
4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 RNAi-Validierung

Die Anwendung der RNAi- Technik erfordert den Einsatz verschiedener Kontrollen („Whither RNAi“, Editorial in *Nature Cell Biology* 5 (6) 2003). Durch sie soll gezeigt werden, daß einerseits die Expression des Zielproteins auch tatsächlich unterdrückt wird und andererseits diese Expressionsunterdrückung auch hochspezifisch nur das Zielprotein betrifft.

Unter anderen werden folgende Kontrollen vorgeschlagen („Whither RNAi“ 2003, Hannon and Rossi 2004):

Die Verwendung einer Mismatch-Kontrolle (ein oder zwei Basenpaare der spezifischen siRNA-Sequenz sind mutiert) oder einer sogenannten „scrambled siRNA“ (Sequenz kommt im Genom des Zielorganismus überhaupt nicht vor). Beide Kontrollen sollten in ihrer Sequenz keinen ausreichenden Bezug zur Gensequenz des Zielproteins haben und somit keine spezifische RNAi-Suppression anstossen. Funktionelle Veränderungen, die in Zellen nach Behandlung mit diesen Kontroll-siRNAs gemessen werden, können somit auf andere Einflüsse als einen Gen-spezifischen RNAi-Effekt zurückgeführt werden (zum Beispiel auf den Einfluß der Elektroporation auf die Expression von Genen).

Basiskontrollen, die den „klassischen“ RNAi-Effekt absichern („Whither RNAi“ 2003). Diese Kontrollen sollen zeigen, ob sowohl die Expression des Zielproteins als auch die Expression der korrespondierenden mRNA reduziert ist. Der Nachweis der mRNA-Reduktion wird gefordert, um auszuschliessen, daß durch Anwendung der RNAi-Technik nicht die Expression endogen kodierter Micro-RNAs ausgelöst wurde. Micro-RNAs zerstören die mRNA nicht, sondern blockieren lediglich ihre Translation in ein Protein. Neben der Unterdrückung der Expression des Zielproteins können sie auch noch die Expression weiterer Proteine supprimieren und so die Spezifität der Expressionsunterdrückung deutlich einschränken (Novina and Sharp 2004).

Titrationkontrollen. Mit der Titration zum Beispiel der eingesetzten Menge an siRNA-Oligonukleotiden soll auch eine graduelle Veränderung des funktionellen RNAi-Phänotyps einhergehen. Da der RNAi-Effekt oftmals schon bei sehr geringen siRNA Konzentrationen beobachtet werden kann, wird zudem durch Verwendung kleinstmöglicher siRNA-Konzentrationen die Chance möglicher Nebeneffekte reduziert („Whither RNAi“ 2003, Hannon and Rossi 2004).

Rescue-Kontrollen. Die Expression des Zielgens soll durch eine siRNA-unempfindliche Variante wiederhergestellt werden und zu einer Wiedergewinnung der zuvor verlorenen Funktion führen („Whither RNAi“ 2003, Hannon 2004).

Multiplicity Kontrollen. Mehrere verschiedene siRNAs gegen dasselbe Zielprotein, die für verschiedene Bereiche der Gensequenz kodieren, sollen ähnliche funktionelle Effekte hervorrufen.

Es wird in der Literatur diskutiert, welche konkreten Kontrollen im Einzelfall methodisch möglich, sinnvoll und notwendig zu fordern sind („Whither RNAi“ 2003, Hannon 2004, Huppi 2005, Sandy 2005). Das Anforderungsprofil an Kontrollen für eine Studie zur Ausschaltung eines spezifischen Gens unterscheidet sich zum Beispiel deutlich von dem an eine Studie, die einen Hochdurchsatz-Screen durchführt („Whither RNAi“ 2003, Echeverri and Perrimon 2006).

Für die RNAi-Experimente der vorliegenden Arbeit wurden einige der oben genannten Kontrollen ausgewählt und angewendet. Als Negativ-Kontrolle wurde eine „Scrambled siRNA“ eingesetzt, um unspezifische Effekte abzugrenzen (zum Beispiel Induktion der Genexpression durch Elektroporation von Zellen, mögliche unspezifische Effekte von Oligonukleotiden).

Als Basiskontrolle wurde ein sogenannter Surrogatassay durchgeführt. Der Surrogatassay wird in der Literatur vorgeschlagen, wenn die endogene Expression des Zielproteins mangels spezifischer Antikörper nicht direkt untersucht werden kann (Huppi et al., 2005; Kumar et al., 2003; Sandy et al., 2005; Wu et al., 2004). Dabei wird getestet, inwieweit der spezifische RNAi-Effekt an einem mit einem Markierungsepitop überexprimierten Zielprotein nachgewiesen werden kann. Es gibt in diesem Zusammenhang Hinweise, daß siRNA, die die Überexpression des Zielproteins unterdrückt, auch zu einer Reduktion der endogenen mRNA des Zielproteins führt (Wu et al., 2004). Die Problematik einer fundierten RNAi-Validierung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein häufiges Problem, da für viele Proteine noch keine Antikörper vorliegen. So wird geschätzt, daß von den 35 000 bekannten humanen Genen 15 000 funktionell noch völlig uncharakterisiert sind (Saha 2002). Für die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, daß alle drei siRNAs die Expression des FLAG-markierten CD2BP2 in Jurkatzellen bis unter die Nachweisgrenze im Western Blot unterdrücken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in der vorliegenden Studie kein funktioneller RNAi-Phänotyp gefunden werden konnte. Somit sind Kontrollen, die eine Spezifität des RNAi-

Phänotyps untermauern, nicht notwendig geworden (zum Beispiel Titrationskontrolle, Rescue-Kontrollen). Mit Hilfe der in der Literatur vorgeschlagenen Surrogat-Strategie konnte jedoch gezeigt werden, daß die eingesetzten siRNAs die Überexpression des CD2BP2-Gens deutlich unterdrücken können. Es ist damit wahrscheinlich, daß diese siRNAs auch zum enzymatischen Abbau der endogenen mRNA von CD2BP2 führen und so seine Expression unterdrücken (Wu 2004, Huppi 2005, Sandy 2005).

4.1.2 siRNA-Transfer

Die Eignung von siRNA-Oligonukleotiden zur Suppression der Proteinexpression hängt von ihrem effizienten Transfer in die Zellen ab. Neben lipid- und peptidbasierten Transfektionsmethoden wird vielfach die Elektroporation zum siRNA Transfer eingesetzt. Grundsätzlich zeigt die Elektroporation bei bestimmten Zelltypen, die als schwer transfizierbar gelten, gute Ergebnisse (Gresch et al., 2004;Heidenreich et al., 2003) und ist zumeist gut reproduzierbar (Echeverri and Perrimon, 2006).

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter siRNA zum Abschätzen der Effizienz ihres Transfers in die Zellen ist in der Literatur vielfach dokumentiert (Chan et al., 2006;Gresch et al., 2004;Heidenreich et al., 2003). Dabei werden Transfektionsraten von 50 % (Chan et al., 2006), 80 % (Chiu 2005) oder auch nahezu 100 % (Gresch et al., 2004;Heidenreich et al., 2003;Skapenko et al., 2004) beschrieben. Die siRNA-Transfektionsrate in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ist mit den publizierten Daten anderer Arbeiten vergleichbar und beträgt ebenfalls nahezu 100 %.

4.1.3 Meßgenauigkeit und Anwendbarkeit von Zytokindurchflußzytometrie und Zytokin-ELISA in Verbindung mit RNAi- Ansätzen

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-vermittelten Zytokinantwort von T-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurde die Expression von CD2BP2 in T-Zellen spezifisch durch Anwendung der RNAi-Technik unterdrückt, um die Zellen anschließend über CD2 zu stimulieren und Zytokinantworten in der Durchflußzytometrie oder im ELISA zu messen. Die Untersuchung dieses Systems erfordert daher das Zusammenspiel von einzelnen Telexperimenten mit jeweils eigenen Meßgenauigkeiten.

Diese experimentellen Schwankungen wurden jedoch auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Im

folgenden sollen diese Aspekte diskutiert werden. Es soll aufgezeigt werden, welche Effekte prinzipiell messbar gewesen wären, wo methodische Limitierungen in der kombinierten Anwendung von RNAi-Technik und Zytokindurchflußzytometrie / Zytokin-ELISA liegen und wie die vorliegende Arbeit in den Kontext bereits publizierter, vergleichbarer Studien unter ihrem methodischen Aspekt eingeordnet werden kann.

Die Messgenauigkeit des Meßsystems Zytokindurchflußzytometrie hängt auch von der Anzahl der untersuchten Zellen ab. Um den Unterschied in den Häufigkeiten zytokinpositiver Zellen zwischen zwei Proben als signifikant bezeichnen zu können, ist eine bestimmte Anzahl durchflußzytometrisch analysierter Zellen notwendig (BD Fastimmune CFC Handbook).

Obwohl in den vorliegenden Experimenten kein reproduzierbarer Unterschied zwischen den siRNA- Behandlungsgruppen gefunden werden konnte, stellt sich die Frage, ob unter Berücksichtigung der jeweils untersuchten Zellzahlen *prinzipiell* ein Unterschied messbar gewesen wäre und wie klein dieser Unterschied hätte sein dürfen, um immer noch als statistisch signifikant angesehen werden zu können. Zur Abschätzung der notwendig zu untersuchenden Zellzahlen (N) bei gegebener Teststärke (Wahrscheinlichkeit eines Tests, eine richtige Alternativhypothese als solche zu erkennen, Weiß 2001) von 90 % und einem p-Wert von <0,05 schlägt die Firma BD einen Algorithmus vor (Formel 4-1).

$$N = \frac{2 \times \left(\frac{B + A}{100 + 100} \right) \times \left(1 - \frac{B + A}{100 + 100} \right) \times 8,6}{\left(\frac{B}{100} - \frac{A}{100} \right)^2}$$

Formel 4-1. Algorithmus zur Abschätzung der notwendig zu untersuchenden Zellzahlen in der Zytokindurchflußzytometrie, „sample size calculator“. Mit Hilfe der Formel kann bei gegebenem **A** (Anteil zytokinpositiver Zellen der Behandlungsgruppe A (zum Beispiel Negativ- Kontroll- siRNA in %) und gegebenem **B** (Anteil zytokinpositiver Zellen der Behandlungsgruppe B (zum Beispiel CD2BP2 siRNA in %) die notwendig durchflußzytometrisch zu messende Zellzahl **N** berechnet werden, bei der eine zwischen beiden Behandlungsgruppen A und B gemessene Differenz als statistisch signifikant angenommen werden kann (p< 0,05, Teststärke 90 %) (BD FastImmune CFC Handbook).

Für die explorative Messreihe wurden 10 000 Zellen pro Probe untersucht, für die tiefenanalytische Messreihe 100 000 Zellen pro Probe. Mit Hilfe des Algorithmus (Formel 4-1) lässt sich nun grob abschätzen, welche Unterschiede zwischen zwei siRNA-Behandlungsgruppen mit statistischer Signifikanz hätten potentiell gefunden werden können.

Für die Experimente der Zytokindurchflußzytometrie lag der Anteil der zytokinpositiven Zellen im Kontrollexperiment zwischen 5 % und 15 %. Basierend auf der Annahme, daß die siRNA-Behandlungsgruppe „Negativ Kontroll siRNA“ einen Anteil von 10 % zytokinpositiver Zellen aufweist, kann in der Tabelle 4-1 abgelesen werden, wie viele Zellen untersucht werden müssten, um bestimmte Unterschiede zur siRNA-Behandlungsgruppe „CD2BP2 siRNA“ als signifikant nachzuweisen.

Diesem Beispiel folgend hätte bei 10 000 untersuchten Zellen (explorative Messreihe) eine Differenz von etwa 1,2 % (10 % zu 8,8 %) oder größer als statistisch signifikant nachgewiesen werden können. Für 100 000 untersuchte Zellen (analytische Messreihe) hätte eine Differenz von etwa 0,4 % (10 % zu 9,6 %) oder größer als statistisch signifikant nachgewiesen werden können.

Behandlungsgruppe A (Negativ-Kontroll- siRNA)	Behandlungsgruppe B (CD2BP2-siRNA)	Differenz	Notwendige Zellzahl N für statistisch signifikanten Unterschied zwischen A und B
10 %	9,75%	0,25%	244 924
10%	9,65%	0,35%	124 397
10%	9,6%	0,4%	95 026
10%	9,5%	0,5%	60 540
10%	9,0%	1%	14788
10%	8,8%	1,2%	10 172
10%	8,5%	1,5%	6417
10%	7,5%	2,5%	2197
10%	5%	5%	477
10%	1%	9%	110

Tabelle 4-1. Notwendig zu untersuchende Zellzahl für die Detektion einer statistisch signifikanten Differenz in der Häufigkeit zytokinpositiver Zellen in der Zytokindurchflußzytometrie. Die Tabelle zeigt beispielhaft, welche Zellzahlen mindestens durchflußzytometrisch analysiert werden müssten, damit eine Differenz zwischen den Häufigkeiten zytokinpositiver Zellen der Untersuchungsgruppe A (hier 10 %) und der Untersuchungsgruppe B (hier 1 % bis 9,75 %) als statistisch signifikant (Teststärke 90 %, $p < 0,05$) angesehen werden kann.

Neben der zellzahlabhängigen Genauigkeit einer einzelnen Messung treten in der Zytokindurchflußzytometrie auch Schwankungen von Experiment zu Experiment auf. Diese Schwankungen können als „Inter Assay Precision“ bezeichnet werden und wurden in der vorliegenden Arbeit durch Bestimmung eines Variationskoeffizienten kontrolliert (vergleiche Material und Methoden 2.6.2).

In der analytischen Messreihe bezüglich der Frequenz CD69+IL2+ Zellen (vergleiche Abbildung 3-8) wurde für jeden Blutspender das Experiment dreimal wiederholt. Aus diesen Wiederholungen konnte der Variationskoeffizient und damit die „Inter Assay Precision“ bestimmt werden (Tabelle 3-1), um die auftretenden Schwankungen zu kontrollieren. Dabei lag der Variationskoeffizient für Blutspender A nach drei Experimentwiederholungen im Bereich von 3 bis 10,8 %, für Blutspender B im Bereich von 15,4 bis 24,5 %. Diese Werte können gut mit Daten aus einer ähnlichen Versuchsreihe der Firma Becton Dickinson verglichen werden. Hier wurden unter Verwendung des gleichen Meßsystems die Frequenzen IFN γ - positiver T Zellen bestimmt, für jeden Blutspender drei Experimentwiederholungen durchgeführt und die Variationskoeffizienten („Inter Assay Precision“) ermittelt. Sie lagen für einen Blutspender bei 14,6 %, für einen anderen Blutspender bei 32,7 % (Tabelle 3-1) (BD FastImmune CFC Handbook S.26) (Nomura et al., 2000). Anhand dieses Vergleichs kann geschlussfolgert werden, daß die Schwankungen der Experimente der Zytokindurchflußzytometrie dieser Arbeit im Bereich publizierter Daten liegen.

Darüber hinaus können die Daten dieser Arbeit mit einer anderen publizierten Arbeit verglichen werden, in der ebenfalls die Expression eines für die intrazelluläre Signalverarbeitung wichtigen Proteins (des Transkriptionsfaktors GATA-3) durch Anwendung der RNAi-Technik unterdrückt und anschließend die Zytokinantwort der Zellen in der Zytokindurchflußzytometrie untersucht wurde (Skapenko 2004). In 5 unabhängigen Experimenten konnte durch Anwendung eines zweiseitigen T-Testes ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit IL-4 positiver Zellen zwischen den siRNA-Behandlungsgruppen gefunden werden (Signifikanzniveau 0,05) (Skapenko et al., 2004). Dabei fällt auf, daß die Schwankungsbreite der Frequenzen IL-4 positiver Zellen über alle 5 Experimente mit etwa 2 bis 19 % für die Kontrollgruppe oder etwa 0,8 bis 12 % für die GATA-3 siRNA-Behandlungsgruppe vergleichsweise groß ist (Tabelle 4-2). Trotzdem konnte ein statistisch signifikanter Einfluß der GATA-3 siRNA auf die Frequenz IL-4 positiver Zellen nachgewiesen werden. Zudem ist die Paardifferenz zwischen den Werten der Kontrollgruppe/GATA-3 siRNA-Behandlungsgruppe vergleichsweise groß, was sich auch in der Differenz der Mittelwerte von etwa 3% widerspiegelt (Skapenko 2004, Tabelle 4-2).

Die Daten aus der analytischen Messreihe der vorliegenden Arbeit (Tabelle 4-2) zeigen, daß kein statistisch signifikanter Einfluß der CD2BP2 siRNAs auf die Frequenz IL2 -positiver Zellen nachgewiesen werden konnte ($p=0,096$ beziehungsweise $p=0,411$). Dabei ist in 4 von 6

Experimenten in beiden CD2BP2-siRNA-Behandlungsgruppen zwar ein leichter Anstieg der Frequenz IL-2 positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe messbar (Experiment 3-6 in Tabelle 4-2, rechte Spalte). In 2 von 6 Experimenten zeigt sich jedoch ein uneinheitliches Bild. In einem Experiment wird für die CD2BP2-siRNA-1 ein leichter Anstieg, für die siRNA-3 jedoch ein Abfall der Frequenz IL-2 positiver Zellen gemessen (Experiment 2 in Tabelle 4-2, rechte Spalte). In einem weiteren Experiment zeigte sich in beiden CD2BP2-siRNA-Behandlungsgruppen ein Abfall der Frequenz IL-2 positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe (Experiment 1 in Tabelle 4-2, rechte Spalte). Zudem ist, verglichen mit der Arbeit von Skapenko et al, die Paardifferenz zwischen den Werten der Kontrollgruppe und den CD2BP2 siRNA-Behandlungsgruppen vergleichsweise klein, was sich auch in der Differenz der Mittelwerte von etwa 1,3 % beziehungsweise 0,5 % widerspiegelt (Tabelle 4-2).

	Skapenko <i>et al</i> 2004		Vorliegende Arbeit		
	Kontrolle (% IL-4 positiver Zellen)	GATA-3 siRNA (% IL-4 positiver Zellen)	Kontrolle (% IL-2 positiver Zellen)	CD2BP2- siRNA-1 (% IL-2 positiver Zellen)	CD2BP2- siRNA-3 (% IL-2 positiver Zellen)
Experiment 1	2,2	0,8	6,8	6,5	6,0
Experiment 2	3,0	0,8	6,7	6,8	5,9
Experiment 3	5,2	3,5	5,3	6,3	5,6
Experiment 4	9,1	5,3	7,6	11,9	10,3
Experiment 5	19,2	12,0	7,4	8,9	8,5
Experiment 6	-	-	6,1	7,6	6,7
Mittelwert	7,7	4,5	6,7	8,0	7,2
Standardabweichung	6,2	4,1	0,8	1,9	1,7
Variationskoeffizient	80,4	91,6	11,6	24,1	24,0
p-Wert		< 0,05		= 0,096	= 0,411

Tabelle 4-2. Vergleich von Messreihen der Zytokindurchflußzytometrie und ihrer statistischen Kenngrößen von Skapenko et al 2004 und der vorliegenden Arbeit. In der Spalte „Skapenko et al 2004“ sind die Frequenzen IL-4 positiver T Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten (Kontrollgruppe versus GATA-3 siRNA Behandlungsgruppe) aufgelistet wie sie aus der Figure 2B dieser Publikation abgelesen werden können (Skapenko 2004). Aus diesen Frequenzen sind die im unteren Teil der Tabelle gezeigten statistischen Kenngrößen Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet worden. Der p-Wert wurde der Abbildung 2B der Publikation entnommen (Skapenko 2004). In der Spalte „Vorliegende Arbeit“ sind die Einzelwerte der Frequenzen der IL-2 positiven T Zellen aus den unabhängigen Versuchen aufgelistet, die im Kapitel 3.3 dieser Arbeit beschrieben und die im Diagramm der Abbildung 3-8 zusammenfassend dargestellt sind. Es ist zu beachten, daß die Experimente 1-3 der vorliegenden Arbeit Wiederholungsexperimente mit Blut von einem Blutspender und die Experimente 4-6 der vorliegenden Arbeit Wiederholungsexperimente mit Blut von einem weiteren Blutspender darstellen, während die Experimente 1-5 aus der Figure 2B der Publikation von Skapenko et al singuläre Experimente mit Blut von 5 verschiedenen Blutspendern repräsentieren.

In der Literatur gibt es weitere Beispiele dafür, daß mit der kombinierten Anwendung von RNAi-Technik und Durchflußzytometrie die Beteiligung intrazellulärer Proteine an der Signaltransduktion nachgewiesen werden kann. So führten der RNAi-vermittelte Knockdown der Kinase PDK-1 zu einer durchflußzytometrisch messbaren Änderung der Häufigkeit IL-2 positiver Zellen (Lee et al., 2005), während der Knockdown der Kinase LCK die Frequenz CD69-positiver Zellen reduzierte (Chan et al., 2006).

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, daß der in dieser Arbeit gewählte methodische Ansatz in der Kombination aus RNAi-Technik und Zytokindurchflußzytometrie prinzipiell geeignet ist, um die Beteiligung von Proteinen an intrazellulären Signaltransduktionsprozessen, die zu einer Zytokinantwort führen, nachzuweisen. Die methodisch bedingten Schwankungen der vorliegenden Arbeit wurden kontrolliert und liegen im Bereich publizierter Daten.

Die Schwankungen in den Experimenten der Kombination RNAi-Technik und Zytokin-ELISA wurden ebenfalls analysiert (Kapitel 3.5.4). Neben Schwankungen von Experiment zu Experiment („Inter Assay Precision“) wurden auch Schwankungen innerhalb eines Experimentes untersucht („Intra Assay Precision“), indem innerhalb einer siRNA-Behandlungsgruppe drei Aliquots gleicher Zellzahl angefertigt, mit siRNA nukleofektiert, stimuliert und kultiviert wurden. Abschließend wurden aus dem Kulturüberstand die IL-2 Mengen im ELISA bestimmt. Für die drei Aliquots einer siRNA Behandlungsgruppe konnte bezüglich der gemessenen IL-2 Werte ein Variationskoeffizient bestimmt werden.

Für die Experimente unter Verwendung von PMA und CD2-Antikörpern als Stimulus lagen die Variationskoeffizienten der Intra Assay Precision mit 0,5 bis 3,3 % und der Inter Assay Precision mit 6,0 bis 8,8 % in einem sehr niedrigen Bereich (Tabelle 3-2). Ein etwaiger Effekt der CD2BP2 siRNA hätte unter diesen geringen Schwankungen gut gemessen werden können. Im Vergleich dazu lagen für die Experimente unter alleiniger Verwendung der CD2-Antikörper als Stimulus die Variationskoeffizienten in einem höheren Bereich. Für die Intra Assay Precision wurden Variationskoeffizienten von bis zu 27,5 % bestimmt, für die Inter Assay Precision lagen die Variationskoeffizienten im Bereich von 7,5 bis 52,7 % (Tabelle 3-3). Da Variationskoeffizienten von bis zu 30 % in den Biowissenschaften als akzeptabel angesehen werden können (Weiß 2001), bewegen sich die Schwankungen für die Experimente unter alleiniger Verwendung der CD2-Antikörper als Stimulus bis auf eine Messreihe (Variationskoeffizient 52,7 %) in einem akzeptablen Rahmen. Es kann spekuliert werden, daß auch unter diesen Bedingungen prinzipiell ein Einfluß der CD2BP2-siRNA auf die sezernierte

IL-2 Menge hätte gefunden werden können, zumal eine hohe Schwankungsbreite von Experiment zu Experiment den statistisch signifikanten Nachweis des Einflusses von siRNA auf eine Zytokinantwort nicht ausschließt (Tabelle 4-2, Skapenko 2004).

Darüberhinaus gibt es in der Literatur Beispiele dafür, daß mit der kombinierten Anwendung von RNAi-Technik und Zytokin-ELISA die Beteiligung intrazellulärer Proteine an der Signaltransduktion nachgewiesen werden kann (Round et al., 2005). Der siRNA-vermittelte Knockdown des molekularen Gerüstproteins („scaffolding molecule“) Dlg1 in antigenspezifischen Maus-T-Zellen führte nach Stimulation zu einer im ELISA messbar reduzierten IL-2 Antwort. Dabei war im Vergleich zur Kontrollgruppe (etwa 15 pg/ml) die IL-2 Konzentration unter Dlg1-siRNA Einfluß reproduzierbar auf etwa 5 pg/ml reduziert. Der Einfluß der Dlg1-siRNA konnte im Bereich von 5- 15 pg/ml IL-2 reproduzierbar titriert werden.

4.1.4 PBMCs als heterogene Population

Wie andere Studien zeigen, kann die Zytokinantwort von humanen T Zellen durch die Präsenz anderer peripherer Leukozyten deutlich beeinflusst werden. Dieser Einfluß hängt auch davon ab, welche Stimuli appliziert werden. Beispielsweise löste die Stimulation mit einer Kombination aus stimulierenden CD2 und CD28 Antikörpern in der heterogenen Gruppe der PBMCs weitaus größere IL-10 – und IL-2 –Antworten aus, als bei gereinigten T-Zellen. (Schwarz et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde mit der heterogenen Zellpopulation der PBMCs gearbeitet, während andere Untersuchungen hochaufgereinigte T-Zellen verwenden, um in RNAi-Experimenten die funktionelle Rolle von intrazellulären Proteinen für die Zytokinantwort zu untersuchen (Skapenko 2004, Round 2005). Für weiterführende Untersuchungen zur Rolle von CD2BP2 könnte es interessant sein, ebenfalls hochaufgereinigte T-Zellen in RNAi-Experimenten hinsichtlich ihrer Zytokinantwort zu untersuchen. Möglicherweise führt der Knockdown von CD2BP2 zu einer moderaten Reduktion des IL-2 Signales, die durch einen deutlicheren stimulierenden Einfluß der anderen Leukozyten überlagert wird. Es ist allerdings auch zu bedenken, daß die Untersuchung hochaufgereinigter T-Zellen ein artifizielles System schafft. Im physiologischen Kontext interagieren T-Zellen ebenfalls mit anderen Leukozyten.

4.2 Auffälligkeiten bei den funktionellen Tests

Für die vorliegende Arbeit wurden CD2BP2-siRNA-behandelte PBMCs über CD2 stimuliert und die Zytokinantworten wurden in der Durchflußzytometrie und im ELISA bestimmt. Zudem wurde die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 durchflusszytometrisch untersucht. Insgesamt konnte kein deutlicher Hinweis gefunden werden, daß CD2BP2 an CD2-Signalwegen beteiligt ist, die zur Produktion von IL-2, IFN γ und IL-10 führen. Auch für eine deutliche Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-vermittelten Induktion der CD69-Expression gibt es keine Hinweise.

Im Einzelnen zeigen sich in einigen Experimenten teilweise widersprüchliche Befunde. In der ausführlichen Analyse der CD69 Expression unterscheidet sich die mit der siRNA-3 behandelte Zellpopulation statistisch signifikant von der Kontrollgruppe. Gleichzeitig gibt es aber keinen signifikanten Unterschied zwischen der siRNA-1 Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe. Theoretisch sollte die Wirkung beider siRNA-Varianten gleich sein, da beide in die Herunterregulation des Proteins CD2BP2 münden (Abbildung 3-1). Der fehlende Einfluß der siRNA-1 auf die CD2-vermittelte CD69 Expression zeigt sich ebenfalls in der explorativen Messreihe. Es kann hier spekuliert werden, daß die Unterschiede zwischen siRNA-3 Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe auf die vorhandene Schwankungsbreite der Experimente zurückzuführen ist. Um die Verhältnisse genauer aufzuklären, könnten weitere Versuche unter Einbeziehung der dritten CD2BP2-siRNA unternommen werden.

Es fällt auf, daß in den IL-2 ELISA-Experimenten unter Verwendung der Stimuluskombination CD2-Antikörper + PMA der statistische Vergleich der siRNA-1 beziehungsweise siRNA-3 Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe zu p-Werten von jeweils 0,05 führt. Damit liegen die ermittelten p- Werte genau auf der Grenze des festgelegten Signifikanzniveaus von 0,05. Es könnte also angenommen werden, daß CD2BP2 doch an der CD2-IL-2 Signaltransduktion beteiligt ist- wenn auch nicht in entscheidendem Umfang. Allerdings sind die Veränderungen in den beiden Behandlungsgruppen siRNA-1 und siRNA-3 nicht gleichsinnig. In der siRNA-1 Behandlungsgruppe kommt es zu einer Erhöhung, in der siRNA-3 Behandlungsgruppe dagegen zu einer Verminderung der IL-2 Antwort verglichen mit der Kontrollgruppe.

Auffällig erscheinen ebenfalls die unterschiedlichen Streuungen der Fluoreszenzintensitäten der Fluoreszenzsignale in der Durchflußzytometrie für die Zytokine IL-2, IFN γ und IL-10 (Abbildung 3-4 B). Während für IL-2 und IFN- γ ein großer Teil der Population mehr als 10- fach

höhere Intensitäten nach Stimulation aufweist, unterscheidet sie sich im Falle des IL-10 nur wenig von der Intensität der unstimulierten Zellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß mit der Verwendung von CD2-Antikörpern und PMA keine optimale Stimulation hinsichtlich der IL-10 Antwort erreicht wurde. Ein möglicher Einfluß der CD2BP2 siRNA auf die IL-10 Antwort ist bei suboptimaler IL-10 Antwort sicher schwerer nachzuweisen. Insofern kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden, das CD2BP2 am CD2- IL-10 Signalweg beteiligt ist.

Die PBMCs wurden mit CD2-Antikörpern in Anwesenheit von PMA stimuliert. In anderen Untersuchungen konnte beobachtet werden, daß das Ausmaß der Zytokinantwort nach Antikörperstimulation von humanen T-Zellen sehr deutlich von der Anwesenheit von PMA abhängen kann. Dabei kann die PMA-Zugabe die Antwort bestimmter Zytokine verstärken (IL-2, IFN- γ) (Chang et al., 1989; Schwarz et al., 1995), die Antwort anderer Zytokine wie IL-10 oder IL-4 wird hingegen durch PMA erheblich gemindert (Schwarz et al., 1995). Bei der Interpretation der vorliegenden Arbeit muß deswegen berücksichtigt werden, daß ein Teil der Untersuchungen unter Verwendung von PMA als Stimulus durchgeführt wurde, welches das CD2 Signal überdecken kann. Für einen Teil der ELISA-Experimente zur Untersuchung der IL-2 Antwort wurde auf PMA als Kostimulus verzichtet. Es wurden lediglich CD2 Antikörper zur Stimulation verwendet. Dabei konnte kein deutlicher Einfluß der CD2BP2 siRNA auf die IL-2 Antwort gemessen werden. Für sämtliche durchflußzytometrischen Untersuchungen bezüglich der Expression von CD69, IL-2, IFN- γ und IL-10 wurde jedoch PMA als Kostimulus verwendet. Für weitergehende Untersuchungen könnte versucht werden, alternative CD2 Stimulationmodelle zu verwenden (zum Beispiel Modelle zur Stimulation über den CD2-Liganden CD58 und den T-Zellrezeptor).

4.3 Zelluläre Funktionen von CD2BP2

4.3.1 Rolle von CD2BP2 im CD2- Signalweg von T Zellen

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung von CD2BP2 am CD2-IL-2 Signalweg nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren Ergebnisse vorheriger Arbeiten kompatibel mit einer Funktion des CD2BP2 in der T-Zell-Signaltransduktion (Nishizawa 1998, Freund 2002). Prinzipiell wäre es denkbar, daß die vorliegende Arbeit eine tatsächliche Beteiligung von CD2BP2 am CD2-IL2 Signalweg aufgrund bestimmter methodischer

Limitationen nicht nachweisen konnte. Andererseits wäre es jedoch auch möglich, daß die Ergebnisse der Experimente der vorhergehenden Arbeiten zu weitgehend interpretiert wurden.

Die initiale Hypothese, daß CD2BP2 in T Zellen mit CD2 interagieren könnte und dadurch Signale weiterleitet, die zu einer IL-2 Ausschüttung führen, wurde in der Publikation von Nishizawa et al hergeleitet (Nishizawa 1998). Flag-markiertes CD2BP2 wurde in Jurkatzellen überexprimiert und konnte mit CD2 koimmunopräzipitiert werden. Einerseits könnte durch die Überexpression die natürliche Stöchiometrie gestört worden sein und überschüssiges Protein könnte in Zellkompartimente vorgedrungen sein, in denen es unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommt. Andererseits wurde von den Jurkatzellen ein Zell-Lysat angefertigt, bei dem die natürliche Kompartimentierung der Zellen zerstört wird. Insofern wäre es denkbar, daß CD2 und CD2BP2 erst unter den artifiziellen Bedingungen der Überexpression und der Zell-Lyse räumlich in Kontakt kommen konnten und dann miteinander wechselwirkten. Möglicherweise wurde mit diesen Experimenten lediglich gezeigt, daß CD2BP2 und CD2 potentiell miteinander interagieren können. Ob dies unter physiologischen Bedingungen tatsächlich passiert, bliebe dabei aber offen. Zur funktionellen Charakterisierung der CD2-CD2BP2 Interaktion wurde ein Fragment von CD2BP2, welches lediglich die isolierte GYF- Domäne umfasste, in den Jurkatzellen überexprimiert. Nach CD2-Stimulation konnte eine Erhöhung der IL-2 Produktion im Vergleich zu Jurkatzellen, in denen dieses CD2BP2-Fragment nicht überexprimiert wurde, gemessen werden. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, daß sich die Lokalisation der isolierten GYF-Domäne von der des Gesamtproteins unterscheiden könnte. Dadurch könnten andere Bindungspartner gebunden werden, die für den gemessenen Effekt der IL-2 Erhöhung verantwortlich sind. Überdies ist zu beachten, daß sich Jurkatzellen und primäre T-Zellen in wichtigen Merkmalen unterscheiden. So werden zum Beispiel in Jurkatzellen die Phosphatasen PTEN und SHIP nicht exprimiert, die in primären T-Zellen eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion übernehmen (Astoul et al., 2001). Insofern wäre es denkbar, daß die Befunde von Nishizawa et al spezifisch auf die Verhältnisse in der Tumorzelllinie Jurkat zutreffen und nicht auf primäre T Zellen übertragbar sind.

Nach Untersuchungen zur Lipid Raft Assoziation von CD2BP2 , CD2 und Fyn wurde ein Modell vorgeschlagen, daß den Befund der IL-2 Erhöhung nach CD2BP2-GYF Überexpression (Nishizawa 1998) in eine Rolle von CD2BP2 in der Raft-assoziierten Signalweiterleitung integriert (Freund 2002). Im Gegensatz zu CD2 und Fyn konnte CD2BP2 nicht in der für die Signalweiterleitung als wichtig postulierten Raft-Fraktion gefunden werden. Es wurde daher

vorgeschlagen, daß CD2BP2 CD2 zunächst außerhalb der Rafts verankert. Erst nach CD2 Stimulation würde CD2 aus der CD2BP2-vermittelten Verankerung gelöst und transloziert in die Rafts. Dort könnte CD2 mit Fyn interagieren und auf diese Weise eine IL-2 Ausschüttung vermitteln. Die überexprimierte isolierte GYF-Domäne würde nach dieser Vorstellung das endogene CD2BP2 aus seiner CD2-Bindung verdrängen und dadurch CD2 aus seiner Verankerung lösen. CD2 könnte dann in die Rafts wandern und dort die IL-2 Ausschüttung initiieren (Freund 2002).

Diese Modellvorstellung wird jedoch durch andere Befunde in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die CD2 –Raft-Assoziation unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von CD2 stattfindet (Yang and Reinherz 2001). Da CD2BP2 jedoch mit der zytoplasmatischen Domäne von CD2 interagiert (Nishizawa 1998) kann es auf diese Weise die Raft-Assoziation von CD2 nicht beeinflussen. Grundsätzlich wird auch die Bedeutung des Modells der Lipid Rafts für die Signalweiterleitung in T-Zellen in Frage gestellt (Heerklotz 2002, Munro 2003, Douglass and Vale 2005).

4.3.2 CD2BP2 als Bestandteil des Spliceosomes

Unabhängig von seiner späteren Charakterisierung als CD2-bindendes Protein wurde CD2BP2 bereits 1989/ 1991 beschrieben (Bach et al., 1989; Behrens and Luhrmann, 1991). Dort konnte es als Bestandteil des 20 S U5 snRNP Proteinkomplexes identifiziert werden und zeigte auf dem SDS-Gel eine augenscheinliche Größe von 52 KDa. Aus diesen Gründen wurde es dort als „U5-52K“ –Protein bezeichnet. Später wurde erkannt, daß CD2BP2 und U5-52K identisch sind (Hartmuth et al 2002). Der 20 S U5 snRNP Proteinkomplex ist Bestandteil des sogenannten „Spliceosomes“, einem funktionellen Modul bestehend aus snRNAs und Proteinen. In diesem Proteinnetzwerk findet der RNA-Splicing Prozeß statt.

Es konnte gezeigt werden, das CD2BP2/U5-52K innerhalb des U5 snRNP Proteinkomplexes mit den Proteinen U5-15K und U5-102K interagieren kann. Dabei interagiert die N-terminale Hälfte von CD2BP2/U5-52K (Aminosäuren 1-255, enthält die C-terminale GYF-Domäne *nicht*) mit dem U5-102K Protein, nicht jedoch mit dem U5-15K Protein. Die C-terminale Hälfte von CD2BP2/U5-52K (Aminosäuren 256-341, enthält die C-terminale GYF-Domäne) interagiert hingegen mit dem U5-15K Protein, nicht jedoch mit dem U5-102K Protein. Da U5-52K offenbar über zwei unterschiedliche Domänen mit den Proteinen U5-15K und U5-102K interagiert,

könnten diese Interaktionen simultan erfolgen (Laggerbauer 2005).

Überdies gibt es Hinweise, daß CD2BP2/U5-52K mit weiteren Proteinen interagieren kann, die am Splicing beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, daß CD2BP2 und auch die isolierte CD2BP2-GYF Domäne mit SmB interagieren können (Kofler 2004, Kofler 2005). SmB ist als wichtiges Splicing-Protein bekannt (Will and Lührmann 2001). Des weiteren wurde nachgewiesen, daß CD2BP2 mit dem Protein NPWBP interagieren kann (Kofler 2005). NPWBP ist als Komponente des U4/U6 snRNP ebenfalls Bestandteil des Spliceosomes (Makarova 2004).

Während des Splicings interagieren verschiedene Proteinkomplexe in einem sehr dynamischen Prozess miteinander. Während dieses Prozesses entstehen eine Reihe von Proteinkomplex-Intermediaten, die intensiven Umbauvorgängen unterworfen sind, bis schließlich das endgültige, katalytisch aktive Spliceosome entstanden ist. Zu einem frühen Zeitpunkt, nach Anlagerung von U1 an die 5'-Splicing-Position und U2 an die Verzweigungsstelle (Prespliceosome), verbinden sich die U4-, U6- und U5 snRNPs – zu einem sogenannten U4/U6.U5 tri-snRNP-Komplex der an das Prespliceosom bindet und zur Ausbildung von Komplex B führt. Die Aufreinigung des U5 snRNP-Komplexes führte unter anderem zur Identifikation von CD2BP2/U5-52K als einem seiner Bestandteile. Im U4/U6.U5 tri-snRNP-Komplex konnte CD2BP2/U5-15K jedoch zunächst nicht mehr nachgewiesen werden. Deshalb wurde spekuliert, daß CD2BP2/U5-52K die Assemblierung des U4/U6.U5 tri-snRNP-Komplexes zwar unterstützt, während dieses Prozesses aber den tri-snRNP-Komplex verlässt (Laggerbauer 2005). In einer neueren Studie konnte CD2BP2/U5-52K jedoch als Teil des B-Komplexes isoliert werden (Deckert 2006). Die vorherige Aufreinigung des U4/U6.U5 tri-snRNP-Komplexes erfolgte unter Verwendung von Heparin (Laggerbauer 2005), wohingegen für die Aufreinigung des gesamten B-Komplexes mildere Reinigungsbedingungen ohne Heparin gewählt wurden (Deckert 2006). Es wird nun spekuliert, daß das Fehlen von U5-52K im U4/U6.U5 tri-snRNP-Komplex darauf zurückzuführen ist, daß es durch die stringenteren Reinigungsbedingungen unter Verwendung von Heparin aus dem Komplex herausgelöst wurde (Deckert 2006). In Übereinstimmung mit einer Funktion beim Splicing steht auch die bisher unter bestimmten experimentellen Bedingungen gefundene nukleäre Lokalisation von CD2BP2/U5-52K. So konnte endogenes CD2BP2/U5-52K im Zellkern von HeLa Zellen beobachtet werden (Laggerbauer et al., 2005). Überexprimiertes CD2BP2/U5-52K wurde im Kern von HeLa und Jurkat Zellen nachgewiesen (Kofler et al., 2004).

4.3.3 CD2BP2- Ein Protein mit diversen zellulären Funktionen ?

Neben CD2BP2/U5-52K gibt es noch weitere Proteine, die initial als CD2 Bindungspartner beschrieben wurden und denen durch weitergehende Untersuchungen CD2-unabhängige Funktionen zugeordnet werden konnten. Ähnlich CD2BP2 wurde das Protein CD2AP in einem Hefe-Two-Hybrid Screen mit CD2 als Köder-Protein (bait) aus einer gewebsspezifischen cDNA-Bibliothek isoliert (Dustin et al., 1998; Nishizawa et al., 1998). Northern Blot Analyse zeigte für beide Proteine, daß ihre mRNAs nicht nur in hämatopoetischen Zellen vorkommen sondern ebenfalls in einer Reihe anderer Gewebe. Inzwischen sind verschiedene Funktionen von CD2AP bekannt. Einige dieser Funktionen beziehen sich auf T –Zellen, andere nicht: So vermittelt CD2AP das Clustering von CD2 und die Polarisation von T-Zellen (Dustin 1998) In bestimmten Nierenzellen (Podozyten) interagiert CD2AP mit Proteinen wie Nephrin und Podocin und beteiligt sich darüber an der strukturellen Organisation dieser Zellen, indem es seine Bindungspartner mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (Schwarz 2001). Ebenfalls in Podozyten ist eine Bindung an die PI3-Kinase und eine damit einhergehende AKT Aktivierung gezeigt worden (Huber 2003).

Obwohl CD2BP2/U5-52K Teil des Spliceosomes ist, zeigen bestimmte Untersuchungen jedoch auch, daß Ribonucleoproteine unter ausgewählten physiologischen Bedingungen nicht ausschließlich im Zellkern lokalisiert sein müssen und auch Funktionen haben können, die über das Splicing hinausgehen. So wurden Splicing-assoziierte Proteine etwa in den sogenannten spreading association centers („SIC’s) gefunden. Diese SIC’s bilden sich in der frühen Phase eines Kontaktes zwischen Zelle und einer Matrix und wurden nur in primären Zellen beobachtet. Konkret enthielten die SIC’s bisher als Ribonucleoproteine bekannte Proteine wie hnRNP-E oder SmB. Von SmB ist bekannt, daß es eine wichtige strukturelle Rolle für die räumliche Organisation des Spliceosomes hat, wobei ihm selbst keine enzymatische Funktion zukommt. Zugleich fehlten den SICs jedoch wichtige Bestandteile des Spliceosomes, so daß es unwahrscheinlich ist, daß die Ribonucleoproteine der SICs dem Splicing dienen. Es kann spekuliert werden, daß Ribonucleoproteine nicht nur innerhalb der Spliceosomes an der räumlichen Organisation von Proteinkomplexen beteiligt sind, sondern solche Aufgaben auch in einem anderen funktionellen Kontext erfüllen. Eine solche Rolle als strukturelles Gerüstprotein (Adaptorprotein oder Scaffolding Protein) könnte unter Umständen auch CD2BP2/U5-52K zukommen, zumal gezeigt werden konnte, daß die GYF-Domäne von CD2BP2/U5-52K im zellulären Kontext mit SmB interagieren kann (Kofler et al., 2004). In diesem Zusammenhang

gibt es auch Befunde, daß Ribonucleoproteine die Faltung von Proteinen unterstützen können (Meli 2001).

4.3.4 Ausblick

Durch die vorliegende Arbeit konnten keine weiteren Hinweise auf eine Beteiligung von CD2BP2 am CD2 Signalweg gefunden werden. Nach Knockdown von endogenem CD2BP2 in primären T-Zellen änderten sich nach CD2-Stimulation funktionelle Parameter wie der frühe Aktivierungsmarker CD69 und die Produktion verschiedener Zytokine wie IL-2, IFN- γ und IL-10 nicht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-Signaltransduktion unter anderen experimentellen Bedingungen nachweisbar wird. So wäre es zum Beispiel denkbar, hochaufgereinigte T-Zellen mit siRNA zu transfizieren und über antigenpräsentierende Zellen zu stimulieren. Entwicklung und Einsatz gut charakterisierter Antikörper gegen CD2BP2 könnten Lokalisationsstudien in primären Zellen ermöglichen. Neben der Möglichkeit einer Beteiligung von CD2BP2 an der CD2-Signaltransduktion dürfte die weitere Erforschung seiner Rolle im Splicing neue Erkenntnisse über die funktionelle Rolle von CD2BP2 erbringen.