedenen CD2BP2-spezifischen siRNAs oder Negativ-Kontroll-siRNA nukleofektiert und kultiviert. Nach einem Tag beziehungsweise nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und Lysate angefertigt. Mittels BCA-Test wurde der Gesamtproteingehalt eines jeden Lysates bestimmt, durch Verdünnen mit PBS-Puffer auf jeweils gleiche Proteinkonzentrationen normalisiert, anschließend per SDS-Gel aufgetrennt, geblotet und mit anti-FLAG Antikörpern entwickelt.

Um die RNAi- Technik erfolgreich anwenden zu können, mußten in einem ersten Schritt siRNA-Oligonukleotide eingesetzt werden, deren Sequenz und Beschaffenheit nachweisbar die Unterdrückung der Neuexpression des Zielproteins erlaubte. Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt drei siRNA-Kandidaten der Firmen Qiagen und Ambion getestet. Für die Überprüfung des CD2BP2-Protein-„Knockdowns“ wurden FLAG-CD2BP2 stabil überexprimierende Jurkatzellen mit den CD2BP2- siRNA Kandidaten nukleofektiert und kultiviert. Nach einem Tag beziehungsweise zwei Tagen wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf FLAG-CD2BP2-spezifische Signale untersucht. Der Western Blot zeigte, daß Zellen, die mit der Negativ-Kontroll-siRNA behandelt wurden, eine deutliche Bande bei 50 KDa aufwiesen. Dort wird erfahrungsgemäß das FLAG-CD2BP2- Protein erwartet (Nishizawa 1998). Proben, die mit 3 verschiedenen Kandidaten für CD2BP2-spezifische siRNAs behandelt wurden, zeigten an dieser Stelle keine detektierbaren Signale mehr (Abbildung 3-1).

## 3.2 Charakterisierung der CD2BP2-spezifischen siRNAs in PBMCs: Nukleofektionseffizienz und Spezifität

### 3.2.1 Nukleofektionseffizienz



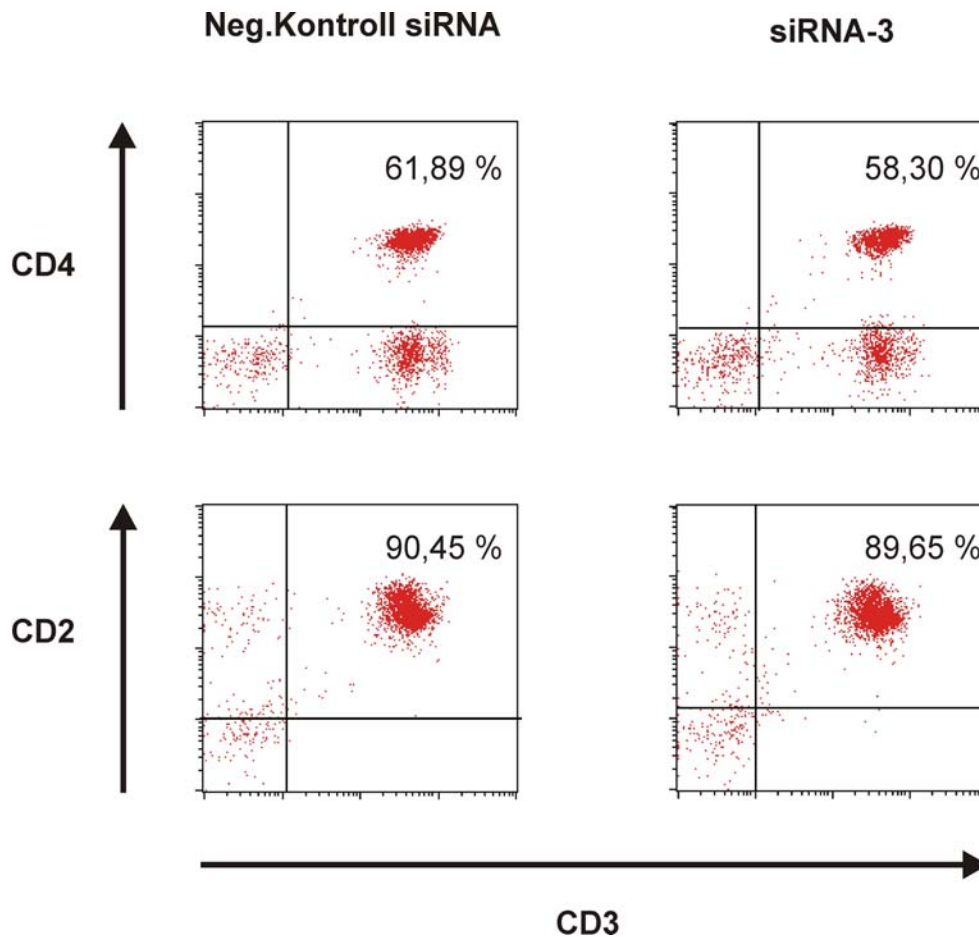
**Abbildung 3-2. Effizienz des siRNA-Transfers.** Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden aus Vollblut per Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und entweder mit Alexa-488-fluorophormarkierter oder mit unmarkierter siRNA nukleofektiert und anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Dazu wurde zunächst die Fluoreszenz der mit unmarkierter siRNA nukleofektierten Zellen gemessen, in einem Histogramm dargestellt (schwarze Kurve) und über den Marker M1 markiert. In einem zweiten Schritt wurde die Fluoreszenz der mit Alexa-488 markierter siRNA nukleofektierten Zellen bestimmt und im selben Histogramm dargestellt (grüne Kurve). In vier unabhängigen Experimenten zeigte sich, daß die Fluoreszenz nahezu aller mit Alexa-488 markierter siRNA nukleofektierten Zellen größer war als die Hintergrundfluoreszenz der Kontrollgruppe (Marker M1). Nahezu alle mit Alexa-488-fluorophormarkierter siRNA nukleofektierten Zellen zeigten daher eine Alexa-488 spezifische Fluoreszenz (98,89% , +/- 0,66%).

Die in Jurkatzellen als knockdown-wirksam charakterisierten siRNAs sollten für funktionelle Studien in primären peripheren mononukleären Blutzellen verwendet werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Wirkung der siRNA ist ihr effizienter Transfer in die Zielzellen (Hannon and Rossi, 2004). Die Effizienz des Transfers synthetischer siRNA hängt von der verwendeten Transfektionsmethode und der Transfizierbarkeit der Zellen ab (Huppi et al., 2005).

Um den siRNA-Transfer in die PBMCs zu kontrollieren, wurden diese mit Alexa-488 fluorophormarkierter CD2BP2-spezifischer siRNA nukleofektiert und durchflußzytometrisch

analysiert. Nach Nukleofektion wiesen nahezu alle Zellen eine Alexa-488 spezifische Fluoreszenz auf (Abbildung 3-2).

### 3.2.2 Spezifität



**Abbildung 3-3. Spezifität der CD2BP2-siRNA.** Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit Negativ-Kontroll-siRNA oder CD2BP2-spezifischer siRNA nukleofektiert und kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern spezifisch für die Oberflächenantigene CD2 und CD3 beziehungsweise CD2 und CD4 markiert und durchflußzytometrisch analysiert.

Obwohl siRNA grundsätzlich mit hoher Spezifität das Zielprotein herunterreguliert, können mitunter durch die siRNA-Behandlung weitere Proteine in ihrer Expression beeinflusst werden („Off-target“ Effekte) (Hannon and Rossi, 2004; Huppi et al., 2005). Exemplarisch werden deshalb vom Zielprotein verschiedene Proteine auf ihre Expression hin getestet.

Für die vorliegende Studie wurden mit CD2 und CD3 zwei Proteine ausgewählt, die für den

---

CD2-Signalweg von essentieller Bedeutung sind (Howard et al., 1992). Darüber hinaus wurde mit CD4 ein weiteres, wichtiges T-Zellmolekül getestet (Abbas 2003). Dazu wurden PBMCs mit CD2BP2-siRNA nukleofektiert und nach 2 Tagen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD2, CD3 und CD4 markiert und durchflußzytometrisch analysiert. Die Häufigkeit der CD2+CD3+ und der CD2+CD4 Zellen wurde durch die CD2BP2-siRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 3-3).

### 3.3 Exploration der IL-2 Antwort und weiterer Zytokine sowie des Aktivierungsmarkers CD69

Nach dem Nishizawa-Modell bindet CD2BP2 direkt an CD2 und leitet Signale von CD2 in das Zellinnere weiter, die zu einer IL-2 Antwort führen (Nishizawa 1998). Damit läge CD2BP2 sehr weit CD2-proximal. Über CD2 laufen neben Signalen für IL-2 noch weitere Signale, unter anderen für IFN $\gamma$ , IL-10 (Schwarz 1995, Bullens 2001, Wakkach 2001) und CD69 (Sasada 2002). Möglicherweise werden diese Signale ebenfalls von CD2BP2 weitergeleitet. Damit nähme CD2BP2 eine zentrale Rolle in der CD2-Signalweiterleitung ein.

Aus diesen Vorüberlegungen entstand die Idee eines breiter angelegten Screens bezüglich der funktionellen Rolle von CD2BP2, der zunächst nicht nur auf den einen Parameter IL-2 fokussiert, sondern weitere Parameter wie IFN $\gamma$ , IL-10 und CD69 mit einschließt.

Über den genauen zeitlichen Verlauf der Herunterregulation von CD2BP2 in den PBMCs lagen keine direkten Daten vor. Deshalb sollte der Beobachtungszeitraum für etwaige funktionelle Konsequenzen des Knockdowns auf 2 und 3 Tage ausgedehnt werden.

Es wurden drei Behandlungsgruppen von PBMCs gebildet. In zwei Behandlungsgruppen wurden PBMCs entweder mit Negativ-Kontroll-siRNA oder CD2BP2-spezifischer „siRNA-1“ nukleofektiert und stimuliert. In der dritten Behandlungsgruppe wurden die PBMCs unstimuliert belassen. Die Zellen aller drei Behandlungsgruppen wurden anschließend für 2 oder 3 Tage kultiviert und mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD3, CD69, IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 markiert und durchflußzytometrisch analysiert.

#### 3.3.1 Exploration der Zytokinantworten IL-2, IFN $\gamma$ und IL-10

Durch das Setzen von Analysefenstern wurde der Anteil der Subpopulationen der CD3+IL2+ beziehungsweise CD3+ IFN $\gamma$ + beziehungsweise CD3+IL10+ Zellen an den jeweiligen Fraktionen der lymphozytenangereicherten PBMCs ermittelt. Dafür wurde in einem ersten Schritt im Scattergramm aufgrund der Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften aus den PBMCs die Subpopulation der lymphozytenangereicherten PMBCs mit Hilfe einer Analyseregion definiert. Die Eigenschaften dieser Subpopulation wurden dann in einem zweiten Schritt bezüglich der Parameter CD3– und zytokinspezifische Fluoreszenz in einem zweidimensionalen Punktdiagramm dargestellt. Der rechte obere Quadrant dieses Punktdiagramms stellt den Anteil der Zellen an den lymphozytenangereicherten PMBCs dar, der

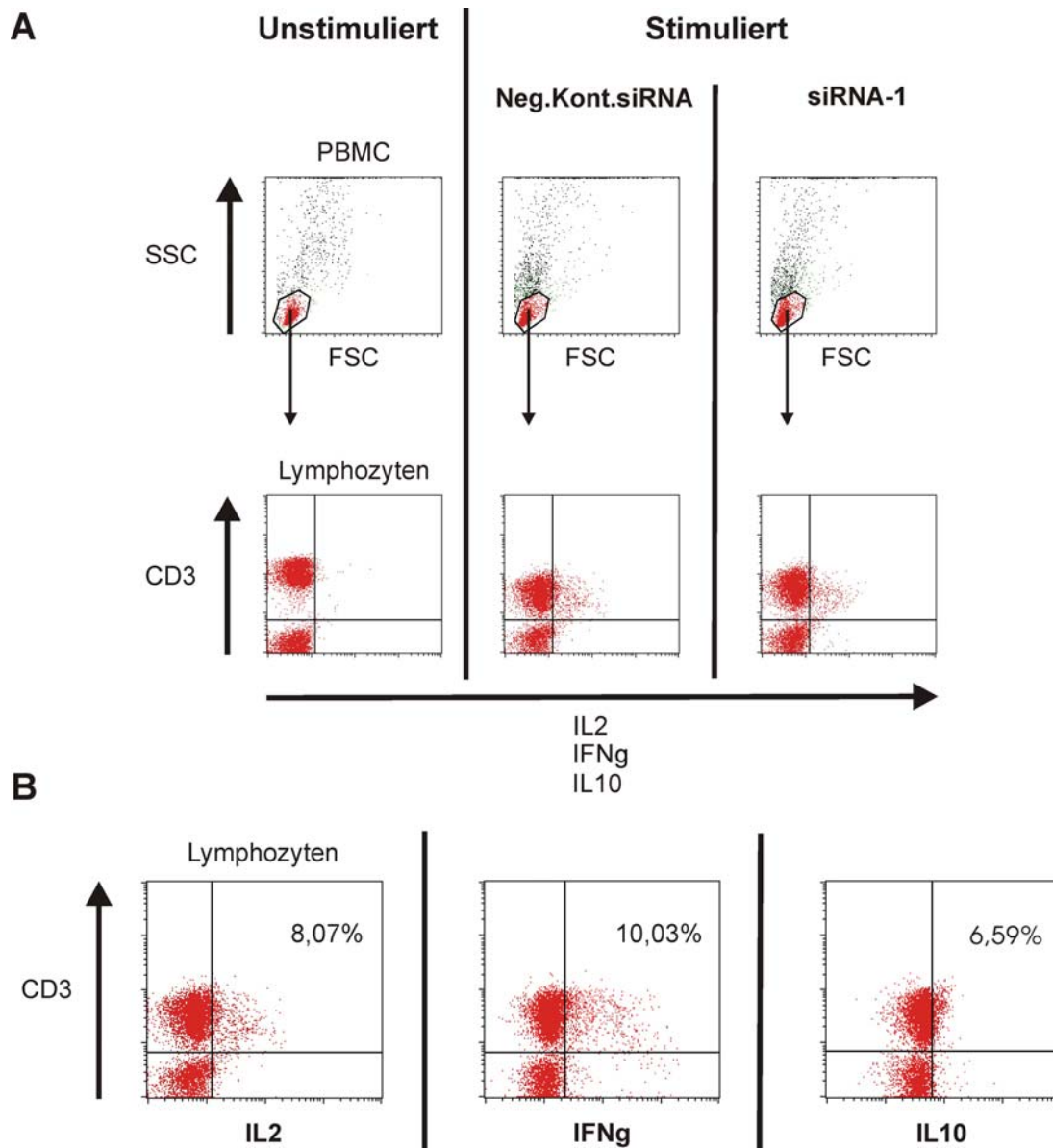
---

gleichzeitig positiv für CD3 und jeweils eines der untersuchten Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 ist (Abbildung 3-4 A).

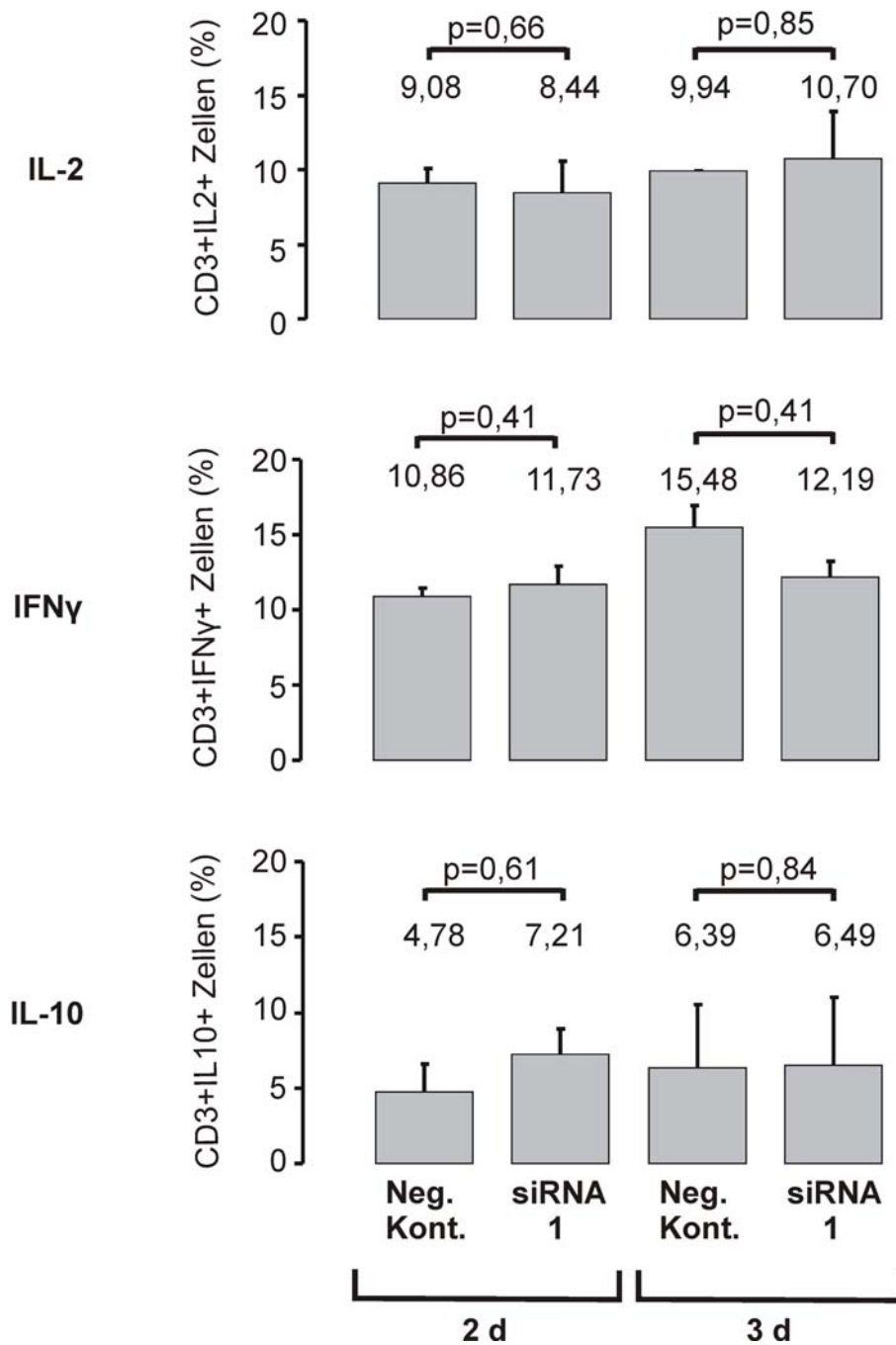
Die Stimulation der mononukleären Zellen führte in beiden siRNA-Behandlungsgruppen zu einer Erhöhung der Häufigkeiten der CD3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Dabei zeigten die Zytokinantworten unterschiedliche Ausmaße für IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 (Abbildung 3-4 B).

Nach zwei unabhängigen Experimenten lag nach 2 und 3 Tagen siRNA-Inkubationszeit im Mittel der Anteil der CD3<sup>+</sup> IL2<sup>+</sup> Zellen im Bereich von 8,4 % bis 10,7%, der Anteil der CD3<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Bereich von 10,9 % bis 15,5 % und der Anteil der CD3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Zellen im Bereich von 4,8 % bis 7,2 % (Abbildung 3-5).

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden siRNA- Behandlungsgruppen konnte hinsichtlich der Häufigkeiten zytokinpositiver Zellen für keines der untersuchten Zytokine festgestellt werden. Die berechneten p-Werte lagen im Bereich zwischen 0,41 und 0,85 und damit deutlich über einem Signifikanzniveau von 0,05 (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-4. Durchflußzytometrische Definition der untersuchten Subpopulationen der PBMCs.** Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit negativer Kontroll-siRNA oder CD2BP2-spezifischer siRNA nukleofektiert und kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 2 oder 3 Tagen wurden die Zellen für 5 Stunden mit CD2/CD2R –Antikörpern in Anwesenheit von PMA stimuliert und mit fluoreszierenden, spezifischen Antikörpern gegen CD3 und CD69 markiert. Anschließend wurden aus jeder Behandlungsgruppe (Negativ-Kontroll-siRNA, CD2BP2-spezifische siRNA) drei Aliquots von Zellen gebildet, die jeweils zusätzlich intrazellulär mit fluoreszierenden Antikörpern gegen IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 markiert und durchflußzytometrisch analysiert wurden. Als Vergleichsgruppe zum Setzen der Marker wurden periphere mononukleäre Blutzellen mitgeführt, die weder nukleofektiert noch stimuliert jedoch gleichartig gefärbt und analysiert wurden. **(A)** Definition der Subpopulation der CD3 /zytokin- doppeltpositiven PBMCs. **(B)** Repräsentative Punkt-Diagramme der unterschiedlichen Zytokinantworten.



**Abbildung 3-5. Einfluß der CD2BP2- siRNA auf die IL-2-, IFN $\gamma$  und IL-10 Zytokinantwort.** Die in den Experimenten zu Abbildung 3-4 bestimmten Häufigkeiten der CD3+IL2+, CD3+IFN $\gamma$ + und CD3+IL10+ Zellen wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Die Behandlungsgruppen „Negativ-Kontroll-siRNA“ und CD2BP2-spezifische „siRNA-1“ wurden gegenübergestellt und die Mittelwerte der Häufigkeiten der CD3+zytokinpositiven Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet. In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe eines gepaarten T-Testes geprüft, ob sich die Mittelwerte aus den beiden gegenübergestellten Behandlungsgruppen signifikant voneinander unterscheiden.



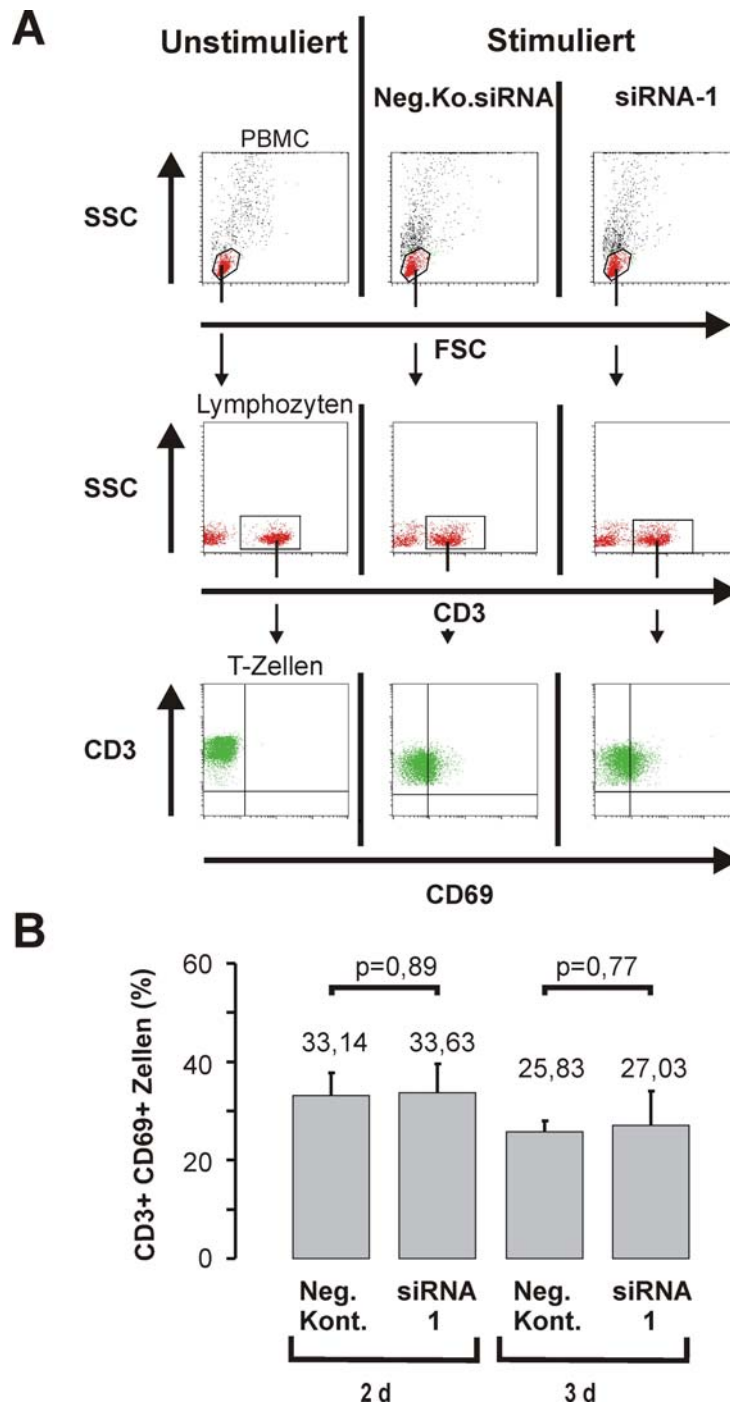
### 3.3.2 Exploration der CD69-Expression

Durch das Setzen von Analysefenstern wurde der Anteil der Subpopulation der CD3+CD69+ Zellen an der Subpopulation der CD3 Zellen der Fraktion der lymphozytenangereicherten PBMCs ermittelt ( Abbildung 3-6 A).

Die Stimulation der mononukleären Zellen führte zu einer Erhöhung der Häufigkeiten der CD69+CD3+ Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Für beide siRNA Behandlungsgruppen lag 2 und 3 Tage nach Transfektion mit siRNA die relative Häufigkeit der CD3+CD69+ Zellen im Bereich von 25,8 % bis 33,6 % ( Abbildung 3-6 B).

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden siRNA-Behandlungsgruppen hinsichtlich der Häufigkeiten der CD3+CD69+ Zellen wurde nicht festgestellt. Die berechneten p-Werte lagen bei 0,89 und 0,77 und damit deutlich über einem Signifikanzniveau von 0,05 ( Abbildung 3-6 B).



**Abbildung 3-6. Einfluß der CD2BP2-siRNA auf die CD69 Expression.** Die aus den Experimenten zu Abbildung 3-4 durchflußzytometrisch gewonnenen Daten wurden einer weiteren Analyse hinsichtlich der Häufigkeiten CD3+CD69+ Zellen unterzogen. **(A)** Definition der Subpopulation der CD3+CD69+ Zellen aus PBMCs. **(B)** Die Behandlungsgruppen „Negativ-Kontroll-siRNA“ und CD2BP2-spezifische „siRNA-1“ wurden gegenübergestellt. Es wurde mittels gepaartem T-Test geprüft, ob sich die mittleren Häufigkeiten der CD3+CD69+ Zellen nach zwei unabhängigen Versuchen signifikant voneinander unterscheiden.

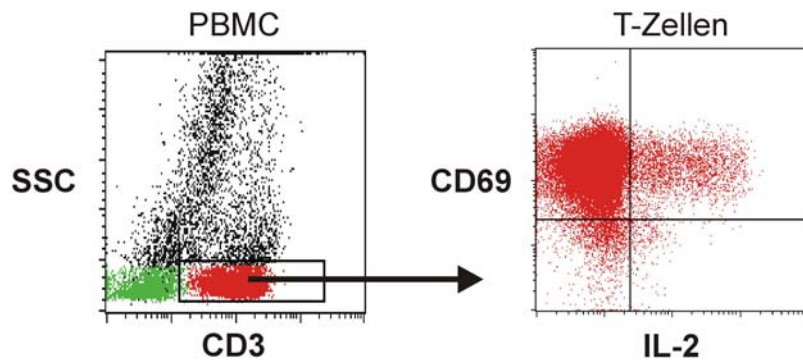
### **3.4 Analyse der IL-2 Antwort und der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 mit erhöhter Meßgenauigkeit**

Nachdem durch die explorativen Experimente (Kapitel 3.3) kein Hinweis auf eine zentrale Rolle von CD2BP2 in der CD2-Signalweiterleitung hinsichtlich der IL-2 Ausschüttung und der Heraufregulation des frühen Aktivierungsmarkers CD69 gefunden werden konnte, sollte nun nach Hinweisen für eine diskretere Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-Signaltransduktionskaskade gesucht werden.

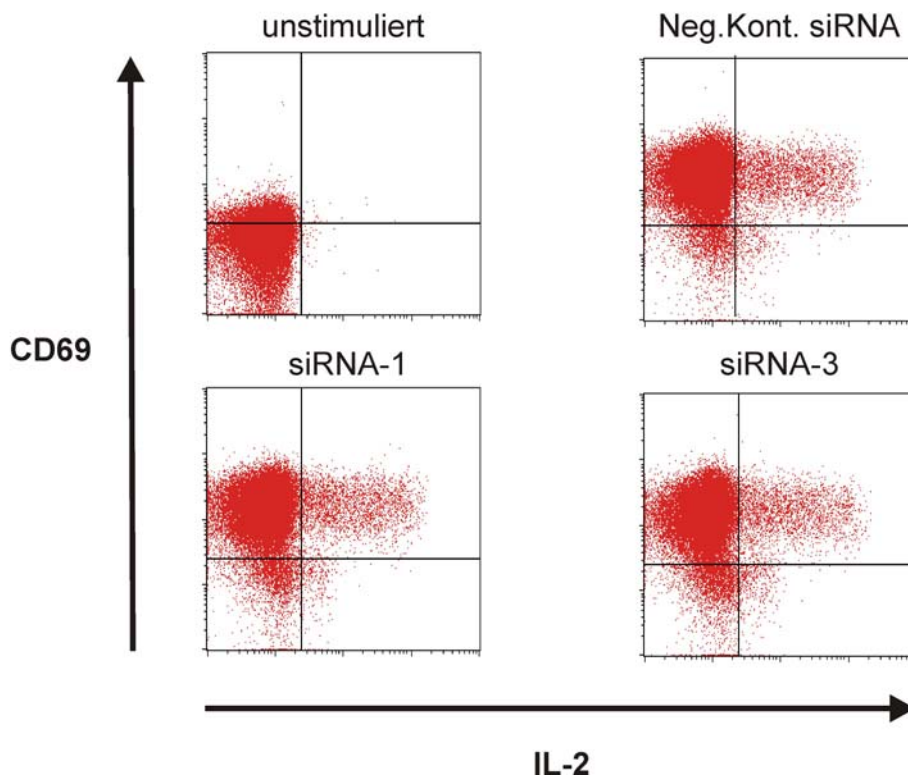
Da die Messgenauigkeit der Zytokindurchflußzytometrie auch von der Anzahl der pro Behandlungsprobe im Durchflußzytometer gemessenen Zellen abhängt (BD FastImmune CFC Handbook, Seite 21; Maecker 2005), wurde die Zellzahl von 10 000 Zellen pro Behandlungsprobe in den explorativen Experimenten auf hier 100 000 Zellen erhöht. Zudem wurde die Anzahl der unabhängigen Versuche von 2 Versuchen in der explorativen Messreihe auf hier 6 Versuche gesteigert.

PBMCs wurden mit Negativ-Kontroll-siRNA oder mit zwei CD2BP2-spezifischen siRNAs „siRNA-1“ beziehungsweise „siRNA-3“ nukleofektiert, kultiviert, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD3, CD69 und IL-2 markiert und durchflußzytometrisch analysiert. Zur Analyse wurde die Subpopulation der CD3-positiven PBMCs hinsichtlich der Expression von CD69 und IL-2 untersucht (Abbildung 3-7).

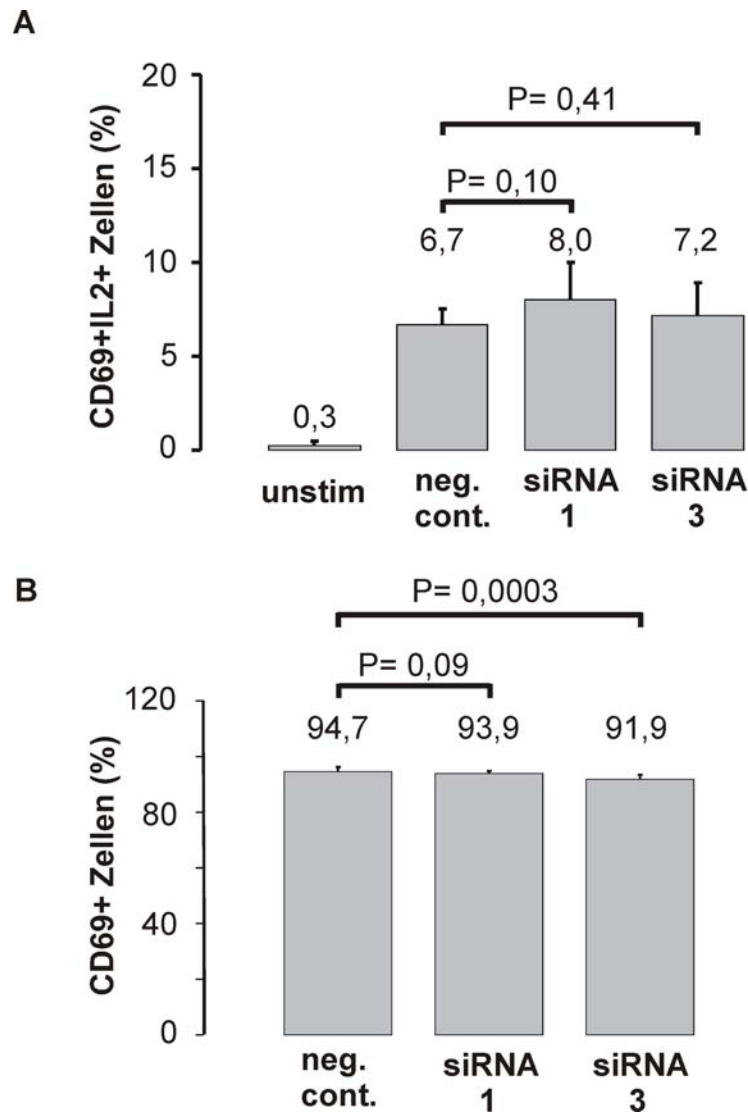
A



B



**Abbildung 3-7. Durchflußzytometrische Analyse der CD2BP2-siRNA behandelten PBMCs hinsichtlich der Parameter IL-2 und CD69 mit erhöhter Meßgenauigkeit; prinzipielles experimentelles Vorgehen.** Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit negativer Kontroll-siRNA oder zwei verschiedenen CD2BP2-spezifischen siRNAs nukleofektiert, kultiviert und nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen für 5 Stunden mit CD2/CD2R –Antikörpern in Anwesenheit von PMA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern spezifisch für CD3 (oberflächlich), CD69 (intrazellulär und oberflächlich) und IL-2 (intrazellulär) markiert und zur Messung im Durchflußzytometer mit einer Zellzahl von 100 000 Zellen pro Probe aufgenommen und analysiert. **(A)** Dabei wurde zunächst die Subpopulation der CD3-positiven PBMCs ermittelt. In einem zweiten Schritt wurden aus den CD3-positiven PBMCs die CD69+IL2+ Zellen dargestellt. **(B)** Typische CD69/IL-2 Punktdiagramme der verschiedenen siRNA-Behandlungsgruppen nach Stimulation mit CD2-Antikörpern und PMA. Zum Vergleich ist das Punktdiagramm unstimulierter Zellen gezeigt.



**Abbildung 3-8 Einfluß der CD2BP2-siRNA auf die IL-2 Antwort und die Expression von CD69.** Nach dem in Abbildung 3-7 beschriebenen experimentellen Schema wurden sechs voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (2 Blutspender, 3 unabhängige Experimente pro Spender). Für jede Behandlungsgruppe (Negativ-Kontroll-siRNA versus CD2BP2 spezifische „siRNA-1“ versus CD2BP2 spezifische „siRNA-3“) wurde die durchschnittliche Häufigkeit (A) der CD69+IL-2+ Zellen sowie (B) der CD69+ Zellen in der Subpopulation der CD3-positiven PBMCs bestimmt und mittels gepaarten T-Test geprüft, ob sich die Behandlungsgruppen hinsichtlich der mittleren Häufigkeiten der (A) CD69+IL-2+ Zellen beziehungsweise der (B) CD69+ Zellen statistisch signifikant voneinander unterscheiden.

Nach Stimulation lag der Anteil der CD69+IL-2+ Zellen an den CD3+ Zellen für alle drei siRNA-Behandlungsgruppen zwischen 6,7 % und 8,0 %. In 6 unabhängigen Experimenten konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der beiden CD2BP2-spezifischen siRNAs „siRNA-1“ und „siRNA-3“ auf die Häufigkeit der CD69+IL-2+ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3-8 A).

Der Anteil CD69+ Zellen an den CD3+Zellen lag im Bereich von 91,9 % bis 94,7 %. Der Vergleich der Behandlungsgruppen „CD2BP2-spezifische siRNA-1“ versus „Negativ-Kontroll-siRNA“ erbrachte keinen Hinweis auf einen statistisch signifikanten Unterschied (p-Wert 0,087). Im Gegensatz dazu wurde für den Vergleich „CD2BP2-spezifische siRNA3“ versus „Negativ-Kontroll-siRNA“ ein p-Wert von 0,0003 berechnet (Abbildung 3-8 B).

### 3.4.1 CFC Assay Precision

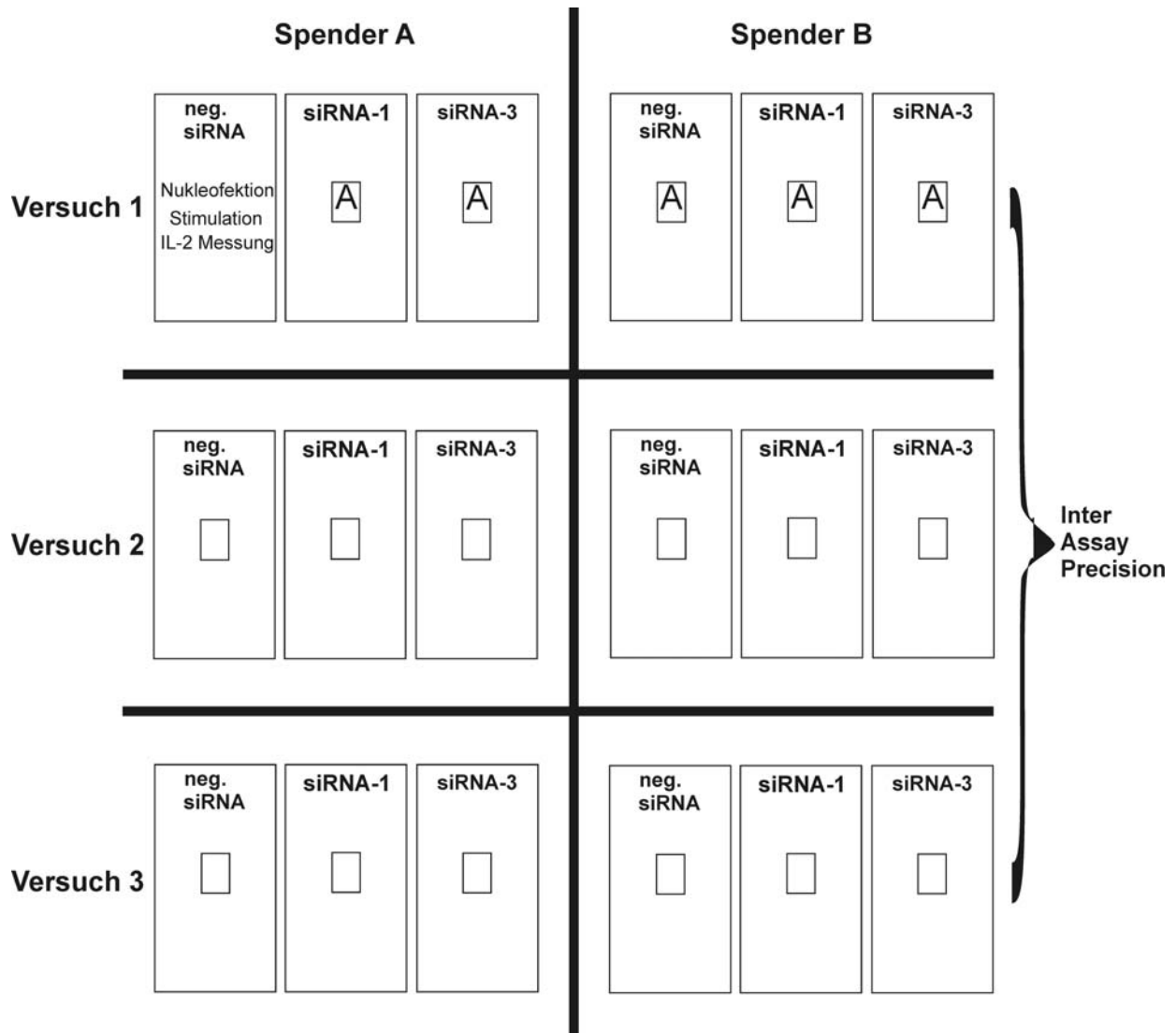
Für eine siRNA-Behandlungsgruppe wurden von Versuch zu Versuch variierende Häufigkeiten IL-2 positiver Zellen gemessen. Je geringer die Schwankungen von Versuch zu Versuch sind, desto wahrscheinlicher können auch kleine Effekte nachgewiesen werden.

Für das hier verwendete Meßsystem der Zytokindurchflußzytometrie (CFC) lagen bereits Analysen vor, die dessen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit charakterisieren (Maecker et al., 2005). Dazu wurde ein Variationskoeffizient eingeführt, der die Schwankungen der Messergebnisse jeweils einer Untersuchungsgruppe über mehrere gleichartige Versuche beschreibt (Berechnung des Variationskoeffizienten vergleiche Abschnitt 2.6.2).

Um die bereits vorhandenen Schwankungscharakteristika mit den Schwankungen der Messungen dieser Arbeit vergleichen zu können, wurde für die hier vorliegende Testreihe derselbe Variationskoeffizient für die Schwankungen der Ergebnisse pro Behandlungsgruppe von Versuch zu Versuch („Inter Assay Precision“) berechnet (Abbildung 3-9).

Für den Blutspender A lagen die Variationskoeffizienten der „Inter Assay Precision“ der drei verschiedenen siRNA- Behandlungsgruppen im Bereich von 3,0 % bis 10,8 %, für den Blutspender B im Bereich von 15,4 % bis 24,5 % (Tabelle 3-1).

Die Inter Assay Precision bezüglich der Untersuchungen der Firma Becton Dickinson (BD) wird mit Variationskoeffizienten beschrieben, die für einen Blutspender bei 14,6 %, für einen weiteren Blutspender bei 32,7 % liegen (Tabelle 3-1 und BD FastImmune CFC Handbook).



**Abbildung 3-9. Bestimmung der Inter Assay Variabilität (Zytokindurchflußzytometrie).** Für einen Versuch wurden die peripheren mononukleären Blutzellen in drei Behandlungsgruppen aufgeteilt: Jede Behandlungsgruppe wurde entweder mit den CD2BP2-spezifischen siRNAs „siRNA-1“ beziehungsweise „siRNA-3“ oder der Negativ-Kontroll-siRNA behandelt. Dazu wurden die Zellen mit der jeweiligen siRNA nukleofektiert, kultiviert und stimuliert. Anschließend wurde die Häufigkeit IL-2 positiver Zellen durchflußzytometrisch ermittelt. Die Variabilität der Häufigkeiten IL-2 positiver Zellen pro Behandlungsgruppe innerhalb der 3 Versuche pro Blutspender wurde durch Berechnung eines Variationskoeffizienten gekennzeichnet.

<b>Donor A</b>		<b>Frequenz aktivierter IL-2-exprimierender Zellen in CD3<sup>+</sup>-Zellen</b>	
	Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	Standardabweichung (SD)	Variationskoeffizient (CV= (SD/ $\bar{x}$ ) x 100)
neg. Kontrolle	6,29	0,68	10,83
siRNA-1	6,55	0,23	3,50
siRNA-3	5,81	0,17	3,00
<b>Donor B</b>		<b>Frequenz aktivierter IL-2-exprimierender Zellen in CD3<sup>+</sup>-Zellen</b>	
	Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	Standardabweichung (SD)	Variationskoeffizient (CV= (SD/ $\bar{x}$ ) x 100)
neg. Kontrolle	8,14	2,00	24,50
siRNA-1	9,45	1,78	18,85
siRNA-3	8,43	1,30	15,44
<b>BD</b>		<b>Frequenz CMV-aktivierter IFN<math>\gamma</math>-exprimierender Zellen in CD4<sup>+</sup>-Zellen</b>	
	Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	Standardabweichung (SD)	Variationskoeffizient (CV= (SD/ $\bar{x}$ ) x 100)
Donor 1	1,97	0,24	14,6
Donor 2	1,80	0,48	32,7

**Tabelle 3-1. Berechnung der Variationskoeffizienten der siRNA- Behandlungsgruppen für Blutspender A und B.** Aus den Häufigkeiten IL-2 positiver Zellen pro Behandlungsgruppe wurden über 3 Versuche pro Blutspender der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus der Variationskoeffizient gebildet. Zum Vergleich sind hier Variationskoeffizienten aus einer ähnlichen Versuchsreihe der Firma Becton Dickinson (BD) zur Messung der Häufigkeiten IFN $\gamma$ -positiver Zellen angegeben (aus „BD FastImmune CFC Handbook“, Seite 26).



### 3.5 IL-2 ELISA

Mit einem zur Zytokindurchflußzytometrie alternativen Ansatz sollten die Untersuchungen bezüglich einer möglichen Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-vermittelten IL-2 Antwort auf eine breitere Grundlage gestellt werden.

Einerseits wurden dafür PBMCs mit CD2 Antikörpern in Anwesenheit von PMA stimuliert. Dadurch sollte geprüft werden, ob unter gleichen Stimulationsbedingungen zwei alternative IL-2 Messmethoden zu tendenziell gleichen Ergebnissen hinsichtlich des Einflusses der CD2BP2-siRNA kommen.

Andererseits sollten die Untersuchungen um einen anderen Aspekt erweitert werden. Die Stimulation über CD2 und PMA schließt ein zweites Signal ein, welches über PMA intrazellulär unter anderen an der PKC seinen Ausgang nimmt (Liu and Heckman, 1998). Möglicherweise wäre der Beitrag von CD2BP2 zur CD2-Signaltransduktion besser erkennbar, wenn das Signal ausschließlich von CD2 ausginge. Aus diesem Grund wurden PBMCs allein mit CD2-Antikörpern stimuliert.

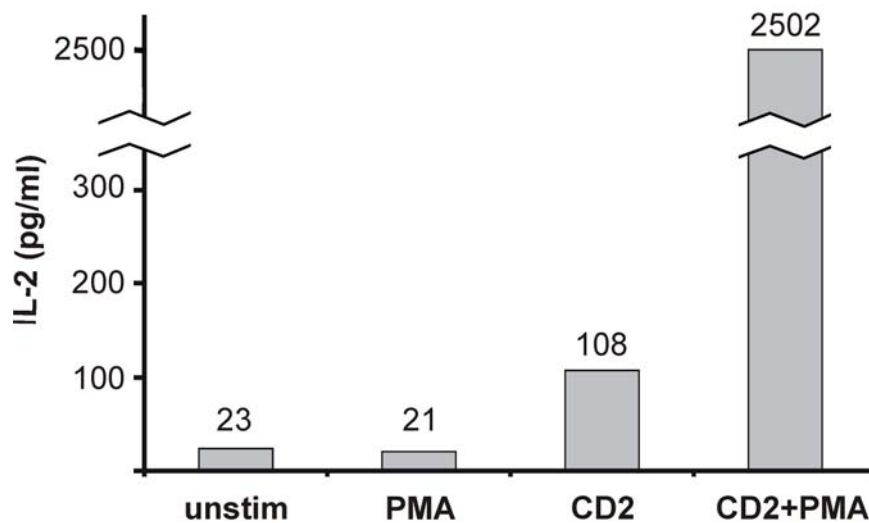
#### 3.5.1 Etablierung IL-2 ELISA

Entsprechend der hier zu untersuchenden Hypothese sollte die Reduktion der CD2BP2-Expression nach CD2-Stimulation zu einer verminderten IL-2 Antwort führen.

Um diese Hypothese mit Hilfe der ELISA-Messmethode untersuchen zu können, musste zunächst gezeigt werden, daß die Stimulation der Zellen überhaupt zu einer messbaren IL-2 Antwort führte. Dabei war zu beachten, daß bereits unstimulierte Zellen IL-2 ELISA Signale liefern. Für die Versuchsreihe sollten drei Signale voneinander unterschieden werden können:

Das Hintergrundsignal der unstimulierten Zellen, das Signal der stimulierten Zellen und das vermutlich reduzierte Signal der CD2BP2-siRNA behandelten Zellen.

Die Unterscheidung dieser drei Signale sollte auch unter den zu erwartenden Schwankungen der Ergebnisse von Probe zu Probe und von Versuch zu Versuch ermöglicht werden. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen sollte ein möglichst hohes Signal für die stimulierten Zellen gegenüber dem Hintergrundsignal der unstimulierten Zellen erzielt werden. Zur Maximierung des IL-2 Signals der stimulierten Zellen wurden verschiedene Parameter untersucht und optimiert.

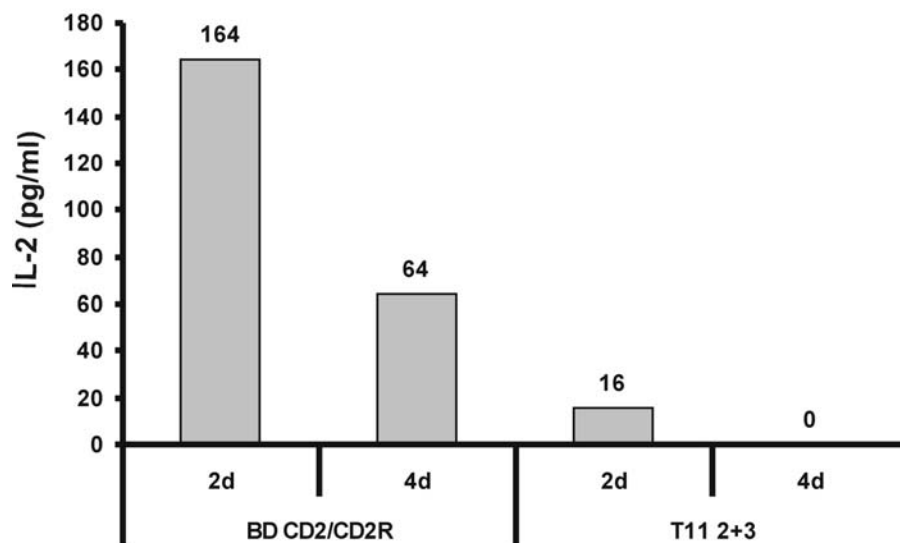


**Abbildung 3-10. Stimulationswirkung von BD CD2/CD2R Antikörpern und PMA- jeweils allein und in Kombination- auf die IL-2 Sekretion von peripheren mononukleären Blutzellen.** Jeweils  $6 \times 10^5$  periphere mononukleäre Blutzellen wurden in 96-Well Platten unter Zusatz der BD CD2/CD2R Antikörper, PMA oder der Kombination beider Stimuli über 2 Tage kultiviert. Anschließend wurde für den Kulturüberstand pro Well die IL-2 Konzentration per ELISA bestimmt.

Die mit Abstand höchste IL-2 Konzentration konnte durch die Kombination der „CD2/CD2R“ Antikörper mit PMA erzielt werden (2502 pg/ml). Die alleinige Verwendung von „CD2/CD2R“ Antikörpern erbrachte in diesem Experiment eine IL-2 Konzentration von 108 pg/ml, die alleinige Verwendung von PMA eine IL-2 Konzentration von 21 pg/ml. Die unstimulierten Zellen wiesen eine IL-2 Konzentration im Kulturüberstand von 23 pg/ml auf (Abbildung 3-10).

Der Vergleich der beiden CD2-stimulierenden Antikörperpaare „CD2/CD2R“ und „T11 2+3“ zeigte, daß „CD2/CD2R“ grundsätzlich höhere IL-2 Konzentrationen hervorrief (164 pg/ml nach 2d und 64 pg/ml nach 4 d) als „T11 2+3“ (16 pg/ml nach 2 d und 0 pg/ml nach 4 d). Zudem zeigte sich, daß eine Kultivierungs/Stimulationsdauer von 2 Tagen bei beiden Antikörperpaaren eine jeweils höhere IL-2 Konzentration erbrachte, als eine Kultivierungs/Stimulationsdauer von 4 Tagen (Abbildung 3-11).

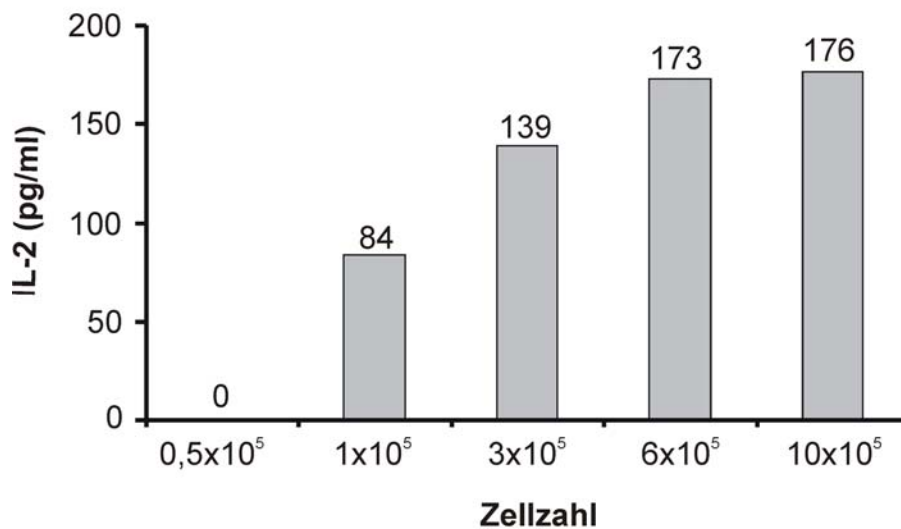
Erwartungsgemäß sezerniert eine größere Zahl an Zellen eine größere Menge an Interleukin-2, sodaß bei gleichem Medienvolumen auch die Interleukin-2 Konzentration zunimmt. Im vorliegenden Versuch, in dem lediglich die Zellzahl variiert wurde, nahm zwar mit steigender



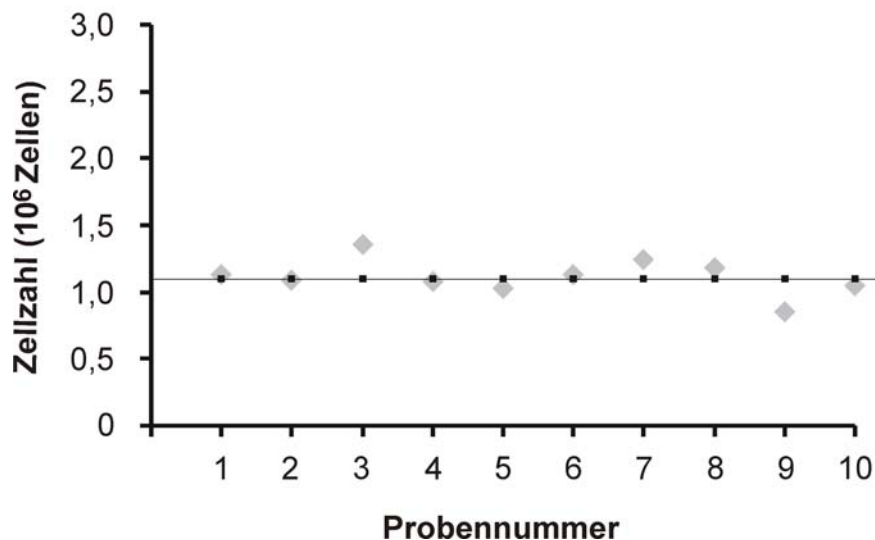
**Abbildung 3-11. Vergleich von Kultivierungsdauer und verschiedenen CD2-Antikörpern hinsichtlich ihres Einflusses auf die Höhe der IL-2 Konzentration im Kulturüberstand.** Periphere mononukleäre Zellen wurden zu jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen in 96-Well Platten unter Zusatz der BD CD2/CD2R oder T11<sub>2+3</sub> Antikörper über 2 beziehungsweise 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde für den Kulturüberstand pro Well die IL-2 Konzentration per ELISA bestimmt.

Zellzahl die Interleukin-2 Konzentration zu. Die Interleukin-2 Konzentration stieg jedoch nicht proportional zur Zellzahl. Mit steigender Zellzahl nahm die IL-2 Zunahme pro Zelle immer weiter ab. Da die IL-2 Konzentrationszunahme zwischen  $6 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen kaum noch erhöht war, wurden für die siRNA-Experimente dann jeweils  $6 \times 10^5$  Zellen pro Probe verwendet (Abbildung 3-12).

Für die siRNA-Experimente sollte lediglich der Einfluß der siRNA auf die IL-2 Konzentration bestimmt werden. Daher war es wichtig, daß sich in jeder siRNA-Behandlungsgruppe möglichst die gleiche Zahl von Zellen befand. Inwieweit die volumenbasierte Aliquotierung tatsächlich zu vergleichbaren Zellzahlen führte, wurde in einem weiteren Vorversuch kontrolliert. Dazu wurden mononukleäre Zellen in ein bestimmtes Volumen Puffer aufgenommen, durch vortexen darin möglichst gleichverteilt. Anschließend wurden aus dieser Zell-Puffer-Suspension zehn Aliquots gleichen Volumens gebildet und die Anzahl der Zellen pro Aliquot bestimmt. Fünf Proben enthielten  $1,1 \times 10^6$  Zellen. Drei Proben lagen mit 1,2 beziehungsweise  $1,0 \times 10^6$  Zellen dicht an der Zellzahl  $1,1 \times 10^6$  Zellen, lediglich zwei Proben wichen mit  $0,9$  und  $1,4 \times 10^6$  Zellen deutlicher davon ab (Abbildung 3-13).

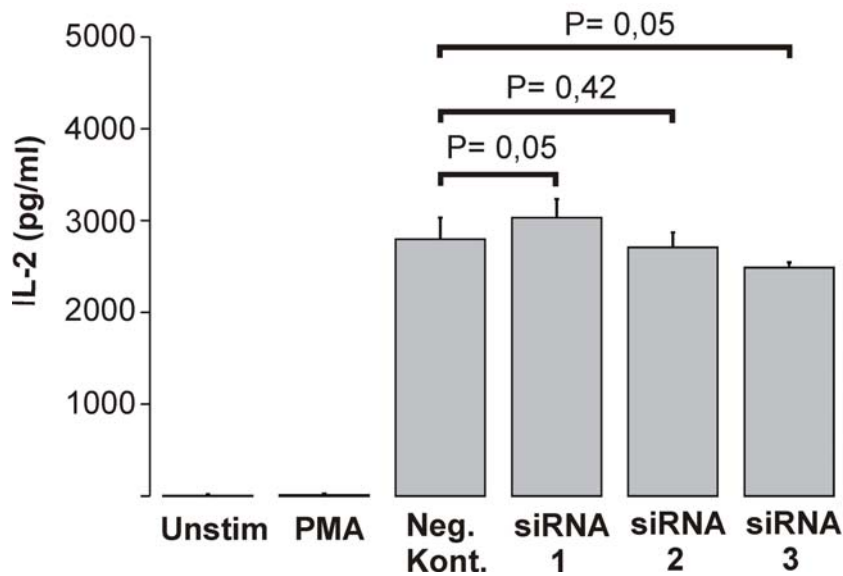


**Abbildung 3-12. Einfluß der Zellzahl auf die Höhe der IL-2 Konzentration im Kulturüberstand nach Kultivierung und Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen.** Verschiedene Zellzahlen peripherer mononukleärer Blutzellen wurden in 96-Well Platten unter Zusatz der BD CD2/CD2R Antikörper über 1 Tag kultiviert. Anschließend wurde für den Kulturüberstand pro Well die IL-2 Konzentration per ELISA bestimmt.



**Abbildung 3-13. Genauigkeit der suspensionsvolumenbasierten Zellaliquotierung.** Periphere mononukleäre Blutzellen wurden in 10 ml PBS/BSA-Puffer aufgenommen und durch Vortexen im Puffer homogenisiert. Anschließend wurden die 10 ml Puffer-Zellsuspension in 10 Proben a 1 ml aufgeteilt, zentrifugiert und die Zellen mit siRNA nukleofektiert. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und jeder Probe wurde ein Aliquot gleichen Volumens entnommen, die darin enthaltene Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.5.2 Stimuluskombination CD2 Antikörper und PMA

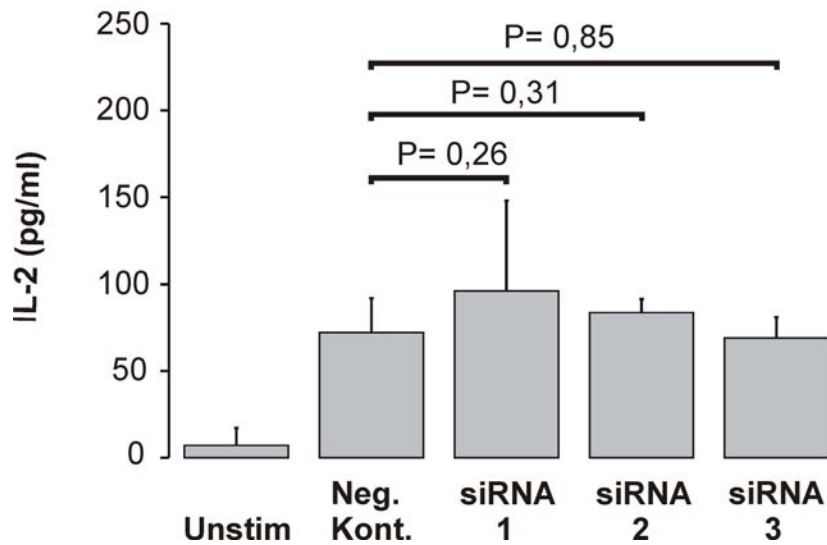


**Abbildung 3-14. Einfluß der CD2BP2-spezifischen siRNAs auf die CD2+PMA-stimulierte IL-2 Antwort .** Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit den CD2BP2-spezifischen siRNAs „siRNA-1“, „siRNA-2“, „siRNA-3“ und der Negativ-Kontroll-siRNA nukleofektiert und in 96-Well-Platten für 2 Tage kultiviert. Zur Stimulation wurden für die letzten 24 Stunden CD2/CD2R Antikörper und PMA hinzugefügt. Anschließend wurde die IL-2 Konzentration in den Kulturüberständen per ELISA bestimmt.

Die Stimulation der Zellen mit CD2/CD2R- Antikörpern und PMA führte zu einer sehr deutlichen Ansammlung von IL-2 im Kulturüberstand im Bereich von 2500- 3000 pg/ml IL-2.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den drei mit verschiedenen CD2BP2-spezifischen siRNAs behandelten Zellpopulationen wurde nicht festgestellt (Abbildung 3-14).

### 3.5.3 Stimulus CD2 Antikörper



**Abbildung 3-15. Einfluß der CD2BP2-spezifischen siRNAs auf die CD2-stimulierte IL-2 Antwort .** Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit den CD2BP2-spezifischen siRNAs „siRNA-1“, „siRNA-2“, „siRNA-3“ und der Negativ-Kontroll-siRNA nukleofektiert und in 96-Well-Platten für 2 Tage kultiviert. Zur Stimulation wurden für die letzten 24 Stunden CD2/CD2R Antikörper hinzugefügt. Anschließend wurde die IL-2 Konzentration in den Kulturüberständen per ELISA bestimmt.

Die Stimulation der Zellen mit CD2/CD2R- Antikörpern führte zu einer Ansammlung von IL-2 im Kulturüberstand im Bereich von 100 pg/ml IL-2. Unstimulierte Zellen zeigten eine IL-2 Ansammlung im Bereich von unter 10 pg/ml IL-2. Dadurch war eine ausreichend hohe Stimulierbarkeit der Zellen gegeben, um eine etwaige Reduktion der IL-2 Sekretion durch siRNA-Behandlung detektieren zu können. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den drei mit verschiedenen CD2BP2-spezifischen siRNAs behandelten Zellen konnte auch hier nicht festgestellt werden. Innerhalb der mit „siRNA-1“ behandelten Gruppe trat eine höhere Schwankung von Versuch zu Versuch auf (Abbildung 3-15).

### 3.5.4 ELISA Assay Precision

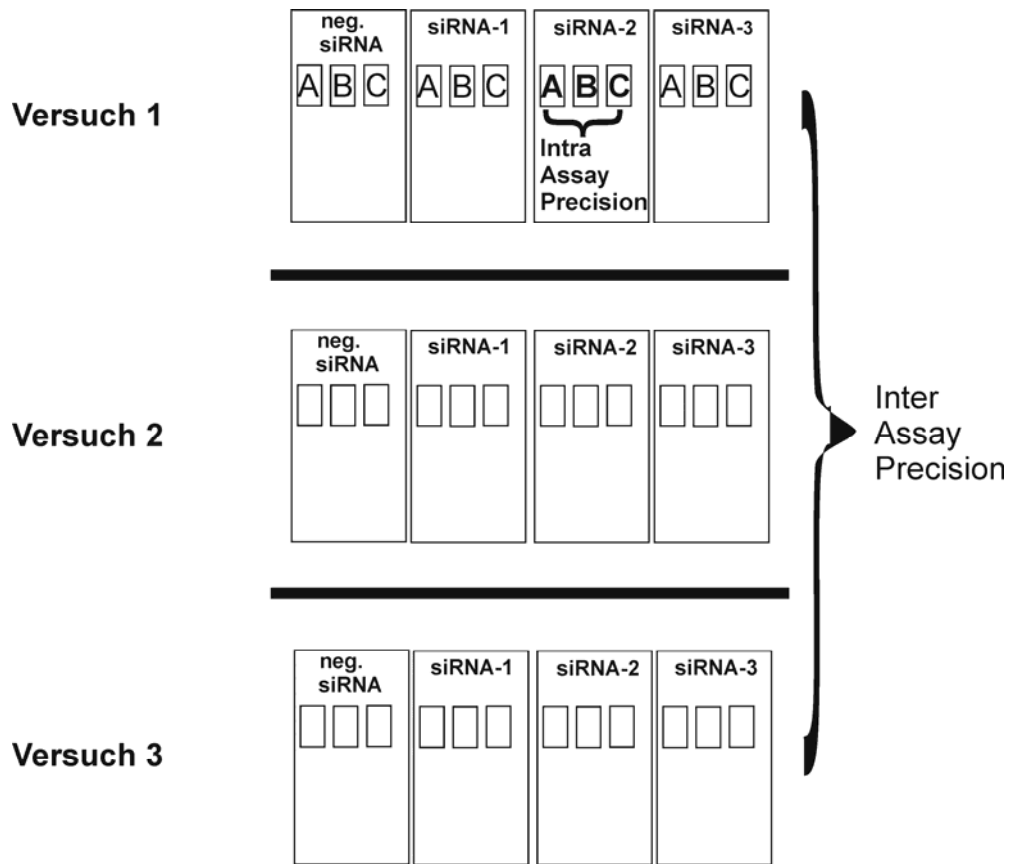
Auch für das IL-2 ELISA Meßsystem wurden Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode bestimmt.

Neben der „Inter Assay Precision“, die sich auf die Schwankungen der IL-2 Antwort zwischen vollständigen Experimenten mit Blut von unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten bezieht, wurde eine „Intra Assay Precision“ berechnet: Innerhalb eines vollständigen Experimentes wurden für eine siRNA –Behandlungsgruppe drei Aliquots gleicher Zellzahl angefertigt, die parallel nukleofektiert, stimuliert und abschließend hinsichtlich der IL-2 Antwort gemessen wurden (Abbildung 3-16).

Für die Versuchsreihe unter Verwendung der CD2/CD2R –Antikörper in Anwesenheit von PMA lagen für die Intra Assay Precision die Variationskoeffizienten im Bereich von 0,5 % bis 3,3 %, für die Inter Assay Precision wiesen die Variationskoeffizienten Werte im Bereich von 6,0 % bis 8,8 % auf (Tabelle 3-2).

Die Versuchsreihe unter alleiniger Verwendung der CD2/CD2R –Antikörper zeigte insgesamt eine geringere Intra und Inter Assay Precision als die Versuchsreihe unter Verwendung der CD2/CD2R –Antikörper in Anwesenheit von PMA. Für die Intra Assay Precision lagen die Variationskoeffizienten im Bereich von 0 % bis 27,5 %, für die Inter Assay Precision im Bereich von 7,5 % bis 52,7 % (Tabelle 3-3).

Damit zeigte die Versuchsreihe unter Verwendung der CD2/CD2R –Antikörper in Anwesenheit von PMA eine sehr gute Meßgenauigkeit und Reproduzierbarkeit. Für die Versuchsreihe unter alleiniger Verwendung der CD2/CD2R –Antikörper war die Intra Assay Precision gut. Die Inter Assay Precision der Behandlungsgruppen „Negativ Kontroll siRNA“ und der „siRNA-2“ war ebenfalls gut. Lediglich die Inter Assay Precision der Behandlungsgruppe „siRNA-1“ war mit einem Variationskoeffizienten von 52,7 % deutlich geringer als die aller anderen Behandlungsgruppen (Tabelle 3-3).



**Abbildung 3-16. Bestimmung der Intra- und Inter Assay Variabilität der IL-2 ELISA Versuche.** Für einen Versuch wurden die PBMCs in vier siRNA-Behandlungsgruppen aufgeteilt (CD2BP2-spezifische siRNAs „siRNA-1“, „siRNA-2“, „siRNA-3“ und Negativ-Kontroll-siRNA). Für jede siRNA-Behandlungsgruppe wurden drei Proben angefertigt. Alle Proben wurden mit der jeweiligen siRNA nukleofektiert, kultiviert und stimuliert. Anschließend wurde die IL-2 Konzentration im Kulturüberstand jeder Probe per ELISA bestimmt. Variabilitäten bezüglich der IL-2 Konzentrationen innerhalb einer siRNA- Behandlungsguppe eines Versuches („Intra Assay Precision“) und Variabilitäten bezüglich der IL-2 Konzentrationen einer siRNA- Behandlungsguppe über alle 3 Versuche („Inter Assay Precision“) wurden durch Berechnung von Variationskoeffizienten gekennzeichnet.



	Intra Assay Precision			Inter Assay Precision		
	Arithm. Mittelwert (pg/ml)	Standard- abweichg. (pg/ml)	Var. koeff. (%)	Arithm. Mittelwert (pg/ml)	Standard- abweichg. (pg/ml)	Var. koeff. (%)
<b>neg. siRNA</b>	3185	38	1,19	2862	252	8,82
	2832	23	0,81			
	2569	84	3,28			
<b>siRNA-1</b>	3233	17	0,54	3033	200	6,59
	2833	32	1,12			
<b>siRNA-2</b>	2870	19	0,68	2708	161	5,95
	2547	31	1,22			
<b>siRNA-3</b>	2488	58	2,32	-	-	-

**Tabelle 3-2. Berechnung der Variationskoeffizienten der CD2+PMA-stimulierten siRNA-Behandlungsgruppen.** Aus den IL-2 Konzentrationen der Proben innerhalb einer siRNA- Behandlungsgruppe eines Versuches wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus die Variationskoeffizienten gebildet, die die „Intra Assay Precision“ kennzeichnen. Aus den arithmetischen Mittelwerten der IL-2 Konzentrationen der Proben einer Behandlungsgruppe eines Versuches wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung der IL-2 Konzentrationen einer Behandlungsgruppe über mehrere Versuche berechnet und daraus Variationskoeffizienten gebildet, die die „Inter Assay Precision“ kennzeichnen.

	Intra Assay Precision			Inter Assay Precision		
	Arithm. Mittelwert (pg/ml)	Standard abweichg. (pg/ml)	Var. koeff. (%)	Arithm. Mittelwert (pg/ml)	Standard- abweichg. (pg/ml)	Var. koeff. (%)
<b>neg. siRNA</b>	46	9	19,57	68	16	23,01
	82	17	21,07			
	76	14	18,74			
<b>siRNA-1</b>	46	13	27,47	96	51	52,73
	147	5	3,40			
<b>siRNA-2</b>	78	7	8,39	84	6	7,46
	90	0	0			
<b>siRNA-3</b>	69	12	17,39	-	-	-

**Tabelle 3-3. Berechnung der Variationskoeffizienten der CD2 -stimulierten siRNA-Behandlungsgruppen.**

Aus den IL-2 Konzentrationen der Proben innerhalb einer siRNA- Behandlungsgruppe eines Versuches wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus die Variationskoeffizienten gebildet, die die „Intra Assay Precision“ kennzeichnen. Aus den arithmetischen Mittelwerten der IL-2 Konzentrationen der Proben einer Behandlungsgruppe eines Versuches wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung der IL-2 Konzentrationen einer Behandlungsgruppe über mehrere Versuche berechnet und daraus Variationskoeffizienten gebildet, die die „Inter Assay Precision“ kennzeichnen.