

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
und
Lehrstuhl für Biochemie
der Technischen Universität München

Smif ist ein negativer Regulator der T-Zell Aktivierung und Autoimmunität *in vivo*

Wibke Kathrin Leibig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Chr. F. W. Becker
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Groll
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 30.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 10.11.2009 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungen.....	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Transforming Growth Factor β Signalweg.....	1
1.1.1 Die Liganden der TGF β -Superfamilie.....	1
1.1.2 Die Familie der TGF β -Rezeptoren.....	3
1.1.3 Die Smad Transkriptionsfaktoren.....	4
1.1.4 Koaktivatoren und Korepressoren im TGF β -Signalweg.....	4
1.2 Smif.....	5
1.3 mRNA Decapping.....	7
1.4 Das Immunsystem.....	9
1.4.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems.....	9
1.4.2 Die Immunreaktion.....	14
1.4.3 Die Regulation von Leukozyten durch TGF β	14
1.4.4 Autoimmunerkrankungen und TGF β	16
1.5 Das knockout Mausmodell.....	17
1.5.1 Das Einschleusen von Fremd-DNA in das Mausgenom (<i>gene targeting</i>).....	17
1.5.2 Knockout Mausmodelle des TGF β -Signalweges.....	18
1.6 Aufgabenstellung.....	20
2 Materialien und Methoden.....	21
2.1 Materialien.....	21
2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen.....	21
2.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur.....	22
2.1.3 Enzyme.....	23
2.1.4 Hormone.....	23
2.1.5 Radioaktive Substanzen.....	24
2.1.6 Membranen.....	24
2.1.7 Antikörper.....	24
2.1.8 Zytokine.....	24
2.1.9 Zelllinien.....	25
2.1.10 Vektoren und DNA Konstrukte.....	25
2.1.11 Bakterienstämme.....	25
2.1.12 Oligonukleotide in 5'→3'.....	26
2.1.13 Molekulargewichtsmarker für Nukleinsäuren und Proteine.....	27
2.1.14 Mausstämme.....	28
2.1.15 Material und Molekularbiologische Kitsysteme.....	28
2.1.16 Geräte.....	28
2.1.17 Lösungen und Puffer.....	30
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	33
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien.....	40
2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	43
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	50
2.2.5 Biologische Untersuchungen.....	55
2.2.6 Grundlegende tierexperimentelle Techniken.....	59
2.2.7 Statistische Auswertung.....	62
3 Ergebnisse.....	63

3.1	Generierung eines Smif-defizienten Mausstammes.....	63
3.1.1	Die Rekombinationsstrategie	63
3.1.2	Von der ES-Zelle zur F1-Generation.....	63
3.1.3	Smif Expression in der F2 Generation.....	65
3.2	Charakterisierung Smif-defizienter Mäuse.....	72
3.2.1	Smif-defiziente Mäuse sind vital	72
3.2.2	Allgemein-pathologische Untersuchung Smif-defizienter Mäuse.....	73
3.2.3	Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine Glomerulonephritis.....	75
3.2.4	Der Nachweis von Autoantikörpern in Smif-defizienten Mäusen.....	77
3.2.5	Die basalen Immunglobulinlevel in Smif-defizienten Mäusen sind nicht verändert.....	78
3.2.6	Zytokinkonzentrationen in Smif-defizienten Mäusen	79
3.2.7	Das Expressionsmuster von Smif in der Maus.....	81
3.2.8	Die Verteilung von Leukozyten in Smif-defizienten Mäusen	84
3.2.9	Der Effekt von TGF β auf Leukozyten: funktionelle <i>in vitro</i> Assays	97
3.2.10	Untersuchungen der Immunantwort in Smif-defizienten Mäusen.....	101
3.2.11	Smif-defiziente Mäuse haben weniger B1-Zellen in der Peritonealhöhle.....	105
3.2.12	Untersuchungen der TGF β -Effekte in Smif-defizienten Fibroblasten	108
3.2.13	JunB wird in Smif-defizienten Milzzellen nicht durch TGF β reguliert	112
4	Diskussion.....	115
4.1	Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine autoimmunologische Erkrankung	115
4.2	Ursachen für die Entstehung des Autoimmunphänotyps in Smif-defizienten Mäusen	117
4.2.1	T-Zellen und nicht B-Zellen sind Auslöser der Autoimmunerkrankung	117
4.2.2	Die Differenzierung naiver T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen.....	120
4.2.3	Sekundäre Effekte in Smif-defizienten Mäusen	121
4.2.4	Smif hat keinen Einfluss auf die Reifung von dendritischen Zellen	122
4.2.5	Die Funktion myeloider Zellen ist in Smif-defizienten Mäusen nicht beeinflusst	123
4.3	Smif ist wichtig für die Immunantwort nach Antigenkontakt.....	124
4.4	Der BMP-Signalweg in Smif-defizienten Mäusen.....	125
4.5	Die Rolle von Smif für das cardiovaskuläre System	126
4.6	Die Ausprägung des Phänotyps ist vom genetischen Hintergrund abhängig	127
4.7	Das Fusionsprotein Smif ¹⁻⁷³ -GFP ist nicht funktionell	129
4.8	Die Rolle von Smif für die Decappingreaktion.....	130
4.9	Smif ist ein spezifischer Transkriptionsaktivator im TGF β -Signalweg	131
5	Zusammenfassung	135
6	Literaturverzeichnis	137
7	Danksagung.....	147
8	Publikationen	149

Abkürzungen

α	anti
A. d.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	AU-reiche Elemente
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLC	<i>B lymphocyte chemoattractant</i>
BMP	bone morphogenetic proteins
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU-preB	<i>pre B cell colony forming unit</i>
CFU-GM	<i>Granulocytic-monocytic colony forming unit</i>
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
cpm	Signal pro Minute (<i>counts per minute</i>)
c-Ski	<i>Sloan-Kettering virus nuclear oncoprotein</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6 Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritische Zellen
Dcp	<i>decapping enzyme</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISK-PAGE	diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDD	<i>electron dense deposits</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES	embryonale Stammzelle
et al.	et aliter
EVH1	<i>enabled vasodilator-stimulated protein homology</i>
F	Farad
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	reife folliculäre B-Zellen
FO	folliculäre B-Zellen
for	<i>forward</i>
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)

Abkürzungen

g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFP/eGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
he; +/-	heterozygot
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
I-Samd	inhibitorische Smad
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
ko; -/-	knockout
LB	Luria-Bertani
LC	Langerhans Zellen
LIF	<i>leucemic inhibitory factor</i>
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	Marker / Mol pro Liter, molar
m	milli (10 ⁻³)
mA	Milliampere
Mef	murine embryonale Fibroblasten
MH	<i>Mad homology</i>
MHCI/MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I / II
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
mM (mmol/l)	10 ⁻³ Mol/Liter
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MSG1	<i>melanocyte-specific gene-1</i>
MZB	Marginalzonen B-Zellen
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
neo ^r	Neomycin-Resistenzkassette
nFO	nicht-follikuläre B-Zellen
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
NK	natürliche Killerzellen
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol/l
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat

PMSF	Phenylmetansulfonylfluorid
PTC	<i>premature termination codons</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	<i>revers</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
R-Smad	Rezeptor-assoziierte Smad
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RTQ-PCR	<i>Real-Time</i> -quantitative-PCR
S4-BD	Smad4-Bindungsdomäne
SAD	<i>transcriptional activation domain</i>
<i>s. cerevisiae</i>	Bäckerhefe (<i>saccharomyces cerevisiae</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smif	<i>Smad4 interacting factor</i>
Smif ^{ko}	Smif-defiziente Mäuse
Smif ^{wt}	Smif-wildtyp Mäuse
SnoN	<i>Ski-related novel gene non-Alu containing</i>
Swift	<i>smad wing for transcriptional activation</i>
T1/T2	Übergangs-B-Zellen 1/2 (<i>transitional B cells</i>)
TβR	TGFβ-Rezeptor
TCR	T-Zell Rezeptor
TD	transaktivierende Domäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TGIF	<i>TG-interacting factor</i>
T _H	T-Helferzellen
Thy	Thymus
TK ^{HSV}	Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
WH1	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 1</i>
wt; +/+	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis (<i>weight/volume</i>)
μCu	10 ⁻⁶ Curie
μg	10 ⁻⁶ Gramm
μl	10 ⁻⁶ Liter
μM (μmol/l)	10 ⁻⁶ Mol/Liter
μmol	10 ⁻⁶ Mol

1 Einleitung

1.1 Der Transforming Growth Factor β Signalweg

Die Regulation und Koordination zellulärer Prozesse ist nur durch ein Zusammenspiel verschiedener Signalwege möglich. Ein Teil dieses komplexen Signalnetzwerkes ist der TGF β (*Transforming Growth Factor β*) Signalweg. Er spielt sowohl in der Embryogenese als auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle. Der geradlinige Weg dieses intrazellulären Signaltransduktionsprozesses führt über die Aktivierung eines Transmembranrezeptors der TGF β -Rezeptorfamilie durch Bindung eines dimeren Liganden zu einer Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Smads (R-Smad). Diese können im phosphorylierten Zustand das *common*-Smad (Smad4) binden und als heteromere Komplex in den Zellkern translozieren, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren. Nach Bindung von Kofaktoren wird die Genexpression TGF β -regulierter Gene gesteuert (Abb. 1.1).¹ Diese Einfachheit steht im Kontrast zu der Vielzahl an biologischen Antworten nach Aktivierung der Signalkaskade. Durch den TGF β -Signalweg werden Prozesse wie Zellwachstum und Homöostase, Differenzierung und Determinierung, Zellmotilität und Migration, Adhäsion und der programmierte Zelltod (Apoptose) reguliert. Verschiedene Parameter führen dennoch zu einer Komplexität, die eine zelltypspezifische und Kontext-abhängige Zellantwort ermöglichen. Dazu gehören die Natur der Zielzelle, das Vorhandensein anderer Signale (so genannter *crossstalk* mit anderen Signalwegen), Signalstärke, Dauer und Intensität.² Fehlregulationen im TGF β Signalweg sind mit maligner Transformation, Metastasierung, Fibrose, Gefäß- und Autoimmunerkrankungen assoziiert.^{3,4}

1.1.1 Die Liganden der TGF β -Superfamilie

Den Ausgangspunkt der Signalkaskade bilden die Mitglieder der TGF β -Superfamilie. Zu diesen zählen über 30 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in Vertebraten: die drei TGF β -Isoformen, die *bone morphogenetic proteins* (BMP), die Activine, die Inhibine, nodal, leftys, MIS

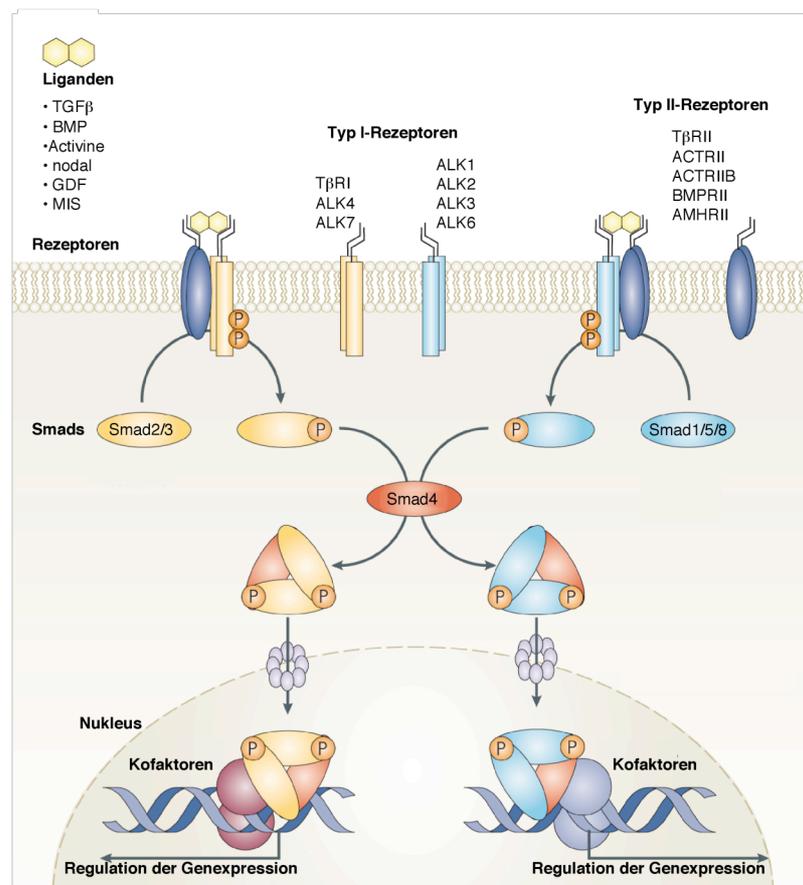


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des TGFβ-Signalweges: von der Membran in den Zellkern (modifiziert nach Schmierer and Hill, 2007).⁵ Der lineare Signalweg beginnt mit der Bindung des Liganden der TGFβ-Superfamilie an den Rezeptor Typ II. Die Zusammenlagerung mit einem Rezeptor des Typs I ergibt den stabilisierten Ligand-Rezeptor-Komplex. Durch Transphosphorylierung des Rezeptors Typ I wird dieser aktiviert und phosphoryliert wiederum die R-Smads, die in Komplex mit Smad4 in den Kern translozieren. Im Zellkern assoziiert der Smad-Komplex mit weiteren Kofaktoren, die sich in Transkriptionsfaktoren, Korepressoren und Koaktivatoren unterteilen. Dies führt zur Regulation der Transkription von TGFβ-regulierten Genen. ACTR: Activin Rezeptor; ALK: *activin receptor-like kinase*; BMP: *bone morphogenetic protein*, GDF: *growth and differentiation factors*, MIS: *Müllerian inhibiting substance*, TβR: TGFβ Rezeptor, TGFβ: *transforming growth factor beta*

(*Müllerian inhibiting substance*) und die GDF (*growth and differentiation factors*).^{1, 5-7} Sie werden ubiquitär exprimiert und nahezu jede Zelle im Organismus ist in der Lage, auf mindestens einen dieser Faktoren zu reagieren.

TGFβ wurde erstmals als ein von chemisch-transformierten Zellen produziertes Polypeptid beschrieben.^{8, 9}

Charakteristisch für die Mitglieder der TGFβ-Superfamilie ist die konservierte Cystein-Knoten-Struktur, welche durch intramolekulare Disulfidbrücken zwischen sechs Cysteinresten entsteht.¹⁰

Intermolekulare Disulfidbrücken über ein weiteres Cystein stabilisieren hetero- und homodimere

Strukturen der Liganden. Synthetisiert werden die Liganden als Pre-Propeptid. Dieses besteht aus einem Signalpeptid (15-25 AS), einer Prodomäne (50-375 AS) und der carboxyterminalen Domäne, dem eigentlichen Zytokin. Die N-terminale Pro-Region ist, neben der C-terminalen Cystein-Knoten-Struktur, essentiell für die Dimerisierung der Faktoren.^{7, 11, 12} Die Dimerisierung erfolgt intrazellulär noch vor der proteolytischen Abspaltung der Pro-Region.^{13, 14} Nach den Prozessierungsschritten werden die reifen Wachstumsfaktoren sekretiert.^{12, 15, 16} Die TGF β -Isoformen selbst wie auch GDF8 und 11 werden nicht als aktive Zytokine sekretiert, sondern in einer latenten Form, in der sie nicht-kovalent an ihr Propeptid gebunden sind.¹⁷ Das Propeptid von TGF β wird auch *latency associated peptide* (LAP) genannt und ist mit einem weiteren Protein, dem *latent TGF β -binding protein* (LTBP) über eine Disulfidbrücke verknüpft. LTBP spielt für die Sekretion, die Lagerung des biologisch inaktiven TGF β in der extrazellulären Matrix und die Aktivierung des Komplexes eine wichtige Rolle.¹⁸

1.1.2 Die Familie der TGF β -Rezeptoren

Transmembranrezeptoren sind ein wichtiger Bestandteil von Signalübertragungswegen, da sie externe Signale ins Zellinnere weiterleiten und so eine gezielte biochemische Antwort auslösen. Die Transmembranrezeptoren der TGF β -Superfamilie zählen zu den Serin/Threonin Kinasen. Sie werden in zwei Klassen unterteilt: Typ I und Typ II. Die sieben Typ I-Rezeptoren haben eine Größe von 55 kDa, während die fünf Typ II-Rezeptoren in etwa 70 kDa groß sind. Die Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären N-glykosylierten Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären C-terminalen Serin/Threonin-Kinasedomäne.¹⁹ Neben der Kinasedomäne zeichnen sich die Typ I-Rezeptoren intrazellulär durch eine juxtamembranäre Glycin/Serin-reiche Region, die GS-Domäne aus. Diese beinhaltet die charakteristische TTSGSGSG Sequenz, die nach Aktivierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes phosphoryliert wird.¹ Zudem findet man in der Kinasedomäne von Typ I-Rezeptoren den so genannten L45-loop, der die Substratspezifität bestimmt. Der aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex ist ein heteromerer Komplex.²⁰⁻²² Jedes Mitglied der TGF β -Superfamilie bindet eine charakteristische Kombination aus Typ I- und Typ II-Rezeptoren. Man unterscheidet zwei Arten der Ligandenbindung. Die erste Gruppe von Liganden bindet zunächst direkt an den Typ II-Rezeptor und rekrutiert dann Rezeptor Typ I. Dieser Mechanismus ist typisch für TGF β . Die BMP-Rezeptoren hingegen binden den Liganden kooperativ.¹ In beiden Fällen kommt es nach Ligandenbindung zu einer mehrfachen, unidirektionalen Transphosphorylierungsreaktion, in der der Typ II-Rezeptor den Typ I-Rezeptor in der GS-Domäne an Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Die Phosphorylierung in der GS-Box

aktiviert die Kinase des Typ I-Rezeptors.¹ Dieser kann durch Phosphorylierung von R-Smads das externe Signal an die intrazellulären Mediatoren weiterleiten.

1.1.3 Die Smad Transkriptionsfaktoren

Die Smad Transkriptionsfaktoren können in drei Klassen unterteilt werden: die Rezeptor-assoziierten Smads (Smad1, -2, -3, -5 und -8), Smad4 und die inhibitorischen Smads, Smad6 und -7 (I-Smad).

Die Smad Proteine zeichnen sich durch zwei konservierte *Mad homology* Domänen (MH) aus, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind.²³ Die N-terminale MH1 Domäne ist zwischen den R-Smads und Smad4 konserviert. Die N-terminale Sequenz der I-Smads zeigt nur eine geringe Homologie zur MH1 Domäne, während die MH2 Domäne zwischen allen Unterklassen hoch konserviert ist.

Die R-Smads sind die ersten intrazellulären Mediatoren im TGF β Signalweg. Abhängig von den Liganden und den dadurch aktivierten Rezeptoren werden die verschiedenen Smad-Proteine im C-terminalen SXS Motiv phosphoryliert. Dabei sind Smad2 und -3 im TGF β /Activin-Signalweg,²⁴ Smad1, -5 und -8 im BMP-Signalweg die Mediatoren.²⁵ Die MH2 Domäne ist, neben der Interaktion mit dem Rezeptor, auch für die Formierung von homo- und heteromeren Smad-Komplexen wie auch für das Pendeln zwischen Zytoplasma und Zellkern unabdingbar.¹⁹ Die phosphorylierten R-Smads können einen Komplex mit Smad4 bilden.²⁶ Dieser transloziert in den Zellkern, wo der heteromere Smad-Komplex als Transkriptionsfaktor fungiert. Die MH1 Domäne beinhaltet das sequenzspezifische DNA Bindungsmotiv, so dass die Smad Transkriptionsfaktoren direkt an die DNA (Smad-Bindungselement: CAGAC) binden können, jedoch nur mit geringer Affinität.²⁷ An der Steuerung TGF β -regulierter Gene sind weitere Kofaktoren beteiligt, die eine starke Bindung und eine hohe Spezifität für die regulatorischen Elemente der Zielgene vermitteln. Dabei ist die Prolin-reiche *transcriptional activation domain* (SAD) in der Linker-Region von Smad4 essentiell.²⁸

Das ein- bzw. ausschalten bestimmter Gene als Konsequenz eines TGF β -Signals, führt so zur biologischen Zellantwort.

1.1.4 Koaktivatoren und Korepressoren im TGF β -Signalweg

Koaktivatoren und Korepressoren bilden das Bindeglied zwischen den Transkriptionsfaktoren und den Komponenten der Transkriptionsmaschinerie.² Die Transkriptionsaktivität nach TGF β -Stimula-

tion wird unter anderem durch die allgemeinen Koaktivatoren CBP/p300 bestimmt.²⁹ CBP/p300 selbst besitzt keine Transkriptionsaktivität, sondern ist eine Histonacetyltransferase. Der Einbezug weiterer Faktoren bietet die Möglichkeit, eine größere Spezifität zu erreichen und unterschiedliche Signale im Zellkern zu verbinden. CBP/p300 kann mit vielen anderen Faktoren, die über verschiedene Signaltransduktionskaskaden reguliert werden, interagieren. So sind mindestens 65 Interaktionspartner von CBP/p300 aus der Interaktomik bekannt (z.B. Smad4 und JunB), die für B- und T-Zellen essentiell sind.³⁰ Weitaus spezifischere Koaktivatoren konnten identifiziert werden.²³ So vermittelt *melanocyte-specific gene-1* (MSG1) die Interaktion zwischen p300 und Smad4, dabei ist MSG1 nicht essentiell für die Transkriptionsaktivität des Smad/p300-Komplexes, die Transkriptionsaktivität wird aber durch die Bindung gesteigert. Weitere Beispiele für Smad-spezifische oder zumindest weniger generelle Koaktivatoren sind Swift (*smad wing for transcriptional activation*) und Smif (siehe auch Kapitel 1.2).²³

Es gibt viele Beispiele für Gene, die auf Transkriptionsebene durch den Smad-Transkriptionskomplex reprimiert werden. Dabei spielt die Bindung von Korepressoren eine entscheidende Rolle. Zu den Korepressoren zählen unter anderem *TG-interacting factor* (TGIF), *Sloan-Kettering virus nuclear oncoprotein* (c-Ski)/*Ski-related novel gene non-Alu containing* (SnoN).²³

Durch das Vorhandensein von Koaktivatoren und Korepressoren wird die TGF β -abhängige Transkriptionsaktivität bestimmt.

1.2 Smif

Smif (***Smad4 interacting factor***) wurde in einem *Yeast-Two-Hybrid Screen* als Interaktionspartner von Smad4 identifiziert und erstmals beschrieben.³¹ Smif Homologe konnten unter anderem in *S.cerevisiae*, in Drosophila, im Zebrafisch und in der Maus identifiziert werden. Smif ist ein ubiquitär exprimiertes 70 kDa großes Protein. Durch Deletionsmutanten konnten zwei funktionelle Domänen ermittelt werden: die N-terminale Smad4-Bindungsdomäne (S4-BD) und eine in der Mitte des Proteins liegende transkriptionsaktivierende Domäne (TD) (Abb. 1.2). Aus Sequenzvergleichsanalysen konnte eine EVH1/WH1 Domäne identifiziert werden.³² Diese Domäne kann mit der Prolin-reichen Smad4 Linker-Region interagieren und ist im Einklang mit den Beobachtungen aus Bindungsexperimenten mit verschiedenen Smif-Deletionsmutaten. Die Interaktion zwischen Smif und Smad4 ist sehr spezifisch, da Smif an kein anderes Mitglied der Smad-Familie binden kann.³¹ Nach Stimulation des TGF β -Signalweges transloziert Smif zusammen mit dem aktivierten Smad-Komplex in den Zellkern, wo Smif als Koaktivator für die Transkription TGF β -

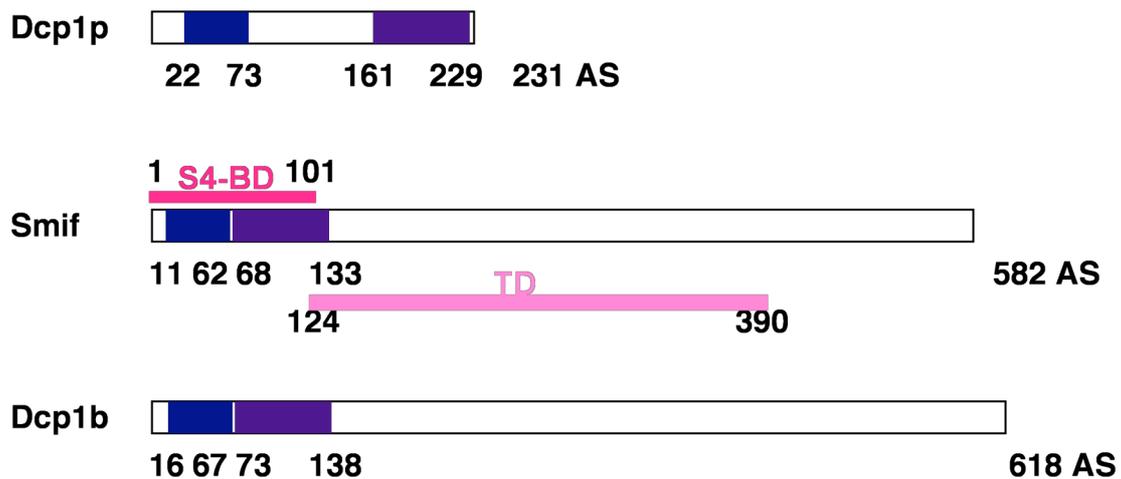


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des humanen Smif Proteins und dessen Homologe Dcp1b und Dcp1p (modifiziert nach Lykke-Andersen, 2002). Die in der schematischen Darstellung blau eingefärbten Bereiche sind zwischen dem Hefe Protein und dem humanen Dcp1 Proteinen konserviert. Die C-Termini der humanen Proteine zeigen keinerlei Homologien zu Dcp1p. Die funktionellen Domänen von Smif, TD und S4-BD, sind durch die rosa Linien oberhalb und unterhalb des schematisch dargestellten Smif gekennzeichnet. TD: transkriptionsaktivierende Domäne, S4-BD: Smad4-Bindungsdomäne

regulierter Gene fungiert. Dabei ist die Transkriptionsaktivität CBP/p300 abhängig, wobei Smif nicht direkt an CBP/p300 bindet.³¹

Smif ist in nahezu allen humanen Geweben und in Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien exprimiert. Im Einklang mit der Expression von Smif in der frühen Embryogenese zeigen Smif *knockdown* Experimente in Zebrafischembryonen (Morpholino Technik) eine defekte Embryonalentwicklung.³¹ Diese Defekte sind vergleichbar mit verschiedenen Mutationen, die den TGF β -Signalweg betreffen.³³

Smif wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander als Homolog zu dem in Hefe vorkommenden *decapping enzyme 1* (Dcp1p) beschrieben.³⁴⁻³⁶ In der Literatur ist Smif daher auch unter dem Synonym Dcp1a bekannt. Der N-Terminus von Smif beinhaltet zwei Regionen die zu 26% identisch mit dem N- und C-Terminus des 231 AS großen Hefe Dcp1p ist. Die C-terminale Region von Smif zeigt hingegen keinerlei Übereinstimmung zu dem Hefe Dcp1p (Abb. 1.2). Sequenzvergleichsanalysen identifizierten ein weiteres Protein (Dcp1b), dessen N-Terminus ebenfalls homolog zu dem Hefe Dcp1p und somit auch zu Smif ist (Abb. 1.2).^{34, 35}

Smif ist ein Phosphoprotein.³⁷⁻⁴⁴ In einer weitangelegten massenspektrometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass Smif nach EGF (*epidermal growth factor*) Stimulation phosphoryliert wird.⁴⁵

Eine Phosphorylierung von Smif wird auch nach zellulärem Stress und in der neuronalen Differenzierung beobachtet.⁴⁶ Die Funktion dieser Phosphorylierung(en) ist bis jetzt unbekannt.

1.3 mRNA Decapping

Die Expression von Genen in Eukaryonten wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Eine davon ist die Balance zwischen Degradation und Translation von mRNA. Die Stabilität von mRNA wird über die 5'-Cap-Struktur, bestehend aus einem 7-Methyl-GTP-Rest, und dem 3'-Poly(A)-Schwanz, eine Reihe von Adenosinresten am 3'-Ende von nahezu allen mRNAs, reguliert. Zum einen ist die 5'-Cap-Struktur wichtig für die Translation von mRNA, zum anderen verhindert sie den Abbau durch 5'→3' Exonucleasen.⁴⁷ Unter Decapping versteht man die irreversible Abspaltung der 5'-Cap-Struktur, die in Hefe mit einer Deadenylierungsreaktion des 3'-Poly(A)-Schwanzes einhergeht (Abb. 1.3a).⁴⁸ Dies bedeutet eine Hemmung der Translation und eine gleichzeitige Aktivierung der mRNA Degradation.^{49, 50} Decapping ist sowohl an der Umsetzung von mRNA (sog. mRNA turnover), als auch am Abbau von spezifischer mRNA durch 5'→3' Exonucleasen, beteiligt.

Der Decapping-Komplex in Hefen besteht aus den Proteinen Dcp1p und Dcp2p, wobei Dcp2p die katalytische Untereinheit bildet.⁵¹ Nach Deadenylierung der mRNA durch den Ccr4:Not Komplex wird der Dcp1:Dcp2 Komplex durch Bindung der Proteine Lsm 1-7 an die deadenylierte mRNA aktiviert. Nach Abspaltung der 5'-Cap-Struktur kann die mRNA durch die 5'→3' Exonuklease Xrn1 abgebaut werden (a, linker Teil). Alternativ kann die mRNA nach Deadenylierung in 3'→5' Richtung durch das Exosom abgebaut werden. Die 5'-Cap-Struktur wird dann nach vollständiger Degradation durch das Protein DcpS hydrolysiert (Abb. 1.3a, rechter Teil).⁵²

Die Genexpression und die Eliminierung von aberranter mRNA wird ebenfalls durch Decapping kontrolliert, einen Mechanismus, der die Qualitätssicherung der mRNA Biogenese gewährleistet.⁵³ Aberrante mRNAs werden unabhängig von einer Deadenylierungsreaktion durch Aktivierung des Dcp1:Dcp2 Komplexes im so genannten Nonsense-vermittelten oder ARE(AU-reiche Elemente)-vermittelten Decappingprozess, abgebaut (Abb. 1.3b+c). Im Nonsense-vermittelten Decappingprozess werden mRNAs abgebaut, die so genannte *premature termination codons* (PTC) enthalten (Abb. 1.3b).⁴⁸ Dabei aktivieren Ribosome, die an der PTC-Sequenz stoppen, Upf1, das wiederum unabhängig von einer Deadenylierungsreaktion den Dcp1:Dcp2 Decapping-Komplex aktiviert. ARE-Elemente hingegen sind in vielen instabilen mRNAs enthalten (Abb. 1.3c).⁵⁴ An diese AU-reichen Sequenzen können Proteine wie TTP binden und so den Decapping-Komplex Dcp1:Dcp2

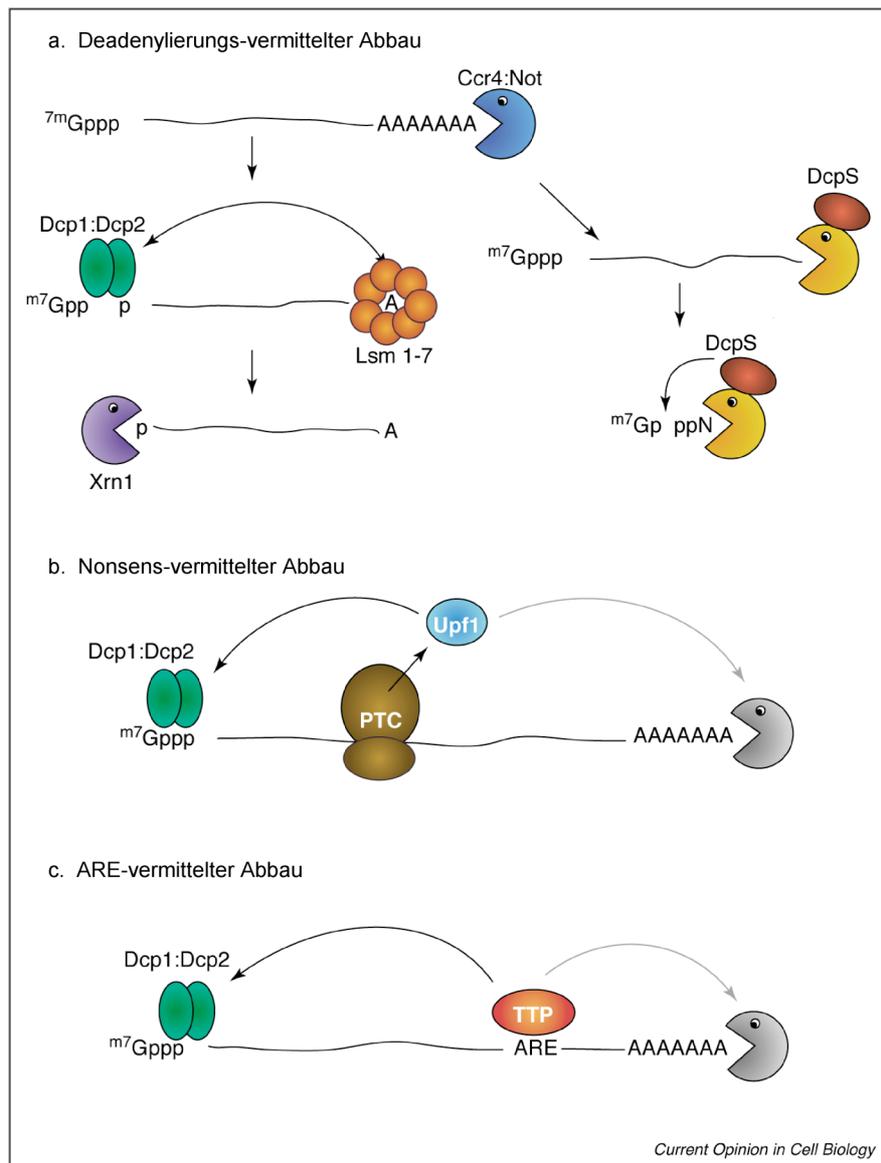


Abb. 1.3: Die Rolle von Decapping für den Abbau von mRNA (modifiziert nach Filimann und Lykke-Andersen, 2005).⁵³ Schematische Darstellung des Deadenylierungs-vermittelten (a), des Nonsens-vermittelten (b) und des ARE-vermittelten mRNA-Abbaus (c). (a) Der generelle mRNA-Abbau in *S.cerevisiae* geht über die Deadenylierung der mRNA und anschließendem Decapping. Die mRNA kann durch die 5'→3' Exonuklease Xrn1 abgebaut werden. Alternativ kann mRNA nach Deadenylierung in 3'→5' durch das Exosom abgebaut werden. Die dabei entstehende Cap-Struktur wird in einem letzten Schritt von dem *Scavenger Decapping Enzym* (DcpS) hydrolysiert. Das Symbol „Pacman“ wird für die Exonukleasen bzw. das Exosom verwendet. (b) Ribosome (dargestellt in braun), die an einer PTC stoppen, aktivieren Upf1, einen essentiellen Faktor im Nonsens-vermittelten mRNA-Abbau. Dieser Faktor kann unabhängig den Decapping Komplex Dcp1:Dcp2 aktivieren und die Deadenylierungsreaktion in Gang setzen. (c) In Säugetieren aktivieren an AU-reiche Sequenzen bindende Proteine wie TTP den Dcp1:Dcp2 Decapping-Komplex und andere Enzyme, die den Abbau von mRNA katalysieren. Der graue „Pacman“ steht für eine Deadenylase. ARE: AU-reiche Elemente; PTC: *premature termination codons*

wie auch Deadenylasen aktivieren. In beiden Fällen kommt es zum enzymatischen Abbau der jeweiligen mRNA. Homologe zu den in Hefe identifizierten Proteinen des Decapping-Komplexes Dcp1p und Dcp2p wurden in Säugetieren gefunden: Dcp1a (Smif), Dcp1b und Dcp2.³⁴ Der Abbau von mRNA in höheren Eukaryonten scheint jedoch komplexer zu sein, da eine Reihe weiterer Proteine benötigt werden. Diese am Decapping-Prozess beteiligten Proteine lagern sich in so genannten Processing-bodies (P-bodies) zusammen.⁵⁵ P-bodies sind cytoplasmatische Strukturen, in denen der mRNA Abbau stattfindet.

1.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem bietet Organismen ein wirkungsvolles Abwehrsystem gegenüber Pathogenen. Es umfasst ein flexibles und komplexes Zusammenspiel zwischen den lymphatischen Organen, spezialisierten Zellen und Signalmolekülen. Für den Organismus nützliche Bakterien oder körpereigene Zellen müssen als solche erkannt werden, um eine Immunantwort auf diese zu unterbinden. Funktioniert diese Unterscheidung nicht, kommt es zu so genannten Autoimmunerkrankungen, deren Ursachen sehr vielfältig sind.

Vertebraten haben eine Vielzahl von Abwehrstrategien entwickelt, um sich selbst zu schützen. Schon früh in der Phylogenese hat sich die unspezifische oder angeborene Immunabwehr entwickelt. Zu diesen Abwehrreaktionen zählen die anatomischen und physiologischen Barrieren, die zellvermittelte Phagozytose von Krankheitserregern, entzündliche Reaktionen und die biochemische Kaskade des Komplementsystems, bei der Serumproteine veränderte, beschädigte Zellen und Bakterien opsonisieren. Die erworbene oder adaptive Immunität ist eine Ergänzung zur angeborenen Immunität. Sie zeichnet sich durch eine spezifische Antigen-Antigenrezeptor vermittelte Immunantwort aus. Es kann ein immunologisches Gedächtnis entstehen, das eine langanhaltende schützende Wirkung ermöglicht.

An der Regulation und Koordination des Immunsystems sind auf molekularer Ebene viele verschiedene Faktoren beteiligt. Das Zytokin TGF β mit seiner ausgeprägten immunsuppressiven Wirkung ist ein zentraler Bestandteil dieser Regulationsmaschinerie.

1.4.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems entstehen aus pluripotenten, hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark (Abb. 1.4). Die pluripotente Stammzelle kann in eine myeloide oder lymphatische

Progenitorzelle differenzieren. Aus dieser entwickelt sich die myeloide bzw. lymphatische Linie. Zu den myeloiden Zellen zählen die Phagozyten, die sich in Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und dendritische Zellen unterteilen, die Erythrozyten und die Thrombozyten. B- und T-Zellen gehören hingegen zu den Lymphozyten. Diese reifen in den primären lymphatischen Organen Thymus und Knochenmark: T-Zellen differenzieren im Thymus, wohingegen sich B-Zellen im Knochenmark (englisch: *bone marrow*) entwickeln. Reife T- und B-Zellen wandern in die sekundären (peripheren) lymphatischen Organe Milz, Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe aus.

1.4.1.1 T-Zellen

T-Zellen reifen im Thymus und durchlaufen dabei drei Hauptstadien, die charakterisiert sind durch die Expression von CD4 und CD8. Zunächst sind die T-Vorläuferzellen doppelt-negativ (DN), werden dann doppelt-positiv (DP) für die beiden Oberflächenmarker. Die naiven T-Zellen kennzeichnen sich durch die Expression von entweder CD4 (T-Helfer-Zellen) oder CD8 (zytotoxische T-Zellen) (einfach-positiv, SP). Die DP-Thymozyten durchlaufen einen Positiv- und Negativselektionsprozess, den nur 5-10% als naive T-Zellen verlassen. Die so entstandenen T-Zellen exprimieren einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR), der nicht gegen Autoantigene gerichtet ist (klonale Deletion). In der Peripherie gibt es einen weiteren Selektionsmechanismus, der als periphere Toleranz bezeichnet wird. In T-Zellen, die Autoantigene in der Peripherie mit ihrem TCR binden können, wird Apoptose induziert, da die zur Aktivierung wichtigen akzessorischen Signale fehlen.

Naive CD4⁺ T-Zellen (T_{H0}) können nach Antigenstimulation in Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinmilieu in T_{H1}-, T_{H2}- oder T_{H17}-Zellen differenzieren (Abb. 1.5). Dabei produzieren sie typische Zytokine: T_{H1} Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IFN γ und IL-2, T_{H2} durch IL-4 und IL-10 Produktion und T_{H17} durch Sekretion von IL-17 aus.

T_{H1}-Zellen induzieren eine ausgeprägte Entzündungsreaktion (inflammatorische T-Zell Antwort) und ermöglichen das Abtöten von intrazellulären Erregern, wohingegen T_{H2}-Zellen die B-Zell Differenzierung in Plasmazellen induzieren.^{56, 57} Die Differenzierung in T_{H1} oder T_{H2} ist für die erfolgreiche Bekämpfung von Erregern von großer Bedeutung. Verdeutlicht wird dies durch Untersuchungen in Mäusen nach Leishmanien-Infektion: eine ausgeprägte T_{H1}-Reaktion sichert das Überleben der Versuchstiere, wohingegen eine Aktivierung von überwiegend T_{H2}-Zellen zu einem tödlichen Verlauf der Infektionskrankheit führt.⁵⁸

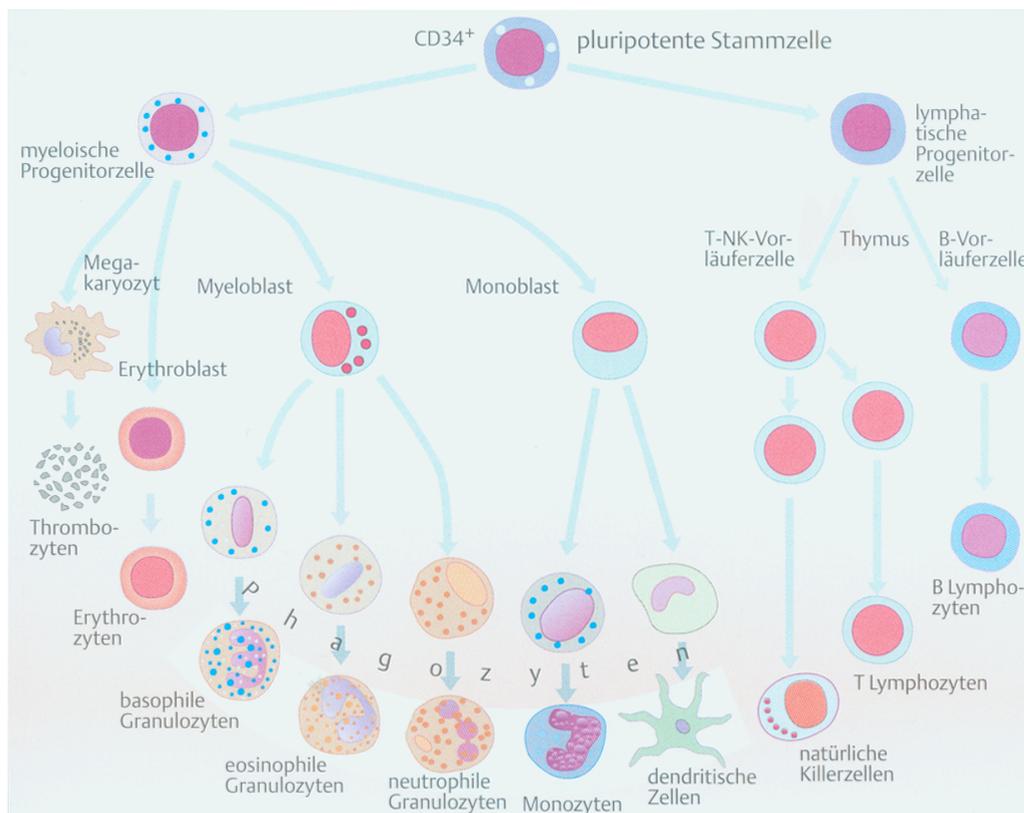


Abb. 1.4: Die Bildung von Blutzellen aus pluripotenten Stammzellen (nach Pezzutto, Ulrichs und Burmester, Taschenatlas der Immunologie).⁵⁹ Schematische Darstellung der Hämatoese (aus dem griechischen *haimatos* = Blut; *poiesis* = Herstellung). Alle Blutzellen stammen von einer pluripotenten, hämatopoetischen Progenitorzelle des Knochenmarks ab. Diese Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und differenzieren zunächst in die noch wenig spezialisierten myeloischen oder lymphatischen Vorläuferzellen. Diese Progenitorzellen können sich nur bedingt teilen und reifen zu verschiedenen Zellen des Blutes. Zu diesen gehören Thrombozyten, Erythrozyten und die Zellen des Immunsystems.

Eine weitere Gruppe von $CD4^+$ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert sind.⁶⁰ Man unterscheidet natürliche von induzierten T_{reg} . Die Aufgabe dieser Subpopulation ist es, eine Immunantwort zu supprimieren und autoaggressive Immunantworten zu unterbinden. Sie sekretieren die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β .

Zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$) erkennen Antigene, die von Körperzellen über MHC-Klasse I Moleküle (MHCI) präsentiert werden, im Gegensatz zu T-Helfer-Zellen, die über MHC-Klasse II (MHCII) präsentierte Antigene erkennen. Nach Antigenkontakt sekretieren die zytotoxischen T-Zellen unter anderem Granzyme und Perforin, zytotoxische Substanzen, die das Apoptoseprogramm in den infizierten Zellen auslösen.

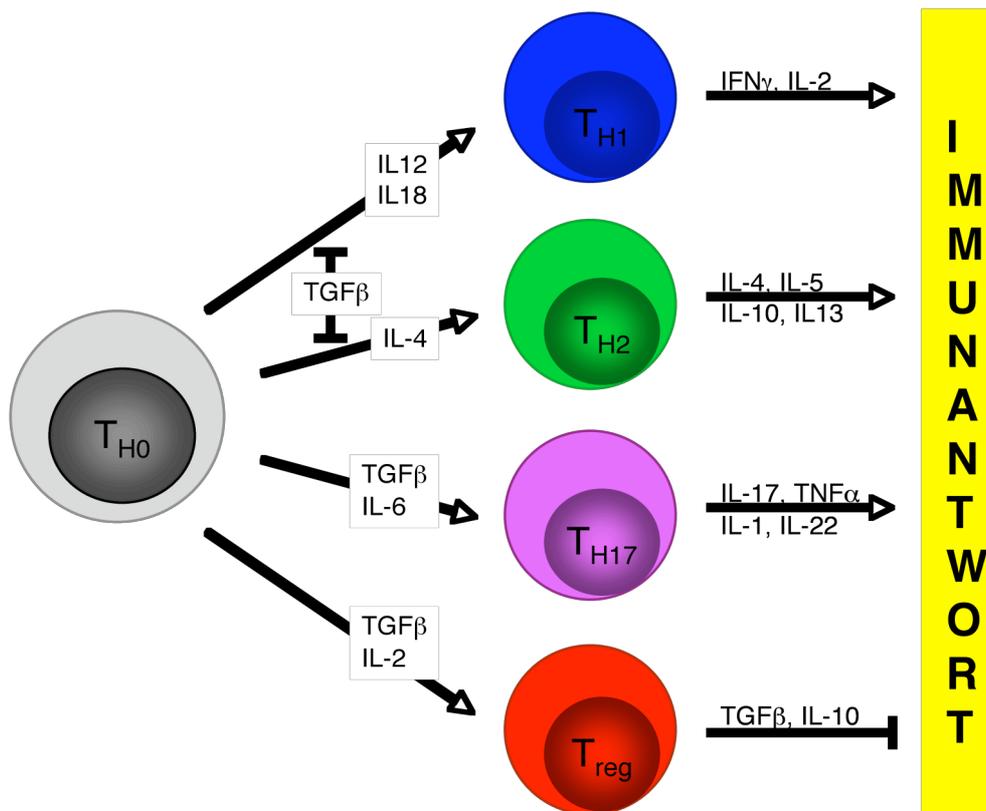


Abb. 1.5: Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen. Das pluripotente Zytokin TGF β erzielt seinen immun-suppressiven Effekt durch die Inhibition der $CD4^+$ T_{H1} / T_{H2} Effektorzellen. Zudem wird die Differenzierung in regulatorische T-Zellen (T_{reg}) über den Transkriptionsfaktor FoxP3 induziert, die ein wichtiger Bestandteil in der Unterdrückung und Beendigung einer Immunantwort spielen. Im Gegensatz zu der inhibitorischen Funktion, fördert TGF β in Kombination mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 die Immunantwort durch Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_{H17} -Zellen.

Zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses können T-Zellen in T-Gedächtniszellen differenzieren, die bei Zweitkontakt eine schnelle und effektive Immunantwort ermöglichen.

Neben den oben beschriebenen konventionellen T-Zellen gibt es noch NKT Zellen und γ/δ T-Zellen, die ein Brückenglied zwischen angeborener und spezifischer Immunität sind.

1.4.1.2 B-Zellen

B-Progenitorzellen differenzieren über verschiedene, definierte Zwischenstufen zu reifen B-Zellen. Zur Vermeidung von B-Zellen, die Autoantigene binden können, durchlaufen sie, analog den T-Zellen, eine klonale Deletion. Nach Antigenkontakt der rezirkulierenden B-Zellen kommt es zur primären B-Zellantwort: sie differenzieren in IgM-produzierende Plasmazellen. Nach Immunglobulin-Klassenwechsel (*class switch*) sekretieren die aktivierten B-Zellen Antikörper anderer Ig-

Klassen. Antikörper bilden, neben anderen Plasmaproteinen, die humorale Immunität (*humor* = Flüssigkeit).

Gedächtnis-B-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des immunologischen Gedächtnisses. Nach Aktivierung der langlebigen Zellen mit dem selben Antigen kommt es zu einer schnellen Antikörperproduktion.

B1-Zellen, eine separate B-Zell-Population, kolonisieren den Pleura- und Peritonealraum. Sie trennen sich bereits in der frühen Ontogenese von der B-Zell-Linie. Charakteristika der B1-Zellen sind die Expression von CD5, die Langlebigkeit, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und das Sezernieren niedrigaffiner polyreaktiver Autoantikörper.⁶¹

1.4.1.3 Natürliche Killerzellen (NK)

NK-Zellen sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen fremde Pathogene, da diese nicht, wie körpereigene Zellen, MHC I auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zellen, die ein „Fehlendes Selbst“ (*missing self*) haben werden sofort zerstört. Eine vorherige Aktivierung der NK-Zellen oder eine Immunisierung ist nicht nötig.

1.4.1.4 Phagozyten

Zu den Phagozyten (vom griechischen Wort *'phagein'* = Essen) zählen die neutrophilen Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen (DC). Neutrophile Granulozyten eliminieren Krankheitserreger durch Phagozytose. Monozyten wandern ins Gewebe ein und differenzieren dort rasch zu Makrophagen. Gewebsständige Makrophagen können, wie die Neutrophilen, eingedrungene Erreger phagozytieren. Aktivierte Monozyten und Makrophagen sezernieren die inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α . Diese Zytokine fördern die Freisetzung opsonisierender Proteine, verursachen Fieber, mobilisieren neutrophile Granulozyten und erhöhen die Gefäßpermeabilität.

Dendritische Zellen sind morphologisch durch ihre langen zytoplasmatischen Ausstülpungen gekennzeichnet. DC haben eine hohe Motilität. Sie können T_{H0}-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren und so eine Differenzierung der naiven T-Zelle in T_{H1} oder T_{H2} induzieren.

1.4.1.5 Antigen-präsentierende Zellen (APC)

Die wichtigsten Zelltypen Antigen-präsentierender Zellen sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Wie der Name schon sagt, können sie Antigene über MHC II Moleküle binden und an ihrer Oberfläche präsentieren. Durch die Präsentation dieser exogenen Antigene können naive

T-Zellen, die den passenden TCR exprimieren, aktiviert werden. APC unterscheiden sich in der Lokalisation, in der Antigenaufnahme, in der Expression von Oberflächenmolekülen (beispielsweise der Menge an MHCII und anderen Kostimulatoren) und der Art von Antigenen, die sie präsentieren können.

Zu den professionellen APC zählen die dendritischen Zellen. Unreife DC sind auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen spezialisiert. Nach Aktivierung durch die Aufnahme von Antigenen in nicht-lymphoiden Geweben, wandern die DC in die T-Zell-reichen Areale der sekundären lymphoiden Organe. Dabei durchlaufen sie einen Reifungsprozess, der sich durch eine phänotypische und funktionelle Änderung äußert.

1.4.2 Die Immunreaktion

Eine Immunantwort auf Pathogene ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunität. Eine Vielzahl an endogenen und exogenen Faktoren ist an der Modulation einer Immunreaktion beteiligt. Betrachtet man die Mannigfaltigkeit der Pathogene, so wird deutlich, wie variabel die Abwehrstrategien eines Organismus sein müssen. Die Immunantwort lässt sich grob in fünf Schritte unterteilen: die Infektion, die Erkennungsphase, die Differenzierungsphase, die Wirkphase und die Abschaltphase. Eindringende Krankheitserreger (Infektion) werden bei Erstkontakt zunächst durch Zellen des unspezifischen Immunsystems erkannt, phagozytiert und prozessiert (Erkennungsphase). Die Antigene werden dann an der Oberfläche über MHCII von den APC präsentiert. T-Zellen, als Teil der adaptiven Immunabwehr, werden durch die spezifische Antigen-Antigenrezeptor-Erkennung der präsentierten Epitope aktiviert. Es kommt zur klonalen Expansion der aktivierten T-Helfer-Zellen, die je nach vorherrschendem Zytokinmilieu in die verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen differenzieren. B-Zellen werden aktiviert und differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen (Differenzierungsphase). Die Antikörper binden an das Epitop, gegen das sie gerichtet sind und können so eine Vernichtung der „markierten“ Zellen durch NKT oder NK-Zellen oder das Komplementsystem hervorrufen (Wirkphase).

1.4.3 Die Regulation von Leukozyten durch TGF β

Alle Leukozyten können TGF β produzieren und auf ein TGF β -Signal reagieren. Dabei kann TGF β sowohl einen stimulatorischen als auch einen inhibitorischen Effekt ausüben. Eine detaillierte Beschreibung der regulatorischen Funktionen von TGF β für das Immunsystem bieten die

Übersichtsartikel '*regulation of immune responses by TGFβ*' und '*Transforming Growth Factor-β Regulation of Immune Responses*'.^{62, 63} Die wichtigsten zellulären Antworten der verschiedenen Immunzellen sind in Abb. 1.6 zusammengefasst.

1.4.3.1 T-Zellen

Der TGFβ-Signalweg hat drei wichtige Aufgaben in der Regulation von T-Zellen: Inhibition der Proliferation, Induktion von T-Zell Differenzierung und Förderung des Überlebens der T-Zellen während der Expansions- und Differenzierungsphase.⁶⁴

Die Inhibition der T-Zell Proliferation ist ein wichtiger Regulationsmechanismus für die Homöostase und zur Vermeidung lymphoproliferativer Erkrankungen.

Naive CD4⁺ T-Zellen können nach Aktivierung, abhängig von den vorherrschenden, polarisierenden Bedingungen, in verschiedene T-Helfer-Zellen differenzieren.⁶⁵ In der Regel inhibiert ein TGFβ-Signal die Differenzierung naiver T-Zellen in T_{H1}- oder T_{H2}-Zellen und induziert die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3. FoxP3 ist essentiell für die Differenzierung in regulatorische T-Zellen und somit für die Repression der Immunantwort. TGFβ kann außerdem in Kombination mit weiteren Zytokinen, wie beispielsweise IL-23, IL-21 und IL-6, eine Differenzierung in T_{H17}-Zellen induzieren.⁶⁶

TGFβ blockiert den *activation-induced cell death* (AICD) in T-Zellen. Dies ist wichtig für die Generierung langlebiger Gedächtnis-T-Zellen.

1.4.3.2 B-Zellen

Die biologischen Antworten von B-Zellen auf ein TGFβ-Signal sind abhängig von dem Differenzierungsstatus der B-Zelle selbst und dem vorhandenen Zytokinmilieu. In der Regel inhibiert TGFβ die Proliferation von B-Zellen und blockiert die B-Zell-Aktivierung. Der Immunglobulin-Klassenwechsel wird durch ein TGFβ-Signal inhibiert. Eine Ausnahme bilden die Isotypen IgA und IgG2b. Hier wirkt TGFβ stimulatorisch.^{67, 68}

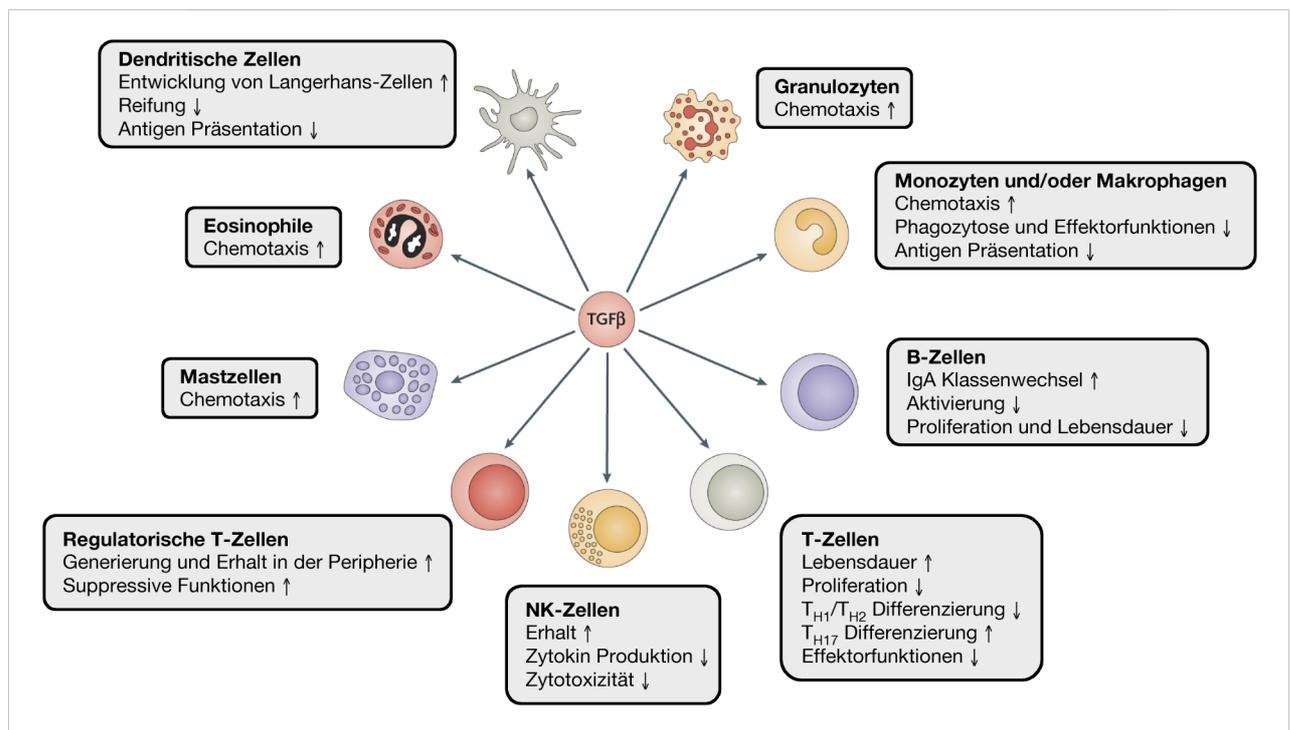


Abb. 1.6: Stimulatorische und inhibitorische Effekte von TGFβ auf Zellen des Immunsystems (modifiziert nach Rubtsov und Rudensky, 2007).⁶⁹ Darstellung der biologischen Zellantworten von Leukozyten nach TGFβ Stimulation. Die Symbole (↑ ↓) zeigen stimulatorische bzw. inhibitorische Effekte von TGFβ auf die jeweiligen zellulären Prozesse an. NK: natürliche Killerzellen, T_H: T-Helferzellen

1.4.3.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen, die T-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren. TGFβ inhibiert die Aktivierung und Reifung von DC *in vitro*. Die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 wird unterdrückt und somit die Antigen-präsentierende Kapazität vermindert.⁷⁰ Im Gegensatz dazu ist TGFβ essentiell für die Generierung von Langerhans-Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.⁷⁰ Langerhans-Zellen (LC) sind eine hoch spezialisierte Subpopulation von dendritischen Zellen in der Epidermis.⁶³

1.4.4 Autoimmunerkrankungen und TGFβ

Der Oberbegriff Autoimmunerkrankung steht für eine Reihe von Krankheiten, bei denen das Immunsystem körpereigene Zellen nicht mehr als solche erkennt. Es kommt zum Verlust der immunologischen Toleranz, die zu einer systemischen oder Organ-spezifischen Erkrankung führt.

Dabei wird eine spezifische adaptive Immunantwort gegen körpereigene Zellen bzw. Autoantigene gerichtet und so das von dem Mikrobiologen Paul Ehrlich beschriebene Prinzip *horror autotoxicus* (Furcht vor Selbstzerstörung) außer Kraft gesetzt. Ursachen von Autoimmunopathien liegen zum einen in einer genetischen Disposition, aber auch Umweltfaktoren können Auslöser sein. Frauen erkranken im Vergleich zu Männern häufiger.

Zu den Autoimmunerkrankungen zählen unter anderem systemischer Lupus erythematoses (SLE), Glomerulonephritis, Multiple Sklerose, Diabetes-mellitus-TypI und rheumatoide Arthritis.

Der SLE zeichnet sich durch eine Hyperreaktivität von B-Zellen sowie einer Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen aus. Dies führt zu inflammatorischen Infiltraten in den verschiedenen Organen. Ein Mausmodell für SLE ist unter anderem die TGF β 1 knockout Maus (TGF β 1^{-/-}), die sich neben inflammatorischen Infiltraten durch Autoantikörper und der Einlagerung von Immunkomplexen in die Glomeruli auszeichnet.⁷¹⁻⁷⁴ Diese Beobachtung unterstreicht die supprimierende Funktion von TGF β für das Immunsystem. Zudem vermindert die systemische Gabe von TGF β in Autoimmun-Mausmodellen für experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) und für die Collagen-induzierte Arthritis (CIA) die Symptome der Erkrankung in der Maus, wohingegen eine Verabreichung von TGF β -Antikörpern das Gegenteil bewirkt.⁶²

1.5 Das knockout Mausmodell

Durch das gezielte Ausschalten von Genen in der Maus lassen sich biologische Prozesse untersuchen und menschliche Erkrankungen simulieren. Den Grundstein zur Entwicklung von knockout Mausmodellen legten die Forscher Mario Capecchi, Oliver Smithies und Martin Evans, die für ihre bahnbrechenden Experimente auf dem Gebiet der homologen Rekombination und der Kultivierung pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES) im Jahr 2007 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurden.⁷⁵⁻⁷⁷

1.5.1 Das Einschleusen von Fremd-DNA in das Mausgenom (*gene targeting*)

Der Einbau homologer Fremd-DNA in das Genom von embryonalen Stammzellen ist durch den Vorgang der homologen Rekombination möglich. Die zu integrierende Mutation oder der zu integrierende Genabschnitt wird von einer langen und einer kurzen Sequenz (*long* und *short arm*) flankiert, die der Sequenz des Zielgens entspricht. An diesen Stellen kann homologe Rekombination stattfinden. Dies geschieht in Säugetierzellen nur sehr selten. Zusätzliche für Selektionsmarker

kodierende DNA-Abschnitte werden in das Mausgenom integriert, um die Selektion von ES-Zellen, die die Fremd-DNA korrekt integriert haben, zu erleichtern (Abb. 1.7). Zur positiven Selektion verwendet man häufig eine Neomycin-Kassette, die den Zellen eine Neomycinresistenz verleiht. Selektion mit dem Antibiotikum G418, einem Neomycin-Analogon, lässt nur ES-Zellen wachsen, die diesen Genabschnitt in ihr Genom integriert haben, sei es durch homologe oder nicht-homologe Rekombination. Zur negativen Selektion von Zellen, die die Fremd-DNA nicht-homolog in ihr Genom integriert haben, verwendet man zusätzlich die Gensequenz für die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus (TK^{HSV}).⁷⁸ Diese Sequenz geht im Falle der homologen Rekombination verloren. Das Vorhandensein der TK^{HSV} macht die Zellen sensitiv gegenüber der antiviralen Substanz Ganciclovir.

Die aus homologer Rekombination entstandenen pluripotenten ES-Zellen werden in eine Blastozyste implantiert. Die Blastozysten werden in scheinchwangere Leihmütter eingesetzt und ausgetragen. Haben sich die implantierten Zellen in den Zellverband der Blastozyste integriert, entstehen hieraus chimäre Mäuse. Diese Mosaikmäuse tragen teilweise Zellen mit dem veränderten Erbgut. Da die ES-Zelllinie aus weißen Mäusen stammt, die in Blastozysten implantiert werden, die wiederum aus schwarzen Mäusen isoliert wurden, erkennt man chimäre Mäuse an ihrem gefleckten Fell. Wichtig ist aber nur die Integration der erbgutveränderten Zellen in der Keimbahn. Durch Verpaarung der Chimären kann ein reiner Knockout-Mausstamm gezüchtet werden. In der ersten Generation sind heterozygote Mäuse an der braunen Fellfarbe leicht zu erkennen. Durch Kreuzung heterozygoter Tiere können homozygote Nachkommen entstehen, bei denen das Zielgen „ausgeknocht“ ist.

1.5.2 Knockout Mausmodelle des TGF β -Signalweges

Zum besseren Verständnis der Funktionsweise und der biologischen Funktionen des TGF β Signalweges wurden verschiedene Mausstämme generiert, die die Untersuchung dieses Signalweges in Säugetieren möglich machen. Die essentielle Bedeutung eines intakten TGF β Signalweges während der Embryogenese wird deutlich, da das nicht Vorhandensein zentraler Komponenten zur Letalität führt. Beispiele sind die T β RI bzw. T β RII knockout Mäuse.^{79, 80} Auch das Fehlen der Smad Proteine führt im Falle von Smad1, Smad2 und Smad4 zu einem letalen Phänotyp.⁸¹⁻⁸⁷ Smad3-defiziente Mäuse hingegen sind vital, allerdings haben diese knockout Mäuse eine verkürzte Lebensspanne. Ursache ist eine Störungen des Immunsystems.^{88, 89}

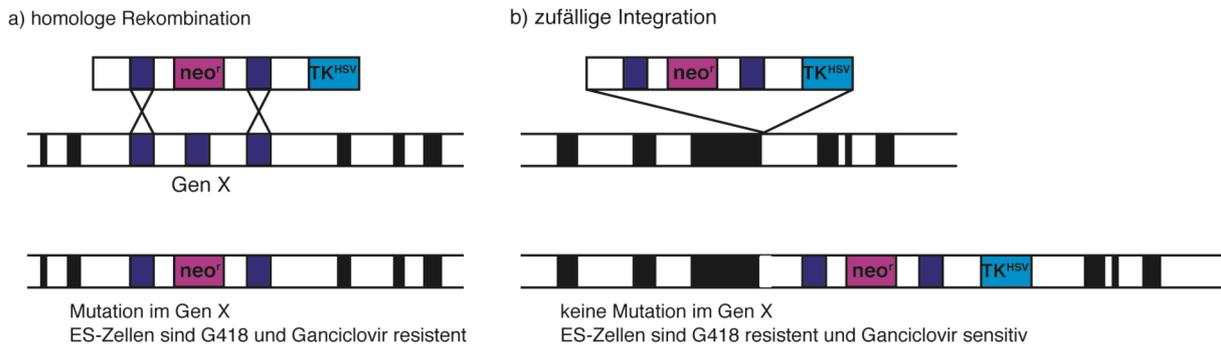


Abb. 1.7: Homologe Rekombination (modifiziert nach Mansour *et al.*, 1988).⁹⁰ Schematische Darstellung eines Rekombinationsvektors für das Gen X, der neben zum Gen X homologe Sequenzen eine neo^r - und TK^{HSV} -Kassette enthält. Durch diese Resistenz-vermittelnden Gene ist eine Anreicherung von ES-Zellen möglich, die die eingeführte Mutation im Gen X tragen. Dazu werden die Zellen mit den Antibiotika G418 und Ganciclovir selektiert. Durch homologe Rekombination wird das Gen X durch die Fremd-DNA ersetzt. Diese führt zu einem veränderten Genlocus X, in dem die Mutation sowie die neo^r -Resistenzkassette zu finden ist. Die TK^{HSV} -kodierende Sequenz geht verloren (a). Rekombinante ES-Zellen sind in diesem Fall G418 und Ganciclovir resistent. Viel häufiger kommt es zu einer zufälligen Integration der Fremd-DNA in das Genom (b). Diese Zellen sind resistent gegenüber G418 aber sensitiv gegenüber Ganciclovir. neo^r : Neomycin-Resistenz Gen; TK^{HSV} : Thymidin Kinase des Herpes-Simplex-Virus

Das TGF β 1 knockout Mausmodell verdeutlicht zudem die bedeutende Funktion des TGF β Signalweges für hämatopoetische Zellen und somit für ein intaktes Immunsystem.^{71, 72, 91} 50% der TGF β 1-defizienten Mäuse sterben während der Embryogenese. Die Überlebenden entwickeln eine spontane SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung, die gekennzeichnet ist durch autoreaktive T-Zellen und der Produktion von Autoantikörpern. Nach 3-4 Wochen sterben die TGF β 1^{-/-} Mäuse an den Folgen der Erkrankung. Eine Zusammenfassung der konventionalen knockout Mausmodelle der TGF β -Superfamilie, Rezeptoren, Signalproteine, Bindungspartner und Regulatoren findet sich in dem Übersichtsartikel von Chang *et al.*⁷ Aufgrund der Letalität verschiedener knockout Mäuse wurden zur Untersuchung der Bedeutung und Funktion der TGF β Signalkaskade für Zellen des Immunsystems verschiedene konditionale knockout Mausmodelle generiert. Die Inaktivierung des TGF β Signalweges spezifisch in T-Zellen beispielsweise ist mit einer T-Zell Aktivierung und als Konsequenz mit inflammatorischen Infiltraten in verschiedenen Organen assoziiert.⁹²⁻⁹⁴ Das Ausschalten der TGF β Signaltransduktion in B-Zellen hingegen manifestiert sich in einer Hyperaktivität der B-Zellen.⁹⁵

1.6 Aufgabenstellung

Zu den durch den TGF β -Signalweg regulierten zellulären Prozessen zählen Zellwachstum und Homöostase, Differenzierung und Determinierung, Zellmotilität, Adhäsion und Apoptose. Fehlregulationen sind mit maligner Transformation, Metastasierung und Autoimmunprozessen assoziiert. Die vielfältigen biologischen Antworten verschiedener Zellen auf ein TGF β -Signal werden durch andere vorherrschende Signale, den Entwicklungsstand der Zelle und durch die Beteiligung spezifischer Faktoren bestimmt. Smif, als ein neu identifizierter Transkriptionskoaktivator, ist Teil dieser komplexen Signaltransduktionskaskade.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die biologische Funktion von Smif und seine Spezifität als Koaktivator in Säugetieren untersucht werden. Hierfür bietet das knockout Mausmodell eine elegante Möglichkeit, Smif-abhängige Prozesse zu untersuchen. Zudem lässt sich aus dem beobachteten Phänotyp von Smif-defizienten Mäusen die Funktion von Smif *in vivo* ableiten. In einem ersten Schritt sollte daher ein Smif-defizienter Mausstamm ausgehend von einem Rekombinationsvektor generiert werden. Nach erfolgreicher Zucht konnten diese konventionellen Smif^{ko} Mäuse für experimentelle Untersuchungen genutzt werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass andere Mausmodelle, die der Untersuchung des TGF β -Signalweges dienen, ein dereguliertes Immunsystem aufweisen und TGF β als pluripotentes Zytokin mit seinem ausgeprägten immunsuppressiven Effekt eine große Rolle spielt, sollte nach einer ersten allgemeinpathologischen Untersuchung das Immunsystem der Mäuse näher betrachtet werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf B- und T-Zellen gerichtet werden. Zur immunologischen Charakterisierung der Mäuse sollte die Untersuchung der Entwicklung und Differenzierung von Leukozyten und deren Aktivierungsstatus, funktionelle Analysen des TGF β -Effektes auf Leukozyten durch Messung der Proliferationsrate und der Differenzierungsfähigkeit gehören. Zusätzlich sollte die Immunantwort durch Immunisierung der Mäuse mit unterschiedlichen Antigenen analysiert werden. Nach Ausarbeitung der Hauptunterschiede zwischen Smif-wildtyp und Smif-defizienten Mäusen sollten die molekularen Ursachen auf Transkriptionsebene geklärt werden. Als Modellsystem sollten hierfür Maus-embryonale Fibroblasten (Mef) generiert werden. Die TGF β -abhängige Transkriptionsaktivität in Mef-Zelllinien sollte in Reporterassays gemessen werden, da die Regulation von Smif-abhängigen Zielgenen von besonderem Interesse war. Die gewonnenen Daten sollten ein komplexes Bild über die Funktionen von Smif und seine Spezifität als Transkriptionsaktivator im TGF β -Signalweg ergeben.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Aluminiumhydroxide Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bacto™ Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA, Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Penzberg
Coomassie Brilliant Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haën, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Taufkirchen
Formaldehyd, 37%-ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd, 2,5%	ElectronMicroscopyScience, Hatfield, USA
Glutathion-Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerol	Fluka, Taufkirchen
Glycerol-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Fluka, Taufkirchen
IC Fixation Buffer	eBioscience, San Diego, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Fluka, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Fluka, Taufkirchen
NP-15-Ova	Biosearch Technologies, Novato, USA
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience, San Diego, USA
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
PMSF	Roche, Penzberg
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Taufkirchen
TNP-AECM-Ficoll	Biosearch Technologies, Novato, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trockenmilchpulver	Fluka, Taufkirchen
Tween 20	Fluka, Taufkirchen
Xylolcyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

β -Mercaptoethanol, 50mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Brefeldin-A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM, Zellkulturmedium	PAA, Pasching, Österreich
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
FCS HyClone	Perbio Science, Bonn
G418 (Neomycin-Analogon)	Calbiochem, MerckAG, Darmstadt
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HANK's BSS	PAA, Pasching, Österreich
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin, 100-fach	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
LIF	bereitgestellt von Prof. Dr. I. Förster

Lipofectamin™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamin™ Reagent, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MethoCult®	StemCellTechnologies, Vancouver, Kanada
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Opti-Mem®	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
PBS, 10-fach, steril	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptavidin Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Phorbol 12-Myristat 13 Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Plus™ Reagent, Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
PMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 (high Glucose, Glutamin)	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblau, 0,4% Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	PAA, Pasching, Österreich

2.1.3 Enzyme

2.1.3.1 Restriktionsenzyme

EcoR1 (100U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
HindIII (10U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
NcoI (10U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
NotI (10U/μl)	Roche, Mannheim
SaII (10U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.3.2 DNA Polymerasen

High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.3.3 andere Enzyme

<i>CIAP</i> 20-30U/μl (Alkalische Phosphatase)	Invitrogen, Karlsruhe
Pronase E	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitroge, Karlsruhe
T4-DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4 Hormone

HCG (=Predalon)	Stocklösung 5U/200μl
PMSG (=Intergonan)	Stocklösung 5U/200μl

2.1.5 Radioaktive Substanzen

³² P- α -dCTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Methyl- ³ H-Thymidin	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.6 Membranen

Genescreen Plus [®] Transfermembran	Perkin Elmer, Boston, USA
Glass Fiber Filter	Packard Instruments, Meriden, USA
Mouse MTN [™] Blot	BD Biosciences, Heidelberg
PVDF Membran (Immobilon P)	Millipore, Schwalbach/Ts.
RayBio [®] Mouse Cytokine Antibody Array III	RayBiotech, Inc., Norcross, USA

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Antikörper für den immunchemischen Nachweis von Proteinen

Antikörper gegen SMIF (Dcp1a, Klon 3G4, Abnova, Heidelberg), GFP (Cell Science, Canton, USA), Myc-Tag (upstate, Schwalbach/Ts.), Smad4 Klon B8 (Santa Cruz Biotchnology, Santa Cruz, USA), Smad2 (Transduction Laboratories, Lexington, USA) und P-Smad2 (S456/467) (Chemicon, Schwalbach/Ts.) wurden zum immunhistochemischen Nachweis der Proteine verwendet. Als Sekundär-Antikörper wurden die HRP-gekoppelten Antikörper von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet.

2.1.7.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden über die Firma eBioscience (San Diego, USA) oder BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

2.1.7.3 Antikörper für Experimente mit B- und T-Zellen

Dynabeads[®] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gegen Ratte IgG, Maus CD8 (Lyt2), Maus pan-B (B220), Maus pan-T (Thy1.2) und anti-Maus CD11b (eBioscience, San Diego, USA) wurden zur Aufreinigung verwendet.

Zur Stimulation von B- und T-Zellen wurden die Antikörper gegen Syrian-Hamster IgG (H+L) (Dianova, Hamburg), Maus-CD3e (eBioscience, San Diego, USA) und Maus-IgM (Dianova, Hamburg) eingesetzt.

2.1.8 Zytokine

Die Zytokine TGF- β 1 (human, rekombinant), BMP-4 (human, rekombinant) wurden bei der Firma R&D (Wiesbaden-Nordenstadt) bestellt. GM-CSF wurde in Form von Zellkulturüberständen von der Arbeitsgruppe J. Ruland zur Verfügung gestellt.

2.1.9 Zelllinien

E14K:	murine embryonale Stammzelllinie
Feeder-Zellen:	murine embryonale Fibroblasten Tag E.14-15 von AG Förster
HeLa:	humane Zervixkarzinom-Zelllinie, DSMZ
NIH3T3:	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie, DSMZ
ΦNX-Eco: (PhoenixE)	retrovirale ecotrope Verpackungs-Zelllinie(Helfervirus-frei): 293T stabil transfiziert mit Moloney <i>GagPol-IRES-Lyt2</i> Konstrukt unter der transkriptionalen Kontrolle des RSV-Promoters und Moloney <i>ecotropic envelope</i> Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promoters von G. P. Nolan, Stanford, USA
primäre Mef:	diese Arbeit
Mef-Zelllinien:	diese Arbeit

2.1.10 Vektoren und DNA Konstrukte

2.1.10.1 Vektoren

MSCV MigR1	J. Miller/ W. Pear, Philadelphia,USA ⁹⁶
pcDNA 3.1/Zeo(-)	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV-Tag	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-4T-2	Amersham Biosciences, Freiburg
pRL-null Vector	Promega, Madison, USA

2.1.10.2 DNA Konstrukte

(SBE) ₄ luc	W. Kruijer
3TP-lux	J. Massague
BV	R. Benezra
BV1.5	R. Benezra
flag-SMIF in MSCV MigR1	diese Arbeit
flag-SMIF in pcDNA3.1	diese Arbeit
flag-SMIF ¹⁻⁷³ in pcDNA3.1	diese Arbeit
GST-SMIF in pGEX-4T-2	diese Arbeit
GST-SMIF ¹⁻⁷³ in pGEX-4T-2	diese Arbeit
HA-Smad4 in pCMV5	R. Bai
I4-TβRE	X.-F, Wang
myc-Dcp2 in pCMV	diese Arbeit; cDNA von Dr. Kiledjia
pGL2T	X.-F, Wang
Rekombinationsvektor	R. Bai

2.1.11 Bakterienstämme

<i>E. Coli</i> DH5α™	Invitrogen, Karlsruhe
Epicurian Coli™ XL-1Blue Supercompetent Cells	Stratagene, Heidelberg
OneShot®BL21 Star™ Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.12 Oligonukleotide in 5'→3'

2.1.12.1 zur Genotypisierung

w: AAT GCA CTG CAG ATT CTC ACC TAA C

b: TAG AAG GGA CGT TAT TTG TAT ACC G

n: GAT ATC AAG CTT GGC TGG ACG TAA

l1: GCT GAT TCC ACC GTA AAT AAG ACA AG

l2: GCA AAT TCT TAT CAG ACA CTA CAG ACC

2.1.12.2 Klonierung GST-SMIF

for: CCG GAA TTC GCA TGG CAC TTT CCT GTT CCA CA

rev: ACG CGT CGA CTC ATA GGT TGT GGT TGT CTT TGT T

2.1.12.3 Klonierung flag-SMIF in pcDNA3.1 Zeo(-)

for: GGA ATT CAT GGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA GGC ACT TTC CTG TTC CAC AGT

rev: CCC AAG CTT TCA TAG GTT GTG GTT GTC TTT GTT

2.1.12.4 Klonierung flag-SMIF in MSCV MigR1

for: GGA GAT CTA TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG AT

rev: GGA ATT CCG TCC CTT CTA TAT CAG TCT TC

2.1.12.5 Klonierung flag-SMIF1-73 in pcDNA3.1 Zeo(-)

for: GGA ATT CAT GGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA GGC ACT TTC CTG TTC CAC AGT

rev: CCC AAG CTT CGT CCC TTC TAT ATC AGT CTT C

2.1.12.6 Klonierung GST-SMIF1-73 in pGEX-4T-2

for: CCG GAA TTC GGA TGG CAC TTT CCT GTT CC CA

rev: ACG CGT CGA CCG TCC CTT CTA TAT CAG TCT TC

2.1.12.7 für RT-PCR

Smif

for: ATG GCA CTT TCC TGT TCC ACA

rev: TCA TAG GTT GTG GTT GTC TTT GTT

E1-E6

for: ATG GCA CTT TCC TGT TCC ACA

rev: ACT GGA GAT ATT TGA GCC GC

2.1.12.8 für RTQ-PCR**Smif 95-201**

for: GTC TGG CGG CCT TGA AAC AA

rev: CTT CTC CCA CTG GTT GGC TTT

Smif 195-338

for: ACC AGT GGG AGA AGA CTG ATA TA

rev: GTT CAT GGA GCT GAA ATT CCA AAT C

Smif 203-310

for: CTG ATA TAG AAG GGA CGT TAT TTG TAT A

rev: TAT TCA CTG GCT CAA CCA GAT TG

Smif 795-929

for: GCT GGG AGA TGC ATC ACA GAA A

rev: GTG CTG ACT TCA GGC TGA ACT

Smif 1570-1690

for: CCC AGT GTG TTC CAG CAA AC

rev: TGC TGA GGA TAA TGG AAG GCT TT

BLC

for: TCT CTC CAG GCC ACG GTA TTC T

rev: ACC ATT TGG CAC GAG GAT TCA C

Oligonukleotide für murine Zytokine und die Kontrollgene GAPDH und β -Aktin aus Giulietti *et al.*, 2001.⁹⁷

2.1.12.9 siRNA gegen murines SMIF

Die 21 Nukleotid-langen dsRNA Moleküle mit einzelsträngigen dTdT Überhängen an den 3'-Enden, wurden bei der Firma Proligo (Paris) synthetisiert. Die Zielsequenzen, die mit Hilfe der Internetseite www.BioPredsi.org bestimmt wurden, sind unten aufgeführt:

Kontroll-siRNA:	CGUACGCGGAAUACUUCGA
siRNA1:	CCAUGAUACAAGCAGUAAA
siRNA2:	GCAGGCUGCUCGAGAUAAA
siRNA3:	GGGAGAAGACUGAUUAGA

2.1.13 Molekulargewichtsmarker für Nukleinsäuren und Proteine

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.14 Mausstämme

C57bl/6
SMIF^{ko} Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln
diese Arbeit

2.1.15 Material und Molekularbiologische Kitsysteme

B Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
BD OptEIA™ ELISA Set	BD Bioscience, Heidelberg
BIOCHIP Mosaik Hep-2/Leber	EUROIMMUN Ag, Lübeck
Bio-Rad Proteinassay	Bio-Rad, München
CD4 ⁺ CD62L ⁺ T cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD49b (DX5) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
MaxiSorb 96-Lochplatten	Nunc GmbH&Co.KG, Langensfeld
Microvette® 300Z	Sarstedt, Nümbrecht
Mouse Immunglobulin Isotype Panel	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Mouse Regulatory T cell Staining Kit	eBioscience, San Diego, USA
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
Rediprime II Random Prime Labelling System	Amersham Biosciences, Freiburg
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
SBA Clonotyping™ System/AP	SouthernBiotech, Birmingham, USA
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Trizol® Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
URISCAN® Harnstreifenfest	YD Diagnostics, Yonging, Korea

2.1.16 Geräte

ABI PRISM® 7700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarosegel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Dispergierwerkzeug	IKA®-Werke, Staufen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
ELISA Reader sunrise	Tecan, Crailsheim
Entwickler Optimax	Protec, Oberstenfeld
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co., Hamburg
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg

Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-14	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Micro96 Harvester	Skatron Instruments, Norwegen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler Primus 96	Peqlab, Erlangen
pH-Meter Φ 32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, HeraSafe	Thermo Scientific, Karlsruhe
Scintillationscounter (LS65000)	Beckman, Fullerton, USA
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transfer Electrophoresis Unit	Hoefer, San Francisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultra-Turrax T8	IKA®-Werke, Staufen
Ultrazentrifuge, Rotor VTI 80	Beckman, Fullerton, USA
UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel

2.1.17 Lösungen und Puffer

Amidoschwarz-Färbelösung:	0,2% Naphtol Blau Schwarz 25% Isopropanol 10% Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25% Isopropanol 10% Essigsäure in A.d.
Coomassie-Färbelösung:	0,25% Coomassie-Blau 45% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung:	45% Methanol 10% Essigsäure
DEPC-H ₂ O:	0,1% DEPC in A.d. über Nacht gerührt, autoklaviert
DNA-Probenpuffer (6-fach):	30% Glycerin (v/v) 0,25% Bromphenolblau (w/v) 0,25% Xylolcyanol 50mM EDTA in A.d.
FACS-Puffer:	0,1% BSA in PBS
LB-Medium (fest):	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH7,0 eingestellt autoklaviert
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10ml A.d.

Lysis-Puffer P50:	10 mM Tris/HCl (pH7,5) 1 mM Kaliumacetat 1,5 mM Magnesiumacetat 2 mM DTT 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10ml A.d.
MOPS-Puffer	20 mM MOPS 50 mM Natriumcitrat 10 mM EDTA mit 1 M NaOH auf pH7,0 einstellen
NETN-Puffer:	0,5% (v/v) NP40 20mM Tris/HCl (pH8) 100mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10ml A.d.
RBC (<i>Red Blood Cell</i>)-Lysispuffer:	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH7,3 in A.d.
RNA-Probenpuffer (5-fach)	0,2% Bromphenolblau 4mM EDTA 7,2% Formaldehyd (37%) 20% Glycerol 3% Formamid 40% RNA-Laufpuffer in DEPC-H ₂ O
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH6,8) 0,4% SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	25mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH6,8) 200mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d.
SSC-Puffer (20-fach): (<i>Standard Saline Citrat</i>)	0,3 M Natriumcitrat/HCl (pH7,0) 3M NaCl
TAE-Puffer (10-fach):	0,4M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH8) in A.d.

TNE-Puffer:	10mM Tris (pH8) 100mM NaCl 1mM EDTA
Transferpuffer:	25mM Tris 192mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5M Tris (pH8,8) 0,4% SDS in A.d.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die eine sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA katalysieren.⁹⁸ Restriktionsendonukleasen erkennen kurze palindromische DNA-Sequenzen. Bei der Reaktion entstehen, abhängig vom verwendeten Enzym, komplementäre, überhängende (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Bei der Wahl der Puffer und Inkubationsbedingungen wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt.

2.2.1.2 5'-Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Bei der Linearisierung von Plasmiden mit nur einem Restriktionsenzym liegt die Vektor-DNA nach dem Verdau mit identischen Restriktionserkennungssequenzen an 5'- und 3'-Ende vor. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert ohne ein DNA-Fragment einzufügen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe mit alkalischer Phosphatase verhindert dies und verbessert so die Effizienz der Klonierung erheblich. Eine kovalente Verknüpfung ist dann nur mit dem Insert möglich, da es eine intakte 5'-Phosphatgruppe besitzt. Die Dephosphorylierungsreaktion kann direkt im Restriktionsansatz durchgeführt werden. Dazu werden 2-5 U der alkalischen Phosphatase *CIAP* zum Reaktionsansatz gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Phosphatase durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung

Nukleinsäure-Fragmente unterschiedlicher Länge können zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung aufgrund ihrer Mobilität in nativen Agarosegelen aufgetrennt werden. Da bei neutralem pH-Wert die Phosphatgruppen des DNA- bzw. RNA-Rückgrats deprotoniert vorliegen, besitzen Nukleinsäuren eine negative Gesamtladung. Diese ermöglicht eine Wanderung im elektrischen Feld zur Anode. Das Polysaccharid Agarose bildet nach Aufkochen in Pufferlösung eine Matrix aus,

durch die kleinere DNA-Fragmente leichter und schneller hindurch wandern können als große. Durch Variation der Agarosekonzentration wird eine optimale Auftrennung erzielt.

Zur Visualisierung der Nukleinsäure-Fragmente wird Ethidiumbromid, ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, eingesetzt, der mit UV-Licht angeregt werden kann. Zur Größenbestimmung werden geeignete Molekulargewichtsmarker verwendet.

2.2.1.3.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

TAE-Puffer: 0,4M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5MEDTA in A.d.

DNA-Probenpuffer (6-fach): 30% Glycerin (v/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v), 0,25% Xylolcyanol, 50 mM EDTA in A.d.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird eine entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf 60°C wird die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Die Auftrennung der mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Fragmente erfolgt in einer mit TAE-Puffer gefüllten DNA-Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 20-210 V. Die DNA kann mit Hilfe einer UV-Lampe visualisiert und fotografisch dokumentiert oder zur präparativen Isolierung ausgeschnitten (Kapitel 2.2.1.4) oder auf eine Membran transferiert werden (Southern Blot, Kapitel 2.2.1.13.1).

2.2.1.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

RNA-Probenpuffer (5-fach): 0,2% Bromphenolblau (m/V), 4mM EDTA, 7,2% Formaldehyd (37%) (V/V), 20% Glycerol (m/V), 3% Formamid (V/V), 40% RNA-Laufpuffer in DEPC H₂O

MOPS-Puffer: 20mM MOPS, 50mM Natriumcitrat, 10mM EDTA, pH7,0

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA wird unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Geräte werden daher über Nacht in 1 M Natriumhydroxidlösung eingelegt, um RNasen zu inaktivieren. Es werden nur RNase-freie Materialien und DEPC-Wasser verwendet, um einer Degradation der RNA vorzubeugen. Für die Herstellung des Agarosegels wird eine entsprechende Menge Agarose in RNA-Laufpuffer aufgekocht bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf 60°C wird die Lösung mit 2% (v/v) 37%-iger Formaldehydlösung und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Durch die Zugabe von Formaldehyd werden Sekundärstrukturen der RNA zerstört. Auftrennung der mit RNA-Probenpuffer versetzten und bei 65°C für 10 Minuten erhitzten RNA-Proben erfolgt in einer mit MOPS-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 15-80 V. Die RNA kann mit Hilfe einer UV-Lampe visualisiert und fotografisch dokumentiert oder zum Transfer auf eine Membran (Northern Blot, Kapitel 2.2.1.13.2) verwendet werden.

2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten werden diese nach elektrophoretischer Auftrennung (Kapitel 2.2.1.3) aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Visualisierung wird eine UV-Quelle mit geringer Bestrahlungsstärke verwendet und die Expositionszeit möglichst gering gehalten, um Veränderungen der DNA in Form von Strangbrüchen und Dimerbildungen zu vermeiden. Für die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wird das „QIAquick® Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei werden Verunreinigungen wie Agarosereste, Enzyme, Nukleotide und Salze entfernt. Die DNA wird bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle kann linearisierte Vektor-DNA mit dem Restriktionsfragment der Fremd-DNA kovalent verknüpft werden.⁹⁸ In Gegenwart von ATP und Mg^{2+} -Ionen ist das Enzym T4-DNA-Ligase in der Lage, eine Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden komplementärer *blunt* oder *sticky ends* zu bilden. Im Ligationsansatz sind 50-100 ng linearisierte Vektor-DNA und die 3-10-fache Menge des zu integrierenden DNA-Fragmentes. Die Ligation wird nach dem Protokoll des „Rapid DNA Ligation Kit“ durchgeführt. Die rekombinante DNA kann zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt (Kapitel 2.2.2.3) oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann photometrisch bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von aromatischen Aminosäuren und Phenolen bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist somit ein Maß für die Reinheit der Probe. Der Quotient aus spezifischem (E_{260}) zu unspezifischem Signal (E_{280}) sollte bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Extinktion beträgt eins ($E_{260}=1$) für doppelsträngige DNA der Konzentration $50\ \mu\text{g/ml}$ und einzelsträngige RNA der Konzentration $40\ \mu\text{g/ml}$.

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient der selektiven Amplifizierung von DNA-Sequenzen *in vitro* unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie zweier Oligonukleotide als *Primer*, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren und zu je einem kurzen Abschnitt der beiden DNA-Stränge komplementär sind.⁹⁹ Das Prinzip beruht auf

Trennung des Matrizenstrangs (*Template*) durch thermische Denaturierung bei 94°C (*Denaturing*) und nachfolgender Anlagerung der *Primer* an die Einzelstränge (*Annealing*). Unter Einsatz einer DNA-Polymerase werden im dritten Schritt die Primer durch Anlagerung von dNTPs bei einer Temperatur von 68 bzw. 72°C verlängert (*Elongation*). Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, wobei alle neu gebildeten DNA-Stränge als Matrizen in Folgezyklen dienen, so dass eine Sequenz im Idealfall nach n Runden 2ⁿ-fach amplifiziert wurde. Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgt eine längere Inkubation bei 72°C, um der Polymerase das Fertigstellen der zuletzt synthetisierten DNA-Stränge zu ermöglichen. Bei der Durchführung einer PCR ist eine sorgfältige Auswahl der *Annealing*-Temperatur für die Anlagerung der Primer erforderlich, da es bei zu hoher Temperatur zu keiner Hybridisierung, bei zu niedriger hingegen zu einer unspezifischen Bindung kommen kann. Die *Annealing*-Temperatur ist im Wesentlichen abhängig von der Länge und dem G/C-Gehalt des Oligonukleotids. Die *Pfu*-Polymerase besitzt neben der 5'→3' DNA-Polymeraseaktivität eine Korrekturlesefunktion (3'→5' Exonucleaseaktivität (*proofreading*)).¹⁰⁰ Somit arbeitet sie mit einer zwölfmal höheren Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase, da sie aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität am 3'-Ende falsch eingebaute Nukleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nukleotid einsetzt. Durchgeführt wird die PCR in einem Thermozykler, dessen automatische Steuerung ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm regelt.

2.2.1.8 Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

In der Reversen-Transkriptase-Reaktion lässt sich die Genexpression von spezifischen Genen nachweisen. Es erfolgt zunächst eine cDNA-Einzelstrangsynthese, bei der RNA als Matrize dient. Im Anschluss folgt eine PCR mit spezifischen *Primern*, die an die zuvor gebildete cDNA binden können, so dass nur die zu untersuchende cDNA Sequenz amplifiziert werden kann. Für die cDNA-Einzelstrangsynthese wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern das „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ benutzt. Die 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primer hybridisieren im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA, so dass sämtliche mRNA, unabhängig von der Sequenz, als Matrize dienen kann.

2.2.1.9 Semi-quantitative PCR

Bei der semi-quantitativen PCR wird nach Ablauf einer herkömmlichen PCR (Kapitel 2.2.1.7) eine Quantifizierung vorgenommen. Hierzu werden die amplifizierten DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter Einbezug einer Kontroll-PCR für das Kontrollgen β -Aktin anhand der Bandenintensität quantifiziert.

2.2.1.10 Quantitative *Real time* PCR (RTQ-PCR)

Die RTQ-PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR (Kapitel 2.2.1.7), ermöglicht aber zusätzlich eine Quantifizierung. Hierfür wird zu dem Reaktionsansatz ein DNA-Farbstoff (SYBR[®]Green) zugegeben. Nach Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes an doppelsträngige DNA, nimmt die Fluoreszenz zu und ist somit proportional zur Menge an PCR-Produkt. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Elongationsschrittes gemessen. Die RTQ-PCR wurde nach Herstellerangaben des „Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG“ durchgeführt und auf einem ABI Prism[®] analysiert. Zur Quantifizierung wurden die erhaltenen Daten auf das Kontrollgen GAPDH oder β -Aktin normiert.

2.2.1.11 Isolierung genomischer DNA

TNE-Puffer: 10mM Tris, pH8; 100mM NaCl; 1mM EDTA
Pronase E: 10mg/ml Pronase E in 10mM Tris und 10mM NaCl (Selbstverdau: 1h; 37°C)
Proteinase K: 10mg/ml in A.d.
Aufschlusspuffer: 1ml TNE-Puffer; 10 μ l Proteinase K; 25 μ l Pronase E; 100 μ l SDS 10%

Für die Extraktion genomischer DNA aus murinen ES-Zellen werden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 20-50 μ l PBS resuspendiert und der Suspension 500 μ l Aufschlusspuffer zugesetzt. Die Salzkonzentration und das Detergenz EDTA in Kombination mit den Proteinasen Pronase E und Proteinase K ermöglicht den Aufschluss der Zellen. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C schüttelnd (500Upm) inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lösung mit 500 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, stark gevortext und anschließend bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumina eiskaltem Ethanol (100%) gefällt. Die DNA wird zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Größe des Sedimentes in 50-500 μ l A.d. aufgenommen.

Die Gewinnung genomischer DNA aus murinem Gewebe und Mausschwanzspitzen erfolgt nach Angaben des Herstellers mit dem „DNeasy[®] Blood & Tissue Kit“.

2.2.1.12 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen und murinen Geweben erfolgt nach der Vorschrift des „RNeasy[®] Plus Mini Kit“. Zum Homogenisieren werden „QIAshredder“ oder ein Ultra-Turrax verwendet. Alternativ wird die RNA unter Verwendung des „TRIZOL[®] Reagent“ gewonnen. Diese RNA Isolierung basiert auf der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode.¹⁰¹ Die isolierte RNA kann bei -80°C gelagert werden.

2.2.1.13 Transfer von Nukleinsäure auf eine Nylon-Membran

2.2.1.13.1 Southern Blot

20xSSC: 0,3M Natriumcitrat/HCl (pH7,0), 3M NaCl
0,4N NaOH, 0,25N HCl

Der Transfer (Blotten) von DNA-Fragmenten auf eine Nylon-Membran erfolgt nach der von Edwin Southern entwickelten Methode.¹⁰² 10 µg genomische DNA werden mit 50 Einheiten EcoRI über Nacht verdaut. Das so entstandene DNA-Gemisch wird in einem 1%-igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. DNA-Fragmente können nur mit einer DNA-Sonde hybridisieren, wenn diese als Einzelstrang vorliegen. Hierzu wird das Gel zur Depurinierung der DNA für 30 min mit 0,25N HCl auf einem Schüttler inkubiert und anschließend zur Denaturierung 20 min mit 0,4N NaOH schüttelnd inkubiert. Die positiv geladene Nylonmembran wird zunächst kurz in A.d. getaucht und dann 15 min in 0,4N NaOH equilibriert. Über eine mit 0,4 N NaOH gefüllten Schale wird eine Glasplatte gelegt, so dass ein Cellulosefilterkarton (*Whatman-Paper*) so positioniert werden kann, dass beide Enden in das NaOH-Reservoir eintauchen. Das Gel wird auf den Cellulosefilterkarton gelegt und mit der auf Gelgröße zugeschnittenen, equilibrierten Membran luftblasenfrei abgedeckt. Luftblasen im Versuchsaufbau würden den Flüssigkeitsstrom unterbrechen, so dass an diesen Stellen die DNA nicht übertragen werden kann. Ein Stapel saugfähiger Papierhandtücher und ein 1-2kg schweres Gewicht zum Beschweren werden darüber gelegt. Der Transfer erfolgt durch Kapillarkräfte für 4-16 Stunden. Nach dem Transfer wird die Membran in zweifachem SSC-Puffer gewaschen. Dreiminütiges Bestrahlen mit UV-Licht bewirkt eine kovalente Bindung zwischen DNA und Membran.

2.2.1.13.2 Northern Blot

20xSSC: 0,3M Natriumcitrat/HCl (pH7,0), 3M NaCl

Der Northern Blot ist, analog zum Southern Blot, eine Methode zur Übertragung von RNA auf eine Nylon-Membran. Nach elektrophoretischer Auftrennung von 10 µg isolierter RNA wird diese auf eine Nylon-Membran durch Kapillarkräfte transferiert. Im Unterschied zum Southern Blot kann das RNA-Gel gleich in 20xSSC überführt werden. Nach Equilibrierung der Nylon-Membran in 20xSSC Puffer, wird die in Abschnitt 2.2.1.13.1 beschriebene Apparatur aufgebaut. Anstelle der 0,4N NaOH wird 20xSSC verwendet. Die RNA wird nach Transfer durch UV-Bestrahlung kovalent mit der Membran verknüpft.

2.2.1.14 Hybridisierung der Membran mit einer [α - 32 P]-dCTP markierten DNA Sonde

ExpressHyb™ Hybridisierungslösung

Waschlösung 1: SSC-Puffer (1-fach); 0,1% SDS

Waschlösung 2: SSC-Puffer (0,1-fach); 0,1% SDS

Zur Herstellung einer DNA-Sonde wird ein geeignetes DNA-Fragment durch Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.1), Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) und anschließender Extraktion (Kapitel 2.2.1.4) vorbereitet. Die Markierung der DNA-Sonde mit [α - 32 P]-dCTP erfolgt nach dem Protokoll des „Rediprime II Random Prime Labelling System“.

Die Hybridisierung der Membran erfolgt nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der ExpressHyb™ Hybridisierungslösung. Nach Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde wird die Membran in Folie eingeschweißt und die Banden durch Exposition auf einem „*Phospho-Imager-Screen*“ detektiert.

2.2.1.15 Entfernen einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Zur Entfernung einer gebundenen Sonde wird die Membran 10 min mit auf 90°C erhitzter 0,5%-iger SDS-Lösung geschüttelt. Nach einer Abkühlphase von 10 Minuten wird die Membran entnommen und bei RT getrocknet. Anschließend kann sie erneut hybridisiert (Kapitel 2.2.1.14) oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH7,0

LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

Ampicillin/Kanamycin: 50mg/ml / 10mg/ml

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgt bei 37°C und 250 Upm in LB-Medium über Nacht oder bei 37°C auf LB-Agarplatten. Der Zusatz von Antibiotika verhindert das Wachstum von unerwünschten Bakterien. Es können nur Zellen wachsen, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid enthalten.

2.2.2.2 Lagerung von *E.coli* Stämmen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienklonen wird ein Teil der Übernachtskultur mit sterilem Glycerol (Endkonzentration 30%) versetzt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Durch eine kurzzeitige Hitzebehandlung kann Ziel-DNA in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust werden. 50 µl chemisch kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA (Retransformation) oder 5 µl Ligationsansatz (Kapitel 2.2.1.5) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgt der Hitzeschock bei 37°C (*DH5α*; *BL21*) bzw. 42°C (*XLI-Blue*) für 45 Sekunden. Durch die schlagartige Erwärmung werden die Plasmide, die sich zuvor an die Zellwand angelagert haben, in die Zelle aufgenommen. Nach dem Hitzeschock werden die Bakterien für zwei weitere Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird der komplette Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten werden anschließend bei 37°C für 12-16 h inkubiert. Bei längerer Inkubation besteht die Möglichkeit der Bildung von Satellitenkolonien.

2.2.2.4 Isolierung von Plasmid DNA (Mini und Maxi Präparation)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Kulturen erfolgt je nach gewünschter DNA-Menge entweder mit dem „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (<20 µg) oder dem „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ nach Herstellerangaben. Das Reinigungsprinzip basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, Neutralisation und anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschsäule. Durch Waschen werden RNA, Proteine und niedermolekulare Verbindungen

entfernt. Die Plasmid-DNA wird unter Hochsalzbedingungen eluiert und anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Nach Waschen mit 70%-igem Ethanol ist die Plasmid-DNA entsalzt und wird in Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -20°C .

2.2.2.5 Induktion und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Induktion: LB-Amp-Medium; NETN-Puffer; 1mM IPTG
Aufreinigung: 10mg/ml Lysozym; Glutathion-Sepharose

Zur Herstellung rekombinanter Fusionsproteine wird das Glutathion S-Transferase Genfusions-system verwendet. GST ist ein 26 kDa großes Enzym, das die Reduktion der Disulfidbrücken im oxidierten Glutathion zu jeweils freien SH-Gruppen katalysiert. Die Besonderheit von GST ist die sehr hohe Affinität zu seinem Substrat. Zunächst wird die cDNA des zu exprimierenden Proteins in den pGEX Vektor kloniert. Die Expression des Fusionsgens erfolgt nach Induktion des Promoters mit dem Lactose Analog IPTG. Das rekombinante GST-Fusionsprotein akkumuliert im Zytoplasma der Bakterien. Durch Aufschluss der Bakterien und anschließender Affinitätschromatographie kann es einfach und schnell aufgereinigt werden. Dabei ist Glutathion an einer Sepharose-Matrix immobilisiert, an das das Fusionsprotein über den N-terminalen GST Teil binden kann. Alle anderen Proteine, die in dem Bakterienlysat vorhanden sind, werden durch Waschen beseitigt.

Die Expression des entsprechenden Fusionsproteins erfolgt in *BL21*. Dazu werden diese zunächst mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert (Kapitel 2.2.2.3). Ein Klon wird in einer 5-ml Übernachtkultur in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Zur Proteinexpression wird diese Vorkultur in 200 ml LB-Amp-Medium überführt. Wenn die Bakterien ihre logarithmische Wachstumsphase erreicht haben ($\text{OD}_{600} \sim 0,4-0,6$) wird die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG für zwei Stunden induziert. Die Bakterien werden im Anschluss bei 4000 Upm und 4°C für 10 min sedimentiert und in 2 ml NETN-Puffer pro 50 ml Bakterienkultur resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird für mindestens 15 min bei -80°C gelagert, um die Zellen durch einen Aggregationswechsel aufzubrechen. Nach Auftauen der Bakterien auf Eis, wird zu diesen $100 \mu\text{g/ml}$ Lysozym gegeben. Das Enzym spaltet glykosidische Bindungen in den Zuckerketten des Peptidoglukangerüsts der Bakterienzellwand und bewirkt so ihren Abbau. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgt eine Ultraschallbehandlung (10 Impulse bei 50%), die sehr effizient Zellen aufschließt. Zudem wird die DNA unter diesen Bedingungen fragmentiert. Im folgenden Zentrifugationsschritt (4°C , 14000 Upm; 20 min) wird die unlösliche Proteinfraction (Pellett) von der löslichen (Überstand) getrennt. Der Überstand, der das GST-Fusionsprotein beinhaltet, wird mit $30 \mu\text{l}$ Glutathion-Sepharose *Beads* versetzt. Nach halbstündiger Inkubation auf dem Rollrad bei 4°C kann an die Sepharose gebundenes Protein durch Zentrifugation sedimentiert werden. Durch

dreimaliges waschen des Pellets mit NETN-Puffer werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die *Beads* werden anschließend in 100µl NETN-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der Qualität und Quantität der Aufreinigung wird ein Aliquot der Probe in einem SDS-Gel (Kapitel 2.2.4.5) aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung visualisiert (Kapitel 2.2.4.6).

2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Brutschrank kultiviert.

2.2.3.1.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung
einfache Trypsin-EDTA-Lösung, PBS

Adhärenente Zelllinien werden in DMEM-Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz werden die Zellen mittels einer 1%-igen Trypsin/EDTA-Lösung durch enzymatischen Abbau von Matrixproteinen vom Boden gelöst. Dazu wäscht man zunächst die Zellen mit PBS und gibt anschließend die Trypsin/EDTA Lösung hinzu, so dass der Boden bedeckt ist. Nach Inkubation von 1-5 min bei 37°C lösen sich die Zellen ab. Die Inkubationszeit sollte nicht überschritten werden, da es sonst zu einem Anverderau der Zellmembran kommen kann. Die gelösten Zellen werden mit Medium abgespült und 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Das im Medium enthaltenen FCS inaktiviert das Trypsin, so dass die Zellen keinen Schaden nehmen. Danach werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche überführt. NIH3T3-Zellen, immortalisierte Mef-Zelllinien und HeLa-Zellen werden auf diese Weise alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Da PhoenixE-Zellen sehr empfindlich auf eine zu hohe Zelldichte reagieren, müssen diese jeden Tag um die Hälfte verdünnt werden.

2.2.3.1.2 Kultivierung der ES-Zelllinie E14K

ES-Kulturmedium: DMEM; 15% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 2 mM Glutamin; 50 µM β-Mercaptoethanol; LIF

EF-Kulturmedium: DMEM; 5% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 2 mM Glutamin; 50 µM β-Mercaptoethanol

ES-Zellen wachsen als adhärenente Zellen auf einer Monolayerschicht von Feeder-Zellen. Als Feeder-Zellen werden primäre murine Fibroblasten eingesetzt, die zuvor für 2,5 h mit Mitomycin C behandelt wurden. Mitomycin C ist ein zytotoxisches Antibiotikum und verhindert die weitere Zellteilung der damit behandelten Zellen. Die ES-Zellen werden täglich mikroskopisch beurteilt, da nur undifferenzierte, totipotente Zellen verwendet werden können. Eine Differenzierung der ES-Zellen wird zudem durch die Zugabe von LIF (*leucemic inhibitory factor*) unterbunden. In der Regel werden die ES-Zellen alle zwei Tage in einem Verhältnis von 1:2 bzw. 1:3 verdünnt (Kapitel 2.2.3.1.1). Das Medium wird jeden Tag gewechselt.

2.2.3.1.3 Lymphozyten

T-Zellmedium: RPMI 1640; 5% FCS (HyClone); 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 2 mM Glutamin; 50 μ M β -Mercaptoethanol

Frisch isolierte Lymphozyten werden in Lochplatten in einer Dichte von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml T-Zellmedium kultiviert.

2.2.3.2 Immortalisierung von murinen embryonalen Fibroblasten nach dem 3T3 Protokoll

Zur Immortalisierung primärer Mef wurde die von Rittling beschriebene Methode zu Grunde gelegt.¹⁰³ Hierzu werden primäre Mef mit einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen auf einer 21 cm² Zellkulturschale ausplattiert. Alle 3 Tage werden die Zellen trypsiniert, gezählt und mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Zellkulturschale ausplattiert. Nach 8-15 Passagen kommt es zu einer Krise. In dieser Zeit wird lediglich das Medium gewechselt. Nach 17-20 Passagen wachsen die immortalisierten Klone hoch.

2.2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium (2-fach): 20% DMSO; 80% FCS

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und weiterkultiviert werden. Dazu werden $1-10 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Medium in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei -80°C in einem Frosti eingefroren. Für dauerhafte Lagerung werden die Zellen nach 12-24h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.4 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses sofort in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Die aufgetaute Zellsuspension wird zügig in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation wird das enthaltene DMSO entfernt. Für die Kultivierung werden die Zellen anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau dient zur Unterscheidung zwischen viablen und toten Zellen. Lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen im mikroskopischen Bild hell, während tote Zellen und Zelltrümmer tiefblau angefärbt werden.

Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,5%-igen Trypanblaulösung werden gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden vier Großquadrate ausgezählt, wobei nur viable, nicht angefärbte Zellen berücksichtigt werden. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

2.2.3.6 Transfektionsmethoden

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Dazu zählen die liposomale Transfektion (Lipofektion), die Elektroporation und die retrovirale Transduktion. Die jeweils verwendete Transfektionsmethode ist sowohl von der zu transfizierenden Zelllinie, als auch von den geplanten Experimenten abhängig. So eignet sich die Lipofektion, um Plasmid-DNA transient, d.h. vorübergehend, in adhärenente Zellen einzubringen, während ES-Zellen effizienter durch Elektroporation transfiziert werden können. Die retrovirale Transduktion eignet sich zur stabilen Integration der DNA in des Zellgenom ohne Selektion der Zellen.

2.2.3.6.1 Lipofektion adhärenenter Zellen

Lipofectamine™ 2000 oder Lipofectamine™ Reagent in Kombination mit Plus™ Reagent
Opti-MEM®I, Serum reduziertes Medium

Bei der Lipofektion verwendet man kationische Lipide, um die negativ geladenen DNA-Moleküle zu binden und so in die Zellen einzuschleusen. Die Komplexe verschmelzen mit der lipophilen Zellmembran oder werden durch Phagozytose in die Zellen aktiv aufgenommen. Zur liposomalen Transfektion wurden die Lipofectamine™ Reagenzien nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.3.6.2 Elektroporation

Elektroporationsmedium: RPMI 1640; 25% FCS

Bei der Elektroporation werden Zellen in einer DNA-haltigen Lösung einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, der für eine kurze Zeit in der Membran Poren erzeugt.^{104, 105} Durch diese Poren kann Plasmid-DNA sowohl passiv durch Diffusion als auch elektrophoretisch in die Zelle gelangen.¹⁰⁶

Nach Expansion totipotenter ES-Zellen werden $5 \cdot 10^6$ Zellen in einer Elektroporationsküvette mit $20 \mu\text{g}$ DNA vermischt. Die Elektroporation erfolgt bei $250 \mu\text{F}$ und 340V . Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis, werden $2,5 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 56cm^2 Zellkulturschale, auf der eine Monolayerschicht an Mitomycin C behandelten Feeder-Zellen ist, überführt und im Brutschrank kultiviert.

2.2.3.6.3 Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion

Bei der retroviralen Transduktion macht man sich zu Nutze, dass Retroviren in der Lage sind, ihr einzelsträngiges RNA-Genom nach Infektion einer Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Das virale Hüllprotein (*envelope*) besteht aus einem Transmembranprotein und einem Oberflächenprotein, welches spezifisch mit dem Virusrezeptor an der Oberfläche der Zielzelle interagiert und somit die Virusaufnahme vermittelt. Die Anwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von dem Virus infiziert werden kann. Das ecotrope Oberflächenprotein interagiert mit einem Aminosäure-Transporterprotein, das nur von Mauszellen exprimiert wird.¹⁰⁷ Die Virusverpackungszelllinie Phoenix E trägt ein retrovirales Provirus, das die für die viralen Proteine kodierenden Gene enthält. Transfiziert man diese Zellen mit einem retroviralen Vektor, der neben dem zu transduzierenden Gen das Verpackungssignal ψ enthält, produzieren die Zellen retrovirale Partikel, die in das Kulturmedium sezerniert werden.

24 h nach Lipofektion von Phoenix E-Zellen wird das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt. Der retrovirale Überstand wird 36 und 48h nach der Transfektion gesammelt, filtriert (0,45 μm) und bei 4°C gelagert. Die Transduktion von murinen Zielzellen durch Retrovirus erfolgt durch Inkubation der Zellen mit retroviralem Überstand, welchem zuvor 4 $\mu\text{g/ml}$ Polybren zugesetzt wurde. Polybren, ein Polykation, verbessert die Interaktion zwischen dem viralen Oberflächenprotein und dem zellulären Virusrezeptor, wodurch eine höhere Transduktionseffizienz erzielt werden kann.^{108, 109}

2.2.3.7 Selektion positiver ES-Zell-Klone

Selektionsmedium: ES-Zell-Medium; 0,2mg/ml G418 und/oder 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (2mM) Ganciclovir

Einen Tag nach der Elektroporation der ES-Zellen mit dem Rekombinationsvektor wird dem ES-Zell-Medium G418 zur positiven Selektion beigemischt. Nach zwei Tagen werden die ES-Zellen in Medium mit G418 und Ganciclovir kultiviert. Alle zwei Tage wird das Medium gewechselt bis ES-Zell-Kolonien gepickt werden können. Nach Expansion wird ein Teil der Zellen mittels PCR (Kapitel 2.2.1.7) und Southern Blot (Kapitel 2.2.1.13.1) auf den korrekten Einbau durch homologe Rekombination mit dem Rekombinationsvektor getestet. Der andere Teil wird für die Blastozysteninjektion kryokonserviert (Kapitel 2.2.3.3).

2.2.3.8 RNA-Interferenz

Die Hemmung der Genexpression spezifischer Gene durch RNA-Moleküle wird RNA-Interferenz genannt.¹¹⁰ Dabei wird ein kurzes, synthetisch hergestelltes RNA-Molekül (siRNA; *small interfering* RNA) durch Transfektion in die Zelle eingebracht, welches komplementär zur mRNA des Zielgens ist. Durch Bindung der siRNA an die mRNA des Zielgens wird diese gespalten oder es kommt zur Methylierung des entsprechenden Gens. Beides bewirkt eine spezifische Runterregulation des Ziel-Proteins (*knock-down*).

Zum *knock-down* bestimmter Proteine werden durch Transfektion mit Lipofectamin™ 2000 die entsprechenden siRNA in die Zellen eingeschleust. 24-48 h nach Transfektion werden die Zellen lysiert und die Lysate mittels Western Blot (Kapitel 2.2.4.7) analysiert. Alternativ wird die RNA der transfizierten Zellen isoliert (Kapitel 2.2.1.12) und nach Umschreibung in cDNA mittels RTQ-PCR quantifiziert (Kapitel 2.2.1.10).

2.2.3.9 Osmolyse von Erythrozyten

RBC-Puffer: 150mM NH₄Cl; 1mM KHCO₃; 0,1mM Na₂EDTA, pH7,3 in A.d.

Die zu lysierende Probe wird in einem entsprechenden Volumen RBC-Puffer aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Durch den hypotonen Puffer schwellen die Erythrozyten an und platzen. Nach Zentrifugation bei 1500Upm für 5 min wird der Überstand verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

2.2.3.10 Gewinnung von Lymphozyten

T-Zellmedium: RPMI 1640; 5% FCS (HyClone); 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 2 mM Glutamin; 50 µM β-Mercaptoethanol

Waschmedium: RPMI 1640; 1% FCS (HyClone)

RBC: 150mM NH₄Cl; 1mM KHCO₃; 0,1mM Na₂EDTA, pH7,3 in A.d.

Die Isolation von T- oder B-Zellen aus Lymphknoten und/oder Milz kann durch positive Aufreinigung oder Depletion geschehen. Dabei werden magnetische *Beads* eingesetzt, an die spezifische Antikörper gekoppelt sind. Die an die *Beads* gebundenen Zellen können von nicht-markierten in einem starken magnetischen Feld getrennt werden. Bei der positiven Aufreinigung wird die gewünschte Zellpopulation durch Verwendung geeigneter Antikörper an die magnetischen *Beads* gekoppelt. Bei der Depletion werden alle anderen Zellen an die *Beads* gebunden. So kann eine Aktivierung der Zielzellpopulation durch Antikörperstimulation vermieden werden. Zudem sind die Zellen für weitere Experimente nicht an *Beads* gekoppelt.

2.2.3.10.1 Gewinnung CD4⁺ Zellen durch Depletion

Nach Entnahme von Lymphknoten und Milz wird aus diesen Organen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dazu werden die Organe mit Hilfe eines Stempels einer 2 ml Spritze durch ein Zellsieb der Porenweite 100 µm gedrückt. Im Anschluss wird die so gewonnene Zellsuspension durch ein Zellsieb der Porenweite 70 µm pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1500 Upm für 5 min werden die Zellen in RBC-Puffer aufgenommen, um die Erythrozyten zu lysieren. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 10 ml T-Zellmedium. Nach erneuter Zentrifugation und einem Waschschrift mit Wasch-Puffer werden die Zellen aus Lymphknoten und Milz je einer Maus in 3 ml Wasch-Puffer aufgenommen und mit 20 µl anti-CD11b Antikörper für 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen in 7 ml Waschpuffer aufgenommen und pro Maus wird ein Dynabeads[®]-Cocktail bestehend aus anti-CD8/anti-PanB/Ziege-anti-Ratte *Beads* für 30 min bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Nach Positionierung in einem magnetischen Feld werden die *Beads* vom Überstand getrennt. Dieser wird erneut mit dem Dynabeads[®]-Cocktail inkubiert. Nach Zentrifugation des Überstandes werden die CD4⁺ T-Zellen in einem geeigneten Volumen aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Einige Zellen werden zur Kontrolle der Reinheit auf den Oberflächenmarker CD4 gefärbt und im FACS analysiert. Bei einer Reinheit von ≥92% werden die T-Zellen für weitere Experimente verwendet.

2.2.3.10.2 Isolierung von B220⁺ B-Zellen

Für die Negativ-Aufreinigung von B220⁺ B-Zellen wird entweder analog zur Gewinnung von CD4⁺ Zellen vorgegangen oder der „B Cell Isolation Kit“ verwendet. Bei der Aufreinigung mit Hilfe der Dynabeads[®] wird nur die Milz eingesetzt und anstelle von murinen Pan-B die murine Pan-T Dynabeads[®] verwendet, um spezifisch T-Zellen zu depletieren.

2.2.3.11 Gewinnung von NK-Zellen aus Milz oder Knochenmark

NK-Zellen wurden in einer Positiv-Aufreinigung unter Verwendung der CD49b (DX5) MicroBeads der Firma Milteny Biotec Inc. (Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben gewonnen.

2.2.3.12 *in vitro* Differenzierung von BMDC (*bone marrow derived dendritic cell*)

DC-Medium: RPMI 1640; 10% FCS; 2% GM-CSF enthaltener Zellkulturüberstand

Die Differenzierung von DC erfolgt nach dem Protokoll von Lutz *et al.*, 1999.¹¹¹ Eine aus Knochenmark gewonnene Einzelzellsuspension wird in einer Dichte von 2-4*10⁶ Zellen pro 10 ml DC-Medium auf einer 56 cm² Standard-Kulturschale ausplattiert. Nach drei Tagen wird 10 ml

frisches DC-Medium zur Kultur gegeben. An Tag sechs werden 10 ml Medium pro Kulturschale abgenommen, zentrifugiert und das Sediment in 10 ml DC-Medium resuspendiert. Diese Zellen werden zurück in die Kulturschale überführt. An Tag sieben oder acht werden die Zellen auf DC-Marker mittels Durchflusszytometrie immunphänotypisiert. Bei erfolgreicher *in vitro* Differenzierung werden $2,5 \cdot 10^5$ BMDC pro 24-Lochplatte in 500 μ l DC-Medium ausgesät und am nächsten Tag mit LPS stimuliert. Der Zellkulturüberstand wird mittels ELISA (Kapitel 2.2.5.2) auf sekretierte Zytokine hin analysiert. Aus den Zellen wird die RNA isoliert (Kapitel 2.2.1.12), in cDNA umgeschrieben und mittels RTQ-PCR analysiert (Kapitel 2.2.1.10).

2.2.3.13 Kolonie-Formierung von adulten, hämatopoetischen Stammzellen der Maus

Hämatopoetische Vorläuferzellen sind in der Lage in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Diese Fähigkeit kann *in vitro* quantifiziert werden. Dazu wird eine Einzelzellsuspension, die aus Knochenmark gewonnen wurde, in das semi-feste Medium Methylcellulose gegeben. Dieses enthält alle Nährstoffe und je nachdem in welche Richtung die Zellen differenziert werden sollen, einen entsprechenden Zytokincocktail. Nach Inkubation bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ von wenigen Tagen bis hin zu mehreren Wochen können die gebildeten Kolonien gezählt und beurteilt werden. In dieser Arbeit wurde MethoCult® verwendet, um die Fähigkeit zur Differenzierung zu analysieren.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Lysis-Puffer: 10mM Tris/HCl, pH7,5; 130mM NaCl; 5mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1M Tris/HCl, pH6,8; 200mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d.

Zellen können mit Hilfe von nicht-ionischen Detergenzien wie Triton-X oder NP-40 aufgeschlossen werden. Die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren wie Vanadat und Glycerolphosphat in Kombination mit Protease-Inhibitoren verhindern den Abbau von Proteinen und deren Phosphorylierungen. Die zu lysierenden Zellen werden durch Zentrifugation sedimentiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes werden die Zellen in eiskaltem, frisch angesetztem Lysispuffer für 20 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wird die Probe bei 14000 Upm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C vollständig denaturiert oder in GST-Pulldown Experimenten eingesetzt (Kapitel 2.2.4.4).

2.2.4.2 Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe

Lysis-Puffer: 10mM Tris/HCl, pH7,5; 130mM NaCl; 5mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1M Tris/HCl, pH6,8; 200mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d.

Zur Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe, wird dieses gewogen und mit einem entsprechenden Volumen an Lysis Puffer versetzt (100 µl pro 10 mg Gewebe). Nachdem sich unter Verwendung eines Ultra-Turrax eine homogene Lösung gebildet hat, wird die Probe mit 10-20 Impulsen bei 50% sonifiziert. Es folgt eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 4°C, 20 min) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel 2.2.4.3) eine geeignete Menge mittels SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.5) analysiert.

2.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und aromatische Aminosäuren in saurer Lösung.¹¹² Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Die Konzentrationen werden unter Verwendung des Bio-Rad Proteinassay nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt.

2.2.4.4 Bindungsexperiment mit GST-Fusionsproteinen (GST-Pulldown)

Lysis-Puffer: 10mM Tris/HCl, pH7,5; 130mM NaCl; 5mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad10 ml A.d

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1M Tris/HCl, pH6,8; 200mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d.

Die Interaktion zwischen Proteinen kann mit Hilfe von GST-Pulldown Experimenten *in vitro* nachgewiesen werden. Hierfür werden Zellysate (Kapitel 2.2.4.1), die zuvor kurz mit Glutathion-Sepharose zur Entfernung unspezifisch-bindender Proteine inkubiert wurden, mit 10-20 µg aufgereinigtem, an Sepharose gekoppeltem GST-Fusionsprotein für 2 h bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Glutathion-Sepharose mit Lysis-Puffer werden diese mit SDS-Ladepuffer versetzt. Die Proteine werden bei 95°C für 10 min vollständig denaturiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (Kapitel 2.2.4.7) und immunchemisch nachgewiesen (Kapitel 2.2.4.9).

2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375mM Tris/HCl, pH8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5mM Tris/HCl, pH6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

SDS-Elektrophoresepuffer: 25mM Tris; 192mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt.¹¹³ Die Zugabe von Probenpuffer zur Proteinlösung schafft denaturierende Bedingungen. Das anionische Detergenz SDS bindet an die Proteine mit einem konstanten Massenverhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein. Durch diese Bindung werden sowohl intra- als auch intermolekulare Wechselwirkungen aufgebrochen und die Eigenladung der Proteine maskiert. Die Auftrennung erfolgt daher nur aufgrund ihrer molaren Masse durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels. Im diskontinuierlichen System passieren die Proteine zunächst das grobporige Sammelgel, um eine scharfe Proteinbande zu erhalten. Das Prinzip der Bandenschärfung beruht hierbei auf der Anwesenheit von Folge- und Leitonen in der Probe. Zwischen den getrennten Folge- und Leitonen erhöht sich die lokale Feldstärke, was dazu führt, dass die SDS-Proteinkomplexe beschleunigt werden und dicht hinter der Leitonenfront als scharfe, konzentrierte Bande laufen. Wird das Trenngel erreicht, wird der Effekt aufgrund des höheren pH-Wertes aufgehoben.

Polyacrylamidgele entstehen durch Kopolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid. Die Porengröße von Sammel- und Trenngel lässt sich dabei durch Veränderung der Konzentrationen der beiden Komponenten variieren. Die Reaktion ist eine radikalische Ketten-

reaktion, die durch Ammoniumperoxosulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Radikalstabilisator initiiert wird.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wird das Trenngel je nach gewünschter Auftrennung der Proteine mit 5-15% Polyacrylamid-Lösung angesetzt, luftblasenfrei in die Gelvorrichtung gegossen und mit 500 µl Ethanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels, wird das Ethanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die mit Probenpuffer versetzten und zusätzlich hitzedenaturierten Proteine werden in die Probenaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (25-120 Volt) aufgetrennt. Ein Proteinmarker dient zum Molekulargewichtvergleich.

2.2.4.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Coomassie-Färbelösung: 0,25% Brilliant Blau; 45% Methanol; 10% Essigsäure in A.d.
Coomassie-Entfärbelösung: 45% Methanol; 10% Essigsäure in A.d.

Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der Proteine unspezifisch anfärbt. Dabei lagert sich der Farbstoff an basische Aminosäuren an. Proteine werden im SDS Gel aufgetrennt (Kapitel 2.2.4.5) und darin nachgewiesen, indem das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend so lange in Entfärbelösung inkubiert wird, bis die Proteinbanden klar erkennbar sind.

2.2.4.7 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

Transferpuffer: 25mM Tris; 192mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Unter Western Blotting versteht man den Transfer von zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Protein-bindende Membran.^{114, 115} Beim „*Wet-Blot*“-Verfahren wird eine in Methanol equilibrierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und zwischen zwei Schichten aus Cellulosefilterkarton (*Whatmann-Paper*) in der Vorrichtung eingespannt. Diese wird entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei konstanter Stromstärke von 1 A. Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine (etwa 1 min pro kDa).

2.2.4.8 Amidoschwarz-Färbung der PVDF-Membran

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,2% Naphtol Blau Schwarz 25% Isopropanol; 10% Essigsäure in A.d.
Amidoschwarz-Entfärbelösung: 25% Isopropanol; 10% Essigsäure in A.d.

Naphtol Blau Schwarz ist ein Diazofarbstoff, der Proteine unspezifisch anfärben kann. Um die Effizienz des Blotvorgangs zu überprüfen oder die geladene Proteinmenge zu vergleichen wird die PVDF-Membran für 15 min in der Amidoschwarz-Färbelösung geschüttelt und anschließend so lange in Entfärbelösung inkubiert, bis Proteinbanden klar erkennbar sind.

2.2.4.9 Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen

PBS-Tween-(PBST)-Puffer: 0,1% Tween 20 in PBS

Blockierlösung: 10% Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS-Tween-Puffer; 5% BSA in PBS-Tween-Puffer

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert, der wiederum mittels eines Chemolumineszenz-Systems nachgewiesen werden kann. Die Membran wird in PBST-Puffer gewaschen und anschließend 30min bei 37°C in Blockierlösung inkubiert. Das Blockieren dient der Minimierung unspezifischer Signale bei dem immunochemischen Nachweis durch Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen auf der Membran. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgt für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Danach wird die Membran dreimal für je 10min in PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend inkubiert man die Membran bei RT mit einem gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde. Nach erneutem Waschen wird die Membran mit Chemolumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das so erzeugte Signal kann einen Hyperfilm belichten, der das Ergebnis dokumentiert.

2.2.4.10 Entfernen gebundener Antikörper von Membranen

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 10% Essigsäure; 10% Methanol in A.d.

Um die an eine Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Membran für 10 min in 0,2 N NaOH schüttelnd inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Membran kann dann erneut geblockt und mit Antikörper inkubiert werden (Kapitel 2.2.4.9).

2.2.4.11 Anreicherung von *Processing-bodies* durch Ultrazentrifugation

Lysis-Puffer P50: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM Kaliumacetat, 1,5 mM Magnesiumacetat, 2 mM DTT; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette; ad 10 ml A.d.

Processing-bodies (P-bodies) sind Orte des RNA Abbaus. Sie bestehen aus den am Abbau beteiligten Proteinen. P-bodies können durch Zentrifugation in der P50 Fraktion angereichert

werden¹¹⁶. Hierzu werden $4 \cdot 10^7$ Mef geerntet und in 1 ml P50-Lysispuffer aufgenommen. Zum Zellaufschluss durch schwache Scherkräfte wird ein Typ B Dounce-Homogenisator verwendet (25 Stöße). Zum Entfernen der Zellkerne werden die Lysate für 10 min bei 2.000g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wird als P (Pellett) bezeichnet, der Überstand als S (*supernatant*). Der Überstand wird in einem Ultrazentrifugationsschritt bei 4°C und 50.000 g für 1 h zentrifugiert. Der Überstand (S50) wird abgenommen; das erhaltene Sediment (P50) ist mit P-bodies angereichert. Die Analyse der Fraktionen erfolgt mittels immunchemischem Nachweis (Kapitel 2.2.4.9).

2.2.5 Biologische Untersuchungen

2.2.5.1 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS-Puffer: 0,1% BSA in PBS

Bei der Immunphänotypisierung werden zellspezifische Oberflächenantigene mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert und in einem Durchflusszytometer analysiert. Da die Antikörper spezifische Antigene erkennen, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Antigendichte auf der jeweiligen Zelle. Durch Kombination mehrerer, mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelter Antikörper können auch Subpopulationen voneinander unterschieden werden.

Zur Immunphänotypisierung werden die aufgearbeiteten Zellen in F_c-Block™-Lösung aufgenommen (Konzentration $1 \cdot 10^7$ Zellen pro 1 ml F_c-Block™) und je 100 µl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verteilt. Die Zugabe von F_c-Block™ dient der Maskierung unspezifischer Bindungsstellen. Für jede Färbung werden die entsprechenden Antikörper dazu gegeben, standardmäßig in einer Verdünnung von 1:200. Der Ansatz inkubiert unter Ausschluss von Licht 20 min bei 4°C. Anschließend wird die Platte bei 4°C und 1450 Upm für 5 min zentrifugiert und die Zellen einmal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen werden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Je nach Anwendung werden vor der Analyse im Durchflusszytometer jedem Ansatz 1 µg/ml Propidiumiodid, ein Farbstoff, der in DNA interkalieren kann, zugesetzt, um den Ausschluss toter Zellen in der Auswertung zu ermöglichen. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung der FlowJo Software.

Die Färbung des intrazellulären Markers für regulatorische T-Zellen Foxp3 wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „Mouse Regulatory T cell Staining Kit“ durchgeführt. Die Zytokine IL-4 und IFN γ wurden nach dem Färbeprotokoll für intrazelluläre Färbungen der Firma eBioscience durchgeführt.

2.2.5.2 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay* ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest ist ein immunologisches Nachweisverfahren. Es können verschiedenartigste Antigene (z.B. Zytokine) durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen in einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Zunächst wird der *coating*-Antikörper in einer Maxi-Sorb 96-Loch-Mikrotiterplatte immobilisiert. Dieser Antikörper ist spezifisch für das nachzuweisende Antigen und bindet dieses nach Zugabe. Nach intensivem Waschen wird das an

den *coating*-Antikörper gebundene Antigen durch den Detektions-Antikörper erkannt. Es entsteht ein *coating*-Antikörper/Antigen/Detektions-Antikörper-Komplex. An den Detektions-Antikörper ist entweder direkt die Meerrettich Peroxidase (HRP) oder die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, oder es wird ein dritter an HRP- oder AP-gekoppelter Antikörper in dem System benötigt, der den Detektionsantikörper spezifisch bindet (ein so genannter Sandwich-ELISA). Nach Zugabe des Substrates für die HRP bzw. AP wird der Farbumschlag in einem Platten-Leser ausgemessen. Ein mitlaufender Standard dient als Vergleich. Die Zytokinkonzentrationen werden mit den BD OptEIA™ ELISA Sets nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Konzentration von Antikörpern aus Mausseren werden unter Verwendung des „SBA Clonotyping™ System/AP“ Kit und den „Mouse Immunoglobulin Isotype Panel“ nach Herstellerangaben bestimmt. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen ssDNA und dsDNA wurde nach der von Yu *et al.*, 2006 beschriebenen Methode durchgeführt.¹¹⁷

2.2.5.3 Nachweis von Autoantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zur qualitativen Bestimmung von Autoantikörpern im Mausserum werden die BIOCHIP-Mosaiken der EUROIMMUN AG nach Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wird die Substratkombination aus HEp-2-Zellen und Primatenleber mit Mausserum in einer Verdünnung von 1:25 inkubiert. Sind im Serum spezifische Autoantikörper enthalten, so binden diese an ihr Antigen. In einem zweiten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper mit Fluorescein-gekoppelten Antikörpern markiert und können so im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

2.2.5.4 Zytokinarray

Zum Nachweis von inflammatorischen Zytokinen im Serum von Mäusen wird der „RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array“ nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Array basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA (Kapitel 2.2.5.2).

2.2.5.5 Proliferationsassay

2.2.5.5.1 ³H-Thymidin Einbau in der S-Phase

Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin bei der DNA Replikation ist ein Marker für die Proliferationsaktivität. Nur Zellen in S-Phase können ³H-Thymidin in die DNA einbauen.

Zur Messung der Proliferationsaktivität werden CD4⁺ T-Zellen in einer Dichte von 1*10⁵ oder 4*10⁴ Zellen pro Loch auf einer 96-Lochplatte ausgesät. Diese wurde zuvor mit einem α-Maus CD3e Antikörper *gecoated*. Dafür wurden am Tag zuvor die Platten mit einer 10 µg/ml α-Syrian

Hamster IgG Lösung in PBS bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Entfernen von nicht gebundenem Antikörper durch Waschen mit PBS werden die Platten mit der jeweils im Experiment vermerkten Konzentration an α -Maus CD3e-Antikörper für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS sind die Platten einsatzbereit. Der α -CD3e-Antikörper stimuliert spezifisch den T-Zell-Rezeptor der T-Zellen, woraufhin diese proliferieren. Nach 24, 48 und/oder 72h wird pro Loch 1 μ Ci Methyl-³H-Thymidin zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 8-10 Stunden werden die Zellen auf Glasfaser Filter transferiert und die inkorporierte Radioaktivität im β -Zähler gemessen.

Die Proliferation von B220⁺ B-Zellen kann analog zur T-Zell Proliferation gemessen werden, allerdings werden diese durch den löslichen Stimulus LPS oder α -Maus IgM-Antikörper stimuliert.

2.2.5.5.2 Trypanblau-Ausschluss

Die Proliferationsrate primärer Mef wird durch zählen ermittelt. Dafür werden an Tag null $1 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 56cm² Zellkulturschale ausplattiert. Alle 24h werden die mit Trypanblau vermischten Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2.2.5.6 Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in T_{H1} und T_{H2}

T-Zellmedium: RPMI 1640; 5% FCS (HyClone); 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 2 mM Glutamin; 50 μ M β -Mercaptoethanol

Die Differenzierungskapazität von naiven CD4⁺ T-Zellen kann über die Zytokinproduktion von IFN γ und IL-4 bestimmt werden. Hierfür werden $1 \cdot 10^6$ aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen pro ml Kulturmedium *ex vivo* für 6 Stunden mit 10 pM PMA und 1 μ M Ionomycin stimuliert. Nach zwei Stunden wird zu den Ansätzen 10 μ g/ml Brefeldin A gegeben, ein Antibiotikum, welches die Sekretion der Zytokine in den Kulturüberstand durch den Block des Transportes zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat verhindert. Die Analyse erfolgt nach intrazellulärer Färbung von IFN γ und IL-4 durchflusszytometrisch (Kapitel 2.2.5.1).

2.2.5.7 Reporterassay

D10: DMEM, 10% FCS, Pen/Strep
D0: DMEM, Pen/Strep

Luziferasen sind Enzyme, die die Oxidation von Luziferinen katalysieren. Bei dieser Reaktion kommt es zu Biolumineszenz, die im Luminometer gemessen werden kann. Die Aktivität eines Promoters kann *in vivo* ermittelt werden, indem Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert werden, der hinter der spezifischen Promotersequenz das Enzym *firefly* Luziferase codiert. Ist der Promoter aktiv, so wird die Luziferase-DNA transkribiert und translatiert. Das Enzym kann durch

Zugabe von seinem Substrat, dem Luziferin, indirekt durch die entstehende Biolumineszenz nachgewiesen werden. Je mehr Protein gebildet wird, desto stärker ist das Lichtsignal, da mehr Substrat umgesetzt werden kann. Als interne Kontrolle dient der pLR-null-Vektor der für die *Renilla* Luziferase codiert. Da dieser Vektor keinen Promoter enthält, wird die *Renilla* Luziferase-Sequenz ständig abgelesen. Das „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ ermöglicht die Messung beider Enzymaktivitäten in einer Probe. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Proben ist möglich, da Unterschiede in der Transfektionseffizienz in diesem System berücksichtigt werden.

$5 \cdot 10^4$ Zellen pro 24-Lochplatte werden mit dem entsprechenden Reporterkonstrukt und dem pLR-null-Vektor unter Verwendung von Lipofectamin™ transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion werden die Zellen gehungert, d.h. sie werden zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend für weitere 12 h in Serum-freiem Medium kultiviert. Es folgt eine 12-stündige Stimulation mit 4 ng/ml TGFβ bzw. 100 ng/ml BMP4. Im Anschluss werden die Zellen entsprechend den Angaben des Herstellers passiv lysiert und in diesen Lysaten die Luziferase-Aktivität im Luminometer gemessen.

2.2.6 Grundlegende tierexperimentelle Techniken

2.2.6.1 Superovulation, Blastozystenisolierung und Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten

Die Superovulation virginer Weibchen, die Blastozystenisolierung aus dem Uterus, die Blastozysteninjektion von ES-Zellen in die isolierten Blastozysten und der Retransfer in den Uterus scheinsschwangerer Leihmütter wurde nach den Protokollen von Hogan in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Irmgard Förster durchgeführt.¹¹⁸

2.2.6.2 Mauszucht

Zur Dauerverpaarung werden ein Männchen und ein Weibchen ab einem Alter von 6-8 Wochen zusammengesetzt. Dem Nachwuchs wird in einem Alter von 2-3 Wochen ein Stückchen Schwanz unter Narkose abgeschnitten, aus dem genomische DNA zur Genotypisierung gewonnen wird. Gleichzeitig werden die Jungtiere durch Ohrlochung markiert. In einem Alter von 3-4 Wochen werden die Jungtiere von den Eltern und nach Geschlecht getrennt, da die Geschlechtsreife mit 4-6 Wochen einsetzt. Für eine terminierte Verpaarung wird ein Männchen für 12-16 h über Nacht zu einem Weibchen gesetzt. Am nächsten Morgen kann per Vaginalplaque(VP)-Kontrolle der Erfolg der Verpaarung geprüft werden. Falls kein VP vorhanden ist, kann eine terminierte Verpaarung in den darauf folgenden Tagen erneut angesetzt werden.

2.2.6.3 Fixierung von Mäusen in Formalin

Durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen wird das Fell in einem Sternschnitt aufgeschnitten und von der Muskulatur getrennt. Anschließend wird der Peritonealraum bis zum Sternum geöffnet und durch Durchtrennung der Rippen das Herz freigelegt. Mit einer Kanüle wird in den linken Vorhof gepufferte Formalinlösung eingespritzt. Während dieses Vorgangs wird die Hohlvene durchschnitten, so dass alle Organe von Innen her fixiert werden. Der Kadaver wird über Nacht in gepufferter Formalinlösung gelagert und am nächsten Tag zur Analyse an die Kooperationspartnerin PD Dr. Leticia Quintanilla-Fend geschickt.

2.2.6.4 Fixierung von Nieren für die Elektronenmikroskopie

Nach chirurgischer Entnahme der Nieren werden diese in ca. 1 mm³ Stücke mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert und anschließend in 2,5%-iger Glutaraldehyd-Lösung über Nacht bei 4°C gelagert. Alle

weiteren Schritte wurden von der Kooperationspartnerin PD Dr. Leticia Quintanilla-Fend durchgeführt.

2.2.6.5 Organentnahme und Peritoneallavage

Zur Organentnahme werden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und in einem Sternschnitt geöffnet. Nach Abtrennung des Fells kann die Peritonealhöhle durch Injektion von Medium gespült werden. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wird das eingespritzte Medium wieder entnommen. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 1300 Upm für 5 min sedimentiert und können nach entsprechender Färbung immunphänotypisiert werden (Kapitel 2.2.5.1). In einem nächsten Schritt werden die inguinalen, brachialen und axillaren Lymphknoten entfernt. Nach Aufschneiden des Peritonealhöhle bis zum Sternum können die einzelnen Organe (Leber, Niere, Milz, mesenteriale und iliakale Lymphknoten, gegebenenfalls Hoden) entnommen werden. Der Brustkorb wird entlang des Sternums und entlang der Rippenbögen geöffnet. Lunge, Herz und Thymus können so entnommen werden. Die Organe werden zur histochemischen Färbung in gepufferter Formalinlösung fixiert oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Aus Lymphknoten, Thymus und Milz kann eine Einzelzellsuspension hergestellt werden, die entweder durchflusszytometrisch analysiert wird (Kapitel 2.2.5.1) oder zur Aufreinigung von B- oder T-Zellen verwendet wird (Kapitel 2.2.3.10).

2.2.6.6 Präparation von Knochenmarkzellen

Durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen werden Femur und Tibia chirurgisch entnommen. Anschließend wird das Knochenmark mit HANK's unter Verwendung einer Injektionskanüle (27G 3/4) aus den Knochen gespült und durch ein Zellsieb der Porenweite 100 µm pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zentrifugation erfolgt bei 1000 Upm für 6 min. Anschließend werden die Zellen in entsprechendem Medium aufgenommen und weiterkultiviert oder mittels FACS-Analyse immunphänotypisiert (Kapitel 2.2.5.1).

2.2.6.7 Bestimmung des Proteingehalts im Mausurin

Der Proteingehalt im Urin der Mäuse wird mit Hilfe der URISCAN® Harnteststreifen nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.2.6.8 Gewinnung muriner embryonaler Fibroblasten

Zur Gewinnung von Fibroblasten aus Mausembryonen werden Embryonen aus terminierten Verpaarungen zwischen E12.5 und E14.5 präpariert. Die Abtrennung von Kopf und das Entfernen bereits differenzierter innerer Organe wie Leber und Herz, dienen zur Anreicherung embryonaler Fibroblasten in der Primärkultur. Aus den Köpfen wird genomische DNA isoliert (Kapitel 2.2.1.11), so dass die Embryonen direkt genotypisiert werden können. Das restliche Gewebe wird zerkleinert und in 5 ml 0,25% (w/V) Trypsinlösung in einem Glaskolben mit Glasperlen mit einem Durchmesser von 3 mm bei 37°C für 5 min geschüttelt. Die so vereinzelteten Zellen werden in Medium aufgenommen und nach einmaligem Waschen auf 56 cm² Zellkulturschalen überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden Zelltrümmer und größere Gewebeteile durch waschen mit PBS entfernt. Die konfluenten Zellen werden in einem Verhältnis von 1:2 passagiert.

2.2.6.9 Messung Endotoxin-induzierter Mortalität

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien. Im Blut bindet LPS an das Serumprotein Septin. Dieser Komplex bindet den Oberflächenrezeptor CD14, der unter anderem auf Monozyten exprimiert wird, und induziert so eine rasche Immunantwort.

Den Mäusen werden 35 mg/kg Körpergewicht LPS i.p. injiziert. Nach 1, 2 und 6 Stunden wird den Mäusen Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen. Das Serum wird anschließend auf die Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α im ELISA getestet (Kapitel 2.2.5.2). Von den Mäusen wird eine Überlebenskurve erstellt. Das Experiment wurde in Kooperation mit PD Dr. Florian Greten durchgeführt.

2.2.6.10 Die Immunisierung von Mäusen

Zur Induktion einer Immunantwort werden Mäuse mit einem Antigen immunisiert. Man unterscheidet bei den Antigenen zwischen T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Antigenen. Zu der ersten Gruppe zählt NP-15-Ova, wohingegen TNP-Ficoll ein T-Zell-unabhängiges Antigen ist. T-Zell-abhängige Antigene erzielen eine maximale Immunantwort nur durch Beteiligung von T-Zellen, bei T-Zell-unabhängige Antigene hingegen ist eine T-Zell Beteiligung nicht erforderlich.

Den Mäusen wird an Tag null entweder 50 μ g TNP-Ficoll in 200 μ l PBS i.p. verabreicht oder 200 μ g NP-15-Ova in PBS mit 4 mg/ml des Adjuvants Alum. Bei der Immunisierung mit NP-15-Ova ist zusätzlich eine Auffrischung mit der halben Menge an Tag 28 und 56 vorgesehen. Zu den

angegebenen Zeitpunkten wird den Mäusen Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Die Konzentration von Antikörperklassen wird in einem ELISA nachgewiesen (Kapitel 2.2.5.2).

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle Untersuchungsergebnisse werden auf ihre Signifikanz überprüft. In den Diagrammen ist entweder die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken dargestellt oder es wird die statistische Signifikanz in einem zweiseitigen Student'schen T-Test überprüft. Dabei sind Resultate eindeutig signifikant, wenn $p \leq 0,05$ ist.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung eines Smif-defizienten Mausstammes

Proteine lassen sich mit den verschiedensten molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden charakterisieren. Dennoch spiegelt jeder dieser Versuche nur eine Teilsituation wieder. Das Ausschalten eines Proteins im lebenden Organismus liefert wichtige Informationen über dessen Aufgaben unter physiologischen Bedingungen. Abhängig vom Entwicklungsstadium, exogenen und endogenen Reizen sowie in verschiedenen Zelltypen können die biologischen Funktionen *in vivo* untersucht werden.

3.1.1 Die Rekombinationsstrategie

Der Austausch von Genabschnitten durch homologe Rekombination ermöglicht die Einführung von Mutationen in das Mausgenom. Voraussetzung ist die Klonierung eines Rekombinationsvektors, der, flankiert von homologen Sequenzen, die gewünschte Mutation enthält. Im Falle von Smif wurde ein Teil von Exon 2 durch das grün-fluoreszierende Protein (GFP) und eine inverse Neomycin-Resistenzkassette (neo^r) ersetzt (Abb. 3.1). Das Einschleusen von GFP ins Mausgenom unter dem natürlichen Promoter von Smif ermöglicht den Nachweis jener Zellen, deren Smif-Promoter aktiv ist. Die neo^r dient, neben der Zerstörung des Genlokus, der Selektion positiver ES-Zellklone, da sie eine Resistenz gegenüber dem Neomycin-Analogen G418 vermittelt. Eine negative Selektion mit Ganciclovir kann durch die Verwendung der TK^{HSV} -Selektionskassette die Zahl der falsch-positiven Klone um das vierfache reduzieren.

3.1.2 Von der ES-Zelle zur F1-Generation

Elektroporation ist die effizienteste Transfektionsmethode zur Einschleusung von Fremd-DNA in ES-Zellen. Die pluripotenten Zellen wurden nach Expansion mit dem linearisierten Rekombinationsvektor elektroporiert und anschließend kultiviert. Einen Tag nach der Transfektion wurde die Selektion begonnen, die durch homologe Rekombination die Mutation im *Smif*

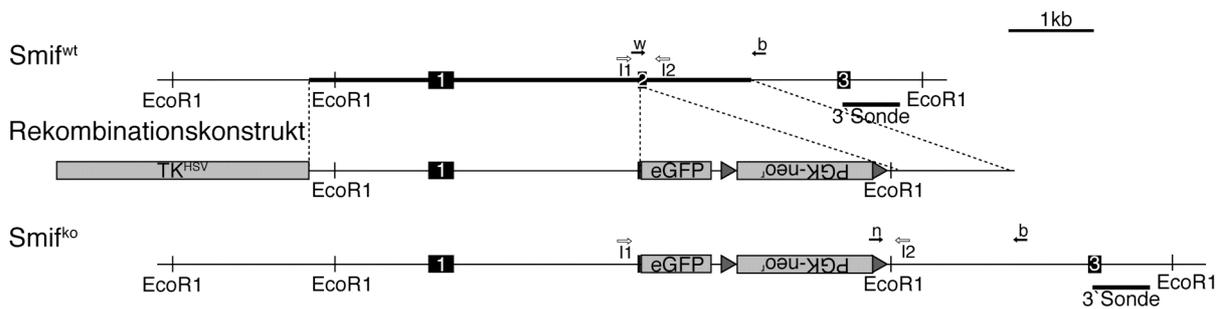


Abb. 3.1: Die Rekombinationsstrategie zur Generierung eines *Smif*-defizienten Mausstammes. Schematische Darstellung des Rekombinationsvektors und einem Teil des *Smif* Genlokus vor und nach homologer Rekombination. Ein Teil von Exon 2 wurde durch Einbringen von GFP im Leserahmen und einer inversen neo^r -Kassette ersetzt. Im Gegensatz zur neo^r , die zur positiven Selektion verwendet werden kann, dient die im Konstrukt enthaltene TK^{HSV} -Kassette der negativen Selektion von ES-Zellklonen. Die 3'-Sonde wurde zur Überprüfung einer erfolgreichen Rekombination zur Hybridisierung EcoR1-verdauter DNA verwendet. Die Identifizierung von wildtyp und knockout Allelen erfolgte standardmäßig mittels PCR unter Verwendung der eingezeichneten Primerpaare (Pfeile).

Genlokus trugen. Hierzu wurde das Kulturmedium mit G418 zur positiven und mit Ganciclovir zur negativen Selektion versetzt. Es wuchsen 64 unabhängige Klone. Diese resistenten Kolonien wurden gepickt. Nach Expansion dieser Klone wurde ein Teil der Zellen viabel kryokonserviert. Der andere Teil wurde zur Gewinnung von genomischer DNA lysiert. Die DNA wurde zunächst in einer PCR-Reaktion auf die eingeführte Mutation hin untersucht (Abb. 3.2). Die Verwendung der Primer n und b (Abb. 3.1) ermöglichte den Nachweis des mutierten Allels. 9 der 64 Klone waren positiv und hatten Teile der Fremd-DNA in ihr Genom integriert. In Abb. 3.2a ist das Ergebnis der PCR exemplarisch für die Klone 25-28 gezeigt. Southern Blot Analysen der in der PCR positiven Klone sollten den korrekten Austausch des DNA Abschnittes mit dem Rekombinationsvektor bestätigen (Abb. 3.2b). Dazu wurde die DNA nach EcoR1 Verdau elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit der radioaktiv-markierten 3'-Sonde (Abb. 3.1) detektiert. Die gleiche Bandenintensität des 3,1 kb und 6,9 kb Fragmentes weist auf eine heterozygote ES-Zelle hin, die ein wildtyp (6,9 kb) und ein knockout (3.1kb) Allel besitzt. Klon 11 wurde wegen des ausgewogenen Bandenmusters in Blastozysten implantiert (Abb. 3.2b). Dazu wurden Blastozysten aus dem Uterus von C57BL/6 Weibchen gespült, in die die ES-Zellen implantiert wurden. Die so entstandenen chimären Blastozysten wurden scheinchwangeren Leihmüttern eingesetzt, die diese austrugen. Auf diesem Wege wurden 11 chimäre Mäuse geboren. Von denen fünf männlich und sechs weiblich waren. Die Chimären konnten leicht an Hand ihrer gefleckten Fellfarbe identifiziert werden (Kapitel 1.5.1). Aus den Verpaarungen der Chimären mit C75BL/6 Mäusen können nur heterozygote Nachkommen entstehen, wenn die Insertion im *Smif* Gen in der Keimbahn der Chimären ist. Fünf der chimären Mäuse bekamen agouti-farbene Nachkommen. Die braune Fellfarbe ist ein Indikator für heterozygote Mäuse (Kapitel 1.5.1). Demnach trugen diese fünf Chimären

die Mutation in der Keimbahn. Insgesamt waren in der F1 Generation 20 von 54 Mäusen agouti-farben und somit heterozygot. Der Genotyp der Mäuse der F1 Generation wurde nicht nur anhand der Fellfarbe bestimmt, sondern zusätzlich mittels PCR kontrolliert und bestätigt. Dazu wurde genomische DNA aus dem Schwanz der Mäuse isoliert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Standardmäßig verwendet wurde das Primerpaar w/b zur Detektion des wildtyp Allels und das Primerpaar n/b für das mutierte Allel (Abb. 3.1). Im Einklang mit der nach Mendel erwarteten Verteilung bestand die F1 Generation zur Hälfte aus homozygoten wildtyp Mäusen und zur anderen Hälfte aus heterozygoten Mäusen.

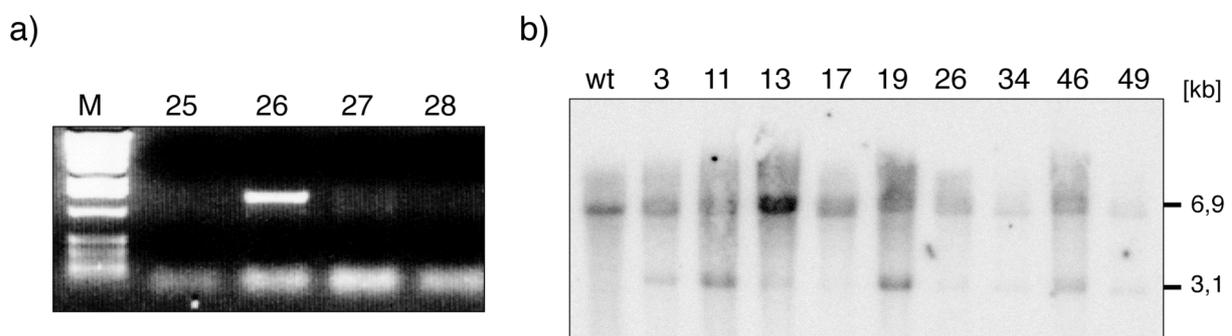


Abb. 3.2: Analyse der ES-Zellklone. Die nach Selektion mit G418 und Ganciclovir hochgewachsenen Klone wurden auf den korrekten Einbau der gewünschten Fremd-DNA hin überprüft. Nach Gewinnung von genomischer DNA wurde diese in einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Primer n und b (Abb. 3.1) analysiert. Das Ergebnis ist exemplarisch für die Klone 25-28 gezeigt (a). Die Ergebnisse aus der PCR wurden mittels Southern Blot für die positiven Klone verifiziert (b). Die EcoR1-verdaute genomische DNA wurde auf eine Membran transferiert und mit einer 600 bp 3'-Sonde (Abb. 3.1) hybridisiert. Als Kontrolle wurde DNA einer wildtyp Maus verwendet (wt, linke Spur).

3.1.3 Smif Expression in der F2 Generation

Aus der Verpaarung von heterozygoten Mäusen der F1 Generation ist die F2 Generation entstanden. Die F2 Generation besteht aus Mäusen, deren Genort für *Smif* homozygot oder heterozygot sein kann. Der Genotyp der Neugeborenen wurde standardmäßig in einer PCR-Reaktion ermittelt (Abb. 3.3). Dazu wurde genomische DNA aus einem kleinen Schwanzstück isoliert. Es ergibt sich ein typisches Bandenmuster für die möglichen Genotypen wildtyp, heterozygot und knockout. Bei Verwendung des Primerpaares 11/12 entsteht für das wildtyp Allel eine Bande von 500 bp und für das knockout Allel von 3400 bp in einer Reaktion (Abb. 3.1 und Abb. 3.3b).

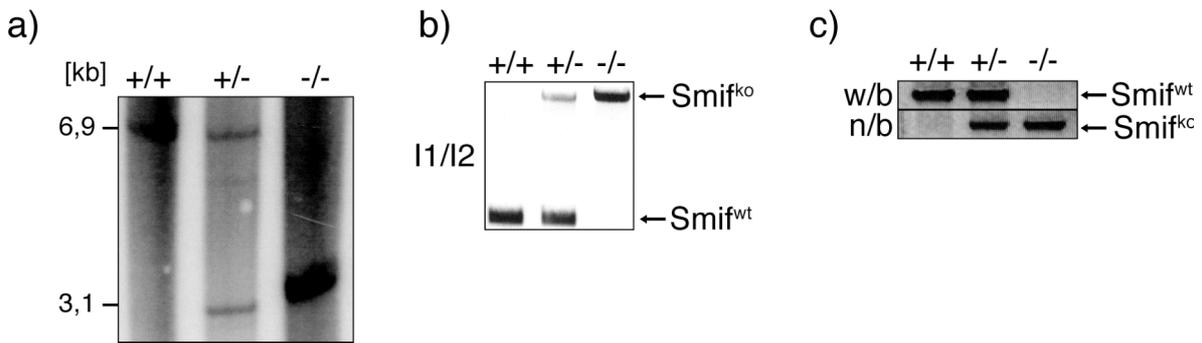


Abb. 3.3: Untersuchung des *Smif* Genlokus vor und nach homologer Rekombination. Nach Isolation von genomischer DNA aus Mausschwänzen zur Genotypisierung eines Wurfes, wurde diese mit der Restriktionsendonuklease EcoR1 verdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Transfer auf eine Membran wurde diese mit einer 800 bp Sonde, die komplementär zu *Smif* ist, hybridisiert. Es ergibt sich eine Bande von 6,9 kb für das wildtyp Allel und 3,1 kb für den mutierten Genlokus (a, Abb. 3.1). Standardmäßig wurde zur Genotypisierung die genomische DNA in einer PCR Reaktion eingesetzt. Dazu wurde entweder das Primerpaar (I1/I2) verwendet (b), das den Nachweis des wildtyp wie auch des mutierten Gens in einer PCR-Reaktion ermöglicht oder es wurden pro Probe zwei PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren (w/b) für wildtyp und (n/b) für knockout (c) (Abb. 3.1) angesetzt. Exemplarisch ist das Ergebnis für je eine wildtyp (wt), heterozygote (he) und eine knockout (ko) Maus gezeigt.

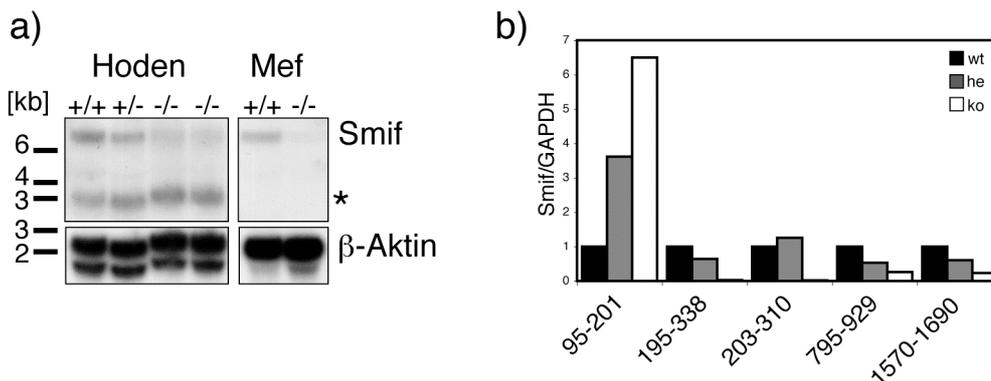


Abb. 3.4: Die Expression von *Smif* mRNA. Die aus Hoden bzw. Mef-Zelllinien isolierte RNA wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit einer radioaktiv-markierten *Smif*-Sonde hybridisiert. Nach Entfernen der gebundenen Sonde wurde die Membran mit einer radioaktiv-markierten Sonde, die komplementär zu β -Aktin ist, hybridisiert. Dies ermöglicht den Vergleich der geladenen Mengen an RNA. In a) ist das Autoradiogramm dargestellt. In den knockout Geweben und Mef konnte kein Transkript mit einer Größe von 6,9 kb detektiert werden. Der Stern (*) markiert eine unspezifische Bande. Zur Quantifizierung der RNA Level in Mef-Zelllinien wurden RTQ-PCR Analysen durchgeführt (b). Nach Isolation der RNA aus wildtyp (schwarze Balken), heterozygoten (graue Balken) und knockout (weiße Balken) Mef-Zelllinien und dem anschließenden Umschreiben in cDNA wurde diese analysiert. Die verschiedenen amplifizierten Teilstücke von *Smif*, angegeben in Basenpaaren, sind der Beschriftung zu entnehmen.

Das wildtyp Allel kann zudem mit dem Primerpaar w/b nachgewiesen werden, wohingegen das Primerpaar n/b nur an die mutierte DNA binden kann (Abb. 3.3c). Zusätzlich wurden Southern Blot Analysen von genomischer DNA durchgeführt, um den *Smif* Genlokus zu überprüfen (Abb. 3.3a). Nach Inkubation der DNA mit dem Restriktionsenzym EcoR1, Transfer der gelelektrophoretisch

aufgetrennten DNA auf eine Nylon-Membran und Bindung der radioaktiv-markierten 3'-Sonde an das komplementäre Teilstück des *Smif* Genlokus, konnte eine Bande von 6,9 kb für das wildtyp Allel detektiert werden, während sich durch Einführen einer neuen *EcoR1* Schnittstelle für das knockout Allel eine Bande bei 3.1 kb ergab (Abb. 3.1 und Abb. 3.3a). Auch die Sequenzierung des *Smif* Gens zeigte einen Erfolg der Strategie auf DNA Ebene.

Das Fehlen von *Smif* wurde in knockout Zellen auf mRNA Ebene überprüft. Aus Hoden bzw. Mef-Zelllinien isolierte RNA wurde zu diesem Zwecke exemplarisch für die gesamte Maus mittels Northern Blot und quantitativer RT-PCR analysiert (Abb. 3.4). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der gewonnenen RNA und anschließendem Transfer auf eine Nylon-Membran wurde diese mit einer zu *Smif* komplementären, radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. Der Northern Blot zeigt deutlich, dass keine *Smif* mRNA in knockout Zellen vorhanden ist (Abb. 3.4a). Die Menge an geladener RNA der unterschiedlichen Proben wurde anhand der Menge an β -Aktin ermittelt. Variationen der geladenen RNA konnten so ausgeschlossen werden. Die Daten wurden in einer semi-quantitativen PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dazu wurden die Primer so gewählt, dass ein Produkt nur dann entstehen kann, wenn mRNA von *Smif* vorhanden ist oder ein Fragment bestehend aus Exon 1 bis 6. Im Gegensatz zu wildtyp RNA konnte in keiner getesteten knockout Probe ein PCR-Produkt detektiert werden. Gleiche Mengen an eingesetzter RNA in jeder Reaktion wurde durch den Nachweis von β -Aktin gewährleistet.

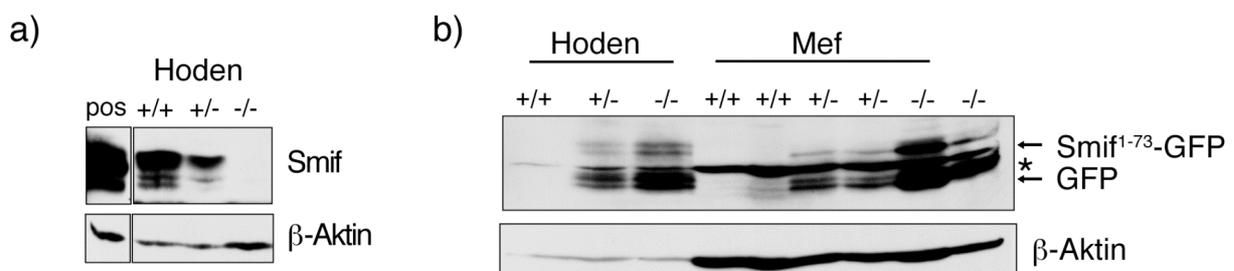


Abb. 3.5: Die Expression des *Smif*-Proteins. Hodenlysate und Lysate aus Mef-Zelllinien von knockout (-/-), heterozygoten (+/-) und wildtyp (+/+) Mäusen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung a) zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem α -*Smif*-Antikörper und einem Antikörper gegen β -Aktin auf der gleichen Membran. Als Positivkontrolle wurden Lysate aus Phoenix-Zellen aufgetragen, die zuvor mit *Smif* transient transfiziert worden sind (linke Spur). In b) ist die immunchemische Darstellung der Proteine mit einem α -GFP- und α - β -Aktin-Antikörper auf der gleichen Membran gezeigt.

In einer quantitativen PCR wurde die aus knockout Zellen gewonnene RNA auf das Vorhandensein von Smif-Fragmenten getestet (Abb. 3.4b). Dazu wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und in einer quantitativen PCR unter Verwendung der in Abb. 3.4b angegebenen Primerpaare eingesetzt. Interessanterweise konnte ein Smif-Transkript, das die Basenpaare 95-201 umfasst, in Mef knockout Zellen nachgewiesen werden. Abgeleitet aus der Rekombinationsstrategie und den Ergebnissen der RTQ-PCR, besteht die vorhandene Smif mRNA aus den ersten 219 Basenpaaren und somit aus der genetischen Information von Exon 1 und einem Teil von Exon 2.

Auf Proteinebene konnte Smif in Hodenlysaten nicht immunchemisch mit einem α -Smif-Antikörper detektiert werden (Abb. 3.5a).

Die Expression von Smif ist ubiquitär, in Hoden und Herz wird Smif jedoch stärker exprimiert als in den anderen getesteten Geweben (Abb. 3.17). Die Daten aus der RTQ-PCR gaben Hinweis auf die Existenz der N-terminalen Aminosäuren 1-73 (Smif¹⁻⁷³). Das Epitop, gegen das der α -Smif-Antikörper gerichtet ist, umfasst die Aminosäuren 186-266 des humanen Smif-Proteins. Das Smif¹⁻⁷³-Fragment kann mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden. Somit konnte mit diesem Experiment die Frage, ob Smif¹⁻⁷³ exprimiert wird, nicht beantwortet werden.

Die Verwendung eines α -GFP-Antikörpers hingegen zeigte eine weitere spezifische Bande im Western Blot in den knockout Proben, die ungefähr 10 kDa größer ist als GFP alleine (Abb. 3.5b). Diese Beobachtung bestätigte die Vermutung, dass ein Teil von Smif exprimiert wird. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus Smif¹⁻⁷³ und GFP. Dies konnte in siRNA Experimenten gezeigt werden. Wildtyp Mef wurden mit je einer von drei siRNAs, die gegen das murine Smif designt wurden, transient transfiziert. Die Effizienz des knockdowns wurde in RTQ-PCR und Western Blot ermittelt (Abb. 3.6). siRNA1, die gegen Exon 7 gerichtet ist, reguliert Smif zu 80% herunter. siRNA2, gerichtet gegen Exon 5, zeigt einen knockdown von 50% im Western Blot, ebenso siRNA3, die gegen Exon 1 gerichtet ist. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA beeinflusste die Smif Expression hingegen nicht. Knockout Mef, die transient mit der Kontroll-siRNA oder siRNA1 oder 2 transfiziert wurden, exprimieren sowohl GFP als auch das Fusionsprotein Smif¹⁻⁷³-GFP (Abb. 3.6, Spur 2, 3 und 4). Bei Verwendung der siRNA3, die komplementär zu der für Exon 1 kodierenden mRNA ist, fehlen hingegen sowohl die GFP als auch die Smif¹⁻⁷³-GFP Bande (Abb. 3.6, Spur 5). Daraus lässt sich folgern, dass in Smif-defizienten Zellen ein Fusionsprotein bestehend aus Smif¹⁻⁷³ und GFP existiert.

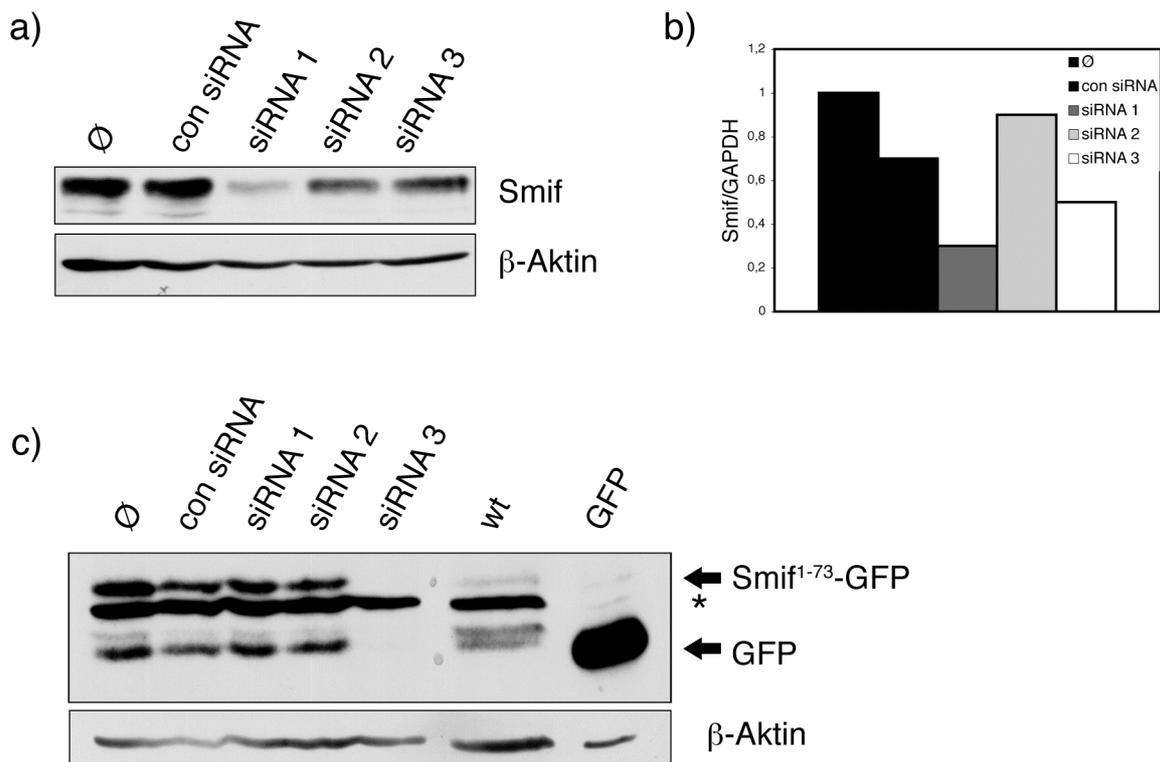


Abb. 3.6: siRNA, gerichtet gegen Exon1 von Smif, führt zur Herunterregulation von Smif in wildtyp Zellen und von GFP und Smif¹⁻⁷³-GFP in knockout Mef. Mef-Zelllinien wurden entweder mit Smif-spezifischer siRNA (siRNA1-3) oder Kontroll siRNA (con siRNA) transfiziert. 36 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert oder zur RNA Isolation eingesetzt. Abbildung a) zeigt die immunchemische Darstellung von Smif nach vorheriger gelelektrophoretischer Auftrennung der Lysate im Western Blot. Als Ladungskontrolle wurde auf der gleichen Membran β -Aktin nachgewiesen. In c) ist der immunchemische Nachweis von GFP und als Kontrolle β -Aktin dargestellt. β -Aktin dient in beiden Fällen als interne Ladungskontrolle. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurde die Menge an Smif Transkript quantitativ in Duplikaten in einer RTQ-PCR bestimmt (b). Die dargestellten Ergebnisse wurden auf das Kontrollgen GAPDH normiert.

3.1.3.1 Die Charakterisierung des Fusionsproteins Smif¹⁻⁷³-GFP

Expressionsanalysen von Smif in der F2 Generation haben gezeigt, dass in Smif-defizienten Mäusen die Aminosäuren 1-73 von Smif exprimiert werden.

Aus Experimenten mit Deletionsmutanten von Smif konnte die Smad4-Bindungsdomäne identifiziert werden.³¹ Die ersten 100 AS des humanen Smif sind ausreichend für eine Interaktion mit Smad4. Zudem zeigen Sequenzvergleichsanalysen zwischen humanem Smif und Dcp1p aus Hefe Homologien zwischen Dcp1p und dem N-Terminus von Smif. Aus diesen Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die Interaktion zwischen dem N-Terminus von Smif und Dcp2 stattfindet. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das in Smif-defizienten Mäusen exprimierte Fragment eine biologische Funktion, sowohl als Transkriptionsaktivator im TGF β Signalweg als auch als Decapper zur Regulation von mRNA haben könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde

getestet, ob eine Interaktion zwischen Smif¹⁻⁷³ und Smad4 bzw. Dcp2 *in vitro* möglich ist (Abb. 3.7). Hierfür wurden Phoenix-Zellen entweder mit HA-Smad4 oder myc-Dcp2 transient transfiziert. Anschließend wurden die entsprechenden Lysate in GST-Bindungsexperimenten eingesetzt. Während sowohl Smad4 als auch Dcp2 an die GST-Smif-Sepharose binden können (Abb. 3.7a, Spur3 und Abb. 3.7b, Spur4), ist keine Bindung von Dcp2 an die GST-Smif¹⁻⁷³-Sepharose zu detektieren (Abb. 3.7b, Spur 3). Im Vergleich zu GST-Smif interagiert Smad4 mit der GST-Smif¹⁻⁷³-Sepharose *in vitro* nur sehr viel schwächer (vergleiche Abb. 3.7a, Spur 3 mit 4). Die nachgewiesenen Bindungen in diesem Experiment sind spezifisch, da in der Kontrolle mit GST-Sepharose kein Smad4 bzw. Dcp2 im Pulldown vorhanden ist (Abb. 3.7a+b je Spur 2). Die Amidoschwarzfärbung der Membran zeigt den Einsatz gleicher Mengen an GST- bzw. GST-Smif-Sepharose in allen Ansätzen.

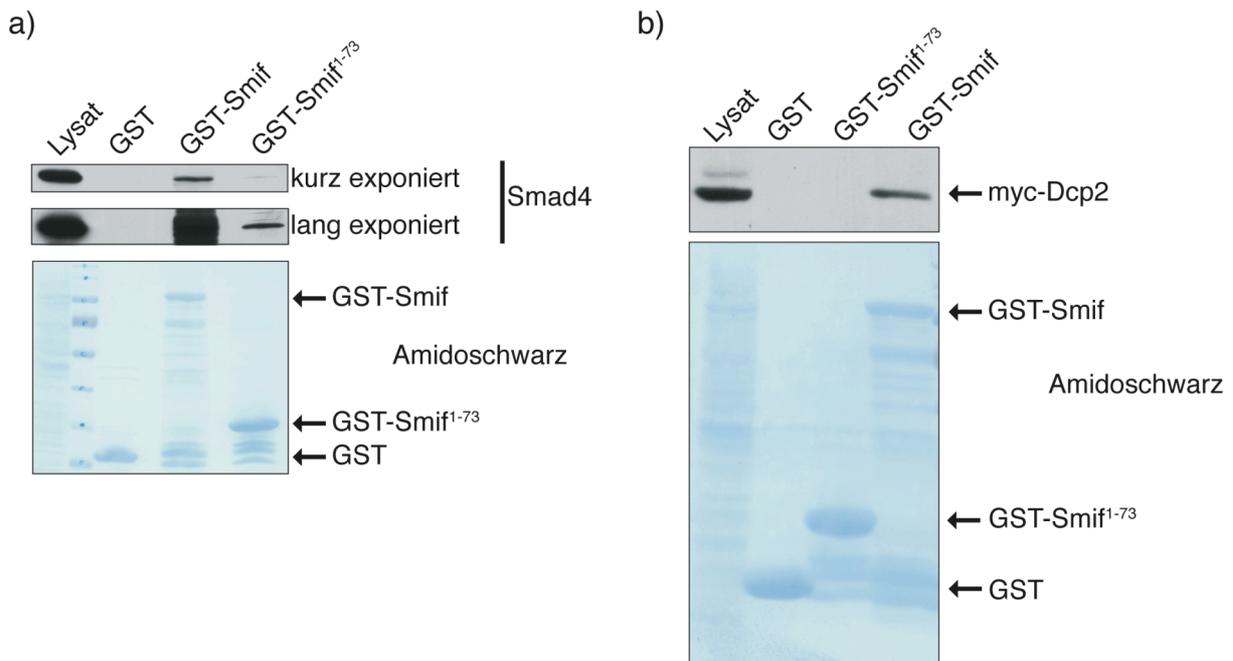


Abb. 3.7: Smif¹⁻⁷³ kann Smad4 binden, für die Bindung an Dcp2 sind die ersten 73 AS nicht ausreichend. Phoenix-Zellen wurden transient mit entweder Smad4 (a) oder Dcp2 (b) transfiziert. Die Lysate wurden mit GST-, GST-Smif oder GST-Smif¹⁻⁷³-Sepharose inkubiert und die gebundenen Proteinkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung von Smad4 (a) und Dcp2 (b) in den Lysaten (linke Spur), sowie die gebundenen Proteinkomplexe (rechte Spuren) und eine Amidoschwarzfärbung der Membran zur Visualisierung der Menge an eingesetztem GST-Protein.

Decapping findet in so genannten P-bodies statt.⁵⁵ Smif ist, als Teil des Decappingkomplexes, in diesen cytoplasmatischen Strukturen innerhalb der Zelle lokalisiert.^{34, 35} P-bodies können durch Ultrazentrifugation in der P50 Fraktion angereichert werden.¹¹⁶ Für Fraktionierungsexperimente

wurden knockout Mef lysiert und in einem ersten Zentrifugationsschritt größere Zellfragmente abgetrennt (P; Abb. 3.8 Spur5). Der Überstand (S; Abb. 3.8 Spur 4) wurde in einer Ultrazentrifuge bei 50.000 g für 60 Minuten zentrifugiert. Das so entstandene Sediment, die P50 Fraktion, wurde auf das Vorhandensein von Smif^{l-73}-GFP getestet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde GFP und Smif^{l-73}-GFP immunchemisch unter Verwendung eines α -GFP-Antikörpers detektiert (Abb. 3.8). Weder GFP noch Smif^{l-73}-GFP konnten in der P50 Fraktion (Abb. 3.8 Spur 6) nachgewiesen werden. Analog wurde das Experiment mit Lysaten aus wildtyp Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hier konnte, wie erwartet, eine Anreicherung von Smif in der P50 Fraktion gezeigt werden.

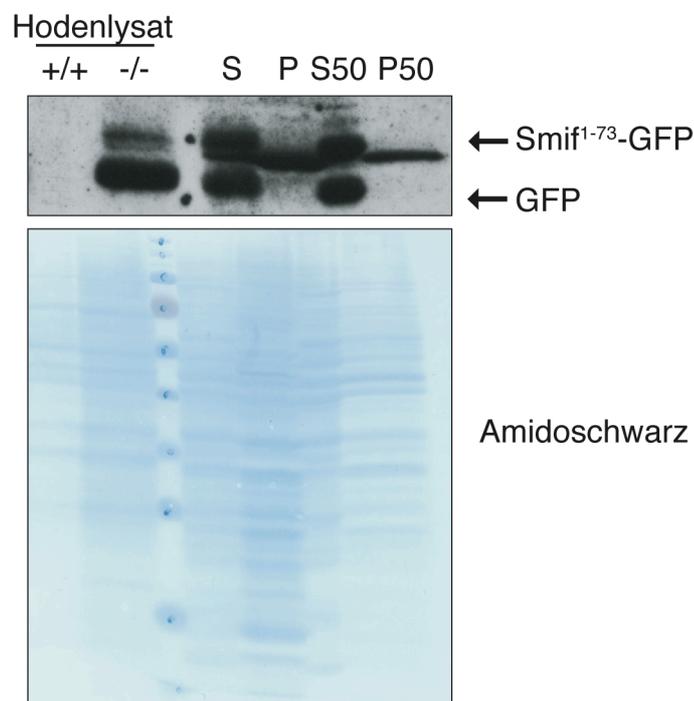


Abb. 3.8: Lokalisation von Smif^{l-73}-GFP innerhalb der Zelle. Aus Lysaten von immortalisierten knockout Mef wurden durch Ultrazentrifugation bei 50.000 g P-bodies in der P50 Fraktion angereichert. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot, die mit einem α -GFP-Antikörper detektiert wurden. Lysate aus Hoden von wildtyp (1. Spur) oder Smif-defizienten Mäusen (2. Spur) wurden als Negativ- bzw. Positivkontrolle verwendet. S: Überstand nach Lyse; P: Sediment nach Lyse; S50: Überstand nach der Ultrazentrifugation; P50: Sediment nach der Ultrazentrifugation

Smif^{l-73} kann folglich weder Dcp2 binden, noch weist es innerhalb der Zelle eine korrekte Lokalisation auf, um am Decapping in Smif-defizienten Zellen beteiligt zu sein. Im Gegensatz dazu kann Smif^{l-73} mit sehr geringer Affinität an Smad4 binden. Da diesem Fragment jedoch die transkriptionsaktivierende Domäne fehlt, ist eine Funktion im TGF β Signalweg auszuschließen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Daten ableiten, dass zwar ein Teil von Smif als GFP-Fusionsprotein exprimiert wird, dieses jedoch *in vivo* keine Funktionalität besitzt.

3.2 Charakterisierung Smif-defizienter Mäuse

3.2.1 Smif-defiziente Mäuse sind vital

Aus der Verpaarung von heterozygoten Mäusen der F1 Generation sollte nach der Mendelschen Vererbungslehre eine Nachkommenschaft von 25% wt, 50% he und 25% ko entstehen. Die Mendelsche Verteilung aus der Verpaarung heterozygoter Mäuse des generierten Mausstammes lag bei 26% wt (404), 57% he (869) und 17% ko (265). Interessanterweise war nur 1/3 der geborenen Smif-defizienten Mäuse weiblich.

Vergleiche von Geschwistern zeigten ein um 10-30% reduziertes Körpergewicht von Smif^{ko} im Vergleich zu wildtyp oder heterozygoten Wurfgeschwistern (Daten nicht gezeigt).

Die Überlebensrate der knockout Mäuse wurde über einen Zeitraum von 24 Monaten dokumentiert (Tabelle 3.1). Im Vergleich zu Smif^{wt} ist die Lebensspanne verkürzt. Wildtyp Mäuse werden unter den gegebenen Zuchtbedingungen älter als zwei Jahre. Smif-defiziente Mäuse hingegen sterben im Durchschnitt im Alter von 12 Monaten, wobei die individuelle Lebensdauer zwischen einem Monat und älter als 24 Monaten liegen kann (Tabelle 3.1). Erste klinische Anzeichen für die Verschlechterung des Allgemeinzustandes sind starker Gewichtsverlust, reduzierte Mobilität und eine gebuckelte Haltung. Bei einigen Tieren konnte zusätzlich eine Entzündung der Augen oder der Haut beobachtet werden.

Tabelle 3.1: Lebensspanne Smif-defizienter Mäuse. Smif-defiziente Mäuse wurden über 24 Monate beobachtet. Die Anzahl der verstorbenen Mäuse ist gegen das Alter in Monaten aufgetragen.

Monate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	>24
ko	4	-	1	1	3	1	3	-	2	3	-	-	1	5	4	3	4	2	1	-	1	2	2	1	3

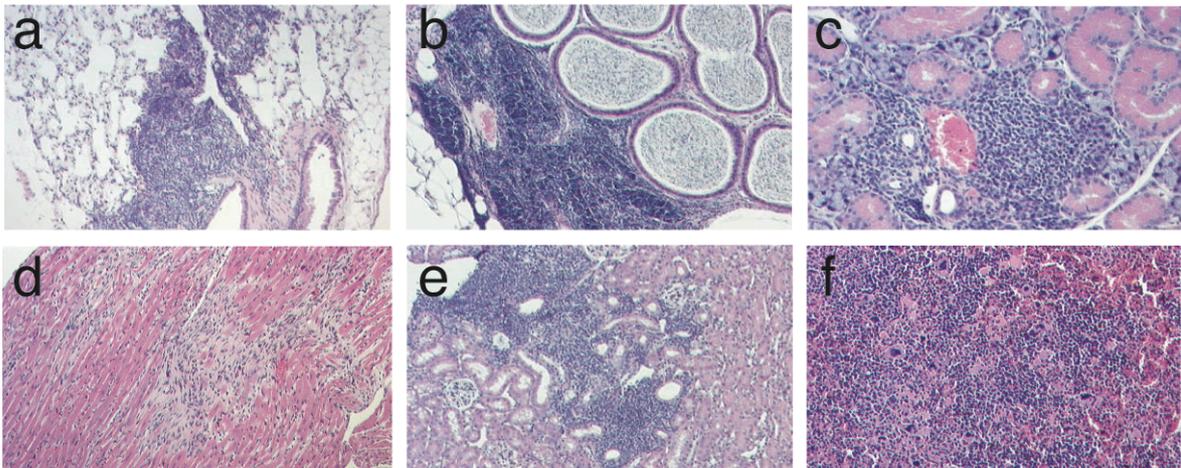


Abb. 3.9: Inflammatorische Infiltrate in verschiedenen Organen. Dargestellt ist eine repräsentative H&E Färbung von Paraffin-Gewebeschnitten von Lunge (a, 100x), Epididymus (b, 100x), Speicheldrüse (c, 200x), Herz (d, 100x), Niere (e, 100x) und Milz (f, 100x) aus $Smif^{ko}$ Mäusen.

3.2.2 Allgemein-pathologische Untersuchung $Smif$ -defizienter Mäuse

Um die Ursache für die verkürzte Lebensspanne der $Smif$ -defizienten Mäuse zu klären, wurden $Smif^{ko}$ einer allgemein-pathologischen Untersuchung unterzogen. Nach Fixierung der Mäuse in Formalin wurden die verschiedenen Organe in Paraffin gebettet. Die Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) angefärbt (Abb. 3.9). Alle untersuchten knockout Tiere zeigten inflammatorische Infiltrate von lymphatischen Zellen in verschiedenen Organen (Abb. 3.9). Dazu zählen unter anderem Herz, Lunge, Epididymus, Speicheldrüse, Niere und Milz. Wildtyp Geschwister wiesen keinerlei Anzeichen einer Erkrankung auf.

Darüberhinaus wies das Herz der $Smif^{ko}$ degenerative Veränderungen im Myocardium auf. Eine Fibrosierung im Herzgewebe könnte ein Anzeichen für abgelaufene Myokardinfarkte sein, welche im Falle von größeren oder mehreren, aufeinander folgenden Infarkten eine mögliche Todesursache von $Smif$ -defizienten Mäusen sein könnten (Daten nicht gezeigt).

In männlichen $Smif^{ko}$ konnte zudem eine fokale Hodenathrophie beobachtet werden, die mit einer subtilen Hyperplasie der Leydig-Zellen einhergeht (Daten nicht gezeigt). Verpaarungen von $Smif$ -defizienten Mäusen in einem Alter von 6-8 Wochen mit C57BL/6 Mäusen zeigten jedoch, dass sowohl weibliche als auch männliche Mäuse fertil sind.

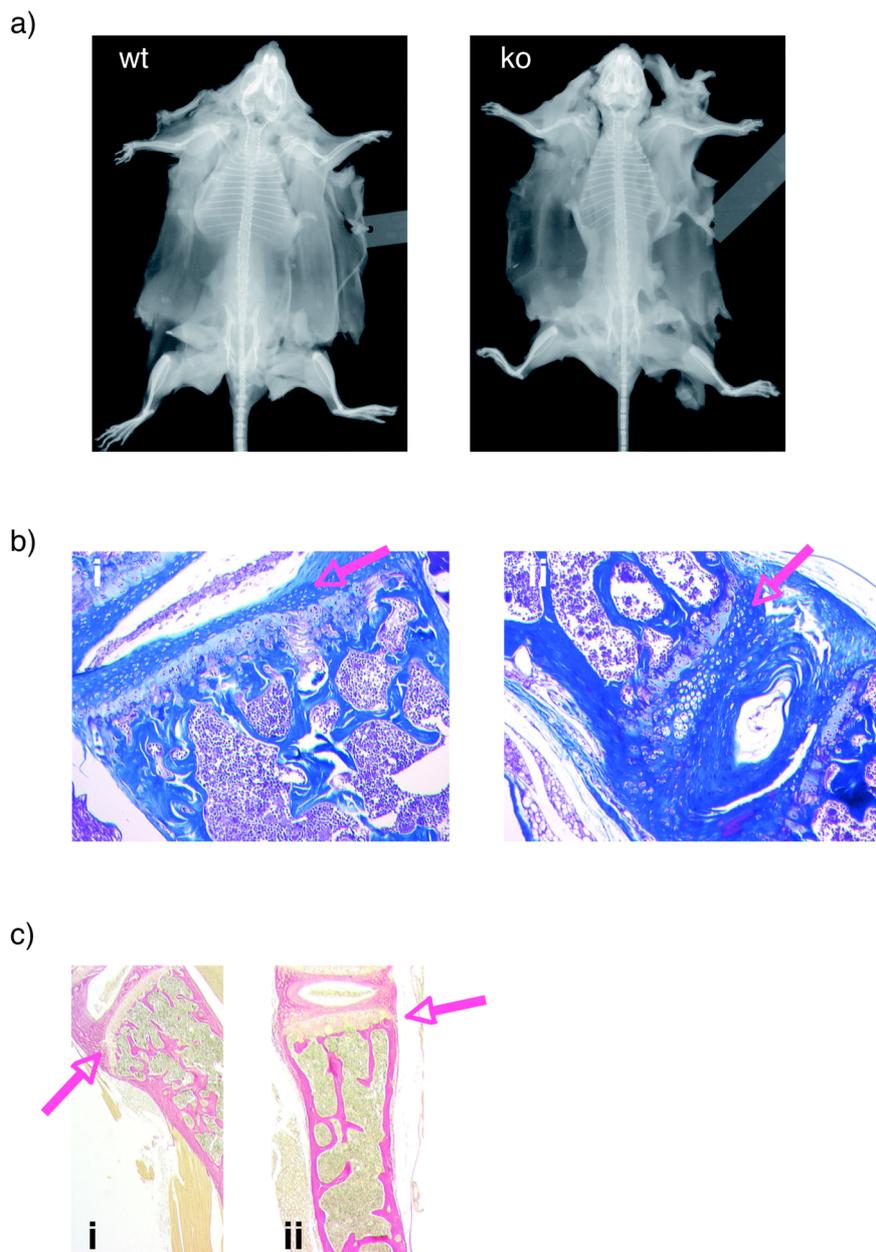


Abb. 3.10: Der Knochenaufbau in Smif-defizienten Mäusen. Röntgenbilder von einer wildtyp Maus (linkes Bild) und einer Smif-defizienten Maus (rechtes Bild) sind in Abbildungsteil a) gezeigt. In b) sind Schnitte der Wirbelsäule einer repräsentativen Smif-defizienten Maus (ii) und einer Kontrollmaus (i) nach Färbung mit Trichrom nach Masson-Goldner abgebildet. Färbung der Schnitte nach van Gieson einer wildtyp Maus (i) und einer Smif-defizienten Maus (ii) sind im Abbildungsteil c) dargestellt. Die Pfeile weisen auf die Epiphysenfuge.

Zu den Mitgliedern der TGF β -Superfamilie zählen auch die *bone morphogenic proteins* (BMP), die neben anderen Aufgaben, wichtig für ein normales Knochenwachstum sind. Röntgenaufnahmen des Knochengestüts Smif-defizienter Mäuse zeigten jedoch keine morphologischen Veränderungen des Skeletts (Abb. 3.10a). In Schnitten der Wirbelsäule konnte eine Vergrößerung der Epiphysen-

fuge, dem Ort des Knochenwachstums, festgestellt werden (Abb. 3.10b). Im Femur ist ebenfalls eine leicht ausgedehnte Epiphysenfuge zwischen Epiphyse und Methaphyse zu erkennen (Abb. 3.10c). In einer von fünf untersuchten Smif-defizienten Maus konnte eine Osteosklerose festgestellt werden, wohingegen in keiner untersuchten Kontrollmaus ein übermäßiges Wachstum von Knochengewebe gefunden wurde. (Daten nicht gezeigt). Die weitere Untersuchung dieser Veränderung und somit die Rolle von Smif für die Regulation des Knochenwachstums wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet.

3.2.3 Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine Glomerulonephritis

Die H&E Färbungen von Paraffinschnitten der verschiedenen Organe, insbesondere der Niere aus Smif-defizienten Mäusen zeigten deutlich Infiltrationen von Immunzellen (Abb. 3.9).

Ein Großteil der Nierenerkrankungen werden durch Antikörper-vermittelte Prozesse verursacht. Dabei sind vorwiegend die Glomeruli betroffen. Eine Veränderung der Glomerulus Struktur in Smif^{ko} konnte durch die chemohistologische Reaktion von Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz (PAS) visualisiert werden (Abb. 3.11). Kontrollmäuse hingegen zeigten einen gesunden Glomerulus Aufbau.

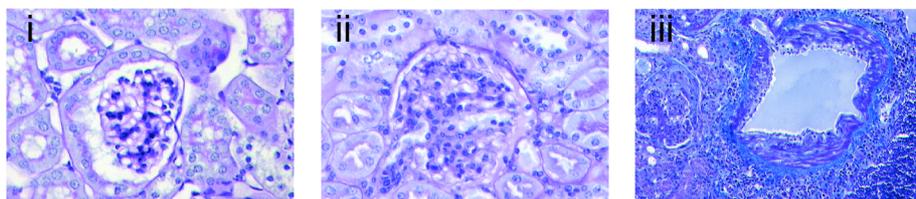


Abb. 3.11: Histologische Schnitte der Niere. Dargestellt sind PAS-Färbungen von Paraffin-Gewebeschnitten der Niere von wildtyp (i) und knockout (ii) Mäusen. Die Niere von Smif-defizienten Mäusen wurde zusätzlich mit Trichrom nach Masson-Goldner angefärbt (iii).

Die Färbungen mit Trichrom nach Masson-Goldner zur differenzierten Anfärbung der Bindegewebskomponenten in der Niere Smif-defizienter Mäuse wies auf eine Vaskulitis, eine Entzündung der Kapillaren durch autoimmunologische Prozesse, hin (Abb. 3.11ii und iii). Semi-feine Schnitte und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nieren aus knockout Mäusen sollten über die Ursache der Glomerulonephritis Aufschluss geben. In Feingewebschnitten waren aktivierte Lymphozyten im Kapillarlumen der Glomeruli erkennbar (siehe Pfeile in Abb. 3.12a). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, im Gegensatz zu den Kontrollnieren, eine Fusion der

Fußfortsätze der viszeralen Epithelzellen zusammen mit einer Verdickung der Basalmembran. Diese durch intramembranäre Ablagerungen von Immunkomplexen verursachte Verdickung der Membran ist als elektronendichte Region (*dense deposits*) in den elektronenmikroskopischen Bildern erkennbar (Abb. 3.12b). In keiner der untersuchten Kontrollmäuse konnten derartige pathologische Veränderungen festgestellt werden.

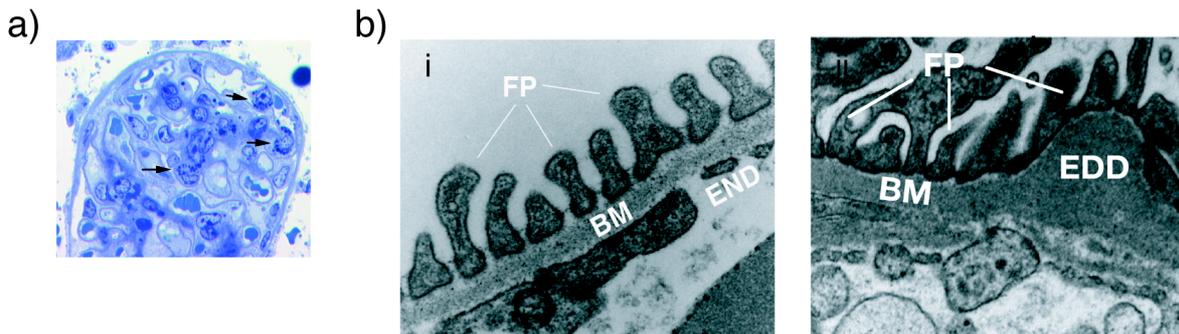


Abb. 3.12: Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine Glomerulonephritis. Abbildung a) zeigt einen repräsentativen, semi-feinen Schnitt der Niere einer Smif-defizienten Maus. Die Pfeile weisen auf aktivierte Lymphozyten in den Kapillaren des Lumens eines Glomerulus. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Niere sind in b) exemplarisch von einer wildtyp (i) und einer knockout Maus (ii) gezeigt. FP: Fußfortsätze; BM: Basalmembran; END: Endothelium; EDD: *electron dense deposits*

Häufig kommt es durch die glomeruläre Schädigung zu einer erhöhten Filtration von Proteinen aus dem Blut, was eine Proteinurie zur Folge hat. Der Proteingehalt im Urin von Smif^{ko} und Smif^{wt} Mäusen wurde mit Hilfe von Urinsticks bestimmt. Eine Konzentration von ≥ 300 mg/dl wurde als Grenzwert zugrunde gelegt. Im Urin von sieben der dreizehn getesteten knockout Mäuse konnte eine erhöhte Proteinkonzentration nachgewiesen werden, wohingegen die Proteinkonzentration im Urin bei allen getesteten wildtyp Mäusen unter diesem Grenzwert lag (Tabelle 3.2).

Insgesamt zeigt der histologische Befund der Niere eine proliferative Glomerulonephritis in Smif-defizienten Mäusen, die durch diffuse Proliferation und Einlagerung von Immunkomplexen gekennzeichnet ist. Als Folge dieser autoimmunologischen Erkrankung kommt es zur Proteinurie.

Tabelle 3.2: Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine Proteinurie. Der Proteingehalt im Urin von Mäusen wurde unter Verwendung von Urinsticks bestimmt. Ab einem Wert von ≥ 300 mg/dl spricht man von einer Proteinurie.

Protein ≥ 300 mg/dl	
wt	0/9
ko	7/13

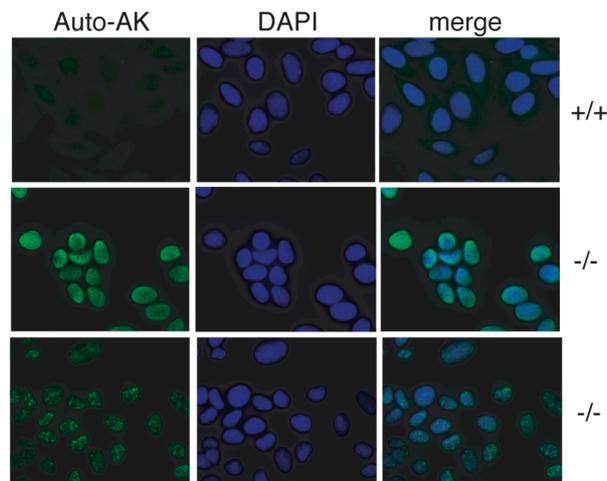


Abb. 3.13: In Smif-defizienten Mäusen sind Autoantikörper nachweisbar. HEp-2 Zellen wurden mit Serum aus wildtyp (+/+) (obere Reihe) oder knockout (-/-) (untere Reihen) Mäusen inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen folgte eine Inkubation mit einem FITC-gekoppelten α -total-Ig-Antikörper. Als Kontrolle wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. Dargestellt sind repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen für beide Gruppen.

3.2.4 Der Nachweis von Autoantikörpern in Smif-defizienten Mäusen

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, entwickeln Smif-defiziente Mäuse eine Glomerulonephritis, die durch die Einlagerung von Immunkomplexen in der Basalmembran charakterisiert ist. Histologisch konnte zudem gezeigt werden, dass die verschiedenen Organe in Smif^{ko} von inflammatorischen Infiltraten durchzogen sind (Abb. 3.9). Zusammengenommen sind dies typische Anzeichen einer Autoimmunerkrankung. Die verschiedenen, systemischen Autoimmunopathien sind mit der Produktion charakteristischer Autoantikörper assoziiert. Zum Nachweis von Autoantikörpern in Smif-defizienten Mäusen wurde diesen Blut entnommen, aus dem Serum gewonnen wurde. Auf einem Objektträger fixierte HEp-2 Zellen wurden mit den Seren der Mäuse inkubiert und die für Autoantikörper typischen Muster in der Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 3.13). Dazu wurden nach Seruminkubation und ausgiebigem Waschen die Zellen mit einem FITC-konjugierten α -total-Ig-Antikörper inkubiert. Während in keiner getesteten Serumprobe aus wildtyp Mäusen Autoantikörper detektiert werden konnten, waren sechs von 22 untersuchten Proben von Smif^{ko} in der Immunfluoreszenz positiv. Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Mäuse und dem Auftreten von Autoantikörpern konnte beobachtet werden. Die typischen Muster, die eine erste Einordnung der Spezifitäten der Autoantikörper ermöglichen, unterscheiden sich zwischen den Smif-defizienten Mäusen (vgl. die in Abb. 3.13 dargestellten Beispiele für Smif^{ko}). Es wurden sowohl grobgranuläre als auch nukleäre Muster gefunden. Der spezifische Nachweis von Auto-

antikörpern gegen einzelsträngige und doppelsträngige DNA lieferte einen negativen Befund (Daten nicht gezeigt).

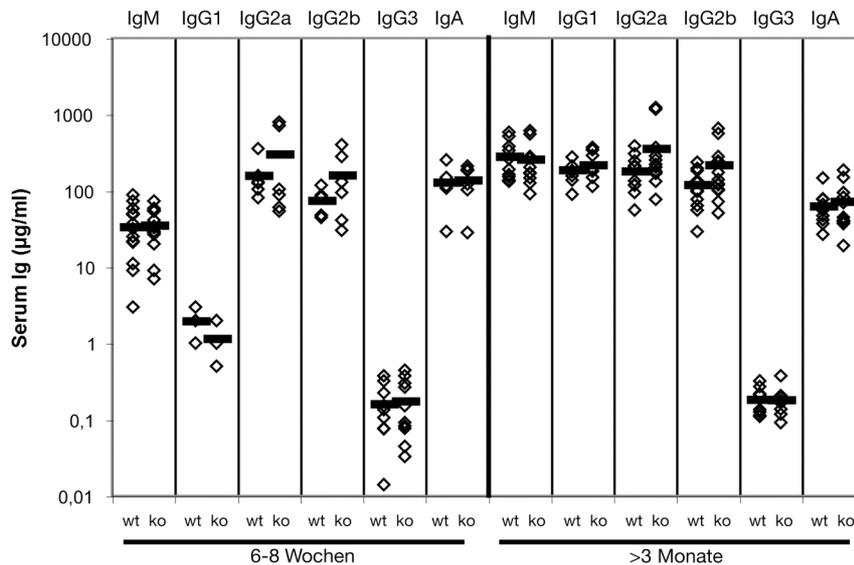


Abb. 3.14: Bestimmung der basalen Immunglobulinkonzentrationen. Die basalen Level der verschiedenen Immunglobulin Isotypen wurden im Serum von jungen (6-8 Wochen, linker Abbildungsteil) und älteren (>3 Monate, rechter Abbildungsteil) Mäusen in ELISA-Messungen ermittelt. Jede Raute steht für eine Maus, die horizontalen Striche geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe (wildtyp bzw. knockout) an.

3.2.5 Die basalen Immunglobulinlevel in Smif-defizienten Mäusen sind nicht verändert

Der Nachweis von Autoantikörpern warf die Frage auf, ob Smif-defiziente Mäuse bereits basale Unterschiede in den unterschiedlichen Immunglobulinklassen im Serum haben. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Konzentration der Immunglobuline im Serum von knockout und wildtyp Mäusen in ELISA-Messungen bestimmt (Abb. 3.14). Als Standard dienten die jeweiligen Immunglobuline bekannter Konzentration. Es konnte weder in jungen (6-8 Wochen) noch in älteren (>3 Monaten) Mäusen ein Unterschied in den basalen Konzentrationen der Immunglobuline IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.14). Demzufolge weisen Smif-defiziente Mäuse keinen Defekt in der Produktion von Antikörpern der unterschiedlichen Klassen per se auf. Die Produktion von Autoantikörpern wird daher durch eine andere Fehlregulation verursacht.

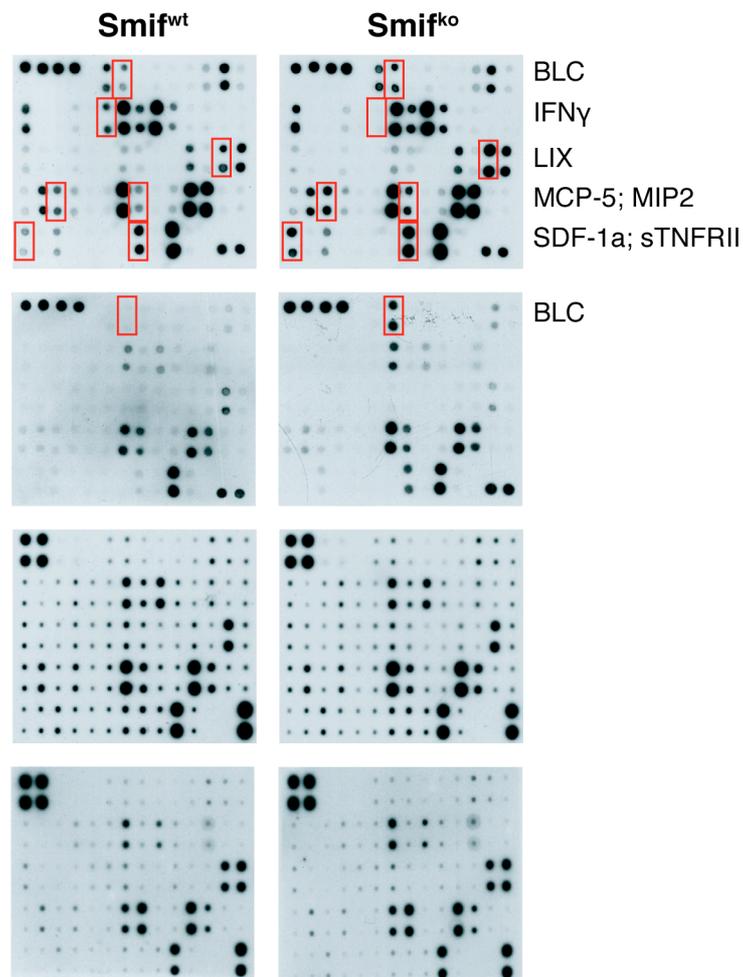


Abb. 3.15: Die quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Serum Smif-defizienter Mäuse. Unter Verwendung der „rayBio® Mouse Cytokine Antibody Array III“ wurden die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine im Serum von je vier knockout (rechte Spalte) und wildtyp Mäusen (linke Spalte) bestimmt. In roten Kästchen sind diejenigen Zytokine eingrahmt, die sich zwischen den Pärchen aus Smif^{ko} und der dazugehörigen Kontrolle unterscheiden.

3.2.6 Zytokinkonzentrationen in Smif-defizienten Mäusen

Die Aktivierung des Immunsystems kann mit einer veränderten Konzentration an Zytokinen verbunden sein. Neben einer Aktivierung von Zellen durch Zell-Zell-Kontakte ist die Stimulation durch proinflammatorische Zytokine ein wichtiger Regulationsmechanismus. Daher wurden im folgenden Experiment die Konzentration der verschiedenen Zytokine bestimmt.

Serum aus Smif-defizienten Mäusen und geeigneten Kontrollmäusen wurden in einem Zytokin-array, der auf einen Sandwich-ELISA basiert, analysiert. Die quantitative, immunchemische Detektion der einzelnen Zytokine ist in Abb. 3.15 für je vier Individuen pro Gruppe dargestellt. In zwei Smif-defizienten Mäusen konnte ein Unterschied in den Zytokinkonzentrationen einzelner

Zytokine (rote Kästchen) detektiert werden. Übereinstimmend in den beiden Proben ist nur eine Erhöhung von BLC (*B lymphocyte chemoattractant*, CXCL13) im Serum.

Gesondert wurde die Konzentration an TGF β im Serum ermittelt, da das Zytokin nicht auf den Membranen inkludiert war. Die mit Hilfe von ELISA ermittelten basalen Level an TGF β zeigten eine leichte Erhöhung der TGF β -Konzentration im Serum Smif-defizienter Mäuse (Abb. 3.16). Dies stellt einen möglichen Regulationsmechanismus dar, der das Fehlen von Smif zu einem gewissen Maße auszugleichen versucht.

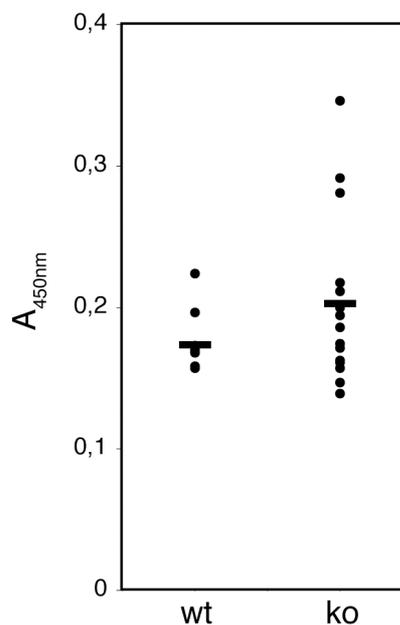


Abb. 3.16: Bestimmung der TGF β 1 Konzentration im Serum. Die Bestimmung der Konzentrationen an TGF β 1 im Serum von Smif-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollen wurde mittels TGF β 1 ELISA durchgeführt. Dargestellt sind die gemessenen Absorptionen der verschiedenen Mäuse, die als Punkte dargestellt sind. Der Balken stellt den Mittelwert dar. Der durch einen Student'schen T-Test berechnete p-Wert ist $< 0,093$.

Die Expression von Zytokinen in der Milz und in den Lymphknoten wurde zudem in einer Reihe von quantitativen RTQ-PCR-Reaktionen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Zu den untersuchten Zytokinen zählen: TNF α , IFN γ , iNos, MCP-1, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17 und IL-18. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Mengen an getesteten Zytokinen zwischen wildtyp und knockout Proben beobachtet werden.

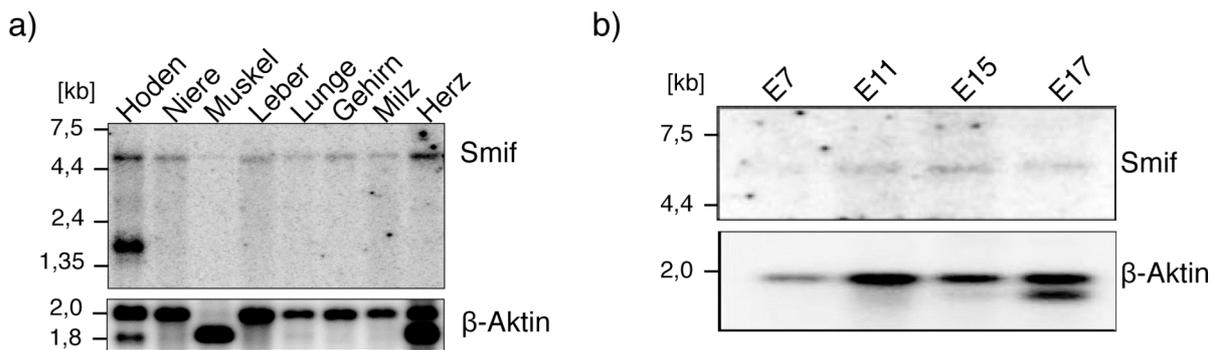


Abb. 3.17: Expressionsanalyse von Smif in der Maus. Auf einer Membran immobilisierte RNA aus murinem Gewebe (a) oder aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (b) wurde mit einer radioaktiv-markierten 800 bp Sonde, die komplementär zur Smif mRNA ist, hybridisiert. Als Kontrolle wurden die Membranen nach Entfernung der ersten Sonde mit einer zweiten Sonde hybridisiert, die komplementär zu β -Aktin ist. β -Aktin dient als Kontrolle für die geladenen RNA Menge. In der Abbildung dargestellt sind die Autoradiographien der Northern Blots.

3.2.7 Das Expressionsmuster von Smif in der Maus

Ausgehend von den ausgeprägten pathologischen Veränderung in Smif-defizienten Mäusen stellte sich die Frage, worin deren zellulären und molekularen Ursachen liegen. Eine Untersuchung der Expression von Smif in verschiedenen Organen, in verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus und in unterschiedlichen Zelltypen ermöglicht eine erste Einschränkung. Aus diesem Grund wurde das Expressionsmuster von Smif in der Maus in Northern Blot Analysen ermittelt (Abb. 3.17). Dazu wurde auf einer Membran immobilisierte RNA aus verschiedenen murinen Geweben und aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien auf für Smif-kodierende mRNA untersucht. Diese Membranen wurden mit einer radioaktiv-markierten Smif-Sonde hybridisiert. Die Smif RNA konnte nach Exposition der Membranen auf einem *Phospho-Imager-Screen* autoradiographisch dargestellt werden. Die mRNA von Smif hat eine Größe von 5 kb. Nach Entfernen der Smif-spezifischen Sonde wurde dieselbe Membran mit einer zweiten radioaktiv-markierten Sonde inkubiert. Diese Sonde war komplementär zu der für β -Aktin-kodierenden RNA. Die Bandenintensität der β -Aktin RNA ermöglicht den Abgleich der geladenen RNA Gesamtmenge der einzelnen Proben untereinander. Smif wird in allen getesteten Geweben exprimiert, besonders stark in Hoden und Herz, wohingegen in Muskelgewebe die Smif Expression gering ist. Eine intermediäre Expression konnte in Niere, Leber, Lunge, Gehirn und Milz detektiert werden (Abb. 3.17a). In embryonalen Zellen konnte Smif in E.7, E11, E15 und E.17 nachgewiesen werden (Abb. 3.17b).

In situ Hybridisierungen von C57BL/6 Embryonen unter Verwendung einer Smif-Sonde bestätigten eine ubiquitäre Expression von Smif in der Maus (Abb. 3.18).

Smif wird demnach sowohl in der Embryogenese als auch in der adulten Maus ubiquitär exprimiert (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Smif-defiziente Mäuse sind viabel, somit ist Smif nicht essentiell für die Embryogenese, da es sonst zu einem letalen Phänotyp kommen würde.

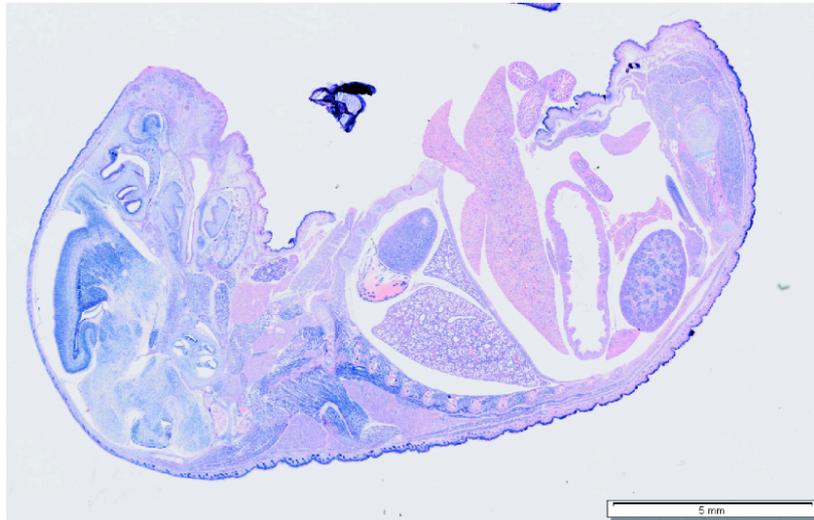


Abb. 3.18: Nachweis der Smif Expression in Mausembryonen. *In situ* Hybridisierung eines C57BL/6 Embryos des Entwicklungsstadiums E15.5.

Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine Autoimmunerkrankung, die mit inflammatorischen Infiltraten, Glomerulonephritis und der Produktion von Autoantikörpern assoziiert ist (Abb. 3.9, Abb. 3.11, Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Dieser autoimmunologische Phänotyp lenkte das besondere Interesse auf die Expression von Smif in lymphatischen Geweben, Knochenmark und Leukozyten. Zur Beantwortung der Frage, ob Smif in diesen Geweben/Zellen vorhanden ist, wurde zum einen Smif im Western Blot immunchemisch detektiert und zum anderen das in das Genom eingeführte GFP unter der Kontrolle des endogenen Smif-Promoters zur Detektion der Smif Expression genutzt. Knockout beziehungsweise heterozygote Zellen, deren Smif-Promoter aktiv ist, exprimieren GFP. Das wiederum kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Nach Aufreinigung der Leukozytenpopulationen wurden dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen, B- und T-Zellen aus wildtyp Mäusen lysiert. Die Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde Smif unter Verwendung eines α -Smif-Antikörpers immunchemisch nachgewiesen (Abb. 3.19a). Alle getesteten Leukozyten exprimieren Smif. Obwohl die Bandenintensität für die Kontrolle β -Aktin gleich ist und somit in allen Spuren die gleiche Menge an Gesamtprotein geladen worden ist, ist die Smif Bande im Makrophagenlysat (Abb. 3.19, Spur 5) im Vergleich zu den anderen getesteten Zelltypen (B- und T-Zellen, NK und

dendritischen Zellen) geringer. Somit exprimieren Makrophagen Smif viel schwächer als alle anderen, getesteten Leukozyten.

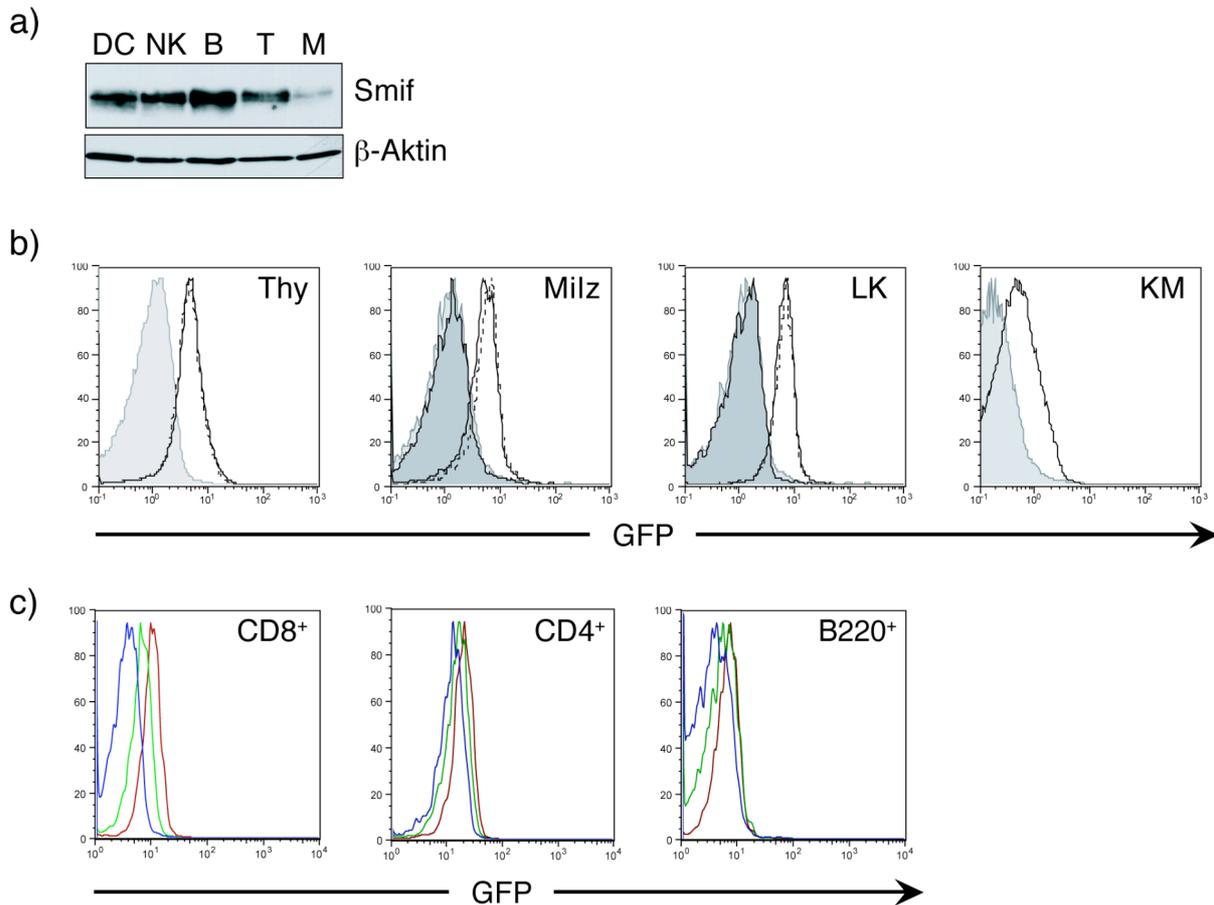


Abb. 3.19: Smif Expression in Leukozyten, lymphatischen Geweben und Knochenmark. (a) Die unterschiedlichen Leukozyten wurden aus wildtyp Mäusen isoliert, lysiert und die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylon-Membran konnte Smif immunchemisch mit Hilfe eines α -Smif-Antikörpers nachgewiesen werden. Nach Entfernen des Erstantikörpers wurde die aufgetragene Gesamtproteinmenge durch Detektion von β -Aktin kontrolliert. Nach Organentnahme wurde aus Thymus (Thy), Milz und Lymphknoten (LK) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Das Knochenmark (KM) wurde durch Spülen von Femur und Tibia gewonnen. Nach Osmolyse der Erythrozyten wurde die GFP-Expression stellvertretend für die Smif-Expression durchflusszytometrisch bestimmt (b). Dargestellt sind die exemplarischen Histogramme von je zwei wildtyp (grau-ausgefüllte Kurven) und knockout Mäusen (schwarze Linien). In (c) ist die Expression von GFP in CD4⁺, CD8⁺ und B220⁺ Milzzellen exemplarisch für je eine wildtyp (blaue Kurve), eine heterozygote (grüne Kurve) und eine knockout Maus (rote Kurve) dargestellt. DC: dendritische Zellen, NK: natürliche Killerzellen, B: B-Zellen, T: T-Zellen, Thy: Thymus, LK: Lymphknoten, KM: Knochenmark

Aus den lymphatischen Geweben Thymus, Milz und Lymphknoten sowie aus Knochenmark wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Expression von GFP in viablen Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Die FACS-Analyse zeigt eine deutliche GFP-Expression in knockout Geweben (schwarze Linien), wohingegen in wildtyp Zellen, kein GFP exprimiert wird

(grau-ausgefüllte Kurven), da keine für GFP-kodierende DNA vorhanden ist (Abb. 3.19b). Um die Expression von Smif indirekt über die Expression von GFP in Lymphozyten nachzuweisen, wurde eine Einzelzellsuspension aus der Milz mit einem PE-konjugierten T-Zell-Marker (CD4 bzw. CD8) oder Pan-B-Zellmarker (B220/CD45R) angefärbt. Nach Ausschluss der toten und ungefärbten Zellen ist die GFP-Expression im repräsentativen Histogramm dargestellt (Abb. 3.19c). Wildtyp T- und B-Zellen (blaue Linie) sind GFP negativ, wohingegen sich das Abbild der knockout Zellen (rote Linie) nach rechts verschiebt. Zwischen beiden Kurven liegt die der heterozygoten Lymphozyten (grüne Linie), die die für GFP-kodierende DNA nur auf einem Allel besitzen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Smif in jedem Entwicklungsstadium und allen getesteten Geweben der Maus ubiquitär exprimiert wird. Auch in allen getesteten Immunzellen ist Smif nachweisbar. Zusammen mit dem beobachteten Autoimmunphänotyp Smif-defizienter Mäuse spricht dies für eine essentielle Rolle von Smif in der Regulation des Immunsystems *in vivo*.

3.2.8 Die Verteilung von Leukozyten in Smif-defizienten Mäusen

3.2.8.1 Die Verteilung myeloider Zellen in Smif-defizienten Mäusen

Die Unterscheidung von Zellen der myeloiden Linie wurde mit Hilfe der Antikörper gegen CD11b und Gr-1 durchgeführt. Während Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen das Integrin CD11b auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist Gr-1 spezifisch auf Granulozyten zu finden. In der Verteilung von CD11b⁺, Gr-1⁺ und doppelt-positiven Zellen in der Milz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Smif^{wt} und Smif^{ko} festgestellt werden. Auch die Doppelfärbung mit dem Pan-Makrophagenmarker α -F4/80 und Gr-1 zeigte keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Auch wenn keine Signifikanz in der Anzahl myeloider Zellen in der Milz gemessen werden konnte, so zeigten doch einige Smif-defiziente Mäuse eine klare Tendenz zur Anreicherung von Zellen der myeloiden Linie.

Die Analyse von Smif-defizienten Mäusen, die aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes durchgeführt wurde, zeigte in einigen Fällen eine massive Splenomegalie (Daten nicht gezeigt). Durchflusszytometrische Erhebung der prozentualen Anteile von Leukozyten in den vergrößerten Milzen zeigten eine erhebliche Expansion myeloider Zellen in der Milz (Daten nicht gezeigt). Dies zog die Reduktion an B- und T-Zellen nach sich, deren prozentualer Anteil im Vergleich zur Normalverteilung weit abfiel. Parallel zur FACS-Analyse wurden histologische Schnitte beurteilt (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der Daten gab Anlass zu der Annahme, dass die Splenomegalie höchst wahrscheinlich durch eine Infektion ausgelöst wurde. Pathologisch manifestiert sich

die Infektion durch eine Expansion der roten Pulpa mit proliferierenden Granulozyten. Ob die Vergrößerung der Milz ein primärer oder sekundärer Effekt ist konnte bis jetzt nicht eindeutig festgestellt werden. Zwischen jungen wildtyp und knockout Mäusen variiert das Milzgewicht zwischen den beiden Gruppen jedenfalls nicht (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung mit der leichten Erhöhung des Anteils an myeloiden Zellen in der Milz konnte in einigen, aber nicht allen Smif^{ko} eine erhöhte Kolonie-Formierungs-Kapazität von myeloiden Zellen in Methylcellulose gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Dazu wurden isolierte Knochenmarkszellen in Serum-freier Methylcellulose mit SCF (*stem cell factor*), IL-3 und IL-6 für 12 Tage inkubiert. Der Zytokincocktail stimuliert die Differenzierung und Proliferation myeloider Zellen aus Progenitoren des Knochenmarks. Während aus wildtyp Knochenmark nach 12 Tagen pro Loch einer 6-Lochtiterplatte ungefähr 20 Kolonien pro 10.000 Zellen gewachsen sind, waren es aus knockout Knochenmarkszellen doppelt so viele (Daten nicht gezeigt). Dieser Unterschied konnte in drei von fünf Fällen beobachtet werden.

3.2.8.2 Die Entwicklung und Reifung von Lymphozyten in Smif-defizienten Mäusen

Bei Autoimmunopathien kommt es im Organismus zu einer überschießenden Immunantwort. Die Zellen des Immunsystems können körpereigene nicht mehr von körperfremden Antigenen unterscheiden, so dass es zu einer Autoimmunreaktion kommt. Fehlregulationen in Lymphozyten spielen bei der Entstehung solcher Erkrankungen eine entscheidende Rolle.

Um die Ursache(n) des Phänotyps Smif-defizienter Mäuse zu finden, wurden weit angelegte durchflusszytometrische Untersuchungen bezüglich der Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Zell-Subpopulationen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst aus Milz, Lymphknoten oder Knochenmark Einzelzellsuspensionen hergestellt. Zur Immunphänotypisierung wurden die Zellen durch Markierung zellspezifischer Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern angefärbt. In der anschließenden Analyse der Zellsuspension am Durchflusszytometer konnten über die Antigendichte und die Kombination verschiedener Antikörper Subpopulationen unterschieden werden. Dabei wurden in den Punktwolkendiagrammen nur viable Lymphozyten berücksichtigt. Diese sind durch ihre Größe und Granularität, die durch die vorwärts-seitwärts Streuung im Durchflusszytometer bestimmt werden kann, von anderen Zellen zu unterscheiden.

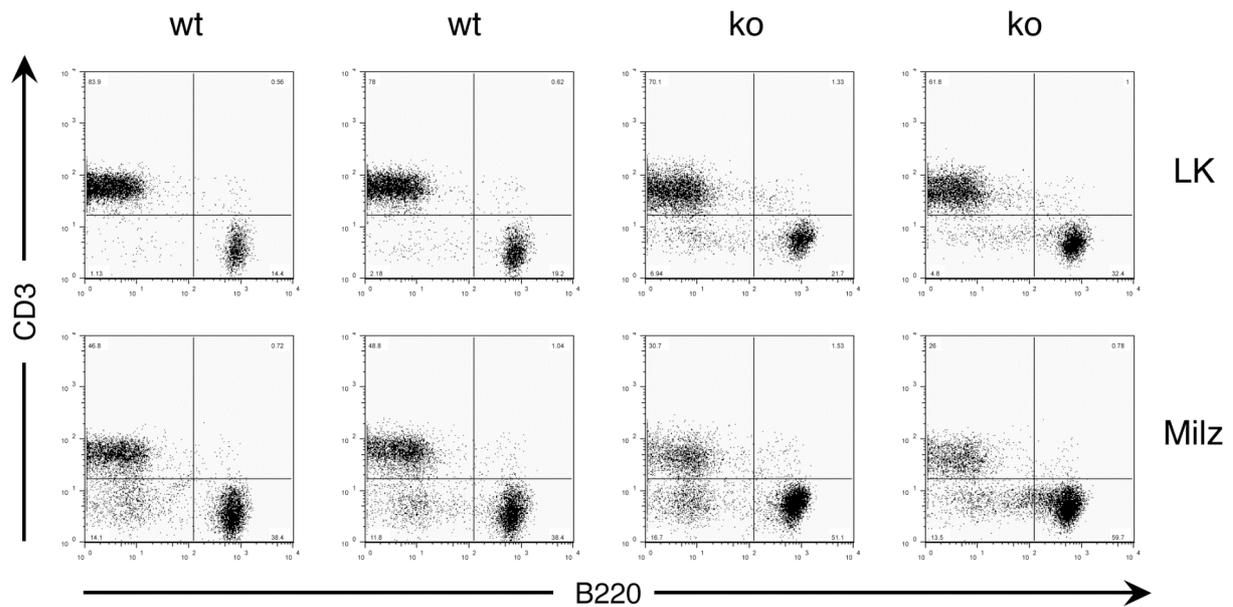


Abb. 3.20: Die Verteilung von B- und T-Zellen in der Peripherie: ein Vergleich zwischen wildtyp und knockout Mäusen. Exemplarische Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Lymphknoten und Milz von zwei Smif-defizienten Mäusen (ko, rechte Spalten) und zwei Kontrollmäusen (wt, linke Spalten). Die Einzelzellsuspensionen wurden nach Organentnahme und hypotoner Erythrozytenlyse mit den Antikörpern gegen CD3 (FITC-konjugiert) und B220 (APC-konjugiert) gefärbt. Die abgebildeten Punktwolkendiagramme geben den prozentualen Anteil an CD3⁺ und B220⁺ Zellen (linker oberer Quadrant und rechter unterer Quadrant) in der viablen Lymphozytenpopulation aus Lymphknoten (oberer Reihe) und Milz (untere Reihe) an. LK: Lymphknoten

3.2.8.2.1 Die periphere Verteilung von B- und T-Zellen

Die Verteilung von B- und T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen wurde mit Hilfe des Pan-B-Zellmarkers B220 und des Pan-T-Zellmarkers CD3 bzw. TCR untersucht (Abb.3.20 und Daten nicht gezeigt). Repräsentative Punktwolkendiagramme der B- und T-Zell Verteilung in Milz und Lymphknoten sind in Abb. 3.20 gezeigt. In Lymphknoten gibt es keine Unterschiede im prozentualen Anteil an B- und T-Zellen zwischen wildtyp und knockout, der für T-Zellen bei ~65% und für B-Zellen bei ~35% liegt (Abb. 3.20, obere Zeile). In der Milz von Smif^{ko} Mäusen gibt es hingegen eine Tendenz zu mehr B-Zellen und damit verbunden eine Reduktion an T-Zellen. Der prozentuale Anteil liegt hier bei ~60% für B-Zellen im Vergleich zu nur ~50% in den Milzen von wildtyp Tieren. Dahingegen sind ~40% der Lymphozyten T-Zellen in der Milz von Kontrollmäusen. In Smif-defizienten Mäusen beträgt der Anteil nur ~30% (Abb. 3.20, untere Zeile). Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen von einigen erkrankten Smif-defizienten Mäusen eine Expansion der B-Zellen (Abb. 3.21). Die Expansion der B-Zellen konnte durch die Färbung der B-Zell-Areale in Paraffinschnitten der Milz mit einem

α -B220-Antikörper gut visualisiert werden. Die Gegenfärbung mit dem Pan-T-Zellmarker α -CD3 zeigte eine Verkleinerung der T-Zell Areale in der Milz. Die Anordnung der B- und T-Zell Areale in allen untersuchten Kontrollmäusen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Folglich ist der Phänotyp einiger Smif-defizienter Mäuse mit einer reaktiven B-Zell Proliferation verbunden.

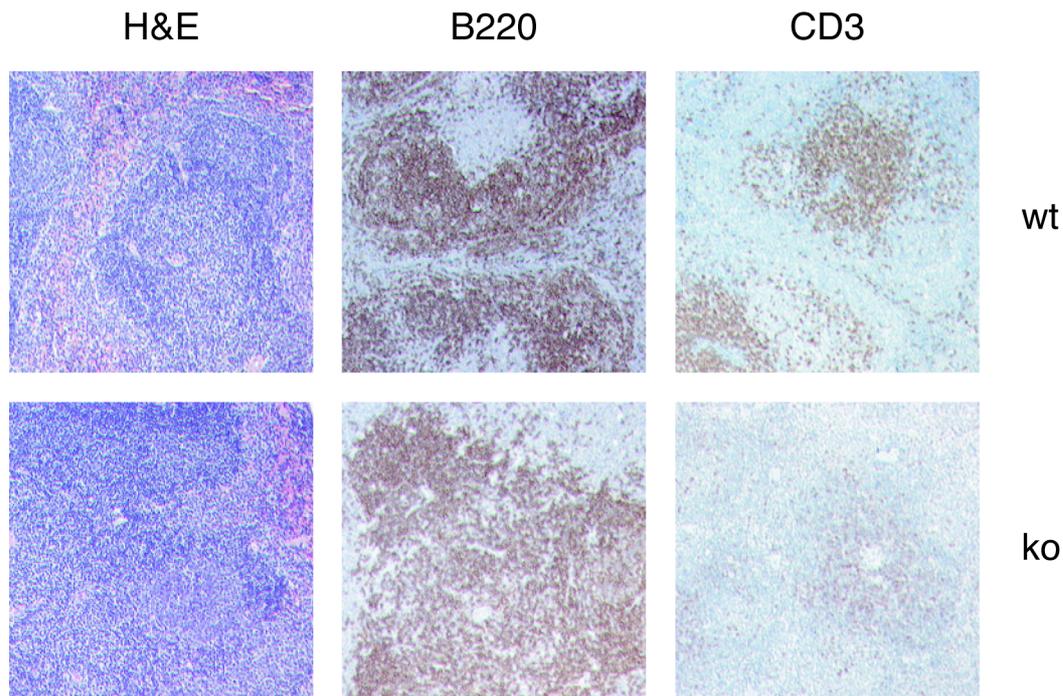


Abb. 3.21: Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine reaktive Proliferation von B-Zellen. Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen der Milz von jeweils einer charakteristischen Smif-defizienten Maus (untere Reihe) und einer Kontrollmaus (obere Reihe). Der Verlust der T-Zell-Areale und die Expansion der B-Zellen wurde durch die Färbung der Paraffinschnitte mit H&E (linke Spalte) sowie dem Pan-T-Zell-Marker CD3 (rechte Spalte) und Pan-B-Zell-Marker B220 (mittlere Spalte) visualisiert.

3.2.8.2.2 Kolonie-Formierungskapazität von Smif-defizienten B-Zell-Progenitoren ist erhöht

Die Teilungs- und Differenzierungsrate von B-Zell-Vorläuferzellen kann *in vitro* bestimmt werden. Dazu wird die Kapazität zur Bildung von Kolonien in Methylcellulose aus B-Vorläuferzellen (CFU-preB) in der Anwesenheit von IL-17 gemessen. Aus einer Smif-defizienten Maus und einer wildtyp Kontrolle wurde Knochenmark entnommen und anschließend 25.000 Zellen in IL-17-haltiger Methylcellulose pro Loch einer 12-Lochplatte kultiviert. Nach sieben Tagen wurde die Zahl der entstandenen CFU-preB Kolonien gezählt. Aus wildtyp Knochenmark sind ungefähr 14 Kolonien entstanden, wohingegen aus Knochenmark, das aus Smif^{ko} gewonnen wurde, im Durchschnitt 23 Kolonien wuchsen (Daten nicht gezeigt). Der Unterschied in der Kapazität zur Bildung von CFU-

preB aus Knochenmark dieses Geschwisterpaares ist signifikant und könnte eine mögliche Ursache der B-Zell-Expansion darstellen. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an pro- und pre-B-Zellen im Knochenmark wiesen jedoch keine Unterschiede in der Anzahl dieser Zellen auf (siehe Kapitel 3.2.8.2.3).

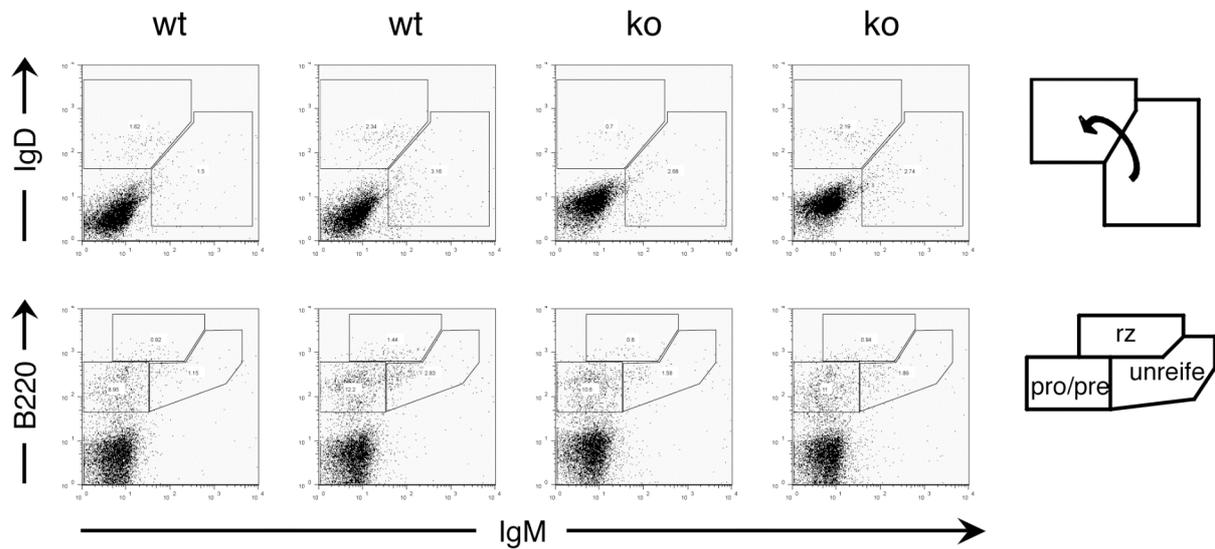


Abb. 3.22: Die Reifung von B-Zellen im Knochenmark Smif-defizienter Mäuse. Knochenmark wurde entweder aus Smif^{ko} oder aus Smif^{wt} Mäusen durch Spülen von Femur und Tibia gewonnen. Nach Homogenisieren der Zellsuspension und hypotoner Lyse der Erythrozyten wurde diese mit α -IgM-PE, α -B220-APC und α -IgD-FITC in einer dreifach-Färbung inkubiert. Die angefärbte Einzelzellsuspension wurde am Durchflusszytometer analysiert. In den abgebildeten Punktwolkendiagrammen sind repräsentativ die Ergebnisse von je zwei Mäusen pro Gruppe (wildtyp links, knockout rechts) dargestellt. Dabei wurden nur viable Lymphozyten berücksichtigt. Die Zahlen in den markierten Feldern geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulation an. Der Pfeil gibt die Richtung der B-Zell-Reifung B220⁺ Zellen von IgM⁺ zu IgD⁺ B-Zellen an. rz: rezirkulierende B-Zellen.

3.2.8.2.3 Die Differenzierung von B- und T-Zellen ist in Smif-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt

Eine Störung in der Differenzierung zu reifen Lymphozyten oder das Fehlen von Subpopulationen könnte eine mögliche Erklärung für den autoimmunologischen Phänotyp in Smif-defizienten Mäusen sein. Um diese These zu überprüfen, wurde die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark sowie die Entwicklung von T-Zellen im Thymus untersucht.

B220 wird hauptsächlich von Zellen der B-Zelllinie exprimiert, von der pro-B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle. IgM hingegen wird erst von reiferen B-Zellen auf der Oberfläche präsentiert, während in frühen B-Zellen IgM ausschließlich intrazellulär zu finden ist. Der Reifungsstatus von B-Zellen kann durch die Doppelfärbung der Oberflächenmoleküle B220 und IgM in pro/pre-B-Zellen (B220⁺ IgM⁻), unreife B-Zellen (B220⁺ IgM⁺) und rezirkulierende B-Zellen (B200⁺ IgM^{int})

differenziert werden (Abb. 3.22, untere Zeile). Im Gegensatz zu IgM tragen nur periphere, reife B-Zellen IgD auf ihrer Oberfläche. Anhand der Doppelfärbung von Knochenmarkszellen oder der Milz mit IgM und IgD konnte der Reifungsprozess der B-Zellen verfolgt werden (siehe Pfeilrichtung in Abb. 3.22). In keiner der untersuchten Entwicklungsstufen der B-Zelllinie konnten Unterschiede im prozentualen Anteil im Knochenmark von Smif-defizienten im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt werden. Dabei lag der Anteil an Vorläufer-B-Zellen im Durchschnitt bei 10%, für unreife B-Zellen in etwa bei 2,5%. Rezirkulierende B-Zellen machten einen Anteil von circa 2% der Lymphozytenpopulation im Knochenmark aus. Exemplarisch sind die Punktwolken- diagramme für je zwei Mäuse pro Gruppe in Abb. 3.22 gezeigt.

Das Verhältnis von IgM^+ B-Zellen zu IgD^+ B-Zellen wurde auch in der Milz bestimmt. Dabei lag der Anteil an IgM^+ Zellen bei ~17%, wohingegen ~74% der B220^+ B-Zellen in der Milz IgD^+ waren. Ein Unterschied zwischen Smif-defizienten Mäusen und wildtyp Geschwistern gab es bei der Immunphänotypisierung nicht (Abb. 3.23).

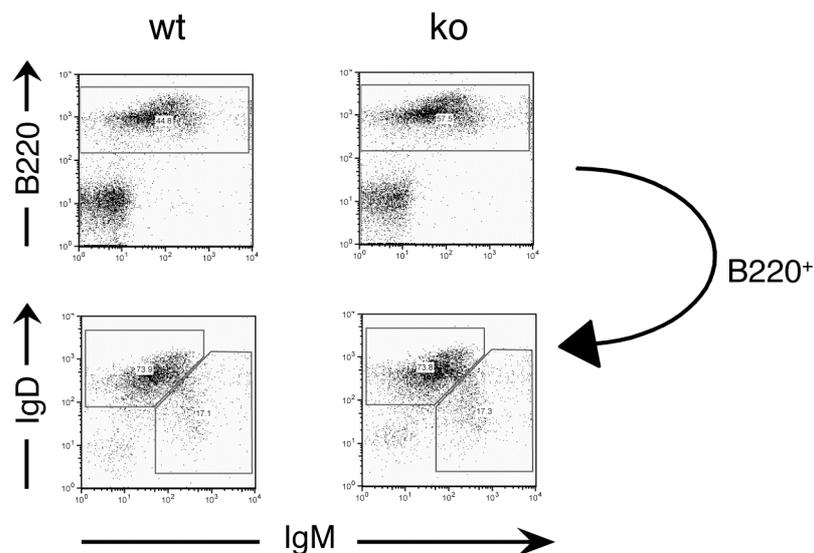


Abb. 3.23: Der Anteil an reifen B-Zellen in der Milz Smif-defizienter Mäuse. Eine Einzelzellsuspension aus der Milz wurde nach hypotoner Lyse der Erythrozyten und anschließender dreifach-Färbung mit $\alpha\text{-IgM-PE}$, $\alpha\text{-B220-APC}$ und $\alpha\text{-IgD-FITC}$ durchflusszytometrisch analysiert. In den abgebildeten Punktwolken- diagrammen sind die repräsentativen Ergebnisse von je einer Smif-defizienten Maus (ko, linke Spalte) und einer Kontrollmaus (wt, rechte Spalte) dargestellt. Dabei wurden nur viable Lymphozyten berücksichtigt. Die Reifung der B-Zellen ist durch die Expression von IgM und IgD in den B220^+ B-Zellen dargestellt (untere Reihe). Die Zahlen in den markierten Feldern geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulation an.

B-Zellen lassen sich in Marginalzonen B-Zellen (MZB), folliculäre B-Zellen (FO) und nicht-follikuläre B-Zellen (nFO) unterteilen. Sie unterscheiden sich durch die Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker wie CD21 und CD23 auf ihrer Oberfläche. MZB sind nicht-

zirkulierende reife B-Zellen, die in der Marginalzone der Milz verweilen. MZB sind Teil der frühen T-Zell-unabhängigen Immunantwort. Sie unterscheiden sich von folliculären B-Zellen durch die Expression von IgM, CD21, CD1 und CD9, wohingegen sie IgD, CD23 und CD5 negativ sind. Folliculäre B-Zellen machen den größten Anteil an B-Zellen in der Milz aus. Sie können im Gegensatz zu Marginalzonen B-Zellen rezirkulieren und sind in der B-Zell-Zone der weißen Pulpa zu finden. Immunphänotypisch zeichnen sie sich durch eine starke Expression von IgM, IgD und CD23 aus, während CD21 intermediär an der Zelloberfläche exprimiert wird. CD1 und CD5 sind auf ihrer Zelloberfläche nicht zu finden. Nicht-folliculäre B-Zellen der Milz exprimieren weder CD21 noch CD23.

In den Punktwolkendiagrammen dargestellt sind die Ergebnisse aus der Vierfachfärbung einer Einzelzellsuspensionen der Milz, die aus wildtyp bzw. knockout Mäusen gewonnen wurde (Abb. 3.24). Dabei wurden die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen B220, IgM, CD21 und CD23 verwendet. Folliculäre B-Zellen machen den größten Anteil von ungefähr 76% aus, wohingegen nicht-folliculäre B-Zellen einen Anteil von ~15% ausmachen. 5% der B-Zellen in der Milz sind MZB, die CD21 aber nicht CD23 exprimieren (Abb. 3.24, mittlere Zeile). In den prozentualen Anteilen der drei B-Zell-Subpopulationen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen $Smif^{ko}$ und Kontrollmäusen gemessen werden.

Die heterogene B-Zell-Population aus folliculären und nicht-folliculären B-Zellen kann aufgrund der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern in weitere Subpopulationen unterteilt werden. Frühe Übergangs-B-Zellen (*transitional 1*, T1) sind durch eine starke Expression von IgM charakterisiert, während sie für IgD, CD21 und CD23 negativ sind. T2, späte Übergangs-B-Zellen, zeichnen sich durch eine starke Expression von IgM und IgD aus. Zudem exprimieren sie die Oberflächenmoleküle CD21 und CD23. Folliculäre reife B-Zellen (FM= *follicular mature B cell*) können im Punktwolkendiagramm durch eine intermediäre Expression von IgM und CD21 von den T1 und T2 Zellen abgegrenzt werden. Die FM bilden mit einem prozentualen Anteil von 50% die größte Population. T1 und T2 B-Zellen hingegen sind mit je ~10% in den untersuchten B-Zellen der Milz vertreten (Abb. 3.24, untere Zeile). Auch diese B-Zell-Subpopulationen sind in der knockout Maus in normalen Verhältnissen vorhanden, erkennbar durch den Vergleich der Punktwolkendiagramme von je zwei $Smif$ -defizienten Mäusen mit ihren wildtyp Wurfgeschwistern.

Aus der Analyse der B-Zell-Populationen kann geschlussfolgert werden, dass es keinen Defekt in der Entwicklung und Reifung von B-Zellen gibt, da alle Subpopulationen in $Smif$ -defizienten Mäusen in einem normalen prozentualen Anteil vorliegen. Nur in einigen bereits erkrankten $Smif^{ko}$ konnte eine leichte Erhöhung an $B220^+$ B-Zellen in der Milz detektiert werden.

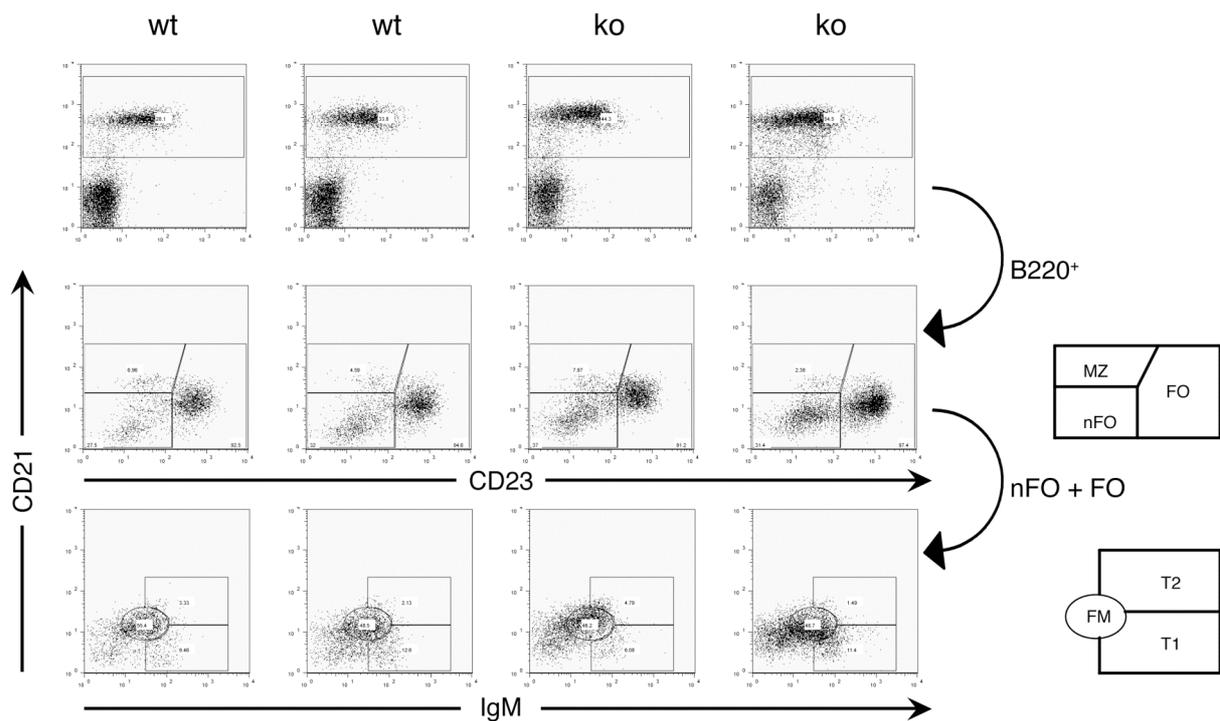


Abb. 3.24: Untersuchung der B-Zell-Subpopulationen in der Milz. Zellen der Einzelzellsuspensionen aus der Milz von entweder Smif-defizienten Mäusen (ko) oder Kontrollmäusen (wt) wurden nach hypotoner Lyse der Erythrozyten immunphänotypisiert. Dazu wurden die Zellen in einer vierfach-Färbung mit den Antikörpern α -B220-APC, α -CD21-FITC, α -CD23-PE-Cy5 und α -IgM-PE gefärbt. Nach Ausschluss aller nicht-B220⁺ Zellen (obere Reihe) ist die Expression der Oberflächenmoleküle CD21 und CD23 in den repräsentativen Punktwolkendiagrammen dargestellt (mittlere Reihe). Der prozentuale Anteil der CD21⁺CD23⁻ MZB, der CD21⁺CD23⁻ nFO und der CD21⁺CD23⁺ FO Zellen sind in den jeweiligen Kästchen angegeben. Unter Ausschluss der MZB ist die Unterscheidung der verbleibenden nFO und FO B-Zellen in den Punktwolkendiagrammen der unteren Reihe dargestellt. Die Zahlen in den jeweiligen Markierungen geben den prozentualen Anteil an FM, T1 und T2 Zellen an. MZB: Marginalzonen B-Zellen, FO: folliculäre B-Zellen, nFO: nicht-folliculäre B-Zellen, FM: reife folliculäre B-Zellen, T1/T2: Übergangs-B-Zellen 1/2

Die T-Zell Entwicklung findet über die drei Hauptstadien doppelt-negativ für CD4 und CD8, doppelt-positiv und einzel-positiv im Thymus statt. Im Thymus sind ungefähr 90% der T-Zellen CD4, CD8 doppelt-positiv.

Um die Entwicklung von T-Zellen zu verfolgen, wurde eine Einzelzellsuspension, gewonnen aus dem Thymus von 14 Tage alten Mäusen, auf die Oberflächenmarker CD4 und CD8 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. In den repräsentativen Punktwolkendiagrammen ist die Verteilung der drei Hauptstadien exemplarisch für je zwei Individuen pro Gruppe dargestellt (Abb. 3.25). Sowohl Smif^{ko} als auch Smif^{wt} zeigen eine Normalverteilung der T-Zell-Vorläuferzellen, die bei ~90% doppelt-positiven Zellen, ~8% CD4⁺ T-Zellen und ~4% CD8 einfach-positiven T-Zellen liegt. Eine leichte Reduktion der CD4⁺ T-Zellen auf ~6% wurde in 14 Tage alten knockout Mäusen gemessen. Diese Beobachtung konnte bei der Analyse des Thymus aus älteren Mäusen nicht bestätigt werden (siehe Tabelle 3.3).

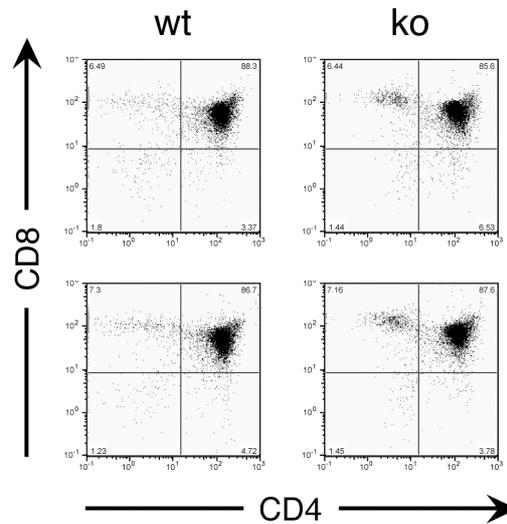


Abb. 3.25: Die T-Zell Entwicklung im Thymus Smif-defizienter Mäuse ist normal. Der entnommene Thymus aus 14 Tage alten Mäusen wurde homogenisiert. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde mit den Antikörpern gegen CD4 (PE-konjugiert) und CD8 (FITC-konjugiert) gefärbt. Die für die Oberflächenmarker positiven Zellen sind in den unterschiedlichen Quadranten der Punktwolkendiagramme für je zwei Individuen pro Gruppe exemplarisch dargestellt. In den Punktwolkendiagrammen sind nur viable Lymphozyten berücksichtigt worden.

Die Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie ist exemplarisch für zwei knockout Mäuse und einer gleichaltrigen wildtyp Maus in Abb. 3.26 gezeigt. Der prozentuale Anteil an T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) ist in der Milz mit einem Anteil von ~20% bzw ~10% und in den Lymphknoten mit ~35% bzw. ~25% in Smif-defizienten Mäusen vergleichbar mit dem Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Kontrollmäusen. Eine leichte Reduktion der CD4⁺ T-Zellen in der Milz ist erkennbar (12% in wildtyp gegen 8% in knockout Mäusen, Abb. 3.26, untere Zeile). Dies ist im Einklang mit der oben beschriebenen Reduktion an T-Zellen in der Milz, die mit einer Expansion von B-Zellen einhergeht.

Regulatorische T-Zellen verhindern eine überschießende Immunantwort durch ihre supprimierenden Eigenschaften. Zudem sind T_{reg} wichtig für die Generierung einer immunologischen Toleranz. Fehlregulationen sind mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. T_{reg} entstehen aus naiven CD4⁺ T-Zellen abhängig von einem TGFβ Signal. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird exklusiv in regulatorischen T-Zellen exprimiert und dient daher als Marker. FoxP3 kann durch intrazelluläre Färbung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

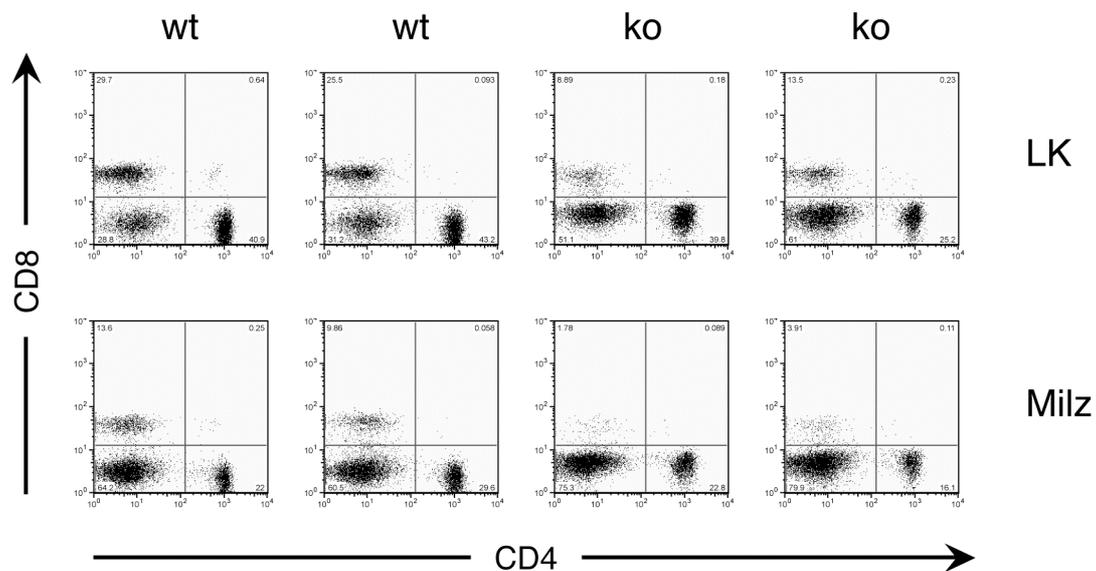


Abb. 3.26: Der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen von Smif-defizienten Mäusen. Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten (obere Reihe) und Milz (untere Reihe) wurden nach hypotoner Lyse der Erythrozyten und Färbung mit α -CD4-PE und α -CD8-FITC in einer Doppelfärbung immunphänotypisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse exemplarisch für eine Kontrollmaus und zwei Smif-defiziente Wurfgeschwister. In den Punktwolkendiagrammen sind nur viable Lymphozyten berücksichtigt worden. Die Zahlen in den einzelnen Quadranten geben den prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Zellen (unten rechts) und CD8⁺ T-Zellen (oben links) an.

In den Punktwolkendiagrammen in Abb. 3.27 sind viable, CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von entweder wildtyp oder knockout Mäusen dargestellt. Der prozentuale Anteil an T_{reg} (FoxP3⁺ CD25⁺), der bei ca. 10% liegt, unterscheidet sich in den beiden Gruppen nicht. In manchen Smif-defizienten Mäusen konnte sogar eine leichte Erhöhung der T_{reg} Population festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede in den B- und T-Zell-Populationen zwischen knockout und wildtyp Mäusen gemessen werden. Die Ursache für die Entwicklung des autoimmunologischen Phänotyps ist nicht durch einen Entwicklungsdefekt zu erklären. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass Lymphozyten auf endogene Stimuli mit einer nicht-adäquaten biologischen Zellantwort reagieren. Eine Zusammenfassung der obigen Daten findet sich in Tabelle 3.3.

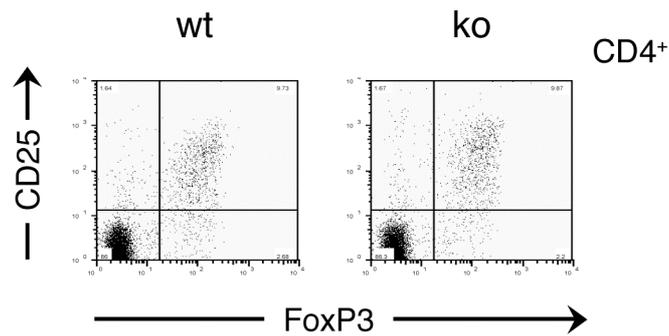


Abb. 3.27: Der prozentuale Anteil an regulatorischen T-Zellen in der Milz. Zellen einer Erythrozyten-freien Einzelzellsuspension aus entweder wildtyp oder knockout Milzen wurden mit Hilfe einer dreifach Färbung unter Verwendung der Antikörper gegen CD4 (APC-konjugiert), CD25 (PE-konjugiert) und FoxP3 (FITC-konjugiert) immunphänotypisiert. Dabei wurden in einem ersten Schritt die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen folgte die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3. In den repräsentativen Punktwolkendiagrammen, in denen nur viable, CD4⁺ T-Zellen berücksichtigt wurden, ist der prozentuale Anteil an regulatorischen T-Zellen im oberen rechten Quadranten exemplarisch für eine Kontrollmaus (links) und eine Smif-defiziente Maus (rechts) angegeben.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Immunphänotypisierung von B- und T-Zellen. In der Tabelle sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Lymphozytenpopulationen als Mittelwert von Smif-defizienten Mäusen (rechte Spalte) und Kontrollmäusen (linke Spalte) zusammengefasst. Dabei ist n ≥ 5. Bei der T-Zell Entwicklung im Thymus beziehen sich die ersten Werte auf junge, die zweiten auf ältere Mäuse. Die p-Werte wurden unter Zuhilfenahme des Student'schen T-Test berechnet.

		wt	ko	p-Wert
B-Zellen	B220 ⁺ Milz	50,8	60,9	0,06
	B220 ⁺ LK	35,8	36,4	0,94
	IgM ⁺ Milz	21,9	18,5	0,41
	IgD ⁺ Milz	56,9	52,8	0,77
	pro-pre	10,6	11,6	0,51
	unreife	2,5	2,5	0,97
	rezirkulierend	1,6	2,4	0,49
	MZ	6,6	5,1	0,51
	FO	74,3	79,3	0,53
	nFO	16,0	14,9	0,83
	FM	50,7	47,3	0,29
	T1	11,0	11,3	0,9
	T2	5,5	9,4	0,48
T-Zellen	CD3 ⁺ LK	68,2	61,4	0,31
	CD3 ⁺ Milz	41,4	32,1	0,07
	CD4 ⁺ CD8 ⁺	87,1/85,6	86,5/87,8	0,58/0,23
	CD4 ⁺	7,6/9,5	6,0/8,2	0,05/0,48
	CD8 ⁺	3,9/2,7	4,7/2,0	0,33/0,26
	CD4 ⁺ LK	38,1	32,9	0,18
	CD4 ⁺ Milz	22,2	17,1	0,09
	CD8 ⁺ LK	25,0	20,7	0,22
	CD8 ⁺ Milz	11,7	7,6	0,14
	T _{reg}	11,0	13,5	0,19

3.2.8.3 Smif-defiziente T-Zellen jedoch nicht B-Zellen sind voraktiviert

Aktiviert B- bzw. T-Zellen können anhand ihrer Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle von nicht aktivierten im Durchflusszytometer unterschieden werden.

Die Hochregulation von CD25, CD44 und CD69 bzw. die Herunterregulation von CD62L auf der Zelloberfläche ist typisch für eine aktivierte CD4⁺ T-Zelle. CD69 ist ein früh-induziertes Glykoprotein auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten und eignet sich dadurch als Marker für den Aktivierungsstatus von sowohl T- als auch B-Zellen. CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors, und CD44, ein Oberflächen-Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird, werden ebenfalls nach Aktivierung hoch reguliert. CD62L oder L-Selektin ist ein „*Homing*“ Rezeptor für Leukozyten. CD62L begünstigt das Einwandern von T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie auf ihr Antigen treffen können.

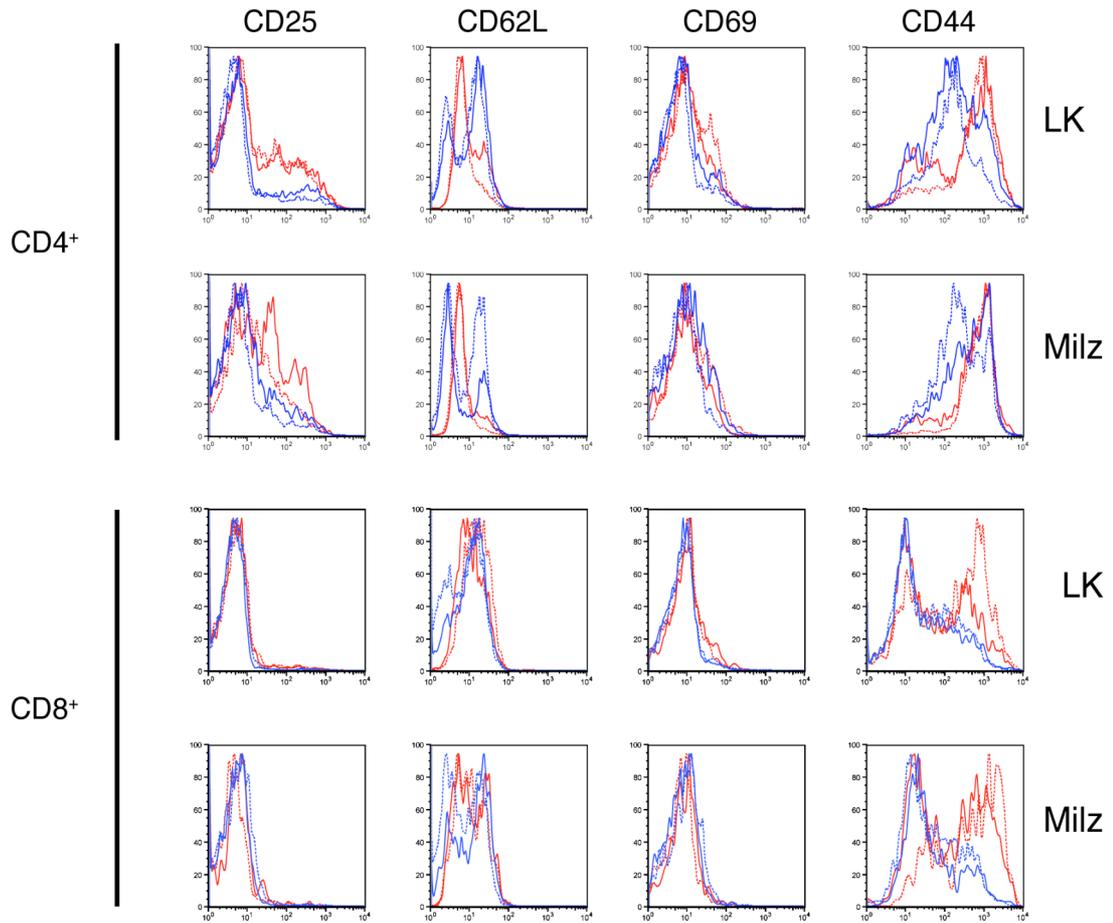
Zur Immunphänotypisierung wurden Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. In Abb. 3.28 sind repräsentative Histogramme, in denen die Expression bestimmter Oberflächenmarker, die eine Unterscheidung zwischen aktivierten und nicht-aktivierten Lymphozyten ermöglichen, auf knockout Lymphozyten (rote Linien) und wildtyp Lymphozyten (blaue Linie), dargestellt.

Im Vergleich zu den wildtyp Wurfgeschwistern sind die Kurven von Smif-defizienten Mäusen im Histogramm nach rechts für CD25, CD69 und CD44 und nach links für CD62L verschoben (Abb. 3.28a). CD4⁺ T-Zellen in Lymphknoten und Milz der Smif-defizienten Mäusen sind somit voraktiviert. CD8⁺ T-Zellen hingegen unterscheiden sich in der Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD62L nicht. CD44, ein Oberflächenmolekül, das auf Gedächtniszellen hoch exprimiert wird, ist auf CD8⁺ Smif-defizienten T-Zellen hochreguliert (Abb. 3.28a).

Aktiviert B-Zellen zeichnen sich durch die Hochregulation von CD43, einem frühen B-Zell Aktivierungsmarker, CD86, einem kostimulatorischen Molekül zur T-Zell Aktivierung und CD69 aus. CD62L wird, wie auf T-Zellen, herunterreguliert. Die Kurven im Histogramm von Smif-defizienten Mäusen (rote Linie) und Kontrollmäusen (blaue Linie) liegen genau übereinander (Abb. 3.28b). Die Aktivierungsmarker sind daher auf Smif-defizienten B220⁺ Zellen in einer vergleichbaren Dichte auf der Oberfläche exprimiert wie auf wildtyp B-Zellen.

CD4⁺ T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen zeichnen sich durch einen aktivierten/Gedächtnis-Immunphänotyp aus, der sich in der Expression von CD25, CD62L, CD69 und CD44 äußert. CD8⁺ T-Zellen hingegen unterschieden sich von zytotoxischen wildtyp T-Zellen durch eine erhöhte Expression von CD44, einem spezifischen Oberflächenmarker für Gedächtnis-T-Zellen.

a)



b)

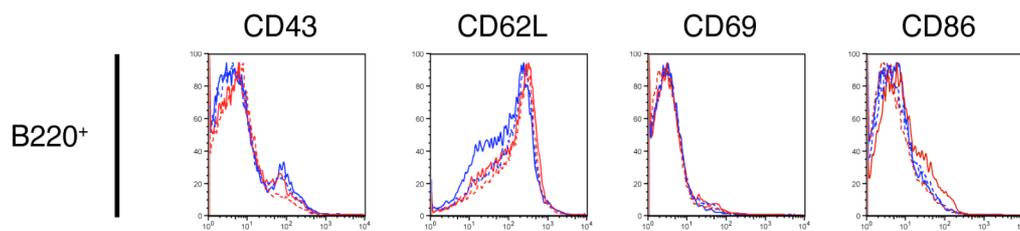


Abb. 3.28: CD4⁺ T-Zellen sind in Smif-defizienten Mäusen voraktiviert. In Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten (LK) und Milz wurden nach hypotoner Lyse der Erythrozyten die Aktivierungsmarker CD25, CD62L, CD69 und CD44 auf der Zelloberfläche mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern angefärbt. In den Histogrammen ist die Expression der verschiedenen Marker exemplarisch für je zwei wildtyp (blaue Kurve) und knockout (rote Kurve) Mäuse abgebildet. Dabei wurden im oberen Teil nur viable CD4⁺ Zellen berücksichtigt, während unten die Expression der Aktivierungsmarker in CD8⁺ T-Zellen dargestellt ist (a). In Abbildungsteil b) ist die Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD43, CD62L, CD69 und CD86 in B220⁺ Zellen gezeigt.

B-Zellen kommen in einem nicht-aktivierten Status in der Peripherie vor. Die aktivierten T-Zellen sind eine mögliche Erklärung oder eine Konsequenz des beobachteten Autoimmunphänotyps. Die möglichen Ursachen für die Voraktivierung sind Bestandteil der weiteren Untersuchungen.

3.2.8.4 Smif-defiziente T-Zellen differenzieren bevorzugt in T_{H1}-Zellen

Die Messung der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ist ein weiterer Indikator für deren Aktivierungszustand. Die Differenzierung in funktionelle T_{H1} bzw. T_{H2} kann nach PMA und Ionomycin Stimulation durch intrazelluläre Färbung der Zytokine IFN γ bzw. IL-4 gemessen werden.

Erste Experimente zeigen, dass mehr Smif-defiziente CD4⁺ Zellen unter neutralen Bedingungen fähig sind, IFN γ zu produzieren als CD4⁺ T-Zellen, die aus Kontrollmäusen isoliert wurden (Daten nicht gezeigt). Demnach differenzieren Smif-defiziente CD4⁺ T-Zellen bevorzugt in T_{H1}-Zellen.

3.2.9 Der Effekt von TGF β auf Leukozyten: funktionelle *in vitro* Assays

TGF β ist ein multifunktionales Zytokin, das besonders in der Regulation des Immunsystems eine entscheidende Rolle einnimmt. Alle Leukozyten können sowohl TGF β produzieren als auch auf TGF β reagieren. Dabei kann TGF β sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch wirken (Abb. 1.6). Das vorherrschende Zytokinmilieu wie auch der Differenzierungsstatus der Zelle selbst beeinflussen die TGF β -abhängigen Zellantworten.

Smif als transkriptioneller Koaktivator im TGF β Signalweg ist an der Regulation der Expression von Zielgenen nach TGF β Stimulation beteiligt. Das Ausschalten von Smif ist nur dann mit einer veränderten Zellantwort assoziiert, wenn auf molekularer Ebene die dafür verantwortliche Genregulation Smif-abhängig ist.

3.2.9.1 TGF β inhibiert die Reifung Smif-defizienter dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die T-Zellen spezifisch aktivieren. DC können aus Knochenmark *in vitro* unter Zugabe des Zytokins GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) differenziert werden.¹¹⁹ Es ist bekannt, dass die Zugabe von TGF β die Differenzierung von DC in einen unreifen Phänotyp begünstigt. Dieser zeichnet sich durch die hauptsächlich intrazelluläre Expression von MHC II aus, sowie eine geringe Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.¹¹⁹⁻¹²¹ Die gleichzeitige Stimulation von dendritischen Zellen mit LPS und TGF β führt zu einer geringen Expression

an MHCII und den kostimulatorischen Molekülen. Des Weiteren wird die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF α durch die Zugabe von TGF β zu LPS-stimulierten DC inhibiert.¹²²

Der prozentuale Anteil an CD11c⁺ dendritischen Zellen, ist im Knochenmark aus Smif-defizienten Mäusen vergleichbar mit dem Anteil in Kontrollmäusen (Daten nicht gezeigt).

Knochenmark aus Smif^{ko} oder Smif^{wt} wurde zur Differenzierung von BMDC (*bone marrow derived DC*) *in vitro* eingesetzt. Zu diesem Zwecke wurden die Knochenmarkszellen in GM-CSF-haltigem Kulturmedium mit und ohne TGF β inkubiert. Nach acht Tagen wurden die Zellen immunphänotypisiert. Dazu wurden die Oberflächenproteine CD11c, MHCII, CD80 und CD86 mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern angefärbt. In den repräsentativen Punktwolkenendiagrammen ist die Verteilung zwischen unreifen (CD11c⁺ MHCII^{int}) und reifen (CD11c⁺ MHCII^{hi}) DC dargestellt (Abb. 3.29). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Addition von TGF β zu den Kulturen einen unreifen Phänotyp begünstigt. Die Zahl der CD11c⁺ MHCII^{hi} dendritischen Zellen sinkt konzentrationsabhängig von ~15 % auf ~2,5 %, dabei ist zwischen wildtyp und knockout kein Unterschied erkennbar (Abb. 3.29a). In den Histogrammen ist die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 dargestellt (Abb. 3.29b). Das Abbild der Kurven verschiebt sich mit steigender TGF β -Konzentration nach links. Dies bedeutet eine Abnahme der kostimulatorischen Moleküle an der Oberfläche, was einem unreiferen Phänotyp entspricht.

Das Fehlen von Smif scheint keinen Einfluss auf die Reifung von DC zu haben. TGF β wirkt auch auf Smif-defiziente DC inhibitorisch. Ein signifikanter Unterschied zwischen den wildtyp und knockout Kulturen konnte nicht festgestellt werden.

Das Verhalten von dendritischen Zellen nach LPS-Stimulation wurde in einem nächsten Schritt untersucht. Dazu wurden aus Knochenmark differenzierte DC aus Smif-defizienten oder Kontrollmäusen mit unterschiedlichen Konzentration an LPS mit und ohne TGF β für 0, 2, 6 oder 24 Stunden stimuliert. Im Überstand der Kulturen wurde die Konzentration der Zytokine IL-12 und TNF α in ELISA-Messungen bestimmt. Als Standard dienten die Zytokine IL-12 und TNF α in bekannter Konzentration. Die Zugabe von TGF β inhibierte die Produktion der proinflammatorischen Zytokine in wildtyp und knockout DC Kulturen im gleichen Maße (Daten nicht gezeigt).

Die Daten zeigen deutlich, dass das Fehlen von Smif keinen Einfluss auf die TGF β -abhängige Reifung BMDC *ex vivo* hat.

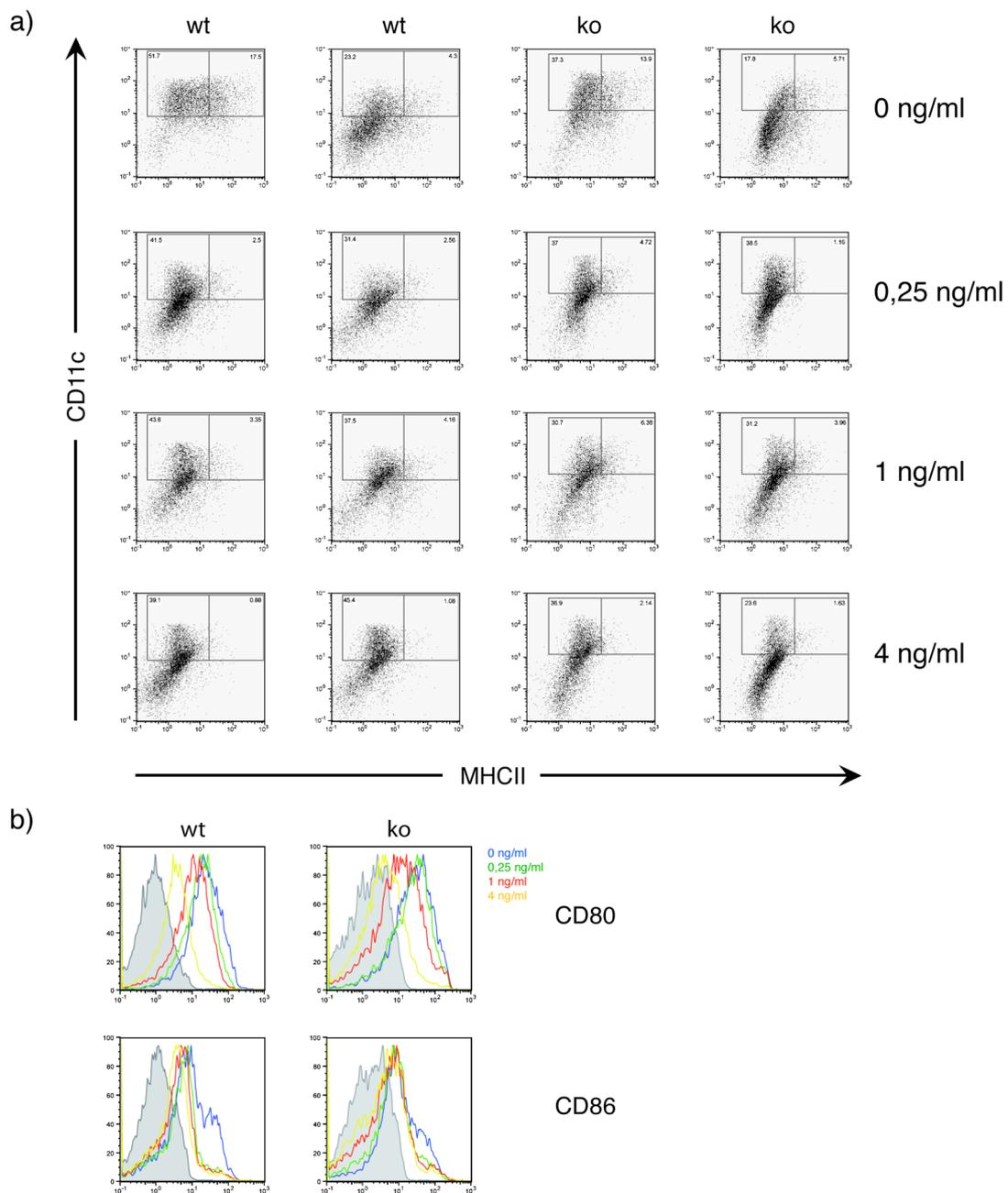


Abb. 3.29: Der Effekt von TGFβ auf die *in vitro* Differenzierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark. Knochenmark wurde entweder aus Smif-defizienten Mäusen oder Kontrollmäusen durch Spülen von Femur und Tibia gewonnen. Nach Homogenisieren der Zellsuspension wurde diese in GM-CSF-haltigem Medium mit und ohne TGFβ für 7 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Oberflächenmoleküle CD11c und MHCII immunphänotypisiert. Exemplarisch sind die Punktwolkendiagramme für je zwei Mäuse jeder Gruppe gezeigt, dabei wurden nur viable Zellen berücksichtigt. Der prozentuale Anteil an unreifen (CD11c⁺ MHCII^{lo}) und reifen (CD11c⁺ MHCII⁺) dendritischen Zellen ist in den Rechtecken angegeben (a). Die TGFβ-abhängige Expression der akzessorischen Kostimulatoren CD80 und CD86 in diesen Zellen sind in den Histogrammen exemplarisch für BMDC einer Smif^{ko} (rechte Spalte) und einer Smif^{wt} Maus (linke Spalte) dargestellt (b).

3.2.9.2 Die TGF β -induzierte Inhibition der Proliferation ist in T-Zellen, jedoch nicht in B-Zellen aufgehoben

TGF β besitzt die Fähigkeit, die Proliferation sowohl von B- als auch von T-Zellen zu inhibieren.⁶³ Die Grundlage des beobachteten autoimmunologischen Phänotyps Smif-defizienter Mäuse könnten Lymphozyten bilden, die unempfindlich für ein TGF β Signal sind. Um den antiproliferativen Effekt von TGF β auf Lymphozyten zu testen, wurden diese isoliert, kultiviert und die Proliferation nach 24 Stunden indirekt durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die neu synthetisierte DNA replikativer Zellen gemessen.

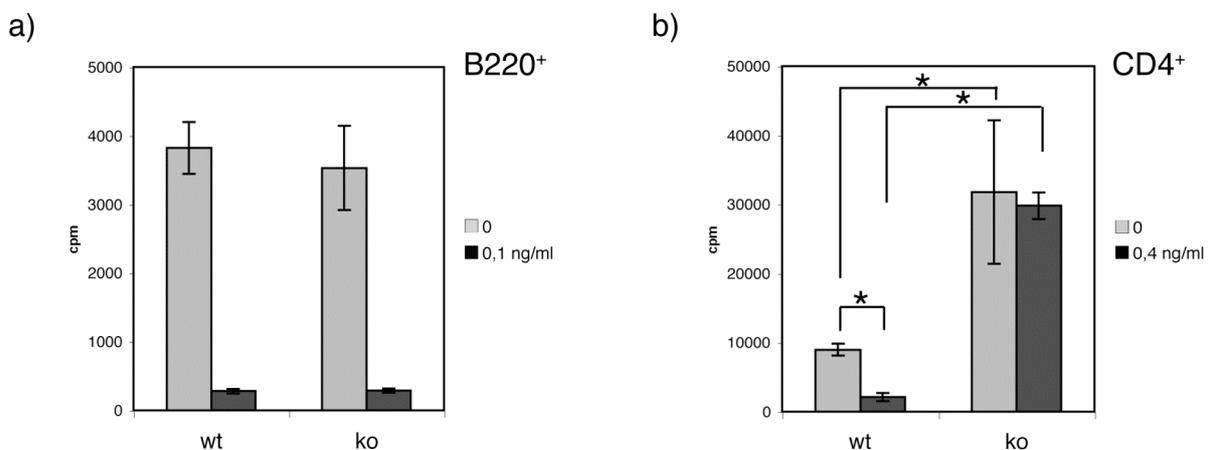


Abb. 3.30: TGF β kann die Proliferation Smif-defizienter B-Zellen jedoch nicht von Smif-defizienten T-Zellen inhibieren. Die aus Milz isolierten B220⁺ Zellen und aus Lymphknoten und Milz aufgereinigten CD4⁺ Zellen wurden mit einer Reinheit von >92% für die Proliferationsmessungen verwendet. Dafür wurden $1 \cdot 10^5$ B-Zellen mit $1 \mu\text{g/ml}$ α -IgM-Antikörper mit und ohne 0,1 ng/ml TGF β für 24 Stunden stimuliert. Für die letzten 6-8 Stunden wurde das Kulturmedium mit ^3H -Thymidin versetzt und die Menge an inkorporiertem, radioaktivem Thymidin im β -Zähler als Signal pro Minute (cpm) gemessen und im Diagramm dargestellt. $7,5 \cdot 10^4$ T-Zellen wurden mit einem plattengebundenen α -CD3-Antikörper mit und ohne 0,4 ng/ml TGF β stimuliert. Die Inkorporation von ^3H -Thymidin wurde nach 24 Stunden gemessen. In den Balkendiagrammen sind die Proliferationsraten von einem repräsentativen Experiment mit je mindestens drei Proben an B- und T-Zellen (a+b) aus wildtyp (wt) oder knockout Mäusen (ko) dargestellt. Die Standardabweichungen aus den vierfach-Bestimmungen sind als Fehlerbalken in den Diagrammen eingezeichnet. Die Sterne kennzeichnen einen p-Wert aus einem Student'schen T-Test von <0,05.

CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten und Milz oder B220⁺ B-Zellen aus der Milz von Smif^{wt} oder Smif^{ko} Mäusen wurden aufgereinigt, so dass eine Kultur von >95% Reinheit zur Messung der Proliferation eingesetzt werden konnte. Es wurden $7,5 \cdot 10^4$ CD4⁺ T-Zellen bzw. $1 \cdot 10^5$ B220⁺ B-Zellen in 96-Lochplatten einen Tag mit gebundenem α -CD3-Antikörper bzw. mit α -IgM-Antikörper oder LPS stimuliert. Um die Reaktion von TGF β auf die Lymphozytenkultur zu messen, wurde die Proliferationsrate von wildtyp und knockout Zellen mit und ohne TGF β verglichen. Die

Proliferation der B- bzw. T-Zellen ist als cpm (Count pro Minute) im Balkendiagramm dargestellt (Abb. 3.30). Wie bereits andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, inhibiert die Zugabe von TGF β die Proliferation von wildtyp B-Zellen (Abb. 3.30a, linkes Balkenpaar).¹²³ Smif-defiziente B220⁺ B-Zellen verhalten sich wie wildtyp Zellen (Abb. 3.30a, rechtes Balkenpaar). Ganz anders sieht es bei aus Smif^{ko} isolierten CD4⁺ T-Zellen aus. Diese proliferieren unter den gegebenen Kulturbedingungen besser als wildtyp T-Zellen (Abb. 3.30, graue Balken). Zudem kann TGF β die Proliferation (Abb. 3.30b, rechtes Balkenpaar) nicht inhibieren.

Folglich ist der anti-proliferative Effekt von TGF β *in vitro* ein Smif-abhängiger Prozess in CD4⁺ T-Zellen, wohingegen Smif-defiziente B-Zellen sich wie wildtyp Zellen verhalten. Die beobachtete stärkere Proliferation der CD4⁺ Zellen *in vivo* könnte mit der Voraktivierung der Zellen in Smif-defizienten Mäusen in Zusammenhang stehen (Kapitel 3.2.8.3).

3.2.10 Untersuchungen der Immunantwort in Smif-defizienten Mäusen

Die große zeitliche Divergenz in der Manifestation der Autoimmunerkrankung zwischen den einzelnen Smif-defizienten Mäusen macht die Unterscheidung zwischen primären, auslösenden Faktoren und sekundären Effekten schwierig. Deswegen wurde eine gezielte, zeitlich definierte Immunantwort durch spezifische Immunstimulation in jungen Mäusen ausgelöst. Sowohl Smif-defiziente Mäuse als auch Kontrollmäuse wurden durch Injektion verschiedener Antigene immunisiert und die darauffolgende Immunantwort an Hand geeigneter Parameter verfolgt.

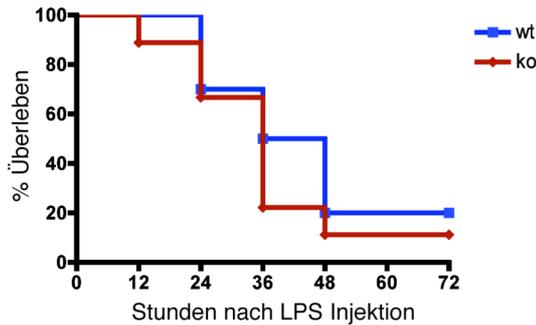
3.2.10.1 Die LPS-induzierte Immunantwort in Smif-defizienten Mäusen ist vergleichbar mit der in Kontrollmäusen

Die intraperitoneale Injektion des Endotoxins und Pyrogens LPS löst in den Mäusen eine starke Immunantwort aus. LPS bindet an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)/CD14/MD2-Rezeptorkomplex, und aktiviert so verschiedene Zelltypen, besonders aber Makrophagen. Infolgedessen reagieren sie mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α .

Nach Injektion von 35 mg/kg Körpergewicht LPS wurde den Mäusen nach einer, zwei und sechs Stunden Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α wurde in ELISA-Messungen ermittelt. Die Konzentrationen an diesen Zytokinen nahm sowohl in Smif-defizienten Mäusen (rote Kurve) als auch in Kontrollmäusen (blaue Kurve) nach LPS-Injektion zu (Abb. 3.31b). Dabei wird TNF α sehr früh in großen Mengen sekretiert, weswegen die Konzentration nach zwei Stunden ihr Maximum erreicht hat. Die Produktion von IL-1 und IL-6 beginnt hingegen erst ungefähr eine Stunden nach Injektion.

Die Mäuse verstarben aufgrund der toxischen, pyrogenen Wirkung von LPS innerhalb von drei Tagen. In Abb. 3.31a ist die Kaplan-Meier Überlebenskurve als prozentualer Anteil überlebender Tiere gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurven unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen, wildtyp (blaue Linie) und knockout (rote Linie), nicht.

a)



b)

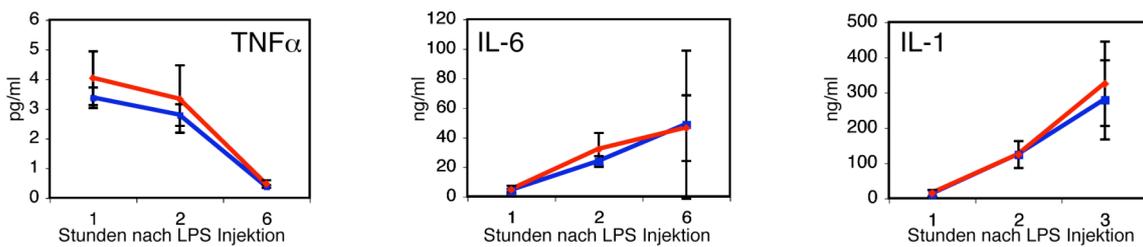


Abb. 3.31: Die Immunisierung mit Lipopolysaccharid. Smif-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen wurden 35 mg/kg LPS i.p. verabreicht. 1, 2 und 6 Stunden nach Injektion wurde den Mäusen Blut zur Serumgewinnung entnommen. Die Mäuse verstarben innerhalb von 3 Tagen an den Folgen des verabreichten Endotoxins oder wurden aufgrund des sich rasch verschlechternden Allgemeinzustandes getötet. In der Kaplan-Meier Überlebenskurve ist der prozentuale Anteil überlebender Tiere aus zwei unabhängigen Experimenten gegen die Zeit aufgetragen. In rot dargestellt ist die Gruppe der Smif-defizienten Mäuse und in blau die Gruppe der Kontrollmäuse (a). Die Konzentration der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α wurde aus dem Serum der Mäuse mittels ELISA bestimmt (b). In den Diagrammen ist der Mittelwert der jeweiligen Zytokinkonzentration der Kontrollgruppe (blau) und die mittlere Konzentration in den Seren der knockout Mäuse (rot) dargestellt. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Smif die schnelle Immunantwort nach LPS Injektion nicht beeinflusst. Sowohl die Produktion proinflammatorischer Zytokine als auch die Überlebensdauer Smif-defizienter Mäuse ist vergleichbar mit der von Kontrollmäusen. Zudem konnte zuvor gezeigt werden, dass Smif, im Vergleich zu anderen Leukozyten, nur schwach in Makrophagen exprimiert wird (Abb. 3.19a).

3.2.10.2 Die Immunisierung Smif-defizienter Mäuse mit T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Antigenen

Zur Immunisierung von Mäusen werden diese mit Immunogenen in Kontakt gebracht, die eine Immunreaktion auslösen. T-Zell-abhängige Antigene (z.B. NP-15-Ova) unterscheiden sich von T-Zell-unabhängigen Antigenen (z.B. TNP-Ficoll) in der Art und Weise, wie sie eine Immunantwort auslösen. Während zur maximalen Antikörperproduktion nach Kontakt mit T-Zell-abhängigen Antigenen neben der Quervernetzung der B-Zell-Rezeptoren durch das Antigen kostimulatorische Signale von T-Zellen benötigt werden, reicht für eine vollständige Aktivierung der B-Zellen das T-Zell-unabhängige Antigen aus.

3.2.10.2.1 Smif-defiziente Mäuse reagieren auf die NP-15-Ova Immunisierung mit einer mit wildtyp Kontrollen vergleichbaren Immunantwort

Zur Immunisierung der Mäuse mit einem T-Zell-abhängigen Antigen, wurde diesen 200 µg NP-15-Ova pro Maus intraperitoneal verabreicht. Um die Immunantwort zu verstärken wurden den Tieren an Tag 28 und 56 nach erster Injektion erneut NP-15-Ova gespritzt. Den Mäusen wurde an den im Diagramm angegebenen Tagen nach Erstkontakt Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Die Konzentration an Antikörpern, als Marker für die Stärke der Immunantwort, wurde mittels ELISA bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Konzentration an IgM, IgG1, IgA und IgG3 im Serum ist für die knockout Gruppe (rote Linie) und die Kontrollgruppe (blaue Linie) in den Diagrammen dargestellt (Abb. 3.32). Während sich die Konzentration an IgM, IgA und IgG3 nicht signifikant in den beiden Gruppen unterscheidet, ist zu späteren Zeitpunkten in Smif-defizienten Mäusen eine höhere IgG1 Konzentration im Serum gemessen worden. Dieses Ergebnis konnte bei der Reproduktion der Daten nicht bestätigt werden. Demnach reagieren sowohl Smif-defiziente als auch wildtyp Mäuse auf die Immunisierung mit NP-15-Ova, einem T-Zell-abhängigen Antigen, mit einer vergleichbar stark ausgeprägten Immunantwort.

3.2.10.2.2 Smif-defiziente Mäuse reagieren auf die TNP-Ficoll Immunisierung mit einer verstärkten Immunantwort

Zur Immunisierung der Mäuse mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll, wurde diesen 50 µg TNP-Ficoll pro Maus intraperitoneal injiziert. TNP-Ficoll induziert eine Quervernetzung der membranständigen Immunglobuline, was zu einer vollständigen, T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen führt. Es kommt zu einer IgM Antwort mit anschließender Differenzierung und Immunglobulin Klassenwechsel zu IgG3. Die Konzentrationen an IgM bzw. IgG3 im Serum der Mäuse wurden am Tag der Immunisierung und erneut nach 7, 14 und 21 Tagen ELISA-Messungen

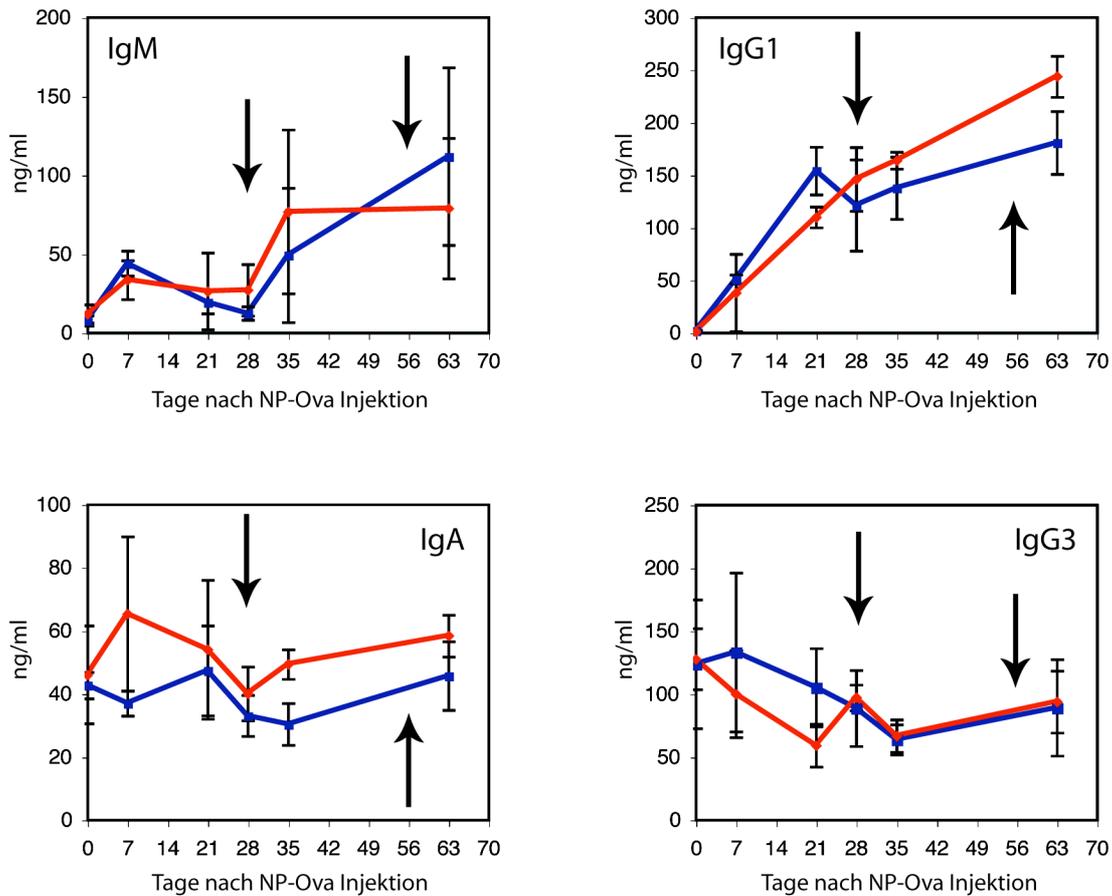


Abb. 3.32: Immunisierung Smif-defizienter Mäuse mit dem T-Zell-abhängigen Antigen NP-15-Ova. Smif-defizienten Mäusen (rot) und Kontrollmäusen (blau) wurde 200 µg NP-15-Ova pro Maus i.p. injiziert. Dabei bestand jede Gruppe aus mindestens drei Mäusen. In den Diagrammen sind die mittleren Konzentrationen der verschiedenen Immunglobulinklassen aus einem von zwei unabhängigen Experimenten gegen die Zeit aufgetragen. Die Pfeile weisen auf die Tage 28 und 56, an denen eine Auffrischung der Immunisierung mit der gleichen Dosis an Antigen durchgeführt wurde. Die Standardabweichung ist jeweils in Form von Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt.

ermittelt. In Abb. 3.33 ist der zeitliche Verlauf der Konzentration an IgM bzw. IgG3 aufgetragen. Die Immunglobulin-Konzentrationen sind in Smif-defizienten Mäusen (rote Linie) um ein vielfaches höher im Vergleich zu immunisierten Kontrollmäusen (blaue Linie). Die Menge an IgM bzw. IgG3 im Serum ist als Maß für die Stärke der Immunantwort bestimmt worden. Smif-defiziente Mäuse reagieren auf T-Zell-unabhängige Antigene mit einer vergleichsweise starken Aktivierung von B-Zellen. Smif wird folglich in B-Zellen zu einer kontrollierten, adäquaten Immunantwort benötigt. Der Verlust der Smif Expression geht einher mit der übermäßigen Produktion von Antikörpern, die zu einer verstärkten Immunantwort führt.

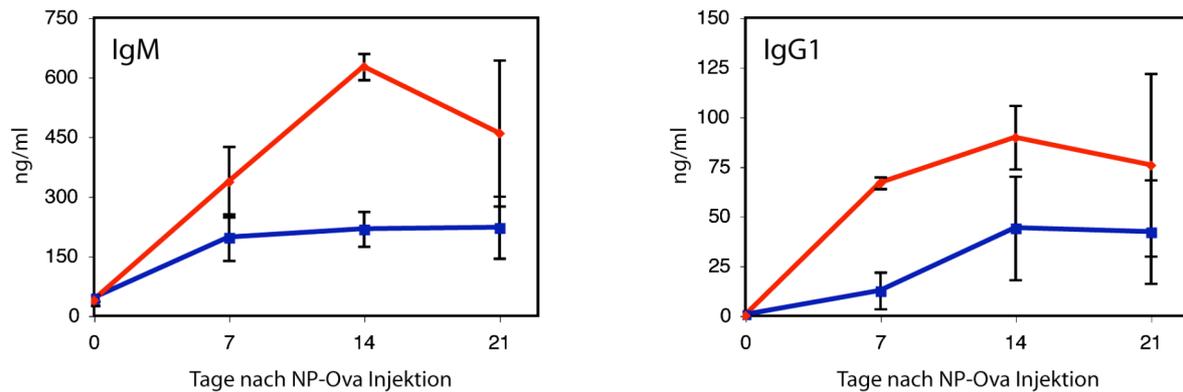


Abb. 3.33: Immunisierung Smif-defizienter Mäuse mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll. Smif-defizienten Mäusen (rot) und Kontrollmäusen (blau) wurde 50 µg TNP-Ficoll pro Maus i.p. injiziert. In den Diagrammen ist der Verlauf der Konzentration von IgM (linker Graph) und IgG3 (rechter Graph) nach TNP-Ficoll Gabe aus einem von drei Immunisierungsexperimenten dargestellt. Dabei bestanden die Gruppen der Smif-defizienten Mäuse (rote Kurve) und der Kontrollmäuse (blaue Kurve) aus je mindestens drei Tieren. Die Standardabweichung ist jeweils in Form von Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt.

3.2.11 Smif-defiziente Mäuse haben weniger B1-Zellen in der Peritonealhöhle

T-Zell-unabhängige Antigene stimulieren die Produktion von Antikörpern in der Abwesenheit von MHCII-vermittelter T-Zell-Hilfe. B-Zellen, die auf eine Stimulation mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll ansprechen, sind die Marginalzonen B-Zellen in der Milz und die B1-Zellen in der Pleura- und Peritonealhöhle.¹²⁴ Zusammen induzieren sie die frühe Immunantwort nach Antigenkontakt.

Die Ergebnisse der Immunisierungsexperimente (Kapitel 3.2.10) warfen die Frage auf, ob die an der Immunantwort nach Stimulation mit T-Zell-unabhängigen Antigenen beteiligten B-Zell-Populationen sich zwischen Smif-defizienten und wildtyp Mäusen unterscheiden. Zur Beantwortung der Frage wurde zunächst die Smif Expression in diesen spezialisierten B-Zellen ermittelt. Hierfür wurde die Expression von Smif indirekt über die Expression von GFP durchflusszytometrisch bestimmt. Sowohl bei B1-Zellen als auch bei MZB-Zellen ist im Histogramm eine deutliche Verschiebung der Kurven von Smif^{ko} (rote Kurve) im Vergleich zu Smif^{wt} (blaue Kurve) nach rechts zu erkennen (Abb. 3.34). Demzufolge ist der endogene Smif-Promoter in knockout B1-Zellen und MZB aktiv und GFP wird exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass Smif in wildtyp B1-Zellen und MZB exprimiert wird. In Abb. 3.24 wurde bereits gezeigt, dass der prozentuale Anteil an MZB in der Milz zwischen knockout und wildtyp Mäusen nicht variiert.

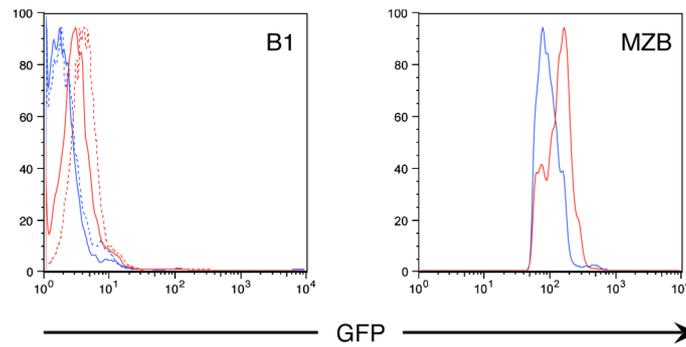


Abb. 3.34: Smif Expression in Marginalzonen B-Zellen und B1 Zellen. Die Expression von GFP in Smif-defizienten Mäusen (schwarze Kurven) ist für die Populationen der Marginalzonen B-Zellen (linkes Histogramm) und B1-Zellen (rechtes Histogramm) dargestellt. Als Kontrolle sind die Kurven von je zwei wildtyp Mäusen in grau im selben Histogramm gezeigt.

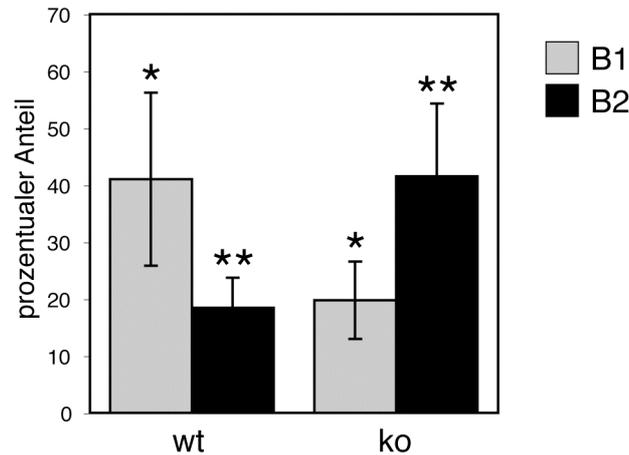


Abb. 3.35: Der Anteil an B1-Zellen im Peritonealraum. Die Zellen aus einer Peritoneallavage wurden auf die Oberflächenmarker B220 und CD19 mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die Menge an B1 ($CD19^+ B220^{lo}$, hellgrau) und B-Zellen ($CD19^+ B220^+$, dunkelgrau) wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Im Balkendiagramm sind die mittleren prozentualen Anteile an den B-Zell-Populationen aus wildtyp (wt, linker Abbildungsteil) und knockout (ko, rechter Abbildungsteil) Mäusen dargestellt. Die Standardabweichungen ergeben sich aus der Bildung des Mittelwertes aus 6 bzw. 8 Mäusen pro Gruppe und sind in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die Sternchen (*) markieren einen p-Wert $<0,004$.

Die Immunphänotypisierung der Zellen, die aus einer Peritoneallavage gewonnen wurden, mit den Markern B220 und CD19 zeigte eine deutliche Reduktion an B1-Zellen ($B220^{lo} CD19^+$) und eine Erhöhung der B-Zellen ($B220^+ CD19^+$) in der Bauchhöhle (Abb. 3.35). Während nur ~20 % der Zellen in Smif-defizienten Mäusen $B220^{lo} CD19^+$ waren (linker Balken, rechter Teil der Abb. 3.35), waren es in Kontrollmäusen ~50 % (linker Balken, linker Teil der Abb. 3.35).

B1-Zellen können aufgrund eines Konzentrationsgradienten des Chemokins BLC in die Milz einwandern, wo sie spezifisch mit T-Zellen interagieren. Da die Zahl der B1-Zellen in Smif-defizienten Mäusen im Bauchraum verringert ist, wurde die Expression von BLC genauer untersucht. Erste Hinweise auf eine erhöhte BLC Konzentration gaben die Ergebnisse der Zytokinarrays, in denen, basierend auf einem Sandwich-ELISA, verschiedene Zytokinkonzentrationen im Serum der Mäuse quantitativ bestimmt wurden. In zwei von vier knockout Mäusen konnte eine Erhöhung des Chemokins BLC im Vergleich zu wildtyp Geschwistern im Serum detektiert werden (Abb. 3.15). Zur Verifizierung dieser Daten wurden quantitative RTQ-PCR durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus Milz oder Thymus in cDNA umgeschrieben und in der PCR-Reaktion eingesetzt. In Abb. 3.36 ist die relative Menge an BLC, normiert auf das Kontrollgen GAPDH, im Balkendiagramm dargestellt. In vielen, aber nicht allen Smif-defizienten Mäusen (weiße Balken) konnte ein Vielfaches an BLC mRNA im Vergleich zu Kontrollmäusen (schwarze Balken) nachgewiesen werden.

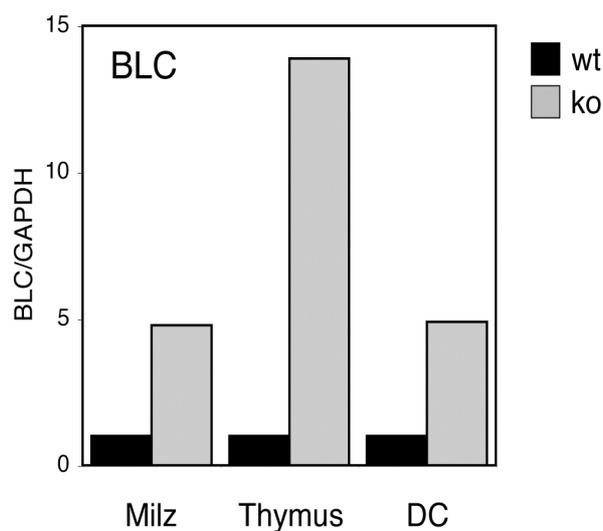


Abb. 3.36: Die BLC Expression in Milz, Thymus und dendritischen Zellen. RNA wurde aus Milz, Thymus und dendritischen Zellen Smif-defizienter Mäuse (graue Balken) und Kontrollmäuse (schwarze Balken) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge an BLC wurde in einer quantitativen RTQ-PCR-Reaktion in Duplikaten bestimmt. Im Balkendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte normiert auf das Kontrollgen GAPDH. Dabei wurde der Wert für die wildtyp Probe auf eins gesetzt. BLC: *B lymphocyte chemoattractant*; DC: dendritische Zellen

Dendritische Zellen produzieren BLC, womit die Organisation von B-Zellen in den Lymphfollikeln und lymphatischen Geweben kontrolliert wird. Daher wurde die Expression von BLC in aus Knochenmark differenzierten dendritischen Zellen (Abb. 3.29) gemessen. Smif-defiziente DC haben im Vergleich zu wildtyp Zellen mehr mRNA, die für BLC codiert (Abb. 3.36, rechtes Balkenpaar).

Die Ergebnisse geben Anlass zu der Annahme, dass B1-Zellen aufgrund der erhöhten Konzentration an BLC in die Gewebe einwandern und so die Zahl der B1-Zellen in der Bauchhöhle reduziert wird.

3.2.12 Untersuchungen der TGF β -Effekte in Smif-defizienten Fibroblasten

Zur Untersuchung des TGF β -Signalweges eignen sich Fibroblasten, die aus Embryonen des generierten Smif-Mausstammes gewonnen wurden. Nach Immortalisierung können die Zelllinien unbegrenzt expandiert werden. Dies ermöglicht eine Reihe von Experimenten in diesem Modellsystem.

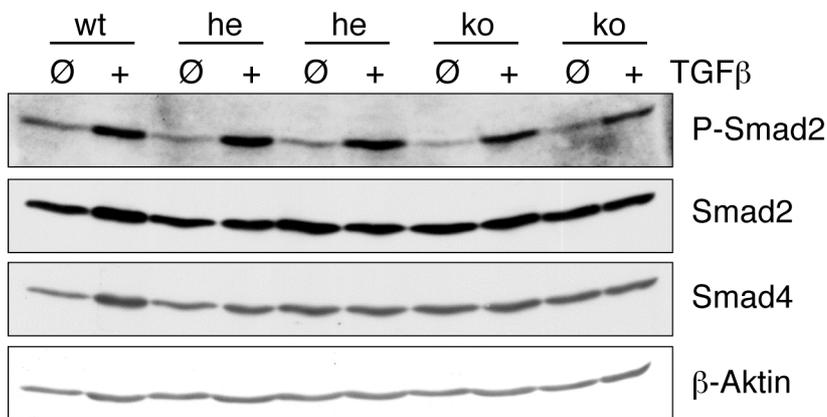


Abb. 3.37: Der TGF β -Signalweg in primären Mef. Primäre Mef wurden für 24 Stunden gehungert und anschließend zwei Stunden mit 4ng/ml TGF β stimuliert. Aus wildtyp (wt), heterozygoten (he) und knockout (ko) Zellen wurden Lysate hergestellt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der untersuchten Proteine P-Smad2, Smad2, Smad4 und β -Aktin im Western Blot nach vorheriger gelelektrophoretischer Auftrennung. Dabei diente die Detektion von β -Aktin als Kontrolle für die geladene Proteinmenge.

3.2.12.1 Der TGF β -Signalweg in primären Mef

An den ersten Schritten der Aktivierung der TGF β -Signaltransduktionskaskade ist Smif nicht direkt beteiligt. Durch interne Kontrollmechanismen wie positive oder negative *feedback-loops* könnte Smif dennoch Einfluss auf die intrazelluläre Weiterleitung des Signals haben. Um dies zu überprüfen, wurden primäre knockout und wildtyp Mef für zwei Stunden mit 4 ng/ml TGF β kultiviert. Die Menge an phosphoryliertem Smad2, als Marker für die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade, sowie die Mengen an Smad2 und Smad4 wurden mittels Western Blot ermittelt (Abb. 3.37). Die Darstellung der Proteine mit dem entsprechenden Antikörper zeigen vergleichbare

Mengen an den Proteinen. Die immunchemische Darstellung von β -Aktin zeigt eine gleiche Ladung an Gesamtprotein in allen Proben.

Diese Daten zeigen deutlich, dass Smif die intrazelluläre Weiterleitung eines TGF β -Signals über die Phosphorylierung von Smad2 sowie die intrazellulären Konzentrationen an Smad2 und Smad4 nicht beeinflusst.

3.2.12.2 TGF β inhibiert die Proliferation primärer Mef

TGF β wirkt inhibitorisch auf das Zellwachstum verschiedenster Zellen. Die Bestimmung der Zellzahl kann demzufolge zur funktionellen Untersuchung des TGF β -Effektes auf Mef herangezogen werden. Primäre Mef wurden in einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ mit und ohne TGF β kultiviert. Die Proliferationsrate wurde durch Zählen der viablen Zellen ermittelt. Tote Zellen wurden durch die Färbung der zu zählenden Zellsuspension mit Trypanblau ausgeschlossen. In Abb. 3.38 sind die Wachstumskurven von vier knockout und zwei wildtyp Mef mit je zwei unterschiedlichen TGF β -Konzentrationen dargestellt. TGF β ist in der Lage, sowohl in Smif-defizienten als auch in wildtyp Zellen das Wachstum zu inhibieren.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass der durch TGF β -vermittelte Proliferationsstopp in primären Mef ein Smif-unabhängiger Prozess ist.

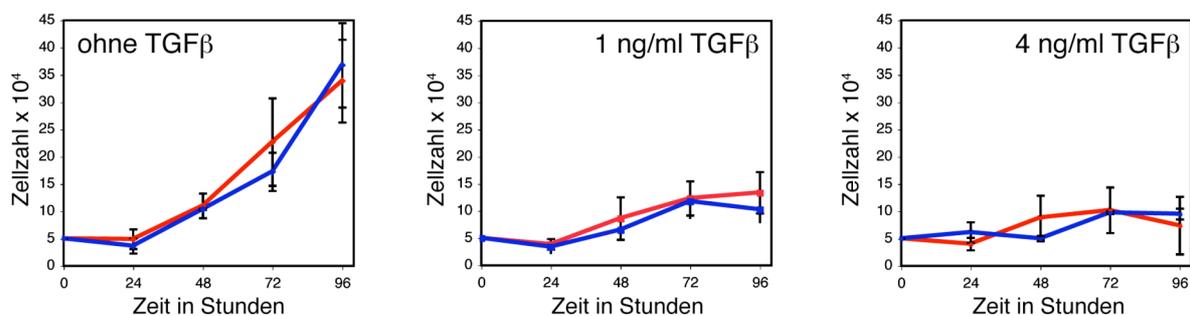


Abb. 3.38: Der Effekt von TGF β auf die Proliferation von primären Mef. Die Zellzahl primärer Mef wurde nach einem, zwei, drei und vier Tagen unter Ausschluss der toten Zellen durch Trypanblau bestimmt. Dargestellt sind die Wachstumskurven von wildtyp (blau, n=2) und knockout (rot, n=4) Mef mit und ohne TGF β . Die Standardabweichungen vom jeweiligen Mittelwert sind in Form von Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt.

3.2.12.3 Die TGF β -abhängige Transkriptionsaktivierung in Smif-defizienten immortalisierten Mef ist eingeschränkt

Die durch TGF β -vermittelte Aktivierung der Transkription kann mit Hilfe von Luziferase-Reporterkonstrukten gemessen werden. Für das ARE-lux Promoterkonstrukt konnte bereits gezeigt

werden, dass die Expression von dominant-negativem Smif in Mv1Lu-Zellen die TGF β -vermittelte Antwort blockiert.³¹ Es sind verschiedene Luziferase-Reporterkonstrukte von unterschiedlichen Arbeitsgruppen charakterisiert worden, die abhängig von einem Signal von Mitgliedern der TGF β -Superfamilie aktiviert werden. Zu diesen zählen neben ARE-lux auch die TGF β -abhängigen Konstrukte 3TP-lux, I4+T β RE und das BMP4-abhängige BV1.5 Konstrukt. (SBE)₄-luc ist sowohl durch TGF β als auch BMP4 aktivierbar.

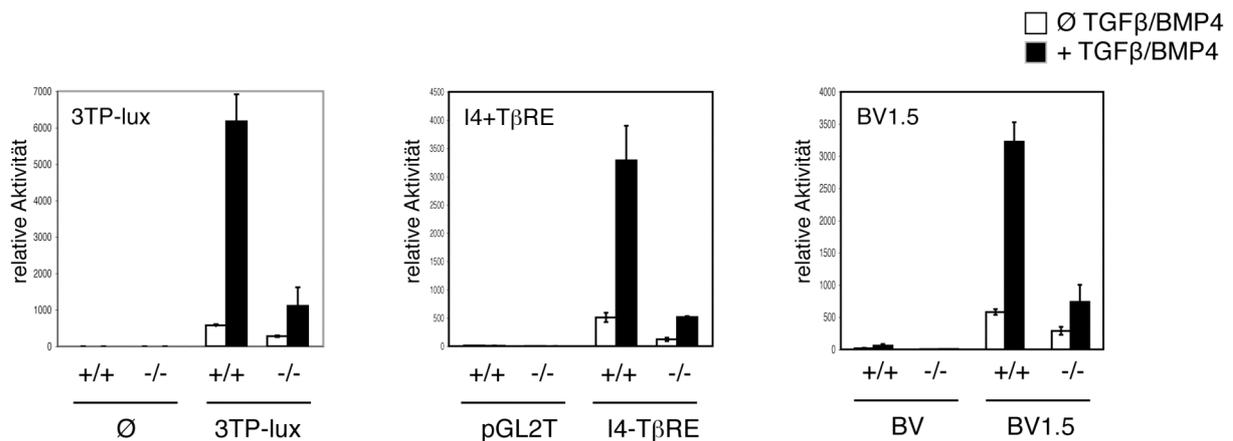


Abb. 3.39: Die Transkriptionsaktivität in Smif-defizienten Mef-Zelllinien. $5 \cdot 10^4$ Mef wurden transient mit den angegebenen Konstrukten je in Triplikaten transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 12 Stunden gehungert und für die darauf folgenden 12 Stunden mit entweder 4 ng/ml TGF β (3TP-lux, linkes Diagramm; I4+T β RE, mittleres Diagramm) oder 100 ng/ml BMP4 (BV1.5, rechtes Diagramm) stimuliert. Nach passiver Lyse wurde die Reporteraktivität mit dem „Dual Luciferase® Reporter Assay System“ am Luminometer bestimmt. In den Balkendiagrammen sind die auf die Kontrolle *Renilla* bezogenen Messwerte der *firefly* Luziferase aus einem von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zum Mittelwert der Dreifachbestimmungen an.

Zur Messung der Transkriptionsaktivität über die Expression von Luziferase wurden entweder wildtyp oder knockout Mef-Zelllinien mit einem Vektor, der für die *Renilla*-Luziferase kodiert, als interne Kontrolle und den angegebenen Konstrukten, transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 12 Stunden gehungert und anschließend für 12 weitere Stunden mit TGF β bzw. BMP4 stimuliert. Nach passiver Lyse der Zellen wurde nach Zugabe der Substrate für die *Renilla* und *firefly* Luziferase, die bei der Umsetzung entstandene Chemolumineszenz im Luminometer gemessen. Die relative Aktivitäten sind in Abbildung 3.39 und 3.40 dargestellt. Für alle drei Reporterkonstrukte ist eine starke Aktivierung nach Stimulation in wildtyp Mef erkennbar (Abb. 3.39). Im Vergleich dazu kann die Transkription in Smif-defizienten Fibroblasten nur sehr schwach aktiviert werden. Dies wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten und mit je mindestens

zwei verschiedenen Mef-Zelllinien jeden Genotyps bestätigt. Ein klares Indiz für die TGF β -abhängige transkriptionsaktivierende Wirkung von Smif.

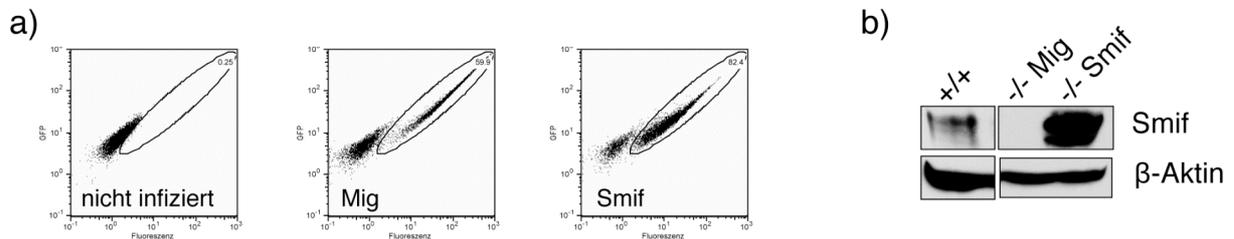


Abb. 3.40: Wiedereinbringen von funktionellem Smif in knockout Mef-Zelllinien. Smif-defiziente Mef-Zelllinien wurden retroviral mit entweder dem Kontrollvektor Mig oder Mig-Smif infiziert. Die Effizienz der Infektion ist in den repräsentativen Punktwolkendiagrammen anhand der GFP Expression gezeigt (a). Nicht infizierte knockout Mef-Zellen dienten als Negativkontrolle (linkes Punktwolkendiagramm). Der prozentuale Anteil an positiven Zellen ist innerhalb der Ellipsen angegeben. Die Expression von Smif wurde im Western Blot überprüft (b). Hierfür wurden Lysate der verschiedenen Zelllinien (rechte Spuren) sowie einer wildtyp Positivkontrolle (linke Spur) gelelektrophoretisch aufgetrennt und Smif immunchemisch unter Verwendung eines α -Smif-Antikörpers detektiert. Stellvertretend für die geladene Proteingesamtmenge wurde die Menge an β -Aktin bestimmt.

Um die Smif-Abhängigkeit in diesem beobachteten Unterschied zwischen wildtyp und knockout Zellen zu bestätigen, wurde funktionelles Smif in einer Mef knockout Linie re-exprimiert (Abb. 3.40). Zu diesem Zwecke wurde in Phoenix-Zellen Virus generiert, der die genetische Information für das murine Smif trägt. Nach retroviraler Transfektion der knockout Mef-Zelllinie wurde die Effizienz der Transfektion durch durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression überprüft (Abb. 3.40a). EGFP ist in dem verwendeten Mig-Vektor kodiert und wird über eine IRES exprimiert. Die Bestimmung der Anzahl an EGFP-positiven Mef, die in dem Versuch eingesetzt wurden, ist in Abb. 3.40a dargestellt. Ungefähr 60% der eingesetzten Zellen exprimieren EGFP, d.h. sind erfolgreich mit entweder dem Leervektor oder Mig-Smif transfiziert worden. Die immunchemische Darstellung im Western Blot mit einem α -Smif-Antikörper bestätigt, dass die Transduktion in einer Smif-Expression resultiert, die im Vergleich zu wildtyp Mef um ein vielfaches höher ist (Abb. 3.40b). Diese Zellen wurden zusammen mit wildtyp Kontrollen mit dem *Renilla*-Vektor und dem (SBE)₄-luc Reporter transfiziert. Durch die Stimulation der Zellen mit TGF β erhöht sich die Aktivität des Promoters (SBE)₄ (Abb. 3.41, vergleiche weiße Balken mit schwarzen). Dabei ist die Aktivierung in den Smif-defizienten Zellen und knockout Mef, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, signifikant schwächer. Die Re-expression von Smif hingegen hebt diesen Defekt wieder auf. Im Vergleich zu wildtyp-Zellen wird die Aktivierung sogar gesteigert, was auf die höhere Expression von Smif in diesen Zellen zurückgeführt werden kann.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Repression der Transkriptionsaktivität in knockout Mef ein Smif-abhängiger Prozess ist. Das Wiedereinbringen von Smif kann diesen Effekt umkehren.

3.2.13 JunB wird in Smif-defizienten Milzzellen nicht durch TGF β reguliert

Die Ergebnisse der Reporterassays zeigen, dass in Smif-defizienten Zellen die verschiedenen TGF β -abhängigen Promotoren nach Stimulation im Vergleich zu wildtyp nicht im gleichen Ausmaß aktiviert werden können. Diese Daten sollten in primären Milzzellen und somit in einem weniger artifiziellen System bestätigt werden. Der beobachtete Phänotyp in Smif-defizienten Mäusen ist vermutlich auf molekularer Ebene durch die eingeschränkte Aktivierung verschiedener Promotoren nach TGF β Stimulation bedingt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von Smif in Ba/F3-Zellen zu einer TGF β -abhängigen Hochregulation von JunB führt, wohingegen bei Expression einer Smif-Mutante, der die transkriptionsaktivierende Domäne fehlt, die Expression von JunB nicht hochreguliert werden kann.³¹

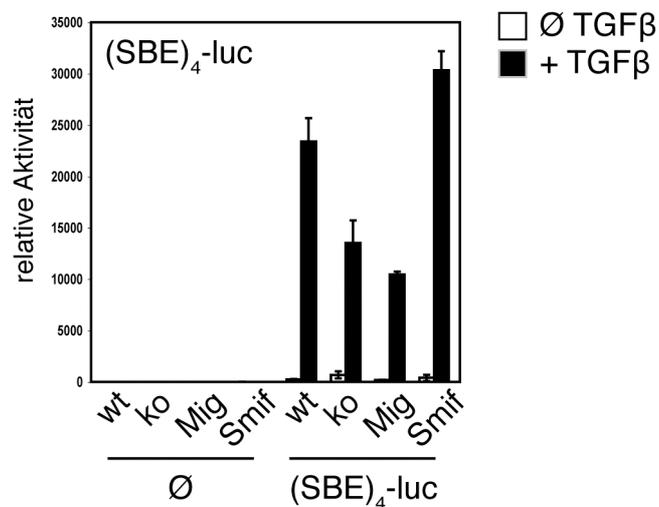


Abb. 3.41: Smif reguliert die Transkriptionsaktivität des TGF β -abhängigen Reporterkonstruktes (SBE)₄-luc. Analog zu Abb. 3.40 wurde die Transkriptionsaktivität in den angegebenen Mef-Zelllinien gemessen. Hierfür wurden neben wildtyp und knockout Zellen auch zu ~60% GFP-positive knockout Mef verwendet, die entweder mit dem Kontrollvektor oder Mig-Smif retroviral infiziert wurden (Abb. 3.40). Im Diagramm dargestellt ist die relative Reporteraktivität aus einem von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zum Mittelwert der Dreifachbestimmungen an.

Die TGF β -abhängige Regulation von JunB in wildtyp versus knockout Zellen sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden. Hierfür wurde eine Einzelzellsuspension aus der Milz für zwei Stunden mit und ohne TGF β inkubiert. Anschließend wurde die Menge an JunB, einem frühen

TGF β -abhängigen Gen, mittels quantitativer RTQ-PCR bestimmt (Abb. 3.42). Im Balkendiagramm sind die relativen Mengen an JunB, normiert auf das Kontrollgen GAPDH, dargestellt. Die basalen Level an JunB sind in Smif-defizienten Milzzellen vergleichbar mit Milzzellen, die aus Kontrollmäusen isoliert worden sind. Die Stimulation der Milzzellen aus wildtyp Mäusen mit TGF β zeigen, wie erwartet, eine Induktion der JunB Expression. Diese Hochregulation kann in Smif-defizienten Milzzellen nicht beobachtet werden.

Die Daten bestätigen die wichtige Funktion von Smif als Transkriptionsaktivator für TGF β -abhängige Gene, wie beispielsweise JunB. Die TGF β -abhängige Expression verschiedener Proteine ist die zelluläre Grundlage für die durch TGF β induzierten biologischen Antworten der Zellen.

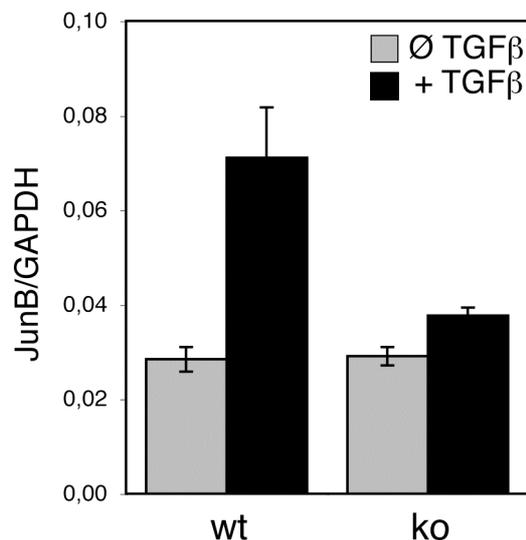


Abb. 3.42: Die Regulation des frühen TGF β -abhängigen Gens JunB in Milzzellen. Einzelzellsuspensionen aus Smif-defizienten Mäusen (ko, rechter Teil) und Kontrollmäusen (wt, linker Teil) wurden für 24 Stunden mit oder ohne 4 ng/ml TGF β inkubiert. Nach Isolation der RNA wurde die Menge an JunB in einer quantitativen RTQ-PCR bestimmt. Im Balkendiagramm dargestellt ist der Mittelwert aus Doppelbestimmungen der Menge an JunB bezogen auf das Kontrollgen GAPDH. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4 Diskussion

Das erfolgreiche Ausschalten eines Proteins durch Generierung eines knockout Mausmodells ermöglicht die Untersuchung dessen biologischer Funktionen *in vivo*.

Smif wurde in unserem Labor als Interaktionspartner von Smad4 identifiziert.³¹ Funktionelle Analysen zeigten, dass Smif ein bedeutsamer Koaktivator in der Transkription TGF β -regulierter Gene abhängig von einem TGF β Signal ist. Im Gegensatz zu den allgemeinen Koaktivatoren CBP/p300, die an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, scheint Smif ein überwiegend Smad-spezifischer Koaktivator zu sein.²³ In Hefe konnte eine TGF β - und Smad4-unabhängige Transkriptionsaktivität beobachtet werden, die auf eine mögliche Beteiligung von Smif in anderen Signalwegen hinweist.³¹

Die Funktion von Smif und Smif-spezifischen biologischen Prozessen in Säugetieren wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die erfolgreiche Generierung einer konventionellen Smif-defizienten Maus bot hierfür die Grundlage.

Smif wird während der gesamten Embryogenese exprimiert (Abb. 3.17b und Abb. 3.18). Smif-defiziente Mäuse sind viabel. Diese Beobachtung lieferte bereits einen wichtigen Hinweis auf die Spezifität von Smif als Koaktivator. Das Ausschalten von transkriptionalen Koaktivatoren, die auch in anderen Signalkaskaden eine Rolle spielen wie CBP/p300, führt zu einer embryonalen Letalität. Selbst Mäuse, die heterozygot für CBP und p300 sind, sterben während der Embryonalentwicklung.¹²⁵

Die Wichtigkeit von Smif in Säugetieren wurde bei dem Vergleich zwischen Smif-defizienten Mäusen und wildtyp Wurfgeschwistern deutlich. Smif^{ko} haben ein reduziertes Körpergewicht, eine verkürzte Lebenserwartung (Tabelle 3.1) und machen nur 17% der Nachkommenschaft aus Paarungen heterozygoter Mäuse aus. Nach der Verteilung nach Mendel würde man 25% Smif^{ko} erwarten.

4.1 Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine autoimmunologische Erkrankung

Unter Autoimmunopathien fasst man eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammen, denen ein Verlust der immunologischen Toleranz zu Grunde liegt. Man unterscheidet systemische von organspezifischen Autoimmunerkrankungen. Der TGF β -Signalweg ist in vielerlei Hinsicht mit der

Entstehung von Autoimmunerkrankungen verbunden.¹²⁶ Dabei spielt vor allem der Verlust des inhibitorischen Effekts auf Zellen des Immunsystems eine entscheidende Rolle (Kapitel 1.4.3). Als Folge kommt es zur Aktivierung von T-Zellen und der Produktion von Antikörpern gegen Autoantigene.

Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine systemische Autoimmunerkrankung, die große Ähnlichkeit zu der im Menschen auftretenden Krankheit systemischer Lupus erythematoses (SLE) aufweist. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in der Maus durch Infiltrationen von Lymphozyten in verschiedenen Organen und der Entstehung einer Glomerulonephritis (Abb. 3.9, Abb. 3.11 und Abb. 3.12). In Smif-defizienten Mäusen weist alles darauf hin, dass es sich um eine Immunkomplex-induzierte Glomerulonephritis handelt, die mit einer Proteinurie, einem typisch klinischen Symptom, einhergeht (Tabelle 3.2). Es konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Immunkomplexeinlagerungen in der Basalmembran visualisiert werden. Diese sind als elektronendichte Ablagerungen (EDD) deutlich zu erkennen (Abb. 3.12b). Immunkomplexe können sich zudem in der Gefäßwand ablagern, eine mögliche Ursache für die beobachtete Vaskulitis in der Niere (Abb. 3.11).

Smif-defiziente Mäuse produzieren Autoantikörper, die im Serum detektiert werden können (Abb. 3.13). Die Autoantigene, gegen die Smif^{ko} Autoantikörper produzieren, unterschieden sich zwischen den verschiedenen Smif-defizienten Mäusen. Dies kann an den unterschiedlichen Autoantikörpermustern abgelesen werden. Alle detektierten Autoantigene befinden sich im Nukleus, da eine cytoplasmatische Färbung in keiner untersuchten Maus beobachtet wurde. Die Diversität der Autoantikörper spricht dagegen, dass es sich hierbei primär um eine Fehlregulation der B-Zellen handelt.

Der Phänotyp in Smif^{ko} weist in den oben beschriebenen Beobachtungen Ähnlichkeiten zu dem Phänotyp von TGFβ1^{-/-} Mäusen auf.^{73, 74} Autoantikörper gegen verschiedene nukleäre Antigene konnten in TGFβ1-defizienten Mäusen gemessen werden und Einlagerungen von Immunglobulinen in den Glomeruli der Niere wurden detektiert. Im Gegensatz zur TGFβ1^{-/-}, konnten in Smif-defizienten Mäusen in ELISA-Messungen keine Autoantikörper gegen Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz unterstützen die Gemeinsamkeiten zu der TGFβ1^{-/-} Maus die bisherigen Beobachtungen, dass Smif Teil der TGFβ-Signaltransduktionskaskade ist.

Viele Erkenntnisse über den Mechanismus der Entstehung von systemischen Autoimmunerkrankungen und deren Manifestation wurden aus Mausmodellen abgeleitet. Eines dieser Mausmodelle ist die MRL/lpr Maus. Diese Mäuse entwickeln eine spontane Autoimmunerkrankung, die die humane Lupus Erkrankung imitiert. Interessanterweise haben diese Mäuse eine erhöhte Serum-

konzentration an TGF β .¹²⁷ Eine leichte Erhöhung der TGF β -Konzentration konnte auch in Smif-defizienten Mäusen beobachtet werden (Abb. 3.16). Dies bietet jedoch weder in Smif^{ko} noch in MRL/lpr Mäusen einen Schutz vor der Entstehung autoimmunologischer Prozesse. Erst die starke Expression von TGF β in MRL/lpr Mäusen verhindert die Entstehung der SLE.¹²⁸

Die zentralen Mechanismen, die die Grundlage für den in Smif-defizienten Mäusen beobachteten autoimmunologischen Phänotyp bilden, werden in den folgenden Kapitel diskutiert.

4.2 Ursachen für die Entstehung des Autoimmunphänotyps in Smif-defizienten

Mäusen

Das Ausschalten von Smif in der kompletten Maus führt zu einer spontanen Autoimmunerkrankung, infolgedessen die Mäuse sterben. Gekennzeichnet ist der autoimmunologische Phänotyp durch eine massive Lymphozyteninfiltration in verschiedenen Organen und einer Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis. Die Zusammenhänge zwischen Smif, dem TGF β -Signalweg und der Entstehung der Autoimmunerkrankung auf zellulärer Ebene werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.2.1 T-Zellen und nicht B-Zellen sind Auslöser der Autoimmunerkrankung

Die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie ermöglichte eine Aussage über die Entwicklung und Differenzierung der Lymphozyten in Smif-defizienten Mäusen. Das pleiotrope Zytokin TGF β beeinflusst sowohl die Entwicklung von T-Zellen als auch die Entwicklung von B-Zellen, vom Progenitor bis hin zur reifen Zelle.^{66, 67}

Die periphere Verteilung von B- und T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen gemessen anhand der Oberflächenmarker B220 bzw. CD3 oder TCR unterscheidet sich nicht signifikant von dem prozentualen Anteil an B- und T-Zellen in Milz und Lymphknoten von Kontrollmäusen (Abb. 3.20). Auch ist das Verhältnis von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zu CD4⁺ T-Helfer-Zellen in den lymphatischen Organen durch das Ausschalten von Smif nicht beeinflusst (Abb. 3.26). Diese Normalverteilung in der Peripherie deckt sich mit einer normalen T-Zell-Entwicklung im Thymus (Abb. 3.25). Gleiches gilt für B-Zellen. Weder die B-Zell-Entwicklung noch die Verteilung verschiedener B-Zell-Subpopulationen sind in der Smif^{ko} verändert (Abb. 3.22, Abb. 3.23 und Abb. 3.24). Infolgedessen können Störungen in der Entwicklung und Reifung von B- und T-Zellen als

Ursache für die Entstehung der Autoimmunerkrankung in Smif-defizienten Mäusen auf zellulärer Ebene ausgeschlossen werden.

Im Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen ist die Reifung von T-Zellen, bei denen der TGF β Signalweg durch Mutation des T β RII in T-Zellen vollständig ausgeschaltet ist, ist ebenfalls nicht beeinflusst.¹²⁹ Ferner sind keine Defizite in der T-Zell-Entwicklung in Smad3-defizienten Mäusen festgestellt worden.⁸⁸

Interessanterweise sind die T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen voraktiviert. Die Oberflächenmarker aktivierter T-Zellen CD25, CD69, CD44 sind auf Smif-defizienten CD4⁺ T-Zellen hochreguliert. CD62L wird nach Aktivierung naiver T-Zellen herunterreguliert. Die Abnahme von CD62L auf der Oberfläche von Smif-defizienten Zellen im Vergleich zu CD4⁺ Zellen aus Kontrollmäusen ist deutlich messbar (Abb. 3.28a). CD4⁺ Zellen zeichnen sich somit durch einen aktivierten/Gedächtnis-Immunphänotyp aus, wohingegen CD8⁺ Zellen nur den Gedächtnis-T-Zell Marker CD44 vermehrt auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD62L ist mit der von CD8⁺ wildtyp Zellen vergleichbar (Abb. 3.28a). Die Expression der B-Zell-Aktivierungsmarker CD43, CD62L, CD69 und CD86 hingegen ist in Smif-defizienten Mäusen nicht verändert (Abb. 3.28b). B-Zellen liegen nicht-aktiviert vor.

Die spontane Aktivierung der T-Zellen *in vivo* ist als erste Ursache für den beobachteten autoimmunologischen Phänotyp in der Smif^{ko} festzuhalten. Dabei handelt es sich um einen T-Zell-spezifischen Prozess.

Auch in anderen Mausmodellen konnte bereits beobachtet werden, dass T-Zellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, die durch Fehlregulationen im TGF β Signalweg ausgelöst werden, eine zentrale Rolle einnehmen. B-Zellen hingegen spielen in diesem Zusammenhang eine eher untergeordnete Rolle. So zeigen TGF β 1-defiziente Mäuse eine progressive Leukozyten-Infiltration in verschiedenen Organen zusammen mit einer Hyperaktivität der T-Zellen.^{71, 72} Die entscheidende Rolle, die T-Zellen bei der Entwicklung des Phänotyps spielen, konnte durch die Depletion von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in der Maus gezeigt werden.^{130, 131} In beiden Fällen wird die Ausprägung der Erkrankung abgeschwächt. Unterstützt wird die Annahme, dass T-Zellen direkt durch das Ausschalten des TGF β -Signalweges ihre Toleranz verlieren durch die Beobachtungen in Mausmodellen, in denen spezifisch der TGF β -Signalweg in T-Zellen unterbrochen wurde. Die Expression eines dominant-negativen T β RII in T-Zellen (CD4-DNR II) führt zu deren Aktivierung, die sich in inflammatorischen Infiltrationen manifestiert.^{92, 93} T-Zell-spezifische T β RI- oder T β RII-defiziente Mäuse entwickeln einen zur TGF β 1-defizienten Maus vergleichbaren Phänotyp.^{94, 129, 132}

Um die biologische Zellantwort nach Stimulation mit TGF β zu untersuchen und somit weitere Hinweise für die Entstehung der Autoimmunität in Smif-defizienten Mäusen zu erlangen, wurde die

Proliferation von aufgereinigten Lymphozyten gemessen. Die Zugabe von TGF β inhibiert die Proliferation in diesem System analog zu der Funktion von TGF β *in vivo*. So konnte in einem funktionellen Assay die Funktionalität des TGF β -Signalweges in Lymphozyten gemessen werden.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der aktivierte T-Zell Phänotyp in Smif-defizienten Mäusen *ex vivo* mit einer starken Proliferation von CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit α -CD3 Antikörper verbunden ist (Abb. 3.30b). Dieses Wachstum kann, wie es in wildtyp T-Zellen der Fall ist, nicht mehr durch die Zugabe von TGF β blockiert werden. Der inhibitorische Effekt von TGF β auf Smif-defiziente T-Zellen ist aufgehoben. Sehr hohe TGF β -Konzentrationen können das Wachstum der CD4⁺ Zellen Smif-defizienter Mäuse jedoch inhibieren (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten bestätigen die Funktion von Smif als Koaktivator. Eine ausreichende Transkriptionsaktivität von TGF β -regulierten Genen ist nach übermäßiger Stimulation auch in Smif-defizienten Zellen zu beobachten.

Smif-defiziente B-Zellen wachsen nach *in vitro* Stimulation mit entweder α -IgM-Antikörper oder LPS vergleichbar gut wie wildtyp B-Zellen (Abb. 3.30a). Die Proliferation von LPS-stimulierten B-Zellen kann durch die Zugabe von TGF β geblockt werden.¹²³

Die Inhibition von B-Zellen durch TGF β ist, im Gegensatz zu T-Zellen, ein Smif-unabhängiger Prozess. Nach Zugabe von TGF β zu *in vitro* Kulturen wird das Wachstum von Smif-defizienten B-Zellen und wildtyp Zellen gleichstark über einen weiten Konzentrationsbereich inhibiert (Abb. 3.30a).

Aus den Ergebnissen der Proliferationsmessungen lässt sich die zelltypspezifische Funktion von Smif ableiten. Die Proliferation von LPS- oder α -IgM-stimulierten B-Zellen wird durch die Zugabe von TGF β inhibiert, einen Unterschied im Grad der Wachstumsinhibition zwischen wildtyp und Smif-defizienten Zellen konnte nicht gemessen werden. Im Gegensatz dazu kann die Proliferation von α -CD3-stimulierten Smif-defizienten T-Zellen nicht mehr inhibiert werden. Dies zeigt, dass Smif ein zelltypspezifischer Koaktivator ist. Der auf die Proliferation inhibierende Effekt von TGF β wird zelltypspezifisch über Smif reguliert. Die beobachtete TGF β -abhängige Inhibition der Proliferation in B-Zellen und Mef (Abb. 3.38) wird in einem Smif-unabhängigen Signaltransduktionsprozess vermittelt, während die Inhibition in T-Zellen Smif-abhängig ist. Der beobachtete autoimmunologische Phänotyp kann mit dem Verlust des antiproliferativen Effekts von TGF β auf T-Zellen in Verbindung gebracht werden.

Diese Beobachtungen erinnern an Smad3-defiziente Mäuse. Hier konnte bereits für Smad3-defiziente Mef, Milzzellen und aufgereinigte B-Zellen eine Inhibition der Proliferation durch TGF β gezeigt werden, wohingegen nach Stimulation mit α -CD3 Antikörper TGF β das Wachstum der

Milzzellen bzw. aufgereinigten T-Zellen nicht mehr inhibieren kann.^{88, 89} Dennoch zeigen Mäuse, bei denen Exon1 von *Smad3* mutiert wurde, keinen inflammatorischen Phänotyp.⁸⁸ Möglicherweise wegen der redundanten Funktionen von Smad3 und Smad2. Der Autoimmunphänotyp der TGFβ1^{-/-} Maus hingegen wird zumindest teilweise durch den Verlust des inhibitorischen Effekts von TGFβ auf Lymphozyten verursacht.^{133, 134}

4.2.2 Die Differenzierung naiver T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen

Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Effektor-T-Zellen ist ein entscheidender Schritt während der Immunantwort. Das Ausschalten des TGFβ Signalweges in T-Zellen in der CD4-DNRII-Maus führt zu einer spontanen Differenzierung in T_{H1}- und T_{H2}-Zellen.⁹² T-Zellen, denen der TβRII fehlt, differenzieren bevorzugt in die T_{H1}-Richtung.^{94, 129} Erste Experimente haben gezeigt, dass Smif-defiziente T-Zellen unter nicht-gerichteten Bedingungen eine Tendenz zeigen, in T_{H1}-Zellen zu differenzieren (Daten nicht gezeigt).

Neben dem Block naiver T-Zellen in T_{H1}- bzw. T_{H2}-Zellen zu differenzieren, kann ein TGFβ Signal die Differenzierung in regulatorische T-Zellen und T_{H17}-Zellen fördern.

Regulatorische T-Zellen sind maßgeblich an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt.^{135, 136} In Smif-defizienten Mäusen kann die Ursache der Erkrankung nicht in einem Fehlen von T_{reg} begründet liegen, da der prozentuale Anteil an regulatorischen T-Zellen in der Peripherie vergleichbar mit dem Anteil in Kontrollmäusen ist (Abb. 3.27). Ein funktioneller Defekt in Smif-defizienten, regulatorischen T-Zellen ist jedoch denkbar. So ist die neonatale Entfernung regulatorischer T-Zellen oder die Deletion von T_{reg} in adulten wildtyp Mäusen ausreichend, um einen autoimmunologischen Phänotyp zu induzieren.¹³⁷ FoxP3-defiziente Mäuse ähneln in ihrem Phänotyp der TGFβ1^{-/-} Maus.^{138, 139} Durch Gabe von TGFβ-induzierten T_{reg} kann dieser autoimmunologische Phänotyp aufgehoben werden.¹⁴⁰

Die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Gata3, RORγT und FoxP3 bestimmen die Differenzierung naiver T-Zellen in die unterschiedlichen Effektor-T-Zellen. TGFβ ist für die Differenzierung in T_{H17} und T_{reg} wichtig, die mit der Expression von RORγT und FoxP3 einhergeht.⁶⁶ In wie weit die Expression dieser Proteine Smif-abhängig ist, wird eine interessante Aufgabenstellung für weitergehende Experimente sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Entwicklung und Reifung von T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen normal ist. Dennoch zeichnen sich Smif-defiziente CD4⁺ Zellen durch einen aktivierten-/Gedächtnis-Phänotyp aus. Zudem kann die Proliferation durch TGFβ *in vitro* nicht

inhibiert werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass sich B-Zellen sowohl in der Differenzierung als auch im Aktivierungstatus und in der Inhibition der Proliferation durch TGF β nicht von wildtyp Zellen unterscheiden, verdeutlichen die zelltypspezifische Funktion von Smif als transkriptionsaktivierender Faktor im TGF β -Signalweg. Die durch die Abwesenheit von Smif verursachte spontane Aktivierung der T-Zellen ist auf zellulärer Ebene die Ursache für den beobachteten Autoimmunphänotyp in Smif-defizienten Mäusen.

4.2.3 Sekundäre Effekte in Smif-defizienten Mäusen

Für die Regulation des Immunsystems sind T-Zellen essentiell. Sie können durch Sekretion verschiedener Zytokine andere Zellen aktivieren und die Antikörperproduktion von B-Zellen regulieren. TGF β spielt in der Regulation dieser Prozesse eine wichtige Rolle.

Das Zytokin TGF β beeinflusst die Entwicklung von B-Zellen vom Progenitor bis hin zur reifen B-Zelle.⁶⁷ Eine Entwicklungsstörung kann nicht mit dem beobachteten Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden, da sich die B-Zellen im Knochenmark Smif-defizienter Mäuse normal entwickeln (Abb. 3.22). In der Peripherie ist jedoch der prozentuale Anteil an B220⁺ Zellen in der Milz leicht erhöht (Abb. 3.20). Vergleicht man die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen in der Milz zwischen knockout und wildtyp Mäusen, so findet man keinen Unterschied in den prozentualen Anteilen (Abb. 3.24). Die relative Verteilung ist gleich. Im Einklang mit der leicht erhöhten Anzahl an B-Zellen insgesamt (Abb. 3.20) konnte in Untersuchungen von einigen, aber nicht allen erkrankten Smif-defizienten Mäusen eine Proliferation der B-Zellen in der Milz diagnostiziert werden (Abb. 3.21). Eine stärkere Proliferation der B-Zellen konnte jedoch *in vitro* nicht detektiert werden (Abb. 3.30). Sekundäre Effekte wurden durch Verwendung von aus 6-8 Wochen alten Mäusen aufgereinigten, reinen B-Zell-Populationen in diesem Experiment ausgeschlossen. Die Proliferation konnte durch die Zugabe von TGF β , vergleichbar mit aus Kontrollmäusen isolierten B-Zellen, inhibiert werden (Abb. 3.30). Zusammengenommen mit der Erhöhung von B220⁺ Zellen in der Milz, die auch durch die Analyse weiterer Mäuse keine Signifikanz erreichte, und dem Ergebnis, dass nur in einigen Mäusen eine Expansion der B-Zell-Areale in der Milz beobachtet werden konnte, spricht für einen sekundären Effekt. Dieser könnte durch Aktivierung der B-Zellen durch die voraktivierten T-Zellen verursacht sein.

Ein Vergleich mit der Literatur unterstützt diese Annahme. Das bessere Ansprechen von B-Zellen aus älteren TGF β 1^{-/-} auf die Proliferationsstimulation ist mit einer verlängerten Exposition der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder dem Kontakt zu Autoantigenen zu erklären.¹⁴¹ Dass es sich in der TGF β 1^{-/-} Maus um einen sekundären B-Zell-Phänotyp handelt, wird durch die

spezifische Eliminierung von ausschließlich B-Zellen in der Maus gestützt. Das Fehlen der B-Zell-Population kann den ausgeprägten immunologischen Phänotyp nicht verhindern, wohingegen die Depletion von T-Zellen die Stärke der Entzündungsreaktion vermindert und so das Leben der Mäuse verlängert.¹⁴¹

Smif-defiziente Mäuse entwickeln eine Immunkomplex-induzierte Glomerulonephritis (Abb. 3.12 und Tabelle 3.2). Die im Serum detektierten Autoantikörper zeigen ein unterschiedliches Muster in der Immunfluoreszenz (Abb. 3.13). Dies ist ein Anzeichen für einen zufälligen Prozess, der zu einer Diversität von Autoantikörpern führt. Die basalen Serumkonzentrationen der Immunglobulinklassen in Smif-defizienten Mäusen sind jedoch nicht beeinflusst (Abb. 3.14). 1989 konnte zum ersten mal gezeigt werden, dass TGF β in B-Zellen den Klassenwechsel zu IgA fördert, während die Sekretion von IgM und den IgG Isotypen gehemmt wird.^{142, 143} Eine Ausnahme bildet IgG2b, dessen Sekretion positiv von TGF β beeinflusst wird.¹⁴⁴ Die normalen Ig Konzentration in Smif-defizienten Mäusen zeigen, dass B-Zellen adäquat auf ein TGF β -Signal reagieren können. Für den Klassenwechsel zu IgA bzw. IgG2b ist Smif entbehrlich. Der Verlust von Smad3 beeinflusst ebenfalls die Immunglobulinlevel nicht, während in Mäusen, in denen Smad2 in B-Zellen ausgeschaltet ist, eine verringerte Konzentration an Serum IgA detektiert werden konnte.^{89, 145, 146} Das Ausschalten des kompletten TGF β -Signalweges durch die Deletion des T β RII in CD19⁺ B-Zellen führt ebenso zu einem Verlust an IgA im Serum.⁹⁵ Auch in der TGF β 1^{-/-} Maus sind die basalen IgA-Level erniedrigt.¹⁴⁷ Dies bestätigt die Besonderheit von Smif ein sehr spezifischer Koaktivator im TGF β -Signalweg zu sein.

Die Untersuchung der B-Zellen in Smif-defizienten Mäusen ergab, dass sowohl die Inhibition der Proliferation als auch der Klassenwechsel zu IgA ein Smif-unabhängiger Prozess ist. Erst die Aktivierung der B-Zellen über die autoreaktiven T-Zellen führt zu einer Proliferation der B-Zellen in der Peripherie und zur Produktion von Autoantikörpern. Sowohl die Expansion der B-Zellen als auch die Produktion von Autoantikörpern ist vom Alter und dem Fortschreiten der Autoimmunopathie der Smif^{ko} abhängig. Alles in allem sprechen diese Ergebnisse für einen sekundären B-Zell-Phänotyp.

4.2.4 Smif hat keinen Einfluss auf die Reifung von dendritischen Zellen

Knochenmarkszellen lassen sich *in vitro* durch Zugabe von GM-CSF zu DC differenzieren. Wird dem Kulturmedium TGF β zugefügt, wird die Reifung der DC inhibiert. Die Zellen zeichnen sich dann durch einen unreifen Phänotyp aus, der durch die intermediäre Expression von MHCII und der schwachen Expression kostimulatorischer Moleküle gekennzeichnet ist.¹¹⁹⁻¹²¹

Die Inhibition der BMDC-Reifung durch TGF β war in wildtyp und knockout Zellen gleich (Abb. 3.29). Dies gilt auch für die Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation von *ex vivo* differenzierten DC aus dem Knochenmark. Die Zugabe von TGF β hat eine supprimierende Wirkung auf BMDC *in vitro*, so dass die Produktion der Zytokine IL-12 und TNF α , unabhängig vom Genotyp, inhibiert wird (Daten nicht gezeigt).

TGF β -defiziente Mäuse, die einen immundefizienten, genetischen Hintergrund haben, fehlen die epidermalen Langerhans-Zellen (LC), obwohl die Mäuse normale LC-Vorläuferzellen in ihrem Knochenmark besitzen.^{71, 148}

Die Frage, ob Smif in der Differenzierung von Progenitorzellen in LC eine wichtige Funktion einnimmt ist bis jetzt unbeantwortet. Die Reifung und der Effekt von TGF β auf BMDC *in vitro* ist durch den Verlust von Smif jedenfalls nicht beeinflusst. Ebenso die Anzahl an CD11c⁺ Zellen im Knochenmark wird durch das Ausschalten von Smif nicht verändert. Unterschiede zwischen knockout und wildtyp Mäusen konnten allerdings in der Anzahl an CD11c⁺CD11b⁺ Zellen im Blut und in der Produktion des Chemokins BLC beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3).

4.2.5 Die Funktion myeloider Zellen ist in Smif-defizienten Mäusen nicht beeinflusst

Smif wird, im Vergleich zu anderen Leukozyten, nur schwach in Makrophagen exprimiert (Abb. 3.19). Die Funktionalität der myeloiden Zellen wurde zur vollständigen Analyse in den generierten knockout Mäusen untersucht.

Smif-defiziente Mäuse weisen eine leicht erhöhte Zahl an Granulozyten in der Peripherie auf (Kapitel 3.2.8.1). Eine erhöhte Kolonie-Formierungs-Kapazität von myeloiden Stammzellen konnte *in vitro* beobachtet werden (Kapitel 3.2.8.1). Für T β RI knockout Mäuse hingegen, in denen der komplette TGF β -Signalweg ausgeschaltet ist, ist eine normale Anzahl an hämatopoetischen Vorläuferzellen beschrieben worden.¹⁴⁹

Einige Smif^{ko}, die aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes analysiert wurden, zeigten eine Vergrößerung der Milz (Kapitel 3.2.8.1). Die Splenomegalie der erkrankten Mäuse ist mehr einem sekundären Effekt zuzuordnen. Eine Infektion könnte eine mögliche Erklärung sein. Einen Unterschied in den Gewichten der Milz konnte in jungen Mäusen nicht beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.2.8.1).

Die Funktion myeloider Zellen wurde durch die Injektion von LPS untersucht. Das Endotoxin simuliert eine Infektion von Gram-negativen Bakterien. Die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie auch die Überlebensdauer als Marker für die Stärke der Immunantwort waren in Smif-defizienten Mäusen vergleichbar mit Kontrollmäusen (Abb. 3.31). In diesem Experiment konnte

kein Hinweis auf eine Fehlregulation in der hauptsächlich durch Makrophagen-vermittelten Immunantwort gefunden werden.

Insgesamt scheint der Verlust von Smif in myeloiden Zellen, im Gegensatz zu T-Zellen, die biologischen Funktionen nicht oder nur geringfügig zu beeinflussen. Die Beobachtete Splenomegalie ist einem sekundären Effekt zuzuordnen.

Zusammengefasst konnten T-Zellen als zelluläre Ursache für die Entstehung der autoimmunologischen Prozesse in Smif-defizienten Mäusen identifiziert werden. Die spontane Aktivierung der T-Zellen *in vivo* und der Verlust des inhibitorischen TGF β -Effekts bilden die Grundlage für die Autoimmunität. Autoantikörper und die reaktive B-Zell-Proliferation sind sekundäre Effekte, ebenso die durch Granulozyten verursachte Splenomegalie. Smif ist demnach, im Gegensatz zu anderen bekannten Koaktivatoren, sehr spezifisch.

4.3 Smif ist wichtig für die Immunantwort nach Antigenkontakt

In Immunisierungsexperimenten sollte die Smif-vermittelte Regulation der Immunantwort untersucht werden. Dabei wurde die Reaktion auf die Gabe eines Antigens anhand der Produktion von Immunglobulinen bestimmt. Smif-defiziente Mäuse zeigen eine normale basale Konzentration an Serum IgA, wie auch allen anderen Ig Isotypen (Abb. 3.14), eine wichtige Voraussetzung für die Interpretation der Ergebnisse aus den Immunisierungsexperimenten.

Smif-defiziente Mäuse, die mit einem T-Zell-abhängigen Antigen immunisiert wurden, zeigten eine Immunantwort, die mit der von Kontrollmäusen vergleichbar war (Abb. 3.32). Gemessen wurde die Ausprägung der Immunreaktion anhand der IgM, IgG1, IgG3 und IgA Konzentrationen im Serum. Im Gegensatz dazu reagieren Smif-defiziente Mäuse auf T-Zell-unabhängige Antigene mit einer verstärkten Immunantwort, gemessen an der IgM und IgG3 Produktion (Abb. 3.33). Diese Beobachtung unterstreicht die Rolle von Smif als negativer Regulator für das Immunsystem. Neben der Autoimmunerkrankung, die Smif-defiziente Mäuse entwickeln, reagieren sie auf die Stimulation zumindest von einigen Antigenen mit einer verstärkten Immunreaktion. Auch hier spricht das Ergebnis für eine Funktion von Smif im TGF β -Signalweg, da in T β RII knockout Mäusen eine vergleichbare Erhöhung der IgG3 Produktion nach Immunisierung gemessen werden konnte.⁹⁵

Verantwortlich für die schnelle Immunantwort nach Kontakt mit T-Zell-unabhängigen Antigenen sind Marginalzonen B-Zellen und B1-Zellen.^{150, 151} In Smif-defizienten Mäusen ist das Verhältnis von B1- zu B-Zellen verschoben (Abb. 3.35). Weniger B1-Zellen sind im Bauchraum zu finden.

Die erhöhte Expression von BLC in Milz und Thymus (Abb. 3.36) spricht für eine Einwanderung der B1-Zellen in die peripheren, lymphatischen Organe, wo sie T-Zellen aktivieren können. In Übereinstimmung mit dieser These wurden in ersten Experimenten mehr CD11c⁺CD11b⁺ dendritische Zellen im Blut Smif-defizienter Mäuse gefunden, eine Population von DC, die den Großteil des Chemokins produzieren (Daten nicht gezeigt). Auch die Produktion an BLC von Smif-defizienten BMDC, gemessen in einer quantitativen PCR, war erhöht (Abb. 3.36). Weiterreichende Untersuchungen der B1-Zell-Population wird Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

In BWF₁-Mäusen, die spontan eine Lupus-ähnliche Erkrankung entwickeln, ist der Anteil an B1-Zellen, im Gegensatz zur Smif^{ko}, in der Bauchhöhle erhöht. Die B1-Zellen wandern in verschiedene Organe ein, wo sie T-Zellen aktivieren und so die Entstehung einer autoimmunologischen Erkrankung fördern.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Dabei scheint nicht die vergrößerte B1-Zell-Population im Peritonealraum entscheidend zu sein, sondern das Einwandern in die Organe. Das Chemokin BLC ist dafür ein entscheidendes Signal. Die aberrante Expression von BLC durch CD11c⁺CD11b⁺ DC ist bei der Entstehung von murinem Lupus von besonderer Bedeutung.^{155, 156}

4.4 Der BMP-Signalweg in Smif-defizienten Mäusen

Die *bone morphogenetic proteins* (BMP) sind Wachstumsfaktoren, die zu der Gruppe der TGFβ-Superfamilie zählen. Neben wichtigen Funktionen während der Embryogenese, regulieren BMP das Knochenwachstum. Nach Bindung an den Rezeptor phosphoryliert dieser die intrazellulären Mediatoren Smad1/5/8. Diese aktivierten Smad-Proteine binden daraufhin Smad4. Der Smad-Komplex wandert in den Zellkern, wo unter Beteiligung weiterer Faktoren die Genexpression reguliert wird.¹⁵⁷

Die Untersuchung der Spezifität von Smif als Koaktivator innerhalb des TGFβ-Signalweges gaben Anlass zur Untersuchung der Knochenstruktur in Smif-defizienten Mäusen. Röntgenaufnahmen von Smif-defizienten Mäusen zeigten keine Abnormalitäten des Skeletts (Abb. 3.10a). Färbungen der Wirbelsäule und des Femurs zeigten hingegen eine Vergrößerung der Epiphysenfuge, dem Ort des Knochenwachstums (Abb. 3.10b+c). Die Häufigkeit, mit der Smif-defiziente Mäuse eine Osteosklerose entwickeln und deren Ursache wird in weiterführenden Studien untersucht. Bisher konnte eine derartige Erkrankung nur in einer der untersuchten Smif-defizienten Mäuse diagnostiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die offensichtlichen Störungen in Smif-defizienten Mäusen, die den BMP-Signalweg betreffen, stehen im Einklang mit vorherigen Untersuchungen. Es konnte eine aktivierende Funktion der

Transkription von Smif nach BMP4 Stimulation bei Überexpression beobachtet werden.³¹ Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies in Mef-Zelllinien, in denen Smif komplett ausgeschaltet ist, bestätigt werden (Abb. 3.39). Nach BMP4 Stimulation war in wildtyp Mef eine Steigerung der Transkriptionsaktivität des BV1.5 Reporterkonstruktes messbar (Abb. 3.39, rechtes Diagramm). Smif-defiziente Mef hingegen reagieren auf BMP4 Stimulation mit einer deutlich verringerten Transkriptionsaktivität (Abb. 3.39).

BMP sind wichtig für die embryonale Entwicklung. Verdeutlicht wird dies durch das Ausschalten von BMP2 oder 4 in der Maus. Diese Mutationen führen zur embryonalen Letalität.^{158, 159} Obwohl Smif während der Embryogenese exprimiert wird (Abb. 3.18 und Abb. 3.19), vermittelt Smif hier nicht die überlebenswichtigen Informationen. Die Smif-defizienten Mäuse weisen Ähnlichkeiten zu anderen, den BMP Signalweg betreffenden, Mausmodelle auf. Der Phänotyp BMP3-defizienter Mäuse ist beispielsweise mit einer erhöhten Knochendichte im adulten Organismus verbunden.¹⁶⁰ BMP5-defiziente Mäuse zeichnen sich durch Auffälligkeiten in der Skelett- und Knorpelstruktur aus.^{161, 162}

Die Spezifität von Smif ist demnach nicht nur auf die Umsetzung des Signals ausgehend von den TGF β Liganden beschränkt. Auch reguliert Smif die Transkription nach Stimulation mit Liganden der BMP-Familie. Trotz Expression von Smif in der Embryogenese ist Smif nicht essentiell für die pränatale Entwicklung der Mäuse.

4.5 Die Rolle von Smif für das cardiovaskuläre System

Das erste funktionelle System, das sich während der Embryogenese von Vertebraten entwickelt, ist das cardiovaskuläre System. Zur Entstehung tragen die drei Prozesse, Angiogenese, Vaskulogenese und Hämatopoese bei. An der Pathogenese von vielen cardiovaskulären Erkrankungen ist TGF β beteiligt. Zu diesen zählen Hypertonie, Atherosklerose, Hypertrophie des Herzens und andere Herzfehler.^{3, 163}

Smif-defiziente Mäuse sind viabel und zeichnen sich durch einen ausgeprägten Autoimmunphänotyp aus. Eine essentielle Funktion von Smif für die Bildung des cardiovaskulären Systems kann somit ausgeschlossen werden. Anders als bei der Smad5 oder T β RII knockout Maus. Mutationen im *Smad5* oder *T β RII* Gen führen zu einer embryonalen Letalität, dessen Ursache in einer Störung der Formierung des cardiovaskulären Systems liegt.¹⁶⁴

Veränderungen in der Struktur des Herzgewebes konnte in Smif-defizienten Mäusen beobachtet werden. Im Herzen Smif-defizienter Mäuse konnte eine Fibrosierung im Myocardium histo-

pathologisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Fibrosierung ist ein Anzeichen abgelaufener Myokardinfarkte, wobei das zerstörte Gewebe durch Fibroblasten ersetzt wurde.

Durch chronische Entzündungsreaktionen, wie sie in Smif^{ko} zu beobachten sind, kann es ebenfalls zu einer Fibrosierung kommen, die durch eine erhöhte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen sowie der Proliferation, Migration und Akkumulation von mesenchymalen Zellen gekennzeichnet ist.¹⁶⁵ In diesem Fall wäre die Fibrosierung auf einen Sekundäreffekt zurückzuführen, der durch die autoimmunologischen Prozesse in Smif-defizienten Mäusen ausgelöst wird. Hierfür spricht die beobachteten Infiltrationen von Lymphozyten im Herzgewebe (Abb. 3.9). Diese These wird gestützt durch Beobachtungen in immundefizienten Rag1^{-/-} Mäusen, in denen das Ausmaß der Fibrosierung TGFβ-unabhängig ist.¹⁶⁶

Inwieweit die Signaltransduktion in anderen Zelltypen die Entstehung der Fibrosierung des Herzens beeinflusst und deren Funktion in der Entstehung des gesamten Krankheitsbildes, bleibt zu untersuchen. Transplantationsexperimente, bei denen Smif-defiziente Knochenmarkszellen in wildtyp Empfängermause transplantiert werden, werden Aufschluss über die durch hämatopoetische Zellen vermittelten Symptome geben. Da die Empfängermause vor der Transplantation myeloablativ bestrahlt werden können ist gewährleistet, dass die Hämatopoese ausschließlich von Zellen der Smif-defizienten Spendermause ausgeht. Das Knochenmark von TβRII-defizienten Mäusen ist jedenfalls ausreichend, um den letalen Phänotyp in den Empfängermausen zu induzieren.¹⁶⁷ Umgekehrt kann die Beeinflussung andere Zelltypen durch das Ausschalten von Smif in Transplantationsmodellen untersucht werden, in denen wildtyp Knochenmark in bestrahlte Smif-defiziente Empfängermause transplantiert wird. Zu den bis jetzt untersuchten Zelltypen, die nicht Bestandteil des Immunsystems sind, zählen die aus Mausembryonen gewonnenen Fibroblasten. In diesen Zellen konnte eine normale Aktivierung des Signalweges durch TGFβ Stimulation gezeigt werden (Abb. 3.37). Auch wurde durch Zugabe von TGFβ die Proliferation von primären Mef-Kulturen inhibiert (Abb. 3.38).

4.6 Die Ausprägung des Phänotyps ist vom genetischen Hintergrund abhängig

Der Verlust von verschiedenen Komponenten des TGFβ-Signalweges führt in Mausmodellen zu einem letalen Phänotyp, so auch für Smad4, dem Interaktionspartner von Smif.^{86, 87} Smif-defiziente Mäuse sind viabel. Im Gegensatz zum Zebrafisch, wo der knockdown von Smif mittels Morpolino-Technik schwere embryonale Defekte verursacht, scheint Smif für die Embryogenese

des generierten Mausstammes eine untergeordnete Rolle zu spielen, obwohl es in allen embryonalen Entwicklungsstadien exprimiert wird (Abb. 3.17b).³¹

Nur 1/3 der genotypisierten knockout Mäuse sind weiblich. Nimmt man die Prozentzahl aus der Mendelschen Verteilung hinzu, nach der nur 17% der geborenen Nachkommen homozygot für die Smif Mutation sind, lässt sich vermuten, dass ein Teil der weiblichen Knockouts interuterin oder neonatal sterben. Ferner entwickeln die lebenden männlichen Smif-defizienten Mäuse einen ausgeprägteren Phänotyp im Vergleich zu gleichaltrigen weiblichen knockout Mäusen. Dies legt die Vermutung nah, dass einige Weibchen so stark betroffen sind, dass sie schon sehr früh sterben. Nur weibliche knockout Tiere mit einer sehr schwachen Ausprägung des immunologischen Defekts können überleben, wohingegen Männchen im allgemeinen weniger stark betroffenen sind. Diese These wird gestützt durch die Beobachtung, dass weibliche T β RI knockout Mäuse eine spontane inflammatorische Erkrankung entwickeln, während die Männchen keine Anzeichen einer Erkrankung zeigen.¹⁶⁸ Denkbar ist dieser unterschiedlich ausgeprägte Phänotyp innerhalb der weiblichen Nachkommenschaft, da der gezüchtete Smif-defiziente Mausstamm auf einem gemischten genetischen Hintergrund basiert. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung von immunologischen Erkrankungen und dem genetischen Hintergrund. Dies konnte beispielsweise für den Vergleich von Fc Rezeptor II knockout (Fc γ RIIB) in einem C57BL/6 und BALB/c Hintergrund gezeigt werden. C57BL/6 Mäuse entwickeln eine fatale Glomerulonephritis, die mit der Produktion von Autoantikörpern einhergeht, während BALB/c Mäuse, die defizient für Fc γ RIIB sind, resistent sind.¹⁶⁹ Der beobachtete SLE-ähnliche Phänotyp in Mäusen, bei denen C1q, ein Teil des Komplementfaktors C1, ausgeschaltet wurde, ist ein anderes Beispiel für die Abhängigkeit zwischen dem genetischen Hintergrund und autoimmunologischen Prozessen.¹⁷⁰ Zudem gibt es verschiedene Mausmodelle, die, wegen ihres genetischen Hintergrundes, eine spontane Autoimmunerkrankung entwickeln. Zu diesen zählen die MRL/lpr, NOD und NZB/NZW Mäusen.¹⁷¹⁻¹⁷³

Die Rückkreuzung des Smif-defizienten Mausstammes auf einen reinen C57BL/6 Hintergrund wird zur Zeit durchgeführt. Erste Verpaarungen heterozygoter Mäuse aus der siebten Rückkreuzungsgeneration legen die Vermutung nahe, dass dieser genetische Hintergrund zur embryonalen Letalität Smif-defizienter Mäuse führt. Eine gleichartige Beobachtung wurde bereits für TGF β 1-defiziente Mäuse beschrieben. Die Letalitätsrate von knockout Embryonen in unterschiedlichen genetischen Hintergründen variiert zwischen 20 und 100%, wobei eine vollständige Penetranz der embryonalen Sterblichkeitsrate von TGF β 1-defizienten Mäusen bei einem C57BL/6 Hintergrund beobachtet wurde.¹⁷⁴

Die Abhängigkeit zwischen der Ausprägung des Phänotyps und dem genetischen Hintergrund *Smif*-defizienter Mäuse ist eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Untersuchungen im Zebrafisch und des hier beschriebenen *Smif*-defizienten Mausstammes. Auch können die beobachteten Variationen in der Ausprägung der Autoimmunerkrankung (vgl. Tabelle 3.1) in den Variationen des genetischen Hintergrundes begründet sein.

4.7 Das Fusionsprotein *Smif*¹⁻⁷³-GFP ist nicht funktionell

Der *Smif* Genlocus wurde durch gezielte homologe Rekombination erfolgreich mutiert (Kapitel 3.1). Als Resultat wird in der gesamten knockout Maus *Smif* nicht mehr exprimiert (Kapitel 3.1.3). Jedoch konnte das Vorhandensein eines Fusionsproteins zwischen dem N-terminalen Part von *Smif* (AS 1-73) und GFP im Western Blot und mittels RTQ-PCR gezeigt werden (Abb. 3.4 und Abb. 3.5). Dass es sich lediglich um die ersten 73 Aminosäuren von *Smif* handelt, lässt sich zum einen aus der Rekombinationsstrategie ableiten, zum anderen aus der Größe des Fusionsproteins schließen (Abb. 3.1 und Abb. 3.5b). Die Insertion von GFP und der inversen *neo*^r-Kassette erfolgt im Leserahmen nach dem Nukleotid 219. Diese N-terminalen Basenpaare (1-219) konnten in einer quantitativen RT-PCR detektiert werden (Abb. 3.4b). Zudem gelang der immunchemische Nachweis eines Fusionsproteins bestehend aus *Smif*¹⁻⁷³ und GFP mit Hilfe eines α -GFP Antikörpers (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Eine Expression von C-terminalen Abschnitten von *Smif* konnte mittels RTQ-PCR nicht detektiert werden und wird somit ausgeschlossen (Abb. 3.4b). Durch den Einsatz von siRNA gegen Exon 1, 5 oder 7 von *Smif* wurden die Daten verifiziert (Abb. 3.6). Bei Transfektion der siRNA, die gegen Exon 1 gerichtet ist, wird sowohl *Smif*¹⁻⁷³-GFP als auch GFP runterreguliert. Demnach werden *Smif*¹⁻⁷³ und GFP von nur einer mRNA abgelesen, die zwei unterschiedliche Translationsinitiationssequenzen enthält. Die durch RTQ-PCR nachgewiesene Hochregulation von *Smif*¹⁻⁷³ ist durch die an die GFP Sequenz fusionierte Poly(A)-Sequenz bedingt. Die so gewonnene Stabilisierung der mRNA könnte die starke Expression von *Smif*¹⁻⁷³-GFP ermöglichen.

Wie bereits für andere knockout Mausmodelle beschrieben, kann es aufgrund der Rekombinationsstrategie zur Expression von Proteinfragmenten kommen oder es werden zur Untersuchung von Proteinfunktionen nur Mutationen in einer funktionellen Domäne eingefügt. In beiden Fällen können die Deletionsmutanten einem kompletten knockout entsprechen.

Es stellte sich die Frage, ob das Fragment *Smif*¹⁻⁷³ funktionell ist. Studien mit Deletionsmutaten von *Smif* zeigten, dass die ersten 100 Aminosäuren für eine Interaktion mit Smad4 ausreichend sind.³¹

Jedoch wird neben der Interaktion für die Aktivierung der Transkription die transkriptionsaktivierende Domäne von Smif (AS 144-410) benötigt.³¹

Die Bindungsfähigkeit von Smif¹⁻⁷³ an Smad4 wurde in Pulldown-Experimenten getestet. Smif¹⁻⁷³ bindet Smad4 im Vergleich zu Smif mit einer sehr viel geringeren Affinität (Abb. 3.7a). Die Bandenintensität und somit die Menge an gebundenem Protein ist über 90% reduziert. Kommt es dennoch zu einer Interaktion *in vivo*, so muss diese Interaktion dominant negativ sein, da in Smif¹⁻⁷³ die transkriptionsaktivierende Domäne fehlt. Diese Annahme wird durch Reporterassays gestützt, die gezeigt haben, dass die Expression von Smif-Deletionsmutanten, in denen diese Domäne fehlt, die Aktivität der Reporter nicht mehr steigern konnte.³¹

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es keinerlei Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion des Fragmentes Smif¹⁻⁷³ für den TGFβ-Signalweg *in vivo* gibt.

4.8 Die Rolle von Smif für die Decappingreaktion

Smif wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander als Homolog zu dem Hefe Protein Dcp1p beschrieben und ist in der Literatur auch unter dem Synonym Dcp1a zu finden.^{34,35} Sequenzvergleichsanalysen zeigen Homologien zwischen dem N-Terminus von Smif und dem nur 231 Aminosäuren großen Dcp1p (Abb. 1.2).³⁵ Im Zusammenspiel mit Dcp2 ist Smif am Abbau von mRNA durch enzymatische Abspaltung der 5'-Cap-Struktur beteiligt, wobei Dcp2 die katalytische Untereinheit bildet.

Interaktionsstudien mittels *in vitro* Bindungsexperimenten zeigten, dass das Fragment Smif¹⁻⁷³, im Gegensatz zu Smif, Dcp2 nicht mehr binden kann (Abb. 3.7b). Auch ist kein Smif¹⁻⁷³-GFP in der P50 Fraktion nachzuweisen, wohingegen in wildtyp Zellen Smif immunchemisch detektierbar ist (Abb. 3.8 und Daten nicht gezeigt). In der P50 Fraktion werden durch Ultrazentrifugation P-bodies, zytoplasmatische Strukturen, in denen Decapping stattfindet, angereichert. Diese Ergebnisse zusammengekommen schließen eine Funktionalität von Smif¹⁻⁷³ im Decapping-Prozess aus.

Dcp1b als Homolog zu Dcp1p und somit auch zu Smif ist ebenfalls in P-bodies lokalisiert.^{175,176} Die für Smif und Dcp1b kodierenden DNA-Abschnitte liegen auf verschiedenen Chromosomen. Der N-Terminus ist zu ~70% homolog, im ganzen sind die beiden Proteine zu ~30% homolog (Abb. 1.2).³⁵ Es gibt keine Hinweise, dass funktionelle Unterschiede zwischen Smif und Dcp1b bestehen.^{54, 176} Ein vollständig funktionsfähiger Decapping-Prozess ist durch Ersatz von Smif durch Dcp1b denkbar.

Ein Verlust der Decappingaktivität in der Zelle würde fatale Folgen haben, da die Expression von Proteinen über die Stabilität der RNA nicht mehr reguliert werden könnte. In diesem Fall würde man einen embryonal-letalen Phänotyp erwarten. In Smif-defizienten Mäusen gibt es keine Anhaltspunkte, dass der Abbau von mRNA über Decapping beeinträchtigt ist.

Neben einer bedeutenden biologischen Funktion von Smif als Koaktivator im TGF β Signalweg, ist Smif am Abbau von mRNA beteiligt. Ob die Regulation der mRNA Stabilität ein TGF β -abhängiger Prozess ist, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ein Smif-vermittelter Zusammenhang zwischen dem TGF β Signalweg und der Degradation von mRNA, aus der eine Regulation der Proteinexpression sowohl auf transkriptioneller als auch auf mRNA Ebene resultiert, ist denkbar. Aus den Veränderungen von Proteinkonzentrationen ergibt sich die Anpassung der Zelle auf exogene Signale. Dass über den TGF β Signalweg neben Regulation der Transkription auch die Stabilität von mRNA beeinflusst wird, konnte bereits für einige Proteine gezeigt werden.¹⁷⁷

4.9 Smif ist ein spezifischer Transkriptionsaktivator im TGF β -Signalweg

Smif wurde als Interaktionspartner von Smad4 identifiziert. Erste funktionelle Analysen mit Mutanten von Smif zeigten, dass Smif die Transkription TGF β -abhängiger Gene aktiviert.³¹ Die Aktivität konnte in Reporterassays gemessen werden.

Das 3TP-lux Reporterkonstrukt ist zusammengesetzt aus einem Teil der Promoterregion von PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) und drei 12-O-Tetradecanoyl-Phorbolacetat *responsive elements*. Die Transkriptionsaktivität von 3TP-lux kann sowohl durch TGF β als auch durch Activin stimuliert werden.^{178, 179}

In Smif-defizienten immortalisierten Mef konnte ein Verlust der Transkriptionsaktivität des 3TP-lux Promoters nach TGF β -Stimulation beobachtet werden (Abb. 3.39, linkes Diagramm). Smad3-defiziente Mef zeigten die Bedeutung für Smad3 in der TGF β -abhängigen Induktion des 3TP-lux Promoters.⁸⁸ Fehlt Smad3, so kann die Promoteraktivität nicht induziert werden. Das Wiedereinbringen von funktionalem Smad3 in knockout Zellen hebt den Verlust der Transkriptionsaktivität auf. Dies ist in Übereinstimmung mit Smif-defizienten Mef. Das Ausschalten von Smif, einem spezifischen Koaktivator, ist ausreichend, um die Transkriptionsaktivität des 3TP-lux Promoters zu inhibieren. Auch die Aktivität der Reporterkonstrukte I4+T β RE, BV1.5 und (SBE)₄-luc ist Smif-abhängig (Abb. 3.39 und Abb. 3.41). Der Reporter I4+T β RE besteht aus vier T β RE (*TGF β responsive element*) des p21 Promoters und wird durch TGF β reguliert.¹⁸⁰ Das BV1.5

Konstrukt hingegen ist ein BMP4-abhängiges Konstrukt. Die Promoterregion ist abgeleitet vom Id1 Promoter.^{181, 182} Das (SBE)₄-luc Konstrukt ist abgeleitet vom JunB Promoter, einem frühen TGFβ-regulierten Gen. TGFβ, Activin und BMP4 können die Transkriptionsaktivität induzieren.¹⁸³ In allen vier getesteten Reporterkonstrukten, die von unterschiedlichen Promotoren abgeleitet sind, ist die Promoteraktivität in Smif-defizienten Mef nach Stimulation mit TGFβ bzw. BMP4 verringert (Abb. 3.39 und Abb. 3.41). Erst das Wiedereinbringen von funktionellem Smif kann die verringerte Transkriptionsaktivität in Smif-defizienten Mef aufheben (Abb. 3.41). Dies weist auf eine umfassende Funktion von Smif als Koaktivator im TGFβ-Signalweg hin, die im Kontrast zu den sehr spezifischen, biologischen Fehlregulationen in der Maus stehen. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von Smif eine spontane Aktivierung der T-Zellen hervorruft, die wiederum Auslöser sekundärer Effekte sind (siehe Kapitel 4.2). Weitere Argumente, die für Smif als einen sehr spezifischer Koaktivator sprechen, finden sich durch Vergleich der Smif^{ko} mit anderen knockout Mausmodellen, bei denen bekannte Koaktivatoren des TGFβ-Signalweges ausgeschaltet worden sind. So führt das Ausschalten von CBP und/oder p300 zu einem embryonal-letalen Phänotyp. Der Doppelknockout ist sogar in heterozygoten Mäusen letal.^{125, 184} Smif vermittelt seine transkriptionsaktivierende Funktion über den CBP/p300-Smad-Komplex.³¹ Das Ausschalten der CBP/p300-abhängigen Transkriptionsaktivatoren GCN5 oder ZEB1 ist, im Gegensatz zu Smif, ausreichend, um einen letalen Phänotyp zu induzieren.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷

Smif-defiziente Mäuse sind viabel, obwohl Smif während der Embryogenese exprimiert wird. Smif reguliert demnach nur bestimmte Gene während der Entwicklung, so dass eine normale Embryogenese möglich ist, während GCN5 oder ZEB1 an mehreren Prozessen beteiligt sind, die nicht nur auf den TGFβ-Signalweg beschränkt sein müssen.

Inwiefern Smif spezifisch TGFβ-abhängige Gene reguliert, könnte unter anderem durch Microarray-Analysen bestimmt werden. Die Identifizierung solcher Zielgene in verschiedenen Zelltypen würde auf molekularer Ebene die Ursachen des beobachteten Phänotyps in Smif-defizienten Mäusen erklären.

Ausgehend von der Annahme, dass Smif abwärts von Smad4 spezifisch nur bestimmte Gene reguliert, lassen sich die verschiedenen Beobachtungen in der Maus erklären. So wird beispielsweise der Klassenwechsel zu IgA in Smif-defizienten Mäusen nicht beeinflusst (Kapitel 4.2.3), ebenso der inhibitorische Effekt von TGFβ auf die B-Zell-Proliferation. Smif-defiziente T-Zellen hingegen reagieren auf die Stimulation mit TGFβ nicht mit einem Wachstumsstopp (Abb. 3.30). Neben der Spezifität von Smif können einige TGFβ-Effekte über einen nicht-kanonischen Signalweg vermittelt werden.¹⁸⁸ So zeigen sowohl Smad4-defiziente Tumorzellen als auch Fibroblasten aus Smad4-defizienten Mäusen eine TGFβ-abhängige Aktivierung von Zielgenen.^{86, 189, 190}

Die beobachteten Effekte in Smif-defizienten Mef kommen nicht durch andere Faktoren zustande, sondern sind auf den Verlust von Smif zurückzuführen. Durch das Wiedereinbringen von funktionellem Smif in knockout Zellen konnte die verminderte Transkriptionsaktivität rückgängig gemacht werden und somit die transkriptionsaktivierende Funktion von Smif eindeutig belegt werden (Abb. 3.40 und Abb. 3.41). Dabei ist der Grad der Transkriptionsaktivität in diesem artifiziellen System von der Konzentration von Smif innerhalb der Zelle abhängig.

Die Smif-abhängige Regulation von JunB wurde zusätzlich zu dem (SBE)₄-luc Reporter in primären Zellen bestätigt. Stimuliert man primäre Smif-defiziente Milzzellen mit TGFβ, so wird die JunB mRNA nicht, wie es in wildtyp Zellen zu beobachten ist, hochreguliert (Abb. 3.42). Es ist bekannt, dass an der Aktivierung des JunB Promotors der Heteromere Smad3-Smad4-Komplex und weitere Kofaktoren beteiligt sind.¹⁹¹ Aus den Daten lässt sich schlussfolgern, dass einer der benötigten Kofaktoren Smif ist.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass Smif ein Transkriptionsaktivator im TGFβ Signalweg ist, der die Genexpressionen verschiedener TGFβ-regulierter Gene beeinflusst. Eine Spezifität von Smif für diesen Prozess war bisher nicht bekannt. Durch die Untersuchungen der Smif^{ko} Maus ist deutlich geworden, dass es TGFβ-vermittelte Prozesse gibt, die Smif-abhängig sind. Besonders die zelltypspezifische Funktion ist hervorzuheben. So führt die Fehlregulation von T-Zellen zur Entstehung der Autoimmunerkrankung. Es wird eine interessante Aufgabe sein, die Smif-abhängigen Zielgene zu identifizieren, um so die biologische Funktion von Smif auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

TGF β ist ein pluripotentes Zytokin mit einem ausgeprägten, immunsuppressiven Effekt. Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen werden durch den TGF β -Signalweg reguliert. Smif ist als transkriptionaler Koaktivator Teil dieser Signaltransduktionskaskade.

In der vorliegenden Arbeit wurden die biologischen Funktionen und die Spezifität von Smif in höheren Eukaryonten untersucht. Nach erfolgreicher Generierung eines Smif-defizienten Mausstammes konnte dieser zur Analyse der Funktionen von Smif *in vivo* verwendet werden.

Smif-defiziente Mäuse sind viabel, jedoch haben sie im Vergleich zu wildtyp Mäusen eine verkürzte Lebenserwartung. Eine allgemein-pathologische Untersuchung Smif-defizienter Mäuse zeigte erhebliche Infiltrationen von Lymphozyten in verschiedenen Organen. Darüber hinaus entwickeln Smif^{ko} eine Immunkomplex-induzierte Glomerulonephritis, die mit einer Proteinurie einhergeht. Im Einklang mit dieser Beobachtung konnten in Smif-defizienten Mäusen Autoantikörper nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten T-Zellen als Ursache der Autoimmunerkrankung identifiziert werden. T-Zellen in Smif-defizienten Mäusen sind voraktiviert und es ist nicht möglich, die Proliferation von T-Zellen *ex vivo* durch die Zugabe von TGF β zu inhibieren. Smif-defiziente B-Zellen hingegen reagieren auf die TGF β Stimulation mit einer Inhibition der Proliferation. Die Autoantikörperproduktion wie auch die reaktive Proliferation von B-Zellen in älteren Smif-defizienten Mäusen ist wahrscheinlich sekundär und auf die autoreaktiven T-Zellen und den Verlust des inhibitorischen Effekts von TGF β auf T-Zellen zurückzuführen.

Die Transkriptionsaktivität von TGF β -abhängigen Reporterkonstrukten in Smif-defizienten Zellen ist stark eingeschränkt. Das Wiedereinbringen von funktionalem Smif kann den Verlust der Transkriptionsaktivität aufheben. Ferner konnte in Milzzellen eine Smif-abhängige Expression des TGF β -Zielgens JunB gezeigt werden. Smif scheint, im Gegensatz zu anderen Koaktivatoren des TGF β -Signalweges, sowohl TGF β -spezifisch als auch Zelltyp-spezifisch zu sein. Zum einen sind Smif-defiziente Mäuse vital, obwohl Smif während der Embryogenese exprimiert wird und zum anderen sind einige, aber nicht alle TGF β -regulierten Zellantworten durch das Fehlen von Smif beeinflusst.

Interessanterweise reagieren Smif-defiziente Mäuse auf die Immunisierung mit einem T-Zell-unabhängigen Antigen mit einer verstärkten Immunantwort, während die Reaktion auf ein T-Zell-abhängiges Antigen oder Endotoxin mit der von Kontrollmäusen vergleichbar ist. Die Fehlregulation von B1-Zellen in Smif-defizienten Mäusen könnte in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung sein.

Summa summarum wird der beobachtete autoimmunologische Phänotyp durch die spontane Aktivierung der T-Zellen und die Aufhebung der inhibitorischen Wirkung von TGF β auf T-Zellen verursacht.

6 Literaturverzeichnis

1. Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-791 (1998).
2. Feng, X.H. & Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-693 (2005).
3. Gordon, K.J. & Blobe, G.C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 197-228 (2008).
4. Massague, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215-230 (2008).
5. Schmierer, B. & Hill, C.S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 970-982 (2007).
6. Attisano, L. & Wrana, J.L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**, 1646-1647 (2002).
7. Chang, H., Brown, C.W. & Matzuk, M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* **23**, 787-823 (2002).
8. Roberts, A.B. *et al.* Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3494-3498 (1980).
9. Moses, H.L., Branum, E.L., Proper, J.A. & Robinson, R.A. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res* **41**, 2842-2848 (1981).
10. Sun, P.D. & Davies, D.R. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**, 269-291 (1995).
11. Gray, A.M. & Mason, A.J. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328-1330 (1990).
12. Khalil, N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* **1**, 1255-1263 (1999).
13. Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E. & Leduc, R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **270**, 10618-10624 (1995).
14. Constam, D.B. & Robertson, E.J. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* **144**, 139-149 (1999).
15. Derynck, R. *et al.* Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**, 701-705 (1985).
16. Gentry, L.E., Lioubin, M.N., Purchio, A.F. & Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* **8**, 4162-4168 (1988).
17. Gentry, L.E. *et al.* Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* **7**, 3418-3427 (1987).
18. Miyazono, K., Ichijo, H. & Heldin, C.H. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* **8**, 11-22 (1993).
19. Shi, Y. & Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700 (2003).
20. Feng, X.H. & Derynck, R. Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF) beta signaling pathways by heteromeric cytoplasmic domains of TGF-beta receptors. *J Biol Chem* **271**, 13123-13129 (1996).
21. Chen, Y.G. *et al.* Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**, 2144-2152 (1998).
22. Persson, U. *et al.* The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett* **434**, 83-87 (1998).

23. Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-2810 (2005).
24. Macias-Silva, M. *et al.* MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**, 1215-1224 (1996).
25. Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J. & Massague, J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* **11**, 984-995 (1997).
26. Shi, Y., Hata, A., Lo, R.S., Massague, J. & Pavletich, N.P. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* **388**, 87-93 (1997).
27. Shi, Y. *et al.* Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**, 585-594 (1998).
28. de Caestecker, M.P. *et al.* The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem* **275**, 2115-2122 (2000).
29. Massague, J. & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* **19**, 1745-1754 (2000).
30. Kasper, L.H. *et al.* Conditional knockout mice reveal distinct functions for the global transcriptional coactivators CBP and p300 in T-cell development. *Mol Cell Biol* **26**, 789-809 (2006).
31. Bai, R.Y. *et al.* SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 181-190 (2002).
32. Callebaut, I. An EVH1/WH1 domain as a key actor in TGFbeta signalling. *FEBS Lett* **519**, 178-180 (2002).
33. Schier, A.F. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 589-621 (2003).
34. van Dijk, E. *et al.* Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* **21**, 6915-6924 (2002).
35. Lykke-Andersen, J. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol* **22**, 8114-8121 (2002).
36. Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A. & Kiledjian, M. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12663-12668 (2002).
37. Beausoleil, S.A. *et al.* Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12130-12135 (2004).
38. Villen, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A. & Gygi, S.P. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1488-1493 (2007).
39. Imami, K., Sugiyama, N., Kyono, Y., Tomita, M. & Ishihama, Y. Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. *Anal Sci* **24**, 161-166 (2008).
40. Zanivan, S. *et al.* Solid Tumor Proteome and Phosphoproteome Analysis by High Resolution Mass Spectrometry. *J Proteome Res* (2008).
41. Daub, H. *et al.* Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell* **31**, 438-448 (2008).
42. Dephoure, N. *et al.* A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10762-10767 (2008).
43. Cantin, G.T. *et al.* Combining protein-based IMAC, peptide-based IMAC, and MudPIT for efficient phosphoproteomic analysis. *J Proteome Res* **7**, 1346-1351 (2008).
44. Chen, R.Q. *et al.* CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells. *Cancer Res* **69**, 2663-2668 (2009).
45. Olsen, J.V. *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648 (2006).

46. Blumenthal, J., Behar, L., Elliott, E. & Ginzburg, I. Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress. *FEBS Lett* **583**, 197-201 (2009).
47. Cougot, N., van Dijk, E., Babajko, S. & Seraphin, B. 'Cap-tabolism'. *Trends Biochem Sci* **29**, 436-444 (2004).
48. Muhrad, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* **370**, 578-581 (1994).
49. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 9-22 (2007).
50. Parker, R. & Sheth, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**, 635-646 (2007).
51. Bail, S. & Kiledjian, M. More than 1 + 2 in mRNA decapping. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 7-9 (2006).
52. Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* **107**, 751-762 (2001).
53. Fillman, C. & Lykke-Andersen, J. RNA decapping inside and outside of processing bodies. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 326-331 (2005).
54. Fenger-Gron, M., Fillman, C., Norrild, B. & Lykke-Andersen, J. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell* **20**, 905-915 (2005).
55. Franks, T.M. & Lykke-Andersen, J. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* **32**, 605-615 (2008).
56. Constant, S.L. & Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* **15**, 297-322 (1997).
57. Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B. & Rao, A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* **24**, 607-656 (2006).
58. Campos-Neto, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz J Med Biol Res* **38**, 979-984 (2005).
59. Pezzutto, A., Ulrichs, T. & Burmester, G.-R. Taschenatlas der Immunologie. *Georg Thieme Verlag KG* (2007).
60. Wan, Y.Y. & Flavell, R.A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* **212**, 114-130 (2006).
61. Berland, R. & Wortis, H.H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* **20**, 253-300 (2002).
62. Letterio, J.J. & Roberts, A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* **16**, 137-161 (1998).
63. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K. & Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* **24**, 99-146 (2006).
64. Gorelik, L. & Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* **2**, 46-53 (2002).
65. Murphy, K.M. & Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 933-944 (2002).
66. Li, M.O. & Flavell, R.A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* **134**, 392-404 (2008).
67. Leberman, D.A. & Edmiston, J.S. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect* **1**, 1297-1304 (1999).
68. Stavnezer, J. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *J Immunol* **155**, 1647-1651 (1995).
69. Rubtsov, Y.P. & Rudensky, A.Y. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* **7**, 443-453 (2007).
70. Strobl, H. & Knapp, W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* **1**, 1283-1290 (1999).

71. Shull, M.M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-699 (1992).
72. Kulkarni, A.B. *et al.* Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 770-774 (1993).
73. Dang, H. *et al.* SLE-like autoantibodies and Sjogren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta knockout mice. *J Immunol* **155**, 3205-3212 (1995).
74. Yaswen, L. *et al.* Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood* **87**, 1439-1445 (1996).
75. Thomas, K.R., Folger, K.R. & Capecchi, M.R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**, 419-428 (1986).
76. Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A. & Kucherlapati, R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**, 230-234 (1985).
77. Papaioannou, V.E., McBurney, M.W., Gardner, R.L. & Evans, M.J. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* **258**, 70-73 (1975).
78. Lupton, S.D., Brunton, L.L., Kalberg, V.A. & Overell, R.W. Dominant positive and negative selection using a hygromycin phosphotransferase-thymidine kinase fusion gene. *Mol Cell Biol* **11**, 3374-3378 (1991).
79. Oshima, M., Oshima, H. & Taketo, M.M. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* **179**, 297-302 (1996).
80. Larsson, J. *et al.* Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J* **20**, 1663-1673 (2001).
81. Tremblay, K.D., Dunn, N.R. & Robertson, E.J. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* **128**, 3609-3621 (2001).
82. Lechleider, R.J. *et al.* Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Dev Biol* **240**, 157-167 (2001).
83. Waldrip, W.R., Bikoff, E.K., Hoodless, P.A., Wrana, J.L. & Robertson, E.J. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* **92**, 797-808 (1998).
84. Weinstein, M. *et al.* Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9378-9383 (1998).
85. Nomura, M. & Li, E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* **393**, 786-790 (1998).
86. Sirard, C. *et al.* The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev* **12**, 107-119 (1998).
87. Yang, X., Li, C., Xu, X. & Deng, C. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3667-3672 (1998).
88. Datto, M.B. *et al.* Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**, 2495-2504 (1999).
89. Yang, X. *et al.* Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J* **18**, 1280-1291 (1999).
90. Mansour, S.L., Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-352 (1988).
91. Dickson, M.C. *et al.* Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* **121**, 1845-1854 (1995).

92. Gorelik, L. & Flavell, R.A. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **12**, 171-181 (2000).
93. Lucas, P.J., Kim, S.J., Melby, S.J. & Gress, R.E. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *J Exp Med* **191**, 1187-1196 (2000).
94. Li, M.O., Sanjabi, S. & Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* **25**, 455-471 (2006).
95. Cazac, B.B. & Roes, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* **13**, 443-451 (2000).
96. Pear, W.S. *et al.* Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**, 3780-3792 (1998).
97. Giulietti, A. *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401 (2001).
98. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol. 2. Auflage. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1989).
99. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**, 17-27 (1992).
100. Lundberg, K.S. *et al.* High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6 (1991).
101. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159 (1987).
102. Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517 (1975).
103. Rittling, S.R. Clonal nature of spontaneously immortalized 3T3 cells. *Exp Cell Res* **229**, 7-13 (1996).
104. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**, 841-845 (1982).
105. Potter, H. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem* **174**, 361-373 (1988).
106. Sukharev, S.I., Titomirov, A.V. & Klenchin, V.A. Electrically-induced DNA transfer into cells. Electrotransfectin in vivo., in *Gene Therapeutics. Methods and Applications of Direct Gene Transfer*. (ed. J.A. Wolff) 210-232 (Birkhäuser, Boston; 1994).
107. Wang, H., Kavanaugh, M.P., North, R.A. & Kabat, D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* **352**, 729-731 (1991).
108. Conti, C., Mastromarino, P., Riccioli, A. & Orsi, N. Electrostatic interactions in the early events of VSV infection. *Res Virol* **142**, 17-24 (1991).
109. Arcasoy, S.M., Latoche, J.D., Gondor, M., Pitt, B.R. & Pilewski, J.M. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* **4**, 32-38 (1997).
110. Elbashir, S.M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
111. Lutz, M.B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**, 77-92 (1999).
112. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
113. Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, J.V., Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-820 (1967).

114. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).
115. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3116-3120 (1979).
116. Jiao, X., Wang, Z. & Kiledjian, M. Identification of an mRNA-decapping regulator implicated in X-linked mental retardation. *Mol Cell* **24**, 713-722 (2006).
117. Yu, P. *et al.* Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE. *Int Immunol* **18**, 1211-1219 (2006).
118. Hogan, B. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual.*
119. Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M. & Inaba, K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* **15**, 144-153 (1997).
120. Lu, L. *et al.* Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation* **64**, 1808-1815 (1997).
121. Fainaru, O. *et al.* TGFbeta-dependent gene expression profile during maturation of dendritic cells. *Genes Immun* **8**, 239-244 (2007).
122. Geissmann, F. *et al.* TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* **162**, 4567-4575 (1999).
123. Bouchard, C., Fridman, W.H. & Sautes, C. Effect of TGF-beta1 on cell cycle regulatory proteins in LPS-stimulated normal mouse B lymphocytes. *J Immunol* **159**, 4155-4164 (1997).
124. Martin, F. & Kearney, J.F. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev* **175**, 70-79 (2000).
125. Yao, T.P. *et al.* Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**, 361-372 (1998).
126. Prud'homme, G.J. & Piccirillo, C.A. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* **14**, 23-42 (2000).
127. Lowrance, J.H., O'Sullivan, F.X., Caver, T.E., Waegell, W. & Gresham, H.D. Spontaneous elaboration of transforming growth factor beta suppresses host defense against bacterial infection in autoimmune MRL/lpr mice. *J Exp Med* **180**, 1693-1703 (1994).
128. Raz, E. *et al.* Modulation of disease activity in murine systemic lupus erythematosus by cytokine gene delivery. *Lupus* **4**, 286-292 (1995).
129. Marie, J.C., Liggitt, D. & Rudensky, A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* **25**, 441-454 (2006).
130. Kobayashi, S. *et al.* Beta 2-microglobulin-deficient background ameliorates lethal phenotype of the TGF-beta 1 null mouse. *J Immunol* **163**, 4013-4019 (1999).
131. Letterio, J.J. *et al.* Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest* **98**, 2109-2119 (1996).
132. Liu, Y. *et al.* A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **9**, 632-640 (2008).
133. Kehrl, J.H. *et al.* Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* **137**, 3855-3860 (1986).
134. Kehrl, J.H. *et al.* Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* **163**, 1037-1050 (1986).
135. Wan, Y.Y. & Flavell, R.A. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* **28**, 647-659 (2008).

136. Wahl, S.M. & Chen, W. Transforming growth factor-beta-induced regulatory T cells referee inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* **7**, 62-68 (2005).
137. Kim, J.M., Rasmussen, J.P. & Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* **8**, 191-197 (2007).
138. Lahl, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* **204**, 57-63 (2007).
139. Brunkow, M.E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfⁱⁿ, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27**, 68-73 (2001).
140. Huter, E.N. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3⁺ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol* **38**, 1814-1821 (2008).
141. Bommireddy, R. *et al.* Elimination of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells but not B cells eliminates inflammation and prolongs the survival of TGFbeta1-deficient mice. *Cell Immunol* **232**, 96-104 (2004).
142. Coffman, R.L., Lebman, D.A. & Shrader, B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* **170**, 1039-1044 (1989).
143. Sonoda, E. *et al.* Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* **170**, 1415-1420 (1989).
144. McIntyre, T.M. *et al.* Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *J Exp Med* **177**, 1031-1037 (1993).
145. Klein, J. *et al.* B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cell fate. *J Immunol* **176**, 2389-2396 (2006).
146. McKarns, S.C., Letterio, J.J. & Kaminski, N.E. Concentration-dependent bifunctional effect of TGF-beta 1 on immunoglobulin production: a role for Smad3 in IgA production in vitro. *Int Immunopharmacol* **3**, 1761-1774 (2003).
147. van Ginkel, F.W. *et al.* Partial IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice. *J Immunol* **163**, 1951-1957 (1999).
148. Borkowski, T.A. *et al.* A role for TGFbeta1 in langerhans cell biology. Further characterization of the epidermal Langerhans cell defect in TGFbeta1 null mice. *J Clin Invest* **100**, 575-581 (1997).
149. Larsson, J. *et al.* TGF-beta signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. *Blood* **102**, 3129-3135 (2003).
150. Fagarasan, S. & Honjo, T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* **290**, 89-92 (2000).
151. Martin, F., Oliver, A.M. & Kearney, J.F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* **14**, 617-629 (2001).
152. Ito, T. *et al.* Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 cells in the target organs in a murine model for systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **172**, 3628-3634 (2004).
153. Sato, T. *et al.* Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur J Immunol* **34**, 3346-3358 (2004).
154. Xu, Z., Butfiloski, E.J., Sobel, E.S. & Morel, L. Mechanisms of peritoneal B-1a cells accumulation induced by murine lupus susceptibility locus Sle2. *J Immunol* **173**, 6050-6058 (2004).
155. Ishikawa, S. *et al.* Increased circulating CD11b⁺CD11c⁺ dendritic cells (DC) in aged BWF1 mice which can be matured by TNF-alpha into BLC/CXCL13-producing DC. *Eur J Immunol* **32**, 1881-1887 (2002).

156. Ishikawa, S. *et al.* Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J Exp Med* **193**, 1393-1402 (2001).
157. Cao, X. & Chen, D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* **357**, 1-8 (2005).
158. Zhang, H. & Bradley, A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**, 2977-2986 (1996).
159. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A. & Hogan, B.L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**, 2105-2116 (1995).
160. Daluiski, A. *et al.* Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* **27**, 84-88 (2001).
161. Kingsley, D.M. *et al.* The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* **71**, 399-410 (1992).
162. King, J.A., Marker, P.C., Seung, K.J. & Kingsley, D.M. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol* **166**, 112-122 (1994).
163. Xiao, H. & Zhang, Y.Y. Understanding the role of transforming growth factor-beta signalling in the heart: overview of studies using genetic mouse models. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**, 335-341 (2008).
164. Goumans, M.J., Liu, Z. & ten Dijke, P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* **19**, 116-127 (2009).
165. Pohlers, D. *et al.* TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* (2009).
166. Schultz Jel, J. *et al.* TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest* **109**, 787-796 (2002).
167. Leveen, P. *et al.* Induced disruption of the transforming growth factor beta type II receptor gene in mice causes a lethal inflammatory disorder that is transplantable. *Blood* **100**, 560-568 (2002).
168. Nandula, S.R. *et al.* Female mice are more susceptible to developing inflammatory disorders due to impaired transforming growth factor beta signaling in salivary glands. *Arthritis Rheum* **56**, 1798-1805 (2007).
169. Bolland, S. & Ravetch, J.V. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* **13**, 277-285 (2000).
170. Mitchell, D.A. *et al.* C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *J Immunol* **168**, 2538-2543 (2002).
171. Vidal, S., Kono, D.H. & Theofilopoulos, A.N. Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Faslpr mice. *J Clin Invest* **101**, 696-702 (1998).
172. Anderson, M.S. & Bluestone, J.A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* **23**, 447-485 (2005).
173. Drake, C.G., Rozzo, S.J., Vyse, T.J., Palmer, E. & Kotzin, B.L. Genetic contributions to lupus-like disease in (NZB x NZW)F1 mice. *Immunol Rev* **144**, 51-74 (1995).
174. Kallapur, S., Ormsby, I. & Doetschman, T. Strain dependency of TGFbeta1 function during embryogenesis. *Mol Reprod Dev* **52**, 341-349 (1999).
175. Cougot, N., Babajko, S. & Seraphin, B. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* **165**, 31-40 (2004).
176. Aizer, A. *et al.* The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell* **19**, 4154-4166 (2008).
177. Dibrov, A., Kashour, T. & Amara, F.M. The role of transforming growth factor beta signaling in messenger RNA stability. *Growth Factors* **24**, 1-11 (2006).
178. Wrana, J.L. *et al.* TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003-1014 (1992).

179. Dennler, S. *et al.* Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **17**, 3091-3100 (1998).
180. Datto, M.B., Yu, Y. & Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* **270**, 28623-28628 (1995).
181. Tournay, O. & Benezra, R. Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* **16**, 2418-2430 (1996).
182. Korchynskiy, O. & ten Dijke, P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* **277**, 4883-4891 (2002).
183. Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C.H., ten Dijke, P. & Kruijer, W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* **273**, 21145-21152 (1998).
184. Tanaka, Y. *et al.* Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10215-10220 (1997).
185. Xu, W. *et al.* Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat Genet* **26**, 229-232 (2000).
186. Bu, P., Evrard, Y.A., Lozano, G. & Dent, S.Y. Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol Cell Biol* **27**, 3405-3416 (2007).
187. Liu, Y. *et al.* Zeb1 mutant mice as a model of posterior corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 1843-1849 (2008).
188. Derynck, R. & Zhang, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584 (2003).
189. Wisotzkey, R.G. *et al.* Medea is a Drosophila Smad4 homolog that is differentially required to potentiate DPP responses. *Development* **125**, 1433-1445 (1998).
190. Subramanian, G. *et al.* Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype. *Cancer Res* **64**, 5200-5211 (2004).
191. Inman, G.J. & Hill, C.S. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem* **277**, 51008-51016 (2002).

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefasst war, mir die Freiheit bei der Ausgestaltung zu lassen. Für seine wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Groll danke ich für die bereitwillige Übernahme dieser Dissertation in den Fachbereich Biochemie der Technischen Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Dissertation im hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München anfertigen zu können, bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Ruland, Frau Prof. Dr. Irmgard Förster, Frau PD Dr. Leticia Quintanilla-Fend und Herrn PD Dr. Florian Greten für wertvolle Vorschläge, fachliche Diskussionen und experimentelle Unterstützung, ohne die die Arbeit in diesem Rahmen nicht möglich gewesen wäre.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft, ebenso den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Ruland und Bernhard. Namentlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Claudia Mugler für ihre technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit, Sebastian Kuhn für seine kritischen Diskussionen und seine Hilfe bei der Messung der Proliferation, Thomas Patzelt für seine tatkräftige Unterstützung bei den FACS-Analysen, Lena Illert für die Einführung in das Arbeiten mit Mäusen, Olaf Gross für die Protokolle für DC, Susie Weiß für ihre Hilfe bei der ES-Zellkultur, Birgit Wittig für ihre Unterstützung bei der Immunisierung mit LPS, Becky Dechow für hilfreiche Tipps und Tricks im Laboralltag und Susanne Raulefs für die Einweisung in das Projekt bedanken. Viele von meinen Kollegen sind meine Freunde geworden und ich möchte ihnen für ihre Freundschaft danken.

Ein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, die alle auf ihre persönliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8 Publikationen

Leibig W., Kuhn S., Patzelt T., Mugler C., Bai, R., Quintanilla-Fend L., Pfeffer, K., Förster I., Peschel C., Ruland J. and Duyster J. Smif is a negative regulator of T cell activation and autoimmunity in vivo. (Manuskript in Vorbereitung)

Kessels, M.M., Dong, J., **Leibig, W.**, Westermann, P. & Qualmann, B. Complexes of syndapin II with dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Sci* **119**, 1504-1516 (2006).