

**Charakterisierung der Expression, Regulation und
Funktion des nukleären Hormon Rezeptors
Peroxisom Proliferator Aktivator Rezeptor delta
in humanen T Lymphozyten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Nadya Al-Yacoub

(aus Berlin)

Berlin, März 2008

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Petra Knaus

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Susann Schweiger

Disputation am 02.09.2008

-INHALTSVERZEICHNIS

<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>5</u>
1.1. PSORIASIS.....	5
1.1.1. DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE.....	5
1.1.2. HISTOLOGISCHE MERKMALE.....	6
1.1.3. IMMUNOPATHOGENESE	6
1.1.4. AKTIVIERUNG PSORIATISCHER T-LYMPHOZYTEN	9
1.2. PEROXISOM PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR δ	10
1.2.1. EXPRESSION UND FUNKTION	10
1.2.2. PPAR δ STRUKTUR UND LIGANDEN-ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG	12
1.2.3. DIE PPAR δ EXPRESSION IN DER HAUT	14
1.3. LENTIVIRAL VERMITTELTE RNA-INTERFERENZ.....	16
1.3.1. RNA-INTERFERENZ.....	16
1.3.2. DAS PRINZIP DER RETROVIRAL VERMITTELTEN siRNA.....	17
1.3.3. DAS LENTIVIRAL BASIERENDE SYSTEM	18
1.3.4. AUFBAU REPLIKATIONSINKOMPETENTER LENTIVIRALER VEKTOREN.....	20
1.3.5. OFF-TARGET-EFFEKTE	22
1.4. PROBLEMSTELLUNG	24
<u>2. MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN</u>	<u>25</u>
2.1. MATERIALIEN UND GERÄTE.....	25
2.2. KITS.....	26
2.3. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	26
2.4. ANTIKÖRPER ZUR ZELLISOLIERUNG- UND ANALYSE.....	28
2.5. ANTIKÖRPER.....	29
2.6. MEDIEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR.....	29
2.7. OLIGONUKLEOTIDE	30
2.7.1. PRIMER FÜR DIE PCR	30
2.7.2. shRNA-NUKLEOTIDE	30
2.8. VEKTOREN	31
2.9. BAKTERIENSTÄMME	31

2.10. HUMANE ZELLINIEN	31
2.11. PUFFER UND LÖSUNGEN	32
<u>3. METHODEN</u>	<u>33</u>
3.1. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.1.1. KULTIVIERUNG VON <i>E-COLI</i>	33
3.1.2. HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	33
3.1.3. TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN	34
3.1.4. HERSTELLUNG VON GLYCEROLSTOCKS.....	34
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	35
3.2.1. NUKLEINSÄURE-ANALYTIK.....	35
3.2.1.1 <i>Isolierung von Plasmid DNA</i>	35
3.2.1.2 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	35
3.2.1.3 <i>Restriktionsverdau von DNA</i>	36
3.2.1.4. <i>Dephosphorylierung von DNA mit CIAP</i>	36
3.2.1.5. <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	37
3.2.1.6. <i>Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	37
3.2.2. HERSTELLUNG VON shRNA-LENTIVektoren.....	38
3.2.2.1. <i>Herstellung der shRNA-Oligonukleotide</i>	38
3.2.2.2. <i>Phosphorylierung von DNA-Fragmenten</i>	38
3.2.2.3. <i>Ligation von zwei DNA-Fragmenten</i>	39
3.2.3. ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS ZELLMATERIAL	39
3.2.4. cDNA-SYNTHESE MIT REVERSE TRANSKRIPTASE	39
3.2.5. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	40
3.3. PROTEIN-ANALYTIK	41
3.3.1. PROTEIN-ISOLIERUNG	41
3.3.2. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	42
3.3.3. DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)..	42
3.3.4. WESTERNBLOT	43
3.4. ZELLKULTUR	44
3.4.1. KULTIVIERUNG UND PASSAGIERUNG VON ZELLEN.....	44
3.4.2. NEUBAUER ZÄHLKAMMER	45
3.4.3. KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN	45
3.4.4. ZELLPROLIFERATION-BESTIMMUNG.....	46

3.4.5.	PROLIFERATIONSUNTERSUCHUNG MITTELS MTS-ASSAY	46
3.4.6.	ISOLIERUNG VON PRIMÄREN T-ZELLEN AUS HAUTPROBEN	47
3.4.7.	ISOLIERUNG VON LYMPHOZYTEN AUS VOLLBLUT	47
3.4.7.1.	<i>Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut</i>	47
3.4.7.2.	<i>Isolierung von CD3+ T-Zellen durch MACS aus PBMCs</i>	48
3.4.7.3.	<i>Positive Sortierung von CD3+ T-Zellen</i>	48
3.4.7.4.	<i>Anreicherung von CD3+ T-Zellen durch Depletion</i>	49
3.4.8.	METHODEN ZUR ANALYSE DER APOPTOSE.....	49
3.4.9.	NACHWEIS DER APOTOTISCHEN ZELLEN DURCH ANNEXIN V –FÄRBUNG	50
3.4.10.	ZELLYKLUSPROFILANALYSE MITTELS PROPIDIUMIODID-FÄRBUNG.....	50
3.4.11.	DURCHFLUßZYTOMETRIE	51
3.4.12.	PRODUKTION LENTIVIRALER PARTIKEL.....	52
3.4.12.1.	<i>Calciumphosphat-Transfektion von 293HEK-Zellen</i>	52
3.4.12.2.	<i>Titerbestimmung</i>	54
3.4.12.3.	<i>Infektion von Zellen</i>	55
3.4.12.4.	<i>Anreicherung viraler Partikel</i>	56
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	57
4.1.	OPTIMIERUNG DER PRODUKTION UND ANREICHERUNG LENTIVIRALER VEKTOREN.	57
4.1.1.	OPTIMIERUNG DER LENTIVIRUS PRODUKTION.....	57
4.1.2.	OPTIMIERUNG DER VIRUS-AUKONZENTRIERUNG MITTELS ULTRAZENTRIFUGATION ...	63
4.2.	PPARδ IN HUMANEN T-LYMPHOZYTEN	65
4.2.1.	EXPRESSION VON PPAR δ IN HUMANEN T-LYMPHOZYTEN.....	65
4.2.2.	TYP I INTERFERON VERMITTELT DIE INDUKTION VON PPAR δ	67
4.2.3.	PROLIFERATION HUMANER T-ZELLEN INFOLGE VON PPAR δ AKTIVIERUNG.....	71
4.2.4.	PPAR δ UND APOPTOSE IN HUMANEN T-ZELLEN.....	75
4.2.4.1.	<i>PPARδ schützt vor IFNα induzierter Apoptose in T-Zellen</i>	75
4.2.4.2.	<i>PPARδ schützt vor Serumentzug nicht aber vor Fas-induzierter Apoptose</i>	80
4.2.5.	MECHANISMUS DER ANTI-APOPTOTISCHEN AKTIVITÄT VON PPAR δ IN T-ZELLEN	82

<u>5. DISKUSSION</u>	<u>86</u>
5.1. LENTIVIRAL VERMITTELTE RNA-INTERFERENZ.....	86
5.2. EXPRESSION UND FUNKTION VON PPAR δ IN HUMANEN T-LYMPHOZYTEN	91
5.2.1. EXPRESSION UND INDUKTION VON PPAR δ IN HUMANEN T-LYMPHOZYTEN	92
5.2.2. BIOLOGISCHE FUNKTION VON PPAR δ IN HUMANEN T-LYMPHOZYTEN	93
<u>6. SUMMARY.....</u>	<u>100</u>
<u>7. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>102</u>
<u>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>104</u>
<u>9. LITERATUR.....</u>	<u>106</u>
I. PUBLIKATIONEN	121
II. DANKSAGUNGEN.....	122
II. ERKLÄRUNG.....	123

1. Einleitung

1.1. Psoriasis

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Die Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine erbliche und häufige Hauterkrankung, die mit Rötung und Schuppung der Haut einhergeht. Die Prävalenzrate in den westlichen Ländern wird mit 2% angegeben [Lowe et al., 2007]. Psoriasis ist im Wesentlichen durch scharf, aber meist unregelmäßige begrenzte rötliche Papeln und Plaques, welche mit silbrig-glänzenden Schuppen bedeckt sind, gekennzeichnet. Neben der Haut können auch Gelenke, Zehen-/ Fingernägel und Schleimhäute befallen sein (<http://www.springer.com/978-3-540-00332-8>).

Psoriasis wird in zwei unterschiedliche Typen unterteilt. Die Typ I- Psoriasis manifestiert sich vor dem 40. Lebensjahr, weist eine familiäre Prädisposition sowie einen schwerwiegenden klinischen Verlauf auf. Beim Typ I besteht eine hohe Assoziation mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-Cw6 und HLA-DR7 und seltener eine Assoziation zu HLA-B13 und HLA-B17 [Krueger and Bowcock, 2005].

Die Typ II-Psoriasis tritt hingegen im späteren Erwachsenenalter auf und ist durch eine geringe HLA-Kopplung, der fehlenden familiären Prädisposition sowie einer leichteren Verlaufsform der Erkrankung gekennzeichnet

Bei der Psoriasis handelt es sich um eine poly- und heterogenetische Erkrankung, an deren Entstehung sowohl genetische Faktoren als auch andere Auslöser beteiligt sind [Krueger and Bowcock, 2005]. Auch wenn vermutet wird, dass zwischen 10-20 verschiedene Genloci auf unterschiedlichen Chromosomen mit Psoriasis assoziiert sind, konnten bis heute 9 identifiziert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>). Ferner kommen verschiedene andere mögliche Psoriasis-Genorte, wie z.B. 16q und 20p [Elder, 2005] in Frage. Liegt eine genetische Prädisposition vor, können verschiedene endo- und exogene Faktoren zum Ausbruch der Krankheit führen.

Zu den Auslöseren/Triggern zählen unter anderem bestimmte Medikamente, Stress und Entzündungen [Ockenfels, 2003].

Außerdem können Hautläsionen auch durch mechanische Manipulation entstehen, bekannt als *Köbner-Phänomen* [Holzmann et al., 1974]. Ein weiterer wichtiger Auslöser sind Streptokokkeninfekte, insbesondere Infektion der oberen Atemwege, die die *Guttata*-Form der Psoriasis auslösen können [Weisenseel et al., 2002]. Ob und wann das Zusammentreffen von exogenen Triggern und genetischer Veranlagung auch tatsächlich zum Ausbruch der Erkrankung führt, ist bis heute weitestgehend ungeklärt.

1.1.2. Histologische Merkmale

Die phänotypisch, unterschiedlichen Formen der Psoriasis weisen einheitliche histopathologische Merkmale auf. Im Vordergrund stehen die Merkmale einer Entzündung, charakterisiert durch aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen, die sich in der Epidermis und der oberen Dermis befinden. Ein weiteres Merkmal sind die hyperproliferativen Keratinozyten mit zehnfach erhöhter Zellteilungsrate, die zur starken Verdickung der Epidermis führen (Hyperkeratose) und eine massive Ansammlung unreifer Hautzellen an der Oberfläche zur Folge haben, die als Schuppen sichtbar werden. Die veränderte Differenzierung führt zudem zu einem Verlust der Granular-Schicht der Epidermis. Neben einer Hyperproliferation der Keratinozyten kommt es bei der Psoriasis auch zur Akkumulation neutrophiler Granulozyten in den oberen Epidermisschichten; dies führt zu Bildung von Mikroabzessen. Die Rötung der betroffenen Hautläsionen ist auf die Weitstellung der kleinen Blutgefäße in diesen Arealen zurückzuführen. Durch diese Gefäßveränderung gelangen vermehrt Zellen des Immunsystems in die Haut (<http://www.springer.com/978-3-540-00332-8>).

1.1.3. Immunopathogenese

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis zur Pathogenese der Psoriasis entschieden verändert. Viele Beobachtungen deuten darauf hin, dass T-Zellen maßgeblich bei der Psoriasis beteiligt sind [Gaspari, 2006; Prinz, 2003].

Die Applikation von immunsuppressiven Medikamenten wie Alefacept, ein Fusionsprotein welches die T-Zell Aktivierung hemmt [Ellis and Krueger, 2001], und

DAB₃₈₉-IL-2 führt zu einer Beseitigung der psoriatischen Plaques. Letzteres enthält eine Untereinheit des Diphtherietoxins und kann so nach der Bindung an aktivierte T-Lymphozyten deren Zelltod auslösen [Gottlieb et al., 1995]. Alefacept dagegen blockiert die Signalübertragung zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen und verringert zusätzlich die Zahl der T-Gedächtniszellen. Mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen wurden im zellulären Entzündungsinfiltrat psoriatischer Läsionen sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, die auf ihrer Oberfläche die Aktivierungsmarker CD25, CD27 und den T-Gedächtniszellen-spezifischen Marker CD45-RO [Bos et al., 1989; Prinz, 2003; Sabat et al., 2007] exprimieren.

Weitere wichtige Hinweise für die pathogenetische Bedeutung der T-Zellen liefert die Transplantationsmedizin. Die Arbeitsgruppe von *Adkins et al* konnte zeigen, dass es zur Abheilung der Erkrankung nach Transplantation von Knochenmark gesunder Spender kam [Adkins et al., 2000]. Umgekehrt führte die Transplantation von Knochenmark psoriatischer Spender in gesunde Empfänger zum Ausbruch der Psoriasis bei diesen [Yokota et al., 1996]. Diese Beobachtungen wurden durch Tierversuche an immundefizienten SCID-Mäusen (**s**evere **c**omind **i**mmundeficiency) unterstützt. SCID-Mäuse denen nicht läsionale Haut von Psoriatikern transplantiert wurde, blieben symptomfrei. Erst die Injektion von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, die aus Patientenblut isoliert wurden, induzierte den Ausbruch der Psoriasis im Bereich der Transplantate [Nickoloff and Wrone-Smith, 1999; Wrone-Smith and Nickoloff, 1996]. Unklar bleibt, ob der durch die Lymphozyten verursachte Phänotyp auf die CD4⁺ (überwiegend in der Dermis lokalisiert) [Szabo et al., 1998] oder CD8⁺ T-Zellpopulation (vorwiegend in der Epidermis zu finden) [Pauls et al., 2001; Szabo et al., 1998] zurückzuführen ist. Es wird vermutet, dass beide Zellpopulationen eine bedeutende Rolle spielen, wobei die CD8⁺ T-Zellen funktionell von den CD4⁺ T-Zellen abhängig sind. Die therapeutische Wirkung von anti-CD4-Antikörper deutet auf die Schlüsselrolle von CD4⁺ T Zellen hin [Gottlieb et al., 2000]. Andererseits sprechen auch einige Daten für die Relevanz von CD8⁺ T-Zellen hin [Austin et al., 1998; Kohlmann et al., 2004].

Die pathologischen Hautveränderungen werden durch Sekretion eines besonderen Zytokinmusters vermittelt. Ist die Sekretion eines Botenstoffes einmal angestoßen, wird im Rahmen der Kettenreaktion einer Entzündung die Sekretion weiterer Zytokine

ausgelöst. Die Sekretion bestimmter Interleukine (IL-3, IL-6, IL-19, IL-20, IL-22, IL-17) sowie $\text{IFN}\gamma$ und des **Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktors** (GM-CSF) ist für die gesteigerte Keratinozytenproliferation verantwortlich [Krueger et al., 1990; Lowes et al., 2007]. Die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ bei gleichzeitigem Fehlen von IL-4 (Interleukin 4) deutet auf eine TH-1-Prägung psoriatischer T-Lymphozyten hin. Dadurch sind in der Epidermis nur Zytokine anzutreffen, die für diesen Subtyp charakteristisch sind, sowie IL-2, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ [Barna et al., 1997; Schlaak et al., 1994]. Die β -Defensin Produktion durch Keratinozyten wird von $\text{TNF}\alpha$ initiiert. Die Keratinozyten ihrerseits werden zur Produktion von Zytokine wie das **platelet-derived-growthfactor** (PDGF) angeregt, die das Wachstum weiterer Hautzellen unterstützen [Krane et al., 1991; Prinz, 2001]. Die Zytokine fördern wiederum in einem autokrinen Mechanismus ihre eigene Sekretion, womit die Entzündung verstärkt und aufrechterhalten wird. Das Zytokinprofil psoriatischer Läsionen zeichnet sich durch ein Überwiegen inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitiger Reduktion antiinflammatorischer Zytokinen aus [Austin et al., 1998].

Neue Therapieansätze, basierend auf die neutralisierende Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ oder IL-12, haben positive Resultate erzielt und weisen ebenfalls auf die Schlüsselrolle von Zytokinen bei der Psoriasis hin. Interferon γ (Typ-II IFN), welches von aktivierten T-Zellen produziert wird, ist eines der vorherrschenden Zytokine sowohl in läsionaler Haut als auch in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) psoriatischer Patienten [van der Fits et al., 2003]. Auch zeigen psoriatische Keratinozyten eine veränderte Sensitivität und Reaktion gegenüber $\text{IFN}\gamma$ [Barker et al., 1990]. Im einzelnen: $\text{IFN}\gamma$ stimuliert die Aktivität der APC, verstärkt die Expression von ICAM-I auf Endothelzellen und Keratinozyten und stimuliert die Freisetzung von IL-1 aus verschiedenen Zellen. Auch induziert $\text{IFN}\gamma$ in Kooperation mit $\text{TNF}\alpha$ die Produktion von IL-8 in Keratinozyten, reguliert die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Expression von IP-10 in unterschiedlichen Zelltypen und führt zuletzt zur Hochregulation von $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren [Bonifati and Ameglio, 1999].

Bei einer Autoimmunerkrankung wie die Psoriasis erscheint eine pathogenetische Rolle von Typ-I IFN plausibel. Die Assoziationen zwischen viralen Infektionen und der Entstehung von Psoriasis [Erkek et al., 2000; Mallon, 2000] als auch die Beobachtung, dass eine $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung zur Induktion bzw. Verschlechterung der

Erkrankung führte [Taylor et al., 2000; Wolfer et al., 1996], waren Indizien für die Rolle von Typ-I IFN bei Psoriasis. Studien mit IRF-2^{-/-}-defizienten Mäusen lieferten die ersten direkten Hinweise für die Beteiligung dieser Interferone in der Pathogenese der Psoriasis [Arakura et al., 2007]. Die Mäuse zeigten Psoriasis ähnliche Haut-Abnormalitäten, die durch erhöhte Expression von ICAM-1 sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellinfiltrate gekennzeichnet waren. Da IRF-2 und Typ-I IFN-Rezeptor doppel-defiziente Mäuse keine Anzeichen einer Hautentzündung aufwiesen, deutete dies auf die Schlüsselrolle der IFN α/β Signalwege bei der Entwicklung dieses Phänotyps hin [Arakura et al., 2007]. Van Der Fits konnte zeigen, dass der IFN α/β -Signalwege auch in läsionaler Epidermis bei Psoriasis Patienten aktiviert sind. Ähnlich der IRF-2^{-/-}-defizienten Mäuse wird dies durch Hochregulation der STAT1, IRF-9 und IRF-7 Expression, Komponenten des Typ-I IFN-Signalweges, erreicht [van der Fits et al., 2003].

Infiltrierende als auch ortsständige Zellen wie T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Keratinozyten und Endothelzellen sind für die Freisetzung der Zytokine im Rahmen der Entzündungsreaktion bei Psoriasis verantwortlich. Plasmazytoide dendritische Zellen sind eines der best charakterisierten IFN α/β Quellen, und es wird vermutet, dass die IFN α produzierende BDCA-2⁺CD123⁺ Subpopulation eine besondere Rolle bei der Auslösung der Läsionen zu kommt [Michalik and Wahli, 2007; Nestle et al., 2005]. Auch sind myeloide CD11c⁺ dendritische Zellen, die stark TNF α und iNOS (enzyme inducible nitric oxide synthase) exprimieren, in psoriatischen Läsionen vermehrt vorhanden [Lowe et al., 2005]. Des weiteren wird vermutet, dass die CD11c⁺ DCs die Zytokine IL-23 und IL-20 produzieren, welche wiederum T-Zellen bzw. Keratinozyten aktivieren [Lowe et al., 2007].

1.1.4. Aktivierung psoriatischer T-Lymphozyten

Die T- Lymphozyten werden durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert. Hierzu zählen Makrophagen, Langerhans-Zellen (LC), B-Lymphozyten, sog. myeloide dendritische Zellen (DDC) und plasmazytoide DCs [Banchereau and Steinman, 1998].

Der erste Schritt der Aktivierung ist die Bindung der T-Zelle an eine APC. Diese Bindung erfolgt zwischen dem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) auf der APC-Oberfläche und dem LFA-1-Ligand (Lymphocyte function associated antigen-1) auf der T-Zell-Oberfläche. Die Interaktion zwischen dem HLA-Molekül der APC und dem T-Zell-Rezeptor (TZR) reicht für eine vollständige Aktivierung nicht aus. Erst durch ein zweites Signal, der Ko-Stimulation von T-Zellen, vermittelt durch Mitglieder der B7-Familie und ihren Liganden, z.B. CD28, kommt es zur Sekretion von IL-2. Nach Aktivierung erfolgt die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen und die Proliferationsphase. Anschließend wandern diese T-Zellen in die Haut ein und können wieder reaktiviert werden. Die Hauptfunktion aktivierter T-Zellen besteht nun in der Freisetzung der Zytokine, die ihrerseits bei weiteren Hautzellen die Zytokinsekretion induzieren. Auch die beschleunigte Wanderung der Keratinozyten zur Hautoberfläche und die Erweiterung der Blutgefäße in Läsionen ist ein Ergebnis der fehlgesteuerten Immunvorgänge in der Psoriasis.

1.2. Peroxisom Proliferator-Activated Receptor δ

1.2.1. Expression und Funktion

Peroxisom-Proliferator-Activated-Receptors (PPARs) sind Liganden-aktivierte Kernrezeptoren, die der Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren angehören [Wahli et al., 1995]. Diese Rezeptor-Gruppe wurde erstmals in den frühen 90-er Jahren in Nagetieren identifiziert, wo sie ursprünglich als Komponenten beschrieben wurden, die an der Proliferation der Peroxisomen beteiligt sind.

Die PPAR-Familie umfasst drei Isoformen, PPAR α auch bezeichnet als (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3), wobei diese Isoformen von drei verschiedenen Genen kodiert werden [Blanquart et al., 2003]. Die drei Isoformen wurden in unterschiedlichen Spezies identifiziert und weisen ein gewebsspezifisches Expressionsmuster auf. PPAR γ , die am intensivsten untersuchte Isoform, wird hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert, aber auch im Darm und im Herzen [Devchand et al., 1999]. PPAR γ ist unter anderem in der Adipogenese, dem Glukosemetabolismus und dem Lipidstoffwechsel involviert [Kliwer et al., 2001; Rosen and Spiegelman, 2000].

PPAR α wird in der Leber, im Herzen, in den Nieren, im braunen Fettgewebe und der quergestreiften Skelettmuskulatur exprimiert, wobei es hauptsächlich Gene reguliert, die für den Lipidstoffwechsel von Bedeutung sind [Braissant et al., 1996; Zandbergen and Plutzky, 2007]. So stimuliert PPAR α die zelluläre Aufnahme von Fettsäuren in der Leber [Latruffe et al., 2000]; im Herzen reguliert es zusätzlich die β -Oxidation der Fettsäuren [Yang and Li, 2007].

Lange Zeit blieb die funktionelle Bedeutung von PPAR δ (auch als PPAR β bezeichnet) ungeklärt. Erst Studien mit PPAR δ -knockout-Mäusen lieferten erste Hinweise für mögliche Funktionen dieses Transkriptionsfaktors. Die Mäuse waren durch eine gestörte Wundheilung, einer veränderten Entzündungsantwort der Haut, defekte Myelinierung und Übergewicht gekennzeichnet [Peters et al., 2000; Wang et al., 2003]. Zusammen mit den Ergebnissen zum hochaffinen PPAR δ Agonisten waren diese Beobachtungen ein wichtiges Indiz für die biologische Relevanz von PPAR δ in der Regulation metabolischer Vorgänge. Die Aktivierung des PPAR δ Rezeptors moduliert sowohl den Lipoprotein-Metabolismus als auch die Glukosehomöostase und führt zur Abschwächung der Entzündungsantwort der Makrophagen [Lee et al., 2006]. PPAR δ wird in der Leber, den β -Zellen des Pankreas, Endothelzellen, vaskulären Zellen und im Gehirn exprimiert. Von besonderer Bedeutung für die Psoriasis ist die Expression von PPAR δ in den Keratinozyten, wo es eine proliferative Wirkung hat [Di-Poi et al., 2002].

Aufgrund der bisherigen Datenlage und Indizien scheint die Rolle von PPAR δ in der Apoptose komplex und Zelltyp-abhängig zu sein. So wurde eine PPAR δ vermittelte Inhibition der Stress-induzierten Apoptose in primären Keratinozyten beschrieben. Dabei führte PPAR δ zur Herunterregulation der Proteinphosphatase PTEN bzw. Hochregulation von ILK1 (integrin-linked kinase) und PDK1 (Phosphoinositid-abhängige Kinase-1), was in einer verstärkten Aktivierung von Akt (Serin/Threonin-Kinase B) und somit zur Inhibition der Apoptose resultierte [Di-Poi et al., 2002]. Dieselbe Gruppe beschrieb zusätzlich einen Akt-abhängigen protektiven Effekt für PPAR δ bei Ischemia- und H₂O₂-induzierter Apoptose in der Niere [Letavernier et al., 2005]. Diese Beobachtungen konnten von anderen Gruppen weder in Keratinozyten [Burdick et al., 2007] noch in Endothelzellen reproduziert werden [Liou et al., 2006].

Allerdings stellten diese Gruppen fest, dass der hierfür zugrundeliegende Mechanismus auf die transkriptionelle Induktion des Apoptoseregulatorproteins 14-3-3 ϵ beruht, was eine verminderte Translokation des proapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieds Bad (Bcl-xL/Bcl-2 associated death promotor) zum Mitochondrium zur Folge hat [Liou et al., 2006].

Bei der Celecoxib-induzierten Apoptose in Darmkrebskarzinom-Zellen wurde ebenfalls ein protektiver Effekt für PPAR δ gezeigt, obgleich keine Details des dabei involvierten Mechanismus beschrieben wurden [Shureiqi et al., 2003]. Die Aktivierung von PPAR δ durch nicht-selektive Agonisten wie PGI $_2$ (Prostacyclin) führte zu einer proapoptotischen Aktivität von PPAR δ in 293T und Endothelzellen [Hatae et al., 2001]. Diese widersprüchlichen Beobachtungen verdeutlichen die komplexe Rolle von PPAR δ in der Apoptose.

1.2.2. PPAR δ Struktur und Liganden-abhängige Aktivierung

Die Proteinstruktur von PPAR δ und die der weiteren Isoformen ist im Wesentlichen übereinstimmend mit der Struktur anderer nukleärer Hormonrezeptoren. Das Protein lässt sich funktionell in vier Untereinheiten aufteilen (Abb. 1.2.).

Erstens die Liganden-unabhängige Aktivierungsdomäne (A/B), die sich in der N-terminalen Region befindet. Die Domäne enthält die als AF-1 bezeichnete Region, welche eine transkriptionelle Aktivierungsfunktion ausübt. Angrenzend ist die aus zwei Zinkfingermotiven bestehende konservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD). Nach der sogenannten Gelenkdomäne „*hinge-region*“ folgt als letzte Domäne die Liganden-Bindungsdomäne (LBD). Diese Region umfasst eine Heterodimerisierungsdomäne sowie eine C-terminal gelegene Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne (AF-2) [Burns and Vanden Heuvel, 2007].

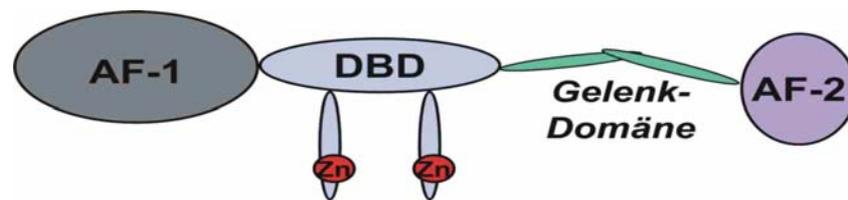


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des Peroxisomproliferator-aktivierenden Rezeptores delta (PPAR δ).

Die Aktivierung der PPARs erfolgt über die Bindung eines spezifischen Lipid-Liganden an den jeweiligen Rezeptor. Neben den natürlichen Liganden, wie Fettsäuren (z.B. Arachideonsäure) und deren Derivaten, sind inzwischen auch eine Reihe synthetischer Formen bekannt. Dazu gehören die NSAIDs (**n**on-**s**teroidal **a**nti-**i**nflammatory **d**rugs), die PPs (**p**eroxisome **p**roliferators) und Fettsäureanaloga [Komar, 2005]. Dabei sind einige dieser Liganden spezifisch für die jeweilige Isoform. Für PPAR α und PPAR γ sind eine Reihe endogener und synthetischer Liganden, die auch klinisch angewandt werden, bekannt. Alle drei Isoformen werden von Prostaglandine aktiviert.

PPAR δ wird durch Fettsäuren, wie die Arachidonsäure, sowie einige Eicosanoide aktiviert. Ratinoin-Säure kann ebenfalls PPAR δ binden [Ziouzenkova and Plutzky, 2008]. Für PPAR δ sind inzwischen auch einige synthetische Liganden, wie L-165041, cPGI (Carbaprostazyklin) und GW501516 bekannt [Hihi et al., 2002; Leibowitz et al., 2000; Westergaard et al., 2001]. Im Gegensatz zu PPAR α bzw. PPAR γ werden die bekannten synthetischen Liganden für PPAR δ nicht für therapeutische Anwendungen eingesetzt [Gervois et al., 2004]. Es befinden sich jedoch synthetische Liganden in der klinischen Erprobung zur Behandlung von Fettsucht und des metabolischen Syndroms und Diabetes Typ 2 [Luquet et al., 2005; Luquet et al., 2004].

Als Folge der Bindung eines spezifischen PPAR-Liganden kommt es zur Heterodimerisierung mit einem weiteren nukleären Rezeptor, dem Retinoid X

Rezeptor (RXR) [Bishop-Bailey, 2000; He et al., 1999]. Die PPAR/RXR-Heterodimere binden an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb der Promotorregion der Zielgene und regulieren dadurch deren Transkription [Friedmann et al., 2005; Hunter et al., 1996]. Die in den Zielgenen enthaltene DNA-Bindungssequenz wird als **peroxisome proliferating response element (PPRE)** bezeichnet und besteht aus der zweimaligen Abfolge der Consensus-Sequenz AGGTCA getrennt durch ein einzelnes Nukleotid [Gervois et al., 1999]. In Abwesenheit eines Liganden bilden die PPARs Komplexe mit Korepressoren wie SMRT (**s**ilencing **m**ediator for **r**etinoid and **t**hyroid **h**ormon **r**eceptors) und NCoR (**n**uclear receptor **co**-repressor), wodurch die Bindung an die DNA verhindert wird [Tan et al., 2005].

1.2.3. Die PPAR δ Expression in der Haut

Die Haut lässt sich in Unterhaut (Subcutis), Lederhaut (Dermis) und Oberhaut (Epidermis) untergliedern. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht und in verschiedene Strukturen unterteilt ist. Diese Strukturen stellen ihrerseits die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten dar. Die Hornschicht (Stratum corneum), das Endprodukt der Keratinozyten-Differenzierung, wirkt als Permeabilitätsbarriere zum Schutz gegen äußerliche Umwelteinflüsse. Fehlregulationen dieses Differenzierungsprozesses sind die Ursache für die Entwicklung des ersten Leitsymptoms der Psoriasis, die äußerlich sichtbar werdende Schuppung.

Ein Einfluss der PPARs auf die embryonale Entwicklung der Epidermis konnte durch die Beobachtung, dass die drei PPAR Subtypen -vorwiegend PPAR δ - in der murinen interfollikulären Epidermis exprimiert werden, dokumentiert werden [Michalik et al., 2002]. Nach der Geburt wird die Expression der drei PPARs in der interfollikulären Epidermis undedektierbar, während sie in den Haarfollikeln weiter vorhanden ist [Michalik et al., 2002; Michalik and Wahli, 2007].

In der humanen Haut werden alle PPAR Subtypen, mit PPAR δ als Hauptsubtyp, auch in der interfollikulären Epidermis von Erwachsenen exprimiert [Komar et al., 2001; Westergaard et al., 2001]. Detaillierte immunchemische Analysen zeigten eine Lokalisation von PPAR δ in den Zellkernen der Suprabasalen-Schicht, wohingegen in

der Basal-Schicht sowohl eine Kern-, als auch eine Zytoplasma Lokalisation nachweisbar ist [Westergaard et al., 2003].

Die Funktion der PPARs in der epidermalen Homöostase wurde mit Hilfe von *in vitro* Experimenten an Keratinozyten untersucht. Eine Behandlung mit PPAR δ -Liganden (L-165041 und GW1514) wirkt proliferogen und induziert die Expression Differenzierungs-assoziiertes Gene wie Involucrin, Keratin 6 und Transglutaminase in humanen Keratinozyten [Romanowska et al., 2008; Westergaard et al., 2001]. Des Weiteren wird PPAR δ transkriptionell durch die bei der Psoriasis zentralen Zytokine TNF α und IFN γ induziert. [Tan et al., 2004a; Tan et al., 2001]. Auch im Rahmen der Wundheilung ist PPAR δ von besonderer Bedeutung. Diese läuft im Allgemeinen in vier Schritten ab: Die initiale Gefäßreaktion, die Gerinnungskaskade, das inflammatorische Infiltrat, sowie die Gewebeneubildung. Dabei ist die regulatorische Funktion von PPAR δ in den Keratinozyten ein wichtiger Faktor während dieses Prozesses. Zu Beginn führen die Zytokine TNF α oder IFN γ über die Aktivierung sog. stress-assoziiertes Signalwege zur Stimulation von PPAR δ . Zusätzlich wird die Produktion endogener Liganden begünstigt. Die so resultierende Steigerung der transkriptionellen Aktivität von PPAR δ im Epithel bedingt eine Beschleunigung der Keratinozyten-Differenzierung bei gleichzeitiger Blockierung der Apoptose [Tan et al., 2001].

Ist die Epithelisation einmal abgeschlossen, wird die TNF α -bedingte Stimulation von PPAR δ durch den TGF- β -Signalweg gehemmt [Ashcroft et al., 1999; Michalik and Wahli, 2007]. *In vitro* führte die langanhaltende Behandlung mit einem PPAR δ -Agonisten zur Lipid Akkumulation in den Keratinozyten. Die Expression von ADRP (**a**dipose **d**ifferentiation **r**elated **p**rotein) und FIAF (**f**asting-induced **a**dipose **f**actor), zwei wichtige Akteure des Lipid-Stoffwechsels, wird durch PPAR δ Aktivierung in der Haut induziert [Schmuth et al., 2004].

1.3. Lentiviral vermittelte RNA-Interferenz

1.3.1. RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine effektive Methode zur gezielten Inaktivierung von Genen in eukaryotischen Zellen. Es handelt sich um einen sog. „*posttranskriptionellen gene silencing*“ (PTGS) Prozess, der durch ds-RNA-Moleküle induziert wird. Eukaryontische Zellen verwenden den RNAi-Mechanismus zur Abwehr fremder RNA-Moleküle, insbesondere solche, die als Doppelstrang identifiziert werden können. Im ersten Schritt des nativen RNAi-Mechanismus werden doppelsträngige RNA-Moleküle in kleine 21-28 Nucleotidepaare (nt) lange Fragmente mit 2 nt Überhang am 3'-Ende gespalten. Die Spaltung wird durch das RNaseIII ähnliche Enzym Dicer in einer ATP-abhängigen Reaktion katalysiert [Agrawal et al., 2003; Mittal, 2004]. Die resultierenden siRNAs bleiben mit dem Enzym verbunden und leiten den Enzymkomplex zu weiteren dsRNA-Molekülen, was zu deren Spaltung führt. Die siRNAs werden anschließend mit Hilfe des dsRNA-bindenden Proteins R2D2 an den Enzymkomplex RISC (**R**NA **i**nduced **s**ilencing **c**omplex) weitergegeben. Der RISC-Protein Komplex enthält eine RNA-Helikase und eine RNA-Endonuklease. Nach der Entwindung der siRNA durch die Helikase dirigiert der Antisense-Strang den RISC-Komplex zur komplementären mRNA-Zielsequenz, um diese durch die Endonuklease zu spalten. Die mRNA wird nun zugänglich für weitere Exonukleasen.

Bei den microRNA-Molekülen (miRNA) handelt es sich um 21-28nt lange regulatorische RNAs die aus einem endogenen Vorläufermolekül mit doppelsträngigem Bereich (Haarnadelstruktur) prozessiert werden. Die einzelsträngigen miRNAs entstehen durch DICER vermittelte Spaltung des ca. 70 Nucleotide großen Vorläufermoleküles [Agrawal et al., 2003]. Die Sequenz der miRNAs sind meist nicht vollständig komplementär zur der der Ziel-RNA. Aus diesem Grund können die miRNAs im Gegensatz zu den siRNAs nicht entlang ihrer gesamten Sequenz mit einer Ziel-RNA Basenpaare ausbilden.

Obwohl die miRNAs wie die siRNAs in den RISC-Proteinkomplex übergehen, kommt es auf Grund der ungepaarten Nukleotiden nicht zur Zerschneidung der Ziel-RNA. Stattdessen wird die Translation der Ziel-RNA blockiert. Es kann zur Degradation der Ziel-RNA kommen, wenn die miRNA komplett komplementär zur dieser ist [Martinez et al., 2003; McManus and Sharp, 2002; Tuschl, 2003]. siRNAs können chemisch synthetisiert und durch physikalische Transfektions-Methoden eingeschleust oder endogen von Expressionvektoren in Zellen exprimiert werden. Aufgrund zeitlich limitierter Aktivität exogen applizierter siRNAs konzentriert sich eine Vielzahl von Experimenten auf den viralen, vermittelten siRNA-Transfer. Die siRNA wird bei diesen Plasmidvektoren von RNA-Polymerase-II [Dykxhoorn et al., 2003] oder RNA-Polymerase-III-Promotoren, wie dem U6-Promotor [Miyagishi and Taira, 2002], exprimiert. Dabei kann die Expression der Doppelstränge von zwei separaten Promotoren oder, sofern sie in Form einer Haarnadelstruktur vorliegen, von einem einzelnen Promotor erfolgen.

1.3.2. Das Prinzip der retroviral vermittelten siRNA

Die Herstellung viraler Vektoren erleichtert sowohl die Untersuchung der viralen Replikation als auch die Struktur- und Funktionsanalyse von verschiedenen Genen und Genprodukten. Ferner können mit Hilfe dieser Vektoren Gene in humane Zellen eingebracht werden und stellen somit eine Möglichkeit zur Therapie verschiedener Erkrankungen dar [Anderson, 1998; Dropulic, 1998]. Retrovirale Gentransfer-Systeme haben gegenüber anderen Systemen mehrere Vorteile.

Virale Vektoren integrieren ins Genom der Zielzelle und ermöglichen so eine stabile Expression über einen längeren Zeitraum. Auch werden keine viralen Gene transferiert, was eine Zerstörung der Zielzelle durch virusspezifische cytotoxische T-Zellen verhindert. Zusätzlich besitzen diese Vektoren eine relativ große Klonierungskapazität, womit sie besonders für klinische Anwendungen attraktiv wären. Neben diesen Vorteilen, die allen retroviralen Vektoren gemein ist, besitzen lentivirale Vektoren den großen Vorteil, dass sie in der Lage sind, nicht replizierende Zellen zu infizieren. Diese Eigenschaft ermöglichte viele *in vivo* Studien, in denen ein effizienter Transfer, sowie die Integration und stabile Expression von Transgenen in Zellen wie Neuronen, Makrophagen und Hepatozyten wichtig ist [Blomer et al., 1997; Trono, 2000].

1.3.3. Das lentiviral basierende System

Systeme für lentivirale Transfektion leiten sich vom HIV-1 Virus (**h**uman **i**mmundefizienz **v**irus) ab [Miyoshi et al., 1997; Naldini et al., 1996]. Die Genomstruktur der Lentiviren ist komplex und weist mehrere überlappende Leseraster sowie eine Vielzahl unterschiedlich gespleißter mRNAs auf. Infektiöse Viruspartikel bestehen aus zwei einzelsträngigen Plus RNA-Molekülen und einem Nukleokapsid mit den Proteinen *gag*, *pro* und *pol*. Die Virushülle bildet das *env*-Protein. Neben diesen retroviralen Genen besitzen die Lentiviren regulatorische und akzessorische Gene. Zusätzlich zu den für die virale Replikation essentiellen Genen *rev* und *Tat* werden die nicht essentiellen akzessorischen Gene *nef*, *vpu*, *vpr* und *vif* kodiert.

Im Provirus wird das Genom zu beiden Seiten von den *long terminal repeats* (LTRs) flankiert, die die sog. U5-, U3- und R.-Regionen enthalten. Die in den LTRs enthaltenen *cis*-aktiven-Sequenzen sind für die Expression der viralen Gene notwendig. Die Genexpression erfolgt in zwei Phasen. In der frühen Phase werden die mehrfach gespleißten mRNAs, welche für die regulatorischen Gene *rev*, *nef* und *Tat* kodieren, gebildet. Diese werden dann im Zytoplasma translatiert und die Proteine *Tat* und *Rev* werden anschließend in den Zellkern transportiert.

Durch Bindung an die 5'-Enden der viralen mRNA verstärkt das *Tat* Protein deren Transkription durch Stimulation der transkriptionellen Elongation. Die Aktivität des *Rev* Proteins ist Voraussetzung für den Übergang von der frühen zur späten Phase. Das *Rev* Protein interagiert dabei mit der als RRE (**R**ev **r**esponsive **E**lement) bezeichneten RNA-Sequenz, welche sich innerhalb des *env*-Gens befindet. So kann *Rev* das Spleißen sowie den RNA-Export ins Zytoplasma kontrollieren. Die strukturellen Proteine (*gag*, *pol-gag*, *env*) werden zur Zellmembran transportiert und lagern sich dort an. Hier findet die Morphogenese zu infektiösen Partikeln statt.

Die Verpackung der genomischen RNA erfolgt über die Bindung der RNA-Moleküle an die Zinkfinger-Motive der Nucleokapsid-Proteinanteile in den *pol-gag* und *gag* Vorläuferprodukten. Diese Interaktion wird durch das als Ψ (Psi; *packaging signal*) bezeichnete Element vermittelt.

Nur genomische RNA-Moleküle enthalten in deren LTR-Region das Ψ -Element, während es allen in anderen mRNA-Spezies durch Spleißen entfernt wurde. Auf diese Weise wird gesichert, dass die Virionen überwiegend in ungespleißte mRNAs verpackt werden. Die gebildeten Virionen verlassen schließlich durch Knospung die Wirtszelle. Der Reifungsprozess, bei dem die virale Protease die Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten spaltet, erfolgt erst im von der Zelle freigesetzten Viruspartikel. Dadurch wird sichergestellt, dass die Vorläuferproteine nicht bereits im Zytoplasma gespalten werden. Dies würde eine korrekte Morphogenese und Assoziation mit dem RNA-Genom verhindern. Auch würde es zu einer vorzeitigen Schädigung der Wirtszelle führen.

Biologische Sicherheit ist eines der wichtigsten Aspekte bei der experimentellen Verwendung von lentiviralen Vektoren. Daher musste das Risiko der genetischen Rekombination des Virus gesenkt werden. An der Herstellung Virusbasierender-Gen-Transfersystems sind zwei Komponenten beteiligt. Erstens die Verpackungselemente, welche die Strukturproteine und Enzyme beinhalten, die zur Herstellung eines infektiösen Virus notwendig sind. Zweitens der Transfervektor welcher das genetische Material in die Zelle transferiert. Bei lentiviralen Systemen der sogenannten „ersten Generation“ enthielt das verwendete Verpackungselement noch alle HIV-1 Proteine außer dem Envelope-Protein [Donahue et al., 1992; Dull et al., 1998], das von einem separaten Vektor exprimiert wurde.

In einer weiteren Entwicklung des Systems, wurden die Komponenten des Verpackungselementes auf die *gag*, *pol*, *Tat* und *rev* Gene des HIV reduziert. Dieses System der lentiviralen Vektoren wurde als „zweite Generation“ bezeichnet [Zufferey et al., 1997]. Spätere Experimente zeigten, dass der für die Replikation notwendige virale Transaktivator (*Tat*) aus dem Verpackungskonstrukt eliminiert werden kann, wenn der ursprüngliche U3-Promotor durch einen konstitutiv aktiven Promotor ersetzt wird. Bei der Herstellung *tat*-unabhängiger Expressionskonstrukte wurde der CMV-Promotor verwendet [Dull et al., 1998] und das so entstandene Endsystem wird als „dritte Generation“ bezeichnet.

1.3.4. Aufbau Replikationsinkompetenter lentiviraler Vektoren

Die Etablierung eines replikationsdefizienten Vektor Systems stellt eine weitere Verbesserung des lentiviralen Systems dar. Um replikationsinkompetente Vektoren herzustellen, müssen alle für die viralen Strukturproteine kodierenden Regionen aus dem Genom entfernt werden, so dass von dem Vektor selbst keine viralen Proteine mehr exprimiert werden können. Die Sequenzen des lentiviralen Vektors wurden dabei auf die HIV-stammende *cis*-aktiven Sequenzen reduziert, die für Verpackung, Integration und reverse Transkription essentiell sind [Kim et al., 1998; Naldini, 1998; Parolin et al., 1994]. Diese minimale Sequenz besteht aus dem Promotor, dem Verpackungssignal (Ψ), die für die reverse Transkription notwendigen Sequenzen, die Erkennungssequenz der Integrase in den U3 und U5 Regionen und zuletzt das für die mRNA-Bildung wichtige Polyadenylierungssignal. Die im Vektor vorhandene reverse Transkriptionssequenz beinhaltet die R-Region, die Primer-Bindungsstelle (PBS) und den zentralen Polypyrimidintrakt (cPPT), welcher für einen besseren Gentransfer verantwortlich ist.

Um den Export der mRNA-Moleküle in das Zytoplasma zu ermöglichen, verfügt der Vektor zusätzlich über eine RRE-Sequenz. Die aus dem Vektor eliminierten Sequenzen wurden durch eine Expressionskassette ersetzt, die das zu transferierende Fremdgen bzw. dsRNA enthielt. Dieses Gen wird von einem fremden internen Promotor exprimiert.

Das in dieser Arbeit verwendete Transfer-Plasmid enthielt die Expressionskassette mit dem U6-Promotor und der shRNA, sowie eine Expressionskassette für E-GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors [Rubinson et al., 2003].

Um den Prozess des lentiviralen vermittelten Gentransfers von dem der viralen Infektion zu unterscheiden, wird dieser als Transduktion bezeichnet. Zur Minimierung der Wahrscheinlichkeit zufälliger Rekombinationen werden die für die Transduktion notwendigen Komponenten in *trans* zu Verfügung gestellt.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei hauptsächlich um die für die Bildung der Viruspartikel benötigten Strukturproteine *gag*, *pol* und *env*. Diese werden auf zwei separate Verpackungsplasmide aufgeteilt. Das Rev-Protein gewährleistet den Transport der RNA-Moleküle in den Zellkern. Das im lentiviralen Vektor koexprimierte

Rev-RRE-System, interagiert mit der RRE-Sequenzen des Transfervektors und der des Verpackungsvektors und bedingt so den Kerntransport der RNA (Abb. 1.2.).

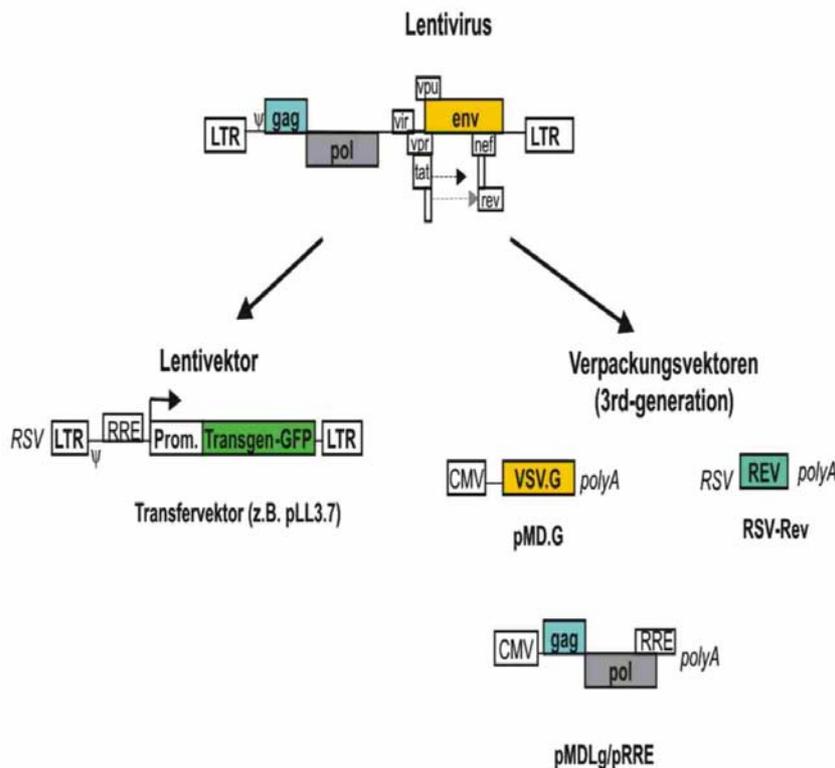


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung des HIV Provirus (oben) und der vier davon abstammende Konstrukte des 3rd-generation Verpackungssystem (unten). Das Verpackungskonstrukt (pMDLg/pRRE) exprimiert die Gene gag und pol unter der Kontrolle des CMV-Promotors und die polyadenylation-site des humanen B-Globin-Genes. Für die Expression von gag und pol ist deren REV vermittelter Transport in den Kern notwendig. Da alle tet und rev Exons entfernt wurden, wird die rev cDNA *in trans* vom (RSV-Rev) Konstrukt exprimiert. Der selbst inaktivierende Transfervektor enthält die Expressions-Kassette für das Transgen. Das Envelop-Gen (VSV.G) wird vom vierten Konstrukt (pMD.G) exprimiert. (Abb. modifiziert nach Dull et al. 1998)

Um das Wirtsspektrum viraler Vektorsysteme zu erweitern, werden diese mit einem heterologen Hüllprotein anstelle des nativen env Genes „pseudotypisiert“ [Lever et al., 2004; Sanders, 2002]. Das hier verwendete lentivirale System wurde mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert [Burns et al., 1993; Naldini et al., 1996]. Ein separates Envelope-Plasmid exprimiert das

Glykoprotein unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Der in dieser Arbeit verwendete Transfervektor gehört zu der Gruppe sich selbst inaktivierender Vektoren (SIN) [Zufferey et al., 1998]. Die Inaktivierung ist auf eine Deletion in der U3-Region der 3'-LTR zurückzuführen. Diese Deletion wird durch die Integration der Virus-RNA in das Wirtsgenom an das 5'-Ende übertragen. Dadurch ist eine Initiation der Transkription sowie anschließender Replikation nicht möglich. Diese Vorrichtung ist ein wesentlicher Bestandteil der biologischen Sicherheit dieses Systems.

1.3.5. Off-target-Effekte

Bei der Verwendung von siRNAs werden Regulationsmechanismen der Zelle beeinflusst, daher kann es zu unspezifischen Effekten kommen, die als „off-target effects“ bezeichnet werden. Dazu gehört die Aktivierung des Interferon-Systems [Sledz et al., 2003]. Bei der Verwendung von doppelsträngiger RNAs, die größer als 27-29 bp sind, kann es neben der RNAi-Kaskade auch zu einer Interferonantwort kommen [Siolas et al., 2005]. Dies erfolgt durch die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) und Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 (eukaryontischer Initiationsfaktor 2), was zur Apoptose der Zellen führt. Der Gruppe von Tuschl gelang es durch das Einsetzen von doppelsträngiger 21mere die Interferonantwort zu umgehen. Es zeigte sich, dass die 21mere zu klein waren, um die PKR zu aktivieren [Paddison et al., 2002]. Auch für die shRNA-Vektoren wurde eine Interferonantwort detektiert, wobei die Antwort bei der Expression von 19 bp langer shRNAs geringer ausfällt im Vergleich mit längeren shRNAs [Bridge et al., 2003].

Ferner kann ein mismatch zwischen siRNA und Ziel-mRNA eine unspezifische Gen-Repression induzieren. Es wurde gezeigt, dass bereits eine Basepaarung von 11-15 aufeinander folgenden Nukleotiden genügt, um diese Repression hervorzurufen [Jackson et al., 2003].

Ein weiterer *off-target* Effekt könnte durch die Aufnahme des Sense-Strangs der siRNA-Moleküle in den RISC-Komplex hervorgerufen werden.

Die Aufnahme des falschen Strangs in den RISC-Komplex führt zum unspezifischen Abbau von mRNA. Die Modifikation der siRNA am 5'-Ende des Sense-Stranges stellt eine der Strategien dar, dies zu vermindern.

Dagegen wird beim Einsetzen von Duplex-siRNA-Molekülen eine andere Strategie verfolgt, um diesen Effekt zu verhindern. So verfügen die ds-siRNAs über ein 3'-überhängende Ende und sind ähnlich stabil wie siRNA-Moleküle. Weiterhin sind die ds-siRNAs so aufgebaut, das sie partiell-komplementär oder –palindrom [Hossbach et al., 2006].

1.4. Problemstellung

Eine Vielzahl von neuen Literaturangaben weisen auf eine zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors PPAR δ bei Psoriasis hin. Da die Psoriasis durch übermäßige Keratinozytenproliferation und Differenzierung gekennzeichnet ist, beschränkte sich die Forschung bislang auf die Bedeutung von PPAR δ in Keratinozyten. An der Psoriasispathogenese sind jedoch auch aktivierte T-Zellen beteiligt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob PPAR δ auch in T-Zellen von funktioneller Bedeutung ist. Folgende Einzelfragen sollten dabei experimentell untersucht werden:

- Lässt sich ein lentivirales Transduktions-System soweit optimieren, dass primäre humane T-Zellen mit Hilfe von siRNA funktionell charakterisiert werden können?
- Wird PPAR δ in humanen T-Zellen exprimiert? Falls ja, welche Faktoren führen zur transkriptionellen Induktion ?
- Sind Interferone an der Regulation von PPAR δ in T-Zellen beteiligt?
- Induziert PPAR δ die Proliferation von T-Zellen?
- Inhibiert PPAR δ die Apoptose in T-Zellen?

2. Materialien und Chemikalien

2.1. Materialien und Geräte

Durchflußzytometer (FACS Calibur)	BD Biosciences
Elektrophoreseeinheit (Power Supply EPS600)	Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammern	BioRad Laboratories
Flurometer (Qubit)	Invitrogen
Elektrophoresesystem (Easy-Cast; B1A)	Owl Scientific, Inc
Elektrophoresesystem (Easy-Cast; B2)	Owl Scientific, Inc
Pipetten (2µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf
Autoclave (Varioklav 75S)	H+P Labortechnik
Inkubator (IG150)	Jouan GmbH
Vortexer (G-560E)	Scientific Industries
Semi-dry Blotting Kammer (2117 Multiphor)	LKB Gromma
UV-Photometer (GeneRay)	Biometra
Wasserbad (SUB6)	GRANT Instruments
Thermocycler (PTC-200)	MJ Research
Thermomixer Compact	Eppendorf
pH-meter (pH53)	Wissenschaftliche Techn.-Werkstätten
Laserscanner für Filter: „ <i>luminescent image analyser</i> “; Modell LAS-1000 CH	Fujifilm
Schüttelinkubator 37°C (Innova 4000)	New Brunswick Scientific
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Plastikmaterialien (Zellkultur)	Greiner bzw. Corning
Sterilwerkbank (Holten LaminAir)	Jouan GmbH
Whatmann-Papier	Schleicher & Schuell
Zellisolationseinheit (MACS Separation Unit)	Miltenyi Biotec

Zentrifugen:

Tischzentrifuge (5417C)	Eppendorf
Zellkulturzentrifuge (GS-6)	Bekman
Ultrazentrifuge (Optima LE-80K)	Bekman

2.2. Kits

BCA Protein Assay kit	PIERCE
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences
Mini-PROTEAN 3 electrophoresis system	BioRad
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraktion kit	PIERCE
NucleoSpin®RNA II Kit	MACHEREY-NAGEL
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep	QIAGEN
Plasmid Isolation Kit	QIAGEN
Jetstar 2.0 MaxiPrep Kit	Genomed
CellTiter96® AQueous One Solution	Promega
Cell Proliferation Assay	
GoTaq DNA Polymerase	Promega
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	BioLabs

2.3. Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in kommerziell höchst erhältlichem Reinheitsgrad verwandt.

Isopropanol	Sigma
Acrylamide/Bis-Fertigmischung(40%, 37 : 1)	Sigma
Agar-Bacteriological Grade	MP Biomedicals, INC
β-Mercaptoethanol	Sigma
Blotting grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BioRad
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Sigma

Chemically Defined Lipid Concentrate (100X), liquid	Gibco
Chloroquine diphosphate salt	Sigma
Cholesterol, Wasserlöslich	Sigma
Cycloheximide	Sigma
D-(+)-Glucose	Sigma
Sulfonsäure (HEPES)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Ethanol (EtOH), 96%	Baker
Chloroform	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
GW501516	AXXORA
L-165041	Calbiochem
LB-Broth (Luria/Miller)	Roth
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Seakem LE Agarose	Cambrex
Sucrose (≥ 99.5%)	Sigma
α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin	Sigma
Tween 20	Serva
Größenmarker für Agarose-Gelelektrophorese (1 kb, 100bp)	BioLabs
MagicMark™ XP	Invitrogen
Western Protein Standard	
Ammonium persulfate	Sigma
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Recombinant human TNF α	PeproTech

humanes rekombinantes Interferon- γ (IFN γ)	PBL Biomedical
humanes rekombinantes Interferon- α (INF α)	PBL Biomedical
CD19-MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD14-MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD3-MicroBeads	Miltenyi Biotec
Annexin V-Cy5	BD Biosciences
Interleukin-2 (IL-2)	PromoKine
Tricine sample buffer	Biorad
20%ige SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat)	Serva
L-PHA (Phytohemagglutinin-L)	Sigma
H ₂ O ₂	Sigma
RnaseA	sigma
Restriktionsenzyme	BioLab
Ficoll-Gradienten (Bicoll separation solution)	Biochrom
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals

2.4. Antikörper zur Zellisolierung- und Analyse

anti-CD3-Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Miltenyi Biotec
anti-CD19-FITC	Miltenyi Biotec
anti-CD3-FITC-MicroBeads	Miltenyi Biotec
anti-CD14-MicroBeads	Miltenyi Biotec
anti-CD123-FITC	Miltenyi Biotec
anti-CD16-FITC	Miltenyi Biotec
anti-CD56-FITC	BD Biosciences

2.5. Antikörper

Antikörper	Arbeitsverdünnung	Firma
anti-human-PPAR β/δ (polyclonal)	1 : 300	Cayman chemical
anti-p44/42-MAP-kinase (ERK1/2)	1 : 1000	Cell Signalling
anti-phospho-p44/42MAP-kinase	1 : 1000	Cell Signalling
anti-rabbit IgG-HRP	1 : 1000	Amersham
anti-Fas (monoclonal)	1 : 2000	Upstate, Biotech
anti-goat IgG-HRP	1 : 2000	Santa Cruz

2.6. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
GlutaMax I-liquid	GIBCO
RPMI Medium 1640 (with GlutaMAX™ I)	GIBCO
1 % penicilline/streptomycine	GIBCO
DMEM high glucose (with GlutaMAX™ I, 4500 mg/L D-Glucose, without Sodium Pyruvate)	GIBCO
DPBS (1X), liquid-without Calcium, without Magnesium	GIBCO
AIM-V-Medium	GIBCO
5 % Humanserum	PAN Systems
Trypanblau	GIBCO
Trypsin-EDTA (1x) liquid, 100ml	GIBCO

2.7. Oligonukleotide

2.7.1. Primer für die PCR

Alle Primer wurden von MWG-Biotech bezogen.

GAPDH (PCR-Produkt = 420 bp), $T_A = 56\text{ °C}$

5' - gtcagtgggtggacctgacctv - 3'

3' - aggggtctacatggcaactg - 5'

PPAR β/δ (PCR-Produkt = 483 bp), $T_A = 54\text{ °C}$

5' - aactgcagatgggctgtaac - 3'

3' - gtctcgatgctgtggatcac - 5'

ILK (PCR-Produkt = 500 bp), $T_A = 56\text{ °C}$

5' - atcacacactggatgccgta - 3'

3' - cttccaatgccaccttcatt - 5'

PDK-1 (PCR-Produkt = 532 bp), $T_A = 56\text{ °C}$

5' - ggttggaaccactcttca - 3'

3' - ttgtgcaataggccatgtgt - 5'

2.7.2. shRNA-Nukleotide

Die siRNA-Nukleotide für die Klonierung in den lentiviralen Vektor pLL3.7 wurden von MWG-Biotech bezogen.

HpaI	19nt Sense	Loop	19nt Anti-Sense	Stop
Human siRNA PPAR β/δ				
T	GTCGTACGATCCGCATGAA	TCAAGAGA	TTCATGCGGATCGTACGAC	TTTTTT

2.8. Vektoren

pLL3.7	Zur Verfügung gestellt von Luk van Parijs
pMD2G	Zur Verfügung gestellt von Luk van Parijs
VSV-G	Zur Verfügung gestellt von Luk van Parijs
pRSVRev	Zur Verfügung gestellt von Luk van Parijs
pCDH1 (pCDH1-MCS1-EF1-copGFP)	System Biosciences
PLVTHM	Zur Verfügung gestellt von Prof. D.Trono
pPAX2	Zur Verfügung gestellt von Prof. D.Trono
pLVCT-rtTRKRAB-2SM2	Zur Verfügung gestellt von Prof. D.Trono
PPARd^{RNAi}/2SM2	Zur Verfügung gestellt von Dr. Truss
PPARd/pIGETon	Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Romanowska
PPARδ/pCDH	Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Romanowska

2.9. Bakterienstämme

Top 10 (One shot Top10)	Invitrogen
STbl 3 (MAX Efficiency Competent Cells)	Invitrogen
STbl 2 (MAX Efficiency Competent Cells)	Invitrogen

2.10. Humane Zelllinien

HEK 293T/17 (der humane embryonale Nierenzellen)	ATCC
293FT (ein Subtyp der HEK 293 Zelllinie)	Invitrogen
HeLa (humane epitheliale Karzinomezellen)	ATCC
Jurkat (humane T-Lymphozyten-Tumorzellen)	DSMZ

2.11. Puffer und Lösungen

Annealing Puffer (5x)

100mM Kaliumacetat
30mM HEPES, pH 7.4
2mM Magnesiumacetat

SDS-Elektrophoresepuffer 10x

1.9 M Glycine
230 mM Tris-HCl, pH 8.3
2% SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris, pH 8.8

Sammelgelpuffer (4x)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Blotting Transferpuffer (1x)

25 mM Tris, pH 8.3
150mM Glycine
10% Methanol

TBS-T

1xTBS-Puffer
0,05% Tween

10x TBS

100 mM Tris-HCl, pH 7.6
1,5 M NaCl

Ponceau S (10x)

2% (w/v) Ponceau S
30% (v/v) TCA
30% Sulfosalicylic säure

20% (w/v) Sucrose

20g Sucrose
TNF-Puffer
(mit 0,2 Filter filtrieren und bei 4°C lagern)

TNF-Puffer

50 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
0.5 mM EDTA

2X HBS-Puffer

0.27 M NaCl
10 mM KCl
1,4 mM Na₂HPO₄
10 mM D-Glucose
42 mM HEPES

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung von *E-coli*

Anmerkung : Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen eine Ampicillin-Resistenz.

E-coli-Zellen wurden in Flüssigmedien (LB ± Antibiotikum) bei 37°C oder 30°C, abhängig vom verwendeten Bakterienstamm, unter Schütteln angezogen. Dazu wurden 3 ml Kulturmedium mit *E-coli* Kolonien (Einzelklone von Agarplatte) oder mit Bakterien aus einem bei -80°C gelagerten Glycerolstock angeimpft. Nach 12-16 Stunden wurde mit dieser Vorkultur die Hauptkultur angeimpft.

3.1.2. Herstellung kompetenter Baketieren

Aus einem *E.coli* Glycerolstock wurde 10 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezogen. Am folgenden Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Inkubation erfolgte so lange, bis die Kultur eine optische Dichte (OD bei 600) von 0,5 erreichte. Die Bakterien wurden bei 7000 xg und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Nach der Zentrifugation mussten die Zellen stets auf Eis gehalten werden. Das Pellet wurde in 15 ml eiskaltem TFB-1 Puffer vorsichtig resuspendiert und für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 7000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 2 ml eiskaltem TFB-2 Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 100µl Aliquots in 0,5ml vorgekühlte Reaktionsgefäße aufgeteilt und direkt in flüssigem Stickstoff gefroren, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

3.1.3. Transformation kompetenter Bakterien

Bei der Transformation werden Plasmide von kompetenten Bakterien aufgenommen und somit wird die Vermehrung dieser Plasmide ermöglicht. Zur Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, 1-10 ng DNA aus Ligationsansätze bzw. 50–200 ng Plasmid-DNA zugegeben und vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 25 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Es folgte die Zugabe von 900 µl auf Raumtemperatur vorgewärmtes S.O.C. Medium und die Zellen wurden anschließend bei 30°C oder 37°C (abhängig vom verwendeten Bakterienstamm) und 180rpm für 90 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten (+ Ampicillin 100µg/ml) ausplattiert. Während bei erwarteter hoher Koloniezahlen eine Verdünnungsreihe der Baktierensuspension ausplattiert wurde. Die Platten wurden anschließend im Brutschrank bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.4. Herstellung von Glycerolstocks

Um eine Retransformation von Plasmiden in *E.coli* zu vermeiden, wurden von positiven Plasmiden enthaltenden Klonen Glycerolstocks angelegt, aus denen bei Bedarf Übernachtskulturen angeimpft werden konnten. Hierzu wurde ein Volumen Übernachtskultur mit einem Volumen 40% steriles Glycerol versetzt. Anschließend wurden die Glycerinstocks bei –80°C gelagert. Ein einmal angelegter Glycerolstock sollte nicht mehr aufgetaut werden. Zur Herstellung einer Übernachtskultur wurde der Glycerolstock mit einer sterilen Pipettenspitze angekratzt und mit dieser dann das Kulturmedium angeimpft.

3.2. Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1. Nukleinsäure-Analytik

3.2.1.1 *Isolierung von Plasmid DNA*

Zur Isolierung wurde eine Übernachtskultur entweder aus Glycerolstocks oder von LB-Agarplatten angeimpft und, je nach verwendeten Bakterienstamm, bei 30°C oder 37°C und 180 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Zur Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA für analytische Zwecke wurde das Qiagen Plasmid-Minikit nach Hersteller Angaben verwendet. Hierbei wurden 2ml Kultur durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13.000 xg für 5 Minuten pelletiert. Durch Zugabe des alkalischen Lysepuffer wurde das Pellet lysiert und nach anschließender Neutralisation wurde das Zelllysat für 10 Minuten bei 18.000 xg zentrifugiert und der Überstand auf eine Anionenaustauschersäule gegeben. Nach einem Waschschrift der Säule erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit bidestiliertem Wasser.

Zur Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde der JETSTAR 2.0-Plasmidkit der Firma Genomed verwendet. Hierbei wurden 200 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) in einem 500 ml Schüttelkolben mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und für 16-18 Stunden bei 30°C bzw. 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach Hersteller Angaben. Am Ende der Isolierungsschritte wurde die gefällte DNA je nach Größe des Pellets in einem adequaten Volumen TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch vermessen. Anschließend wurde die DNA durch Restriktionsverdau und nachfolgender Gelelektrophorese und; wenn notwendig, auch durch Sequenzierung überprüft.

3.2.1.2 *Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die Konzentrationsbestimmung sowohl von Plasmid-DNA als auch von RNA-Lösungen erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) in einem Spektralphotometer. Hierzu wurde die verdünnte Nukleinsäure-Lösung in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1cm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Dabei entspricht bei der Messung eine OD von 1 einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA (40µg/ml RNA). Zur Bestimmung der Reinheit der Nucleinsäure-Präparation erfolgte eine zusätzliche Messung der Lösung unter gleichen Bedingungen, jedoch bei 280 nm. Der Quotient aus beiden OD-Werten ($A_{260/280}$) lieferte die Information über den Reinheitsgrad. Dabei liegt der Quotient für eine sehr reinen DNA-Lösung zwischen 1,8 und 1,9; bei RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte sind ein Indiz dafür, dass Verunreinigungen wie z.B. Proteine in der Lösung vorhanden sind.

3.2.1.3 *Restriktionsverdau von DNA*

Restriktionsendonukleasen erkennen auf einem doppelsträngigen DNA-Molekül spezifische Bindungssequenzen und spalten die DNA innerhalb dieser Sequenz. Mit Hilfe dieser Enzyme wurden Plasmide anhand spezifischer Restriktionskarten analytisch identifiziert (analytischer Verdau). Der analytische Verdau wurde mit 200 ng Plasmid-DNA in 20 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Der Restriktionspuffer sowie die entsprechenden Enzymen (1U pro µg DNA) wurden gemäß den Angaben des Herstellers zugesetzt und der Reaktionsansatz 2-16 Stunden bei einer dem Temperaturoptimum der Enzyme entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Verdauprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

3.2.1.4. *Dephosphorylierung von DNA mit CIAP*

Vektoren werden für Klonierungszwecke mittels Restriktionsenzymen linearisiert. Um bei einer Ligation zu verhindern, dass die Enden des linearisierten Vektors mit einander religieren, wurden die 5'-Phosphat-Gruppen des Vektors mit dem CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) Enzym entfernt. Zur Dephosphorylierung wurde dem bereits verdauten Restriktionsansatz CIAP-Puffer und CIAP-Enzym nach Herstellerangaben zugesetzt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 5 mM EDTA und Inkubation für 10 Minuten bei 75°C inaktiviert.

3.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Nucleinsäuren wurden im Agarosegel analysiert. So konnten mittels einer Elektrophorese, die durch Restriktionsverdau entstandenen Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und PCR-Reaktionen kontrolliert werden. Abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente bzw. der PCR-Produkte wurden 0,7–2,0 % Gele hergestellt. Hierzu wurde die entsprechende Agarose-Menge in TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf eine Temperatur von ca. 50°C wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt und das Gel in einer Gelkammer gegossen. Die Nucleinsäure-Proben wurden mit 6x Lade-Puffer versetzt und auf das erkaltete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer bei 90–120 V. Anschließend konnte die Nucleinsäure Aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht und eine Foto-Dokumentation des Gels durchgeführt werden. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen wurden Längenstandards (Marker), die Fragmente mit genau definierten Größen enthalten, zusammen mit den zu untersuchenden Proben auf dem Agarosegel aufgetragen. Anhand dieser Marker erfolgte dann die Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

3.2.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten Fragmente zunächst mit einem Skalpell unter einer UV-Handlampe (245 nm Wellenlänge) ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe eines Qiaquick DNA Gel Extraktions Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA wie in Abschnitt (2.2.1.2) beschrieben bestimmt.

3.2.2. Herstellung von shRNA-Lentivektoren

3.2.2.1. Herstellung der shRNA-Oligonukleotide

Für die Generierung des shRNA-enhaltenden Lentivektors war es notwendig, synthetische Oligonukleotide herzustellen, die nach ihrer Hybridisierung das fertige

Insert mit passenden Enden für die Ligation in dem Vektor darstellten. Zu Beginn wurde die Wahl der siRNA Sequenz unter Zuhilfenahme der Internetseite der Firma Dharmacon getroffen (<http://design.dharmacon.com/rnadesign>). Das dort zur Verfügung gestellte Design-Programm berücksichtigt bei der Auswahl die von der Arbeitsgruppe Khvorova in Nature 2004 publizierte Kriterien für wirksame siRNA [Reynolds et al., 2004]. Die Sequenzen wurden im blast search Programm von NCBI mit den Human-Sequenzen abgeglichen, um eventuelle Homologien zu anderen Genen auszuschließen. Anschließend wurde mit Hilfe dieser siRNA-Sequenz die Sense- und Antisense-Sequenzen für die shRNA Oligonukleotide nach Kriterien von Rubinson [Rubinson et al., 2003] designt und kommerziell im 100 µmol Maßstab synthetisiert. Zur Hybridisierung (*Annealing*) der beiden Stränge wurde je 1 µl (60 pmol) Sense- und Antisense-Strang mit 48 µl *Annealing*-Puffer für vier Minuten bei 95°C und anschließend für weitere 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach dem langsamen Abkühlen auf 4°C wurde der Ansatz zur Phosphorylierung eingesetzt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.2.2. Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Ligation eines shRNA-Oligonukleotides in einem linearisiertem Vektor zu erleichtern, wurden die 5'-Enden des Oligonukleotides phosphoryliert. Hierzu wurden 5 µl des Hybridisierungsansatzes mit 5 µl ATP-haltigem 5xPuffer und 1U T4-Polynukleotidkinase zusammenpipettiert und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde die Kinase zur Inaktivierung für weitere 20 Minuten bei 70°C inkubiert.

3.2.2.3. Ligation von zwei DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung der Enden des shRNA-Doppelstranges (Insert) mit denen des linearen Vektors erfolgte mit Hilfe einer Ligase. Die Orientierung des Inserts war dabei durch die für die Restriktionsenzyme spezifischen Erkennungssequenzen vorgegeben. Die verwendete T4-Ligase ist in der Lage, sowohl glatte als auch kohäsive Enden miteinander zu verknüpfen. 200 ng Vektor und eine dreifach molare Menge an Insert wurden mit 40 U T4-DNA-Ligase und 4 µl 5x Reaktions-Puffer zusammenpipettiert und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend für die Transformation in kompetente Bakterien verwendet.

3.2.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellmaterial

Die Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA II-Isolierungs Kit durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Ernte zunächst in kaltem PBS gewaschen, anschließend erfolgte die Aufreinigung der Gesamt-RNA nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde je nach Pellet Größe mit 30-60 µl DEPC-haltigem Wasser eluiert und nach der Konzentrationsmessung bei -80°C gelagert.

3.2.4. cDNA-Synthese mit Reverse Transkriptase

Das bei dieser Methode verwendete Enzym, die Reverse Transkriptase, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die Synthese von DNA von einer RNA-Matrize ermöglicht. Somit konnte mit Hilfe dieses Enzyms, die aus den Zellen isolierte RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben und dann als Ausgangsmaterial für PCR-Amplifikationen verwendet werden. Für die Herstellung der cDNA wurden 0,5 – 1 µg RNA, 1 µl Oligo dT (500 µg/ml) Primer und 1 µl dNTPs (10 mM) gemischt und mit DEPC-H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Anschließend wurden folgende Komponenten dem Reaktionsansatz zugesetzt:

- 4µl 5x Puffer
- 2µl 0,1M DTT
- 1µl Rnase-Inhibitor (40U / µl)

Nach einer Inkubation von 2 Minuten bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase (200 U). Der Reaktionsansatz wurde zuerst 50 Minuten bei 42°C inkubiert, dann zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase noch zusätzliche 15 Minuten bei 70°C inkubiert.

3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion diente der exponentiellen Amplifikation diverser humaner Gene unter Verwendung der zuvor hergestellten entsprechenden cDNAs. Hierbei wurde zunächst die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturiert. Daraufhin erfolgte die Bindung der spezifischen Primer an die einzelsträngige DANN (Annealingphase). Diese Bindung erfolgte bei einer Temperatur, bei der die Primer in der Lage sind, an die komplementären Sequenzen des DNA-Strangs zu binden. Danach synthetisierte die eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) ausgehend vom Primer den komplementären Strang (Elongationsphase) bei einer für das Enzym optimalen Wirktemperatur (72°C). Dieser Reaktionszyklus wurde mehrmals wiederholt.

Für die Reaktion wurden in einem 0,5ml Reaktionsgefäß zusätzlich zu der cDNA folgende Komponenten zugegeben:

- 5µl 5x PCR-Puffer
- 0,5µl Forward-Primer (10 mM)
- 0,5µl Reverse-Primer (10 mM)
- 0,25µl Taq-Polymerase (5U/ µl)
- ad 25 µl bid.H₂O

In einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel erfolgte die Amplifizierung der Proben nach folgendem Protokoll:

30 Sekunden bei 94°C	Denaturierung
50 Sekunden bei 54 – 60°C	Annealing (Hybridisierung)
90 Sekunden bei 72°C	Elongation

Dabei hing die Annealing-Temperatur von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ab und die Elongationszeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Die Zykluszahl variierte zwischen 20–30 Zyklen, abhängig von dem verwendeten Template. Anschließend erfolgte ein verlängerter Elongationsschritt für 7 Minuten bei 72°C. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Agarosegelen analysiert (siehe 3.2.1.5.).

3.3. Protein-Analytik

3.3.1. Protein-Isolierung

In dieser Arbeit wurde mittels Westernblot die Phosphorylierung von ERK1/2- untersucht. Dabei wurden Gesamt-Protein Extrakte verwendet. Aufgrund der Stresssituation, die durch die Aufarbeitung der Zellen entsteht, kann es zur schnellen Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen kommen. Diese könnten zu einer unerwünschten Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Proteine führen. Aus diesem Grund wurde der gesamte Prozess der Zellextraktion möglichst auf Eis durchgeführt und dem verwendeten Lysispuffer eine Reihe Protease-Inhibitoren zugesetzt. Zur Lyse der gewünschten Zellen wurden diese nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS direkt mit dem Lysispuffer (100µl / 2x10⁶Zellen) inkubiert. Durch dreimaliges Einfrieren bei –80°C und langsames Auftauen auf Eis wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 15.000 xg für 20 Minuten entfernt. Anschließend wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration das Lysat aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

In dieser Arbeit wurde weiterhin die Induktion des PPAR δ -Proteins in T-Zellen ebenfalls mit Hilfe von Westernblot analysiert. Diese Untersuchungen wurden mit Kern- bzw. Cytoplasma-Proteinextrakte durchgeführt. Die Präparation der Protein-Fractionen erfolgte unter Verwendung des *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction*-Kit nach Hersteller Angaben. Von den so gewonnen Proteinextrakten wurde die Proteinkonzentration bestimmt und anschließend wurden sie als Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Hier kam der BCA-Test zum Einsatz. Dabei bildete das Protein mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret- Reaktion). Anschließend kommt es durch Bicinchonininsäure (BCA) zur Bildung eines violetten Farbkomplexes. Die Bestimmung wurde in 96-Well Platten durchgeführt. Als Proteinstandard diente eine BSA (*bovine Serum Albumin*) Verdünnungsreihe von 0–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Von jeder Proben und Standard wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden jeweils 200 μl einer 50 : 1 BCA-Reagenz-Mischung zu 25 μl Probe gegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte dann in einem ELISA-Reader bei 550 nm. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde der Mittelwert aus den jeweiligen Doppelbestimmungen verwendet. Die Konzentration wurden anschließend mittels linearer Regression-Analyse der Standardkurve ermittelt.

3.3.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei werden in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Beim diskontinuierlichen Lämmli-System wird ein Gel (Trenngel) mit einem zweiten Gel (Sammelgel), das sich im pH-Wert sowie in der Acrylamid-Konzentration unterscheidet, überschichtet. Die Herstellung von Sammelgel (5 %) und Trenngel (7,5% bis 12%) erfolgte nach Sambrook. Die einzelnen Gele wurden nach dem in der nachfolgenden Tabelle enthaltendem Pipettierschema gegossen.

Gelkonzentration	5%Sammelgel (10 ml)	Trenngel	
		7,5% (15 ml)	12,5% (15 ml)
40% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid	1 ml	2,8 ml	3,7 ml
10%SDS	100 µl	150 µl	150 µl
Trenngelpuffer		4 ml	4 ml
Sammelgelpuffer	2 ml		
bidest.H ₂ O	6 ml	7,8 ml	7 ml
Ammoniumoersulfat (APS)	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer ist in Kapitel (2.11) beschrieben.

Nach Polymerisierung des Gels wurden 20 µg Proteinprobe mit Probenpuffer im Verhältnis von 2 : 1 versetzt, durch Aufkochen bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und auf die Minigele geladen. Neben den Proben wurde auch ein Längen-Standard aufgetragen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 15-20 mA pro Gel.

3.3.4. Westernblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zum Transfer wurde das Semidry-Blotting Verfahren eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 54 mA (1 mA/cm²Membran) für eine Stunde. Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde die Membran für 2 Minuten bei RT mit Ponceaurot reversibel gefärbt. Mit Hilfe dieser Färbung wurde der Transfer überprüft und die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixierte gleichzeitig die Proteine auf die Membran. Nach der Entfärbung mit bidest. H₂O wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen für 30 Minuten bei RT in 4% Trockenmilch in TBS-T inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5

Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen und über Nacht mit dem primären Antikörper, bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Antikörper wurden, wenn nicht anders vom Hersteller empfohlen, in 4% Trockenmilch in TBS-T (siehe Abschnitt 2.11) verdünnt und in den Konzentrationen eingesetzt, die im Abschnitt (2.5) angegeben sind. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und für 1 Stunde mit dem jeweiligen (gegen primäre Antikörper gerichteten) Peroxidase gekoppelten Sekundär-antikörper inkubiert. Die vom sekundär Antikörper eingesetzte Verdünnung ist in (Abschnitt 2.5) angegeben. Danach wurde die Membran wieder dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte nach dem Prinzip der ECL-Reaktion (enhanced chemoluminescence) mit ECL-Reagenzien der Firma Amersham und einer CCD-Kamera, die an einem Computer angeschlossen war. Die von der Kamera aufgenommenen Lichtquanten werden vom Computer ausgelesen und in Form von Graustufen dargestellt und gespeichert. Dabei besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Graustufenwert und der Zahl der Lichtquanten. Die Dauer der Aufnahme des Blots wurde so gewählt, dass der dynamische Bereich der CCD-Kamera gut ausgenutzt wurde.

3.4. Zellkultur

3.4.1. Kultivierung und Passagierung von Zellen

Alle Arbeiten wurden in einer sterilen Werkbank unter Laminatluftfluß mit sterilen Materialien durchgeführt. Sämtliche Zelllinien und primäre Zellen wurden bei 37°C, 5% CO² und hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Primäre humane T-Zellen wurden in AIM-V Medium mit 5% Humanserum, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und IL-2 (40 U/ml) kultiviert. Die T-Zelllinie Jurkat und die Zelllinie HeLa wurden in RPMI mit 10% FCS und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin gehalten. Die zur Virus-Produktion verwendete Zelllinien 293T/17 und 293FT wuchsen in DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin. Die Intervalle der Mediumwechsel und der Subkultivierung variierten abhängig von der Zelllinie. In der Regel wurden adhärente Zelllinien bei

Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde Trypsin/EDTA-Lösung (0.05 ml/cm²) auf die Zellen gegeben und für 5–10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Alle für den Trypsinierungsprozess verwendeten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt und nach Beendigung der Ablösung, das Trypsin durch Zugabe eines äquivalenten Volumens Medium mit Serumzusatz inaktiviert. Die Zellsuspension wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 xg pelletiert und anschließend in frischem Medium aufgenommen und in neue Kulturflaschen überführt. Wenn nötig, wurde die Zellzahl mit einer Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Wesentlich einfacher gestaltete sich die Subkultivierung von Suspensionskulturen. Bei der T-Zelllinie Jurkat handelte es sich um solch einer Suspensions-Zelllinie. Die Subkultivierung erfolgte durch einfache Verdünnung mit frischem Medium. Wenn die Kultur eine zu hohe Konfluenz erreichte, wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5 min; 800 xg) pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und in neue Kulturflaschen (1/6 der Zellen pro Flasche) überführt.

3.4.2. Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Nach Ernten der Zellen wurde aus der Zellsuspension eine Verdünnung mit Trypanblau hergestellt. 10 µl der Verdünnung wurden auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden vier aus jeweils 16 Quadraten bestehende Felder ausgezählt. Der Mittelwert der vier Felder wurde für die Berechnung der Zellzahl verwendet. Durch Multiplizierung des Mittelwerts mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10⁴ wurde die Zellzahl ermittelt und als Zellen pro ml angegeben.

3.4.3. Kryokonservierung von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl bestimmt und in 90% FCS + 10% DMSO aufgenommen, so dass eine Zellkonzentration von 4 x10⁶

Z/ml vorlag. Durch die Verwendung von DMSO wird eine Kristallbildung und eine partielle Dehydratation des Cytoplasmas verhindert. Je 1 ml der Suspension wurde in Kryoröhrchen gegeben. Um eine Schädigung der Zellen durch zu schnelles Gefrieren zu vermeiden, erfolgte das Einfrieren in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehältnis. Dadurch wurde ein langsames Abkühlen von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ermöglicht. Dazu wurde das Behältnis über Nacht bei -80°C platziert. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen am nächsten Tag bei -140°C gelagert.

Zur Wiederkultivierung eingefrorener Zellen wurden diese möglichst rasch in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt in 10 faches Volumen an vorgewärmtem Medium überführt. Die Suspension wurde für 5 min. zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet erneut in Medium resuspendiert, auf entsprechende Kulturflaschen aufgeteilt und im Brutschrank inkubiert.

3.4.4. Zellproliferation-Bestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der proliferative Effekt des PPAR δ -Proteins in T-Zellen untersucht. Dazu wurden Jurkat T-Zellen geerntet und die Zellzahl ermittelt. Danach wurden die Zellen mit einer definierten Ausgangszellzahl in einer 6-Wellplatte ausplattiert und in Gegenwart von Stimuli ($1\text{ }\mu\text{M}$ PPAR δ -Ligand) bzw. DMSO als Kontrolle kultiviert. Zur Bestimmung der Proliferation wurde anschließend die Zellzahl mittels Trypanblau nach 48 h, 96 h und 144 h ermittelt. Dabei erfolgte für jede Probe eine Doppelbestimmung. Die erhaltenen Werte wurden dann in einem Diagramm dargestellt.

3.4.5. Proliferationsuntersuchung mittels MTS-Assay

Der mit dem Trypanblau bestimmte proliferative Effekt sollte durch Verwendung des MTS-Assay bestätigt werden. Hierbei wurden die relativen Zellzahlen mit dem CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Dazu wurden mit Lentivirus infizierte Jurkat T-Zellen mit 20.000 Zellen/Well in einer 96-Well Platte ausgesät. Zur Messung wurden 20 μl der AQueous One Lösung zu jedem Ansatz gegeben, die Zellen vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend im Photometer bei A 490nm gemessen. Es wurden

jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Zum Nachweis der Proliferation wurden die Zellen für einen längeren Zeitraum kultiviert, und die Messung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (48h, 96h, 144h).

3.4.6. Isolierung von primären T-Zellen aus Hautproben

Psoriasis Patienten wurden von einem Arzt ca. 5mm große Hautproben (Biopsien) entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden diese in sterilem PBS aufgenommen und das Unterhautfettgewebe mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde die Hautprobe in Stücke von ca. 2 mm zerteilt und umgehend in 2 ml AIM-V Medium mit 5% Humanserum in 12-Well-Platten im Brutschrank verwahrt. Nach 2 Tagen wurden die ausgewanderten Lymphozyten mittels Zentrifugation des Kulturmediums geerntet und in 200 µl AIM-V-Medium (+ 40 U/ml IL-2) in einer 96-Well-Rundbodenplatte umgesetzt. Nach mehreren Tagen, abhängig von der Dichte der Zellen, wurden die Zellen in größeren Wells umgesetzt und weiter kultiviert.

3.4.7. Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

3.4.7.1. *Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut*

Die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus gesunden Probanden erfolgte aus heparinisiertem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Ficoll-Paque. Hierzu wurden in einem 50 ml Röhrchen 15 ml auf 37°C vorgewärmtes Ficoll mit 30 ml Blut vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde für 20 min. bei RT und 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten enthaltende Grenzschicht wurde mit einer Transferpipette in eine neues 50 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und für 10 min. bei 300 xg (+ RT) zentrifugiert.

Anschließend erfolgte ein zweiter Waschschrift mit PBS. Nach dem Waschen wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Anreicherung der CD3⁺ T-Zellen verwendet.

3.4.7.2. *Isolierung von CD3⁺ T-Zellen durch MACS aus PBMCs*

Zur Isolierung der CD3⁺ T-Zellen aus den PBMC wurde das magnetische Zelltrennungssystem MACS der Firma Miltenyi verwendet. Bei diesem System werden die Zellen auf Säulen geladen, deren Matrix aus paramagnetischen Mikrobeads bestehen, an die monoklonale Antikörper gebunden sind. Die Aufreinigung erfolgte dann in einem Magnetfeld, das durch die Insertion der Säule in das Magnetfeld erzeugt wurde. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und nach zweimaligem Waschen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit Puffer herausgespült. Das MACS-System kann zur Anreicherung (positiv Sortierung) oder zum Ausschluss (Depletion bzw. negativ Sortierung) einer Zellpopulation aus einer Gesamtzellsuspension eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Sortierung werden Ausgangsfraction, Negativ- und Positivfraction durchflusscytometrisch analysiert.

3.4.7.3. *Positive Sortierung von CD3⁺ T-Zellen*

Die Aufreinigung der CD3⁺ T-Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt. Zu der PBMC-Fraktion wurden CD3-Multisortbeads (80µl / 10⁷Zelle) zugegeben und für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Diese wurden anschließend auf eine mit MACS-Puffer äquilibrierten LS-Separationssäule gegeben. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer wurden die Zellen mit 5 ml eluiert. Das Eluat wurde wieder, wie oben beschrieben, über eine zweite Säule gegeben, um eine größere Reinheit zu erreichen. Ein 20 µl Aliquot des Eluats wurde für die Reinheitsüberprüfung durch Färbung und FACS eingesetzt. Dazu wurden die Zellen der jeweiligen Fraktion mit den folgenden Antikörpern α-CD3-APC, α-CD19-FITC und α-CD14-PE in einem 1 : 25 Verhältnis für 10 min. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde einmal gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörpern zu entfernen. Die Zellen wurden dann in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und im FACS-Calibur gemessen.

3.4.7.4. Anreicherung von CD3⁺ T-Zellen durch Depletion

Für die Induktionsversuche war es notwendig naive, nicht aktivierte CD3⁺ T-Zellen zu gewinnen. Um eine T-Zell-Rezeptor vermittelte Aktivierung zu verhindern, wurden die CD3⁺ T-Zellen durch Depletion andere Zellpopulationen aus den PBMCs aufgereinigt. Dazu erfolgte zu Beginn eine Separation der Monozyten und B-Zellen mittels CD14- bzw. CD19-Beads (je 20µl / 10⁷Zelle) aus den PBMCs. Bei der Depletion werden im Gegensatz zur Separation nicht die an der Säulenmatrix haftende Zellen weiterverwendet, sondern jene, die durchlaufen und mit dem Spülpuffer eluiert werden. Aus der so erhaltenen Fraktion wurden anschließend wieder mittels Sortierung die Phagozyten sowie die natürlichen Killerzellen aussortiert. Dazu wurde die Zellsuspension mit FITC gekoppelten α-CD16- bzw. α-CD56-Antikörpern (jeweils 10µl / 10⁷Zelle) für 15 min. im Kühlschrank inkubiert. Nach einem Waschschrift und Resuspension der Zellen in MACS-Puffer (400 µl) erfolgte die Zugabe von anti-FITC-Microbeads (80µl / 10⁷Zellen). Nach einer 20 minütigen Inkubation sowie einem Waschschrift wurden die Zellen auf eine äquilibrierte LS-Säule gegeben. Die CD3⁺ T-Zellen befanden sich dabei im Durchfluss. Deshalb wurde dieser sowie die Puffermengen aus den Spülvorgängen in einem sterilen 15 ml Röhrchen aufgefangen. Nach Bestimmung der Reinheit wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in AIM-V-Medium (+ IL2) aufgenommen und in 6-Well-Platten kultiviert. Die Färbung der unterschiedlichen Depletions-Fractionen zur Bestimmung der Reinheit erfolgte wie bereits in Abschnitt (2.2.3.7.3) beschrieben. Die Reinheit lag im Bereich von 95%.

3.4.8. Methoden zur Analyse der Apoptose

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der anti-apoptotische Effekt von PPAR δ in T-Zellen untersucht. Die Experimente wurden sowohl mit primären T-Zellen als auch mit der T-Zelllinie Jurkat durchgeführt. Die Apoptose wurde dabei durch Inkubation der Zellen mit den apoptotischen Stimuli IFN α bzw. Anti-Fas-Antikörper oder durch Entzug von Wachstumsfaktoren induziert. Bei der Stimuli-induzierten Apoptose wurde den jeweiligen Zellen in Kultur IFN α (200 ng/ml) oder Anti-Fas-Antikörper (20 ng/ml) zugegeben.

Für die Induktion der Apoptose durch Entzug von Wachstumsfaktoren wurden die Zellen in Medium ohne FCS Zusatz kultiviert. Die Kultivierungsdauer der Zellen unter diesen proapoptotischen Bedingungen wurde in Vorversuchen ermittelt und betrug zwischen 2 und 6 Tagen. Zur Messung des Apoptoseverhaltens der behandelten Zellen wurde entweder die Annexin V- oder die Propidiumiodid-Färbung verwendet.

3.4.9. Nachweis der apoptotischen Zellen durch Annexin V –Färbung

In der frühen Phase der Apoptose treten Veränderungen in der Struktur der Zytoplasmamembran auf. Als Folge dieser Veränderung kommt es an der Plasmamembran zu einer Verlagerung des Phosphatidylserins (PS) von der inneren zu der äußeren Apoptose, wodurch PS an die Zelloberfläche exponiert wird. Das Annexin V Ca^{2+} -abhängige-phospholipide-Bindungsprotein besitzt eine hohe Affinität für PS und bindet daher an PS-exponierende Zellen. Zum Nachweis apoptotischer Zellen werden diese mit Annexin V, das an einem Flouorchrom (z.B. Cy 5) konjugiert ist, gefärbt und zytometrisch nachgewiesen. Für die Annexin V-Färbung wurden die Zellen geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1x Bindungspuffer resuspendiert und die Zellzahl auf 1×10^6 Z/ml eingestellt. 100 μl wurden in einem 5 ml-PS-Röhrchen überführt und nach Zugabe von 5 μl Annexin-Cy5 für 15 min. bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 300 μl Bindungspuffer (1X) zugesetzt und durchflußzytometrisch gemessen. Die Messung erfolgte im FL-4-Fluoreszenzkanal im FACS-Calibur.

3.4.10. Zellzyklusprofilanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung

Durch die Verwendung von Propidiumiodid (PI) können mit Hilfe der Durchflußzytometrie Aussagen bezüglich des DNA-Gehalts einzelner Zellen und somit über die Verteilung im Zellzyklus getroffen werden. Eines der typischen Merkmale der Apoptose ist die Fragmentierung chromosomaler DNA durch endogene Nucleasen, die die DNA zwischen den Nucleosomen schneiden. Zusätzlich wird auch der Zellkern während der Apoptose fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden oft von der Zelle freigesetzt, so dass bei einer PI-Färbung von apoptotischen Zellen ein DNA-Gehalt zu beobachten ist, der tiefer ist

als bei einer normalen Zellen, die sich in der G1-Phase befindet. Diese Phase wird daher als Sub-G1 bezeichnet. Somit kann die DNA-Färbung auch verwendet werden, um die Apoptose in Zellen zu analysieren.

Bei der PI-Färbung stellt die Beseitigung der zellulären RNA eine wichtige Voraussetzung dar, da PI auch mit diese interkaliert und färbt. Des weiteren ist die Permeabilisierung der Zellen und des Zellkerns erforderlich. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und nach einem einmaligem Waschschrift mit PBS in Polystyren(PS)-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (500 xg, RT für 7 min.) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 70% kaltem Ethanol (5 ml per 3×10^6 Zellen) fixiert. Die fixierten Zellen wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Fixierung der Zellen mit Ethanol führt zur Permeabilisierung der Zellmembran und ermöglicht somit das Eindringen von PI in den Zellkern und das Färben der DNA. Die fixierten Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und das Zellpellet in 400µl PBS resuspendiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 20 µg/ml RNase A und Inkubation für 30 min. bei 37°C die RNA verdaut. Danach wurde die PI-Lösung zugegeben (1 µg/ml) und die Zellsuspension durch Vortexen gemischt. Die PS-Röhrchen mit den Zellsuspensionen wurden für 15 Minuten bei RT inkubiert und dann im FACS gemessen. Die Messung der Proben wurde im FL-3-Kanal (logarithmisch) des FACS durchgeführt. Die Messparameter wurden mit Hilfe von nicht apoptotischen Kontrollproben eingestellt. Nach der Messung wurden die Daten mit der Software CellQuestpro dargestellt und ausgewertet.

3.4.11. Durchflußzytometrie

Fluoreszenzmarkierte und E-GEP-exprimierende Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung des Cytofluorometer FACSCalibur der Firma Becton Dickinson vermessen. Die durchflußzytometrische Analyse basiert auf dem Prinzip der gegebenen Lichtstreuungseigenschaften der Zellen sowie der Erfassung von fluoreszierenden Antikörpern emittierter Fluoreszenzstrahlung, um Zellen auf der Einzelzellebene zur charakterisieren. Bei einer FACS-Messung können die zu analysierenden Zellpopulationen anhand von drei zellspezifischen Eigenschaften; der Zellgröße (FSC), der Granularität (SSC) und

der Fluoreszenzintensität differenziert werden. Für die FACS-Analyse ist eine Einzelzellsuspension des zu untersuchenden Materials Voraussetzung.

Bei der Verwendung verschiedener Fluorochrome-gekoppelte Antikörper werden diese so gewählt, dass sie nach der Anregung mit dem Laserlicht in unterschiedlichen Wellenlängen Licht emittieren und somit die Bindung der einzelnen Antikörper in der zu untersuchenden Zellpopulation analysiert werden kann. Bei der Isolierung und Sortierung der primären T-Zellen wurden als Fluorochrome die Fluoresceinisothiocyanat (FITC, FL1), Phycoerythrin (PE, FL2), (PerCP, FL3) und (APC, FL4) verwendet. Zur Apoptose-Analyse wurde das Cy5-gekoppelte Annexin V (FL-4) verwendet. Die Vorwärtsstreulichtsignale (FSC) und die Seitwärtsstreulichtsignale (SSC) wurden mit linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Für die Messung wurde von jeder Probe die Daten von 10000-30000 Zellen aufgenommen und die Analyse erfolgte mit Hilfe von CellQuestpro Software.

3.4.12. Produktion lentiviraler Partikel

3.4.12.1. Calciumphosphat-Transfektion von 293HEK-Zellen

Zur Transfektion der DNA in den eukaryotischen Zellen wurde die Calciumphosphat-Kopräzipitations Methode gewählt, bei der die DNA über Salzkomplexe an die Zellmembran bindet und aufgenommen wird.

Für die Transfektion wurden als Produzentenzellen die 293T/17-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um humane, embryonale Nierenzellen, die stabil das SV40 T-Antigen exprimieren. Dadurch werden die Proteine, die von SV40-Replikationsursprung tragenden Plasmiden kodiert werden, stärker exprimiert. Die adhärennten 293T/17-Zellen wurden vor jeder Virusproduktion frisch aufgetaut und bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% in 175cm²-Kulturflaschen kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 10cm-Petrischalen mit je nach verwendetem Protokoll variierenden Zellzahlen (siehe Tabelle 1) in DEMEM-Kulturmedium ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium 1-4 h vor Transfektion abgesaugt und durch frisches DEMEM bei den Protokollen 1 bis 3 oder Advancedmedium (+ Zusätze) bei Protokoll 4 ersetzt. Für die Virusproduktion wurden,

wie bereits in der Einleitung erwähnt, neben verschiedenen Produktionsprotokollen wurden zusätzlich zwei unterschiedliche Verpackungssysteme ausgetestet.

Aus diesem Grund wurde für die Herstellung der Transfektionsmische abhängig vom verwendeten Verpackungssystem drei bzw. vier Plasmide eingesetzt. Ferner variierte je nach verwendetem Protokoll, die von dem jeweiligen Plasmid eingesetzte Menge.

Die Transfektionsmische setzten sich wie folgt zusammen:

zweite-Generation

x µg Transfervektor
x µg Verpackungvektor
(psPAX2)
x µg Envelopvektor

dritte-Generation

x µg Transfervektor
x µg Verpackungsvektor 1
(pMD2.G)
x µg Verpackungsvektor 2
(pMDLg/pRRE)

+ 50 µl 2.5 M CaCl₂

ad 500 µl steriles HEPES-H₂O

+ 500 µl 2x HBS-Puffer, pH 7.02 - 7.05

Der Transfektionsmix wurde anschließend gut gemischt und bei Raumtemperatur für 20 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Mix tropfenweise aufgetragen und die Zellen dann für 5 – 6 h im Brutschrank inkubiert. Bei der Produktion nach Protokoll 4 wurde dem Transfektionsmix vor dem Auftragen Chloroquine in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. Nach der sechsstündigen Inkubation wurde das Transfektionsmedium gegen 6ml neues DMEM-Medium (bzw. 8 ml Advanced-Medium bei Protokoll 4) ausgetauscht. Wenn der Effekt von Natrium-Butyrat getestet werden sollte, wurde den Zellen nach Mediumwechsel Natrium-Butyrat mit der Endkonzentration von 10 mM zugegeben. 48 Stunden später wurde mit einer Pipette der virushaltige Überstand abgenommen, für 5 min bei 800 xg und 4°C abzentrifugiert und mit einem 0,45 µm-Filter filtriert. Lentivirusüberstände wurden entweder direkt zu Infektions- oder Titerbestimmungsexperimente verwendet oder in Aliquots bei –80°C gelagert. Nach Ablauf von weiteren 24 h wurde der zweite virushaltige Überstand abgenommen und damit wurde so wie mit dem ersten Überstand verfahren.

Tabelle 1: Ein Vergleich der für die Lentivirus-Produktion eingesetzte DNA-Menge in Abhängigkeit des verwendeten Protokolls

Protokoll	Referenz	DNA/10cm ² (µg)	DNA/10 ⁶ Z (µg)	Plasmid- Verhältnis (T : P : E)	Zellzahl
1	http://tronolab.epfl.ch	7,1	16,4	3,3 : 2,5 : 1	2,5 x 10 ⁶
2	[Lois et al., 2001]	3,5	4,2	2 : 2 : 1	4,8 x 10 ⁶
3	[Blesch, 2004]	3,5	5,1	2,8 : 2,6 : 1	4 x 10 ⁶
4	diese Arbeit	12,4	12,4	2 : 1 : 1	5,8 x 10 ⁶

Für die Optimierungsversuche wurde unter anderem das Produktionsprotokoll von Mitta [Mitta et al., 2005] modifiziert. Dieses modifizierte Protokoll entspricht in dieser Arbeit Protokoll 4. Für die Transfektion von Vektoren ≥ 10 kb unter Verwendung dieses Protokolls wurde die gesamte eingesetzte DNA-Menge erhöht.

Die Transfektionsgemische setzten sich wie folgt zusammen:

Transfervektor ≤ 10 kb

18 µg Transfervektor

9 µg psPAX2

9 µg pMD2.G

ad 600 µl steriles HEPES-H₂O

+ 60 µl 2,5 M CaCl₂

+ 600 µl 2x HBS-Puffer, pH 7.02-7.05

Transfervektor ≥ 10 kb

36 µg Transfervektor

18 µg psPAX2

18 µg pMD2.G

3.4.12.2. Titerbestimmung

Der Virustiter der generierten Lentivirusüberstände wurde durch Infektion von HeLa-Zellen bestimmt. Der für die Virusherstellung verwendete Transfervektor kodiert für das Gen des grün-fluoreszierenden Proteins GFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Infektion der Zielzellen mit diesen Vektoren führte zur Expression von

GFP, welches sich durchflußzytometrisch im FACS detektieren und quantifizieren lässt. Somit konnte die Transduktionseffizienz der Zielzellen bestimmt werden. Zur Infektion wurden die HeLa-Zellen in einer 6-Wellplatte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und den Zellen frisches Medium mit 8 µg/ml zugefügt. Ein Well wurde trypsiniert und zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Anschließend wurde der virushaltige Überstand in unterschiedlichen Verdünnungen den Zellen in den Wells zugesetzt. Dadurch konnte die Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion ermittelt werden. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Nach 48 h wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und nach der Resuspendierung in 400 µl FACS-Puffer im FACS vermessen. Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen ermittelt. Für die Berechnung der Anzahl infektiöser Partikel wurde die Verdünnungsprobe verwendet, bei der die Anzahl an GFP-positiven Zellen zwischen 1% und 10% lag. Die Berechnung erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\text{Titer (U/ml)} = (A \times Z / V) \times F$$

A = Anteil der GFP positiven Zellen

Z = Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion

V = Volumen des Überstands im Well

F = Verdünnungsfaktor des eingesetzten Virus

3.4.12.3. Infektion von Zellen

Zur Infektion adhärenter Zellen wurden die Zellen mit der gewünschten Zellzahl in einer 6-Wellplatte oder in einer Petrischale ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Virushaltigen Überstand mit der notwendigen MOI und Polybrene (Endkonzentration 8 µg/ml) infiziert. Dabei war die Anzahl der pro Zelle eingesetzten infektiösen Partikel (MOI; *multiplicity of infection*), versuchsabhängig. Die MOI wird mit Hilfe der aus der Titerbestimmung ermittelten Konzentration und der aktuellen Zellzahl errechnet. Nach 12 h wurde das virushaltige Medium durch frisches ersetzt und nach 48 Stunden die Infektionsraten durchflußzytometrisch in FACS-Gerät bestimmt.

Dazu wurden die geernteten Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und in 300–500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Danach erfolgte die Messung im FACS und die Auswertung der Daten mit der CellQuest Software.

Zur Infektion der Suspensionszelllinie Jurkat wurden die Zelle am Tag der Infektion geerntet und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde die Zellzahl auf 3×10^5 Z/100µl eingestellt und die Zellen in 15 ml Röhrchen gegeben mit 100 µl Zellsuspension per 15 ml Röhrchen. Danach erfolgte die Zugabe des virushaltigen Überstandes (+ Polybrene) mit einer MOI von 10 und der Zentrifugation bei 800 xg für 1 h. Für eine hohe Infektionsrate ist es besonders wichtig, dass das Endvolumen aus Zellsuspension und Virusüberstand während der Zentrifugation nicht 2 ml überschreitet. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation für 3 h im Bruttschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen und den Zellen erneut Virusüberstand mit MOI 10 zugegeben. Anschließend wurde wieder für 1 h zentrifugiert (RT, 800 xg). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 6 Wellplatten überführt und im Bruttschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und nach 48 h post Infektion wurde die Infektionsrate mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Zellen konnten nach Bestimmung der Infektionseffizienz für die Folgeexperimente eingesetzt werden.

3.4.12.4. Anreicherung viraler Partikel

Um eine höhere Infektionseffizienz zu erreichen, können die produzierten Virus-Partikel konzentriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür die Ultrazentrifugationsmethode verwendet. Dazu wurden 5ml einer sterilen 20% (w/v) Sucrose in TNE-Puffer in ein polyallomer conical Zentrifugationsröhrchen überführt und vorsichtig mit 25 ml nach Abschnitt 3.3.9.1 generiertem Virusüberstand beschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in einem SW28 Beckmann-Rotor für 4h und 4°C bei 12000 rpm. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das trockene Pellet in 100–1000 µl Medium resuspendiert, aliquotiert und bei –80°C gelagert. Ein Aliquot wurde zu Titerbestimmung wie in Abschnitt (2.2.6.2) beschrieben verwendet. Modifikationen an diesem Zentrifugationsprotokoll im Verlauf der Optimierungsexperimente wurden im Resultat-Kapitel an entsprechender Stelle erwähnt.

4. Ergebnisse

4.1. Optimierung der Produktion und Anreicherung lentiviraler Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des PPAR δ -Gens mittels siRNA inhibiert werden, die als kurze Haarnadel-RNA (*short hairpin*, shRNA) exprimiert wird. Um eine stabile shRNA-Expression zu gewährleisten, ist die Transduktion von sh-RNA exprimierenden Lentiviren erforderlich, die man durch Klonierung der gewünschten DNA-Oligonukleotide hinter den U6-Promotor des pLL3.7-Vektors erhält.

4.1.1. Optimierung der Lentivirus Produktion

Zu Beginn des Optimierungs-Prozesses wurden drei in der Literatur publizierte Virus-Produktionsprotokolle mit divergenten Gesamt-DNA-Mengen per Zelle, aber gleicher Transfektionsmethode getestet. Die Vektoren des als dritte Generation bezeichneten Verpackungssystems wurden hierbei zur Herstellung der Viren verwendet [Dull et al., 1998]. Die Transfektion der Vektoren und Virusernte erfolgte wie in Abschnitt (3.4.12.2) und (3.4.12.3) beschrieben. Das Lentivirus produziert nach Infektion neben der shRNA das E-GFP-Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors, wodurch die relative Transduktionseffizienz bzw. der Virustiter durchflußzytometrisch bestimmt werden kann (Abschnitt 3.4.12.2.).

Wie in Abb.4.1.a) dargestellt lieferte Protokoll 1 (bzgl. genauerer Angaben siehe Abschnitt 3.4.12.1) den höchsten Titer an Lentiviren im Vergleich zu den beiden anderen Protokollen.

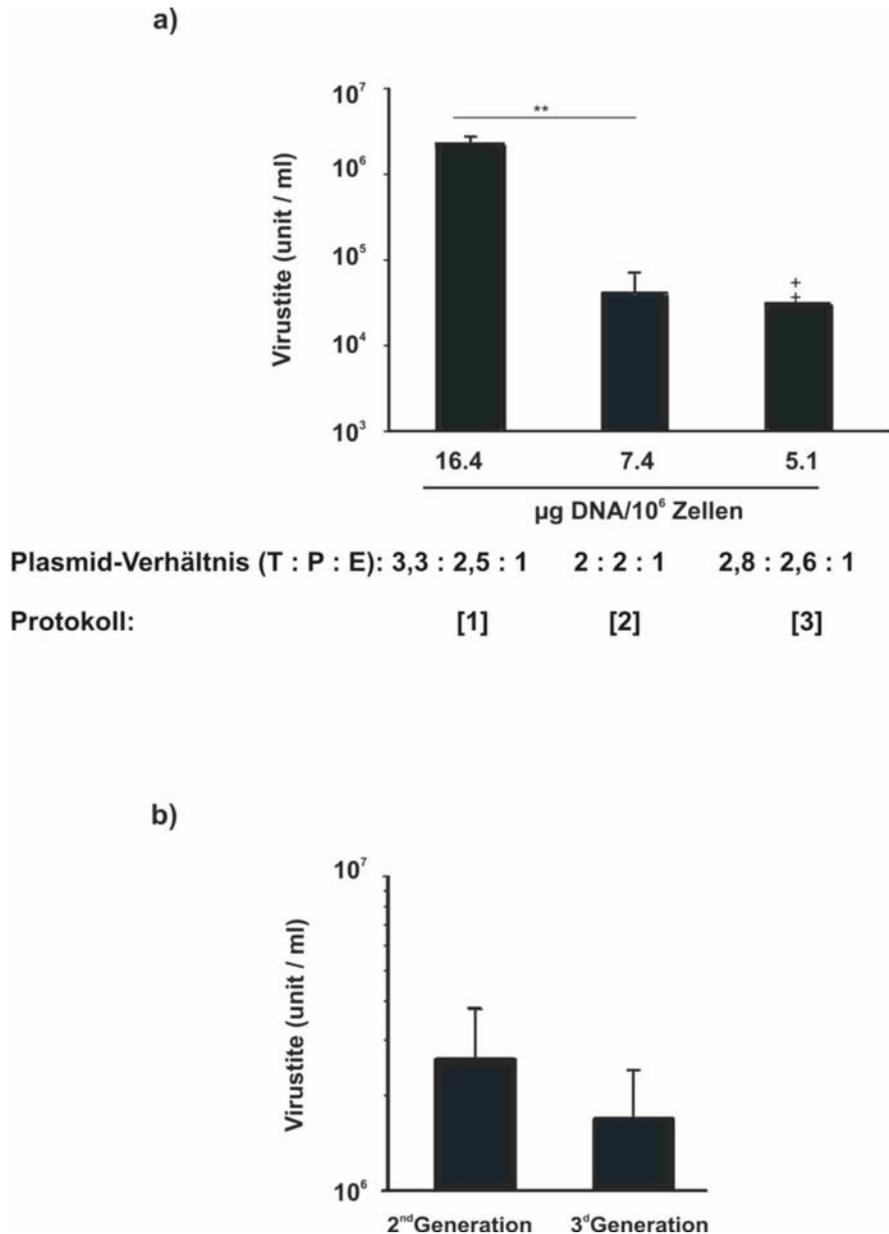


Abb.4.1.: Vergleich unterschiedlicher Virus-Produktionsprotokolle. a) 293FT Zellen wurden mit einer Gesamtmenge an DNA transduziert wie im jeweiligen Protokoll vorgegeben. Dafür wurden die in Referenz [Dull et al., 1998] beschriebenen Vektoren: Transfervektor (T) pLL3.7, Verpackungsvektor (P) und Envelopevektor (E) verwendet. Die dem jeweiligen Protokoll entsprechenden relativen DNA-Verhältnisse der Plasmide (T: P :E) sind unter dem Diagramm angegeben. Virustiter wurde durch FACS-Analyse E-GFP-positiv infizierter Hela-Zellen ermittelt. Gezeigt sind die Durchschnittsdaten \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. ** $p < 0.01$ steht für die Signifikanz, die mittels eines zweiseitigen Student's t-test bestimmt wurde. ++ Protokoll 3 wurde nur einmal durchgeführt. b) Transduktion von 293FT Zellen basierend auf dem Protokoll des 2nd Generation oder 3rd Generation Virus Verpackungssystems. Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus 5 (3rd Generation) bzw. 3 (2nd Generation) unabhängigen Transfektionsversuchen.

Als nächstes wurde der Effekt der unterschiedlichen Verpackungssysteme hinsichtlich der Virusproduktion untersucht. Bei dem sogenannten dritte-Generation-System (3^{rd} -Generation) befinden sich die zur Herstellung eines Viruspartikel notwendigen Elemente auf vier separaten Plasmiden, was eine Kotransfektion von vier Vektoren anstelle von drei, wie beim „zweite-Generation-System“ (2^{nd} -Generation) der Fall, bedeutet. Es stellte sich heraus, dass der Virustiter beim 2^{nd} -Generation Verpackungssystem doppelt so hoch war wie beim 3^{rd} -Generation-System. Das lentivirale System wird auch zum Gentransfer verwendet. Daher ist die Produktion hoher Virustiter insbesondere für Transfervektoren wichtig, die aus unterschiedlichen *backbones* bestehen und große *Inserts* beinhalten. Diese Transfervektoren dienen hier der Optimierung.

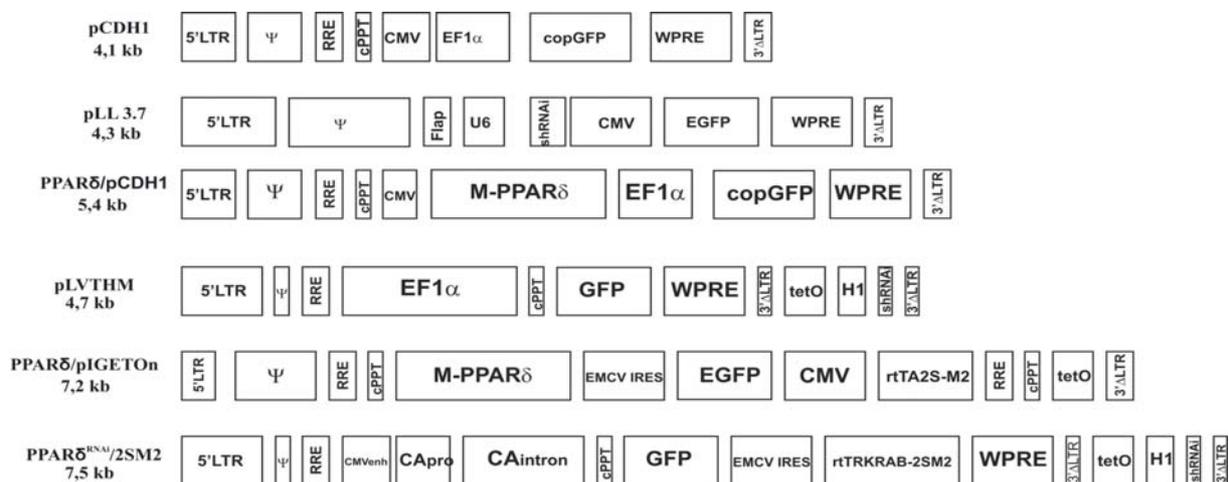


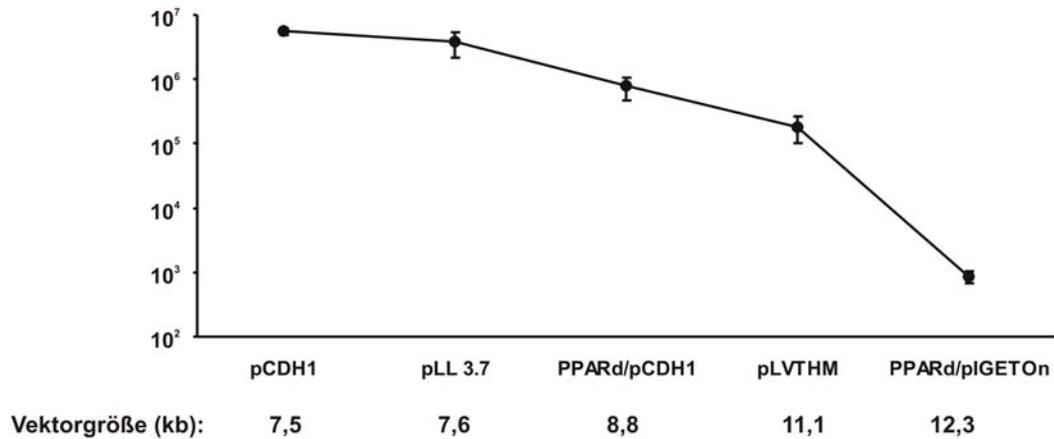
Abb.4.2.: Schematische Darstellung der in Abb. 4.2.b) – 4.2.d) verwendeten lentiviralen Vektoren . Die Größe des *Inserts* ist unter dem dazu gehörigen Plasmid-Namen angegeben. 5'-LTR-Long Terminal Repeat; Ψ -Verpackungssignal; RRE-Rev Response Element; cPPT-Central Polypyrimidinerine Tract; CMV- Human Cytomegalovirus Promotor; EF1 α -Elongation Factor 1 α Promotor; copGFP-Copepod Green Fluorescent Protein; WPRE-Woodchuck hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element; 3 Δ 'LTR-self-inactivating 3'-LTR; U6-U6 DNAPolymerase III Promotor; shRNAi- Short Hairpin RNA interference DNA sequence; M-PPAR δ -murine peroxisome proliferation activator receptor δ cDNA; tetO- tetracycline Operator; H1-H1 DNA Polymerase III Promotor; EMCV IHRES-internal ribosomal entry site sequence of encephalo-myocarditis virus; rtTA2SM2- synthetic tetracycline controlled transactivator; CMVenh- CMV enhancer; Capro- Chicken β -Actin promotor; Caintron- Chicken β -Actin first intron; rtTRKRAB-2SM2-Kruppel-associated box (KRAB) fused to synthetic tetracycline-controlled transactivator (rtTA2S-M2).

Die für den pLL3.7-Transfektor (4.3 kb) bisher etablierten Konditionen wurden für Vektoren der Größe 4.5 - 7.1 kb (siehe schematische Darstellung der Vektoren in Abb.4.2.) ausgetestet. Um ein konstantes Molar-Verhältnis bei der Transfektion zu gewährleisten, wurde die Gesamt-DNA-Menge der transfizierten Zellen angeglichen (von 36 µg auf 72 µg).

Wie in Abb.4.3.a) zu sehen, geht der Virustiter mit zunehmender Größe der Transfektoren signifikant zurück. Durch Modifikation eines von [Mitta et al., 2005] beschriebenen Protokolls gelang es, Titer von bis zu 10^5 V/ml für Vektoren zu erhalten, die Inserts größer als 7 kb enthielten (Abb.4.3.b- schwarze Balken). In diesem optimierten Protokoll, detailliert im Methodenteil beschrieben, wurde die zum Transfer eingesetzte Gesamt-DNA von $6\mu\text{g} / 10\text{cm}^2$ auf $12.4\mu\text{g} / 10\text{cm}^2$ erhöht (wie in [Mitta et al., 2005] spezifiziert).

Es wurde beschrieben, dass die Zugabe des Histondeacetylase Inhibitors Natriumbutyrat die Ausbeute an Viruspartikeln während der Virusproduktion zusätzlich erhöht [Sena-Esteves et al., 2004]. Allerdings ließ sich diese Beobachtung nicht in dieser Arbeit bestätigen (Abb.4.3.b - graue Balken).

a)



b)

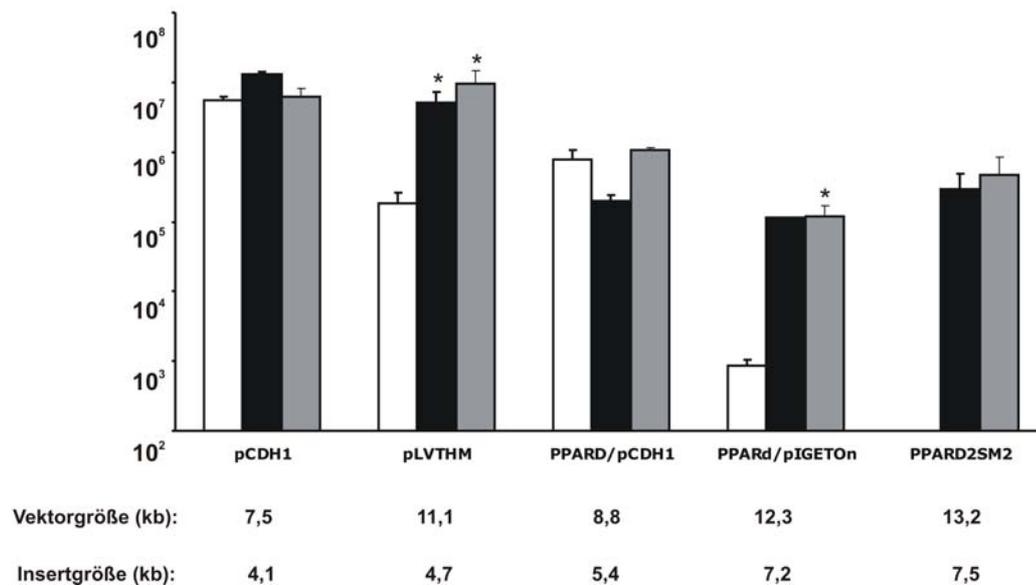


Abb.4.3: Einfluss der Vektorgröße auf den Virustiter. b) Fünf unterschiedliche lentivirale Vektoren (dargestellt in Abb.4.2) wurden unter Verwendung von Protokoll 1 (<http://tronolab.epfl.ch/page58122.html>) produziert. Die Titer-Daten aus mindestens zwei unterschiedlichen Virus Produktionen sind dargestellt (mw \pm sa). c) Die Lentivirus Produktion erfolgte mit Vektoren mit unterschiedlichen Insert-Größen (7.5 bis 13.2 kb). Dabei wurde einmal nach Protokoll 1 (Weiße Balken) oder wie im Methodenteil beschrieben (optimierter Protokoll) in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit (graue Balken) von 0,1 mM Natriumbutyrat getestet. Es werden Daten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. * $p < 0.01$ in a two sided student t-test. Es konnten keine messbaren Titer für den größten Vektor nach Protokoll 1 produziert werden.

Sowohl für das optimierte Protokoll als auch für das früher erwähnte Protokoll 1 konnte eine starke inverse Korrelation zwischen der Größe der proviralen Integrations-Sequenz und dem Virustiter (Abb.4.4a., $r = -0,93$) festgestellt werden. Dagegen bestand keine Korrelation zwischen dem Virustiter und der Größe des *backbone* der Transfervektoren (Abb.4.4.b). Übereinstimmend mit anderen Beobachtungen [Kumar et al., 2001] konnten trotz dieses optimierten Protokolls keine für Experimente brauchbaren Virustiter erzielt werden.

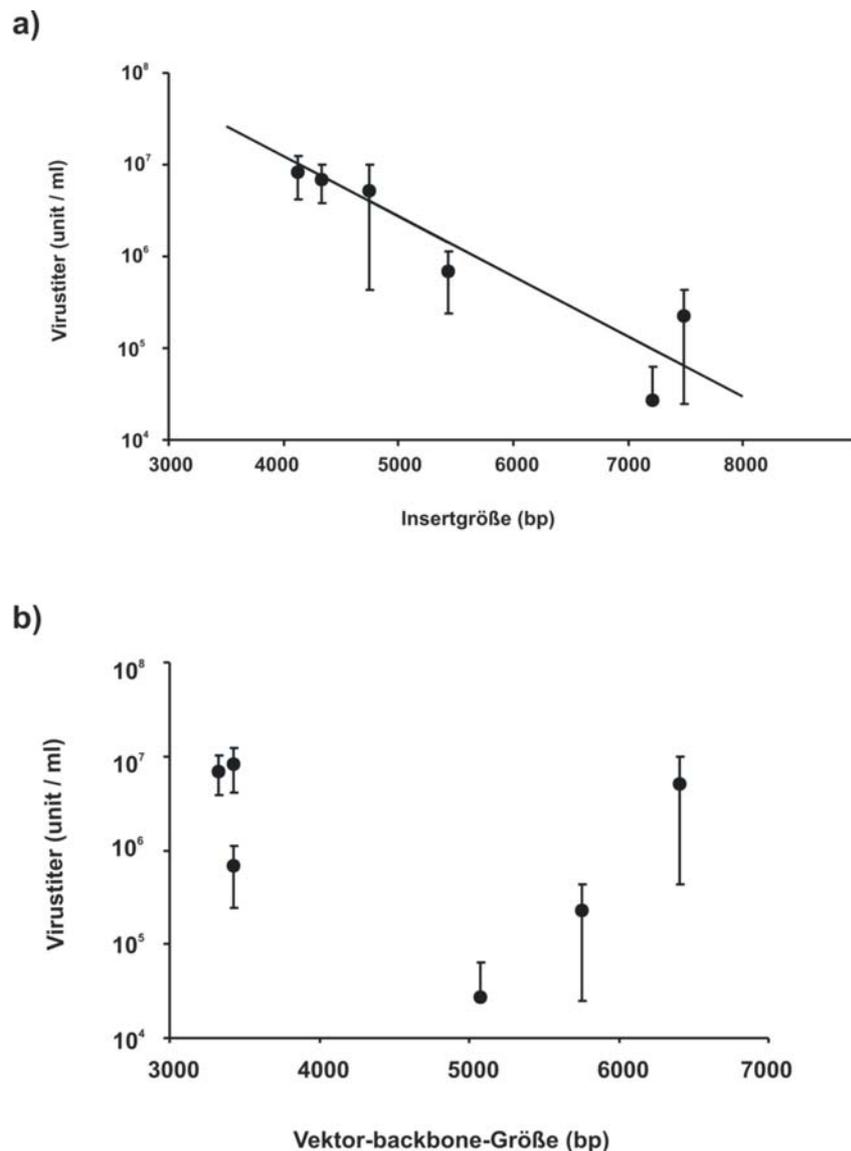


Abb.4.4.: Einfluss der *Insert-* bzw. *backbone*-Größe auf den Virustiter. Virusproduktion nach den beiden in Abb. 4.2. erstellten Protokollen und den dort beschriebenen Vektoren. Lentiviraler Titer gegen Insert- (linkes Diagramm) bzw. Vektor-*backbone*- Größe (rechtes Diagramm) aufgetragen. Für jeden Datenpunkt im jeweiligen Diagramm ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 6 unabhängigen Virus Produktionen dargestellt.

4.1.2. Optimierung der Virus-Aufkonzentrierung mittels Ultrazentrifugation

Für in vivo Anwendungen als auch für eine effektive Infektion schwer infizierbarer primärer Zellen sind Virusstocks mit hohen Titer von großer Wichtigkeit. Um eine hohe Ausbeute an Viruspartikeln zu erhalten, stellt die Aufkonzentrierung der virushaltigen Zellkulturüberstände neben der Virusproduktion einen weiteren wichtigen Schritt in der Optimierungsstrategie dar. Gemäß Literaturangaben erfolgt die Aufkonzentrierung durch 2 h Zentrifugation bei 90.000 xg (26.000 rpm) [Sena-Esteves et al., 2004] (<http://tronolab.epfl.ch/page58122.html>) . Daher wurde dieses Protokoll zu Beginn für die Aufkonzentrierungen verwendet.

Nach Entfernen von Zellbestandteilen wurden die virushaltigen Überstände unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und anschließend in geringem Puffervolumen (PBS) aufgenommen. Ein Teil dieser Suspension diente der Titerbestimmung.

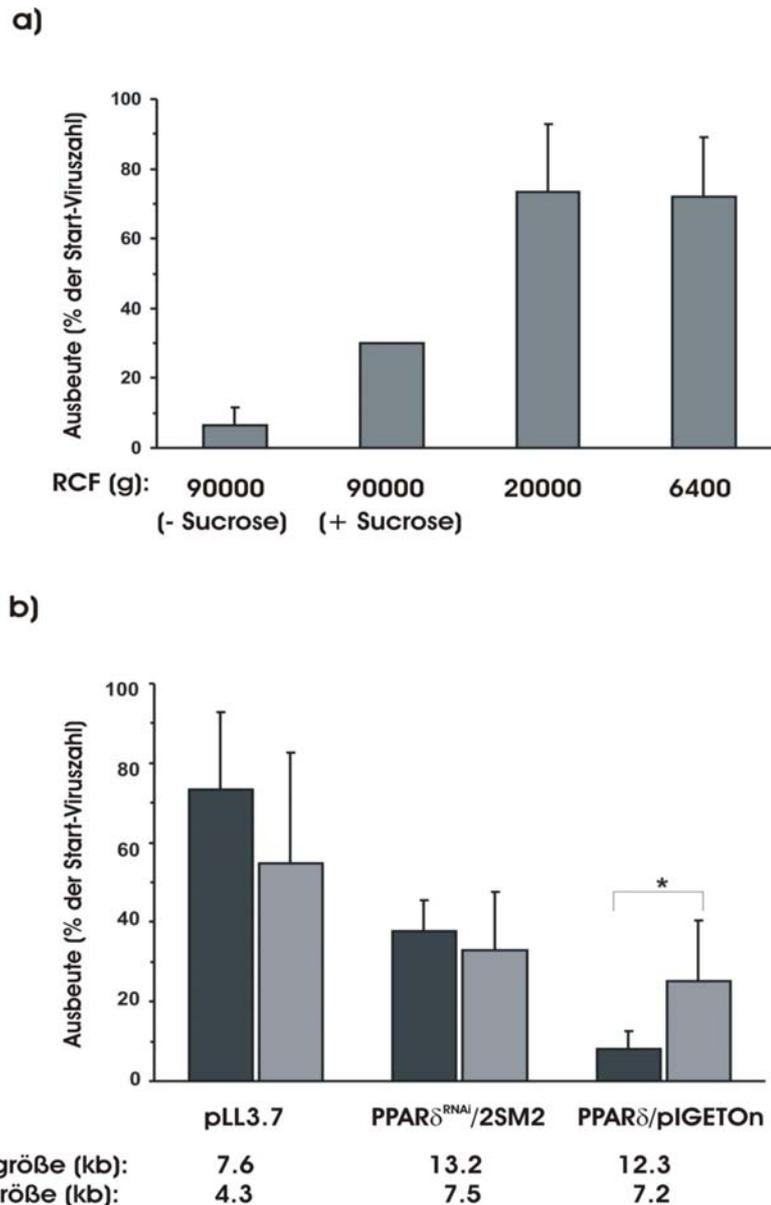


Abb.4.5.: Einfluss von Geschwindigkeit und Beschleunigung auf die Ultrazentrifugation der Viruspartikel. a) Ein 20% Sucrose-Kissen wurde mit Lentivirus-haltigem Zellüberstand überschichtet und bei der angegebenen Geschwindigkeit für 4 h bei 4°C zentrifugiert. (die 90.000 xg Zentrifugation erfolgte dagegen für 2 h). Das Virus-Pellet wurde in Medium resuspendiert und mittels FACS-Analyse von mit E-GFP Viruslösung infizierter HeLa-Zellen quantifiziert. Mit Ausnahme vom Balken, der die Daten für 90.000 xg mit Sucrose darstellt (wurde nur einmal durchgeführt), entsprechen die hier gezeigten Daten dem Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 3 unterschiedlichen Experimenten. b) Zellüberstände mit Viruspartikeln, die die in der Abb. gezeigten proviralen Vektoren enthielten, wurden bei 20.000 xg und Sucrose-Kissen mit (schwarze Balken) oder ohne Start-Beschleunigung zentrifugiert (graue Balken). Anschließend erfolgte die Quantifizierung wie in Punkt (a) beschrieben. Für jeden Datenpunkt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt (* $p < 0.014$).

Die Ausbeute an Gesamtvirus für Viruspartikel, die das pLL3.7 provirus enthielten, lag bei weniger als 10% (Abb.4.5.a). Das Verwenden eines 20%-igen Sucrose-Kissens während der Zentrifugation erhöhte die Ausbeute auf ca. 30% (Abb.4.5.a zweiter Balken von links). Die Kombination aus Sucrose-Kissen und reduzierter Geschwindigkeit auf 20.000 xg (die bei [Yang et al., 2002] empfohlen wird) führte zu einer überraschend deutlichen Verbesserung der Virus-Ausbeute, die nun 80% betrug, wohingegen eine Reduktion auf 6400 xg keine weitere Verbesserung brachte.

Dieses optimierte Aufkonzentrierungsprotokoll wurde für den relativ kleinen pLL3.7-Lentivektor verwendet. Hiervon ausgehend sollte die Ausbeute der bereits beschriebenen Vektoren mit großer Transgensequenz bestimmt werden.

Wie Abb. 4.5.b (schwarze Balken) zeigt, war die Ausbeute für diese Vektoren viel geringer. Im Besonderen lag die Ausbeute von PPAR δ /pIGETOn unter 10% in n=6 unabhängigen Experimenten. Schließlich wurde dieser letzte Zentrifugationsansatz modifiziert. Bei eingeschalteter Start/Beschleunigungs- Funktion kam es jetzt nur beim PPAR δ ^{RNAi}/2SM2 enthaltenden Virus zu einer signifikanten und reproduzierbaren Steigerung der Ausbeute auf ca. 25% (Abb. 4.5.b - graue Balken).

4.2. PPAR δ in humanen T-Lymphozyten

4.2.1. Expression von PPAR δ in humanen T-Lymphozyten

Da aktivierte T-Lymphozyten für die Pathogenese der Psoriasis mit verantwortlich sind, wurde zunächst die Expression von PPAR δ sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in primären T-Lymphozyten untersucht.

Mittels semiquantitativer RT-PCR ließ sich zunächst die Expression von PPAR δ in der T-Zelllinie Jurkat eindeutig nachweisen. Dieses Ergebnis konnte weiterhin in primären humanen CD3⁺ T-Zellen, die zuvor aus Vollblut gesunder Spender als auch in T-Zellen die aus psoriatischen Plaques isoliert wurden bestätigt werden (Abb.4.6).

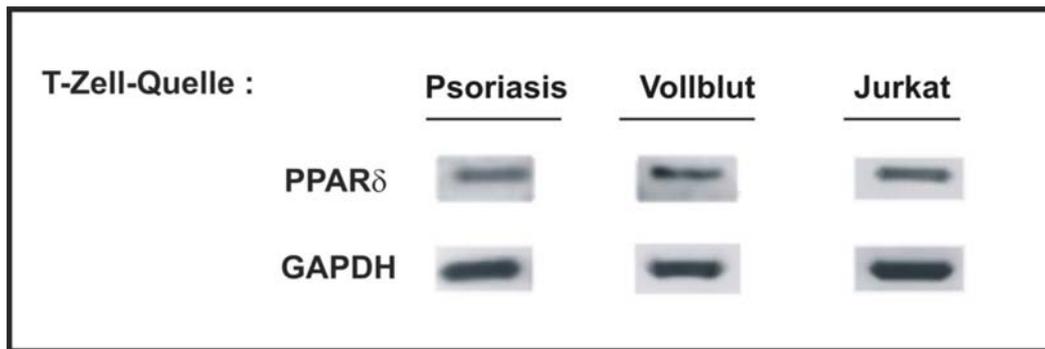


Abb.4.6. : Analyse zur mRNA Expression von PPAR δ in T-Zellen. Detektion von PPAR δ mittels semiquantitativer RT-PCR in T-Zellen isoliert aus psoriatischen Läsionen, CD3⁺-T-Zellen aus peripherem Vollblut und Jurkat Zellen. GAPDH diente zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Geldokumentationsbild von n=3 verschiedenen Experimenten.

Dieses Ergebnis sollte auch auf Proteine Ebene überprüft werden. Dazu wurden Protein-Extrakte aus den jeweiligen T-Zellen isoliert und mittels Westernblot analysiert. Das PPAR δ -Protein konnte sowohl in den Jurkat Zellen als auch in den aus Vollblut isolierten primären CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Auch die aus psoriatischen Plaques zweier Patienten isolierten primären T-Zellen zeigten eine eindeutige Expression des PPAR δ -Proteins. Das Protein war dabei hauptsächlich im Kern lokalisiert.

Die Reinheit der aus peripherem Blut isolierten T-Zellen wurde durchflußzytometrisch überprüft und lag bei ca. 90%. Das PPAR δ -Protein wurde am stärksten in den aktivierten psoriatischen T-Zellen exprimiert.

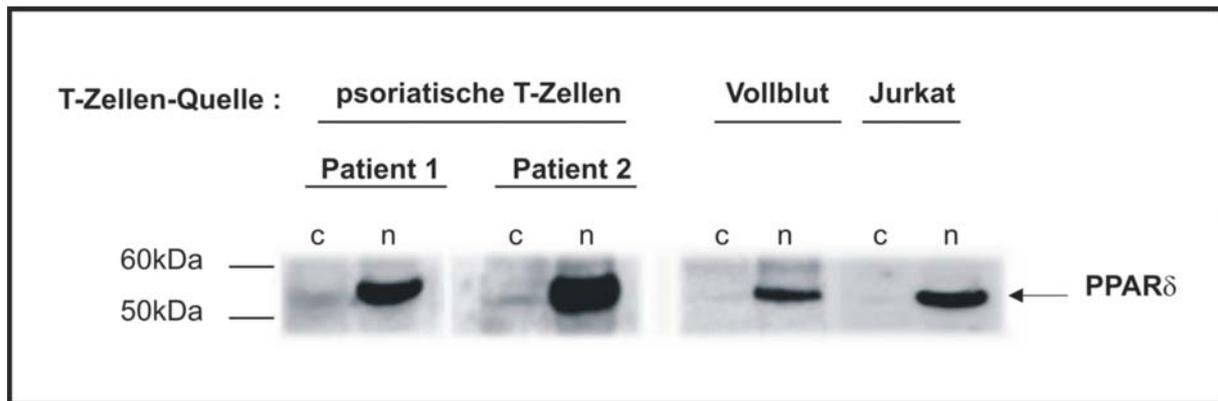


Abb.4.7.: Analyse der Proteinexpression von PPAR δ in T-Zellen. Zur Analyse der Proteinexpression wurden Kern- und Cytoplasma-Fractionen wie im Material und Methodenteil beschrieben isoliert und in Westernblots weiter verarbeitet. Die Proteine wurden aus CD3⁺ T-Zellen aus Vollblut (n=2), T-Zellen aus psoriatischen Läsionen (zwei Patienten) und aus Jurkat Zellen isoliert. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 20 μ g Kern-(n) bzw. Cytoplasma (c)-Protein eingesetzt.

Aus diesem Grund galt es zu klären, ob die PPAR δ Expression in T-Zellen einer T-Zell-Rezeptor vermittelten Aktivierung unterliegt. Zu diesem Zweck wurden aus Vollblut mittels Depletion gewonnene primäre T-Zellen entweder in einer mit α CD3-Antikörper beschichteten 6-Wellplatte oder in Gegenwart von löslichem α CD3 für 48 h kultiviert. In T-Zellen von drei verschiedenen Spendern konnte unter Verwendung dieses Protokolls keine Induktion von PPAR δ beobachtet werden. Daraus folgt, dass die Stimulation von T-Zellen über den Rezeptor keine Induktion von PPAR δ in peripheralen humanen T-Zellen hervorruft.

4.2.2. Typ I Interferon vermittelt die Induktion von PPAR δ

Als nächstes stellte sich die Frage, welche Faktoren, insbesondere die für die Psoriasis relevanten, die PPAR δ Expression induzieren können. Hierfür wurden aus Vollblut isolierte ruhende CD3⁺ T-Zellen verwendet und mit dem jeweiligen Reagenz für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Erwartungsgemäß führte die Stimulation mit TNF α zu einer Akkumulation

des PPAR δ Proteins im Zellkern (Abb. 4.8). In Keratinozyten führt TNF α zur Stimulation des PPAR δ -Gens über eine AP-1-Region in dessen Promotor [Tan et al., 2001]. Eine T-Zell-Rezeptor vermittelte Aktivierung mit Concanavalin A führte zur einer marginalen Induktion von PPAR δ . Dies korreliert mit dem bei der CD3-Antikörperabhängigen Stimulation des T-Zellrezeptors zuvor ermittelten Befund (Abschnitt 4.2.1.). Ferner wurde eine starke Expression von PPAR δ durch zwei proapoptotische Stimuli, Anti-Fas und Wasserstoffperoxid induziert, nicht aber durch Interleukin-2 Stimulation. Auch Interferone üben eine regulatorische Funktion in der Apoptose aus und haben ferner eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Psoriasis. Daher wurde auch dieser Effekt hinsichtlich der PPAR δ Induktion getestet. Wie aus der Abbildung ersichtlich führte die Stimulation primärer T-Zellen mit IFN α (Typ I) aber nicht IFN γ (Typ II) zur Induktion von PPAR δ .

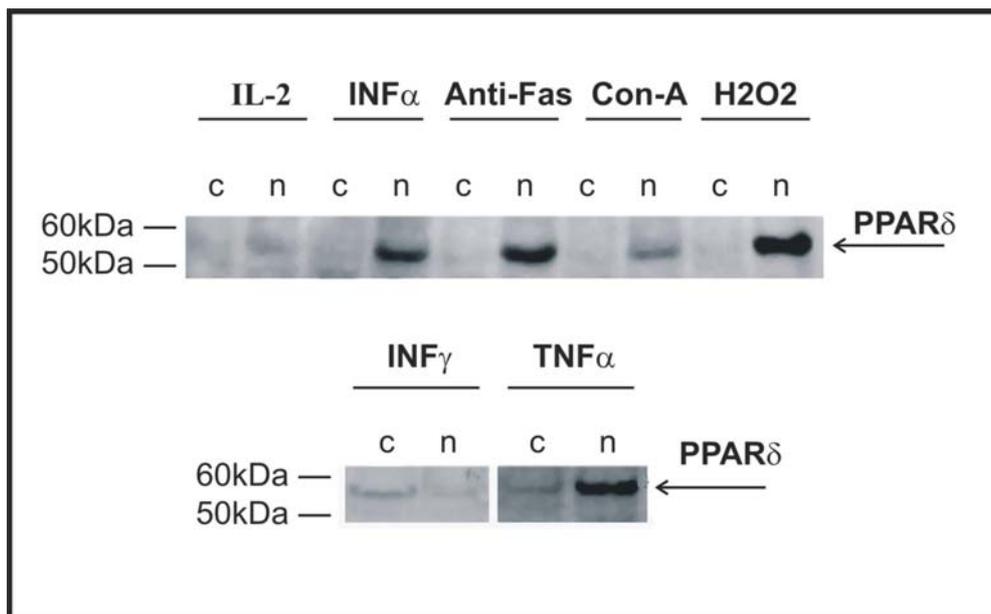


Abb.4.8.: Induktion von PPAR δ in primären naiven T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen durch negative Depletion aus PBMCs mittels MACS. Anschließend wurden die Zellen für 48 h in Anwesenheit eines der folgenden Reagenzien kultiviert; IL-2 (40 ng/ml), IFN α (200 ng/ml), Anti-Fas (20 ng/ml), Concanavalin A (Con-A) , H₂O₂ (1 mM), IFN γ (20 ng/ml) und TNF α (20 ng/ml). Im Anschluss an die Zellernte erfolgte die Protein Extraktion. Kern (n) und Cytoplasma (c) Fraktionen wurden für den Westernblot mit je 20 μ g Protein eingesetzt.

Es deuteten einige Indizien darauf hin, dass $\text{IFN}\alpha$ möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Psoriasis zu kommt (s.o. Einleitung, Abschnitt 1.1.2.). Dies und die und die Tatsache, dass $\text{PPAR}\delta$ bei Psoriasis *in vivo* stark überexprimiert ist, machte eine genauere Untersuchung der $\text{IFN}\alpha$ vermittelte Induktion von $\text{PPAR}\delta$ in T-Zellen von besonderem Interesse.

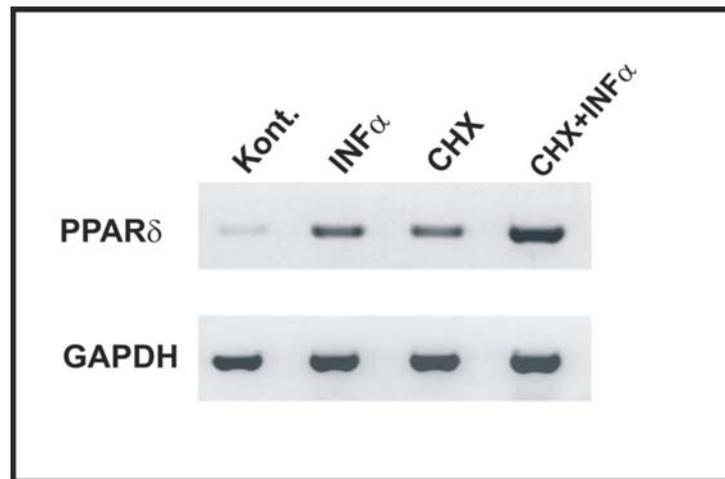


Abb.4.9.: $\text{IFN}\alpha$ vermittelte Induktion der $\text{PPAR}\delta$ -Expression in primären T-Zellen. Primäre naive CD3^+ T-Zellen wurden mittels negativer Depletion gewonnen und anschließend für 48 h mit $\text{IFN}\alpha$ (200 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Cyclohexamid (5 mM) stimuliert. $\text{PPAR}\delta$ -mRNA Expression wurde durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Die Expression von GAPDH diente als interne Kontrolle.

Zu Beginn wurden CD3^+ T-Zellen, die aus der Depletion von B-Zellen und Monozyten ($\text{CD19} / \text{CD14} / \text{CD16} / \text{CD65}$ -Positiv Zellen) aus Vollblut hervorgingen, für 48 h in Gegenwart von 200 ng/ml $\text{IFN}\alpha$ kultiviert. Nach Zellernte wurde die isolierte Gesamt-RNA für die RT-PCR eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Induktion von $\text{PPAR}\delta$ durch $\text{IFN}\alpha$ auf mRNA-Ebene nicht durch den des Proteintranslations-Inhibitors Cyclohexamid blockiert werden konnte (Abb.4.9 Spur 4). Dies deutet daraufhin, dass es sich bei dieser Induktion um einen direkten transkriptionellen Effekt handelt. Der bei der Inkubation der Zellen mit Cyclohexamid ohne $\text{IFN}\alpha$ aufgetretene stimulatorische Effekt ging möglicherweise auf die für Cyclohexamid beschriebene Induktion von Interferon β zurück [Maroteaux et al., 1983]. Die transkriptionelle

Induktion von PPAR δ durch IFN α wurde auch in Abhängigkeit von unterschiedlich langen Stimulationszeiten (6 h, 12 h, 24 h und 48 h) bestätigt.



Abb.4.10.: IFN α Zeit-Abhängige Stimulation von T-Zellen zur Untersuchung der Induktion von PPAR δ . Aufgereinigte naive primäre CD3⁺ T-Zellen wurden für die in der Abbildung angegebenen Zeiten (6 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit IFN α (200 ng/ml) stimuliert. Nach dem jeweiligen Zeitpunkt erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen, wobei für den 0h Ansatz dies direkt nach der MACS-Aufreinigung erfolgte. Die Expressions-Analyse der PPAR δ -mRNA erfolgte wie in (Abb.4.9.) beschrieben.

Wie in Abb. 4.10. zu sehen, war eine PPAR δ Induktion bereits nach 6 h Stimulation erkennbar und erreichte ein Maximum nach 12 h Inkubationszeit. Interessanterweise variierte die Stärke der durch IFN α induzierten PPAR δ Expression in den verschiedenen T-Zell-Spendern. Es zeigte sich des Weiteren, dass die Differenz in der Induktionsstärke eng mit dem vorrausgegangenem Expressionsspiegel von PPAR δ in den jeweiligen T-Zellpopulationen korrelierte. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Versuchsreihe mit unterschiedliche Spendern die IFN α vermittelte Induktion der PPAR δ -Expression ermittelt. Wie in Abb. (4.11) dargestellt, zeigten T-Zellproben die vor der Stimulation bereits einen hohen endogenen PPAR δ -Proteinspiegel aufwiesen, eine geringere Induktion des Proteins nach der Stimulation im Vergleich zu T-Zellproben, die ein geringen, endogenen Proteinspiegel besaßen.

Zusammengefasst, kann PPAR δ in primären T-Zellen, sowohl durch TNF α als auch durch Stress- bzw. Apoptosestimuli reguliert werden. Zusätzlich wird PPAR δ in T-Zellen transkriptionell ein direktes Zielgen von Typ1 Interferon.

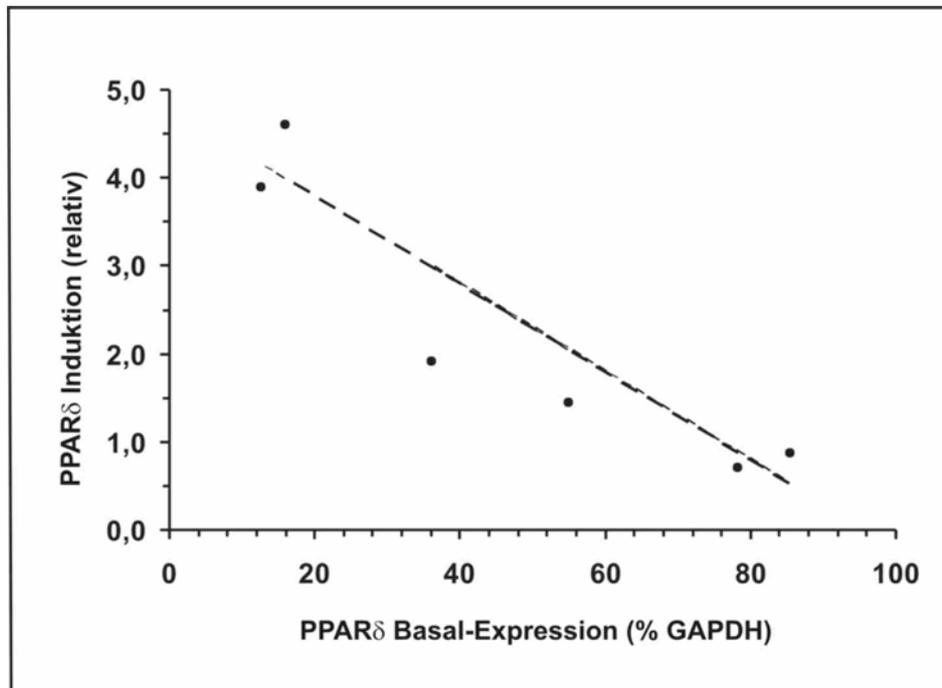


Abb.4.11.: relative PPAR δ Induktion durch IFN α in Abhängigkeit vom Ausgangsexpressionsspiegel. Naive primäre CD3⁺ T-Zellen von sechs Spendern wurden für 12 h mit IFN α (200 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss an die Zellernte erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und Analyse der PPAR δ -mRNA durch PCR. Die Expression wurde densitometrisch quantifiziert und zur GAPDH-Expression normalisiert.

4.2.3. Proliferation humaner T-Zellen infolge von PPAR δ Aktivierung

Die PPARs gehören, wie andere Rezeptoren für Steroidhormone, zur Familie der Liganden-aktivierbaren Transkriptionsfaktoren. Aus diesem Grund sollte in einem nächsten Schritt die funktionelle Wirksamkeit des aktivierten PPAR δ in T-Zellen mittels Aktivierung von PPARdelta durch selektive Liganden untersucht werden.

Proliferation und Apoptose sind zwei zelluläre Prozesse die unter anderem in Keratinozyten durch PPAR δ reguliert werden [Romanowska et al., 2008]. Beide Prozesse sollten daher auch bei T-Zellen untersucht werden.

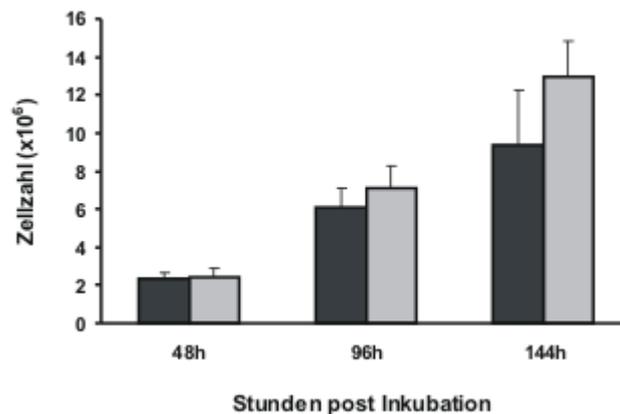


Abb.4.12.: Die Rolle von PPAR δ bzgl. Proliferation der T-Zellen. a) Jurkat T Zellen kultiviert in Anwesenheit von 1 mM des spezifischen PPAR δ Liganden L-165041 (graue Balken) oder dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle (schwarze Balken). Zum jeweils in der Abb. gezeigten Zeitpunkt wurde die Zellzahl der Ansätze ermittelt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unterschiedlichen Experimenten mit Doppelproben dar. * $p < 0.001$ nach dem zweiseitigen, gepaarten Student's t- test.

Zum Nachweis des proliferativen Effekts von PPAR δ wurden Jurkat-T Zellen für 196 h in Gegenwart des spezifischen synthetischen Liganden L-165041 oder dem Lösungsmittel DMSO kultiviert. Für den jeweiligen Ansatz wurde anschließend die Zellzahl alle 48 h ermittelt. Ein Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigt, dass die Aktivierung von PPAR δ durch den Liganden eine verstärkte Proliferation der Zellen zur Folge hatte (Abb.4.12).

Um den proliferativen Effekt in einem zweiten unabhängigen Versuchsansatz zu bestätigen, wurden Jurkat T Zellen mit Lentivirus infiziert, welches eine spezifische siRNA-Sequenz für PPAR δ enthielt. Als Kontrolle wurden weitere Zellen mit einem Leervirus infiziert.

Der Lentivektor exprimierte neben der siRNA auch das E-GFP als Markerprotein. Damit war es möglich, die Proliferation der infizierten Zellen mittels durchflußzytometrischer Messung zu verfolgen. Beide Infektionsansätze wiesen zwei Fraktionen von Zellen auf, die nicht infizierten E-GFP-neg. sowie die erfolgreich infizierten E-GFP-pos.-Zellen. Der Anteil an infizierten Zellen war 48 h Postinfektion bei beiden Ansätzen vergleichbar (69% bzw. 66%). Der Anteil der PPAR δ -siRNA

enthaltenden Zellfraktion zeigte nach einer viertägigen Kultivierung eine signifikante Abnahme (von 66% auf 25%) auf, was bei mit Kontroll-vektor infizierten Zellen nicht der Fall war (von 69% auf 62%). Die siRNA vermittelte Suppression von PPAR δ hatte demnach für die T-Zellen einen eindeutigen Wachstumsnachteil. Diese Beobachtung konnte durch die Anwendung eines Kolorimetrischen MTS Proliferations-Assays bestätigt werden. Der Assay wurde auch hier mit Lentivirus infizierten Jurkat T-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen insgesamt für 120 Stunden post Infektion kultiviert und die Messung erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb dieser Kultivierungszeit (48h, 72h, 96h, 120h).

Es zeigte sich, dass bei den PPAR δ -knockdown-Zellen (PPAR δ^{siRNA}) die zelluläre Proliferation der T-Zellen gehemmt war nach dem RNAi-vermittelten *knockdown* von PPAR δ im Vergleich zu den Kontrollzellen (pLL3.7; Abb.4.13b). Zum Nachweis des Lentivirus vermittelte knockdown von PPAR δ , wurde aus infizierten Jurkat Zellen Protein isoliert und mittels Westernblot untersucht. Wie in (Abb.4.13.c) gezeigt, wiesen die mit PPAR δ^{RNAi} Virus infizierten Jurkat Zellen deutlich weniger PPAR δ Protein auf als die Kontrollen.

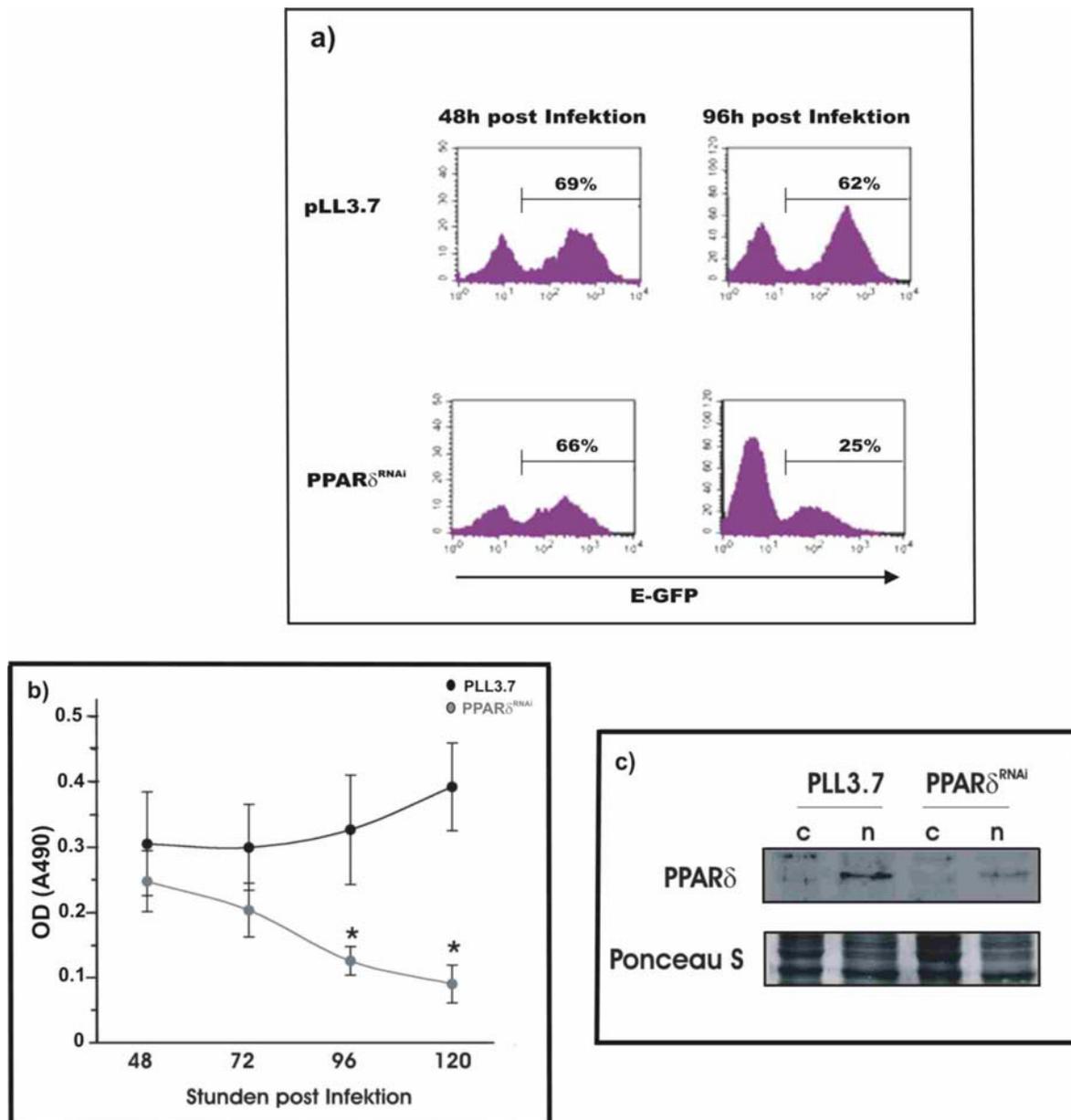


Abb.4.13.: Die Rolle von PPAR δ bzgl. Proliferation der T-Zellen. a) Jurkat T Zellen wurden mit Kontroll-Leervirus (pLL3.7) oder einem PPAR δ -spezifischen-siRNA-Sequenz haltigem Lentivirus (PPAR δ ^{RNAi}) infiziert. Die Effizienz der Infektion wurde durch FACS Analyse des E-GFP Reportergens ermittelt. Der Anteil an infizierten Zellen in den unterschiedlichen Ansätzen ist in der Abbildung dargestellt. b) die Proliferation wurde mit Hilfe des MTS-Assay untersucht. Für den Test wurde ein Teil der in a infizierten Jurkat T-Zellen eingefestzt. Der Test wurde für die in der Abb. dargestellten Zeitpunkte durchgeführt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unterschiedlichen Experimenten mit fünf-Proben dar. * $p < 0.001$ nach dem zweiseitigen, geparteten Student's t-test. c) Westernblot von infizierten Jurkat T-Zellen. Auch hier wurden die Zellen wie in a beschrieben infiziert.

Durch die hier durchgeführten Versuche konnte insgesamt gezeigt werden, dass PPAR δ die Proliferation von T-Zellen stimuliert.

4.2.4. PPAR δ und Apoptose in humanen T-Zellen

Apoptose stellt neben der Proliferation einen weiteren biologischen Prozess dar, für den eine funktionelle Wirksamkeit von PPAR δ beschrieben wird. Nach heutigem Kenntnisstand scheint die Rolle von PPAR δ in der Apoptose komplex und zelltypabhängig zu sein. So wurde unter anderem eine anti-apoptotische Wirkung dieses Transkriptionsfaktors in murinen Keratinozyten beschrieben [Di-Poi et al., 2002]. Dieselbe Arbeitsgruppe berichtete, dass PPAR δ in der Niere vor H₂O₂-induzierter Apoptose schützt [Pesant et al., 2006]. Nachdem gezeigt wurde, daß PPAR δ die Proliferation von T-Zellen erhöht, galt es nun, dessen möglichen anti-apoptotischen Beitrag in diesen Zellen abzuklären.

4.2.4.1. PPAR δ schützt vor IFN α induzierter Apoptose in T-Zellen

Wie bereits beschrieben (Abschnitt 4.2.2.), wurde PPAR δ als ein Zielgen von IFN α in humanen T-Zellen identifiziert. Daher sollte untersucht werden, ob PPAR δ eine regulatorische Funktion bei der IFN α induzierten Apoptose ausübt. Hierzu wurden Jurkat Zellen mit PPAR δ -siRNA enthaltenden Lentivirus (PPAR δ^{siRNA}) bzw. Leervirus (pLL3.7) infiziert. Anschließend wurden die Zellen des jeweiligen Ansatzes auf zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion wurde für 48 h mit 200 ng/ml IFN α inkubiert, während die zweite Fraktion als Kontrolle diente. Zur Messung der Apoptose wurden die Zellen mit Annexin-V gefärbt und anschließend im FACS gemessen. Um sicherzustellen, daß der Prozess des siRNA vermittelten Abbaues von PPAR δ und eine IFN α -induzierter Apoptose der infizierten Zellen hervorgerufen vermittelt werden konnte, erfolgte die Annexin-V Messung erst 48 h nach IFN α Zugabe.

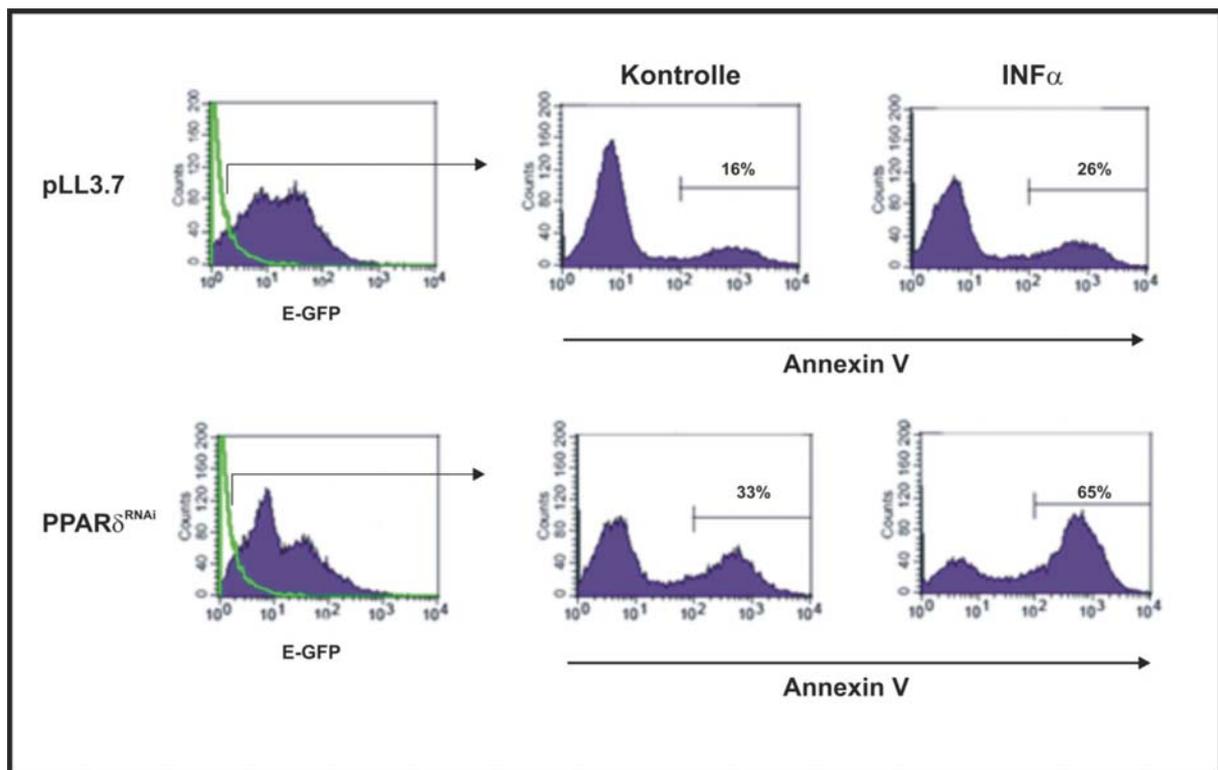


Abb.4.14.: Messung der $\text{INF}\alpha$ induzierten Apoptose nach Ausschalten der $\text{PPAR}\delta$ Funktion. Jurkat T-Zellen wurden mit Kontroll-Leervirus bzw. mit Lentivirus, welches eine $\text{PPAR}\delta$ spezifische siRNA-Sequenz enthielt, transduziert. Die Infektions-Effizienz wurde durch FACS-Messung des E-GFP-Repoters, wie in dem rechten Histogramm gezeigt, verifiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von $\text{INF}\alpha$ (200 ng/ml) für weitere 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zur Messung der Apoptose mit Annexin-V gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Für die Analyse der Apoptose wurden nur die E-GFP-positiven Zellen berücksichtigt. Von diesen wurde dann, wie in der Abb. dargestellt, der prozentuale Anteil Annexin-V positiver Zellen ermittelt. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

Wie in Abb.4.14. gezeigt, führte die Suppression von $\text{PPAR}\delta$ an sich zu einer Verdopplung der Apoptoserate von 18% auf 33% in T-Zellen. Die Kultivierung der Zellen mit $\text{INF}\alpha$ führte bei den mit Leervirus infizierten Kontrollzellen (pLL3.7) zu einer schwachen Erhöhung der Annexin-positiven Zellen.

Dagegen bewirkte die $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung bei den $\text{PPAR}\delta$ -siRNA enthaltenden Zellen einen dramatischen Anstieg Annexin-positiver Zellen von 26% auf 65%.

Nun stellte sich die Frage, ob dieser Schutzeffekt auch durch eine Liganden vermittelte Aktivierung von $\text{PPAR}\delta$ erreicht werden kann. Dazu wurden Jurkat T-Zellen in Gegenwart des $\text{PPAR}\delta$ spezifischen Liganden L-165041 oder dem Lösungsmittel (DMSO) als Kontrolle bei gleichzeitiger Zugabe von $\text{IFN}\alpha$ kultiviert. Nach 48 h erfolgte die Apoptose-Messung mit Hilfe von Annexin-V Färbung und FACS.

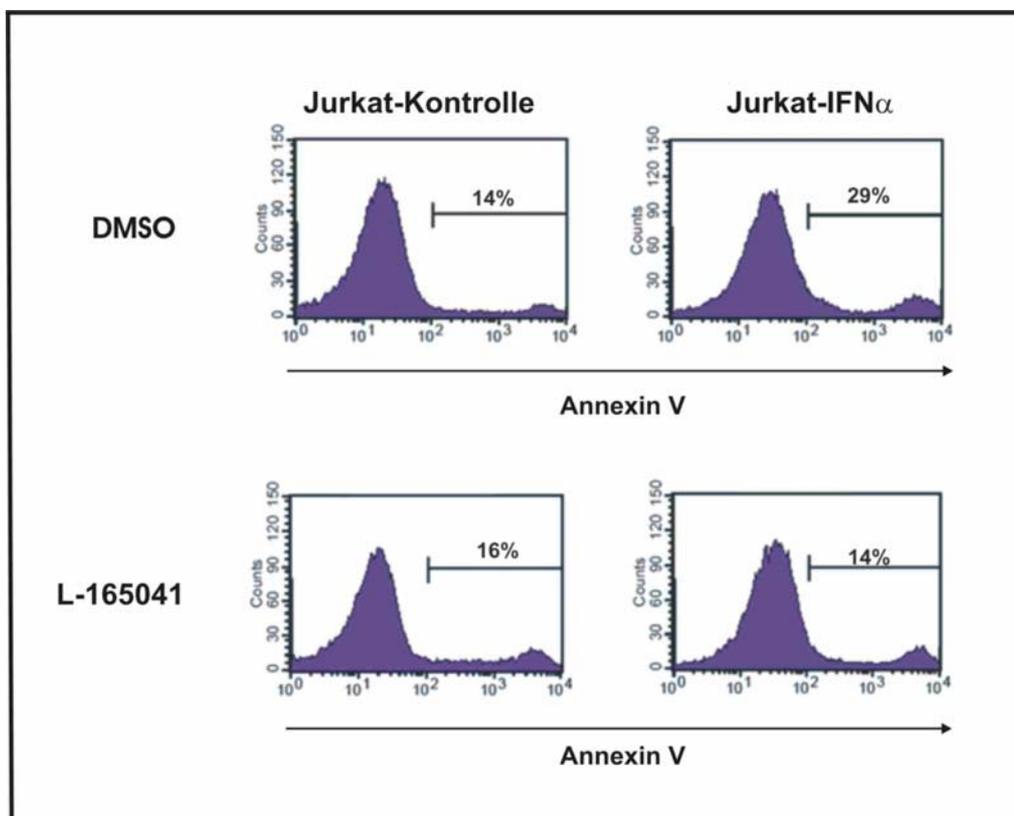


Abb.4.15.: Einfluss der $\text{PPAR}\delta$ -Aktivierung auf die $\text{IFN}\alpha$ induzierte Apoptose. Jurkat T Zellen wurden für 48 h in Gegenwart des spezifischen $\text{PPAR}\delta$ -Liganden L-165041(1 mM) oder dem Lösungsmittel (DMSO) mit $\text{IFN}\alpha$ (200 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V gefärbt und die Quantifizierung der apoptotischen Zellen (Annexin-positiv) erfolgte wie in Abb. 4.14. beschrieben mittels FACS-Messung. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Experimenten.

Wie in (Abb.4.15) zu sehen, führte die Behandlung der Kontrollzellen (DMSO-Histogramm) mit $\text{INF}\alpha$ zu einer 2-fachen Steigerung des Anteils an apoptotischen Zellen von 14% auf 29%. Dieser Effekt konnte bei den mit $\text{PPAR}\delta$ -Ligand (L-165041-Histogramm) behandelten Zellen verhindert werden (von 16% auf 14%). Somit konnte die durch $\text{INF}\alpha$ hervorgerufene Zunahme der apoptotischen Zellen durch Liganden-vermittelte Aktivierung des endogenen $\text{PPAR}\delta$ Proteins vollständig inhibiert werden. Nun wurden aus Vollblut isolierte PHA aktivierte CD3^+ T-Zellen mit dem $\text{PPAR}\delta$ -siRNA-Lentivirus oder dem Leervirus infiziert. Nachdem die infizierten Zellen mit $\text{INF}\alpha$ (200 ng/ml) für 48 h kultiviert wurden, erfolgte im Anschluss die Annexin-V Färbung und FACS Messung.

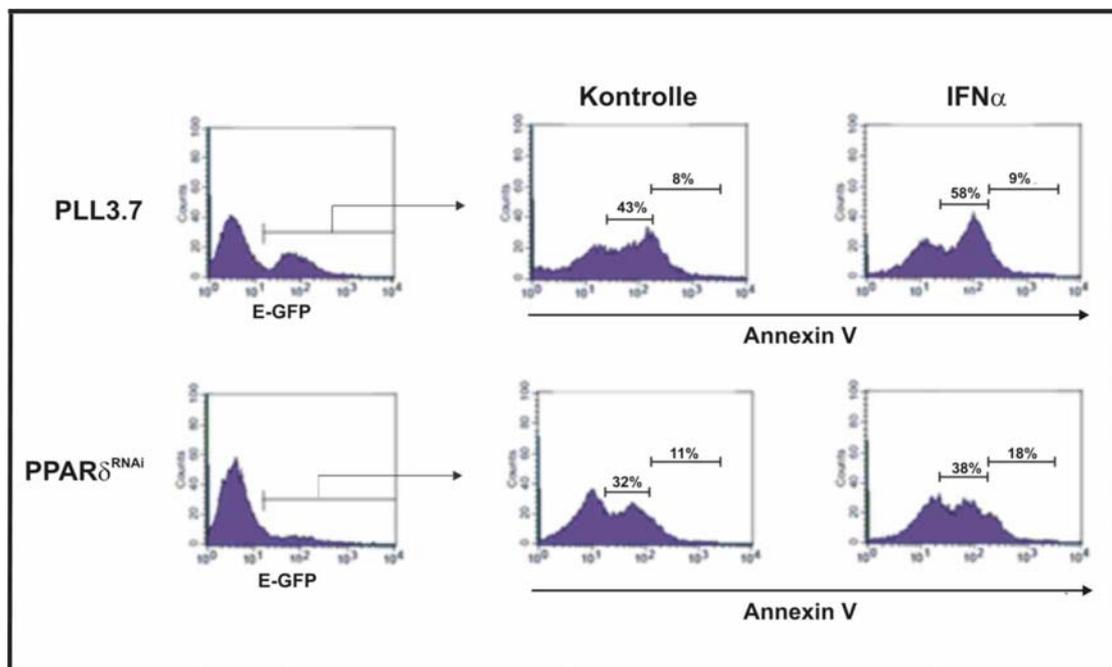


Abb.4.16.: Messung der $\text{INF}\alpha$ induzierten Apoptose nach $\text{PPAR}\delta$ -knockdown. Aus Vollblut aufgereinigte primäre CD3^+ T-Zellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit Lentivirus infiziert. Nach Kontrolle der Infektion mittels FACS wurden die Zellen für weitere 48 h mit $\text{INF}\alpha$ (200 ng/ml) behandelt. Die Apoptose Messung erfolgte durch Annexin V-Färbung der Zellen nach Stimulation. Für eine Quantifizierung der Annexin V-positiven Zellen wurden von den Lentivirus infizierten Zellen nur die E-GFP-positiven Zellen in der Auswertung aufgenommen. Vergleichbare Resultate konnten in CD3^+ Zellen von drei verschiedenen gesunden Spendern bestätigt werden.

Das Annexin Färbeverhalten der primären T-Zellen unterschied sich von dem der Jurkat T-Zellen. Bei den CD3⁺ T-Zellen konnte neben der Annexin-negativen Zellpopulation zwei weitere Populationen identifiziert werden, eine schwach positive und eine stark Annexin-positiv gefärbte Population (Abb. 4.16, mittlere Tafel in der oberen Reihe). Der ermittelte Anteil von ca. 32% an schwach und ca. 11% an stark gefärbten Annexin-V-positiv-Zellen in den Kontrollfraktionen deutet auf den zellulären Stress hin, der durch die Infektion verursacht wird (Abb.4.16; Kontroll-Histogramm).

Die Stimulation mit IFN α bewirkte bei den PPAR δ -knockdown Zellen eine Verdopplung der Annexin-hoch positiven apoptotischen Zellen gegenüber der Kontrolle (18 % vs. 11 %).

Dieses Ergebnis stimmt mit den in Jurkat T-Zellen beobachteten Befunden überein und deutet weiterhin auf den schützenden Effekt von PPAR δ bei der IFN α induzierten Apoptose in T-Zellen.

4.2.4.2. *PPAR δ schützt vor Serumentzug nicht aber vor Fas-induzierter Apoptose*

Neben unspezifischen Signalen wie dem Entzug von Wachstumsfaktoren kann Apoptose in T-Zellen spezifisch durch Zytokine oder Interaktion mit membranständigen Liganden induziert werden. Die Interaktion von Fas und Fas Ligand ist einer von vielen Mechanismen, die eine Apoptoseinduktion hervorrufen. Das Fas Protein und sein Ligand sind an einem Apoptoseweg beteiligt, der unter dem Oberbegriff DISC (Death inducing signaling complex) zusammengefasst ist [Rossi and Gaidano, 2003], während die durch Wachstumsfaktorenentzug eingeleitete Apoptose diesen Apoptoseweg umgeht [al-Rubeai and Singh, 1998].

Daher sollte geklärt werden, welcher dieser beiden Apoptosewege in T-Zellen durch PPAR δ reguliert wird. Mit PPAR δ -RNAi- oder Kontroll-Lentivirus infizierte Jurkat Zellen wurden auf mehrere Fraktionen aufgeteilt. Neben der Kontrollfraktion (nur Medium) wurde eine unter Serumentzug kultiviert, während eine weitere mit α -Fas-Antikörper stimuliert wurde.

Die Messung der früh apoptotischen Zellen erfolgte mit Hilfe der bereits in dieser Arbeit eingesetzten Annexin-V-Assays, wohingegen zur Analyse von Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt (Sub-G1) oder fortgeschrittener DNA-Fragmentierung die Propidiumiodid DNA-Färbung fixierter Zellen verwendet wurde. Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von DNA-Fragmentierung. Dabei nimmt der DNA-Gehalt von apoptotischen Zellen im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen ab. Nach Fixierung der Zellen und vollständiger Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid ist die Fluoreszenz dieser Zellen abhängig vom DNA-Gehalt.

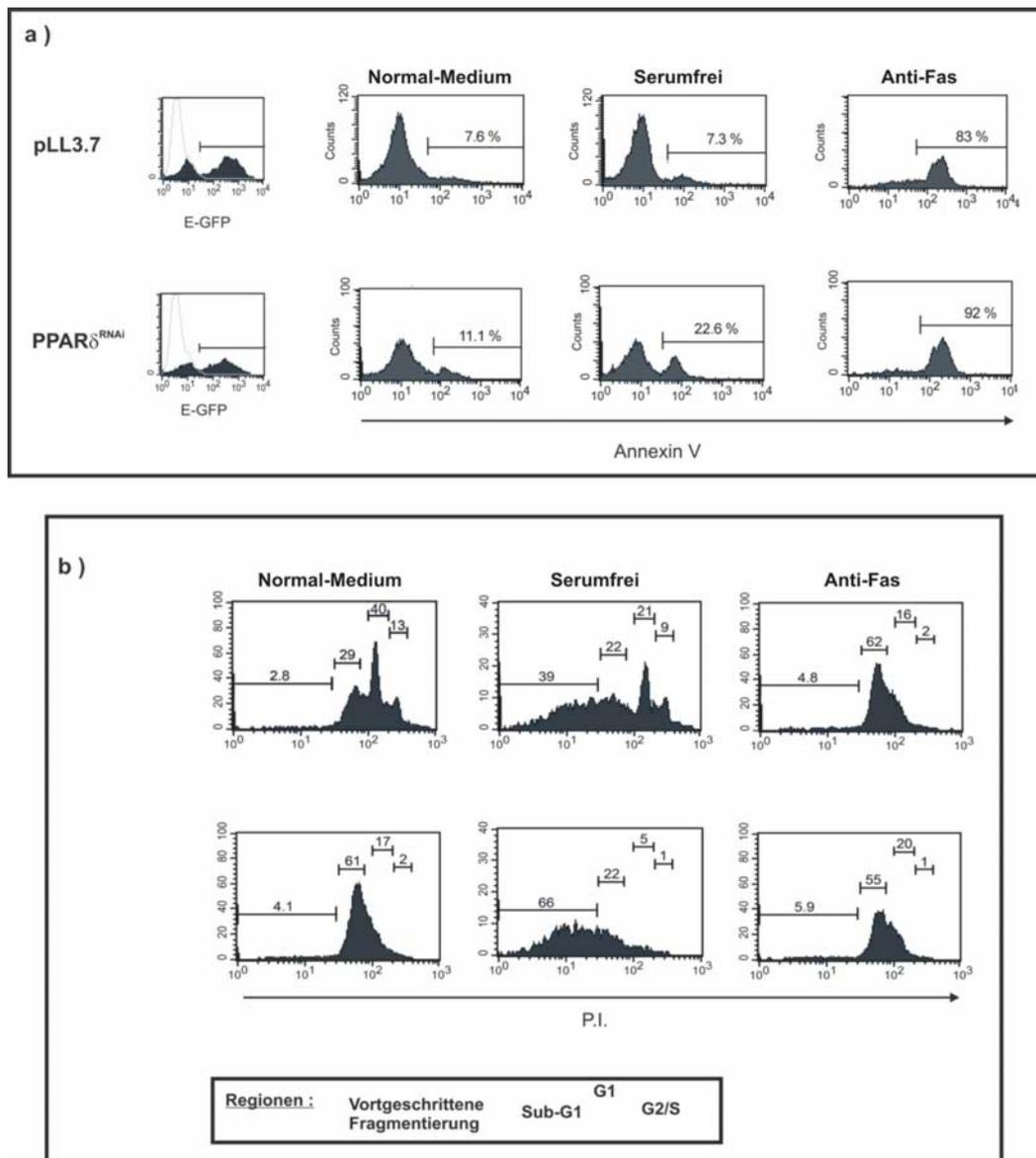


Abb.4.17.: Effekt von PPAR δ bzgl. der durch Serumentzug induzierten Apoptose. a) Jurkat T Zellen wurden mit Leervirus (pLL3.7) bzw. PPAR δ -knockdown-Virus (PPAR δ ^{RNAi}) infiziert. Die jeweiligen Zellansätze wurden nach der Infektion in serumfreies Medium oder mit Anti-Fas-Antikörper kultiviert (siehe Methodenteil). Als Kontrolle wurden infizierte Zellen in normalem Medium gehalten. Zur Messung der Apoptose wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte durch FACS-vermittelte Detektion Annexin-V-positiver Zellen innerhalb der E-GFP-positiven Zellpopulation. b) Zur Messung der Streuung der Zellen innerhalb der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus wurde ein Teil der in (a) infizierten und behandelten Zellen, mit 70%igem Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Mit Hilfe der FACS Messung wurde der prozentuale Anteil der in der jeweiligen Zellzyklusphase befindlichen Zellen ermittelt. Die unterhalb der Abbildung dargestellten Markierungen wurden angewandt, um Populationen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt zu identifizieren. Vergleichbare Resultate wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen mit zwei Spendern erhalten.

Wie in (Abb. 4.17.a) gezeigt, resultierte das Ausschalten von PPAR δ ohne einer weiteren Behandlung in einer 2-fachen Steigerung früh apoptotischer Annexin-positiver (11.1% gegenüber 7.6%) und im Sub-G1 befindlicher (61% gegenüber 29%) Zellen, was die Resultate in Abschnitt 4.2.4.1 (Abb. 4.14) bestätigen.

Serumentzug bewirkte bei den PPAR δ -RNAi-Virus enthaltenden Zellen eine Erhöhung der Apoptose von 11% auf 23%. Die Kontrollzellen mit Leervirus wurden durch den Serumentzug dagegen nicht beeinflusst (7.6% Medium vs. 7.3% FCS-Entzug). Die PI-Färbung derselben Zellfraktionen lieferte ähnliche Ergebnisse.

Der Anteil an Zellen unter Serumentzug, die einen DNA-Verlust aufwiesen war 2-fach höher nach Suppression von PPAR δ (66% vs. 39%, Abb.4.17.b). Des Weiteren fiel auf, dass die Zellen der G1 und G2/S-Phase, die in den Kontrollproben zu sehen waren, nach PPAR δ -knockdown verschwanden. Dies legt den möglichen schützenden Effekt von PPAR δ bei der durch Serumentzug induzierten Apoptose nahe.

Die infizierten Jurkat Zellen waren nach der Fas-Stimulation zu 83% Annexin V-positiv (Abb.4.17.a). Dies war übereinstimmend mit einer deutlichen Akkumulation der Zellen in der Sub-G1 Phase (Abb.4.17.b). Auch die Anwesenheit von PPAR δ führte zu keiner Zunahme der fragmentierten Zellen (Abb.4.17.b). Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen, dass PPAR δ in T-Zellen bei einer durch Serumentzug aber nicht durch Fas-Aktivierung induzierten Apoptose einen schützenden Effekt ausübt.

4.2.5. Mechanismus der anti-apoptotischen Aktivität von PPAR δ in T-Zellen

Abhängig vom pro-apoptotischen, initialen Reiz, der auf die Zelle einwirkt, werden verschiedene Signalwege aktiviert, die zum größten Teil in zwei Apoptosekaskaden münden. Daher wird im Allgemeinen bei Apoptose zwischen dem extrinsischen Signalweg und dem intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg unterschieden. Der Akt1-Signalweg spielt eine zentrale Rolle beim Schutz der Zellen vor Apoptose durch Modulation dieser Apoptosekaskaden. Zur Aktivierung von Akt1 ist die Bindung der Kinasen ILK-1 und PDK-1 notwendig, welche Akt-1 phosphorylieren und somit aktivieren. Die Gruppe von Di-Poi zeigte [Di-Poi et al., 2002], dass in Keratinozyten PPAR δ durch transkriptionelle Hochregulation von ILK und PDK1 anti-apoptotisch wirkt [Di-Poi et al., 2002].

Daher sollte nun verifiziert werden, ob PPAR δ auch in T-Zellen seine antiapoptotischen Wirkung über den Akt1-Signalweg ausübt. Es galt, die PPAR δ vermittelte Erhöhung der Expression von ILK bzw. PDK1 zu untersuchen. Jurkat T-Zellen wurden dazu in Gegenwart von L-165045 bzw. DMSO als Kontrolle kultiviert und anschließend wurde die Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Wie in Abbildung (4.18.a) gezeigt, hatte die Aktivierung von PPAR δ mit Hilfe des synthetischen Liganden L-165045 keine Auswirkungen auf die Expression von ILK und PDK1 in diesen Zellen. In einem ergänzenden Versuch wurden zur Suppression von PPAR δ mittels siRNA die Jurkat T-Zellen mit dem in vorherigen Experimenten verwendeten Lentivirus infiziert. Sowohl die Kontrollzellen (pLL3.7-Leervirus) als auch die PPAR δ -RNAi enthaltenden Zellen zeigten eine vergleichbare Expressionsstärke von ILK und PDK1 (Abb.4.18b).

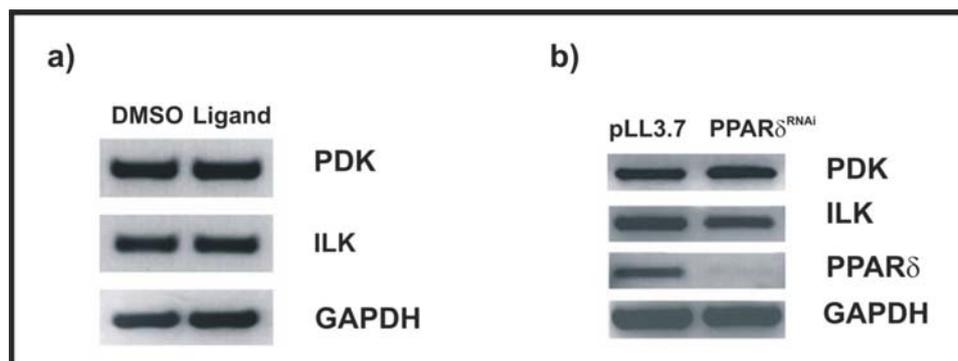


Abb.4.18.: Die Rolle von ILK und PDK1 Kinasen hinsichtlich des PPAR δ vermittelten anti-apoptotischen Effekts. a) Jurkat T-Zellen wurden mit 1 μ M L-165041 bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO für 48 h stimuliert. Die Expression von ILK1 und PDK1 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. b) Jurkat T-Zellen wurden mit Leervirus (pLL3.7) oder Lentivirus, das die PPAR δ spezifische siRNA-Sequenz enthielt, infiziert. 48 h nach der Infektion wurde die Expression von PPAR δ ; ILK1 und PDK1 mittels RT-PCR untersucht. Die Abbildungen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei verschiedenen Experimenten.

Die oben dargestellten Versuche (Abschnitt 4.2.4) hatten gezeigt, dass PPAR δ T-Zellen vor einer durch Entzug von Wachstumsfaktoren induzierter Apoptose schützt. Die im Serum enthaltenden Wachstumsfaktoren vermitteln ihre Wirkung durch

Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs [Sinha et al., 2004]. Aus diesem Grund sollte dieser Signalweg auch in T-Zellen untersucht werden.

Dazu wurden zu Beginn Jurkat T-Zellen mit PPAR δ -RNAi (PPAR δ^{RNAi}) oder Leervirus (pLL3.7) infiziert. Nach Infektion wurden die Zellen in je zwei Fraktionen aufgeteilt, dabei wurde die Kontrollfraktion in normales Medium und die zweite Fraktion in serumfreiem Medium kultiviert und durch Westernblot die Phosphorylierung der ERK1/2-Proteine untersucht.

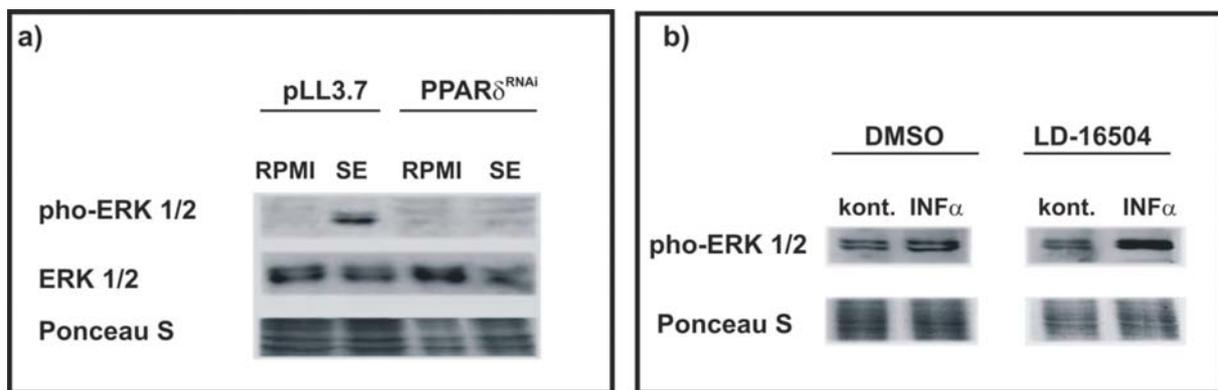


Abb.4.19.: Die Rolle von PPAR δ bei der Regulation der ERK1/2 Phosphorylierung in T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden mit Lentivirus infiziert. Danach erfolgte eine 24-stündige Kultivierung der Zellen in serumfreiem- bzw. normalem- RPMI-Medium. Anschließend wurden Gesamt-Protein Extrakte aus den Zellen gewonnen und für Westernblot eingesetzt. Durch Ponceau S-Färbung wurde sichergestellt, dass vergleichbare Protein-Mengen des jeweiligen Probenansatzes eingesetzt wurden. b) Jurkat T-Zellen wurden mit INF α (200 ng/ml) in An- oder Abwesenheit des spezifischen PPAR δ -Liganden GW-501516 stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit Gesamt-Protein Extrakte wie in (a) beschreiben analysiert.

Wie in Abb. 4.19.a) zu sehen führte der Serumentzug in mit Leervirus infizierten Jurkat T Zellen zu einer starken Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung, eine anti-apoptotischen Antwort, die auch von anderen Gruppen beschrieben wurde [Zhuang et al., 2004]. Das Ausschalten von PPAR δ führte dagegen zu einer kompletten Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb.4.19a).

Nun sollte geklärt werden, ob auch bei der IFN α induzierten Apoptose die PPAR δ vermittelte ERK1/2 Phosphorylierung eine Rolle spielt. Jurkat Zellen wurden zu diesem Zweck mit IFN α bei gleichzeitiger Behandlung mit einem synthetischen PPAR δ Liganden bzw. DMSO als Kontrolle stimuliert. Die Stimulation mit IFN α führte zu ERK1/2 Phosphorylierung nur bei zusätzlicher Aktivierung von PPAR δ durch den Liganden, aber nicht in Abwesenheit der PPAR δ Aktivierung (Abb.4.19.b). Zusammenfassend zeigte sich, dass der protektive Effekt von PPAR δ bei IFN α - und Serumentzug-induzierter Apoptose in T-Zellen teilweise durch Aktivierung von ERK1/2 vermittelt wurde.

5. DISKUSSION

5.1. Lentiviral vermittelte RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine effektive Methode zur spezifischen und effizienten Inaktivierung von Genen (*Gene-Silencing*). Neben der transienten Transfektion von siRNA-Duplexen kann die RNAi auch durch Promotor vermittelte Expression von sh-RNAs (*short hairpins*) von Plasmidvektoren mit RNA-Polymerase-II- oder RNA-Polymerase-III-Promotoren (z.B. U6-Promotor; H1-Promotor) induziert werden [Gupta et al., 2004; Lambeth et al., 2006; Yuan et al., 2006]. Die sh-RNAs werden wie die lange ds-RNAs (double-strand RNAs) vom Dicer-Komplex in siRNAs prozessiert. Für ein stabiles und langzeitiges Ausschalten der Gene ist eine konstante Expression der sh-RNAs notwendig. Je nach Transferkonstrukt und Bestimmungsort wurden unterschiedliche Vektortypen aus human- oder tierpathogenen Lentiviren, wie z.B. HIV-1, entwickelt [Pfeifer et al., 2001; Pfeifer and Verma, 2001]. Lentivirale Vektoren sind vielseitige und effizient einsetzbare Werkzeuge für den Gentransfer in eukaryotische Zellen [Kafri et al., 2000]. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre Transduzierbarkeit in proliferierende und ausdifferenzierten Zellen aus [Lever et al., 2004; Zufferey et al., 1998]. Das Prinzip des viral-vermittelten Gentransfers von sh-RNAs beruht auf der Fähigkeit von Lentiviren, die Kernmembran zu passieren und somit in das Genom zu integrieren [Hao et al., 2005]. Somit stellt die lentiviral-induzierte RNA-Interferenz eine effiziente und schnelle Methode zur Untersuchung von Gen-Funktionen dar.

Durch die Pseudotypisierung mit VSV.G-Hüllprotein wurde der natürliche Wirtsspektrum der lentiviralen Vektoren erweitert und die produzierten Viruspartikel sind wesentlich stabiler als die nativen Viren [Akkina et al., 1996; Burns et al., 1993; Naldini et al., 1996]. Die Herstellung von HIV-basierenden Vektorsystemen erfordert zur Minimierung der Infektionsgefahr eine kontrollierte Replizierbarkeit.

Es wurden mehrere Strategien verfolgt, um die Bildung von replikationskompetenten Vektoren zu vermeiden. Die Bildung dieser replikationsinkompetenten Vektoren ist auf Rekombinations-Ereignisse sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene zurückzuführen [Dull et al., 1998].

Für experimentelle Anwendungen lentiviraler Vektoren entscheidet ein hoher Titer der Virusüberstände über die Transduktionseffizienz. Daher bestand der erste Teil dieser Arbeit darin, das Protokoll zur Produktion und Anreicherung lentiviraler Vektoren zu optimieren. Trotz der großen Fortschritte im Bereich ihrer Erstellung sind die Protokolle bezüglich der Produktion lentiviraler Partikel stark empirisch ausgerichtet und größtenteils nicht standardisiert [Coleman et al., 2003; Mitta et al., 2005; Zufferey et al., 1997]. Als Ausgangspunkt für die Optimierung der Virus-Produktion wurden hier drei bereits in der Literatur veröffentlichte Protokolle evaluiert (siehe Tabelle 1). Die Protokolle divergieren in der für die Transduktion eingesetzten gesamten DNA-Menge pro ausplattierte Zellzahl an produzierenden Zellen (siehe Tabelle 1).

Das Protokoll mit der höchsten bei der Transduktion eingesetzten DNA-Menge (Protokoll 1) lieferte den höchsten Virustiter (Abb.4.1.a), was auf den starken Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf den Virustiter hinweist. Die Unterschiede in der Wirksamkeit je nach Protokolle ist nicht auf eine Variation des Verhältnisses der eingesetzten Transfer-, Verpackungs- und Envelop-Plasmide (T : P : E) zurückzuführen, da diese zwischen Protokoll 1 und 3 vergleichbar sind (siehe Tabelle 1). Aufgrund dieser ersten Beobachtung wurde Protokoll 1 verwendet, um den Effekt der unterschiedlichen Verpackungssysteme auf die Virusproduktion zu untersuchen.

Beim Verpackungssystem der sogenannten „zweiten Generation“ (2^{nd} -generation) werden Helferplasmide (*Packaging-Plasmide*) verwendet, die nur die Sequenzen für die Strukturproteine Gag, Pol und *env* kodieren und aus denen im Vergleich zu Plasmiden der ersten Generation die weiteren akzessorischen Proteine entfernt wurden [Aldovini and Young, 1990; Dull et al., 1998; McBride et al., 1997].

Beim Verpackungssystem der „dritte Generation“ (3^{rd} -generation) werden die Gag, Pol und *env* Proteine von separaten Plasmiden kodiert, was zu einer weiteren Erhöhung der biologischen Sicherheit des Systems führt [Dull et al., 1998]. Somit ist für die Herstellung infektiöser Viruspartikel nach dem 3^{rd} -generation Verpackungssystem eine Kotransduktion von vier anstelle von drei Plasmiden (wie beim 2^{nd} -generation System) nötig.

Ein Vergleich beider Systeme zeigte (Abb.4.1.b), dass das *2nd-generation* Verpackungssystem reproduzierbar einen etwa doppelt so hohen Virustiter lieferte wie das *3rd-generation* System. Auch die für eine Virusproduktion verwendeten Produzentenzelllinien üben, bei gleichbleibendem Verpackungssystem, einen Einfluss auf den resultierenden Virustiter aus. Im Verlauf dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Verwendung des Subklons 293T/17 (von ATCC) der HEK293 Zelllinie eine Verbesserung des Virustiter zur Folge hatte im Vergleich zu einem Neomycin resistenten Subklon dieser Zelllinie, (293FT der Firma Invitrogen). Um eine solche Mehrfach-Transduktion zu umgehen und damit die Virusproduktion zu vereinfachen, widmet sich die Forschung aktiv der Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie [Cockrell et al., 2006; Farson et al., 2001; Ni et al., 2005]. Jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, dass mit Hilfe einer solchen Zelllinie ein hoher Virustiter generiert werden konnte. Daher ist bis zum jetzigen Zeitpunkt die transiente Ko-Transduktion die am weitesten eingesetzte Methode zur Lentivirus Produktion.

Je nach experimentellem Zweck kann sowohl die Größe des *Inserts* als auch die des *backbones* eines lentiviralen Vektors variieren. Daher sollte ein optimiertes Virus-Produktions Protokoll auch für solche Vektoren verwertbare Virustiter liefern. Bei der Testung der etablierten Konditionen für Protokoll 1 mit mehreren Transfer-Vektoren, welche sich in der *Insert*- und *backbone*-Größe unterschieden, konnte eine signifikante Abnahme des Virustiters in Abhängigkeit von der Größe des Transfervektors beobachtet werden (Abb.4.4). Dieser Effekt ist nicht auf unzureichend zur Verfügung gestellte DNA-Menge an Transfervektor im Verhältnis zu den Verpackungs- bzw. Envelope-Vektoren zurückzuführen.

Denn durch Erhöhung der für die Transduktion eingesetzten gesamt DNA-Menge wurde ein konstantes molares Verhältnis der Vektoren pro Zellzahl gewährleistet. Zur Etablierung eines Protokolls, das die Produktion von hohem Virustiter für Vektoren mit großen *Inserts* ermöglicht, ging mittels Vorversuchen aus mehreren in der jüngsten Literatur veröffentlichten Protokollen eines hervor.

Durch Modifikationen des von Mitta et al publizierten Protokolls [Mitta et al., 2005] gelang es, erstmalig für Vektoren mit größer als 7 kb großen *Inserts* Titer von bis zu

10^5 V/ml zu gewinnen (Abb.4.4.b). Die Modifikation bestand darin, die doppelte DNA-Menge zu verwenden, wobei eine weitere Erhöhung zu keiner zusätzlichen Verbesserung des Titers führte. Sowohl für Protokoll 1 als auch 4 konnte eine starke inverse Korrelation zwischen der Größe der proviralen Integrationssequenz und dem Virustiter festgestellt werden. Dagegen bestand kein Zusammenhang zwischen Virustiter und der Größe des *backbones* des Transfervektors. Diese Daten deuten darauf hin, dass beim Verpacken lentiviraler Inserts größer als 8 kb, ungeachtet des verwendeten Protokolls, keine praktikablen Virustiter erzielt werden können, was die Daten von Kumar [Kumar et al., 2001] bestätigt. Auch das Minimieren der Sequenzlänge des *backbones* des Vektors führte nicht zur Steigerung des Titers.

Das Zusetzen von Natriumbutyrat, ein Histondeacetylase Inhibitor, dem ein positiver Effekt auf die Virusproduktion zugeschrieben wird [Karolewski et al., 2003; Sena-Esteves et al., 2004], führte ebenfalls zu keiner zusätzlichen Erhöhung des Titers. Die Verwendung von Natriumbutyrat übt einen uneinheitlichen Effekt auf den Titer lentiviraler Vektoren aus. So konnte Esteves et al bei Mokola-G und Rabies-G pseudotypisierten eine Erhöhung des Titers nach Na-Butyrat Behandlung nachweisen. Diese Steigerung ist auf die Na-Butyrat vermittelte Aktivierung des CMV-Promotors der jeweiligen Envelop-Plasmide zurückzuführen [Gasmi et al., 1999]. Dieselbe Behandlung hatte dagegen bei VSV-G-Envelope, das ebenfalls vom CMV-Promotor exprimiert wird, keine Verbesserung der Produktion zur Folge [Sena-Esteves et al., 2004]. Dies implizierte, dass die maximale Expression des Hüllproteins von diesem Plasmid in den 293T Zellen bereits erreicht wurde und eine weitere Erhöhung der Expression der Verpackungskomponenten nicht in höhere Titer umgesetzt wird.

Neben der Generierung von hohen Virustitern stellt die Anreicherung und Aufreinigung der virushaltigen Überstände eine weitere Limitation bei *in vivo* Anwendungen des lentiviralen Systems dar. Mehrere Strategien wurden verfolgt, retrovirale Partikel physikalisch aufzukonzentrieren, um somit durch Erhöhung der viralen Titer die Effizienz der Transfektion von Zielzellen zu verbessern. In diesem Zusammenhang hat sich die Zentrifugation als eine geeignete Methode bewährt bedingt durch die Einfachheit der Technik sowie der Möglichkeit, große Probenvolumina zu verarbeiten.

Üblicherweise wird eine Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation bei 90.000 xg für 90 min. erreicht (<http://tronolab.epfl.ch/page58122.html>; [Rubinson et al., 2003]). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute an Gesamt-Viren bei dieser hohen Geschwindigkeit unterhalb von 10% lag. Diese reproduzierbaren Daten wurden mit Hilfe des proviralen pLL3.7-Vektors erzeugt (Abb. 4.5.b). Die Durchführung mit einem Sucrose-Kissen erbrachte eine moderate Verbesserung der Ausbeute. Stattdessen konnte durch Kombination von Sucrose-Kissen und Reduktion der Geschwindigkeit auf 20.000 xg (wie von Yang [Yang et al., 2002] veröffentlicht) eine drastische Verbesserung der Ausbeute bis zu 80 % erzielt werden. Eine weitere Reduktion der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 6400 xg führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Ausbeute.

Weiterhin galt es in dieser Arbeit, die Ausbeute an Viren, die durch das Verpacken großer proviraler Inserts entstanden sind, zu evaluieren. In der verfügbaren Literatur sind in der Regel keine Bilanzierungen der jeweiligen Virus-Ausbeute beschrieben, was die vergleichende Evaluation der unterschiedlichen Protokolle deutlich erschwert. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die Ausbeute für Viren, die große Sequenzen enthielten, viel niedriger lag im Vergleich zum proviralen pLL3.7-Vektor (Insert von 4,3). So betrug die Ausbeute für den Vektor mit dem größten Insert (7,2 kb) weniger als 10 % der Ausgangsmenge, was evt. auf eine erhöhte Empfindlichkeit solcher Vektoren gegenüber während der Ultrazentrifugation einwirkende Scherkräfte schließen lässt. Die Ausbeute ließ sich auch nicht durch weitere Geschwindigkeitsreduktion erhöhen. Das Ausbleiben der Initialbeschleunigung während der Zentrifugation hingegen (und damit eine weitere Reduktion der maximal wirksamen Scherkräfte) führte zu einer reproduzierbaren und signifikanten Verbesserung der Ausbeute von bis zu 25 %. Demzufolge kann die Ausbeute an lentiviralen Partikeln nach Ultrazentrifugation durch Reduktion der Geschwindigkeit auf 20.000 xg sowie der Umgehung der Initialbeschleunigung merklich verbessert werden.

Zusammenfassend wird hier ein Protokoll zur Generierung und Anreicherung von replikationsinkompetenten Lentiviren beschrieben mit dem besonderen Vorteil der Anwendbarkeit auf einer Vielzahl von Vektoren mit bis zu 7,6 kb großen *Inserts*. Mit dem hier etablierten Protokoll gelang es erstmalig für Vektoren größer als 8 kb Titer

von bis zu 10^6 V/ml zu generieren. Das hier aufgezeigte modifizierte Zentrifugationsprotokoll ist leicht anwendbar und sollte auch die Aufkonzentrierung großer und fragiler Vektoren erleichtern. Dabei sollte, wie in dieser Arbeit aufgezeigt, die Zentrifugation bei 20.000 xg und ohne Initialbeschleunigung erfolgen. Mit Hilfe des so erhaltenen Endprotokolls für Virusproduktion und Aufkonzentrierung gelang es, Virusüberstände mit hohem Titer zu gewinnen. Dadurch konnten sowohl die Jrukat T-Zellen als auch die primären T-Zellen effizient und erfolgreich infiziert werden, was für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von PPAR δ in diesen Zellen entscheidend war.

5.2. Expression und Funktion von PPAR δ in humanen T-Lymphozyten

Als nukleäre Rezeptoren, die in Keratinozyten Differenzierung und Funktion in der Epidermis involviert sind, wurden in den letzten Jahren die Mitglieder der PPAR-Familie (Peroxisom proliferator-aktivierender Rezeptoren) identifiziert. Nach heutigem Forschungsstand werden drei Subtypen (PPAR α , PPAR δ/β und PPAR γ) unterschieden [Michalik and Wahli, 1999], die durch Ligandenbindung aktiviert werden. Nach der Aktivierung, Translokation in den Kern und Heterodimerisierung mit RXR binden sie an spezifische PPRE-Sequenzen innerhalb ihrer Zielgene und beeinflussen auf diese Weise deren Expression. Eine Vielzahl unabhängiger Indizien weisen auf eine Schlüsselrolle von PPAR δ bei der Pathogenese von Psoriasis hin. So ist PPAR δ in psoriatischen Plaques sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene drastisch überexprimiert. Die Überexpression steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Akkumulation proinflammatorischer Zytokine in den psoriatischen Läsionen [Westergaard et al., 2003].

Auch ist PPAR δ im Rahmen der Wundheilung überexprimiert und induziert in murinen Keratinozyten die differenzierungsassoziierten Gene (z.B. Keratin 6), welche ebenso bei Psoriasis hoch exprimiert sind. Ferner wird PPAR δ transkriptionell durch TNF α und IFN γ , zwei zentrale Mediatoren bei der Psoriasis, induziert [Tan et al., 2001].

Weiterhin sind die für die Lipid-Ligand abhängige Aktivierung des Rezeptors nötigen Interaktionspartner FABP5 und CRABP-II in Psoriasis überexprimiert [Madsen et al., 1992] und in hoch proliferativen Keratinozyten angereichert. Zusätzlich reguliert PPAR δ die Keratinozyten Differenzierung, wirkt antiapoptotisch und führt zur Induktion der Angiogenese [Romanowska et al., 2008; Wang et al., 2006]. Das Expressionsmuster, die funktionelle Aktivitäten von PPAR δ als auch die Expression dessen ko-regulatorischer Proteine implizieren eine wichtige Rolle von PPAR δ in der Psoriasis. Wie in der Einleitung beschrieben, sind auch T-Zellen maßgeblich an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt. Allerdings liegen bislang keine Daten zur Expression bzw. Funktion von PPAR δ in T-Zellen vor. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression und Funktion von PPAR δ in den T-Zellen untersucht werden.

5.2.1. Expression und Induktion von PPAR δ in humanen T-Lymphozyten

Anders als bei PPAR δ ist die Expression von PPAR α und PPAR γ in humanen T-Zellen nachgewiesen worden [Moraes et al., 2006]. Da zur spezifischen Expression von PPAR δ in T-Zellen bisher noch nichts bekannt war, wurde dies der Arbeit untersucht. Die Expression konnte in psoriatischen-, primären CD3⁺ und Jurkat T-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene gezeigt werden (Abb.4.6 und Abb. 4.7). Dabei war das PPAR δ Protein jeweils nahezu ausschließlich kern-lokalisiert. Ein ähnlicher Befund wurde bei Zellen der suprabasalen-Schicht psoritischer Haut erhoben [Westergaard et al., 2003]. Da die für den Versuch verwendeten T-Zellen jeweils aktiviert waren, wurde überprüft, ob für die Expression eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung (TZR) der T-Zellen voraus gehen muss.

Für primäre T-Zellen die unter Verwendung eines stimulierenden CD3-Antikörpers isoliert wurden, konnte keine deutliche Expression des PPAR δ Proteins nachgewiesen werden. In der Literatur verfügbare Indizien deuten darauf hin, dass die transkriptionelle Regulation von PPAR δ komplex und zelltyp-abhängig ist. In murinen Keratinozyten führt TNF α bzw. IFN γ zur Induktion von PPAR δ über den AP-1/ Stress-associated kinase-Signalkaskade, wodurch es schließlich zur Aktivierung des antiapoptotischen Akt-1-Signalwegs kommt [Tan et al., 2001].

Dagegen erfolgt die Repression, der durch inflammatorische Zytokine hervorgerufenene Stimulation der PPAR δ -Expression, durch TGF- β 1 über Smad3 [Tan et al., 2004b]. Die Tatsache, dass diese Signalwege in humanen Keratinozyten nicht bestätigt werden konnten, deutet möglicherweise darauf hin, dass bei den Signalwegen Differenzen zwischen Mensch und Maus bestehen. Auch die Beobachtung, dass PPAR δ in der humanen, jedoch nicht in der murinen, interfollikulären Epidermis von Erwachsenen exprimiert wird, unterstützt diese Vermutung. In einer humanen *colorectalen Krebs-Zelllinie* wird die APC (*tumor suppressor-Pathway*) induzierte Repression von PPAR δ über β -catenin durch eine TCF/LEF-Bindungsstelle im PPAR δ -Promotor vermittelt [He et al., 1999]. Dagegen erfolgt die Vitamin D vermittelte Induktion in verschiedenen humanen Epithelialzelllinien durch Bildung eines D/RXR-Heterodimers [Dunlop et al., 2005].

In der hier präsentierten Arbeit konnte aufgezeigt werden, daß PPAR δ in humanen T-Zellen durch TNF α als auch IFN α induziert werden kann. Während die Induktion durch TNF α vermutlich über eines der vorher charakterisierten Mechanismen verläuft, müssen die nach einer IFN α agierenden *cis-acting-elements* innerhalb des PPAR δ -Promotors noch erforscht werden. Mit Hilfe von *in silico* Analysen des humanen PPAR δ -Promotors konnten einige dafür in Frage kommenden Kandidaten wie die ISRE- bzw. NFAT-Elemente im humanen PPAR δ -Promotor identifiziert werden. Da hier erstmalig die Expression von PPAR δ in T-Zellen aufgezeigt wurde, liegen bisher keine Befunde über die Transkriptionsfaktoren vor, die für die PPAR δ -Transkription in T-Zellen notwendig sind. Somit wird deutlich, dass weiterführende Untersuchungen notwendig sind, um den genauen Mechanismus der transkriptionellen Regulation von PPAR δ in T-Zellen aufzuklären.

5.2.2. Biologische Funktion von PPAR δ in humanen T-Lymphozyten

Neben dem Nachweis der Expression von PPAR δ in T-Zellen widmete sich die Arbeit der Untersuchung der biologischen Funktion dieses Transkriptionsfaktors in den T-Zellen. Die bezüglich des Effektes der Ligand-vermittelten Aktivierung von PPAR δ vorhandenen Daten sind kontrovers.

Während einige eine Stimulation des Zellwachstums als Folge einer solchen Aktivierung beschrieben, zeigten andere dagegen einen inhibitorischen Effekt [Burdick et al., 2006]. So führte die spezifische Aktivierung von PPAR δ mit GW501516 (PPAR δ -Ligand) in Endothelialzellen zur Proliferation sowie zur Induktion der Angiogenese [Piqueras et al., 2007].

Auch in primären humanen Keratinozyten konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Aktivierung die Proliferation der Zellen steigert [Romanowska et al., 2008]. Untersuchungen von Burdick et al. lieferten in einer Keratinozyten Zelllinie einen gegenteiligen Effekt. Unter Verwendung der Jurkat T-Zelllinie konnte hier gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR δ die Proliferation der T-Zellen zur Folge hatte. Ferner zeigten PPAR δ -knockdown Jurkat T-Zellen einen Wachstumsnachteil gegenüber normalen Jurkat Zellen, was mit dem beschriebenen Effekt im Einklang war. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Daten bezüglich der Rolle von PPAR δ in der Proliferation könnte sein, dass es sich um Spezies-spezifische- bzw. Ligand-spezifische-Effekte handelt.

Die antiapoptotische Wirkung ist eine weitere Funktion von PPAR δ in T-Zellen, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Die hier dargestellten Daten zeigen, dass PPAR δ vor Serumentzug induzierter Apoptose in T-Zellen schützt. Da dieser Apoptoseweg durch PPAR δ reguliert wurde, ist bereits für Keratinozyten beschrieben [Di-Poi et al., 2002]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Rolle von PPAR δ bei der durch Entzug von Wachstumsfaktoren vermittelten Apoptose charakterisiert. Weiterhin wurde der Todesrezeptor Fas-Weg untersucht, eines der am besten untersuchten Apoptose-auslösenden Reaktionswege in T-Zellen. Es zeigte sich, dass PPAR δ keine protektive Funktion bei Fas-induzierter Apoptose ausübt. Als nächstes galt es, die möglichen Mechanismen, die dem durch PPAR δ vermittelten antiapoptotischen Effekt in T-Zellen zugrundeliegen, zu untersuchen. Die hier ermittelten Resultate zeigen deutlich, dass PPAR δ eine protektive Wirkung bei durch Serumentzug induzierter- jedoch nicht bei Fas-induzierter Apoptose in humanen T-Zellen ausübt.

Es wurde vormals postuliert, dass durch die PPAR δ -abhängige Modulation des PDK1 / ILK1 /Akt1-Signalweges die Inhibition der Apoptose erfolgt. Dies wurde auch von Di-Poi in primären Keratinozyten in Kultur gezeigt [Di-Poi et al., 2002]. Dieser Mechanismus konnte hier in T-Zellen jedoch nicht bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich vielmehr, dass weder eine Ligand-abhängige Aktivierung noch eine siRNA-vermittelte Herrunter-Regulation von PPAR δ zur einer Veränderung der Expression von PDK1 bzw. ILK1 in T-Zellen führte. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Befund von Burdick [Burdick et al., 2007] sowohl an einer humanen Keratinozyten Zelllinie (N/TERT-1) als auch an primären Maus Keratinozyten. Ferner zeigten sie, dass die Aktivierung von PPAR δ die Phosphorylierung von ERK1/2 in diesen Zellen beeinflusste, was einen Anhaltspunkt für einen möglichen Mechanismus für die antiapoptotische Funktion von PPAR δ in T-Zellen darstellen könnte. Die Untersuchungen ergaben, dass die antiapoptotische Aktivität zumindest teilweise durch Phosphorylierung von ERK1/2 vermittelt wird. Ferner trägt die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs voraussichtlich auch zu der beobachteten PPAR δ vermittelten Stimulation der T-Zell-Proliferation bei. In H9c2-Cardiomyoblasten schützt das aktivierte PPAR δ vor H₂O₂ induzierter Apoptose durch die Induktion der Expression von Catalase [Pesant et al., 2006]. Da weiterhin ERK1/2-Phosphorylierung auch als Reaktion auf oxidativen Stress auftritt [Hill et al., 2006], kann postuliert werden, dass die hier in T-Zellen gezeigte H₂O₂ Induktion von PPAR δ vor Hydrogen-Peroxid induzierter Apoptose schützt und das dies sowohl über die Induktion von Catalase als auch über die Aktivierung von ERK1/2 verläuft. Zusammengefasst hat es den Anschein, dass bei extrazellulären Stress PPAR δ als Aktivator des ERK1/2 Signalwegs agiert.

Wie bereits erwähnt, wurde nachgewiesen, dass PPAR δ ein Zielgen von IFN α ist, daneben gelang es, die schützende Rolle von PPAR δ vor IFN α induzierter Apoptose aufzuzeigen. Bei IFNs handelt es sich um bedeutende Regulatoren des Zellwachstums. Sie übermitteln eine Mannigfaltigkeit an Zell-spezifischen Signalen, welche in verschiedene Effekte resultieren, einschließlich Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Die IFN α induzierte Apoptose konnte bisher in unterschiedlichen experimentellen Systemen gezeigt werden, z.B. in Melanom Zelllinien und humanen endothelialen Tumoren.

Diese Indizien deuten darauf hin, dass sowohl der apoptotische Effekt von Typ I IFN als auch die Apoptosesignalwege Zelltyp-abhängig sind. Dies impliziert, dass eine Kombination aus den IFN-induzierten Signalwegen mit anderen in der jeweiligen spezifischen zellulären Umgebung aktiven Signalwegen für die resultierende Effekt entscheidend ist [Pokrovskaja et al., 2005]. Auch wenn der genaue Mechanismus der IFN-induzierten Apoptose bislang nicht aufgeklärt wurde, konnte eine IFN α -induzierte Aktivierung der Caspasen c9, c7, c3, c8 gezeigt werden [Boccellino et al., 2004; Gamero et al., 2006; Liedtke et al., 2006; Pokrovskaja et al., 2005]. Zusätzlich ist eine IFN α vermittelte Aktivierung von Bax und Bak, zweier proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie, beschrieben worden [Pokrovskaja et al., 2005]. Diese und andere Daten weisen darauf hin, daß der intrinsische Mitochondrien-abhängige Apoptoseweg die Hauptrolle bei der IFN α -induzierten Apoptose zu kommt [Panaretakis et al., 2003; Pokrovskaja et al., 2005]. Diese Daten und der in dieser Arbeit nachgewiesene Schutzeffekt von PPAR δ bei der IFN α -induzierten Apoptose weisen daraufhin, dass PPAR δ seine antiapoptotische Wirkung durch Regulierung von Signalwege des intrinsischen Apoptosewegs ausübt. Ein weiterer Hinweis dafür ist das ebenfalls hier gezeigte Fehlen einer antiapoptotischen Wirkung von PPAR δ bei Fas-induzierter Apoptose, ein extrinsischen Apoptoseweg, in den T-Zellen.

Schließlich wurde der Mechanismen dieser PPAR δ vermittelten antiapoptotische Wirkung untersucht. Auch wenn hier Aktivierung von ERK1/2 infolge der INF α -abhängigen Induktion von PPAR δ gezeigt werden konnte, handelt es sich dabei wahrscheinlich nicht um den einzigen Mechanismus zur Regulation des Typ 1 IFN Signalwegs.

An der Inhibition der Apoptose in T-Zellen könnten wahrscheinlich vorrangig Signale des Typ 1 Interferons involviert sein, welche durch Aktivierung von STAT3 im Gegensatz zu STAT1 oder STAT2 agieren. Diese Annahme beruht auf Ergebnisse von Tanabe, dessen Daten zeigten, dass eine INF α/β -vermittelte Aktivierung von STAT3 antiapoptotisch in STAT1 $^{-/-}$ -T Lymphozyten wirkt [Tanabe et al., 2005]. Ferner zeigte die Gruppe von Sano [Sano et al., 2005], dass STAT3 in psoriatischen Keratinozyten stark aktiviert ist und Transgene Mäuse, die konstitutiv STAT3 überexprimieren, psoriatische Läsionen entwickelten. In humanen leukemischen T-Zellen blockiert die Aktivierung von STAT3 die Apoptose durch Induktion der

Expression von Mcl-1, ein Mitglied der antiapoptotischen bcl-2-Familie [Epling-Burnette et al., 2001].

Insgesamt betrachtet ist eine indirekte Regulation von STAT3 durch PPAR δ vorstellbar. Funktionell agiert PPAR δ in verschiedenen zellbiologischen Prozessen antagonistisch zu den anderen zwei Isoformen PPAR α/γ . So wirkt die Aktivierung von PPAR γ in T-Zellen proapoptotisch und führt zur Dephosphorylierung von STAT3, welches bei Überexpression einen Psoriasis ähnlichen Phänotyp *in vivo* hervorruft [Kim et al., 2005; Sano et al., 2005]. Zusammenfassend sind wahrscheinlich etliche zelluläre Signalwege und Aktionen an der antiapoptotischen Aktivität von PPAR δ beteiligt.

Die Mehrheit antigen-aktivierter T-Zellen *in vivo* stirbt infolge einer komplexen Immunantwort. Das Schicksal der aktivierten T-Zellen wird dabei von zwei separaten Pathways {Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) und autonomer-Zelltod (ACAD)} kontrolliert [Marrack and Kappler, 2004]. Andererseits ist zur Entwicklung von Gedächtnis T-Zellen notwendig, dass einige antigen-aktivierte T-Zellen diesen apoptotischen Zelltod überleben selbst unter den drastischsten Konditionen. Bisher ist es noch weitestgehend ungeklärt, warum die Mehrheit der aktivierten T-Zellen der Apoptose unterliegt, während einige überleben.

Die Induktion des Transkriptionsfaktors PPAR δ durch TNF α und IFN α und dessen Inhibition von IFN α -induzierter Apoptose in T-Zellen liefert einen interessanten Anhaltspunkt für die Vorstellung, dass PPAR δ möglicherweise eine Rolle bei der Regulation des Überlebens dieser aktivierten T-Zellen *in vivo* einnimmt. So ist es vorstellbar, dass der von Marrack in murinen T-Zellen gezeigte antiapoptotische Effekt von IFN α auf die bereits hier beschriebene Induktion von PPAR δ zurückzuführen ist [Marrack et al., 1999]. Die PPARs übernehmen eine wichtige Rolle im Metabolismus durch die Aktivierung mittels inflammatorischer Lipid-Mediatoren [Chinetti et al., 2000]. In Anbetracht dieser Tatsache könnte PPAR δ unabhängig von der Modulation des IFN-Signalwegs den aktivierungs-induzierten-Zelltod durch Kopplung der T-Zell-Aktivierung an den metabolischen Status beeinflussen.

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer detaillierten Analyse des Effekts einer anhaltenden PPAR δ Aktivierung auf das Überleben aktivierter T-Zellen *in vivo* in einem Mausmodell. Was weiterhin für die Wichtigkeit eines solchen Modells spricht, sind die in jüngster Zeit durchgeführten klinischen Studien mit einem synthetischen PPAR δ -Liganden zur Behandlung metabolischer Erkrankungen [Chang et al., 2007]. Eine solche beständige PPAR δ Aktivierung könnte einen erhöhten Spiegel an dauerhaft aktiven T-Zellen zur Folge haben, wodurch negative Folgen, wie z.B. die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, zu befürchten wäre. Dies würde eine Neubewertung eines solchen Behandlungsansatzes notwendig machen.

Es konnte im Verlauf dieser Arbeit erstmalig die Expression von PPAR δ in humanen T-Zellen aufgezeigt werden und dessen Induktion durch zwei in der Psoriasis wichtige Zytokine: $\text{-TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\alpha$ -. Untersuchungen bezüglich der biologischen Funktion von PPAR δ in diesen Zellen zeigten, dass es sowohl proliferationsstimulierend als auch antiapoptotisch wirkt. Dabei erfolgt die $\text{IFN}\alpha$ vermittelte Induktion als auch der antiapoptotische Effekt zumindest teilweise über die ERK1/2 Phosphorylierung.

In der Psoriasis sind neben der Keratinozytenproliferation, die Aktivierung des Typ 1 IFN-Signalwegs und die Persistenz aktiver T-Zellen in läsionaler Haut wichtige Merkmale dieser komplexen Hauterkrankung. Ferner zeigte die Gruppe von Johansen, dass die ERK1/2 Phosphorylierung in psoriatischen Läsionen erhöht ist [Johansen et al., 2005]. Daher deuten die hier gewonnenen Erkenntnisse darauf, dass die Induktion von PPAR δ durch Typ I IFN zum langfristigen Verweilen der aktiven T-Zellen in psoriatischer Haut beiträgt, wobei die Typ I IFN vermittelte Induktion von PPAR δ über eine ERK1/2 Phosphorylierung vermittelt wird. Dieser Befund wird durch die Tatsache, daß PPAR δ einen antagonistischen Effekt gegenüber PPAR γ ausübt und dies über eine die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt unterstützt [Harris and Phipps, 2001]. Zusätzlich wirkt PPAR γ , das einen inhibitorischen Effekt auf die Psoriasis hat, seinerseits proapoptotisch in T-Zellen und wird unter anderem direkt durch ERK vermittelte Phosphorylierung inhibiert [Kuenzli and Saurat, 2003; Malhotra et al., 2005].

Die hier dargestellten Daten repräsentieren neuartige und zusätzliche Hinweise für eine Mitwirkung von PPAR δ in der Pathogenese von Psoriasis. Zusätzlich wurde beschrieben, dass PPAR δ in dendritische Zellen exprimiert [Jakobsen et al., 2006] wird und dessen Aktivierung die Angiogenese in Endothelialzellen stimuliert [Piqueras et al., 2007]. Daraus wird ersichtlich, daß PPAR δ mehrerer für die Psoriasis kritische Zell-populationen beeinflusst, was für eine wichtige Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Psoriasis spricht und dessen Inhibierung ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung von Medikamente darstellt.

6. Summary

Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) is a nuclear hormone receptor regulating diverse biological processes, including β -oxidation of fatty acid, proliferation of keratinocytes and epithelial cell differentiation. The role of PPAR δ in the immune system has not been thoroughly studied to date. Several lines of evidence support a role for PPAR δ in psoriasis pathogenesis. Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with an estimated prevalence of 2% - 4% in the western civilization. Given that psoriasis is characterized by keratinocyte hyperproliferation and aberrant terminal differentiation of keratinocytes, research has been conducted on the role of PPAR δ in keratinocytes. However, a large amount of clinical and experimental evidence supports a main role for T cells in pathogenesis of psoriasis. Therefore, the present work aimed at characterizing the expression and function of PPAR δ in human T cells. In the course of this work, the expression of PPAR δ was shown in activated human T cells purified from peripheral blood, as well as in T cells isolated from affected psoriasis skin lesions. Furthermore, PPAR δ is induced in T cells upon stimulation with type 1 interferon (IFN). Functionally, PPAR δ enhances proliferation of primary T cells and blocks apoptosis induced by type 1 IFN and by serum deprivation. It was shown that these cellular functions are mediated by activation of ERK1/2 signaling. The results presented in this work establish a direct molecular link between type 1 IFN signaling and PPAR δ , define a functional role for PPAR δ in human T cells, and suggest that the induction of PPAR δ by type 1 IFN contributes to the persistence of activated T cells in psoriasis skin lesions.

To study the function of PPAR δ in T cells the suppression of PPAR δ gene expression was necessary. This was accomplished using siRNA expressed from a lentiviral vector. Vectors based on lentiviruses are highly efficient vehicles for gene transfer approaches and are widely used in basic research. The use of replication-deficient pseudotyped HIV-derived lentiviral vectors allows the efficient transduction of primary cells including human T cells. Generation of high titer lentiviral stocks and efficient virus concentration are central to maximize the utility of lentiviral technology. Therefore, the present work initially established protocols for optimizing the production and concentration of lentivectors. Published protocols for lentivirus production on a range of transfer vectors differing in size (7.5–13.2 kb) were evaluated. Based on these, a modified virus production protocol was developed

robustly yielding useful titers (up to 10^7 / ml) for a range of different transfer vectors containing packaging inserts up to 7.5 kb. The results also showed that the recovery of virus after concentration by ultracentrifugation depends on the size of the packaged inserts, heavily decreasing for large packaged inserts. To address this technical limitation, a fast (4h) centrifugation protocol at reduced speed allowing high virus recovery even for large and fragile lentivirus vectors was developed.

7. Zusammenfassung

Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) ist ein nukleärer Rezeptor, der der Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren angehört. Seine biologischen Funktionen sind vielfältig und reichen von der β -Oxidation von Fettsäuren über die Proliferation der Keratinozyten bis hin zur Differenzierung von epithelial Zellen. Die Rolle von PPAR δ innerhalb des Immunsystems wurde bislang nicht genau aufgeklärt. Eine Vielzahl von Indizien weisen auf eine zentrale Rolle von PPAR δ bei Psoriasis hin. Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine häufig auftretende chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung der Haut mit einer Prävalenz von 2% - 4% in den westlichen Industrienationen. Da die Psoriasis durch übermäßige Keratinozytenproliferation und Differenzierung gekennzeichnet ist, beschränkte sich die Forschung bislang auf die Bedeutung von PPAR δ in Keratinozyten. An der Psoriasispathogenese sind jedoch auch aktivierte T-Zellen beteiligt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression und die funktionelle Bedeutung von PPAR δ in humanen T-Zellen untersucht. Die Expression konnte sowohl in aktivierten humanen T-Zellen, die aus peripheralen Blut isoliert wurden, als auch in T-Zellen der suprabasalen-Schicht psoriatischer Haut gezeigt werden. Weiterhin wurde PPAR δ in T-Zellen durch Typ 1 Interferon (IFN) induziert. Funktionell verstärkt PPAR δ die Proliferation primärer T-Zellen und schützt diese sowohl vor Typ 1 IFN-induzierter als auch vor Serumentzug-induzierter Apoptose. Die Untersuchungen ergaben, dass diese zellulären Funktionen durch Aktivierung von ERK1/2 vermittelt werden. Die hier gezeigten Resultate weisen auf eine direkte molekulare Verbindung zwischen den Typ 1 IFN-Signalwegen und PPAR δ hin und die funktionelle Rolle von PPAR δ in humanen T-Zellen wird deutlich aufgezeigt. Dies deutet daraufhin, dass die Typ 1 IFN vermittelte Induktion von PPAR δ möglicherweise für das Ausharren der aktivierten T-Zellen in läsionaler Haut bei Psoriasis verantwortlich ist.

Für Experimente im Rahmen der Untersuchung der Funktionen von PPAR δ in T-Zellen wurde die Expression des PPAR δ -Gens mittels siRNA inhibiert. Die siRNA wurde dabei von einem Lentivektor exprimiert. Aufgrund ihrer Charakteristika stellen die Lentiviren besonders geeignete Vektoren für den Gentransfer dar. Replikationsinkompetente lentivirale Vektoren sind in der Lage ruhende und sich nicht teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material (shRNA) in das Zielzellgenom zu integrieren. Dadurch wird die siRNA in den infizierten Zellen und

deren Tochterzellen stabil exprimiert. Für experimentelle Anwendungen lentiviraler Vektoren sind ein hoher Titer der Virusüberstände und effiziente Virus-Konzentrationen wichtige Faktoren. Aus diesem Grund war das Ziel zu Beginn dieser Arbeit die Produktion und Aufkonzentrierung von Lentivektoren zu optimieren. Dazu wurden mehrere bereits in der Literatur veröffentlichte Protokolle unter Verwendung verschiedener Transfervektoren, die sich in der Größe unterscheiden (7.5-13.2 kb), evaluiert. In dieser Arbeit konnte ein modifiziertes Virusproduktionsprotokoll, das anwendbare Titer (von bis zu 10^7 V/ml) für eine Auswahl unterschiedlicher Lentivektoren mit Inserts bis zu 7.5 kb liefert, etabliert werden. Ferner zeigten die Resultate, dass die Ausbeute an Viren nach der Ultrazentrifugation abhängig ist von der Größe des im Vektor beinhaltenden Inserts und dass die Ausbeute stark abnimmt bei großen Inserts. Auch wurde hier ein schnelles (4h) und leicht anwendbares Zentrifugationsprotokoll präsentiert, welches eine hohe Ausbeute auch für große und fragile Vektoren ermöglicht.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AF	aktivierende Funktion
AP-1	Aktivator-Protein -1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
aq.dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster Differentiation
cDNA	complementary DNA
DC	Dendritische Zelle
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DISC	death inducing signal complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleotid-5'-triphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötale Kälber Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
h	Stunden
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsprotein
IFNα	Interferon alpha
IFNγ	Interferon gamma

Ig (M)	Immunglobulin der Klasse (M)
IL	Interleukin
IP-10	interferon g inducible protein-10
IRF2	IFN regulatory factor 2
kd	Kilodalton
MHC	major histocompatibility complex
miRNA	micro RNAs
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid
PPAR	Peroxisomproliferator-aktivierender Rezeptor
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
RNasen	Ribonukleasen
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RXR	Retinoid X Rezeptor
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
STAT	signal transducers and activators of transcription
SSC	sideward scatter
TZR	T-Zellrezeptor
TH1/2	T-Helfer-Zelle Typ 1/2
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha

9. Literatur

1. Adkins DR, Abidi MH, Brown RA, Khoury H, Goodnough LT, Vij R, Westervelt P, DiPersio JF (2000): Resolution of psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: late complications of therapy. *Bone Marrow Transplant* 26:1239-41.
2. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003): RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:657-85.
3. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS (1996): High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70:2581-5.
4. al-Rubeai M, Singh RP (1998): Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 9:152-6.
5. Aldovini A, Young RA (1990): Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* 64:1920-6.
6. Anderson WF (1998): Human gene therapy. *Nature* 392:25-30.
7. Arakura F, Hida S, Ichikawa E, Yajima C, Nakajima S, Saida T, Taki S (2007): Genetic control directed toward spontaneous IFN-alpha/IFN-beta responses and downstream IFN-gamma expression influences the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disease. *J Immunol* 179:3249-57.
8. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB (1999): Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1:260-6.
9. Austin LM, Coven TR, Bhardwaj N, Steinman R, Krueger JG (1998): Intraepidermal lymphocytes in psoriatic lesions are activated GMP-17(TIA-1)+CD8+CD3+ CTLs as determined by phenotypic analysis. *J Cutan Pathol* 25:79-88.
10. Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52.

- 11.** Barker JN, Sarma V, Mitra RS, Dixit VM, Nickoloff BJ (1990): Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J Clin Invest* 85:605-8.
- 12.** Barna M, Bos JD, Kapsenberg ML, Snijdwint FG (1997): Effect of calcitriol on the production of T-cell-derived cytokines in psoriasis. *Br J Dermatol* 136:536-41.
- 13.** Bishop-Bailey D (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129:823-34.
- 14.** Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003): Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:267-73.
- 15.** Blesch A (2004): Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods* 33:164-72.
- 16.** Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997): Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71:6641-9.
- 17.** Boccellino M, Giuberti G, Quagliuolo L, Marra M, D'Alessandro AM, Fujita H, Giovane A, Abbruzzese A, Caraglia M (2004): Apoptosis induced by interferon-alpha and antagonized by EGF is regulated by caspase-3-mediated cleavage of gelsolin in human epidermoid cancer cells. *J Cell Physiol* 201:71-83.
- 18.** Bonifati C, Ameglio F (1999): Cytokines in psoriasis. *Int J Dermatol* 38:241-51.
- 19.** Bos JD, Hagenaars C, Das PK, Krieg SR, Voorn WJ, Kapsenberg ML (1989): Predominance of "memory" T cells (CD4+, CDw29+) over "naive" T cells (CD4+, CD45R+) in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res* 281:24-30.
- 20.** Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-66.
- 21.** Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003): Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-4.
- 22.** Burdick AD, Bility MT, Girroir EE, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM (2007): Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. *Cell Signal* 19:1163-71.

- 23.**Burdick AD, Kim DJ, Peraza MA, Gonzalez FJ, Peters JM (2006): The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation. *Cell Signal* 18:9-20.
- 24.**Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8033-7.
- 25.**Burns KA, Vanden Heuvel JP (2007): Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1771:952-60.
- 26.**Chang F, Jaber LA, Berlie HD, O'Connell MB (2007): Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Ann Pharmacother* 41:973-83.
- 27.**Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 49:497-505.
- 28.**Cockrell AS, Ma H, Fu K, McCown TJ, Kafri T (2006): A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. *Mol Ther* 14:276-84.
- 29.**Coleman JE, Huentelman MJ, Kasparov S, Metcalfe BL, Paton JF, Katovich MJ, Semple-Rowland SL, Raizada MK (2003): Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiol Genomics* 12:221-8.
- 30.**Devchand PR, Ijpenberg A, Devesvergne B, Wahli W (1999): PPARs: nuclear receptors for fatty acids, eicosanoids, and xenobiotics. *Adv Exp Med Biol* 469:231-6.
- 31.**Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2002): Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell* 10:721-33.
- 32.**Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agricola B, Byrne E, Raffeld M, Moen R, et al. (1992): Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 176:1125-35.
- 33.**Dropulic B (1998): Novel lentiviral vectors for human gene therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 7:997-1001.
- 34.**Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-71.

- 35.** Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C (2005): The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J Mol Biol* 349:248-60.
- 36.** Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:457-67.
- 37.** Elder JT (2005): Psoriasis clinical registries, genetics, and genomics. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2:ii106-7.
- 38.** Ellis CN, Krueger GG (2001): Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* 345:248-55.
- 39.** Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP, Jr. (2001): Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 107:351-62.
- 40.** Erkek E, Karaduman A, Akcan Y, Sokmensuer C, Bukulmez G (2000): Psoriasis associated with HCV and exacerbated by interferon alpha: complete clearance with acitretin during interferon alpha treatment for chronic active hepatitis. *Dermatology* 201:179-81.
- 41.** Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A, Naldini L (2001): A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12:981-97.
- 42.** Friedmann PS, Cooper HL, Healy E (2005): Peroxisome proliferator-activated receptors and their relevance to dermatology. *Acta Derm Venereol* 85:194-202.
- 43.** Gamero AM, Potla R, Sakamoto S, Baker DP, Abraham R, Lerner AC (2006): Type I interferons activate apoptosis in a Jurkat cell variant by caspase-dependent and independent mechanisms. *Cell Signal* 18:1299-308.
- 44.** Gasmi M, Glynn J, Jin MJ, Jolly DJ, Yee JK, Chen ST (1999): Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* 73:1828-34.
- 45.** Gaspari AA (2006): Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 54:S67-80.
- 46.** Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B (1999): Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 13:400-9.

- 47.** Gervois P, Fruchart JC, Staels B (2004): Inflammation, dyslipidaemia, diabetes and PPARs: pharmacological interest of dual PPAR α and PPAR γ agonists. *Int J Clin Pract Suppl*:22-9.
- 48.** Gottlieb AB, Lebwohl M, Shirin S, Sherr A, Gilleaudeau P, Singer G, Solodkina G, Grossman R, Gisoldi E, Phillips S, Neisler HM, Krueger JG (2000): Anti-CD4 monoclonal antibody treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: results of a pilot, multicenter, multiple-dose, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol* 43:595-604.
- 49.** Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG (1995): Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1:442-7.
- 50.** Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V (2004): Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1927-32.
- 51.** Hao DL, Liu CM, Dong WJ, Gong H, Wu XS, Liu DP, Liang CC (2005): Knockdown of human p53 gene expression in 293-T cells by retroviral vector-mediated short hairpin RNA. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:779-83.
- 52.** Harris SG, Phipps RP (2001): The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol* 31:1098-105.
- 53.** Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T (2001): Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem* 276:46260-7.
- 54.** He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999): PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99:335-45.
- 55.** Hiji AK, Michalik L, Wahli W (2002): PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 59:790-8.
- 56.** Hill EV, Sheppard CL, Cheung YF, Gall I, Krause E, Houslay MD (2006): Oxidative stress employs phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signalling pathways to activate cAMP phosphodiesterase-4D3 (PDE4D3) through multi-site phosphorylation at Ser239 and Ser579. *Cell Signal* 18:2056-69.
- 57.** Holzmann H, Krapp R, Hoede N, Morsches B (1974): Exogenous and endogenous provocation of psoriasis. A contribution to the Koebner phenomenon. *Arch Dermatol Forsch* 249:1-12.

- 58.** Hossbach M, Gruber J, Osborn M, Weber K, Tuschl T (2006): Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs. *RNA Biol* 3:82-9.
- 59.** Hunter J, Kassam A, Winrow CJ, Rachubinski RA, Capone JP (1996): Crosstalk between the thyroid hormone and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating peroxisome proliferator-responsive genes. *Mol Cell Endocrinol* 116:213-21.
- 60.** Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635-7.
- 61.** Jakobsen MA, Petersen RK, Kristiansen K, Lange M, Lillevang ST (2006): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, delta, gamma1 and gamma2 expressions are present in human monocyte-derived dendritic cells and modulate dendritic cell maturation by addition of subtype-specific ligands. *Scand J Immunol* 63:330-7.
- 62.** Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L (2005): The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 152:37-42.
- 63.** Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM (2000): Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 1:516-21.
- 64.** Karolewski BA, Watson DJ, Parente MK, Wolfe JH (2003): Comparison of transfection conditions for a lentivirus vector produced in large volumes. *Hum Gene Ther* 14:1287-96.
- 65.** Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Cheon H, Um JW, Sohn J, Song GG, Ji JD (2005): 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2 inhibits IL-6-induced Stat3 phosphorylation in lymphocytes. *Exp Mol Med* 37:179-85.
- 66.** Kim VN, Mitrophanous K, Kingsman SM, Kingsman AJ (1998): Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:811-6.
- 67.** Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 56:239-63.
- 68.** Kohlmann WM, Urban W, Sterry W, Foerster J (2004): Correlation of psoriasis activity with abundance of CD25+CD8+ T cells: conditions for cloning T cells from psoriatic plaques. *Exp Dermatol* 13:607-12.

- 69.** Komar CM (2005): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol* 3:41.
- 70.** Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry TE, Jr. (2001): Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology* 142:4831-8.
- 71.** Krane JF, Murphy DP, Gottlieb AB, Carter DM, Hart CE, Krueger JG (1991): Increased dermal expression of platelet-derived growth factor receptors in growth-activated skin wounds and psoriasis. *J Invest Dermatol* 96:983-6.
- 72.** Krueger JG, Bowcock A (2005): Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2:ii30-6.
- 73.** Krueger JG, Krane JF, Carter DM, Gottlieb AB (1990): Role of growth factors, cytokines, and their receptors in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 94:135S-140S.
- 74.** Kuenzli S, Saurat JH (2003): Effect of topical PPARbeta/delta and PPARgamma agonists on plaque psoriasis. A pilot study. *Dermatology* 206:252-6.
- 75.** Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE (2001): Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12:1893-905.
- 76.** Lambeth LS, Wise TG, Moore RJ, Muralitharan MS, Doran TJ (2006): Comparison of bovine RNA polymerase III promoters for short hairpin RNA expression. *Anim Genet* 37:369-72.
- 77.** Latruffe N, Cherkaoui Malki M, Nicolas-Frances V, Clemencet MC, Jannin B, Berlot JP (2000): Regulation of the peroxisomal beta-oxidation-dependent pathway by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and kinases. *Biochem Pharmacol* 60:1027-32.
- 78.** Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM (2006): PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3444-9.
- 79.** Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J (2000): Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 473:333-6.
- 80.** Letavernier E, Perez J, Joye E, Bellocq A, Fouqueray B, Haymann JP, Heudes D, Wahli W, Desvergne B, Baud L (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor

beta/delta exerts a strong protection from ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16:2395-402.

81.Lever AM, Strappe PM, Zhao J (2004): Lentiviral vectors. *J Biomed Sci* 11:439-49.

82.Liedtke C, Groger N, Manns MP, Trautwein C (2006): Interferon-alpha enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating caspase-8 transcription in human hepatoma cells. *J Hepatol* 44:342-9.

83.Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK (2006): Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1481-7.

84.Lois C, Refaeli Y, Qin XF, Van Parijs L (2001): Retroviruses as tools to study the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:496-504.

85.Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG (2007): Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-73.

86.Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, Novitskaya I, Carbonaro H, Cardinale I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Wittkowski KM, Papp K, Garovoy M, Dummer W, Steinman RM, Krueger JG (2005): Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19057-62.

87.Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi PA (2005): Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1740:313-7.

88.Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Gaudel C, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi PA (2004): Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome. *Biochimie* 86:833-7.

89.Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Celis JE (1992): Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol* 99:299-305.

90.Malhotra S, Bansal D, Shafiq N, Pandhi P, Kumar B (2005): Potential therapeutic role of peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists in psoriasis. *Expert Opin Pharmacother* 6:1455-61.

91. Mallon E (2000): Retroviruses and psoriasis. *Curr Opin Infect Dis* 13:103-107.
92. Maroteaux L, Chen L, Mitrani-Rosenbaum S, Howley PM, Revel M (1983): Cycloheximide induces expression of the human interferon beta 1 gene in mouse cells transformed by bovine papillomavirus-interferon beta 1 recombinants. *J Virol* 47:89-95.
93. Murrack P, Kappler J (2004): Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 22:765-87.
94. Murrack P, Kappler J, Mitchell T (1999): Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189:521-30.
95. Martinez J, Patkaniowska A, Elbashir SM, Harborth J, Hossbach M, Urlaub H, Meyer J, Weber K, Vandeburgh K, Manniga H, Scaringe SA, Luehrmann R, Tuschl T (2003): Analysis of mammalian gene function using small interfering RNAs. *Nucleic Acids Res Suppl*:333.
96. McBride MS, Schwartz MD, Panganiban AT (1997): Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of cis elements required for encapsidation. *J Virol* 71:4544-54.
97. McManus MT, Sharp PA (2002): Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3:737-47.
98. Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W (2002): PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol* 46:105-14.
99. Michalik L, Wahli W (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 10:564-70.
100. Michalik L, Wahli W (2007): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 1771:991-8.
101. Mitta B, Rimann M, Fussenegger M (2005): Detailed design and comparative analysis of protocols for optimized production of high-performance HIV-1-derived lentiviral particles. *Metab Eng* 7:426-36.
102. Mittal V (2004): Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* 5:355-65.
103. Miyagishi M, Taira K (2002): U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20:497-500.

- 104.** Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1997): Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10319-23.
- 105.** Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D (2006): Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 110:371-85.
- 106.** Naldini L (1998): Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* 9:457-63.
- 107.** Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-7.
- 108.** Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M (2005): Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202:135-43.
- 109.** Ni Y, Sun S, Oparaocha I, Humeau L, Davis B, Cohen R, Binder G, Chang YN, Slepushkin V, Dropulic B (2005): Generation of a packaging cell line for prolonged large-scale production of high-titer HIV-1-based lentiviral vector. *J Gene Med* 7:818-34.
- 110.** Nickoloff BJ, Wrone-Smith T (1999): Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol* 155:145-58.
- 111.** Ockenfels HM (2003): [Trigger factors for psoriasis]. *Hautarzt* 54:215-23.
- 112.** Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ (2002): Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1443-8.
- 113.** Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grander D (2003): Interferon-alpha-induced apoptosis in U266 cells is associated with activation of the proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax. *Oncogene* 22:4543-56.
- 114.** Parolin C, Dorfman T, Palu G, Gottlinger H, Sodroski J (1994): Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol* 68:3888-95.
- 115.** Pauls K, Schon M, Kubitzka RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schon MP (2001): Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes. *J Invest Dermatol* 117:569-75.
- 116.** Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi PA, Rochette L, Connat JL (2006): Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) activation

protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovasc Res* 69:440-9.

117. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ (2000): Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* 20:5119-28.

118. Pfeifer A, Kessler T, Yang M, Baranov E, Kootstra N, Cheresch DA, Hoffman RM, Verma IM (2001): Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* 3:319-22.

119. Pfeifer A, Verma IM (2001): Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177-211.

120. Piqueras L, Reynolds AR, Hovalala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, Tanabe T, Warner TD, Bishop-Bailey D (2007): Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:63-9.

121. Pokrovskaja K, Panaretakis T, Grander D (2005): Alternative signaling pathways regulating type I interferon-induced apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 25:799-810.

122. Prinz JC (2001): Psoriasis vulgaris--a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 26:326-32.

123. Prinz JC (2003): The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17:257-70.

124. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-30.

125. Romanowska M, al Yacoub N, Seidel H, Donandt S, Gerken H, Phillip S, Haritonova N, Artuc M, Schweiger S, Sterry W, Foerster J (2008): PPARdelta enhances keratinocyte proliferation in psoriasis and induces heparin-binding EGF-like growth factor. *J Invest Dermatol* 128:110-24.

126. Rosen ED, Spiegelman BM (2000): Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145-71.

127. Rossi D, Gaidano G (2003): Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 88:212-8.

- 128.** Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401-6.
- 129.** Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K (2007): Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 16:779-98.
- 130.** Sanders DA (2002): No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr Opin Biotechnol* 13:437-42.
- 131.** Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ, DiGiovanni J (2005): Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11:43-9.
- 132.** Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B (1994): T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102:145-9.
- 133.** Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, Holder JC, Dorsam S, Chang S, Lau P, Fowler AJ, Chuang G, Moser AH, Brown BE, Mao-Qiang M, Uchida Y, Schoonjans K, Auwerx J, Chambon P, Willson TM, Elias PM, Feingold KR (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:971-83.
- 134.** Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, Crombleholme T, Flake AW (2004): Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Methods* 122:131-9.
- 135.** Shureiqi I, Jiang W, Zuo X, Wu Y, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Morris JS, Fan HZ, Fischer SM, Lippman SM (2003): The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9968-73.
- 136.** Sinha D, Bannerjee S, Schwartz JH, Lieberthal W, Levine JS (2004): Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis. *J Biol Chem* 279:10962-72.

- 137.** Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA (2005): Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23:227-31.
- 138.** Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-9.
- 139.** Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y, Bata-Csorgo Z, Cooper KD (1998): Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4+ and CD8+ subsets. *J Invest Dermatol* 111:1072-8.
- 140.** Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2005): Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:99-105.
- 141.** Tan NS, Michalik L, Di-Poi N, Desvergne B, Wahli W (2004a): Critical roles of the nuclear receptor PPARbeta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta) in skin wound healing. *Biochem Soc Trans* 32:97-102.
- 142.** Tan NS, Michalik L, Di-Poi N, Ng CY, Mermoud N, Roberts AB, Desvergne B, Wahli W (2004b): Essential role of Smad3 in the inhibition of inflammation-induced PPARbeta/delta expression. *Embo J* 23:4211-21.
- 143.** Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, Fluhmann B, Desvergne B, Wahli W (2001): Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 15:3263-77.
- 144.** Tanabe Y, Nishibori T, Su L, Arduini RM, Baker DP, David M (2005): Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes. *J Immunol* 174:609-13.
- 145.** Taylor C, Burns DA, Wiselka MJ (2000): Extensive psoriasis induced by interferon alfa treatment for chronic hepatitis C. *Postgrad Med J* 76:365-7.
- 146.** Trono D (2000): HIV-based vectors: getting the best out of the worst. *J Gene Med* 2:61-3.
- 147.** Tuschl T (2003): Functional genomics: RNA sets the standard. *Nature* 421:220-1.
- 148.** van der Fits L, van der Wel LI, Laman JD, Prens EP, Verschuren MC (2003): Psoriatic lesional skin exhibits an aberrant expression pattern of interferon regulatory factor-2 (IRF-2). *J Pathol* 199:107-14.

- 149.** Wahli W, Braissant O, Desvergne B (1995): Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol* 2:261-6.
- 150.** Wang D, Wang H, Guo Y, Ning W, Katkuri S, Wahli W, Desvergne B, Dey SK, DuBois RN (2006): Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19069-74.
- 151.** Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003): Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-70.
- 152.** Weisenseel P, Laumbacher B, Besgen P, Ludolph-Hauser D, Herzinger T, Roecken M, Wank R, Prinz JC (2002): Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. *J Med Genet* 39:767-8.
- 153.** Westergaard M, Henningsen J, Johansen C, Rasmussen S, Svendsen ML, Jensen UB, Schroder HD, Staels B, Iversen L, Bolund L, Kragballe K, Kristiansen K (2003): Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor kappaB in normal and lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 121:1104-17.
- 154.** Westergaard M, Henningsen J, Svendsen ML, Johansen C, Jensen UB, Schroder HD, Kratchmarova I, Berge RK, Iversen L, Bolund L, Kragballe K, Kristiansen K (2001): Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J Invest Dermatol* 116:702-12.
- 155.** Wolfer LU, Goerdts S, Schroder K, Zouboulis CC, Orfanos CE (1996): [Interferon-alpha-induced psoriasis vulgaris]. *Hautarzt* 47:124-8.
- 156.** Wrone-Smith T, Nickoloff BJ (1996): Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 98:1878-87.
- 157.** Yang J, Friedman MS, Bian H, Crofford LJ, Roessler B, McDonagh KT (2002): Highly efficient genetic transduction of primary human synoviocytes with concentrated retroviral supernatant. *Arthritis Res* 4:215-9.
- 158.** Yang Q, Li Y (2007): Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis. *J Mol Med* 85:697-706.
- 159.** Yokota A, Hukazawa M, Nakaseko C, Ishii A, Ikegami T, Kogure K, Nishimura M, Matsuura Y, Morio S, Nakamura H, Oh H, Hiruma K, Asai T, Tanabe E (1996):

[Resolution of psoriasis vulgaris following allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia]. *Rinsho Ketsueki* 37:35-9.

160. Yuan J, Wang X, Zhang Y, Hu X, Deng X, Fei J, Li N (2006): shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. *Mol Biol Rep* 33:43-9.

161. Zandbergen F, Plutzky J (2007): PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1771:972-82.

162. Zhuang S, Dang Y, Schnellmann RG (2004): Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F365-72.

163. Ziouzenkova O, Plutzky J (2008): Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett* 582:32-8.

164. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998): Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-80.

165. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997): Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-5.

I.PUBLIKATIONEN

1. **Nadya al Yacoub**, Malgorzata Romanowska, Matthias Truss, Nathalie Haritonova, John Foerster: Optimized production and concentration In lentiviral vectors containing large inserts; The Journal of Gene Medicine, 2007; 9:579-584
2. **Nadya al Yacoub**, Malgorzata Romanowska, Sybille Kraus, Susann Schweiger, and John Foerster: PPARdelta is a type 1 interferon target gene and inhibits apoptosis in T cells; The Journal of investigative dermatology.(2008)
3. Romanowska M.*, **al Yacoub N.***, Seidel H., Donando S., Gerken H., Haritonova N., Artuc M., Schweiger S., Sterry W., Foerster J.: PPAR delta enhances keratinocyte proliferation in psoriasis and induces heparin-binding EGF-like growth factor; (2007); The Journal of investigative dermatology. Advanced online publication. *contributed equally.

II. DANKSAGUNGEN

Bei Herrn Dr. John Foerster möchte ich mich herzlich für die Überlassung dieses sehr spannenden Themas und für die Möglichkeit, meine Arbeit unter ausgezeichneter Betreuung durchführen zu können, bedanken. Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Petra Knaus für die Übernahme meiner Doktorarbeit als Erstgutachter und Frau Prof. Schweiger für die Übernahme des Ko-Referates.

Herrn Prof. Peter Walden danke ich sehr für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeiten in den Laborräumen seiner AG und für die herzlich Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Auch gilt mein aufrichtiger und herzlicher Dank allen Mitarbeitern der „AG Walden“ für die freundschaftliche und lustige Arbeitsatmosphäre. Zeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. Florian Losch für die anregenden und interessanten Diskussionen, die sofortige Hilfe, wann immer das FACS mal wieder streikte und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Herzlichen Dank an meine ehemaligen Laborkollegen Malgorzata Romanowska und Natalie Haritonova für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meiner lieben Freundin Dr. Salima Mrabet-Dahbi danke ich für ihre immer wieder aufbauenden Worte, wenn es mal wieder durch ein Tief ging und das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen geliebten Eltern, denen ich nicht genug mit Worten Danken kann, danke ich zutiefst für die bedingungslose und aufopfernde Unterstützung und ihre unermüdliche Geduld. Sie ermöglichten mir dadurch ein sorgenfreies Studieren und Arbeiten.

II. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre zudem, dass ich diese Dissertation weder vollständig, noch teilweise, einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt wurde, einen akademischen Grad zu erwerben.

Nadya Al-Yacoub