

**Die Rolle der Ubiquitin Ligase Smurf2 in T-Lymphozyten
bei der Entwicklung von chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Heike Dornhoff

geb. am 28.08.1978 in Essen

Mainz, 2009

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2010

Für meinen Bruder Sven

Wir vermissen Dich!

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1.1 CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN UND AUTOIMMUNITÄT	1
1.1.1 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	2
1.1.2 TIERMODELLE FÜR CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN	3
1.2 T-LYMPHOZYTEN IN DER AUTOIMMUNITÄT	4
1.2.1 CD4 ⁺ T-Zell Differenzierung (Th1/Th2/Th17)	7
1.2.2 Regulatorische T-Zellen (nTreg/TiTreg)	10
1.3 TGFβ ALS SCHLÜSSELMOLEKÜL DER IMMUNOLOGISCHEN TOLERANZ	12
1.3.1 Rezeptoren	14
1.3.2 Ligandenbindung an den Rezeptor	15
1.3.3 Signaltransduktion des TGF-βs/Smad-Signalweg	16
1.3.4 Die Rolle von TGF-β in der T-Zell Biologie und Immunantwort	18
1.3.5 Die Rolle von TGFβ bei Krebs	19
1.3.6 Regulation des TGFβ-Signalweges: Die Ubiquitin Ligase Smurf und der proteasomaler Proteinabbau	20
Die Ubiquitinierung	21
Ubiquitin E3 Ligase: Smurf2	22
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	25
2.1.1 DNA-Restriktion	25
2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese von DNA	25
2.1.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen durch MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)	26
2.1.4 Reinigung von doppelsträngiger DNA aus Enzymatischen Reaktionen mit dem MinElute Cleanup (Qiagen) Kit Protocol	27
2.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit	27
2.1.6 Sequenzierung von DNA	28
2.1.7 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen und Geweben	28
2.1.8 cDNA-Synthese	29
2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.1.11 Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration	32
2.2 ARBEITEN MIT BAKTERIEN	32
2.2.1 Bakterienstämme	32
2.2.2 Kulturmedien und Lösungen	32
2.2.3 Transformation chemisch kompetenter E.coli-Zellen	32
2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	33
2.3 ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN	33
2.3.1 Zellen/Zelllinien	33
2.3.2 Kulturmedien und Lösungen	33
2.3.3 Isolierung von Thymozyten aus der Maus	34
2.3.4 Isolierung von T-Lymphozyten aus der Milz einer Maus	34
2.3.5 T-Zell Differenzierung	34
2.3.6 Nicht Radioaktiver Proliferations Assay (CFSE)	35
2.3.7 Apoptosefärbung (AnnexinV-FITC/7AAD)	36
2.3.8 Transiente Transfektion	36
2.3.9 Luciferase Assay	37
2.3.10 Kultivierung und Konservierung von Zellen	37
2.4 ARBEITEN MIT GEWEBE	38
2.4.1 H&E (Hämalaun und Eosin) Färbungen von Geweben	38
2.4.2 Immunzytochemische Nachweise	38
2.4.3 Immun-Histochemische Nachweise	39
2.5 ARBEITEN MIT PROTEINEN	40
2.5.1 Isolierung von Gesamtzellextrakten	40
2.5.2 Immunpräzipitation (IP)	40

2.5.3	Western Blot.....	40
2.5.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	43
2.6	ARBEITEN MIT MÄUSEN.....	43
2.6.1	Herstellung einer transgenen Maus durch Injektion in den Pronukleus.....	43
2.6.2	Maus-Modelle	44
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	NACHWEIS DER EXPRESSION VON SMURF2 IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN EINER MAUS	45
3.2	NACHWEIS DER EXPRESSION VON SMURF2 IN T-LYMPHOZYTEN.....	46
3.3	NACHWEIS DER EXPRESSION VON SMURF2 IN CD4 ⁺ SUBPOPULATIONEN	47
3.4	NACHWEIS DER EXPRESSION VON SMURF2 IN TUMOREN.....	48
3.5	NACHWEIS DER SMURF2 EXPRESSION IN TUMORINFILTRIERENDEN LYMPHOZYTEN	49
3.6	NACHWEIS TGF- β VERMITTELTEN EINFLÜSSE AUF DIE INDUKTION VON SMURF2 IN T-ZELLEN.....	50
3.6.1	Zeitabhängige Induktion von Smurf2 in CD4 ⁺ -Zellen durch TGF- β und anergisierenden Agenzien	50
3.6.2	Nachweis TGF β vermittelter Einflüsse auf die Induktion von Smurf2 in TGF β induzierten T regulatorischen Zellen (Tregs).....	52
3.7	IDENTIFIKATION NEUER SPLEIßFORMEN UND EINER NC(NON CODING)RNA VON SMURF2 IN MAUS UND MENSCH	53
3.8	EXPRESSION DER SPLEIßFORMEN VON SMURF2 IN T-LYMPHOZYTEN, SUBPOPULATIONEN UND TUMORGEWEBE	55
3.9	VERÄNDERUNG DER 3D-STRUKTUR DER C2-DOMÄNE BEI DE2SMURF2	57
3.10	LOKALISATION VON WT-SMURF2 UND DE2SMURF2 IN COS-ZELLEN	58
3.11	TGF β SIGNALWEG VON WTSMURF2 UND DE2SMURF2 IN VITRO.....	60
3.12	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER DE2SMURF2 T-ZELL SPEZIFISCHEN MAUS	62
3.12.1	Charakterisierung der transgenen Mäuse.....	62
3.12.2	T-Zell Charakterisierung von Thymus und Milz Zellen.....	63
3.12.3	Veränderung des TGF β Signalweges in CD4 T-Zellen transgener Mäuse	65
3.12.4	CD4 ⁺ T-Zellanalyse: Differenzierung, Proliferation und Apoptose.....	67
3.12.5	CD8 ⁺ T-Zellanalyse.....	72
3.13	HYPOTHESE ZUR HOCHREGULATION DES TGF β RII IN TRANSGENEN LYMPHOZYTEN DURCH DE2SMURF2	75
3.14	TUMORINDUKTION.....	77
3.14.1	AOM/DSS	77
3.14.2	APC ^{min} -Modell (Adenomatous polyposis coli).....	82
3.14.3	Tumorentwicklungsprognose bei Patienten mit Kolonkarzinomen	82
3.15	AKUTE ENTZÜNDUNG DES DARMS (ÜBERLEBENSEXPERIMENT).....	83
3.16	TRANSFERKOLITIS-MODELL	84
3.17	EXPRESSION VON SMURF2 IN DENDRITISCHE ZELLEN HERGESTELLT AUS DEM KNOCHENMARK	85
3.18	HERSTELLUNG EINER SMURF2 „KNOCK OUT“ MAUS.....	86
3.18.1	Vektorkonstruktion für das konditionale „Gene targeting“ des Smurf2-Gens.....	86
3.18.2	Isolierung homolog rekombinanter embryonaler Stammzellen (ES)- Zell-Klone	87
4	DISKUSSION	88
4.1	UNTERSCHIEDLICHE LOKALISATION DER SMURF2 SPLEIßVARIANTEN IN DER ZELLE	89
4.2	POSITIVE REGULATION DES TGF β SIGNALWEGES DURCH DIE ISOFORM VON SMURF2	90
4.3	PROTEKTION DER ENTZÜNDUNGSABHÄNGIGEN ENTWICKLUNG VON KOLONTUMOREN BEI DE2SMURF2 TRANSGENEN MÄUSEN	91
4.4	PROTEKTION DER TRANSGENEN DE2SMURF2 MÄUSE IM ENTZÜNDUNGSUNABHÄNGIGEN KOLONTUMOR-BASIERTEM APC ^{MIN/+} MODELL	92
4.5	GESTEIGERTE EXPRESSION DES PROINFLAMMATORISCHEN INTERLEUKINS 17 IN TRANSGENEN CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-ZELLEN	93
4.6	ENTDECKUNG EINER NEUEN NICHT KODIERENDEN RNA	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
7	Abkürzungsverzeichnis/Anhang	109

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Autoimmunität

Autoimmunerkrankung ist in der Medizin der Begriff für Krankheiten, deren Ursache eine überschießende Reaktion des Immunsystems gegenüber eigenem Gewebe ist. Die genaue Ursache der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist noch weitgehend unklar. Annerkannte Hypothesen von Autoimmunerkrankungen gehen von einer genetischen Disposition, z.B. durch Vorhandensein verschiedener MHC-Molekül-Varianten (*major histocompatibility complex*), in Kombination mit exogen erworbenen Einflüssen aus. Exogene Einflüsse, wie Stress, Infektionen, Schwangerschaft und andere Umweltfaktoren können somit in Kombination mit genetisch bedingten Faktoren zu Autoimmunerkrankungen führen (Rexroth 2005).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED, engl. *Inflammatory bowel disease* IBD) gehören zur Gruppe der organspezifischen Autoimmunerkrankungen. Zu ihnen zählen Krankheiten, bei denen spezifische Organe (Gewebestrukturen) vom Immunsystem angegriffen werden. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen handelt es sich um eine chronisch wiederkehrende idiopathische Entzündung des Intestinaltraktes (Gerd Bouma 2003). Man unterscheidet zwei Formen der CED: Morbus Crohn und Kolitis Ulcerosa (Podolsky 2002). Morbus Crohn wurde erstmals in den dreißiger Jahren durch B.B. Crohn beschrieben (Crohn 1932), während die Kolitis Ulcerosa bereits 1859 von Wilks in London beschrieben wurde (Wilks 1875). Der Morbus Crohn erstreckt sich über den gesamten Gastrointestinaltraktes, wobei hauptsächlich die Entzündung im terminalen Ileum und Kolon überwiegt. Kolitis Ulcerosa konzentriert sich mehr auf das Rektum und des proximalen Kolon. Beim Morbus Crohn erstreckt sich die Entzündung über sämtliche Schichten der Darmwand, während sich bei der Kolitis Ulcerosa die Entzündung sich hauptsächlich in den Darmschichten der Mukosa und Submukosa erstreckt (Podolsky 2002).

Die CED ist weltweit verbreitet. So liegt ihre Prävalenz in Westeuropa und den USA bei 100-200 Fällen pro 100.000 Einwohner (Duerr 1998). Die Inzidenz des Morbus Crohn ist geographisch sehr unterschiedlich und weist ein Nord-Süd-Gefälle auf. Im Norden, wie z.B. England erkranken mehr Menschen als in südlichen Gebieten, wie Italien (Rexroth 2005). Die Prävalenz liegt in den Industrieländern bei 0,1%, dabei sind etwas mehr Frauen betroffen als Männer. Auch die Kolitis Ulcerosa ist weltweit verbreitet, wobei sie in Nordamerika ihre höchste Inzidenz hat. Die niedrigsten Inzidenzen befinden sich in Süd- und Osteuropa, Asien

und Südamerika. Asiatische und afroamerikanische Bevölkerungsgruppen erkranken seltener als weiße, wobei innerhalb der weißen Bevölkerungsgruppen besonders Ashkenazi-Juden betroffen sind (Rexroth 2005). Bei der Kolitis Ulcerosa sind Männer gleich häufig betroffen wie Frauen. Es gibt zwei Manifestationsgipfel, der erste zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, der zweite zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Auch bei dem Morbus Crohn treten die häufigsten Diagnosen zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr auf und jenseits des 60. Lebensjahres (Rexroth 2005). Solche epidemiologische Häufungen sprechen meistens für eine genetische und/oder durch Umweltfaktoren bedingte Erkrankung (Wen 2004). In der Tat wurden Krankheitsgene, wie z.B. das CARD15, DLG5, MDR1 und das PPARG Gen, für die Entstehung von CED identifiziert.

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der CED ist noch weitgehend unklar. Man weiß, daß Vererbung, immunologische Ursachen, Umweltfaktoren und Psychosomatische Einflüsse bei der Entstehung von CED eine Rolle spielen. Zu den umweltbedingten Faktoren zählen, u.a. Rauchen, Ernährung, Streß und Hygiene (Rexroth 2005). Zu den Psychosomatischen Einflüssen zählen Angstsyndrome und Depressionen, die eher Folge, als Ursache der Erkrankung sind. Weiterhin ist bekannt, daß mögliche Auslöser von Morbus Crohn mit einer Infektion von atypischen Mycobakterien (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) angenommen wird. So konnte bei Patienten mit Morbus Crohn mit Hilfe der PCR-Technik in Dünndarmbiopsien Fragmente des Mycobakterium-Genoms isoliert werden. Ferner wird auch diskutiert, ob ein Subtyp von *Escherichia coli* in der Pathogenese von Morbus Crohn sowie die Gattungen *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia* in der Pathogenese von Kolitis Ulcerosa eine Rolle spielen.

Patienten mit CED weisen eine Gewebeschädigung der Darmschleimhaut auf, was durch das Immunsystem des Darmes bewirkt wird. Die Störung der immunologischen Toleranz, eine überschießende Reaktion auf exogene Antigene, verursacht eine defekte Regulation des intestinalen Immunsystems der CED-Patienten. So zeigen Morbus Crohn Patienten Charakteristika einer T-Zell-vermittelten Hypersensitivitätsreaktion. Hierbei werden bevorzugt T helper (TH) 1-Zytokine wie Interferon gamma (INF γ), Interleukin (IL) 2 und IL12 von den beteiligten Immunzellen exprimiert. Kolitis Ulcerosa Patienten zeigen dahingehend eher ein typisches TH2 Zytokinmuster. Dies ist charakterisiert durch die Exprimierung von B-Zell-stimulierenden Zytokinen, wie IL4, IL5 und IL10. Patienten mit CED zeigen weiterhin eine vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren wie

beispielsweise Prostaglandine und Leukotriene. Diese werden durch Granulozyten und/oder Mastzellen gebildet (Rexroth 2005).

Auch die Genetik spielt bei der Entstehung von CED eine große Rolle. So konnte durch eine genomweite Kopplungsanalyse bei Familien mit CED vier Suszeptibilitätsloci für CED (IBD 1-4) auf den Chromosomen 6, 12, 14 und 16 identifiziert werden. Hugot und Kollegen konnten dann ein dazugehöriges Gen identifizieren. Dabei handelt es sich um den intrazellulären Lipopolysaccharid-Rezeptor NOD (*non-obese diabetic*) 2, auch bekannt als CARD (*caspase recruitment domain*) 15. Dieser wird in Monozyten exprimiert und aktiviert nach Bindung bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) den Transkriptionsfaktor NF-κB (*Nucleo Factor kappa B*), der dann verschiedene proinflammatorische Zytokine hochreguliert. Ausschließlich Morbus Crohn Patienten besitzen aufgrund einer Insertionsmutation mit Verschiebung des Leserasters im NOD2-Gen ein verkürztes NOD2-Protein (Ogura 2001). Wie dieses verkürzte Protein zur Erkrankung führt ist jedoch noch unklar.

1.1.2 Tiermodelle für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zur experimentellen Untersuchung der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind viele Tiermodelle beschrieben worden. Diese lassen sich in spontane, chemisch induzierte, genetisch manipulierte und Zelltransfer-Modelle gliedern. Die bekanntesten unterschiedlichen Modelle sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Sie eignen sich besonders für das Studium von genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren, die eine initiiierende Rolle bei der Entstehung von CED spielen (Neurath 2005; Neurath 2007; Wirtz 2007).

CED

Chemisch induzierte Modelle	DSS (<i>dextran sulfate sodium</i>) –induzierte Kolitis TNBS (<i>trinitrobenzene sulfonic acid</i>) –induzierte Kolitis Oxazolone -induzierte Kolitis
Immunologisch induzierte Modelle	Cyclosporin A
Spontane Modelle	SAMP1/Yit (<i>senescence accelerated mouse</i>) C3H/HeJBir

Genetisch manipulierte Modelle	<p>IL-10 knockout</p> <p>IL-2 receptor-β knockout</p> <p>IL-2 receptor-α knockout</p> <p>IL-2 knockout</p> <p>WASP knockout (<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>)</p> <p>Myeloid STAT3 knockout</p> <p>IL-7 transgen</p> <p>HGF transgen</p> <p>TGFβRII dominant negativ transgen</p>
Zelltransfer Modelle	<p>Knochenmark-Transfer in transgene $\epsilon 26$ Maus</p> <p>CD4⁺CD45RB^{high}/SCID</p> <p>CD4⁺CD45^{high}/RAG-2 knockout</p> <p>CD4⁺62L^{high}/SCID</p>

Tabelle 1: Mausmodelle der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)

Die DSS-induzierte Kolitis basiert dabei auf der Zerstörung der Epithelbarriere durch das DSS. Somit wandern bakterielle Antigene aus dem Darmlumen in das Gewebe ein und aktivieren dort T-Zellen sowie Makrophagen. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion und Freilassung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF (*Tumor necrosis factor*) α und IL6 (Strober 2002). Die DSS-Gabe, in Kombination mit einmaliger Verabreichung des mutagenisierten Agens Azoxymethan (AOM), führt zu einer entzündungsabhängigen Tumorentwicklung im Kolon (Neufert C. 2007).

1.2 T-Lymphozyten in der Autoimmunität

Die T-Zell Entwicklung findet im Thymus eines Organismus statt. Es werden zwei verschiedene Zellarten gebildet: die α : β - und die γ : δ -T-Zellen. Diese beiden Arten unterscheiden sich in unterschiedlichen genetischen Loci, die für die Zusammenstellung der jeweiligen T-Zell-Rezeptoren genutzt werden. Beide Zellarten haben eine gemeinsame Vorläuferzelle, sind aber funktionell voneinander verschieden. Die beiden Zellarten unterscheiden sich spezifisch, im Expressionsmuster der CD (*cluster of differentiation*) 4- und CD8-Corezeptoren sowie hinsichtlich ihrer anatomischen Verteilung in der Peripherie. Die Mehrzahl der T-Zellen bilden die α : β -T-Zell Gruppe. Später gehen aus den α : β -T-Zellen zwei

funktionell getrennte Untergruppen hervor, die CD4- und die CD8-T-Zellen. Am Anfang der Entwicklung exprimieren die Thymozyten noch keinen der drei Marker, die für reife T-Zell-Linien kennzeichnend sind. Dazu gehören der CD3:T-Zell-Rezeptor-Komplex sowie die Corezeptoren CD4 oder CD8. Deshalb nennt man diese Zellen auch „doppelt negative Thymozyten“. Die Entwicklung der T-Zellen führt dann weiter zu „doppelt positiven Thymozyten“, die dann die Rezeptoren CD4 und CD8 exprimieren. Die Zellen, die dann Selbst-MHC-Moleküle erkennen und daher eine positive Selektion durchlaufen, reifen weiter heran und exprimieren große Mengen des T-Zell-Rezeptors. Während und nach dem doppelt positiven Entwicklungsstadium durchlaufen die Thymozyten auch eine negative Selektion. Dabei werden diejenigen Zellen ausgeschlossen, die auf Autoantigene ansprechen. Am Ende der Entwicklung beenden sie die Expression eines der beiden Corezeptoren und werden somit zu „einfach positiven“ CD4- oder CD8-Thymozyten. Diese erkennen dann Antigene und werden in die Peripherie verschiedener lymphatischen Gewebe als naive T-Zellen entlassen. Bei der Antigenbindung unterscheiden sich dabei die CD4 von den CD8 T-Zellen in der Erkennung ihrer MHC-Klassen. So erkennen die CD4 T-Zellen die MHC-Klasse II, während die CD8 T-Zellen den MHC Klasse I erkennen.

Neben genetischen Faktoren und der mukosalen Darmflora, die eine Rolle bei CED spielen, ist bekannt, daß auch Zytokine eine zentrale Rolle in der Regulation des Immunsystems und bei der Entwicklung von Immunzellen spielen. So geht man von der Hypothese aus, daß eine Dysregulation von proinflammatorischen Zytokinen und/oder einer Dysregulation von immunsupprimierenden regulatorischen T Zellen (Tregs) zu Autoimmunerkrankungen führen können (O'Shea J.J. 2002; Gerd Bouma 2003).

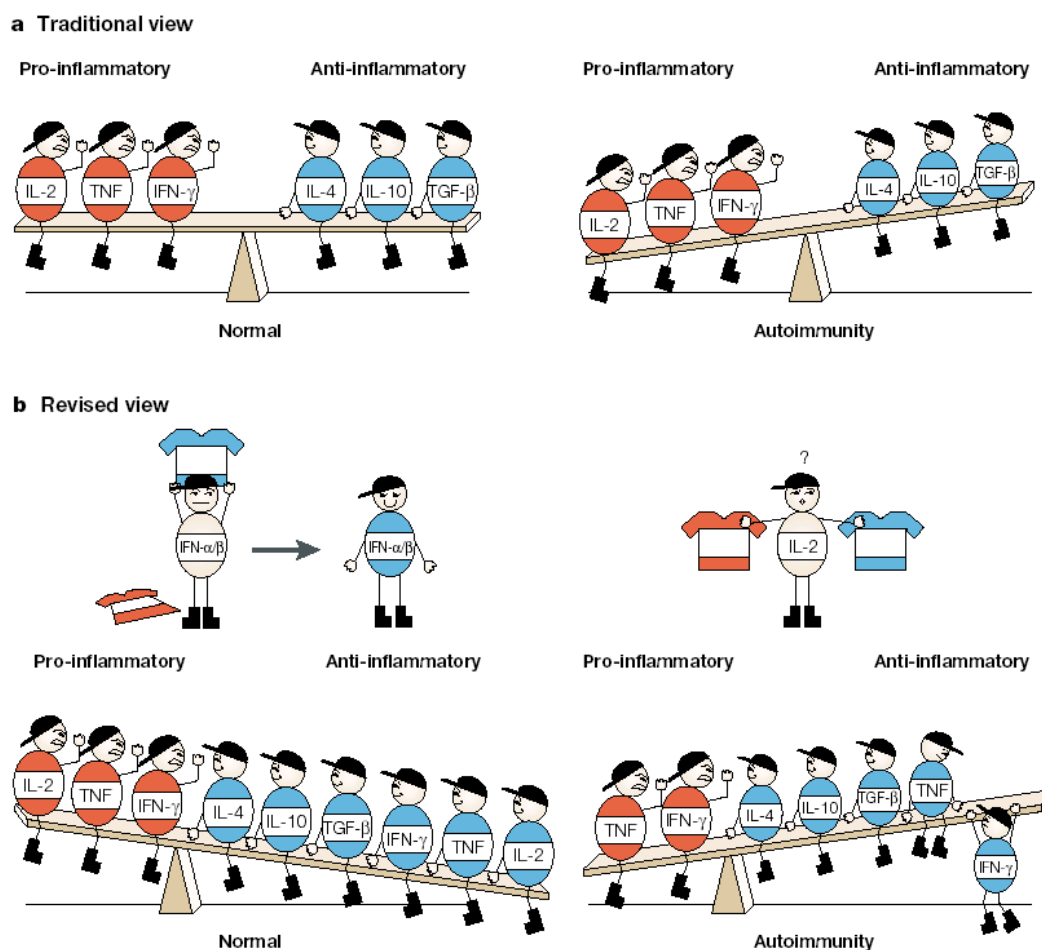


Abbildung 1: Zytokine und Autoimmunität (O’Shea J.J. 2002), Traditionelle und neue Sicht von der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

So zeigen Mausmodelle, die proinflammatorische Zytokine überexprimieren wie TNF α , IFN γ , IL4 und IL12 eine starke Kolitis. Die Traditionelle Sicht von der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist in Abbildung 1a dargestellt. Man ging bisher davon aus, daß die Entstehung von einer Erkrankung mit einer Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen einhergeht. Das Zytokin-Gleichgewicht aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gerät somit aus der Homöostase. Folglich entwickelt sich daraus eine Autoimmunerkrankung. Eine verbesserte Sicht der Zytokinregulation zeigt die Abbildung 1b, in der einige Zytokine sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken können. So liegt im gesunden Organ das Gewicht auf der Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL10, IL4 und TGF (*Transforming growth factor*) β . Bei einer Autoimmunerkrankung können Zytokine „switchen“, indem sie erst antiinflammatorisch wirken, aber dann proinflammatorischen Einfluß haben, wie z.B. das IL2 oder IFN α/β (O’Shea J.J. 2002).

So gibt es neben vielen anderen Ursachen von CED besonders zwei „Pathways“ die zur mukosalen Inflammation führen können. Entweder eine exzessive TH1-Zell Immunantwort

mit einer starken Sekretion von $\text{IFN}\gamma$, IL12 und/oder TNF, oder eine exzessive TH2 vermittelte Immunantwort, mit einer starken Sekretion von IL4, IL5 und/oder IL13 (näheres dazu in Kapitel 1.2.1).

1.2.1 CD4^+ T-Zell Differenzierung (Th1/Th2/Th17)

Nach Erkennung von spezifischen Antigenen von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) im lymphatischem Gewebe erfolgt eine Differenzierung und Aktivierung der naiven Vorläufer T-Zellen in verschiedene Richtungen, ausgehend von den gebildeten Zytokinen der APCs. Die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen benötigt zwei separate Signale. Das erste Signal läuft über den T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplex nach der Interaktion von Antigen und MHC-Komplex der APCs. Das zweite Signal erfolgt durch die Produktion von co-stimulierenden oder accessorischen Molekülen der APCs, die mit ihren Liganden auf den naiven T-Zellen interagieren (z.B. CD28/B7-1, CD28/B7-2, OX40/OX40L, ICOS/B7H). Blockiert man das zweite Signal, so gehen die Zellen in Anergie und es findet eine Unterdrückung von mukosale Erkrankungen statt (Markus F Neurath 2002). Wie schon erwähnt spielen vor allem Zytokine eine große Rolle in der TH-Zell Polarisierung. So spielen besonders die Zytokine IL12 und IL4 in der TH1 und TH2 Differenzierung eine Rolle. Sie induzieren dabei selbst ihre eigenen TH Untergruppe und unterdrücken gleichzeitig zusammen mit $\text{TGF}\beta$ die Generierung der entgegengesetzten Untergruppe (siehe Abbildung 2).

IBD wie der Morbus Crohn ist definiert durch eine chronische Entzündung des gastrointestinalen Trakt, nicht hervorgerufen durch spezifische Pathogene. Der Morbus Crohn ist dabei definiert durch eine diskontinuierliche, transmurale Entzündung, die im gesamten gastrointestinalen Trakt vorkommen kann. Wohingegen die Kolitis Ulcerosa mehr dadurch charakterisiert ist, daß sie mehr oberflächlich und durchgehend im Kolon auftritt und Mukosa und Submukosa befällt. So scheint die TH1 vermittelte IL12 Produktion eine pathogene Rolle bei Morbus Crohn zu spielen (Parronchi 1997), die durch die TNBS induzierte Kolitis bei Mäusen simuliert werden kann (Strober, Fuss et al. 1998; Strober and Fuss 2006; Strober, Fuss et al. 2007). Bei Kolitis Ulcerosa spielt dahingegen IL4 (TH2) die pathogene Rolle, welche durch eine Oxazolone induzierte Kolitis bei Mäusen simuliert werden kann (siehe Tabelle 1).

Die TH1 Differenzierung wird hauptsächlich durch das Zytokin IL12 eingeleitet. Das IL12 besteht aus einem Dimer, der Untergruppe p35 und p40. Dieses Dimer wird besonders von $\text{CD8}\alpha^+$ DCs (*dendritic cell*) oder Makrophagen gebildet. Dabei aktiviert es den

Transkriptionsfaktor STAT4 (*signal transducers and activators of transcriptions*) (Moser M 2000). Die Induktion von INF γ und damit die Differenzierung in TH1 T-Zellen erfolgt zuerst über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 und T-bet (Szabo 2000). Für die TH2 Differenzierung konnte der Transkriptionsfaktor GATA3 identifiziert werden, der durch STAT6 gebildet wird und seine Effektorfunktion in der Zytokinantwort liegt.

Neben der klassischen TH1/TH2 Differenzierung können naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen auch in sogenannte TH3 und TH17 Zellen differenziert werden. Dabei bilden die TH3 T-Zellen die immunsupprimierenden Zellen, welche das antiinflammatorische Zytokins TGF β sezernieren (siehe Kapitel 1.6.2). Die Differenzierung zu TH17 Zellen, einer neueren Untergruppe von T-Zellen, erfolgt durch die Zytokine IL6 und TGF β (siehe Abbildung 2) (Mangan PR 2006; Veldhoen M 2006). Charakteristisch für die TH17 Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors *Orphan nucleo receptor* ROR γ t (Ivanov 2006) und STAT3 (Laurence 2007; Yang 2007). Ebenfalls charakteristisch für diese Zellen ist die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL17. Es gibt fünf Mitglieder der IL17 Familie, IL17B bis IL17F, und IL17A welches ausschließlich durch TH17 Zellen produziert wird (Sanchez-Munoz 2008). Die Produktion von IL17 basiert auf der Aktivierung von STAT3, getriggert durch IL23 (Cho 2006). Die Aufgabe des IL17 ist das Rekrutieren von Immunzellen zum peripheren Entzündungsherd, wo dann diese Immunzellen proinflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL6 und IL1 β produzieren. Dies ist eine Immunantwort, die eine NF- κ B Aktivierung in den rekrutierten Immunzellen nach Bindung des IL17 Rezeptors voraussetzt. Die Zytokine TNF α und IL6 werden beide autokrin von TH17 Zellen produziert. Vielmehr dienen diese der Produktion von weiteren proinflammatorischen Mediatoren. Regulatorische T-Zellen können ebenfalls eine Quelle für die Differenzierung zu TH17 Zellen sein. Weiterhin ist bekannt, daß für die TH17 Differenzierung aus humanen naiven CD4⁺ T-Zellen IL1 β , IL6 und IL23, aber kein TGF β (wie es für Maus T-Zellen gebraucht wird) benötigt wird (Acosta-Rodriguez 2007).

In Seren und intestinalen Geweben von CED-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von IL17 und eine erhöhte Populationsdichte an TH17-Zellen gefunden (Sanchez-Munoz 2008). Somit scheinen TH17 Zellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zu haben. So ist IL17 an der Zerstörung von Knochen und Knorpelgewebe beteiligt und spielt damit eine große Rolle bei der Rheumatoiden Arthritis. Ebenso ist dies bei Psoriasis und der Entwicklung von Multipler Sklerose beim Menschen der Fall. Aber auch in den Tiermodellen von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der EAE

(*experimentelle autoimmune encephalomyelitis*) sind die TH17 Zellen in dem pathogenen Prozess involviert (Korn 2007).

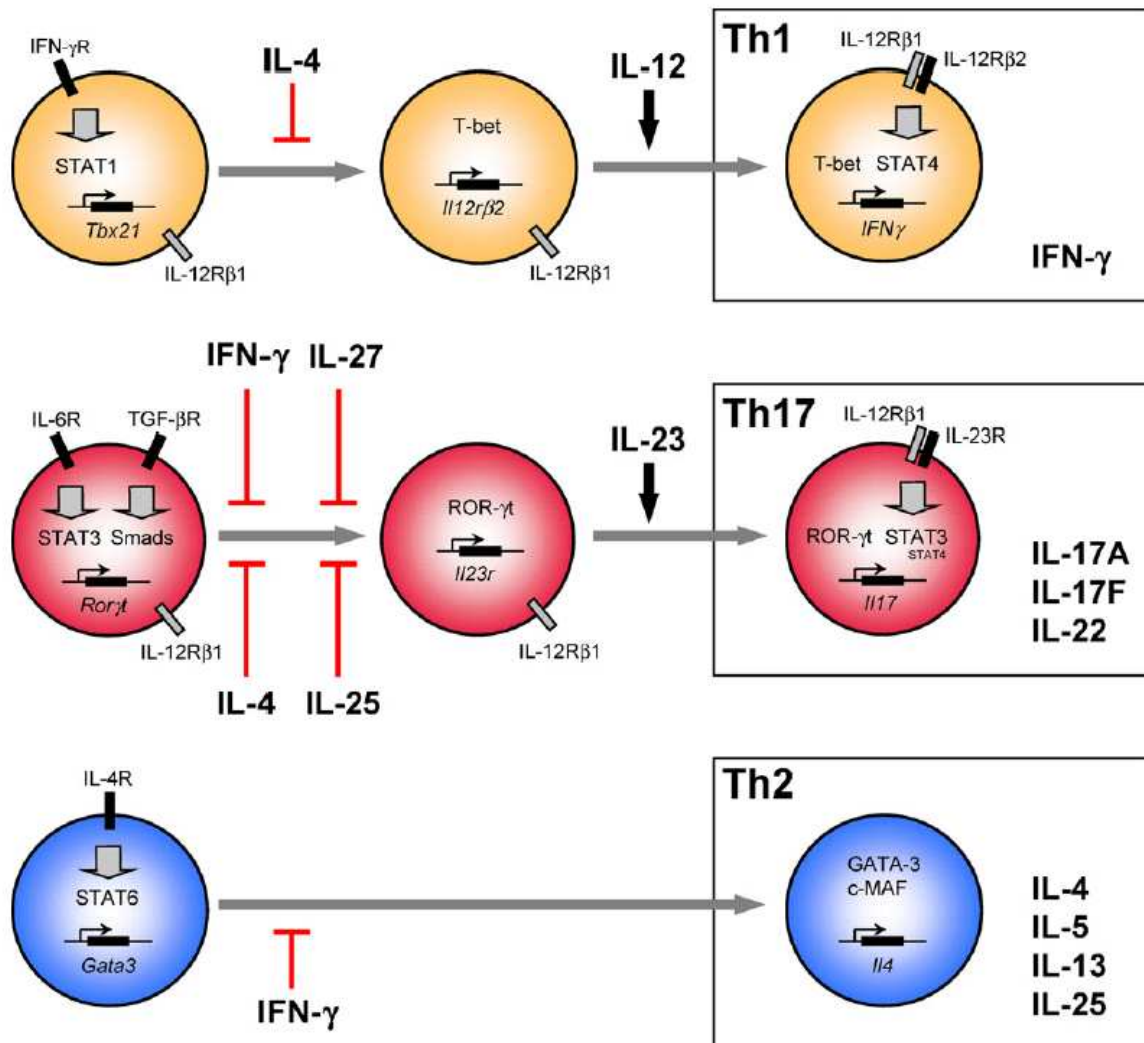


Abbildung 2: Differenzierung und Effektor Zytokine der T-Helfer-Untergruppen; TH1/TH2/TH17 Polarisation (Korn 2007)

Wie oben erwähnt ist IL6 und TGF β im murinen System wichtig für die Generierung von TH17 Zellen. So scheint das TGF β neben einer antiinflammatorischen Wirkung auch eine proinflammatorische Wirkung bei der Differenzierung zu TH17 Zellen zu haben. Bisher ist die Quelle der TGF β produzierenden Zellen in vivo während der TH17 Differenzierung noch nicht gefunden worden. Man geht aber davon aus, daß nTregs (nTregs/Th3: siehe Kapitel 1.6.2), Produzenten des Zytokins TGF β , in die Differenzierung involviert sind. TH17 Zellen produzieren neben ihrem IL17 Zytokin auch IL21 in einem autokrinen Verhältnis, um die TH17 Differenzierung gemeinsam mit dem TGF β voranzutreiben. Durch die Entdeckung der TH17 Zellen konnten weitere Mitglieder der IL12 Familie identifiziert werden, das IL23 und IL27. IL12 ist ein heteromeres Zytokin bestehend aus der Untereinheit p40 und p35. Das IL23

besteht aus den Untereinheiten p19 und teilt die Untereinheit p40 mit dem IL12. Beide Zytokine werden von APCs, wie den Dendritischen Zellen gebildet. Aber diese Interleukine werden durch verschiedene Stimuli aktiviert, so daß sie nicht simultan von den APCs gebildet werden können. Das IL23 scheint für die Expansion und Differenzierung der TH17 benötigt zu werden. So exprimieren IL23 stimulierte Zellen hohe Mengen an IL17A, IL17F und TNF α , wohingegen IL12 die Expression von IFN γ und TNF α fördert. Somit haben TH1 und TH17 Zellen wahrscheinlich verschiedene immunologische Funktionen (Mc Geachy 2008). Stimulation von Zellen mit IL6, TGF β und IL23 scheint eine Population von IL17 produzierenden Zellen zu generieren, die auch das immunsupprimierende Zytokin IL10 sekretieren. Dadurch nehmen diese Gruppe von TH17 Zellen eine regulatorische Funktion ein (siehe Abbildung 3). So gibt es zwei verschiedenen Subklassen von TH17 Zellen, die einen mit der Produktion von regulatorischen Zytokinen IL10 und IL17 und die Immunpathologische Klasse mit der Produktion von IL17 und IL22 (Mc Geachy 2008; Korn 2009).

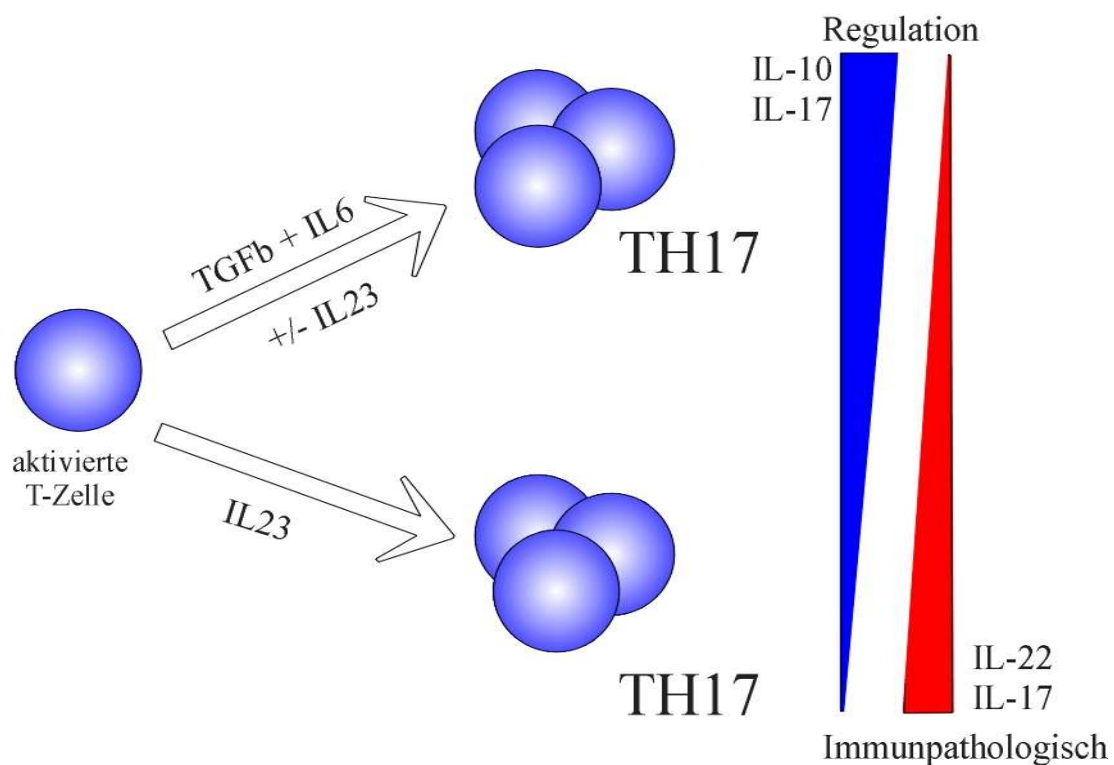


Abbildung 3: Regulation der TH17 Antwort durch die Induktion von IL10 durch IL6 und TGF β in Anlehnung an den Artikel von (Mc Geachy 2008)

1.2.2 Regulatorische T-Zellen (nTreg/TiTreg)

Der Begriff regulatorische T Zellen, kurz Treg, wird dann verwendet, wenn man eine bestimmte Zellart beschreiben will, die regulatorische Funktionen *in vitro* sowie *in vivo* hat.

Diese Zellen kann man wiederum in verschiedene Untergruppen einteilen, abhängig von Oberflächenmarkern, Zytokinprofil und Mechanismus der Suppressoraktion (Roncarolo 2000). Das Konzept der aktiven Suppression wurde schon 1971 durch Gershon et al. (Gershon 1975) beschrieben und kürzlich durch Sakaguchi et al. wiederentdeckt (Sakaguchi 1995). Regulatorische T Zellen üben eine wichtige Rolle in der Prävention und Kontrolle von Autoimmunerkrankungen aus, indem sie die periphere Toleranz aufrechterhalten. Die am besten beschriebenen regulatorischen T-Zellen sind die natürlich (nTregs) vorkommenden $CD4^+CD25^+$ Tregs. Dies ist eine Untergruppe der Treg Zellen, die im Thymus generiert werden und den Oberflächenmarker CD25 (Interleukin 2 Rezeptor α Kette (IL-2R α)) exprimieren. Abhängig von der CD25 Expression umfassen die nTregs 5-10% der peripheren $CD4^+$ T-Zellen und unterdrücken die Immunantwort in einer Antigen unabhängigen Weise. Entfernt man die Tregs durch Thymektomie, so kommt es zu Autoimmunerkrankungen. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box protein 3*) wird ausschließlich von nTregs gebildet wird und ist somit charakteristisch für diese Gruppe. Genetische Defekte im Foxp3-Gen führen dazu, daß keine Tregs mehr gebildet werden und sich nicht entwickeln können. Dies führt somit unweigerlich zu einer systemischen Autoimmunerkrankung, wie in *scurfy* Mäusen und zum IPEX (*X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome*) beim Menschen (Bennett 2001; Brunkow 2001; Wildins 2001; Hori 2003; Khattri 2003). Abgesehen von den Oberflächenmolekülen CTLA-4, GITR und LAG-3 ist nur die Produktion eines bestimmten Zytokins, nämlich des membrangebundenen TGF β typisch. Dieses TGF β ist charakteristisch für natürlich vorkommende Tregs (Huang 2004; Sakaguchi 2004). Neben den natürlich vorkommenden Tregs gibt es eine weitere Untergruppe der Tregs. Diese Zellen werden Tr1 Zellen genannt. Sie exprimieren nicht den Transkriptionsfaktor Foxp3, sondern wesentliche Mengen an IL-10 und TGF β . Sie kommen aber vorwiegend in der intestinalen Mukosa vor, und supprimieren dort die Immunreaktionen gegen verschiedene Antigene.

Eine weitere Gruppe, die zu den T regulatorischen Zellen gehören, ist die sogenannte TH3 Gruppe. Diese Zellen werden aus naiven $CD4^+CD25^-$ Zellen gebildet. Dies erfolgt nach Erkennung eines fremden Antigens via der oralen Route, und führt somit zu einer wichtigen Rolle in der oralen Toleranz. TH3 Zellen exprimieren erhöhte Werte an Foxp3 und TGF β . Diese TH3 Zellen haben jedoch keinen charakteristischen Oberflächenmarker. Desweiteren ist es möglich aus naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen *in vitro* durch polyklonale Aktivierung, sowie durch Zugabe von TGF β , diese zu Foxp3 exprimierenden regulatorische T-Zellen zu convertieren (Fantini 2004), zu sogenannten TiTregs. Somit scheinen Tregs und TGF β eine

wichtige Rolle in der Suppression von autoreaktiven Effektor Zellen und in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zu haben.

1.3 TGF β als Schlüsselmolekül der immunologischen Toleranz

Die Mitglieder der TGF β (*Transforming Growth Factor-beta*) Superfamilie (Massague 1990) werden als Signalmoleküle sezerniert, d.h. sie sind extrazelluläre Liganden, die eine wichtige Rolle in Proliferation, Apoptose, Zellzyklusregulation, Differenzierung, Wachstums- und Entwicklungsprozesse einnehmen. Das TGF β kommt sowohl in Fliegen und Würmern als auch in Mammalia vor (Massague and Chen 2000; Patterson 2000; ten Dijke 2002). Eine veränderte Regulation des TGF β Signalweges führt zu einer Reihe von Erkrankungen beim Menschen, wie Fibrose, Rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Multipler Sklerose sowie zur Karzinogenese (Blobe 2000; Itoh S 2000).

Man unterscheidet drei Isoformen von TGF β : TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3. Sie zeigen inhibitorische wie auch stimulierende Effekte auf die Proliferation und Differenzierung bestimmter Zelllinien (Kingsley 1994). Es handelt sich um strukturell ähnlich, aber funktionell stark unterschiedliche Polypeptide. Sie sind charakterisiert durch sechs Cysteinreste und werden im Menschen durch 42 „*open reading frames*“, 9 in der Fliege und 6 bei Würmern kodiert. Die TGF β Superfamilie enthält zwei Subfamilien: die TGF β /Activin/Nodal- und die BMP (*bone morphogenetic protein*)/GDF (*growth and differentiation factor*)/MIS (*Muellerian inhibiting substance*) Subfamilie. Beide sind definiert durch Sequenzübereinstimmungen und durch die spezifischen Signalwege, die sie aktivieren (siehe Abbildung 4).

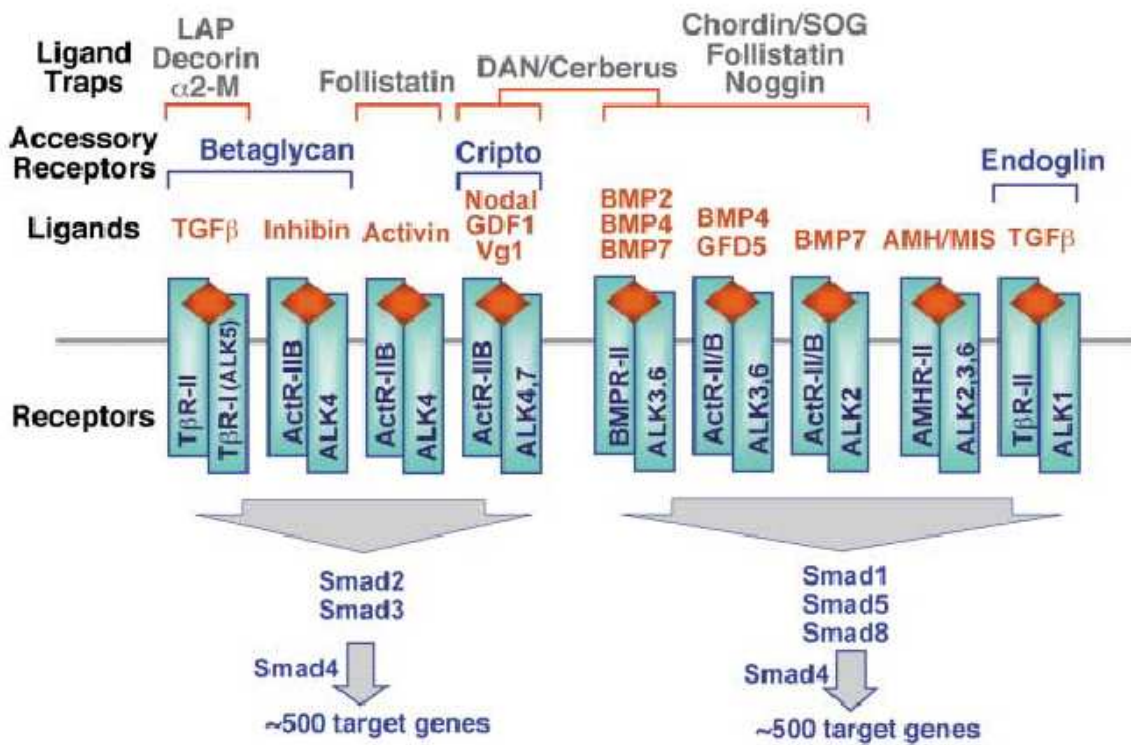


Abbildung4: Schematische Abbildung TGFβ Liganden, Accessorische Rezeptoren, Typ I und Typ II Rezeptoren in Vertebraten (Shi 2003)

Alle Mitglieder der TGFβ-Superfamilie werden als große Vorläuferproteine sezerniert. Eine posttranslationale Prozessierung und Dimerisierung lässt die Proteine zum Protein-Dimer reifen. Die Vorläuferproteine werden an der RXXR-Stelle vor dem ersten Cystein der maturen-Region geschnitten, so dass ein C-terminales Fragment entsteht.

Studien an TGFβ1 zeigten jedoch, dass die Pro-Domäne nicht kovalent an das C-terminale Ende assoziiert bleibt. Die Freisetzung des biologisch aktiven „*mature-Dimers*“, es wird über Disulfidbrücken verbunden, wird dadurch gewährleistet, dass der inaktive Komplex durch das LBP (*latency binding protein*) in die extrazelluläre Matrix freigelassen wird. Dort wird die inaktive Form durch Proteolyse und pH-Erniedrigung in die aktive überführt. Die SH-mature-Domäne besitzt grundsätzlich sieben Cysteine, die wichtig für die Bildung von Homo- und Heterodimere sind, was Studien an TGFβ2 zeigten. Sechs der sieben Cysteine liegen sehr nah beieinander, die damit eine starre Struktur, einen sogenannten Cystein-Knoten bilden (achtgliedriger Ring, durch drei Disulfidbrücken gestützt). Dadurch wird eine hohe Resistenz gegenüber Hitze, denaturierenden Agenzien und pH-Extrema gewährleistet (Massague 1990). Das siebte Cystein dient der Dimerisierung. Allerdings können auch Vertreter ohne Cysteine durch nicht-kovalente Bindung dimerisieren. Die *Leader-Region* dient für die Sekretion, die

variable Pro-Domäne ist für die korrekte Faltung und Sekretion verantwortlich und scheint die Rate und Effizienz der Dimerbildung sowie die Prozessierung zu beeinflussen.

1.3.1 Rezeptoren

Die ligandenbindenden Rezeptoren der TGF β -Familie sind transmembrane Rezeptoren, die eine Serin/Threonin-Aktivität auf ihrer zytosolischen Seite besitzen. Diese werden durch die Bindung der Liganden stimuliert.

Man unterscheidet zwei Rezeptor-Typen: Typ I und Typ II. Die Rezeptoren der Serin/Threonin Kinase-Familie umfaßt 12 Mitglieder im menschlichen Genom – 7 Typ I und 5 Typ II Rezeptoren - alle involviert in der TGF β Signaltransduktion. Es gibt auch Rezeptoren des Typs III, IV und X. Der Rezeptor des Typs III ist ein in der Membran verankertes Proteoglykan, welches eine kurze zytoplasmatische Region und eine große extrazelluläre Domäne besitzt, die alle Isoformen von TGF β binden kann. Das an den Rezeptor gebundene TGF β kann dem Rezeptor des Typs II präsentiert werden, wobei es aber nicht notwendigerweise mit diesem interagieren muß. Die Bindung des TGF β wird durch den Rezeptor Typ III positiv beeinflusst, kann aber auch die Bindung an den Rezeptor-Komplex des Typs I und II verhindern. Beide Typen der Serin/Threonin Kinase Rezeptoren bestehen aus über 500 Aminosäuren, die die N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungs-Domäne bilden, eine Transmembran Region als auch die C-terminale Serin/Threonin Kinase Domäne. Vor Bindung des Liganden liegen sie als Homodimere vor.

Bei der Bindung des Liganden kommt es zur Bildung eines heteromeren Rezeptorkomplexes der Rezeptoren des Typs I und II. Dadurch wird eine korrekte Signalweiterleitung initiiert. Bei der Komplexbildung kommt es zu einer Formierung eines Tetramerkomplexes aus dem Typ II-Rezeptor, einem Homodimer, und aus zwei Typ I-Rezeptoren. Für die Bindung des Liganden an den Rezeptor-Typ I wird der Typ II benötigt. Der Typ I-Rezeptor spielt dann eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung. Der Typ II-Rezeptor kann verschiedene Liganden binden, wobei die Bindungsspezifität des ersten Rezeptor vom Typ II-Rezeptor abhängt. Die verschiedenen Liganden binden mit unterschiedlicher Affinität an den Typ II-Rezeptor, der ebenfalls mit verschiedenen Typ I-Rezeptoren interagieren kann, die dann die Signalgebung des Typ II-Rezeptors ändern können. Durch die zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten der Typ I und Typ II-Rezeptoren wird es den Zellen ermöglicht, verschiedene Signalkaskaden zu initiieren. Nochmals erhöht werden die Möglichkeiten durch Proteine der TGF β Superfamilie, die verschiedene Dimere bilden können, mit der die Zelle dann auf einen bestimmten Faktor reagiert.

Für TGF β 1 sind die Rezeptoren TGF β RII und TGF β RI (ALK5) sowie ALK1 und ALK2 bekannt.

1.3.2 Ligandenbindung an den Rezeptor

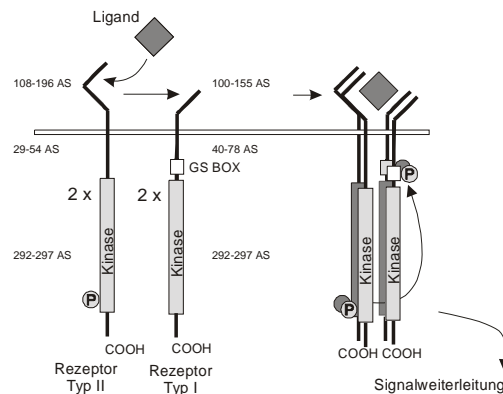


Abbildung 5: Ligand-Rezeptor Interaktion

Die Bindung von TGF β erfolgt zuerst spezifisch an den Typ II-Rezeptor und dann an den Typ I-Rezeptor. Im Gegensatz zu BMP, zeigt TGF β als auch Aktivin eine sehr hohe Affinität zu Typ II-Rezeptoren. Diese interagieren aber nicht allein mit Typ I-Rezeptoren (Massague 1998). Es folgt daraufhin eine Transphosphorylierung des Typ I-Rezeptors durch die Typ II-Kinase an einer spezifischen Region der cytoplasmatischen Domäne, der sogenannten GS-Box, die nur der Rezeptor des Typ I besitzt. Dadurch wird die Kinase des Typ I-Rezeptors aktiviert (Massague 1996), die wiederum Effektormoleküle bzw. Proteine der Signalkaskaden phosphorylieren und damit aktivieren. Im Tetramerkomplex aus zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren werden beide Typ I-Rezeptoren phosphoryliert (siehe Abbildung 5).

1.3.3 Signaltransduktion des TGF- β s/Smad-Signalweg

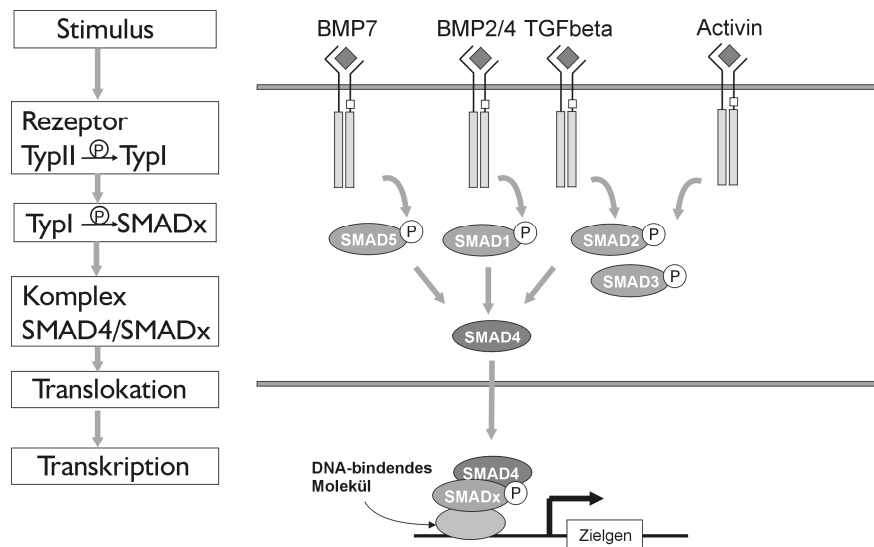


Abbildung 6: Modell des Smad-Signalwegs (ohne inhibitorische Smads) in Anlehnung an die Artikel von Heldin, et al. (1997) und Visser und Themmen (1998)

Die Smad Proteine sind Mitglieder der TGF β -Superfamilie und sind für die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle verantwortlich (siehe Abbildung 6). Der Name Smad kommt ursprünglich aus der Fusion von *Drosophila mothers against dpp* (*Mad*) und *C.elegans Sma*, wo sie zuerst entdeckt und untersucht worden sind. Die Smads können in drei Gruppen eingeteilt werden: erstens die signalwegsspezifischen Smads wie Smad 1, 2, 3, 5 und Smad8 (Itoh S 2000). Zweitens Smads, die innerhalb der Signalwege vorkommen, die sogenannten „common mediator Smads“, wie Smad4 und drittens die inhibitorischen Smads. Diese unterdrücken bei Überexpression den Signalweg von TGF- β -Superfamilienmitgliedern, dazu gehören Smad 6 und Smad7.

Die signalspezifischen Smads 1, 2, 3, 5 und 8 sind strukturell untereinander vergleichbar, wobei Smad 1, 5 und 8 die Effektoren des BMP-Signalweges sind (Itoh S 2000; Derynck 2003) wie BMP2, BMP4 und BMP7. Wohingegen Smad2 und Smad3 an der Activin- und TGF β -induzierten Signalvermittlung beteiligt sind (Derynck 2003). Zusätzlich wirkt Smad2 noch bei der Vg1-induzierten Signalvermittlung mit, Smad3 ist daher eher der Vermittler bei der TGF β -Superfamilienmitglieder-induzierten Signalkaskaden.

Der Aufbau der Smads wird in drei unterschiedliche Domänen eingeteilt, die auch unterschiedliche Funktionen ausüben (Abbildung 7).

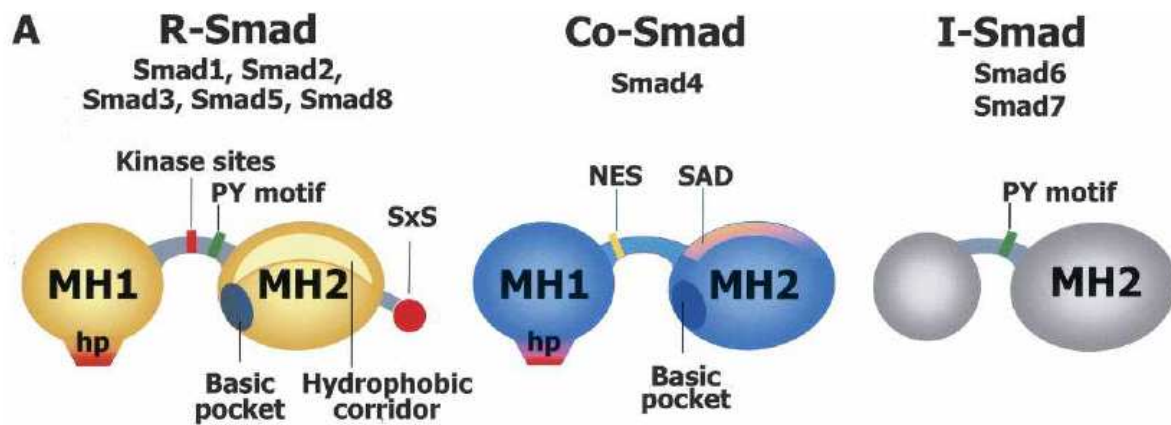


Abbildung 7: Smad-Proteine und ihre strukturellen Elemente (Massague 2006); MH1=Mad homologie 1, MH2=Mad homologie 2, NES=nuclear export signal, SAD=Smad4 activation domain

Die N-terminale Domäne (MH1) weist neben der C-terminalen Domäne (MH2) die größten Aminosäurehomologien der Smad-Proteine untereinander auf. Die Region zwischen den zwei den beiden Regionen wird Linker genannt, und dieser ist dagegen sehr variabel in ihrer Aminosäuresequenz und Länge. Die C-Domäne ist die Effektor-Domäne. Smad 1 und 2 werden durch direkte Phosphorylierung von zwei Serinresten eines SSXS-Motives in dieser Domäne durch die Rezeptorkinase des Typ I aktiviert (Abdollah 1997; Souchelnytskyi 1997); der BMP-Rezeptor Typ I phosphoryliert Smad1 (Kretzschmar, Liu et al. 1997), der Aktivin-Rezeptor Typ IB und TGF β -Rezeptor Typ I Smad2 und 3. Die N-Domäne inhibiert die transkriptionelle und biologische Aktivität der C-Domäne (Hata 1997; Meersseman 1997). Die Linkerregion ist sehr prolinreich und vermittelt u.a. die Spezifität der Interaktion der Smads untereinander, zu Aktivatoren und zu assoziierten Proteinen.

Auch Smad4 ist strukturell mit den signalwegsspezifischen Smads vergleichbar. Es besitzt aber am C-Terminus kein SSXS-Sequenzmotiv, wodurch es nicht durch Phosphorylierung der Rezeptorkinasen aktiviert werden kann. Bei der Signalweiterleitung assoziiert es mit den aktivierten Smads und bildet spezifische Hetero-Oligomere, wodurch dann die Translokation in den Zellkern vollzogen wird und dort die Transkription verschiedener TGF β - bzw. BMP-Target Gene aktiviert werden.

Die Inhibitorischen Smads (I-Smads) 6 und 7 regulieren jeweils den BMP- bzw. den TGF β -Signalweg negativ (Hayashi 1997; Imamura 1997; Nakao 1997b). Und beide haben genauso wenig wie Smad4 ein SSXS-Motiv am C-Terminus, wodurch die Rezeptorkinasen sie nicht aktivieren können. Dagegen liegt der Unterschied zu den übrigen Smads im nicht homologen N-Terminus, hier fehlt die MH1-Domäne. Durch die fehlende Phosphorylierungsstelle am C-

Terminus können die I-Smads, nachdem sie an dem Rezeptor-Typ I gebunden haben, länger verweilen wodurch eine Phosphorylierung der anderen R-Smads unterbunden wird (kompetitive Hemmung) (Hayashi 1997; Imamura 1997; Nakao 1997b).

1.3.4 Die Rolle von TGF- β in der T-Zell Biologie und Immunantwort

Es ist bekannt, daß TGF β einen großen Einfluß auf T Lymphozyten ausübt. So beeinflusst TGF β die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von T-Zellen (siehe Abbildung 9). Das TGF β inhibiert über verschiedene „Pathways“ die Proliferation von T-Zellen indem es zum einen die Expression des T-Zell mitogenen Zytokins IL2, durch Suppression der Transkription mit Hilfe des Smad3, unterdrückt (Li 2006).

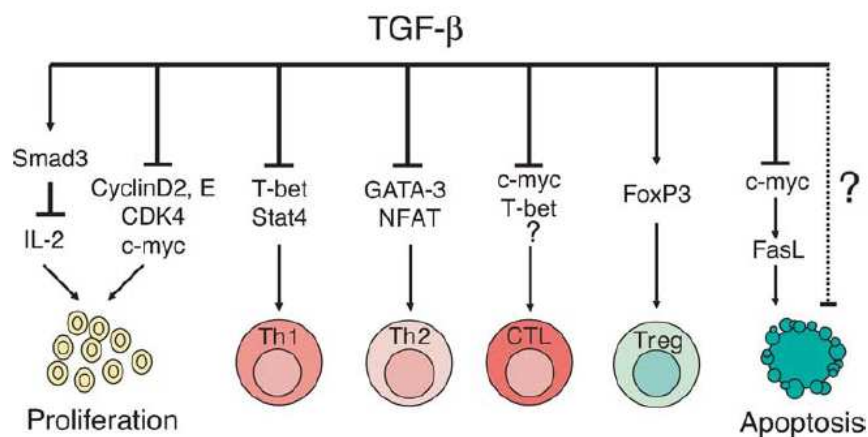


Abbildung 9: Einfluß von TGF β in der T-Zellantwort (Li 2006)

Weiterhin kann TGF β die Proliferation von T-Zellen hemmen, indem es direkt Zellzyklus Regulatoren, wie Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (Cki) p15, p21 oder p27 hochreguliert oder c-myc runterreguliert (Li 2006).

TGF β ist ein wichtiger Regulator der T-Zell Differenzierung, so unterdrückt TGF β die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1 oder Th2 Effektorzellen (Li 2006).

Und auch auf die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen wirkt TGF β hemmend, indem es die Differenzierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) unterdrückt. Dies wird erreicht durch Inhibition der Perforin Expression in aktivierten CD8⁺ T-Zellen (Li 2006).

Wie in Kapitel 1.3 schon erwähnt, spielt TGF β auch eine wichtige Rolle in der peripheren Toleranz, indem es die Differenzierung von naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu CD4⁺CD25⁺ Foxp3 exprimierenden T-Zellen (TiTregs) konvergiert und somit diese eine regulatorische Funktion gegenüber anderen Effektor T-Zellen haben (Fantini, Becker et al. 2004; Fantini, Becker et al. 2006).

Es gibt zwei verschiedene prädominante apoptotische „*Pathways*“: der Intrinsische, reguliert durch pro- und antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder und der „*death receptor pathway*“, einschließlich CD95 (APO-1/Fas) reguliert die Apoptose durch direkte Induktion der Caspase-Kaskade Aktivierung. TGF β fördert das Überleben von T-Zellen, indem es die Apoptose inhibiert und die Zellexpansion unterstützt (Li 2006).

1.3.5 Die Rolle von TGF β bei Krebs

TGF β ist ein multifunktionales Zytokin, was die Organentwicklung sowie die Entwicklung von epithelialen und neuronalen Geweben aber auch besonders das Immunsystem reguliert (Kaminska 2005). Gerade seine regulatorische Rolle als Inhibitor der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Induktor von regulatorischen T-Zellen sowie seine Rolle im Zellzyklus führt dazu, daß das TGF β als Tumorsuppressor angesehen wird (Iyer 2005). Es gibt aber auch Hinweise, daß TGF β vom anfänglichen Tumorsuppressor zum Tumorpromotor „*switchen*“ kann und die Tumorentwicklung, Invasion und die Metastasierung von Tumoren vorantreibt (Iyer 2005). Der Grund liegt dabei in einer Dysregulation der TGF β Signalweiterleitung. Sie führt dann meistens zur Pathogenese von verschiedenen Krankheiten wie Fibrosen und Krebs. So ist bekannt, daß vor allem Mutationen im TGF β RII zu Kolorektalen-, Eierstock- sowie Kopf- und Nacken-Tumoren führen. Während Mutationen *downstream* des Rezeptors im Signalweg zum Verlust der suppressiven Funktion und damit zur defekten Zytostase führt. Folgen sind Brustkrebs und Gliome (Massague 2008). TGF β kommt vor allem in der Mikroumgebung von Tumoren vor. Anfänglich dient es der Vorbeugung der prämaligen Progression, doch können die maligne Zellen das TGF β später für ihren eigenen Vorteil nutzen. So sind die Stroma Zellen des Tumors, aber besonders auch tumorinfiltrierende Zellen, eine Quelle für die TGF β Produktion im Tumor (Xie W. 2002). Tumorinfiltrierende Zellen sind vor allem Leukozyten, Makrophagen sowie endotheliale, mesenchymale und myeloide Vorläuferzellen. Das Vorkommen dieser tumorinfiltrierender Zellen überschneidet sich mit der gesteigerten Sekretion des TGF β s, so daß diese Zellen als Quelle des Zytokins angesehen werden (Wahl 2006; Yang 2008). Eine positive Korrelation zwischen Entzündung und Tumorentwicklung ist gut erkennbar. So ist das TGF β in einem dysreguliertem Immunsystem ein wichtiger Rekrutierungsfaktor von Entzündungszellen. Es kommt zur Differenzierung der T-Lymphozyten zu TH1, TH2 und besonders TH17 Zellen, nach der Präsentation der Tumorantigene durch dendritische Zellen und Makrophagen. Als Beispiel produzieren die TH17 Zellen neben dem IL17 auch die proinflammatorischen Zytokine IL21, IL22 und TNF α , die zur weiteren Entzündung und damit zur

Tumorfortschreitung führen (Veldhoen M 2006). Zusätzlich werden noch andere proinflammatorischen Zytokine, Chemokine, Kolonie stimulierenden Faktoren und proangiogene Faktoren von Zellen produziert, die das Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung optimieren (Wahl 2006). Dahingegen resultieren die immunsupprimierenden Effekte von TGF β darauf, daß aktivierte T-Lymphozyten durch eine stärkere TGF β -Rezeptor Expression anfällig gemacht werden für das sekretierte TGF β der Tumorzellen sowie für das membrangebundene TGF β der regulatorischen T-Zellen (TiTregs). Es wirkt damit supprimierend auf die Zytokinproduktion der Effektorzellen ein. Zusätzlich werden mehr tumorinduzierte TiTregs in den Tumor rekrutiert, die dort ebenfalls die Inflammation limitieren, indem die Zytokinproduktion (z.B. IL6) supprimiert wird (Becker, Fantini et al. 2005; Becker, Fantini et al. 2006).

1.3.6 Regulation des TGF β -Signalweges: Die Ubiquitin Ligase Smurf und der proteasomale Proteinabbau

Die Lebensdauer verschiedener Proteine einer Zelle ist unterschiedlich. So müssen Proteine mit regulatorischer Funktion beispielsweise ausgeschaltet werden, sobald ihr Zweck erfüllt ist. Sie werden teilweise in ihre Bestandteile abgebaut, die teilweise weiterverwertet werden. Aber auch fehlerhaft hergestellte oder geschädigte Proteine werden abgebaut und das Material zur Neusynthese verwendet. Als wichtige Komponente dieser Abbausysteme erwies sich das Ubiquitin, ein Protein mit einem Molekulargewicht von nur 8600 Dalten. Es wurde erst 1974 von der Gruppe um G.Goldstein entdeckt, die die Differenzierung von Lymphozyten untersucht haben. Sie fanden heraus, daß das Protein auch in anderen Zellen vorkam und zwar bei ganz unterschiedlichen Organismen, und somit ubiquitär ist, woraus sich der Name des Proteins widerschlägt: Ubiquitin (allgegenwärtig). Ein im fast gesamten Organismenbereich verbreitetes Protein muß wichtige Aufgaben erfüllen, zumal es sich im Laufe der Evolution kaum verändert hat; so unterscheidet sich das Ubiquitin von Mensch und von der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in drei der 76 Aminosäuren ihrer Proteinkette.

Proteine können somit nicht nur über das System der Proteolyse in ihrer Anzahl reguliert, sondern auch auf ihre Qualität post translational kontrolliert werden. In den letzten Jahrzehnten ist eine Menge an Informationen über die Charakterisierung und Regulation der Ubiquitin-Proteasom vermittelten Proteolyse erlangt worden. So ist bekannt, daß dieser Signalweg der bekannteste nicht lysosomale Prozess ist, der für die Reduzierung der meisten kurz- und langlebigen Proteine in Mammaliazellen essentiell ist. Weiterhin kontrolliert dieser Signalweg den Zellzyklus, die Onkogenese, die Transkription, die Entwicklung und

Differenzierung, Signaltransduktion, Rezeptorregulation und Antigenreifung (Bonifacio 1998).

Die Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung von Proteinen erfolgt in zwei hauptsächlichen Schritten, (1) der kovalenten Bindung einer Polyubiquitinkette an das Zielprotein und (2) der Erkennung des Signals, die dann zur Degradation des Proteins durch das 26S Proteasom führt. Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein mehrstufiger Prozess (Hershko 1998; Ciechanover 2000). So erfolgt im ersten Schritt die Anlagerung von Ubiquitin durch eine Thioesterbindung an den C-terminalen Glycinrest des Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1). Dieser Prozess benötigt für die Anlagerung Energie in Form von ATP (siehe Abbildung 9).

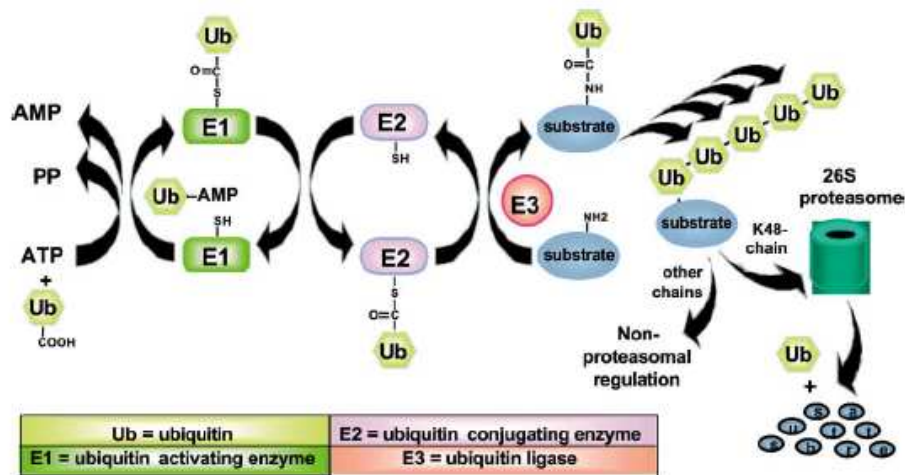


Abbildung 9: Die Ubiquitinierung von Proteinen

E1, das Ubiquitin aktivierende Enzym, transferiert dann das Ubiquitin zum zweiten Enzym, das Ubiquitin konjugierende Enzym (E2). Auch hier findet eine Thiolester-Verbindung zwischen dem aktivem Cystein und dem Ubiquitin statt. Schließlich erfolgt dann die Übergabe des Ubiquitins von dem Ubiquitin konjugierendem Enzym auf das Substrat an eine Aminogruppe eines Lysinrestes des Proteins. Dies wird durch ein drittes Enzym (E3), der Ubiquitin Ligase katalysiert (Robinson 2004). Die Ubiquitinierung kann an verschiedene Lysinrest-Positionen des Zielproteins erfolgen. So geschieht bei einer Polyubiquitinierung an dem Lysinrest der Position 48 (K48) die Degradation des Zielproteins über das 26S Proteasom. Aber auch Polyubiquitinierungen der Position 63 (K63) eines Proteins ist möglich, welches dann zur Aktivierung von Zytokinsignalkaskaden führt. Desweiteren sind aber auch Mono- und Multi-Monoubiquitinierungen von Proteinen möglich. So kann die

Monoubiquitinierung von Proteinen, z.B. am Lysin 11 (K11), das Signal für Endozytose und Kargo bzw. „*trafficking*“ von Membranrezeptoren in einer Zelle sein (Robinson 2004).

Vom E1 Enzym ist nur eine Form in Säugetierzellen bekannt, von dem Ubiquitin konjugierenden Enzym sind bereits 20-30 Formen, von den Ubiquitin Ligasen sind jedoch unzählige verschiedene Enzyme bekannt, die die Regulation der Ubiquitinierung regeln.

Es gibt drei verschiedene Klassen, in die man die Ubiquitin-Ligasen (E3) aufgrund ihrer Struktur teilen kann: (1) HECT (*homologous to E6-AP C-terminus*), (2) RING (*really interesting new gene*) und (3) U-box Domäne-typen. Die Ubiquitin-Ligase Smurf, die den TGF β /BMP Signalweg reguliert, zählt zur ersten Gruppe, der HECT Form.

Ubiquitin E3 Ligase: Smurf2

Die Ubiquitin-Ligase Smurf zählt zur Gruppe der HECT Ligasen, d.h. charakteristisch für die Ligase ist ihre 350 Aminosäuren umspannende katalytische Domäne. Diese Form der Ligase interagiert direkt mit dem E2-Enzym und nimmt das Ubiquitin kovalent auf, um es dann durch direkte Interaktion mit dem Zielprotein auf dieses, ebenfalls kovalent, zu übertragen. Smurf ist eine Kurzform und steht für *Smad ubiquitin regulating factor*. Es gibt zwei verschiedene Formen von Smurf: Smurf1 und Smurf2, welche sich nur in der Anzahl ihrer Tryptophan (WW)-Domänen unterscheiden. Es gibt drei verschiedene Domänen die Smurf1 und 2 besitzen: zum einen die N-terminale C2 (*Protein Kinase C conserved region2*)-Domäne (siehe Abbildung 10). Diese Domäne ist hoch konserviert und kommt in zahlreichen anderen Proteinen vor wie z.B. Perforin, den Ubiquitin-Ligasen Nedd4 und Itch, um nur drei zu nennen. Aber seine funktionelle Bedeutung wurde in den Proteinen der Phospholipase C charakterisiert. Für die Ubiquitin Ligase Smurf2 fand man heraus, daß die C2-Domäne in einer Calcium unabhängigen Weise an Phospholipiden, in der Zellmembran bindet (Izzi 2004; Wiesner 2007). In den WW-Domänen unterscheidet sich dann Smurf1 von Smurf2. Während Smurf1 nur 2 WW-Domänen besitzt, trägt Smurf2 3 WW-Domänen. Diese Domäne interagiert mit dem PY-Motiv von Ziel- und Adaptorproteinen, wie dem Smad7. Und zum Schluß die katalytische C-terminale HECT-Domäne (Kavsak 2000). Smurf2 umfaßt 748 Aminosäuren und ist zu 83% identisch zu Smurf1 (Lin 2000). Weiterhin ist bekannt, daß Smurf1 die R-Smad1, 5 und 8 und den BMP Rezeptor abbaut (Datto 2005), Smurf2 die R-Smad Moleküle 2 und 3 sowie Smad4, das inhibitorische Smad7 und SnoN degradiert (Massague 1999; Lin 2000; Bonni, Wang et al. 2001; Zhang, Chang et al. 2001; Izzi 2004; Moren, Imamura et al. 2005). So reguliert Smurf1 vermehrt den BMP-Signalweg und Smurf2 den TGF β -Signalweg. Für Smurf2 ist weiterhin bekannt, daß es zusammen mit Smad7 aus

dem Nukleus transportiert wird und dann im Zytoplasma mit dem E2-Enzym den TGF β RII rekrutiert, ubiquitiniert und damit zur Degradation markiert (Kavsak 2000; Izzi 2004; Ogunjimi 2005). Somit erfolgt ein „*fine-tuning*“ des TGF β Signalweges durch die Ubiquitin-Ligase Smurf2.

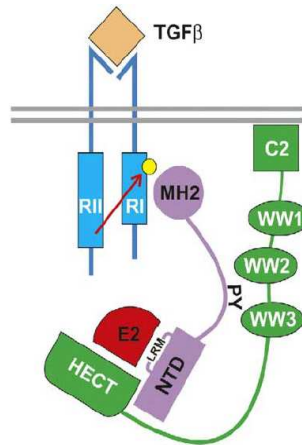


Abbildung 10: TGF β Rezeptor Degradation durch Smurf2 und Smad7 (Ogunjimi 2005); RII=TGF β RezeptorII, RI= TGF β Rezeptor I, HECT= homologous to E6-AP C-terminus, WW=Tryptphan reiche Domäne, C2=Protein kinase C conserved region 2, E2=Ubiquitin konjugiertes Enzym, NTD und MH2=Smad7

Der Mechanismus der Smurf2 Genexpression war zunächst noch unklar, so wurde in einer Promotorstudie gezeigt, daß Smurf2 durch TGF β in einem Smad unabhängigen Prozess aktiviert werden kann (Ohashi, Yamamoto et al. 2005).

Mit Veränderungen im TGF β Signalweg werden fortschreitend mehr Krebserkrankungen beim Menschen beobachtet. So beschreibt man Krebserkrankungen wie in Pankreas, Lunge, Brust und gastrointestinalem Trakt die mit genetischen Veränderungen der verschiedenen TGF β Signalmolekülen assoziiert sind, wie z.B. den Rezeptoren, Smad2, Smad4 und Smad7. Smurf2 ist ein wichtiger Regulator des TGF β Signalweges und eine dysregulierte Expression oder Funktion der E3 Ubiquitin Ligase führt zur Tumorentwicklung und -fortschreitung (Izzi 2004). So konnte vor einiger Zeit eine Korrelation festgestellt werden zwischen einer hohen Expression von Smurf2 und einer Tumorentwicklung mit einer schlechten Überlebensprognose bei Patienten mit Ösophaguskrebs (Fukuchi 2002).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

TGF β spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen wie der Immunregulation und der Tumorentwicklung. Eine dysregulierte Expression und Funktion von TGF β wird mit der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die Ubiquitin-Ligase Smurf2

ist dabei ein wichtiger negativ Regulator des TGF β Signalweges, indem es Smad-Moleküle und den TGF β -Rezeptor zur Degradation im 26S Proteasom ubiquitiniert. Somit spielt Smurf2 eine bedeutende Rolle bei der Modulation der TGF β Sensitivität in Zellen.

Daher sollte in dieser Arbeit vor allem die Funktion und Rolle der Ubiquitin Ligase Smurf2 besonders in T-Zellen in Verbindung zu Autoimmunerkrankungen, wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und der Colitis Ulcerosa, untersucht werden. Dabei sollte der Einfluß von Smurf2 insbesondere in T-Zellen näher charakterisiert werden. Unter anderem sollte auch die Expression von Smurf2 in verschiedenen Geweben und Lymphozyten- Subpopulationen ermittelt werden, sowie seine Induzierbarkeit durch verschiedene Zytokine und anergisierenden Substanzen. Um dann die funktionelle Relevanz der Ubiquitin-Ligase Smurf2 in verschiedenen Mausmodellen von Autoimmunerkrankungen zu untersuchen, sollten induzierbare T-Zell spezifische Smurf2 transgene Mäuse sowie konditionale Smurf2 Knockout Mäuse generiert werden. Zu diesem Zweck sollte das Smurf2 und die Knockout-Konstrukt kloniert werden. Das besondere Interesse lag in der Charakterisierung der T-Zell Entwicklung sowie der Untersuchung phänotypischer und organpathologischer Veränderungen der Tiere. Schließlich sollte untersucht werden, ob eine zielgerichtete Veränderung der Expression von regulatorischen Faktoren, wie dem Smurf2, das regulatorische Potential von TGF β *in vitro* und *in vivo* beeinflussen kann und welche immunologische Auswirkung es auf T-Zellentwicklung und Differenzierung sowie Krankheitsverläufen hat. Schließlich soll anhand der erhobenen Daten die biologische Rolle von Smurf2 bei Autoimmun- und Tumorerkrankungen entworfen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.1.1 DNA-Restriktion

Bei DNA-Verdauen wurden in der Regel Restriktionspuffer mit 10-20mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 10mM DTT mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen verwendet. Die genaue Zusammensetzung richtete sich nach dem eingesetzten Enzym.

Oft wurden bei Restriktionsverdau zwei verschiedene Enzyme mit unterschiedlichen Erkennungssequenzen eingesetzt, die den Vektor linearisieren, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Ligation des Inserts konnte somit gerichtet erfolgen, wenn das Insert ebenfalls mit demselben Enzym im Doppelverdau vorbehandelt wurde.

Ein Standardrestriktionsverdau erfolgte in einem Endvolumen von 20µl. Es wurden maximal 10µg DNA, 2µl 10x Restriktionspuffer, 1µl BSA (2mg/ml) und 5-10 U Enzym eingesetzt. Mit Wasser wurde auf das Endvolumen aufgefüllt. Je nach Temperaturoptimum des Enzyms wurde der Verdau 1-4 Stunden im Heizblock oder Wasserbad, oder über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die meisten Enzyme arbeiten optimal bei einer Temperatur von 37°C.

Um die Restriktionsendonukleasen zu deaktivieren bzw. aus dem Ansatz zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt. Anschließend wurde die DNA gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

50x TAE-Puffer:	242g Tris-Base, 57,1ml Essigsäure, 100ml 0,5M EDTA, pH 8,0
-----------------	--

Die Agarose Neo ultra (Roth) wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, geschmolzen und in eine Gelform gegossen, wenn die Lösung handwarm bzw. 50°C erreicht hatte. Bevor die geschmolzene Agarose in die Gelform gegossen wurde, wurde das Ethidiumbromid (1:20.000) hinzugegeben. Dieses interkaliert in die DNA und kann somit unter UV-Licht Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde mit Aussparungen, den sogenannten Geltaschen, gegossen, in denen dann die DNA-Lösungen nach Erkalten des Gels gegeben wurde. Durch das Erkalten bildet sich eine homogene Gelmatrix aus, die je nach Bedarf fein- oder grobporig ist. Je nach Trennbedarf wurden 0,7-2%ige Agarosegele (w/v) verwendet. Die

DNA wurde mit Probenpuffer (Orange Loading Dye: 10mM TrisHCl pH7,6; 60mM EDTA, 0,15% orange G, 0,03% Xylene Cyanol FF, 60% Glycerol) versehen und in die Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurde noch ein Längenmarker aufgetragen, um den DNA-Banden eine bestimmte Größe zuordnen zu können. Die Gelelektrophorese wurde in der Gelkammer mit 1x TAE-Puffer bei 100-200V durchgeführt (ideal 5V pro cm). Aufgrund der negativen Ladung der DNA über ihre Phosphatgruppen, wandert sie im elektrischen Feld von der Katode zur Anode und wird aufgrund ihrer Größe und Konformation in der Gelmatrix aufgetrennt. Unter UV-Licht bei 360nm können DNA-Banden ab 20ng im Gel identifiziert werden.

2.1.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen durch MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)

Mit Hilfe von chaotropen Salzen können Nukleinsäuren an Silica-Oberflächen binden. Dadurch ist es möglich, die gewünschte DNA von noch im Gel vorhandenen Enzymen, nicht gebundene Primer, freie Nukleotide und Proteine zu reinigen. Die aufzureinigende DNA-Größe sollte zwischen 70bp bis 4kb betragen und die Ladekapazität der MinElute-Säule beträgt 5µg. Mit Elutionspuffer ist es dann möglich, die DNA mit geringer Salzkonzentration und unterschiedlichem pH-Wert von der Säule zu eluieren.

Bindungspuffer QB:	3M Guanidin-Thiocyanat; (0,1% (w/v) Isopropanol); 10mM Tris-HCl pH 6,6
Waschpuffer PE:	10mM Tris-HCl; 20mM NaCl; 80% (v/v) Ethanol pH 7,5
Elutionspuffer EB:	10mM Tris-HCl pH 8,5 oder H ₂ O

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und dann in ein Eppendorfgefäß ausgewogen. Pro 100mg Agarosegel wurden dann 300µl Bindungspuffer hinzugegeben und bei 50°C geschmolzen. Alle 2-3 Minuten wurde das Eppendorfgefäß gevortext, bis nach ungefähr 10 Minuten (min) das Gel mit der DNA geschmolzen vorlag. Nach dem Schmelzen der Agarose wurde dem Bindungspuffer 1 Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt. Die Lösung wurde dann auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule erneut mit 500µl Bindungspuffer ohne Isopropanol zentrifugiert. Es

wurde dann die gebundene DNA einmal mit 750µl Waschpuffer mit hohen Salzkonzentrationen gewaschen, um somit freie Nukleotide und Enzyme zu entfernen. Nach dem Waschen wurde das Auffanggefäß gewechselt und mit niedrigen Salzkonzentrationen und höherem pH-Wert die DNA von der Säule eluiert. Danach erhielt man 10µl des gewünschten Eluats.

2.1.4 Reinigung von doppelsträngiger DNA aus Enzymatischen Reaktionen mit dem MinElute Cleanup (Qiagen) Kit Protocol

Doppelsträngige DNA kann ebenfalls mit chaotropen Salzen ohne vorhergehende Gelelektrophorese von Enzymen gereinigt werden. Dies geschieht meistens nach enzymatischen Reaktionen zum Anhängen von Nukleotiden an ein Fragment zur weiteren Klonierung in einen Vektor. Oder aber nach enzymatischen Dephosphorylierung von Fragmenten, die für eine weitere Klonierung gedacht sind.

Zur enzymatischen Reaktion wurden 300µl QB-Puffer hinzugegeben. Es erfolgte die gleiche Prozedur wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben: Der Bindungspuffer bereitet die DNA darauf vor an der Silicamatrix der Säule zu binden. Nach der Bindung der DNA an die Säule wurde mit 750µl PE-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Eluiert wurde mit 10µl EB-Puffer oder Wasser. Nach Einwirken des Puffers für eine Minute wurde mit maximaler Geschwindigkeit die DNA von der Säule in ein sauberes Eppendorfgefäß eluiert.

2.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit

Mit Hilfe des pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expressions Kits (Invitrogen) ist es möglich, vorher aus den Gelen isolierte DNA-Fragmente in den vorliegenden Expressionsvektor zu klonieren. Dazu wurden zu 8µl des mit der Proof Reading Polymerase (Pfu) amplifizierte PCR-Fragment 1µl ATP (100mM), 2µl 10xPuffer, 1µl Taq-Polymerase und 8µl Wasser gegeben. Der Mix wurde dann für 10 bis 15 Minuten bei 72°C in einem Heizblock inkubiert. Nachfolgend sollte eine Aufreinigung des Enzyms stattfinden (siehe Kapitel 2.1.4). PCR-Produkte, die mit der Herkulase (Stratagene) hergestellt wurden, können sofort nach der Aufreinigung über das Gel in den Vektor ligiert werden, da das Enzym an das PCR-Produkt Adeninreste anhängt und somit die Thymidin-Adenin Klonierung direkt funktioniert.

Die Klonierung des Fragments mit dem Vektor erfolgte in einem Volumen von max. 6µl die dann für die chemische Transformation (2.2.3) in die One Shot TOP 10 Bakterien (Invitrogen) verwendet wurden. 4µl des PCR-Produktes wurden zu 1µl Salzlösung (1,2M NaCl; 0,06M MgCl₂) und 1µl pcDNA 3.1/V5-His TOPO-Vektor (10ng/µl DNA in: 50% Glycerol, 50mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA, 2mM DTT, 0,1% Triton X-100, 100µg/ml BSA, 30µM Phenolrot) gegeben und bei Raumtemperatur 5 bis 30 Minuten inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Es erfolgte dann die Transformation in Bakterien. Liegt das PCR-Fragment kloniert in dem TOPO-Vektor vor, so muß seine Orientierung getestet werden. Dies geschah über Sequenzierung (2.1.6) und/oder mit einem Restriktionsverdau (2.1.1).

2.1.6 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmidkonstrukten wurden der Firma MWG-Operon (www.MWG-Biotech.com) in Martinsried, Deutschland eingereicht.

2.1.7 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen und Geweben

RNA Isolierungen von Geweben mit geringen Mengen an RNA wurden mit dem RNeasy Micro Kit von Qiagen entsprechend des Protokolls durchgeführt. Mit diesem Kit konnte RNA von mindestens 2×10^6 ausgesäten T-Zellen und 1×10^6 ausgesäten Dendritischen Zellen isoliert werden. Dabei wurden die Zellen direkt oder nach Stimulation in 350µl RLT Puffer mit β-Mercaptoethanol (1:100 in RLT verdünnt) gelöst und lysiert. Nach Zugabe von 1 Volumen (350µl) 70% RNase freiem Ethanol ist die RNA bereit für die Bindung auf der Microsäule. Die Säule wurde dann bei 10.000 rpm für 15 Sekunden (sek) zentrifugiert. Danach wurden 350µl eines Waschpuffers (RW1) auf die Säule gegeben und wieder für 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Optional kann nach diesem Schritt ein genomischer DNA Verdau eingefügt werden. Dabei werden 80µl eines DNaseI-Puffer Gemisches auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 500µl des mit Ethanol versetzten RPE Puffers. Die Säule wurde dann wieder für 15 sek Bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchflusses wurden 500µl 80%iger RNase freies Ethanol auf die Säule gegeben und 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es folgte, nach Verwerfens des Durchflusses, das Trocknen der Säule durch 5 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Das Eluieren der RNA erfolgte dann durch Zugabe von 20µl RNase freiem Wasser auf die Membran der Säule, die dann 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Es erfolgte dann die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA durch Photometrische Messung am NanoDrop Gerät.

Gewebe, die größere Mengen an RNA enthalten, wie z.B. Gewebestücke aus Organen, wurden mit dem Trizol Reagenz von Qiagen behandelt. Dabei wurden 50-100mg Gewebe mit 1ml Trizol Reagenz versetzt und mit Eisenkugeln im Gewebelysierer zerkleinert. Die Proben wurden dann 5 min bei RT stehen gelassen damit die Nukleotidkomplexe dissoziieren können. Je eingesetztem ml wurden dann 0,2ml Chloroform hinzugegeben und die Proben 15 sek kräftig geschüttelt, bevor sie dann erneut für 10 min bei RT stehen gelassen wurden. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12.000g, die dann zur Trennung der Probe in drei Phasen führte: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wäßrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der oberen wäßrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase befinden.

Die wäßrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und mit 0,5ml Isopropanol pro eingesetztem ml versetzt und die RNA präzipitiert. Dabei wurden die Proben für 15 min bei RT gelagert, bevor sie im Anschluß bei 12.000g für 10 min und 4°C zentrifugiert wurden. Das RNA-Präzipitat ist von gelartiger Konsistenz und befindet sich dann im Konus des Röhrchens. Anschließend wurde die RNA mit 70% igem RNase freiem Ethanol gewaschen, getrocknet und in RNase freiem Wasser aufgenommen. Es erfolgte eine Photometrische Konzentrationsbestimmung am NanoDrop Gerät.

2.1.8 cDNA-Synthese

Nach Isolierung der RNA erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA mittels der reversen Transkriptase von Stratagene. Hierbei wurden eine bestimmte Menge an RNA eingesetzt, meist 500ng, und die RNA mit 1µl random Hexameren und oligo dT Primern sowie 1µl dNTP's (je10mM) versetzt und mit RNase freiem Wasser auf 12µl aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 65°C, wodurch sich die Primer an die RNA anlagerten. Anschließend erfolgte die Zugabe von 8µl eines Mastermixes der 2µl des 10x Puffer der reversen Transkriptase, 4µl RNase freiem Wasser, 1µl RNase Inhibitor und 1µl reverse Transkriptase enthielt. Der 20µl Ansatz wurde dann 1h bei 42°C inkubiert, bei der die reverse Transkriptase ihr Optimum hat und aktiv ist. Danach erfolgte noch die Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Denaturierung bei 94°C für 5 min. Die cDNA-Matrix konnte dann in der PCR mit genspezifischen Primern analysiert werden.

2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode mit der man DNA exponentiell amplifizieren kann. Die PCR-Reaktionen wurden alle in einem Gerät der Firma Eppendorf (Mastercycler 5330) durchgeführt. Bei der Konstruktion der Primer-Oligonukleotide aus einer bekannten DNA-Sequenz wurde berücksichtigt, daß der GC-Gehalt der Primer bei 40-65% liegt, daß die Basenfolge keine Sekundärstrukturen durch Palindrome ausbildet und daß die Primer nicht zueinander komplementär sind. Für die folgende Berechnung des T_M -Wertes wurde folgende Formel verwendet:

$$T_M[^\circ\text{C}] = 81,5 + 16,6(\log[M] + 0,41(\%G/C)) - 600/N$$

[M]: Kationen [M^+] Konzentrationen im Reaktionsansatz (0,05M im verwendeten 1xPCR- Puffer)

N: Anzahl der Nukleotide des verwendeten Oligonukleotids

%G/C: Guanosin plus Cytosin-Gehalt des Oligonukleotids in Prozent

Der PCR-Ansatz wurde im Allgemeinen wie folgt angesetzt:

x μl DNA (genomisch oder cDNA)

7,5 μl RedTaqPolymerase (Sigma)

2 μl for Primer (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)

2 μl rev Primer (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)

ad. 25 μl mit aqua dest.

Das PCR-Gerät wurde nach folgendem Schema programmiert:

95°C	2 min		Initiale Denaturierung
95°C	45 sek		
$T_M[^\circ\text{C}]$	45 sek	18-35x	Exponentielle Amplifikation
72°C	1-2 min (abhängig vom Transskript)		
72°C	10 min		Terminale Elongation

Die Analyse der PCR erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese

Primer- Bezeichnung	Sequenz	T _M
Fwd Smurf2	CGCTGGGGACATGTCTAACC	55°C
Rev Smurf2	CCATCATTCACAGCAAAGC	
CD2 upstream	CCCAGCTTTCCCTGAAAGTG	
Smurf2 543R	GGCGTTCCCCTGTGTAGTT	
Perforin Fwd	GTCAGAATGCAAGCAGAAGC	53°C
Perforin Rev	GTACCAGGCGAAAAGTGTAC	
IFN γ Fwd	CACACTGCATCTTGGCTTTG	53°C
IFN γ Rev	GACTCCTTTTCCGCTTCCAG	
GzmB Fwd	TCCTGCTACTGCTGACCTTG	54°C
GzmB Rev	ACTATGCCTGCAGCCACTTT	
β Aktin Fwd	ATATCGCTGCGCTGGTCGTC	57°C
β Aktin Rev	CCACGCTCGGTCAGGACTTT	
Smurf2 Rev2	TTGAGCGAGCAGGACTCTTG	55°C
Smurf2 Rev3	TGCTGATTCCACTTTGGATC	51°C
Smad7 Fwd	CGCATGTTTCAGGACCAAACG	55°C
Smad7 Rev	CCGACTACCGGCTGTTGAAG	
CD2 E1/E2	TTTCTTCCAAGTGCAGTCTCCAAAG	56°C
RTmmSmurf2+E2Fwd	GCCTGACAGTACTCTGTG	56°C
RTmmSmurf2+E2Rev	CCATCAACTACCACCTTAGC	
RTmmSmurf2-E2Fwd	CCTGACAGGTCTTCCTGAT	62°C
RTmmSmurf2-E2Rev	CCATACGCTGATCGTAACTG	
RT HsSmurf2+E2Fwd	GCCTGACAGTACTCTGTG	56°C
RT HsSmurf2+E2Rev	CCATCAACCACCACCTTAGC	
RT HsSmurf2-E2Fwd	CCTGACAGGACTTCCTGAT	62°C
RT HsSmurf2-E2Rev	TCCATACACTGATCGTAACTG	

2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Klonierungen von DNA Fragmenten aus Subklonierungsvektoren in verschiedene Endvektoren, z.B. pEGFP, müssen die DNA Fragmente aus den Subklonierungsvektoren herausgeschnitten werden und in den mit den selben Restriktionsenzymen geschnittenen Endvektor ligiert werden. Die Ligation erfolgte durch die T4-Ligase (NEB) bei 16°C über Nacht. Es wurde ein Ansatz von 20 μ l angesetzt, in den man 2 μ l des 10x Puffer, 1 μ l der T4-

Ligase und die dreifache Menge des Inserts zum eingesetztem Vektor gab. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 20µl auffüllt. Bei einer gerichteten Ligation erfolgt keine Dephosphorylierung des Vektors. Wurde jedoch der Vektor nur mit einem Enzym geschnitten, so mußte eine Dephosphorylierung des Vektors erfolgen, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Dabei wurden 1µg des Vektors bei einem 5'-Überhang 15 min bei 37°C und 60min bei 3'-Überhängen mit 5U Antarktischer Phosphatase behandelt. Danach wurde das Enzym für 5 min bei 65°C inaktiviert. Anschließend erfolgte die Ligation.

2.1.11 Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration

Die Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop Gerätes. Es wurden maximal 2µl des Nukleotidansatzes eingesetzt.

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Bakterienstämme

DH5α (NewEnglandBiolabs)

OneShot (Invitrogene)

SoloPack PCR Cloning Competent Cells (Stratagene)

2.2.2 Kulturmedien und Lösungen

LB-Medium	LB-Agar	SOC-Medium
10g Bacto Trypton	1000ml LB-Medium	2% [w/v] Bacto Trypton
5g Hefeextrakt	15g Bacto Agar	0,5% [w/v] Hefe-Extrakt
5g NaCl	TE-Puffer pH 8,0	10mM NaCl
ad 1000ml Aqua dest.	10mM Tris-HCl	2,5mM KCl
2% X-Gal	1mM EDTA pH8,0	10mM MgCl ₂
in DMSO		10mM MgSO ₄
		20mM Glukose

2.2.3 Transformation chemisch kompetenter E.coli-Zellen

1-5µl der Ligationsreaktion wurden zu kompetenten Zellen gegeben und 25 min auf Eis inkubiert, um die Anlagerung der DNA auf der Bakterienoberfläche zu erreichen. Es folgte dann ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec, bei dem die DNA durch die Porenöffnung aufgenommen wird. Durch Zugabe von 250µl SOC-Medium und Inkubation bei 37°C für 1h auf dem Schüttler wurden die Zellen herangezogen. Schließlich erfolgte das Ausplattieren auf

Agar-Platten mit Selektionsantibiotikum (Ampicilin, Kanamycin, etc.) und eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Bei Subklonierungsschritten ist auch ein blau-weiß Selektion möglich, bei der vor dem Ausstreichen der Bakterien die Platten mit 40µl 2%igen X-Gal behandelt wurden. Durch die blau-weiß Selektion ist es möglich Bakterienkolonien voneinander zu unterscheiden, die ein Insert in den Vektor ligiert haben oder bei denen eine Religation stattgefunden hat.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Nach dem Ausstreichen der Bakterien wurden am nächsten Tag die Kolonien gepickt und in LB-Medium bei 37°C über Nacht unter schütteln herangezogen. Die Plasmid-DNA wurde dadurch amplifiziert und konnte dann am nächsten Tag auf ihr Insert hin zu analysiert werden. Dazu wurden die Bakterien in 2ml des Mediums 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und dann lysiert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des FastPlasmid Mini Kit von Eppendorf. Dabei wurden die Zellen für 3min lysiert und dann auf eine Säule gegeben, die dann für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert wurden. Danach erfolgte ein Waschschrift und dann die Elution der DNA von der Säule.

2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.3.1 Zellen/Zelllinien

Cos7 Affen Nieren Zelllinie (ATTC CRL-1651)

HEK Humen embrionic kidney (ATTC CRL-1573)

T-Zellen aus der Maus CD4⁺, CD8⁺ Lymphozyten und Thymozyten

Dendritische Zellen CD11c⁺ aus generierten BMDC (*bone marrow derived dendritic cells*)

2.3.2 Kulturmedien und Lösungen

Kulturmedium RPMI 1640 + L-Glutamin (Gibco) mit 10% [v/v] FCS (Fötales Kälberserum, PAA, hitzeinaktiviert für 30min bei 56°C) 100U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco)	10x PBS (Biochrom) 9,55g/l
	ACK-Puffer (pH7,27) 4,15g NH ₄ Cl 0,5g KHCO ₃ 18,6mg EDTA
Einfriermedium 90% [v/v] FCS 10% [v/v] DMSO (Roth) 1x Trypsin EDTA (PAA)	ad 500ml Aqua dest. pH 7,27
	Ficoll Lösung (Seromed) Dichte: 1,077g/ml

2.3.3 Isolierung von Thymozyten aus der Maus

Nach zervikaler Dislokation von 6-8 Wochen alten Mäusen wurde durch einen Schnitt oberhalb des Brustbeins der Thymus entnommen. Nach Entnahme wurde der Thymus in 1x PBS mit sterilen Glas-Objektträgern zerrieben um die Thymozyten zu isolieren. Es erfolgte eine ACK-Lyse die die Thymozyten von Erythrozyten reinigt. Danach wurden die Zellen im FACS analysiert.

2.3.4 Isolierung von T-Lymphozyten aus der Milz einer Maus

Nach zervikaler Dislokation von 6-12 Wochen alten Tieren wurde mit einem Flankenschnitt die Milz entnommen. Danach wurden die Lymphozyten durch zerreiben der Milz mit sterilen Glas-Objektträgern mit Kulturmedium isoliert. Nach der Reinigung von Erythrozyten durch ACK-Lyse wurde die Milzsuspension mit immunomagnetischen *beads* spezifisch aufgereinigt. Dabei bediente man sich magnetischen Partikeln, die mit monoklonalen Antikörpern gegen $CD4^+$, $CD8^+$, $CD11c^+$, $CD4^+CD25^+$ Oberflächenantigene konjugiert sind. Das Prinzip der Methode beruht auf der Bindung dieser *beads* an z.B. $CD4$ Moleküle auf der Oberfläche von Lymphozyten und der anschließenden Positivselektion über eine magnetische Säule (Miltenyi). Die Milzsuspension wurde nach der ACK-Lyse mit $90\mu\text{l}$ RPMI Medium pro 10^7 der totalen Zellzahl versetzt und mit $10\mu\text{l}$ pro 10^7 Zellen *beads* für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff, um die nicht gebundenen immunomagnetischen Partikel zu entfernen. Anschließend gab man die Milzzellen auf eine magnetische Säule (LS-Positivselektionssäule, Miltenyi). Die in der Säule zurückgehaltenen Zellen wurden 3 mal mit 3ml Medium gewaschen. Anschließend wurden dann die Säule aus dem Magneten entnommen und die in der Säule befindlichen Zellen mit einem Stempel und 5ml Medium eluiert. Bei der Negativselektion von $CD4^+CD25^-$ für eine Transfer Kolitis erfolgte erst der Durchfluß von $CD4^+CD25^-$ und $CD4^+CD25^+$ Zellen, die dann wiederum in einer Positivselektion voneinander getrennt wurden.

2.3.5 T-Zell Differenzierung

Isolierte naive $CD4^+CD25^-$ T-Zellen können in verschiedenen Richtungen durch Zugabe verschiedener Zytokine und Antikörper differenziert werden.

TH 1	TH 2	TH17
α CD3/ α CD28 3000U/ml IL12 20-50ng/ml IL2 α IL4 10 μ g/ml	α CD3/ α CD28 1000U/ml IL4 20-50ng/ml IL2 100U/ml rmIL6 (HIL6) α INF γ 20 μ g/ml α IL12 10-20 μ g/ml	α CD3/ α CD28 5ng/ml HIL6 (100ng IL6) 1ng/ml TGF β α INF γ 10 μ g/ml α IL4 10 μ g/ml
Mediumwechsel am Tag 3 100U/ml IL2	Mediumwechsel am Tag 3 100U/ml IL2 200U/ml IL4 100U/ml IL6	
Intrazelluläre FACS-Färbung am Tag 7	Intrazelluläre FACS-Färbung am Tag 7	Intrazelluläre FACS-Färbung am Tag 4

Die Analyse der Zellen erfolgte dann an den jeweiligen Tagen bei denen dann die Zellen in Kultur mit 50ng PMA, 1 μ g Ionomycin und 10 μ g Brefeldin A für 4-5h bei 37°C inkubiert wurden. Dabei reichern sich die produzierten Zytokine in der Zellen an, so daß man sie im FACS messen konnte. Erst erfolgte die Oberflächenfärbung der T-Zellen bevor die Zellen mit 50 μ l Reagent A (Caltag) für 15 min bei RT fixiert wurden. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Färbung der Zytokine IL4, IL17A oder INF γ in 50 μ l Reagent B (Caltag) für 20 min bei RT. Nach dem Waschen mit 1x PBS konnten die Zellen im FACS analysiert werden.

2.3.6 Nicht Radioaktiver Proliferations Assay (CFSE)

Um die Proliferation von Zellen zu analysieren wurde das CFDA SE Cell Tracer Kit von Molecular Probes verwendet. Zuerst wurden 1,25 μ l des CFSE in 25ml vorgewärmten 1x PBS verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,5 μ M des CFSE zu erreichen. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert bevor sie für 5 min auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit Medium gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 15 min bei 37°C in RPMI-Medium. Es wurde erneut 3 mal mit Medium gewaschen, dann ausgesät (200.000Zellen/96well) und verschieden stimuliert. Nach 3-5 Tagen wurden die Zellen im FACS analysiert, dabei wurde das CFSE im FITC(FL1)-Kanal gemessen.

2.3.7 Apoptosefärbung (AnnexinV-FITC/7AAD)

Um die Induktion der Apoptose in T-Zellen zu untersuchen wurde das Annexin V-FITC Apoptose Detektions Kit I von BD Pharmingen verwendet. Dabei wurden die Zellen zuvor mit verschiedenen Stimulantien inkubiert, bevor sie dann für die FACS-Analyse mit den Apoptosemarkern markiert wurden. Annexin ist eine Probe, mit der man apoptotische Zellen identifizieren kann. Sie bindet dabei an negativ geladene phospholipid Oberflächen mit einer erhöhten Affinität zu Phosphatidylserine (PS). Bei der Apoptose wird neben der Kondensation des Nukleus und des Zytoplasmas sowie der internukleosomale Abbau der DNA auch die Plasmamembran von innen nach außen gestülpt, so daß das PS an der Oberfläche liegt und von Annexin detektiert werden kann. Die Färbung der Zellen muß im Ca^{2+} -freiem Milieu stattfinden, da Annexin Ca^{2+} -abhängig auch an andere Phospholipide bindet. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit 1x PBS in 1x Bindungspuffer mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Es wurden 100µl in ein neues FACS-Röhrchen transferiert und 3µl des Annexin V-FITC sowie 5µl des 7AAD hinzugegeben, welches vorher 1:300 in 1x Bindungspuffer verdünnt worden ist. Mit dem 7AAD kann man das Stadium einer eingehenden Nekrose bestimmen. Die Zellen wurden dann für 15 min bei RT im Dunklen inkubiert und danach mit 400µl 1x Bindungspuffer versetzt. Die Zellen wurden dann im FACS analysiert.

2.3.8 Transiente Transfektion

Um Proteine und deren Interaktion in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien zu analysieren, müssen diese in den Zellen überexprimiert werden. Dazu bedient man sich der transienten Transfektion, bei der die DNA-Sequenzen, die in mammalia Expressionsvektoren vorliegen, auf Liposomen Basis in die Zellen eingeschleust werden. Die adhärennten Zellen wurden ein Tag vor der Transfektion in 6well Schalen ausgesät, so daß sie am Tag der Transfektion 60-80% konfluent waren. Am Tag der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt und mit 1ml normalen Kulturmedium zuzüglich 20% FCS versetzt. 1µg der DNA wurde in 500µl frische Kulturmedium ohne Zusätze gegeben. In einem separaten Greiner-Röhrchen wurden zu 500µl frisches Kulturmedium ohne Zusätze 10µl der HiFect (Lonza) Liposomenlösung hinzugefügt. Danach wurde die DNA-Lösung zu der HiFect-Lösung gegeben und der Ansatz für 15 min bei RT stengelassen. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen pipettiert und diese mindestens 8h bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Lyse der Zellen zur Isolierung der Proteine.

2.3.9 Luciferase Assay

Mit Hilfe des Luciferase Assays kann man durch Überexpression von Proteinen deren Interaktion und Einfluß auf bestimmte Promotorsequenzen, die *in-frame* mit einem Luciferasegen vorliegen, untersuchen. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Smurf2 mit dem CAGA-Luc Promotor für Smad3 untersucht. Dabei wurden die Zellen mit den DNA-Konstrukten und einem β Galaktosidase exprimierenden Vektor transfiziert. Die β Galaktosidase dient dabei dem Proteinabgleich und der Normalisierung der Luciferaseaktivität. Die Zellen wurden 1 Tag nach der Transfektion mit 300 μ l 1x CCLR Lysepuffer von Promega lysiert. Danach wurden die Zellrückstände abzentrifugiert und der Überstand für die Luciferase- und β Gal-Messung verwendet. Die Messung der Luciferase erfolgte im Luminometer mit einer 2 sek Messungsverzögerung, gefolgt von einer 10 sek Messung für das Lesen der Luciferaseaktivität. Dafür wurden zu 20 μ l Zellysat 100 μ l Luciferase Assay Reagent (Promega) gegeben und das Lysat vor der Messung gevortext.

Die Aktivität der β Galaktosidase erfolgte durch Messung der Chemilumineszenz im Luminometer. Dabei wurden 50 μ l des Zellextraktes mit 100 μ l Substrat (1Volumen β Gal Substrat + 99 Volumen Assaypuffer; Solution 1) von Roche versetzt und 15-60 min bei RT im dunklen inkubiert. Die Lichtreaktion wurde dann durch Zugabe von 50 μ l Initiation Reagent (1Volumen Enhancer + 5 Volumen Initiationslösung; Solution2) von Roche versetzt und im Luminometer gemessen.

Die Lux-Werte der Luciferasemessung wurden mit den Lux-Werten der β Gal-Messung abgeglichen, um die relative Expression der Luciferase in den jeweiligen Zellansätzen zu ermitteln. Die negativ Kontrolle (CAGA-Luc unstimuliert) wurde dabei als 1 gesetzt und in Relation zu den zu analysierenden Konstruktion und Stimulationen gesetzt.

2.3.10 Kultivierung und Konservierung von Zellen

Alle Arbeiten für die Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im kompletten RPMI 1640 Medium, in einem Begasungsbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Adherente Zellen wurden 1-2x die Woche gesplittet, indem die Zellen mit 1x Trypsin EDTA behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen in einer geringeren Dichte, ermittelt mit der Neubauer Zellkammer, ausgesät.

Zur Kryokonservierung wurden 1-5 x 10⁶ Zellen/ml Einfriermedium in Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Für eine Dauerkonservierung wurden die Zellen dann am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Das wieder Auftauen der Zellen

erfolgte dann schnell bei 37°C im Wasserbad und sofortigem Überführen in Kulturmedium. Nach Abzentrifugieren der Zellen und entfernen des DMSO wurden dann die Zellen in Kulturflaschen ausgesät.

2.4 Arbeiten mit Gewebe

2.4.1 H&E (Hämalaun und Eosin) Färbungen von Geweben

Mit Hilfe der H&E Färbung kann man im Gewebe Kerne, saure Schleimssubstanzen und Bakterien blau darstellen. Das Zytoplasma der Zellen wird rot angefärbt. Damit ist es möglich pathologische Veränderungen des Gewebes zu untersuchen. Die Gewebeschnitte wurden dabei 10min in saures Mayers Hämalaun eingetaucht und dann für 5 min unter fließendem Wasser gebläut. Dann wurden die Schnitte in 1% wässriges Eosin für 5 min getaucht und mit Aqua dest. gespült. Es folgte eine Entwässerung des Gewebes durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 70% zu 96% Isopropanol und 100% Ethanol, indem die Gewebeschnitte dann für 5 min verweilen. Nachdem sie für 5min auch im Xylobad entwässert worden sind wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt.

2.4.2 Immunzytochemische Nachweise

In dieser Arbeit erfolgte die Färbung von Lysosomen und frühen Endosomen in lebenden Cos7 Zellen, um die Colokalisation von Smurf2 in der Zelle zu analysieren. Dabei wurden die Zellen mit dem Smurf2GFP-DNA-Konstrukt transient transfiziert und für die Lysosomenfärbung mit 10µM LysoTracker von Invitrogen für den 10 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse am Laser Scanning Microscope (LSM). Colokalisationen von Smurf2GFP (grün) und den Lysosomen (rot) sind als gelbe Spots in den Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 24).

Bei der endosomalen Färbung wurden die Zellen vorher mit dem Smurf2GFP-Konstrukt transient transfiziert und dann vor der Färbung mit 4%igen PFA für 20min bei RT fixiert. Die Zellen wurden dann 3 mal mit 1x PBS 0,1% Tween für 5 min gewaschen. Es folgte eine Blockierung der Zellen mit dem Fc Block CD16/CD32 FcγIII/II (BectonDickinson) für 15 min bei RT in der Feuchtekkammer. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 mal mit 1x PBS 0,1% Tween 5 min gewaschen. Die anschließende Antikörperfärbung (EEA1, Abcam; 1µg/ml) erfolgte über Nacht bei 4°C in der Feuchtekkammer. Erneut wurden die Zellen 3 mal mit 1x PBS 0,1% Tween 5 min gewaschen. Es folgt die Zugabe des sekundären Antikörpers (α -rabbit Cy3, Dianova Jackson) für 2h bei RT in der Feuchtekkammer. Nach 3 maligen Waschens mit 1x PBS 0,1% Tween wurden die Objektträger mit Mounting Medium von

Vectashield eingedeckelt. Auch hier erkennt man die Kolo-kalisation an der Überlagerung des grünen GFPs mit dem roten Cy3 in gelben Spots (siehe Abbildung 25).

2.4.3 Immun-Histochemische Nachweise

Es wurden Darmpräparate von verschiedenen Mäusen präpariert und zur Herstellung von Gewebeschnitten in verschiedenen Schnittebenen im Kryostaten (Zeiss) geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnittdicke betrug 5µm. Die Gewebeschnitte wurden bei RT getrocknet und dann bei -80°C eingefroren oder direkt für die Fluoreszenzfärbung verwendet. Die Zellen wurden dafür mit 4%igem PFA für 20 min in der Feuchtekammer fixiert. Dann wurden die Gewebeschnitte kurz mit TBST (*Tris buffered saline + Tween*) gewaschen, mit Methanol und Wasserstoffperoxid für 20 min inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren und dann wieder erneut mit TBST kurz gewaschen. Anschließend erfolgte eine weitere Blockierung von Biotin durch Avidin (Vector Kit SP-2001) für 15 min in der Feuchtekammer. Die Gewebeschnitte wurden dann kurz mit TBST + 2% BSA gewaschen und mit Biotin (Vector Kit SP-2001) für 15 min in der Feuchtekammer blockiert. Es erfolgte erneut ein Waschschriff mit TBST + 2%BSA. Letztendlich wurden dann noch weitere Proteine geblockt mit Hilfe des Protein Blocking (DACO) Reagent für 15 min in der Feuchtekammer. Dieser wurde nach Ablauf der Zeit erneut mit TBST + 2%BSA gewaschen. Es folgte dann die erste Antikörperfärbung über Nacht in der Feuchtekammer bei 4°C.

1.Antikörper	Verdünnung	Firma	2.Antikörper	Verdünnung	Firma
α-Maus CD4	1/1000 (Ratte)	Pharmingen	α-Ratte Biotin	1/1000 (Ziege)	Pharmingen
α-Maus CD11c (HL3)	1/200 (Hamster)	Pharmingen	α-Hamster Biotin	1/1000 (Ziege)	Dianova
α-Maus MPO	1/20 (Kaninchen)	Abcam	A-Kanin. Biotin	1/1000 (Ziege)	Dianova

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Gewebeschnitte 3 mal für 5 min mit TBST gewaschen und es folgte danach die 2. Antikörperfärbung für 30 min bei RT in der Feuchtekammer. Anschließend wurden die Schnitte 3 mal 5 min mit TBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Antikörperfärbung mit dem TSA Fluorescence/Cyanine3 Systems (Perkin Elmer) verstärkt. Dabei wurden die Schnitten 30 min mit Streptavidin HRP (1:100) und nachfolgend, nach dem Waschen, 5 min mit Tyramide (Cyanine; 1:50) inkubiert. Es

folgte die Färbung des Nukleus mit dem Hoechst Farbstoff 3342 (molecular probes) 5 min (1:10000 in TBS) und das Eindeckeln mit Mounting Medium (Vector H-1000). Die Färbung der Gewebe ist bei 4°C bis zu einer Woche stabil.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Isolierung von Gesamtzellextrakten

Zur Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten (T-Zellen/Cos7/HEK) wurden die Zellen mit 60-100µl Lysepuffer (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific) versetzt, der zusätzlich noch Phosphatase und Protease Inhibitoren enthält. Nach Lyse der Zellen wurden die Zellrestbestandteile 20 sek bei maximaler Umdrehung abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppidorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford und die Analyse im Western Blot (2.5.3).

2.5.2 Immunpräzipitation (IP)

Um die kovalente Bindung von Ubiquitin durch unterschiedliche Interaktion von Smad7 und der gespleißten Smurf2 Form am überexprimierten WT-Smurf2GFP Protein zu untersuchen, wurde eine Immunpräzipitation mit den Proteinlysaten durchgeführt. Dabei wurden 100µg des gesamt Proteinextraktes eingesetzt und mit 1µl des polyclonalen GFP Antikörpers (Abcam) für 1h bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden dann 20µl Sepharose A Beads (Sigma) hinzugefügt mit denen dann der Immunkomplex nach 1h RT unter Rotation präzipitiert wurde. Der Immunkomplex wurde dann mehrmals (3-7 mal) mit RIPA-Puffer (150-500mM NaCl, pH9,0) gewaschen und dann mit 50µl 4x Ladepuffer (Roth) versetzt. Die IP konnte dann mit Hilfe des Western Blots analysiert werden.

2.5.3 Western Blot

Bei der Western Blot Analyse von Proteinen wurden 20-30µg des Proteinlysates auf ein vorher gegossenes Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die Porengröße und Prozentigkeit des Gels hängt von der zu untersuchenden Größe des Proteins ab. Es können Gele von der Größe 7,5%, 10%, 12% und 15% gegossen werden.

Sammelgel	1-fach	1,5-fach	2-fach
Aqua dest.	2,2ml	3,3ml	4,4ml
1M Tris pH 6,8	0,38ml	0,57ml	0,76ml
10% SDS	30µl	45µl	60µl
40% PA	0,38ml	0,57ml	0,76ml
10% APS	30µl	45µl	60µl
Temed	3µl	4,5µl	6µl

Trenngel	15%	12%	10%	7,5%
Aqua dest.	4,3ml	5,1ml	5,7ml	6,5ml
1,5M Tris pH 8,8	3ml	3ml	3ml	3ml
10% SDS	120µl	120µl	120µl	120µl
40% Polyacrylamid	4,5ml	3,6ml	3ml	2,3ml
10% APS	60µl	60µl	60µl	60µl
Temed	6µl	6µl	6µl	6µl

10x Laufpuffer: 30g Tris
144g Glycin
10ml 10% SDS
ad. 1000ml mit Aqua dest.

10x Blotpuffer: 30g Tris
140g Glycin

1x Blotpuffer: 700ml Aqua dest.
200ml Methanol
100ml 10x Blotpuffer

Nach Auftragen der Proteinlysate und des Proteinmarkers (Fermentas) auf das Gel wurden die Proben 30 min bei 60V und danach bei 100V aufgetrennt. Es folgte dann das Blotting der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulose Membranen (0,45µm, Whatman) 1h bei 300mA. Anschließend wurden die Membran und die darauf befindlichen Proteine mit 3% Magermilchpulver und 1x Blocking Puffer (Roti-Block, Roth) abgeblockt. Nachfolgend erfolgte dann die 1. Antikörper Zugabe und dann am nächsten Tag nach 3 maligen Waschens mit TBS/0,1% Tween der 2. Antikörper für 1h bei RT. Nach 3 maligen Waschens für 10 min

mit TTBS wurde die Membran mit Detektionssubstrat (Perkin Elmer) behandelt und in der Dunkelkammer mit einem Film (Amersham) die Chemilumineszenz detektiert.

1.Antikörper	Firma	Puffer/Verdünnung/Dauer	2.Antikörper (HRP)	Detektion
Ubiquitin	BioMol	3% Milch / 1:2000 / üN	α -Maus (Amersham) 1:5000	ECL
GFP	Abcam	5%BSA TTBS / 1:5000 / 1h	α -rabbit (Cell Signalling) 1:1000	ECL
pSmad2	Cell Signalling	5%BSA TTBS / 1:1000 / üN	α -rabbit (Cell Signalling) 1:1000	ECL
Smad2	Cell Signalling	5%BSA TTBS / 1:1000 / üN	α -rabbit (Cell Signalling) 1:1000	ECL
pSmad3	Cell Signalling	5%BSA TTBS / 1:1000 / üN	α -rabbit (CellSignalling) 1:1000	ECL
Smad3	Cell Signalling	5%BSA TTBS / 1:1000 / üN	α -rabbit (Cell Signalling) 1:1000	ECL
SnoN	Cell Signalling	5%BSA TTBS / 1:1000 / üN	α -rabbit (Cell Signalling) 1:1000	ECL
TGF β RII	Santa Cruz Biotec	3% Milch / 1:500 / üN	α -rabbit (Amersham) 1:5000	ChemiGlow
Smurf2	Epitomics	5%BSA TTBS / 1:1000 / üN	α -rabbit (Cell Signalling) 1:1000	ECL

2.5.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Konzentration eines Proteinlysates messen zu können, wurde zuerst das Bradford-Reagenz (Roti-Quant; Roth) 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Danach wurden 1ml des vorbereiteten Bradford-Reagenzes in 1 mal Plastikkuvetten gegeben und eine Protein Standardreihe mit BSA (1mg/ml) sowie 1-5µl des Zellextraktes der Probe pipettiert. Nach 5min Inkubation wurden die Proben bei 595nm in einem Photometer (Spectronic 601, Miltenroy) gemessen. Als Referenzwert diente ein Ansatz mit Bradford-Reagenz ohne Protein. Anhand des Vergleichs mit einer BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration berechnet.

2.6 Arbeiten mit Mäusen

2.6.1 Herstellung einer transgenen Maus durch Injektion in den Pronukleus

Nach Subklonierung des Smurf2-Gens in den Topo 3.1 His-Tag Vektor (Invitrogen) wurde das Gen mit den Enzymen NotI und HindIII und die endständigen *sticky ends* wurden dann mit 1U Klenow-Fragment und dNTPs (33µM je) während der Restriktionsverdauung aufgefüllt. Die entstandenen *blunt end* DNA wurde von den Enzymen aufgereinigt über das MinElute Kit (Qiagen) und in den CD2-Vektor, der mit *SmaI* verdaut und dephosphoryliert wurde, ligiert. Die richtige 5'-3'-Lage des Smurf2-Inserts wurde mit Hilfe des PCR-Screens, der *Primer* CD2Fwd und Smurf2rev, analysiert. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von 2,3kb. Die DNA des richtigen Klons wurde dann amplifiziert und zur Kontrolle sequenziert. Anschließend wurde die DNA (10µg) durch Schneiden der DNA mit *Sall* und *NotI* linearisiert und dann über Glasbeads in großer Menge aufgereinigt. Die Elution erfolgte dann in Mikroinjektionspuffer (5-10mM Tris pH 7,4 + 0,1-0,25mM EDTA in ultrapuren Wasser). Die DNA sollte dann in einer Konzentration von 3ng/µl in 100µl Injektionspuffer 1-2 Tage vor der Injektion im Kühlschrank aufbewahrt werden. Unmittelbar vor Gebrauch sollte dann die DNA 30 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert werden. Bei der Mikroinjektion wurden dann schätzungsweise 1-2pl DNA-Lösung pro Zygotenpronukleus mikroinjiziert. Die Mikroinjektion erfolgte in der ZVTE-Zucht der Johannes-Gutenberg Universität. Nach erfolgreicher Injektion wurden dann die F₁-Foundertiere mit Hilfe der PCR bestimmt und für die Zucht eingesetzt.

2.6.2 Maus-Modelle

2.6.2.1 AOM/DSS

Um bei Mäusen Tumore im Darm zu induzieren und diese dann in Abhängigkeit von Entzündung zu analysieren, wurden die Mäuse 1 mal mit 10µg/g Azoxymethan (AOM) intraperitoneal gespritzt. Anschließend wurde den Tieren drei Zyklen für je eine Woche mit Trinkwasser, in dem 1,5-2,5% DSS (dextran sodium sulfate, MP Biomedicals, MW 36.000-50.000) gelöst ist, verabreicht. Tumore entwickelten sich meist ab dem 2. Zyklus am Tag 60. Das DSS zerstört dabei die Epithelbarriere, so daß Darmbakterien in das Gewebe eindringen können und dort zu Entzündungsreaktionen führen. Aufgrund der chronischen Entzündung des Darms entwickeln sich dann Kolonkarzinome.

2.6.2.2 DSS

Um eine akute Entzündungen des Darms zu untersuchen, wurden den Mäusen 7 Tage 2,5-5% DSS über das Trinkwasser verabreicht. Die Entzündung hält mehrere Wochen nach der letzten DSS-Gabe an, so daß der Entzündungsgrad im Miniendoskop erst ab der 2. Woche gemessen werden kann. Um chronische Entzündungen des Darm zu simulieren, wurde den Mäusen 3 Zyklen 2-3%iges DSS verabreicht, unterbrochen von 2 wöchiger Gabe von autoklaviertem Wasser. Das Ermitteln des Entzündungsgrades erfolgte immer am Ende eines jeden Zykluses.

2.6.2.3 Transfer Kolitis

Bei einer Transfer Kolitis wurden immundefizienten RAG1- KO Mäusen, die keine B- und T-Zellen besitzen, 200.000-500.000 CD4⁺CD25⁻ T-Zellen intraperitoneal verabreicht, die von einer zu untersuchenden Maus vorab isoliert wurden. Dabei sollte die Reinheit der Zellen bei mehr als 95% liegen. Dadurch, daß man den RAG-KO Mäusen naive CD4⁺ T-Zellen spritzt entwickeln diese, abhängig von der gespritzten Zellzahl, nach 2-3 Wochen eine Kolitis mit starker Diarrhö. Dadurch, daß die natürlichen Tregs fehlen kommt es zur Entzündungsreaktion im Darm. Als Kontrollgruppe dienten RAG KO Mäuse, denen wild-typ (WT) CD4⁺ T-Zellen gespritzt wurden. Bei der Transfer Kolitis mußte darauf geachtet werden, daß die Empfängertiere Zellen vom selben Geschlecht und Hintergrund bekamen.

3 Ergebnisse

Ubiquitin Ligasen wie ITCH und GRAIL spielen bei der Anergisierung von T-Zellen eine große Rolle, indem sie die Funktion von Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) und Proteinkinase C- θ herunterregulieren. Beides sind Signalmoleküle, die für die T-Zellaktivierung wichtig sind. Dadurch wird die Signalweiterleitung für die IL2-Produktion unterbunden, welches für die T-Zell Proliferation wichtig ist. Toleranz ist die Folge.

Bisher ist aber nur wenig bekannt über die Rolle der Ubiquitin Ligase Smurf2 im Immunsystem. Unklar ist seine Rolle in der Immunregulation bei T-Zellen auf dem Gebiet der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie der Kolitis Ulcerosa (CU) und dem Morbus Crohn (MC).

3.1 Nachweis der Expression von Smurf2 in verschiedenen Geweben einer Maus

Um die Expression von Smurf2 in verschiedenen Geweben einer Maus nachzuweisen sowie das Gewebe zu identifizieren, welche eine besonders starke Expression von Smurf2 aufweisen, wurden von unbehandelten B16/J Mäusen verschiedene Organe entnommen, aus denen RNA isoliert wurde. Anschließend erfolgte die reverse Transkription in cDNA, die dann in der *real time* PCR auf die Expression von Smurf2 hin untersucht wurden. Die Werte wurden mit der Expression des β -Aktin Haushaltsgens abgeglichen.

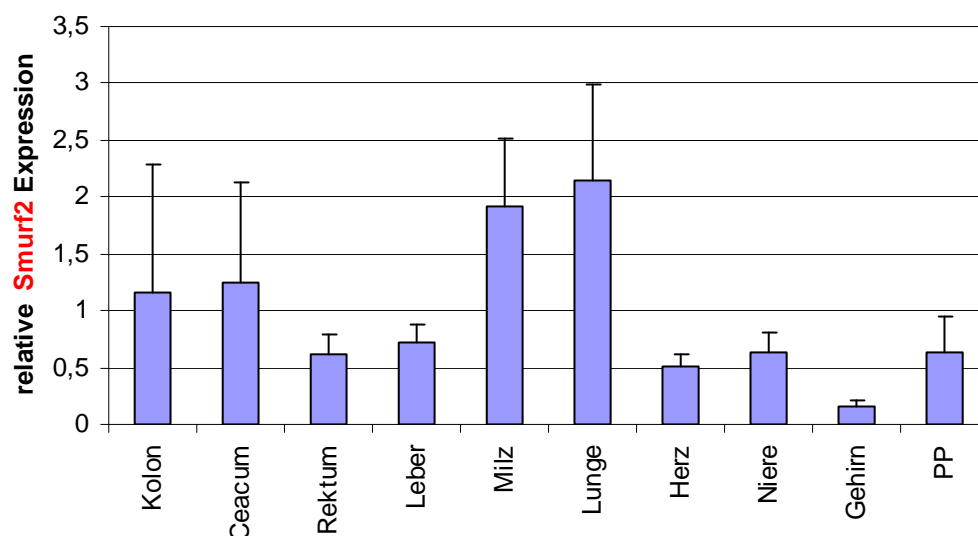


Abbildung 11: Relative Smurf2 Expression in verschiedenen Organen; PP=payer patches; n=6

Wie in der Abbildung 11 zu sehen, wird Smurf2 in fast allen Organen exprimiert. Auffällig ist aber die gesteigerte Expression in den Organen, die für das Immunsystem eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. der Milz und der Lunge. Im Gehirn ist die geringste Expression an Smurf2 cDNA gemessen worden.

3.2 Nachweis der Expression von Smurf2 in T-Lymphozyten

Aufgrund der gesteigerten Expression der Smurf2 cDNA in der Milz, wurde dann die Expression von Smurf2 in naiven T-Lymphozyten näher untersucht. Dabei wurden aus unbehandelten Bl6/J Tieren die Milz entnommen und daraus naive CD4⁺ und CD8⁺ Zellen isoliert, die anschließend direkt für die RNA-Analyse verwendet wurden. Es folgte die Isolation der RNA, die Umschreibung in cDNA und die Analyse der Smurf1 und 2 Expression in der *real time* PCR.

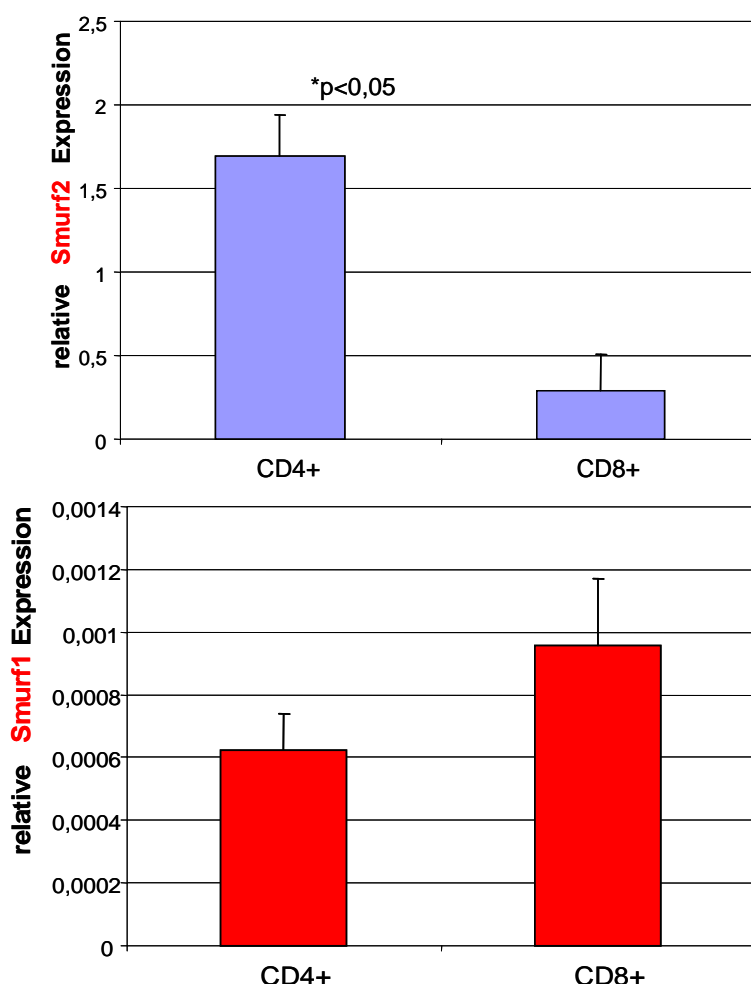


Abbildung 12: Relative Smurf1 und Smurf2 Expression in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten; n=4; Ergebnis repräsentativ für 3 unabhängige Versuche; *p<0,05 student t-Test

Die Smurf1 Expression wurde ebenfalls ermittelt, da Smurf1 zu 83% identisch ist zu Smurf2 (Lin 2000) und sich im dem Fehlen einer WW-Domäne im Vergleich zu Smurf2

unterscheidet (siehe Abbildung 19). Anders als Smurf2 reguliert Smurf1 den BMP-Signalweg. Wie in Abbildung 12 zu sehen, ist die Smurf2 Expression in CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen signifikant höher. Dabei liegt die Expression von Smurf2 im Vergleich zu Smurf1 um den Faktor 10³ höher. Die Untersuchung der Expression von Smurf1 in naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ergab dagegen keine signifikanten Unterschiede.

3.3 Nachweis der Expression von Smurf2 in CD4⁺ Subpopulationen

Um zu überprüfen, welche der Subpopulationen von CD4⁺ Zellen (CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺) eine unterschiedliche Expression von Smurf2 aufweisen, wurden aus unbehandelten Bl6/J Tieren Milzen entnommen, und in einem negativen Selektionsschritt (siehe Kapitel 2.3.4) naive CD4⁺CD25⁻ Zellen von CD4⁺CD25⁺ T regulatorischen Zellen abgetrennt. Auch hier wurde direkt die RNA isoliert und nach dem Umschreiben in cDNA diese in der *real time* PCR auf die Gene Smurf1 und 2 hin untersucht.

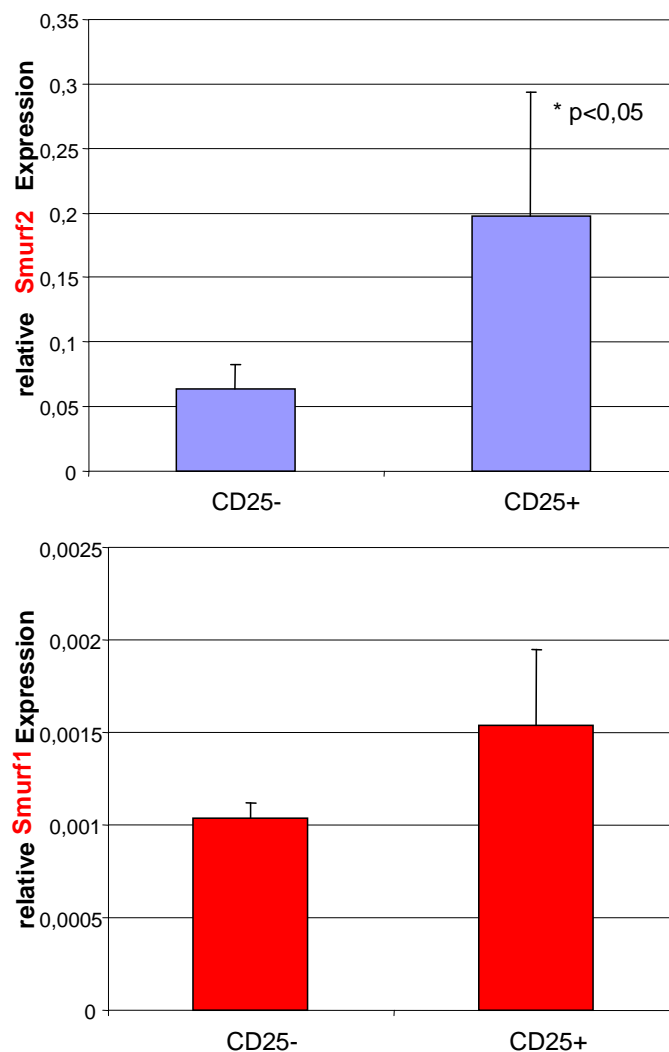


Abbildung 13: Relative Smurf1 und 2 Expression in CD4⁺ Subpopulationen; n=4; Ergebnis repräsentativ für 3 unabhängige Versuche; *p<0,05 student t-Test

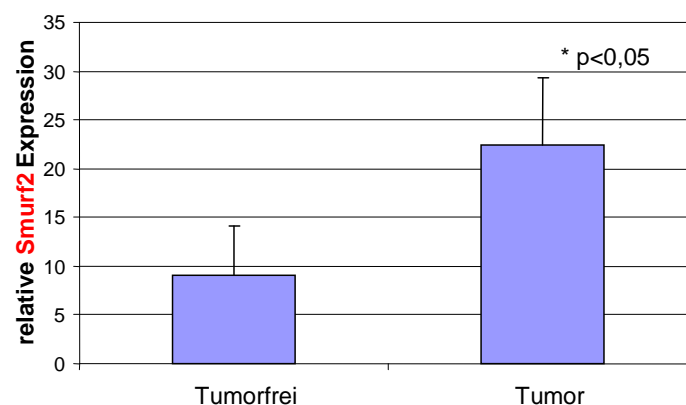
Abbildung 13 zeigt dabei, daß die Smurf2 Expression in den CD4⁺ T-Zellen um den Faktor 10³ höher als die Smurf1 Expression ist. Dabei ist die Smurf2 Expression signifikant stärker in den natürlichen T regulatorischen Zellen verglichen zu den naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Dies könnte darauf hindeuten, daß Smurf2 möglicherweise in der Immunregulation und –suppression eine wichtige Rolle spielt.

3.4 Nachweis der Expression von Smurf2 in Tumoren

Signaltransduktion über TGFβ spielt eine nachgewiesene Rolle bei der Immunhomöostase im Darm und bei der Entstehung von Kolontumoren.

Um zu untersuchen, ob Smurf2 bei der Pathogenese und Ätiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bzw. einer damit assoziierten Tumorgenese eine Rolle spielt, wurde ein von Okayasu und Tanaka (1990 und 1993) entwickeltes Kolonkarzinom Modell, basierend auf dem mutagenisierenden Agens Azoxymethan (AOM), angewandt. Dabei injiziert man Bl6/J Mäusen intraperitoneal Azoxymethan (AOM 10µg/g) und verabreicht den Tieren in drei aufeinanderfolgenden Zyklen Dextran Sodium Sulphate (DSS) über das Trinkwasser (Becker, Fantini et al. 2004). Die DSS Gabe (1,5-3% w/v) über das Trinkwasser wird dabei jeweils über einen Zeitraum von 7 Tagen zugeführt.

Das DSS führte ab dem 10. Tag zur Inflammation der Kolonmukosa, zur Diarrhö und zu Gewichtsverlust gefolgt von Tumoren ab den 60. Behandlungstag. In diesem Stadium wurden die gebildeten Tumore dem Kolon entnommen und daraus die RNA isoliert. Tumorfrees Gewebe wurde aus Kolonabschnitten von Mäusen entnommen, die nur mit DSS behandelt worden sind und keine Tumore ausbildeten. Nach Umschreiben der RNA erfolgte die Quantifizierung von Smurf1 und 2 mittels der *real time* PCR.



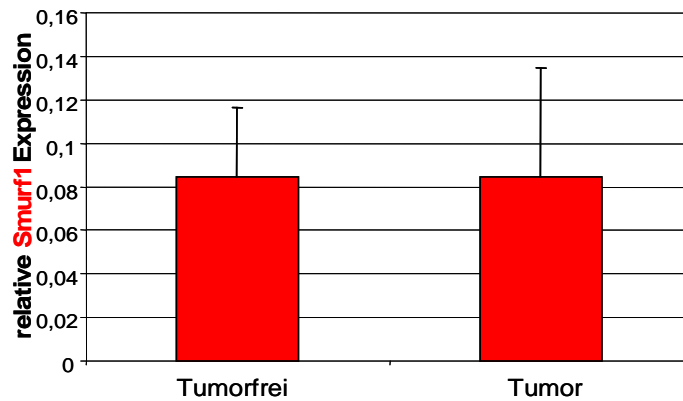


Abbildung 14: Relative Smurf1 und 2 Expression in Tumor und Tumorfreiem Gewebe; n=5; Ergebnis repräsentativ für 4 unabhängige Versuche; *p<0,05 student t-Test

Wie in Abbildung 14 gezeigt, ist die Smurf2 Expression im Kolon-Tumorgewebe signifikant stärker als im tumorfreien Gewebe. Die Daten implizieren somit, daß die Expression von Smurf2 bei der Entwicklung von Darmtumoren heraufreguliert wird. Die Smurf1 Expression dagegen ist im Tumor gegenüber tumorfreiem Gewebe nicht signifikant verändert.

3.5 Nachweis der Smurf2 Expression in tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Um zu untersuchen, ob für die gesteigerte Expression von Smurf2 im Tumorgewebe infiltrierende Lymphozyten verantwortlich ist, wurden aus dem Tumorgewebe und der entzündeten Darmmukosa der Kontroll-B16/J Mäuse Lamina propria Zellen präpariert. Aus den Lamina propria Zellen wurden dann durch positive Selektion (siehe Kapitel 2.3.4) verschiedene Zellen, wie CD4⁺, CD8⁺, dendritische Zellen (CD11c⁺), Epithelzellen und B-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems (Kapitel 2.3.4) isoliert. Wie in der Abbildung 15 gezeigt wird, war die Smurf2 Expression in tumorinfiltrierenden CD4⁺ T-Zellen verglichen zu den übrigen Zelltypen um mehr als das 5-fache erhöht. Interessanterweise war die hohe Smurf2 Expression nur in tumorinfiltrierenden CD4⁺ T-Zellen nachweisbar, nicht jedoch in T-Zellen, die aus tumorfreiem Gewebe isoliert wurden. Die Daten implizieren somit, daß tumorinfiltrierende CD4⁺ T-Zellen eine erhöhte Smurf2 Expression und damit verbunden eine differenzielle TGFβ Signaltransduktion aufweisen.

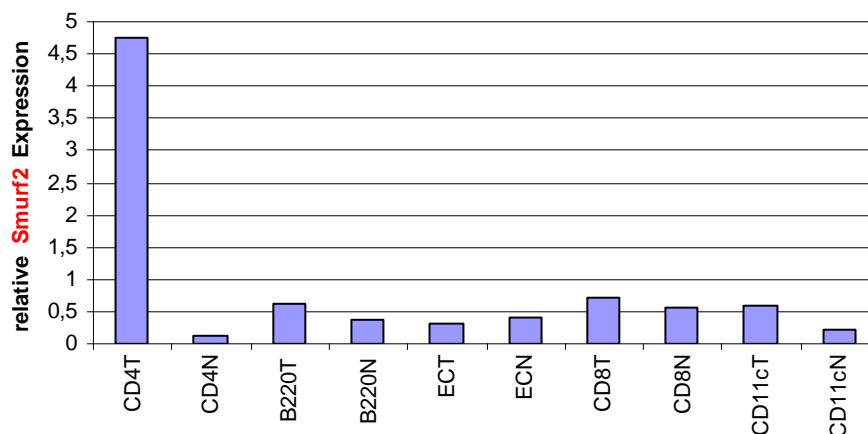


Abbildung 15: Relative Smurf2 Expression verschiedener Zelltypen aus der Lamina propria (T)=Tumor (N)=tumorfreies Gewebe; B-Zellen (B220), Epithelzellen (EC); Ergebnis repräsentativ aus 4 unabhängigen Versuchen

3.6 Nachweis TGF- β vermittelter Einflüsse auf die Induktion von Smurf2 in T-Zellen

Es ist bekannt, daß Kolontumorgewebe große Mengen an TGF β produziert (Becker, Fantini et al. 2006). Dabei kommt dem TGF β unterschiedliche Funktionen zu, abhängig vom Stadium in dem sich der Tumor befindet. So hat TGF β im prämaligen Stadium der Tumorentwicklung supprimierende Effekte (Apoptose, Differenzierung und Zytostase), während es bei fortschreitender Tumorentwicklung seine Funktion ändert und zum Tumorpromotor wird. So wird das Wachstum des Tumors zusätzlich gefördert (Massague 2008).

3.6.1 Zeitabhängige Induktion von Smurf2 in CD4⁺-Zellen durch TGF- β und anergisierenden Agenzien

Um nachzuweisen, welche Zytokine, vor allem TGF β , die Expression von Smurf2 in T-Zellen induzieren, wurden naive CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von B16/J Mäusen isoliert und *in vitro* mit verschiedenen Agenzien zeitabhängig stimuliert. So konnte unter anderem gezeigt werden, daß Smurf2 durch ein anergisierendes Substrat, Ionomycin, induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Durch Stimulation mit TGF β konnte nach 3h ebenfalls eine maximale Induktion von Smurf2 nachgewiesen werden (Abbildung 16a).

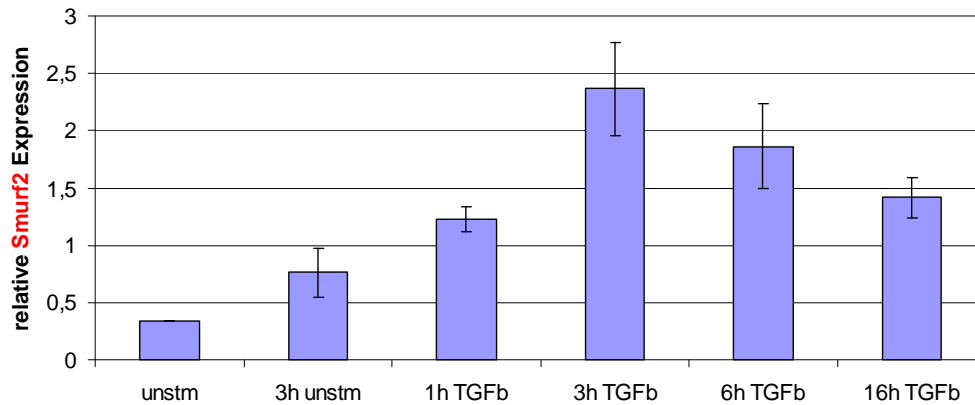


Abbildung 16a: Zeitabhängige Induktion von Smurf2 in CD4⁺ T-Zellen durch TGFβ;
unstim=unstimuliert; n=4; Ergebnis repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

Smurf2 konnte dabei im Vergleich zur unstimulierten Probe nur maximal 3-fach induziert werden. Dieses Ergebnis bestätigte Versuche einer anderen Gruppe, die zeigten, daß das TGFβ die Expression von Smurf2 induzieren kann (Ohashi, Yamamoto et al. 2005). Dabei konnte ebenfalls eine Induktion von Smurf2 maximal um das dreifache beobachtet werden. Auch eine polyklonale Aktivierung der T-Zellen mit αCD3/αCD28 konnte die Induktion von Smurf2 nach bereits 2h einleiten. Eine zusätzliche Stimulation mit TGFβ konnte jedoch die Expression von Smurf2 nicht weiter steigern (siehe Abbildung 16b). Allerdings liegt hier die Expression von Smurf2 im Vergleich zur TGFβ-Stimulation um das 2,5-fache niedriger.

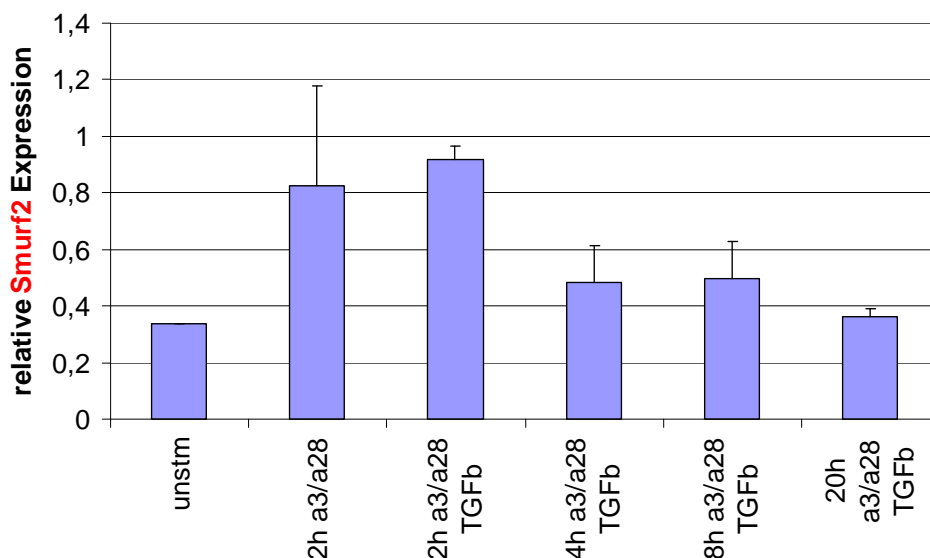


Abbildung 16b: Zeitabhängige Induktion von Smurf2 in CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung der T-Zellen mit αCD3 / αCD28 und TGFβ; n=4; Ergebnis repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

3.6.2 Nachweis TGF β vermittelter Einflüsse auf die Induktion von Smurf2 in TGF β induzierten T regulatorischen Zellen (Tregs)

Wie in der Einleitung erwähnt, spielt TGF β bei der peripheren Toleranz vermutlich durch die Induktion regulatorischer T-Zellen eine wichtige Rolle. Um die Expression und damit seine Rolle bei der Induktion von peripheren Tregs zu untersuchen, wurden naive CD4⁺CD25⁻ aus der Milz von B16/J Mäusen isoliert und für 5 Tage mit TGF β sowie den T-Zell-Aktivatoren α CD3 und α CD28 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen im FACS (*Flourescence activated cell sorter*) auf ihre Foxp3 Expression analysiert. Die Zellen wurden am Tag der Analyse gegen den Oberflächenmarker CD4 und dem Transkriptionsfaktor Foxp3 gefärbt. Die Foxp3 Expression bei TGF β Stimulation lag bei durchschnittlich 40%. Zusätzliche Stimulationen mit HIL6 reduzierten die Foxp3 Induktion, dort lag sie zwischen 10 und 20%. Die Zellen wurden geerntet und mittels der *real time* PCR auf das Gen Smurf2 hin analysiert.

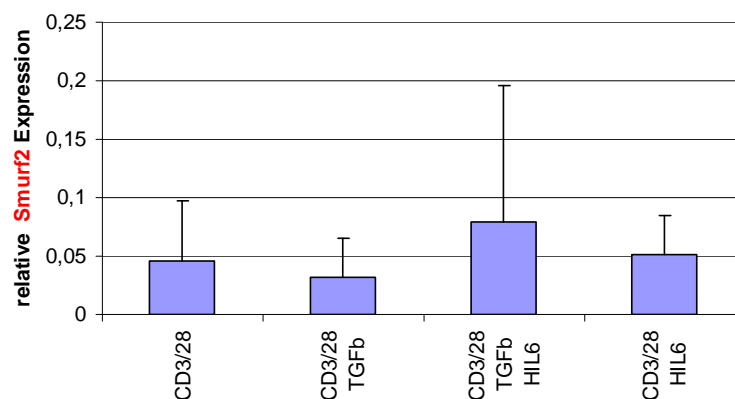


Abbildung 17: Smurf2 Expression in TGF β induzierte Tregs; n=5; Ergebnis repräsentativ für 2 unabhängige Versuche

Bei der Generierung TGF β induzierter T regulatorischen Zellen wird das Smurf2 nicht differenziell reguliert, wie in Abbildung 17 zu erkennen ist. Die Smurf2 Expression ist in peripheren Tregs als auch in den Zellen, die mit HyperIL6 stimuliert worden sind, einem proinflammatorischen Zytokin, das die Differenzierung von CD4⁺ Zellen in TH17 Zellen richtet, nicht signifikant erhöht oder erniedrigt, im Vergleich zur Kontrolle (α CD3/ α CD28).

3.7 Identifikation neuer Spleißformen und einer nc(non coding)RNA von Smurf2 in Maus und Mensch

Da Smurf2 in Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten verstärkt exprimiert wurde und in naiven CD4⁺ T-Zellen durch TGFβ induziert werden konnte, sollte das Smurf2 aus TGFβ stimulierten CD4⁺ T-Zellen kloniert werden. Durch anschließende Sequenzierung der durch Restriktionsverdau erhaltenen positiven Klone konnte eine neue Spleißvariante (dE2Smurf2) und die wild-typ (WT)-Form von Smurf2 in der Maus identifiziert werden (siehe Abbildung 18).

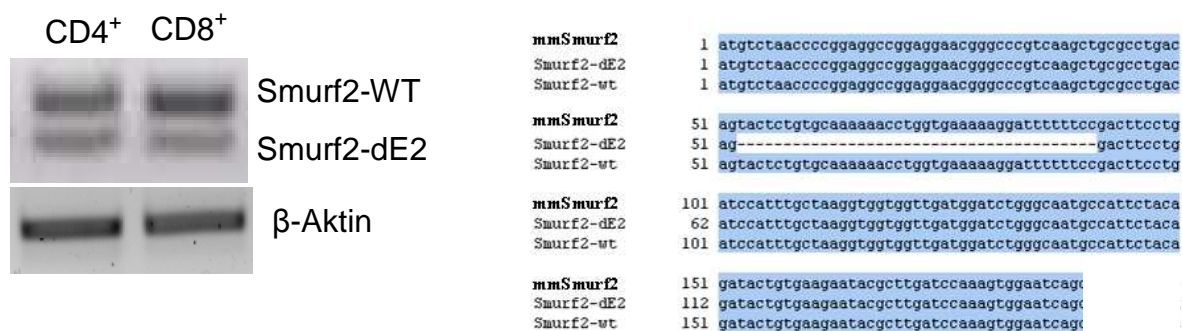


Abbildung 18: Spleißformen von Smurf2 in Maus T-Lymphozyten (A) PCR-Nachweis von WT und dE2Smurf2 in einem 2,5%igen Agarosegel (B) Sequenzvergleich der isolierten DNA von WT und dE2Smurf2, mm=mus musculus

Bei der kurzen Spleißvariante von Smurf2 wird das Exon 2, welches aus 39 Basenpaaren besteht und damit 13 Aminosäuren kodiert, in der C2-Domäne gespleißt (siehe Abbildung 19), so daß aus dem 19 Exon großem WT-Smurf2 ein 18 Exon langes Fragment entsteht. Dieses wird fortlaufend in dieser Arbeit als dE2Smurf2 bezeichnet.

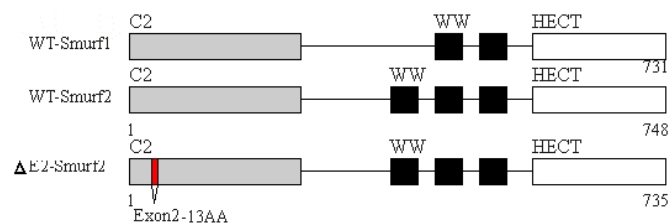


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Domänen von Smurf1, Smurf2 und dE2Smurf2

Auch in menschlicher cDNA, gewonnen von CD4⁺ Zellen aus Blut eines Morbus Crohn Patienten, konnte die Spleißvariante identifiziert werden, so daß auch eine humane Relevanz für die dE2Smurf2 Form besteht. Weiterhin konnte noch eine weitere neue Spleißform (obere Bande) von Smurf2 in menschlichen Lymphozyten identifiziert werden, die nicht in der Maus zu finden ist (siehe Abbildung 20a). Sie enthält einen Einschub eines Exons zwischen Exon1 und 2 (siehe Sequenzalignment, roter Kasten, Abbildung 20a).

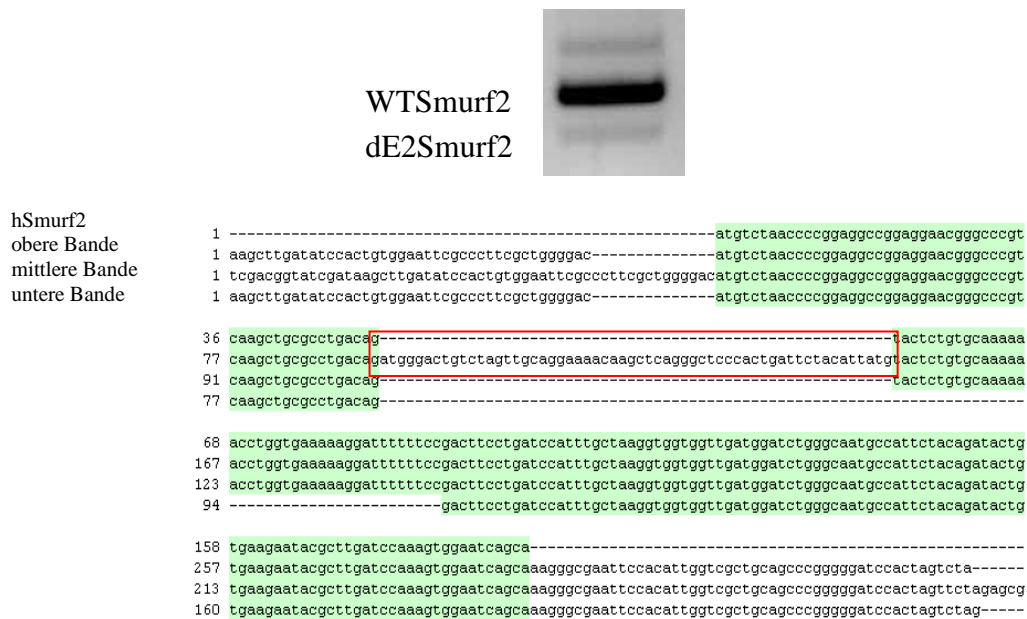


Abbildung 20a: Vorkommen verschiedener Spleißformen von Smurf2 in menschlicher CD4⁺ cDNA; PCR (2,5%iges Agarosegel) und Sequenzalignment der klonierten DNA; roter Kasten=Einschub eines Exons zwischen Exon 1 und 2 was zur Entstehung einer neuen Spleißform von Smurf2 in menschlichen CD4⁺ T-Zellen führt (obere Bande im Agarosegel)

Zudem konnte in murinen CD4⁺ T-Zellen, die mit TGFβ stimuliert worden sind, eine bisher noch nicht bekannte nicht kodierende RNA (ncRNA) identifiziert werden. Die nicht kodierende RNA enthält neben dem gespleißten Exon2 einen Einschub eines Introns/Exons zwischen Exon 3 und 4 der WT-Sequenz, welches im Leseraster nach 165 Basenpaaren ein Stopkodon kodiert (siehe Abbildung 20b, roter Kasten). Dieses führt letztendlich zur Beendigung der Translation des Proteins, welches theoretisch eine Größe von 55 Aminosäuren besitzt. Die Länge der klonierten cDNA (umgeschriebene mRNA) beträgt aber 2,2 kb, so daß ein Protein einer Größe von 748 Aminosäuren kodiert werden müßte. Mit Hilfe der *in vitro* Translation konnte gezeigt werden, daß das theoretische Protein von 55 Aminosäuren nicht gebildet wird (Daten nicht gezeigt). Damit erfüllt das 2,2 kb große mRNA Fragment das Kriterium einer nicht kodierenden RNA.

```

WTSmurf2      1  atgtctaaccgccggaggccggagggaacgggcccgtcaagctgcgcctgacagtactctgtgcaaaaaact
dE2Smurf2    1  .....
ncRNA Smurf2  1  .....

WTSmurf2     71  tggtgaaaaaggattttttccgtcttcctgatccatttgctaaggtggtagttgatggttctgggcagtg
dE2Smurf2    53  .....
ncRNA Smurf2  53  .....

WTSmurf2     141 ccattctacagatactgtgaagaacacacttgatccaaagtggaatcagcattatgacctg-----
dE2Smurf2    102 .....
ncRNA Smurf2  102 .....cagtgagtg

WTSmurf2     -----
dE2Smurf2     -----
ncRNA Smurf2  172 gaaatctacaagagtctgctcgctcaaggcctgcataataggaagaagcaggggaaaagcggttacaaac

WTSmurf2     202 -----tatatcggaaagtctgattcagttacgatcagcgtat
dE2Smurf2    163 .....
ncRNA Smurf2  242 agctttgttctgcagcattaaaaatgtaacagg.....

WTSmurf2     239 ggaatcataagaagatccataaagaagcaaggtgctggatttcttggttggtctgctcttcttccaatgc
dE2Smurf2    200 .....
ncRNA Smurf2  312 .....

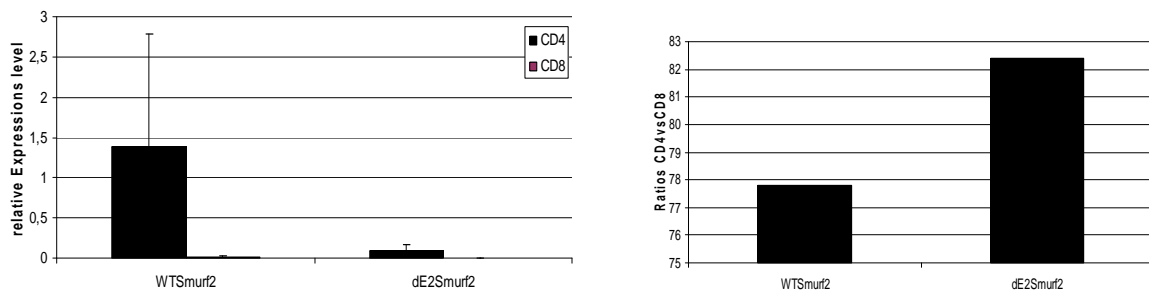
WTSmurf2     309 catcaaccgcctcaaggacactggttatcagaggttgatttatgcaaactggggccaaatgacaatgat
dE2Smurf2    270 .....
ncRNA Smurf2  382 .....

WTSmurf2     379 acagttcaggacaaaattgtagtaagtcttcagtcagagaccgaataggcacgggaggacaagttgtgg
dE2Smurf2    340 .....
ncRNA Smurf2  452 .....
    
```

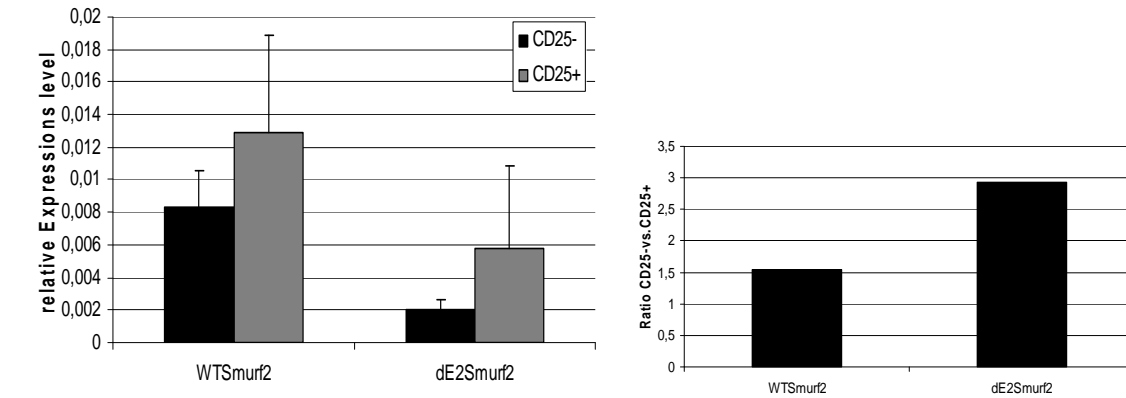
Abbildung 20b: Sequenzvergleich zwischen WTSmurf2, dE2Smurf2 und der nicht kodierenden RNA, roter Kasten=im Leseraster vom Startkodon ATG vorkommendes Stopkodon (tga) des eingeschobenen Exons/Introns

3.8 Expression der Spleißformen von Smurf2 in T-Lymphozyten, Subpopulationen und Tumorgewebe

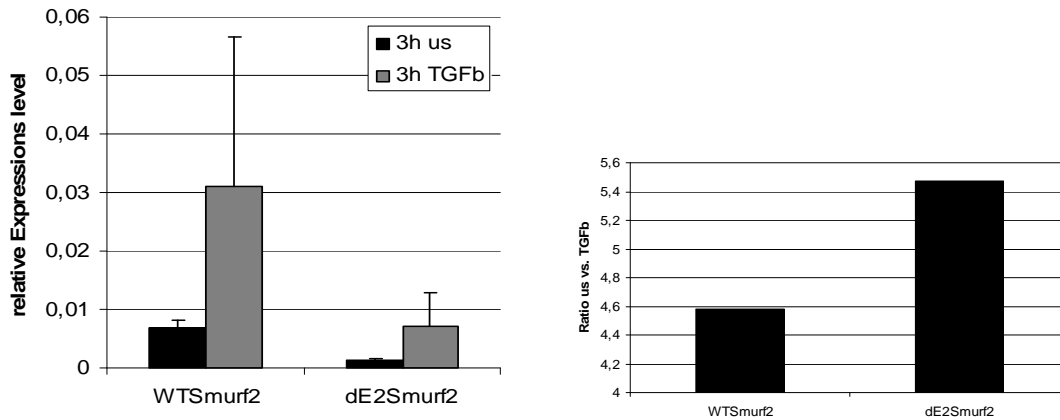
Um die Expression der verschiedenen Smurf2 Formen in den verschiedenen Zellen und Gewebe zu untersuchen, wurde die cDNA von Tumorgewebe (Abbildung 21d), CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 21a) sowie CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ analysiert (Abbildung 21b). Zusätzlich wurde noch die Expression der Spleißformen bei CD4⁺ T-Zellen analysiert, die mit TGFβ stimuliert wurden (Abbildung 21c). Dazu wurden Primer verwendet, die die verschiedenen Spleißformen getrennt voneinander in der *real time* PCR amplifizieren.



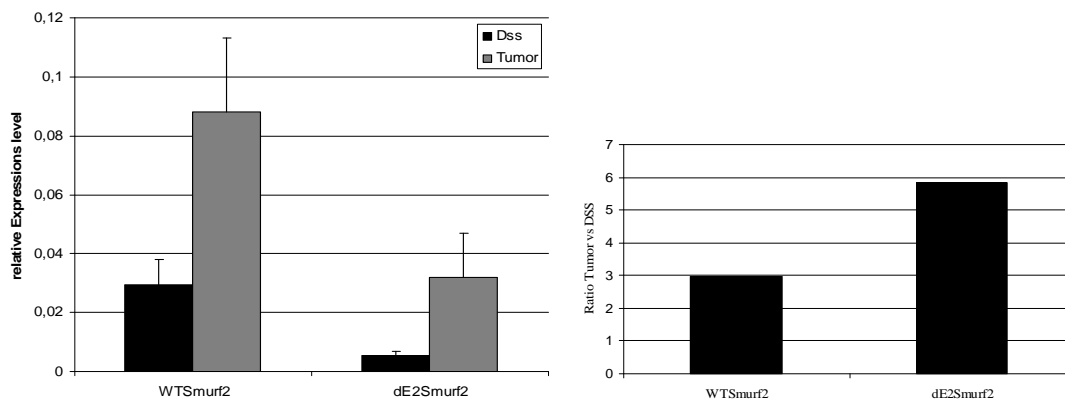
A



B



C



D

Abbildung 21: Expression der Spleißformen von Smurf2 in verschiedenen Zelltypen und Geweben (A) Expression von WTSmurf2 und dE2Smurf2 in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und deren Ratio: CD4/CD8 (B) Expression von WTSmurf2 und dE2Smurf2 in CD25⁻ und CD25⁺ T-Zellen und deren Ratio: CD25⁻/CD25⁺ (C) Expression von WTSmurf2 und dE2Smurf2 in mit TGFβ stimulierten T-Zellen und deren Ratio: 3hus/3hTGFβ (D) Expressionslevel von WTSmurf2 und dE2Smurf2 in Tumorgewebe und Tumorfremem Gewebe (Dss) und deren Ratio: DSS/Tumor

Wie in Abbildung 21 gezeigt, war die allgemeine Expression von WTSmurf2 in allen Zellen und Gewebetypen höher als die der Spleißform dE2Smurf2. Beide Formen von Smurf2 waren auch in der *real time* PCR in den entsprechenden Geweben erhöht, die auch in der quantitativen PCR mit den konventionellen Primern positiv getestet wurden. So war die Expression von WTSmurf2 und dE2Smurf2 im Tumorgewebe allgemein höher als die Expression beider Formen im Tumorfremem Gewebe (Abbildung 21 D). Berechnet man allerdings das Verhältnis der Induktion von WTSmurf2 zwischen DSS und Tumorgewebe sowie die Induktion von dE2Smurf2 zwischen DSS und Tumorgewebe, so war die Induktion der Spleißform dE2Smurf2 stärker als die der WTSmurf2 Form (siehe Abbildung D). Dies spiegelte sich in allen getesteten Zelltypen wieder (siehe Abbildung 21 A, B und C). Somit scheint die Spleißform dE2Smurf2 im Vergleich zur WTSmurf2 Form in CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ Zellen sowie in Zellen, die mit TGFβ stimuliert worden sind, im Verhältnis stärker reguliert zu sein.

3.9 Veränderung der 3D-Struktur der C2-Domäne bei dE2Smurf2

Das Arbeiten mit der gespleißten dE2Smurf2 Form führt zwangsläufig zur Frage, welche Funktion das Spleißen der mRNA in der C2-Domäne hat, sowie welche Rolle das 39bp große Exon2 in der C2-Domäne spielt. Weiterhin ist es wichtig zu wissen, welche Rolle das Spleißen auf die Funktion der Ubiquitin Ligase hat und damit auf die TGFβ Signalweiterleitung. Dazu wurde die 3D Topologie der C2-Domänen von WTSmurf2 und dE2Smurf2 verglichen. Hierbei wurden die Sequenzen in die Swissprot Datenbank eingegeben, die dann die Kristallstruktur beider Formen generierte. Wie in Abbildung 22b gezeigt, veränderte sich die Konformation der C2-Domäne nach dem Spleißen des Exons2, die normalerweise aus 8 β Faltblattstrukturen besteht. Dabei werden die vier antiparallelen β Strukturen über zwei α Helices, die die β Faltblattstrukturen 5 und 6 sowie 6 und 7 verbindet, miteinander verbunden (PDB ID: 2JQZ).

Die Struktur der C2-Domäne von Smurf2 ist sehr ähnlich der anderer C2-Strukturen, wie z.B. von Protein Kinase Cα. Die C2-Domäne interagiert dabei mit phosphatidyl mono-, bi-, and triphosphaten: PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃, in einer Ca²⁺-unabhängigen Weise (Wiesner 2007). Für die C2-Domäne wird beschrieben, daß sie mit Phospholipiden der Zellmembran interagiert, um dann den TGFβRII zusammen mit dem Smad7 abzubauen und damit den TGFβ Signalweg negativ zu regulieren (Kavsak 2000; Ebisawa, Fukuchi et al. 2001; Ogunjimi 2005).

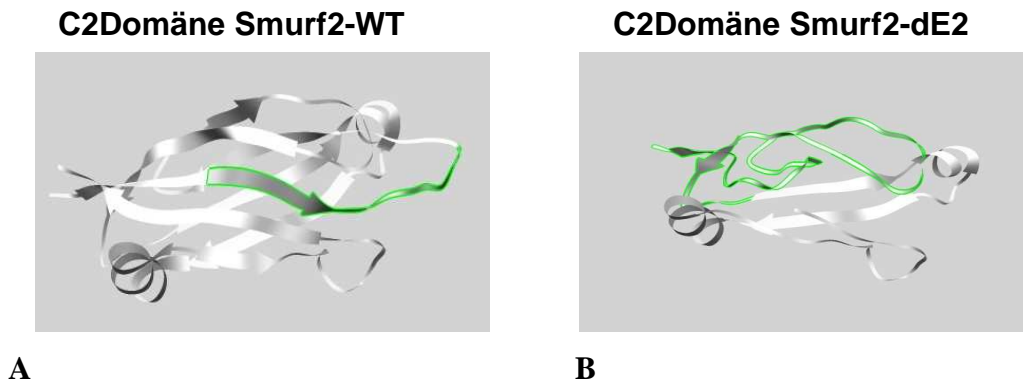


Abbildung 22: 3D-Struktur der C2-Domäne von WT Smurf2 (A) und dE2 Smurf2 (B); dargestellt durch das Programm UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)

3.10 Lokalisation von WT-Smurf2 und dE2Smurf2 in Cos-Zellen

Um die Lokalisation der verschiedenen Formen von Smurf2 in der Zelle *in vivo* zu untersuchen, wurden das WT Smurf2 und dE2 Smurf2 in einen GFP exprimierenden Vektor ligiert und dann transient in Cos7 Zellen überexprimiert. Nach 12h konnte die Expression im konfokalen Mikroskop untersucht werden. Dabei konnte festgestellt werden, daß es Unterschiede in der Lokalisation zwischen WT Smurf2 und dE2 Smurf2 gab (siehe Abbildung 23).

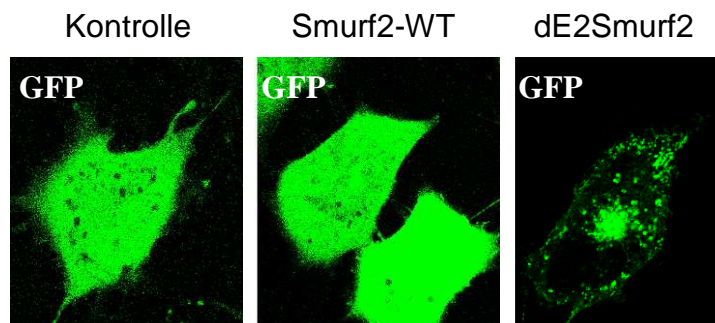


Abbildung 23: Lokalisation der Smurf2 GFP-Expression in Cos7 Zellen; Ergebnis repräsentativ für 10 unabhängige Versuche

So zeigte sich eine über die ganze Zelle verbreitete Expression von WT Smurf2 in Cos7 Zellen während dE2 Smurf2 eher in „spots“ lokalisiert war. Beide Formen von Smurf2 konnten im Western Blot als Membranständige Proteine bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Um zu analysieren, in welchen Kompartimente der Zelle dE2 Smurf2 vorkommt, wurden verschiedene Kompartimente mit Farbstoffen markiert. So konnte beobachtet werden, daß Lysosomen mit dem dE2 Smurf2-GFP co-lokalisieren (siehe Abbildung 24).

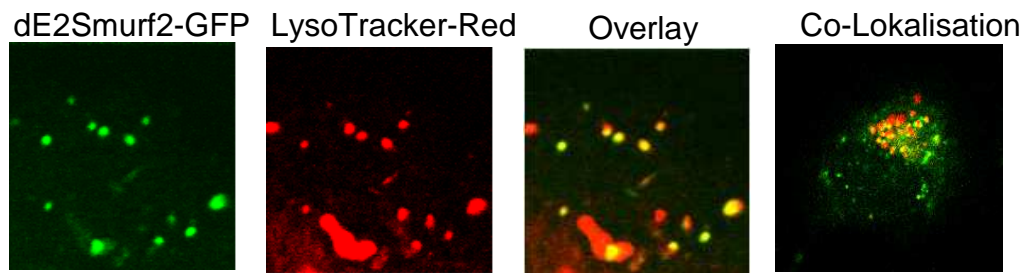


Abbildung 24: Co-Lokalisation von dE2Smurf2 mit Lysosomen; grün=dE2Smurf2 rot=Lysosomen

Dabei wurden die Zellen transient transfiziert, um am nächsten Tag die Zellen mit dem RedLysoTracker (Invitrogen) für 10 min im Brutschrank zu färben. Danach erfolgte die Auswertung durch das Laser Scanning Mikroskop (LSM). Die Überlagerung von grün fluoreszierendem dE2Smurf2 und rot markierten Lysosomen resultierte in gelben „spots“, was die Co-Lokalisation des Proteins mit den Lysosomen anzeigte. Wie in der Abbildung 24 zu sehen ist, liegt keine vollständige Co-Lokalisation vor. Dies ist erkennbar an grünen „spots“, die nicht durch rot überlagert werden. Daher wurde nach weiteren involvierten Kompartimenten gesucht.

Es ist bekannt, daß Lysosomen aus frühen Endosomen gebildet werden. Dabei bilden sie erst mittlere, dann späte Endosomen und schließlich späte verdauende Lysosomen aus (Ciechanover 2004).

So wurden die Zellen ebenfalls auf Co-Lokalisation zwischen dE2Smurf2 und frühen Endosomen hin untersucht. Dazu wurden die Zellen transient mit dem dE2Smurf2 GFP Konstrukt transfiziert und am nächsten Tag fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper (EEA1, Abcam) gegen frühe Endosomen gefärbt. Auch hier konnten Colokalisationen zwischen dE2Smurf2 und Endosomen festgestellt werden (siehe Abbildung 25).

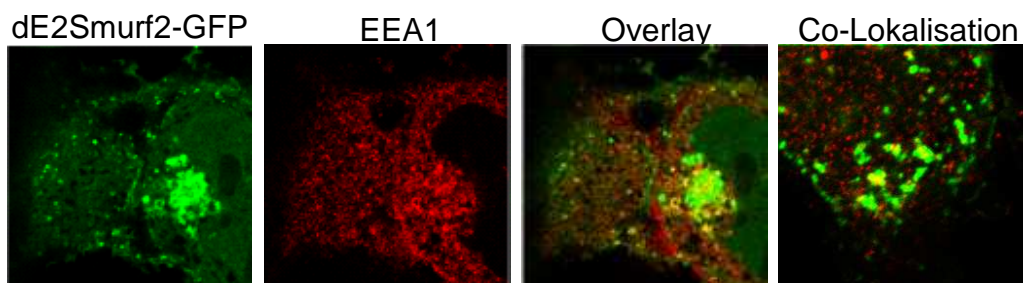


Abbildung 25: Co-Lokalisation von dE2Smurf2 mit frühen Endosomen; grün=dE2Smurf2 rot=frühe Endosomen

Somit konnte gezeigt werden, daß dE2Smurf2 eine andere Lokalisation in der Zelle hat als die WT-Form und wahrscheinlich im endosomalen-lysosomalen Abbau von Proteinen involviert ist. Es ist bereits bekannt, daß verschiedene Ubiquitin Ligasen neben dem proteasomalen Proteinabbau, wie es für die Ubiquitin Ligase WTSmurf2 bekannt ist, auch im lysosomalen Abbau von Proteinen eine Rolle spielen (Kavsak 2000).

3.11 TGF β Signalweg von WTSmurf2 und dE2Smurf2 *in vitro*

Wie in der Einleitung beschrieben, reguliert das WTSmurf2 den TGF β Signalweg auf negative Weise, indem es zusammen mit Smad7 an den TGF β Rezeptor bindet und ihn für den proteasomalen Abbau ubiquitiniert (Kavsak 2000). Aber nicht nur der Rezeptor ist ein Zielprotein für die Degradation von Smurf2, sondern auch die Smad-Moleküle (Massague 1999; Lin 2000; Moren, Imamura et al. 2005). Aufgrund der veränderten Lokalisation von WTSmurf2 und dE2Smurf2 wurde der TGF β Signalweg in Cos7 Zellen näher untersucht, um zu analysieren, ob sich aufgrund der veränderten Lage der Ubiquitin Ligase in der Zelle sich auch Unterschiede in ihrer Funktion ergeben. So wurden Cos7 Zellen mit den DNA-Konstrukten von WTSmurf2, dE2Smurf2 und einem Kontrollvektor transient transfiziert und für 24h mit TGF β behandelt. Am nächsten Tag wurden aus den Zellen Gesamtproteine extrahiert. Diese Proteinextrakte wurden dann mit mittels Western Blot auf Unterschiede des Phosphorylierungsstatus der Moleküle Smad2 und Smad3 sowie auf eine Veränderte Expression des TGF β RII hin untersucht. Da WTSmurf2 zusammen mit Smad7 den TGF β RII zum Proteinabbau ubiquitiniert und damit degradiert (siehe Abbildung 26b), ist nur noch eine geringe Signalweiterleitung des TGF β über die Moleküle Smad2 und Smad3 in den Zellkern möglich. Dies drückte sich in einem geringeren Phosphorylierungsstatus der Moleküle aus. Wie die Abbildung 26a zeigt, war nach der Transfektion der Zellen mit dem WTSmurf2-Konstrukt der Phosphorylierungsstatus der Moleküle pSmad2 und pSmad3 niedriger als bei den Zellen, die mit dem Kontrollvektor behandelt wurden. Die Basalen Level der Smad-Moleküle waren dahingehend unverändert, so daß man davon ausgehen konnte, daß die Unterschiede der phosphorylierten Proteine durch eine geringere Phosphorylierung und nicht durch Veränderung des gesamt Proteinlevels zu begründen war. Interessanterweise konnte bei der Spleißform von Smurf2 (dE2Smurf2) eine gesteigerte Signalweiterleitung in der Zelle beobachtet werden. Sowohl der TGF β RII wurde verstärkt exprimiert, als auch die daraus resultierende gesteigerte Phosphorylierung der Smad-Moleküle nach TGF β Behandlung konnte festgestellt werden.

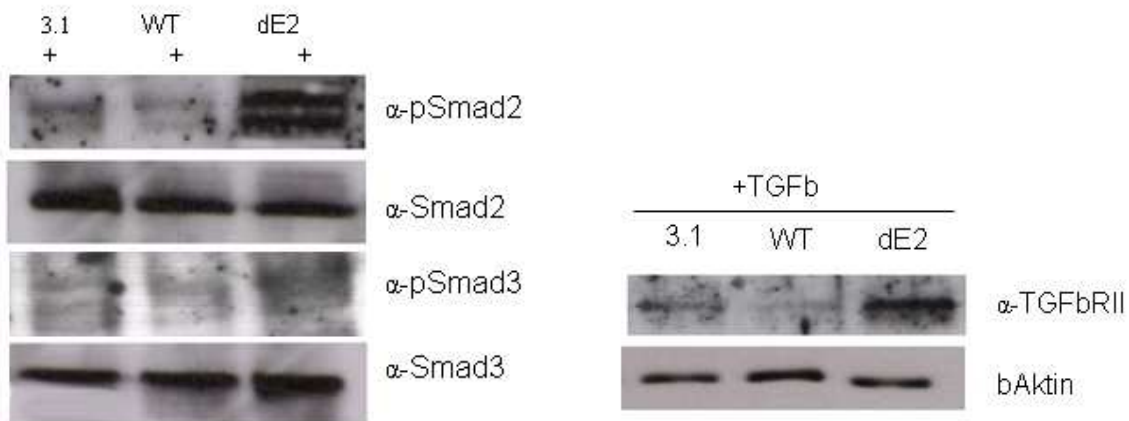
**A****B**

Abbildung 26: TGFβ Signalweg von WTSmurf2 und dE2Smurf2 in Cos7 Zellen (A) Western Blot gegen Smad2 und Smad3 (B) Western Blot gegen TGFβRII; Ergebnis ist repräsentativ für 5 unabhängige Versuche

Somit implizieren die Ergebnisse, daß die Spleißform von Smurf2 den TGFβ Signalweg nicht negativ reguliert, wie es für die WT-Form postuliert ist, sondern positiv. Ein weiteres Experiment, welches die Promotoraktivität von Smad3 mit Hilfe der Luciferase mißt, bestätigte die Annahme der positiven Regulierung des Signalweges durch dE2Smurf2. Für den sogenannte Reporterassay (siehe Abbildung 27) wurden ebenfalls Cos7 Zellen mit den DNA Konstrukten von Smurf2 und einem Kontrollvektor (3.1) zusammen mit dem Smad3 (CAGA) Promotor-Luciferasevektor transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Proteine isoliert, die anschließend im Luminometer nach Zugabe des Substrates auf ihre Lichtwerte gemessen worden sind. Eine gesteigerte Smad3 Phosphorylierung resultierte in einer gesteigerten Smad3-Promotoraktivität. Dadurch erfolgt eine gesteigerte Expression der Luciferase, die nach Zugabe ihres Substrates dieses in einer enzymatischen Reaktion abbaut bei der Licht emittiert wird. Dies konnte dann im Luminomter gemessen werden. Die Lichtwerte wurden mit βGalaktosidasewerten abgeglichen, um die eigentliche Promotoraktivität zu ermitteln. Abbildung 27 bestätigte die Hinweise, die im Western Blot eine positive Regulierung des TGFβ Signalweges durch dE2Smurf2 zeigten. Auch hier war eine deutliche Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (3.1) um das 10fache nach Stimulation mit TGFβ zu erkennen. DE2Smurf2 aktivierte den Smad3-Promotor, währenddessen WTSmurf2 inhibierend auf die Aktivität des Promotors wirkte. Interessanterweise konnte mit einer Überexpression der nicht kodierenden RNA zusammen mit dem dE2Smurf2 Protein die Smad3-Promotoraktivität um das 100 fache gesteigert werden.

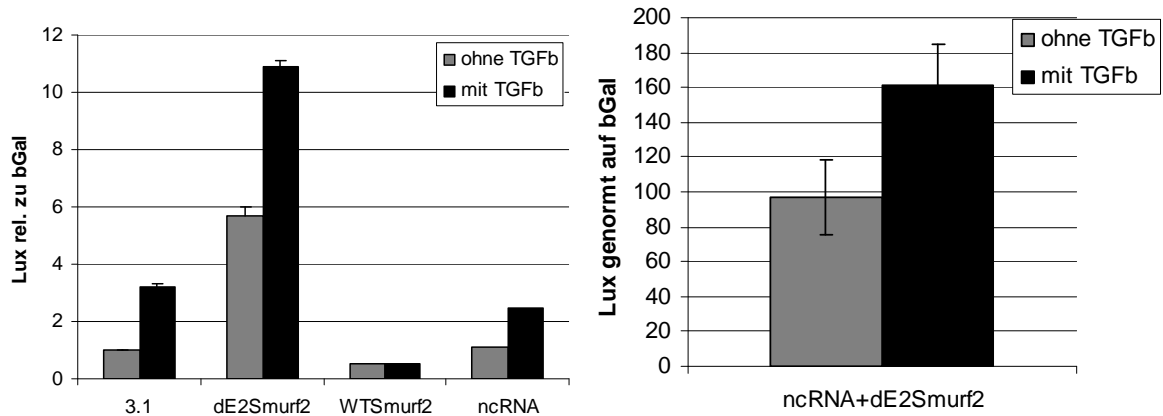


Abbildung 27: Smad3 (CAGA) Promotor Luciferase assay; ncRNA=nicht kodierende RNA; 3.1=Kontrollvektor; n=3; Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

3.12 Herstellung und Charakterisierung der dE2Smurf2 T-Zell spezifischen Maus

Aufgrund der bisher gewonnenen Ergebnisse und interessanten Hinweise der Spleißvariante von Smurf2 auf den TGF β Signalweg sowie seiner Lokalisation in der Zelle, sollte eine T-Zell spezifische transgene Maus hergestellt werden, in der die Auswirkung des dE2Smurf2-Gens auf das Immunsystem *in vivo* untersucht werden sollte.

dE2Smurf2 lag dabei unter der Kontrolle des humanen CD2-Promotors (Zhumabekov T. 1995), um eine T-Zell spezifische Überexpression des Proteins zu erreichen (siehe Abbildung 28).

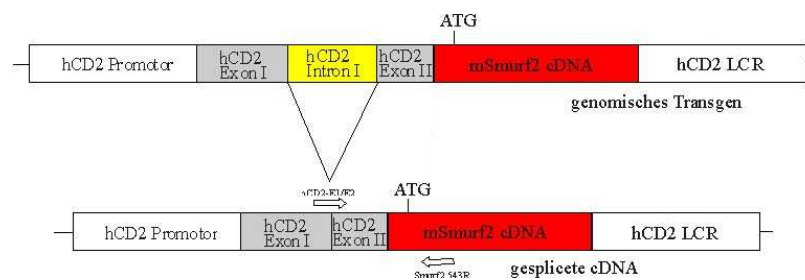


Abbildung 28: Schematische Darstellung des dE2Smurf2 DNA-Konstruktes unter Kontrolle des humanen CD2 Promotors; ATG=Startkodon

Die Herstellung der transgenen (TG) Maus wurde im Material und Methoden Teil beschrieben (2.6.1).

3.12.1 Charakterisierung der transgenen Mäuse

Nach Erhalt der ersten transgentragenden Tiere wurden deren Nachkommen auf die T-Zell spezifische Expression von Smurf2 sowie auf die Überexpression des dE2Smurf2 Gens auf

mRNA und Proteinebene in CD4⁺ T-Zellen untersucht (siehe Abbildung 29 und 30). Dabei konnte festgestellt werden, daß die transgenen Tiere nur in T-Zellen aus Milz und Thymus sowie in intra-epithelialen Lymphozyten das Smurf2 Konstrukt enthalten jedoch nicht in CD11c oder B-Zellen (Abbildung 29). Die Expression des dE2Smurf2-Gens ist somit T-Zell spezifisch.

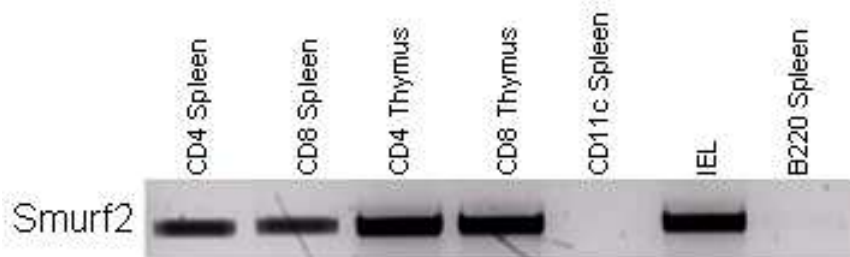
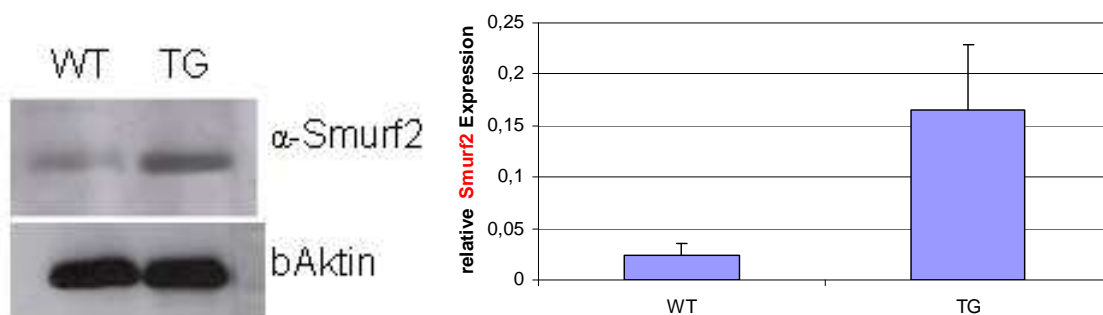


Abbildung 29: Transgenspezifische PCR verschiedener Zelltypen aus Milz (spleen), Thymus und intra-epithelialen Lymphozyten einer Maus

Weiterhin konnte eine Überexpression von dE2Smurf2 auf mRNA und Proteinebene bestätigt werden (siehe Abbildung 30).



A

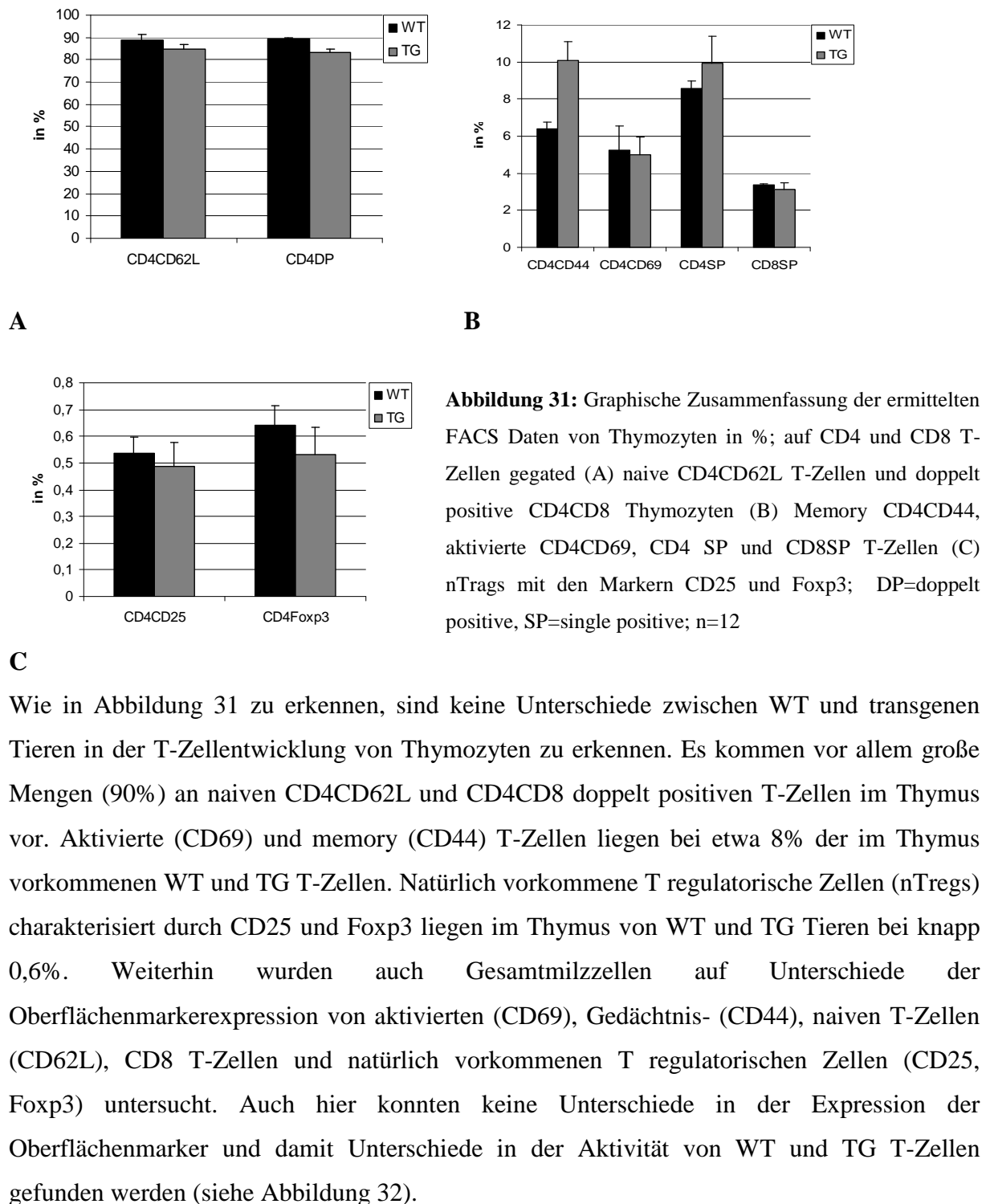
B

Abbildung 30: (A) Smurf2 Western Blot von CD4⁺ Gesamtproteinextrakten aus wild-typ (WT) und transgenen (TG) Mäusen (B) *real time* PCR gegen Smurf2 von cDNA gewonnen aus wild-typ (WT) und transgenen (TG) CD4⁺ Zellen; n=10

3.12.2 T-Zell Charakterisierung von Thymus und Milz Zellen

Um den Phänotyp der transgenen Maus zu ermitteln, wurden die Entwicklung der T-Zellen sowie ihre Differenzierung anhand deren Oberflächenmarker näher untersucht. Dafür wurden Gesamtmilzzellen und Thymozyten isoliert und mit Antikörpern gegen CD4, CD8, B220, CD62L, CD25, CD44, CD69 und Foxp3 gefärbt. Thymozyten wurden auf Unterschiede in der

T-Zellentwicklung von CD4⁺CD8⁺ doppelpositiven zu CD4⁺ und CD8⁺ einzelpositiven Zellen sowie auf Oberflächenmarkern der T-Zelldifferenzierung analysiert.



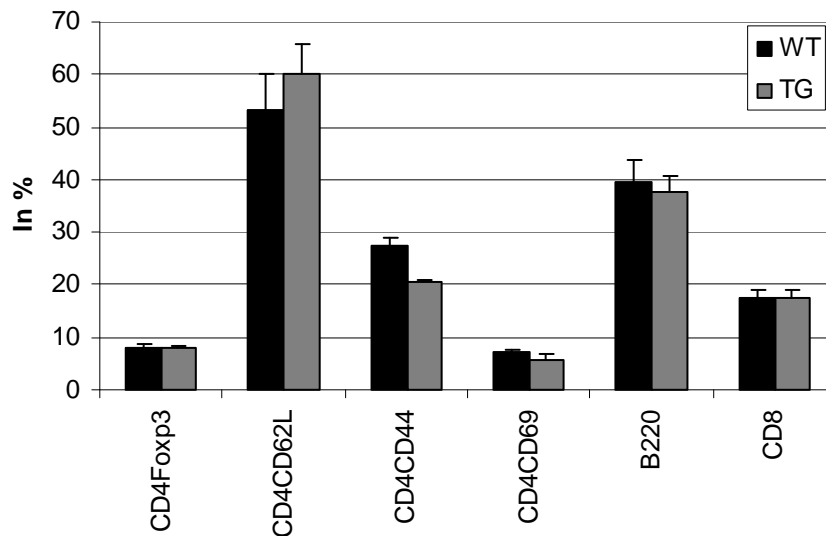


Abbildung 32: Graphische Zusammenfassung der FACS Daten von Gesamtmilzzellen in %; n=12

3.12.3 Veränderung des TGF β Signalweges in CD4 T-Zellen transgener Mäuse

Wie in Kapitel 3.11 gezeigt, konnte eine positive Veränderung des TGF β Signalweges nach Überexpression der dE2Smurf2 Form in Zellen *in vitro* gezeigt werden. Um die Daten auch *in vivo* zu bestätigen wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Milz transgener und WT-Mäuse isoliert, aus ihnen Gesamtproteinextrakte gewonnen, die dann im Western Blot auf den TGF β RII und die Smad-Moleküle 2 und 3 hin analysiert wurden. Wie in Abbildung 33 zu erkennen, konnte auch *in vivo* eine gesteigerte Expression des TGF β RII (A) und eine gesteigerte Phosphorylierung von Smad2 und 3 (B) ermittelt werden. So ist festzuhalten, daß mit einer Überexpression des dE2Smurf2 eine positive Regulation des TGF β Signalweges einhergeht und nicht wie postuliert der TGF β RII durch WTSmurf2 abgebaut und somit das Signal in den Zellkern terminiert wird (Kavsak 2000; Ebisawa, Fukuchi et al. 2001; Ogunjimi 2005).

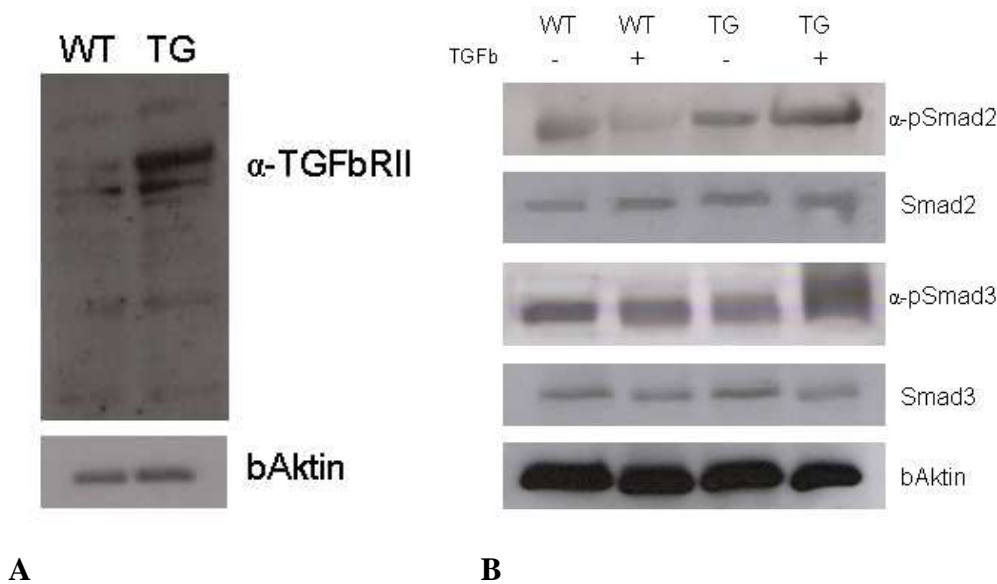


Abbildung 33: TGFβ Signalweg in murinen CD4 T-Zellen (A) Western Blot TGFβRII von Proteinen aus WT und TG CD4⁺ T-Zellen (B) Western Blot gegen pSmad2 und pSmad3 aus Proteinen von WT und TG CD4⁺ T-Zellen stimuliert mit und ohne TGFβ; Ergebnis repräsentativ für 5 Versuche

Um auszuschließen, daß die veränderte Rezeptorexpression in den transgenen T-Zellen durch das Einbringen des Vektor-Konstruktes in die genomische DNA zurückzuführen ist, wurden naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Bl6/J Mäusen isoliert und diese mit Hilfe der Elektroporation (Amaxa; Programm X-01) transient transfiziert. Als Kontrolle diente ein Leervektor (3.1) und die Smurf2 Konstrukte WT und dE2. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 24h mit bzw. ohne TGFβ stimuliert. Am nächsten Tag wurden dann die Zellen gegen CD4-FITC und TGFβRII-PE gefärbt und anschließend im Fluorescence activated cell sorter (FACS) auf ihre Oberflächenantigene gemessen. Wie in Abbildung 34 zu sehen, zeigten die Zellen, die mit der Spleißform von Smurf2 (dE2Smurf2) transfiziert worden sind eine stärkere Expression des TGFβRII als die Kontroll- (3.1) oder die WTSmurf2 Zellen, die durch Stimulation mit TGFβ auf 52% gesteigert wurde. Die Kontrolle und mit WTSmurf2 transfizierten CD4⁺ Zellen wiesen eine basale TGFβRII Expression von 9-14% auf, welche durch TGFβ Stimulation minimal erhöht wurde.

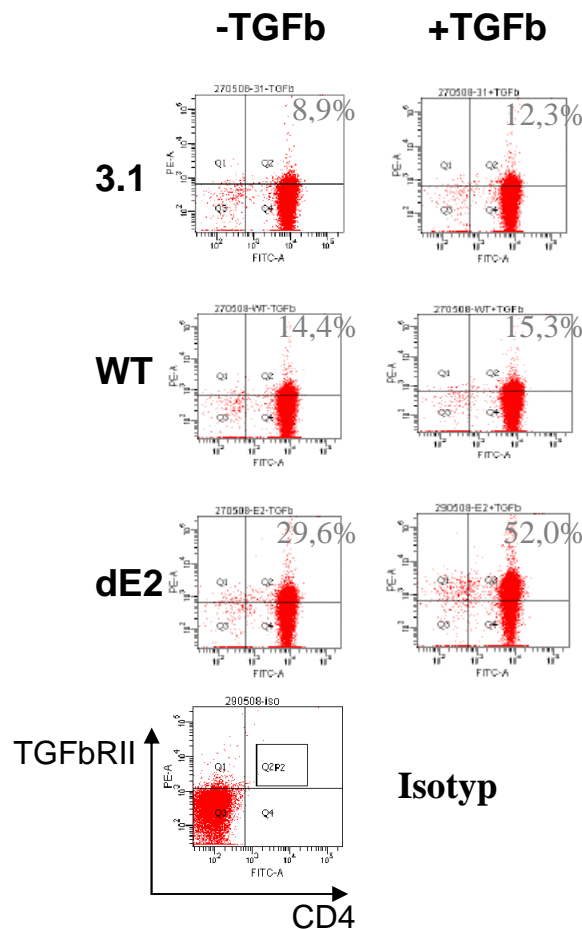


Abbildung 34: FACS Analyse von naiven T-Zellen nach transienter Transfektion mit Kontrollvektor (3.1), WTsmurf2 (WT) und dE2smurf2 (dE2) mit und ohne Stimulation von TGFβ; Isotyp=Kontroll FACS Antikörper, zeigt unspezifische Färbung des TGFβRII; Ergebnis repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

3.12.4 CD4⁺ T-Zellanalyse: Differenzierung, Proliferation und Apoptose

Wie in der Einleitung beschrieben, hat das TGFβ eine zentrale Rolle in der Immunregulation und Differenzierung von T-Zellen. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse von dE2smurf2, die zeigen, daß die dE2smurf2 transgenen Mäuse eine gesteigerte Expression des TGFβRII haben und damit sensitiver gegenüber Stimulationen und das Einwirken von TGFβ sind, wurde die Rolle von dE2smurf2 in der Proliferation, T-Zell-Differenzierung und Apoptose analysiert. Für die Untersuchung auf Veränderungen in der Proliferation wurden naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus wild-typ und transgenen Mäusen isoliert, CFSE gefärbt und für 5 Tage mit αCD3/αCD28 sowie αCD3/αCD28 und verschiedenen Konzentrationen von TGFβ stimuliert. Der CFSE-Farbstoff lagert sich im Zytoplasma der Zelle ein, der sich nach jeder Proliferation der Zelle weiter ausdünn. Am Tag der Analyse wurden die Zellen im FACS auf ihre gebildeten Populationen gemessen (siehe Abbildung 35). Nach einer polyklonalen

Aktivierung der Zellen mit α CD3/ α CD28 konnte eine starke Proliferation beobachtet werden. Diese Hauptpopulation von Zellen ist im Histogramm bei einem CFSE Faktor von 10^1 abgebildet. Wurden die Zellen jedoch mit TGF β stimuliert, so zeigten vor allem die transgenen T-Zellen eine starke Inhibition der Proliferation schon bei geringen Konzentrationen (0,5 bis 2ng) an TGF β . Dies äußerte sich in einer Verschiebung der Hauptpopulation des Histogramms nach rechts (rot). Das TGF β hat somit eine stärkere Wirkung auf die transgenen CD4⁺ T-Zellen als auf die wild-typ Zellen, welches die Zellen an ihrer Proliferation hindert.

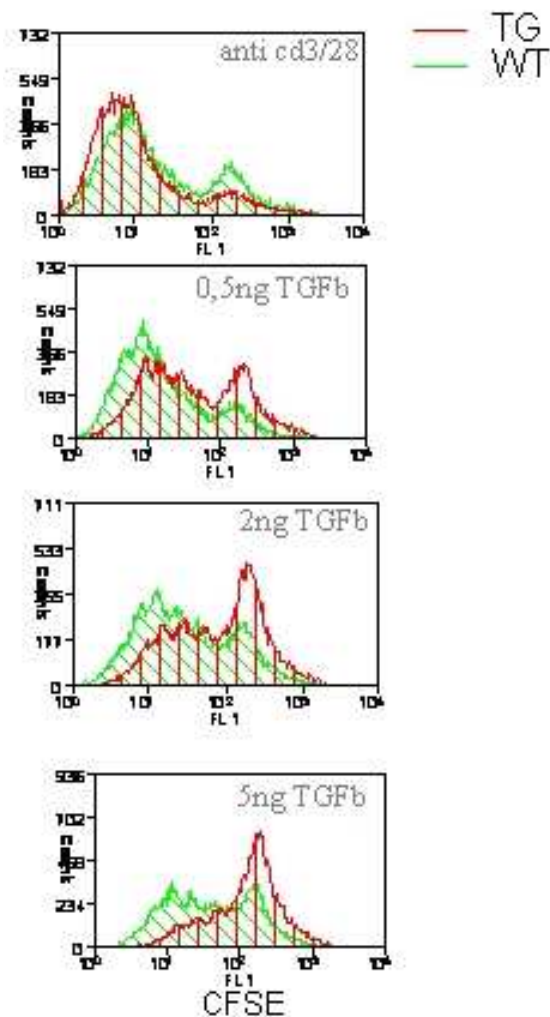


Abbildung 35: CFSE Proliferations assay von WT und TG CD4⁺ T-Zellen; WT=wild-typ TG=transgen; Ergebnis repräsentativ für 6 unabhängige Versuche

Um zu analysieren, ob dE2Smurf2 eine Rolle bei der Differenzierung von naiven T-Zellen in TH1 und TH17 Zellen spielt, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus wild-typ und transgenen Mäusen isoliert und dann mit verschiedenen Zytokinen in Richtung TH1 oder TH17 differenziert. So konnte bei der TH17 Stimulation beobachtet werden, daß die

transgenen Zellen nach Zugabe von IL6 und geringer Konzentration an TGF β stärker in Richtung TH17 differenzierten als die wild-typ Zellen. Dies äußerte sich in einer stärkeren Produktion des Zytokins IL17A (siehe Abbildung 36).

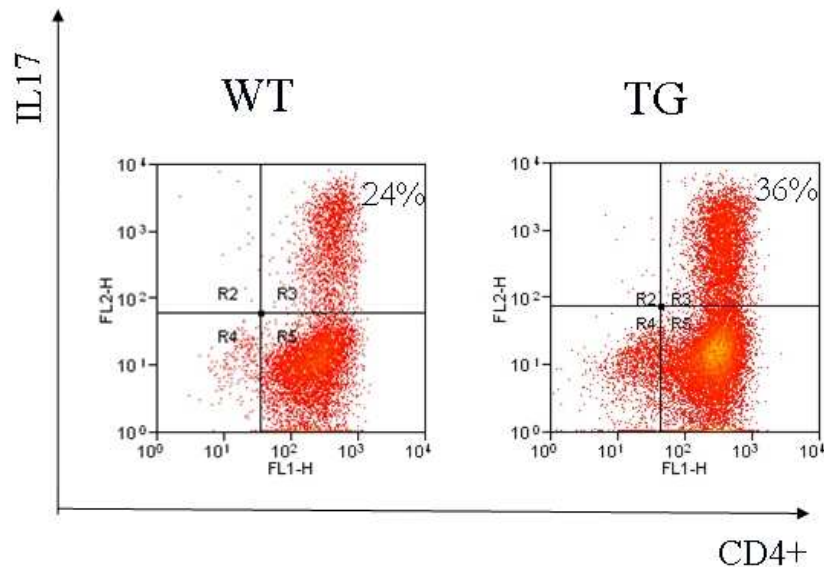


Abbildung 36: TH17 Differenzierung von WT und TG CD4⁺CD25⁻ Zellen; Daten repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

Interessanterweise spielt dE2Smurf2 somit nicht nur in der Proliferation eine Rolle, sondern wirkt auch bei der TH17 Differenzierung ein, was aufgrund der gesteigerten TGF β RII Expression auch zu erwarten war. Bei der TH1 Differenzierung konnte ebenfalls ein Effekt von dE2Smurf2 auf die Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 37). So wurde, durch dE2Smurf2 die Produktion an INF γ produzierenden TH1 Zellen signifikant unterdrückt. Wie in der Einleitung erwähnt, wirkt das TGF β inhibierend auf die Differenzierung von T-Zellen in TH1 und TH2 Effektorzellen samt ihrer Produktion an proinflammatorischen Zytokinen wie INF γ und IL4. Doch interessanterweise zeigte eine Stimulation zu TH1-Zellen zusammen mit geringen Konzentrationen von TGF β eine signifikant gesteigerte Produktion von INF γ in TG T-Zellen. Währenddessen zeigten die WT Zellen eine um das 4-fach geringere Produktion an INF γ durch TH1 Zellen.

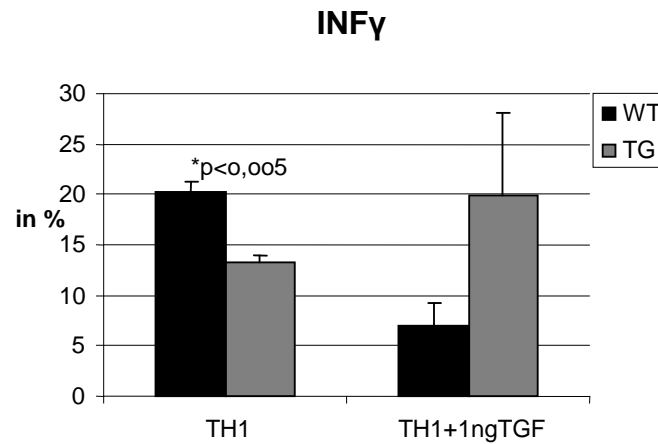


Abbildung 37: TH1 Differenzierung von WT und TG T-Zellen; INF γ Produktion von CD4 T-Zellen in %; n=4
*p<0,05 student t-Test

TGF β spielt auch bei der Induktion von peripheren T regulatorischen T-Zellen eine Rolle, so kann nach Stimulationen von naiven T-Zellen mit α CD3/ α CD28 und TGF β nach 5 Tagen eine Foxp3 Induktion in diesen Zellen gemessen werden (Fantini, Becker et al. 2004). Dies ist der charakteristische Marker für regulatorische T-Zellen. Um die Rolle von dE2Smurf2 bei der Induktion von peripheren regulatorischen T-Zellen (TiTreg) zu untersuchen, wurden WT und TG CD4⁺ Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von TGF β zu TiTreg differenziert und anschließend auf ihre Foxp3 Expression hin analysiert. Aufgrund der differenziellen TGF β Signalweiterleitung in den transgenen CD4⁺ T-Zellen sollte eine gesteigerte Foxp3 Expression schon bei geringen TGF β Konzentrationen beobachtet werden. Doch interessanterweise konnten keine Unterschiede in der Foxp3 Induktion zwischen WT und TG CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit verschiedener TGF β Dosen gefunden werden (siehe Abbildung 38).

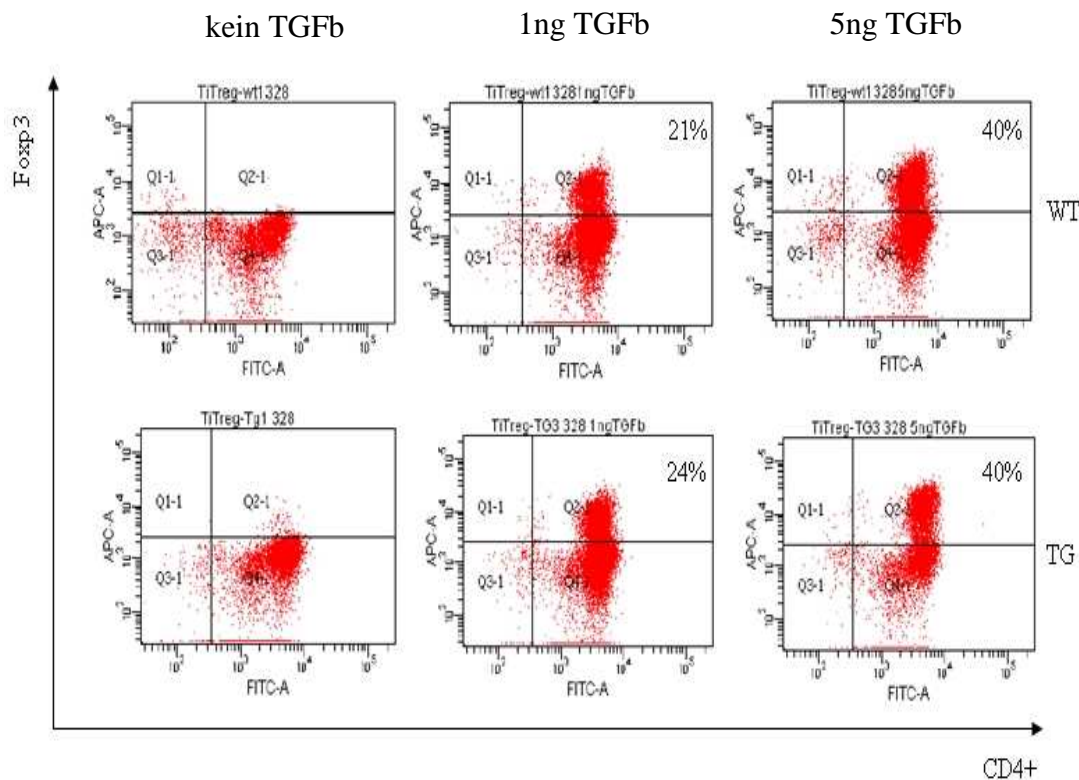


Abbildung 38: TiTreg: Foxp3 Induktion in WT und TG CD4⁺CD25⁻ T-Zellen; Ergebnis repräsentativ für 5 unabhängige Versuche mit je vier Ansätzen

Neben der wichtigen Rolle von TGFβ in der Proliferation, spielt es auch eine große Rolle bei der Apoptose von Zellen. Daher wurde die Wirkung von dE2Smurf2 auf die Apoptoserate von T-Zellen untersucht. Dazu wurden naive T-Zellen aus der Milz von WT und TG Mäusen isoliert und mit αCD3/αCD28 zusammen mit bzw. ohne TGFβ für 5 Tage stimuliert. Am Tag der Analyse wurden die Zellen dann für AnnexinV, einem Apoptosemarker, und 7AAD, einem Nekrosemarker, gefärbt. Zellen die nur positiv für Annexin sind, sind früh apoptotisch. Die Zellen die für beide Marker positiv sind, sind spät apoptotisch. Die differenzielle TGFβ Signalweiterleitung in den transgenen CD4⁺ T-Zellen sollte somit zu einer verringerten Apoptoserate dieser T-Zellen führen, in Abhängigkeit geringer Konzentrationen an TGFβ. Wie in Abbildung 39 zu sehen, konnten keine Unterschiede in der Apoptose- und Nekrosephase zwischen WT und TG CD4⁺ T-Zellen gemessen werden. Sowohl WT-Zellen als auch TG-Zellen gehen nach Aktivierung der Zellen mit αCD3/αCD28 zu gleichen Prozenten in den Zelltod. Eindeutig beobachtet werden konnte jedoch, daß durch zusätzliche Stimulationen der Zellen mit TGFβ die Apoptose- bzw. Nekrosephase reduziert wurde. Dies ist in einer deutlichen gesenkten Prozentzahl im Quadranten R6 zu beobachten. Doch waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen WT und TG Zellen durch die zusätzliche Stimulation mit TGFβ nachweisbar. Somit konnte gezeigt werden, daß TGFβ zwar hemmend auf die

Apoptose von Zellen einwirkt, jedoch dE2Smurf2 in diesem Zusammenhang keine ausschlaggebene Rolle spielt.

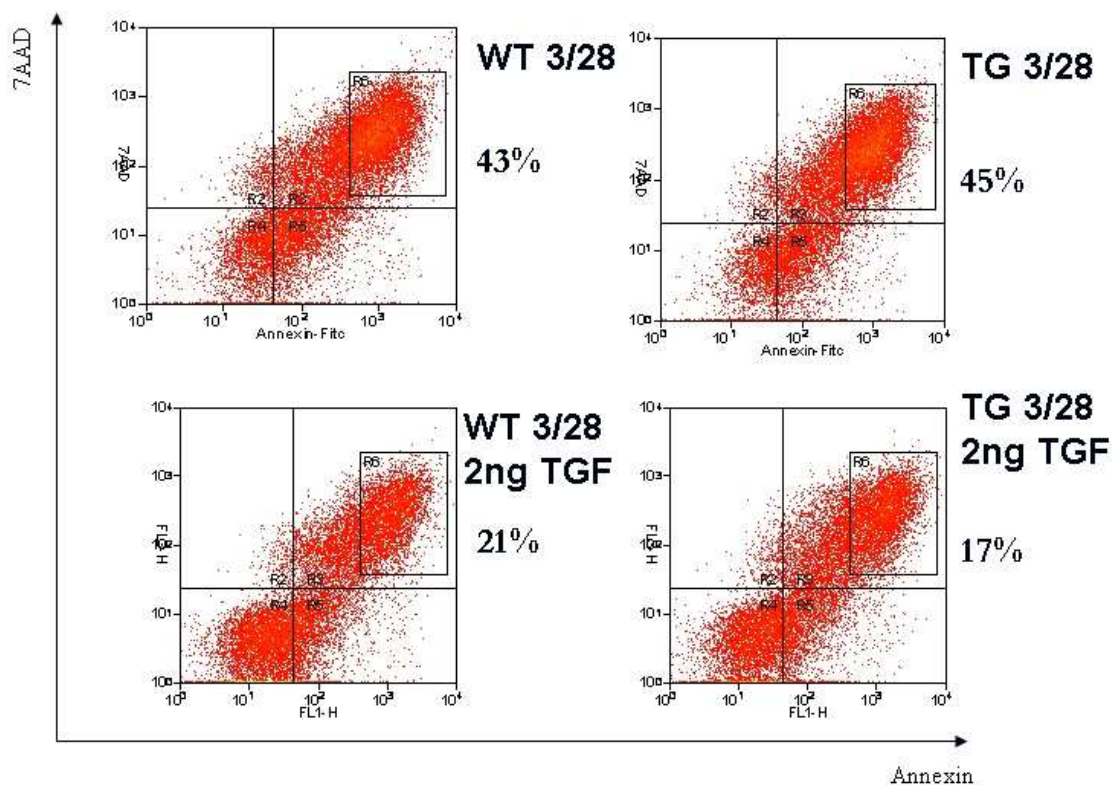


Abbildung 39: Apoptose assay von naiven WT und TG $CD4^+$ T-Zellen mit verschiedenen Stimulationen; Ergebnis repräsentativ für 5 unabhängige Versuche mit je drei Ansätzen

3.12.5 $CD8^+$ T-Zellanalyse

Da dE2Smurf2 unter der Kontrolle des humanen CD2-Promotors lag, wurde nicht nur in murinen $CD4^+$ T-Lymphozyten das Gen überexprimiert, sondern auch in murinen $CD8^+$ T-Zellen. Somit wurden auch die transgenen $CD8^+$ T-Zellen auf eine differenzielle Modulation des TGF β Signalweges hin untersucht. So konnte in den $CD8^+$ T-Zellen transgener Tiere ebenfalls eine gesteigerte Expression des TGF β RII beobachtet werden (siehe Abbildung 40). Nach zusätzlicher Stimulation der $CD8^+$ Zellen mit TGF β konnte eine gesteigerte Expression des TGF β RII in WT Zellen im Vergleich zur unstimulierten Probe beobachtet werden. Jedoch zeigten die transgenen Zellen nach TGF β Stimulation eine Reduktion der Expression des TGF β Rezeptors. Zudem zeigten die transgenen $CD8^+$ Zellen konstitutiv eine gesteigerte Phosphorylierung des Smad3 Proteins im Vergleich zu den transgenen $CD4^+$ Zellen. Nach Stimulation mit TGF β nimmt jedoch die Phosphorylierung des transgenen Smad3 ab, während die des WT Smad3 zunimmt (Abbildung 40).

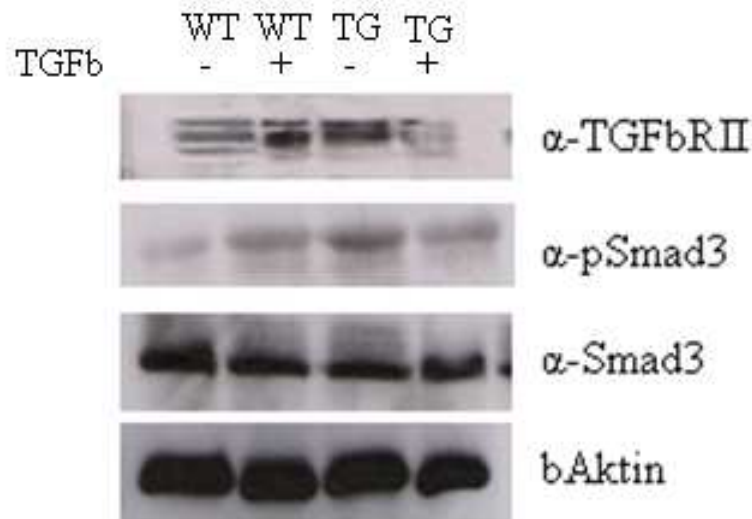


Abbildung 40: Veränderung des TGF β Signalweges transgener CD8⁺ Zellen; Ergebnis repräsentativ für drei unabhängige Versuche

Naiven CD8⁺ T-Zellen aus dem Thymus ist es bereits vorbestimmt zu zytotoxischen T-Zellen zu differenzieren, obwohl sie keine der differenzierten Funktionen bewaffneter Effektorzellen exprimieren. CD8⁺ Zellen sind besonders wichtig bei der Abwehr von Viren, Bakterien, Protozoeninfektionen und Tumoren, die sich im Organismus befinden. Um eine Differenzierung zu zytotoxischen Effektor T-Zellen zu erfahren, benötigen die naiven T-Zellen eine ausreichende Costimulation. So ist es den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen möglich einen programmierten Zelltod in den Zielzellen herbeizuführen, indem sie über eine immunologische Synapse nach Zell-Zell-Kontakt ihre zytotoxischen und lytischen Granula injizieren. Dadurch wird die Apoptose in der Zielzelle ausgelöst (Grakoui 1999; Stinchcombe 2001). Diese Granula entsprechen modifizierten Lysosomen, in denen mindestens zwei verschiedene Gruppen zytotoxischer Effektorproteine enthalten sind. Eines dieser zytotoxischen Proteine, das sogenannte Perforin, polymerisiert zu Poren in der Membran der Zielzelle. Die andere Gruppe von zytotoxischen Proteinen umfaßt mindestens drei Proteasen, die als Granzyme A, B und *orphan* bezeichnet werden. Diese Proteine gehören zu derselben Enzymfamilie wie die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin, den Serinproteasen. Die Porenbildung durch Perforin ist Ca²⁺-abhängig, dieses wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert. Neben dem Perforin gibt es noch einen weiteren Ca²⁺-unabhängigen Mechanismus mit denen die zytotoxischen T-Zellen ihre Zielzellen abtöten können. Dabei ist die Bindung des Fas-Liganden von besonderer Bedeutung. Dieser Ligand liegt meistens auf aktivierten zytotoxischen T-Zellen und TH1 Zellen. Es bindet dann an Fas, welches auf der Membran der

Zielzelle liegt. Durch die Bildung werden Caspasen aktiviert, die dann in der Zielzelle den programmierten Zelltod auslösen (Pipkin 2007). Weiterhin ist es den zytotoxischen T-Zellen möglich über Zytokine die sie freisetzen, wie $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, die Infektionen zu bekämpfen. So hemmt $\text{INF}\gamma$ die virale Replikation und aktiviert zudem Makrophagen und lockt diese zu den Infektionsherden, wo sie dann als Effektorzellen oder antigenpräsentierende Zellen fungieren.

Um nun den Einfluß von dE2Smurf2 auf die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen und die Produktion von Perforin zu untersuchen, wurden CD8^+ T-Zellen aus wild-typ und transgenen Mäusen isoliert. Diese naiven Zellen wurden dann mit $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$, IL2 und mit bzw. ohne $\text{TGF}\beta$ zu Effektorzellen stimuliert. Nach zweitägiger Differenzierung der Zellen wurde aus ihnen die RNA gewonnen und dann mit Hilfe der PCR auf die Produktion von Perforin, Granzym B und $\text{INF}\gamma$ getestet. Wie in Abbildung 41 zu sehen, wurde unter T-Zell Stimulation die Gene Perforin, Granzym B und $\text{INF}\gamma$ gebildet, die die Differenzierung von naiven CD8^+ T-Zellen zu aktivierten zytotoxischen T-Zellen anzeigen. Interessanterweise konnte man eine verstärkte Expression aller drei Gene in transgenen CD8^+ T-Zellen feststellen, die nach $\text{TGF}\beta$ Stimulation stark abnahm, währenddessen bei den WT-Zellen die Gene stärker exprimiert wurden. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen von Thomas et al., die zeigen konnten, daß $\text{TGF}\beta$ in einem Smad-abhängigen Mechanismus die Produktion von Perforin, Granzym B und $\text{INF}\gamma$ inhibiert (Thomas 2005).

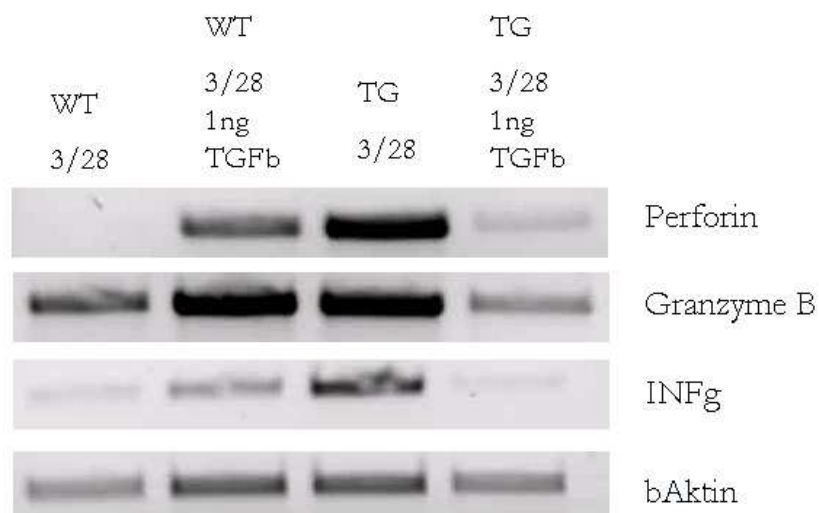


Abbildung 41: Zytotoxische T-Zellen: Veränderte Expression von Perforin, Granzym B und $\text{INF}\gamma$ in transgenen CD8^+ T-Zellen; Ergebnis repräsentativ für drei unabhängige Versuche mit je zwei Ansätzen

3.13 Hypothese zur Hochregulation des TGF β RII in transgenen Lymphozyten durch dE2Smurf2

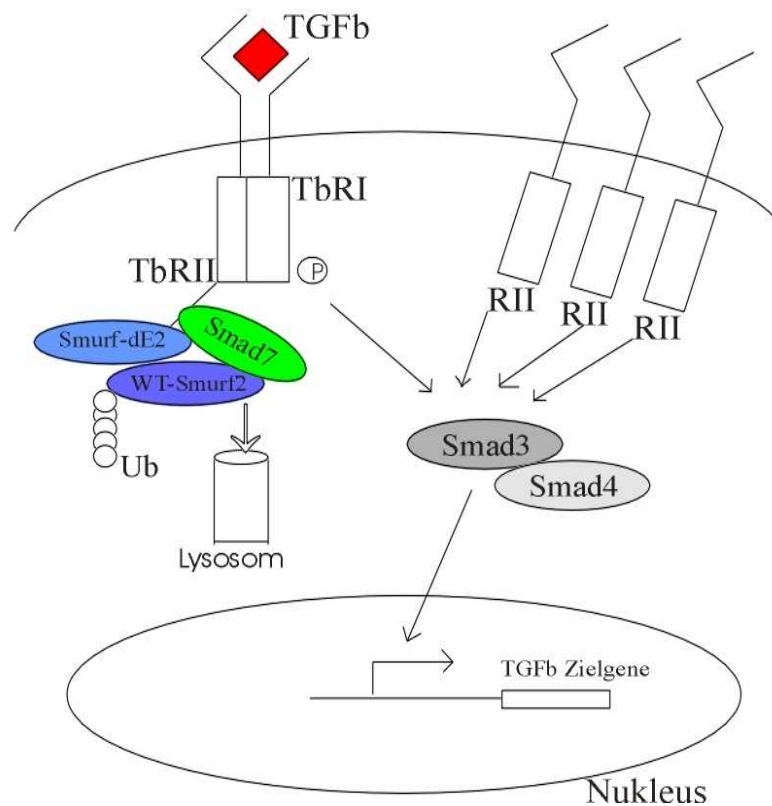


Abbildung 42: Hypothese der TGF β Signalweiterleitung und gesteigerten Expression des TGF β RII bei Überexpression des dE2Smurf2 Proteins; dE2Smurf2 bindet zusammen mit Smad7 an WTSmurf2 und baut dieses lysosomal ab. Dies führt zu einer gesteigerten Signalweiterleitung von phosphoryliertem Smad3 zusammen mit Smad4 in den Zellkern. Ub=Ubiquitin

Die gewonnenen Ergebnisse aus den Überexpressionen der *in vitro* und *in vivo* Versuchen implizieren, daß der TGF β RII bei Überexpression des dE2Smurf2 Gens nicht abgebaut wird, sondern eine gesteigerte Expression des Rezeptors stattfindet. Dies steht im Gegensatz zu dem beschriebenen WTSmurf2. Darüber hinaus wird der TGF β Signalweg positiv reguliert, auch die Smad Moleküle 2 und 3 werden stärker nach Ligandenbindung phosphoryliert. Eine Hypothese, die diese Ergebnisse erklärt, ist in Abbildung 42 dargestellt. Es wird davon ausgegangen, daß bei der Überexpression von dE2Smurf2 dieses an die WTSmurf2 Form bindet, um es dann für die lysosomale Proteindegradation zu ubiquitinieren. Folglich werden der Rezeptor und die Smad Moleküle nicht mehr durch das WTSmurf2 abgebaut und der Signalweg wird dahingehend positiv reguliert. Die dE2Smurf2 Ubiquitin Ligase ist somit für die Regulation seiner WT-Form spezifisch. Um die Hypothese zu beweisen, wurden Cos7

Zellen mit einem WTSmurf2-GFP Konstrukt zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an dE2Smurf2 transient transfiziert und mit bzw. ohne TGF β über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und deren Proteinextrakte im Western Blot auf den Abbau von GFP und damit des WTSmurf2 Proteins hin analysiert (siehe Abbildung 43).

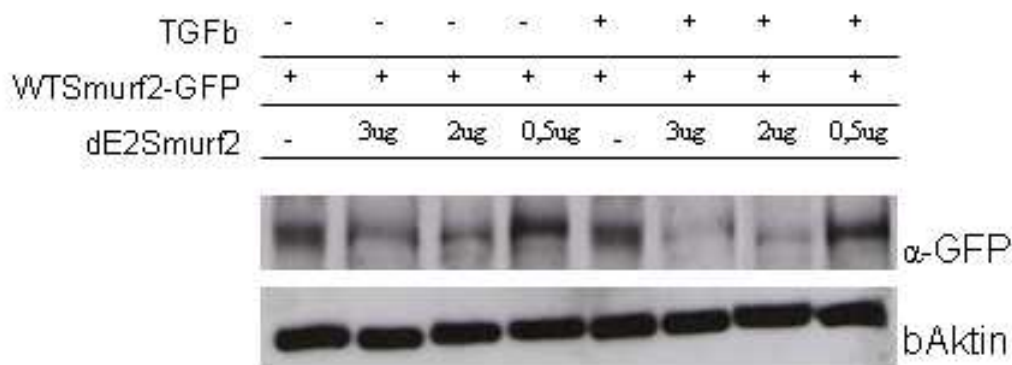


Abbildung 43: Proteindegradation des WTSmurf2 durch dE2Smurf2; Ergebnis repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

Wie in Abbildung 43 zu erkennen, ist der Abbau des WTSmurf2-GFP Proteins abhängig von der Proteinkonzentration der dE2Smurf2 Ubiquitin Ligase. So konnte ein Abbau des WTSmurf2-GFP Proteins erst bei einer Konzentration von 3 μ g des dE2Smurf2 Gens beobachtet werden. Interessanterweise jedoch konnte der Abbau des WTSmurf2-GFP Proteins durch zusätzliche Stimulation mit TGF β noch weiter gesteigert werden. Das wirft natürlich die Frage auf, welches Molekül, das sich durch TGF β induzieren läßt, ebenfalls in der Proteindegradation involviert ist. Eine weitere Frage ist, ob ebenfalls die Spleißform dE2Smurf2 von der WTSmurf2 Form ubiquitiniert und damit degradiert werden kann.

Da die Expression von Smad7 durch TGF β induziert wird (Fantini, Becker et al. 2004) und es bei der Degradation von Rezeptor und Smad-Molekülen involviert ist (Hayashi 1997; Kavsak 2000; Ebisawa, Fukuchi et al. 2001; Chong, Lin et al. 2006), ist es in einem weiteren Experiment auf die Fähigkeit zur Degradation der Ubiquitin Ligasen WTSmurf2 und dE2Smurf2 hin untersucht worden. Und wie in Abbildung 44 zu erkennen, war Smad7 tatsächlich in der Lage, zusammen mit den Ubiquitin Ligasen, diese abzubauen. Somit konnte gezeigt werden, daß die Ligasen bei jeweiliger Überexpression sich gegenseitig zusammen mit Smad7 degradieren können. Dieses Ergebnis bestätigte die Daten von einer Arbeitsgruppe, die herausgefunden hatten, daß die C2-Domäne von Smurf2 intramolekular

mit der HECT-Domäne einer weiteren Ubiquitin Ligase (z.B. hier Smurf2) bindet und diese zur Degradation ubiquitiniert (Wiesner 2007).



Abbildung 44: Proteindegradation des WT-Smurf2 durch dE2-Smurf2 und Smad7 als auch von dE2-Smurf2 durch WT-Smurf2 zusammen mit Smad7; Daten repräsentativ für 3 unabhängige Versuche

3.14 Tumorinduktion

Um die Wirkung der Überexpression von dE2-Smurf2 auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen und der Tumorgenese zu untersuchen, wurden *in vivo* Modelle der CED angewandt (siehe Tabelle 1) und wild-typ Tiere mit transgenen Tieren miteinander verglichen.

3.14.1 AOM/DSS

Um die funktionale Konsequenz der höheren Sensitivität der transgenen T-Zellen gegenüber TGF β bei der Entwicklung von Kolorektalen Karzinomen zu untersuchen, wurde das AOM/DSS Modell angewendet. In dem Kolitis assoziiertem Kolontumor Modell wurde den Mäusen einmalig das mutagene Agens Azoxymethan (AOM) intraperitoneal injiziert, gefolgt von einer siebentägigen Verabreichung von Dextran Sulfat (DSS) im Trinkwasser. Die Gabe des DSS erfolgte in drei Zyklen, mit zweiwöchigen Pausen, in denen normales autoklaviertes Trinkwasser den Tieren verabreicht wurde (siehe Abbildung 45). Dieses simulierte und förderte die Entzündung des Darms, indem es die Epithelbarriere zerstörte und dadurch Bakterien der Darmflora in das Darmgewebe einwandern konnten. Dort traten sie in Kontakt mit den Immunzellen des Organismus, was schließlich zur Entzündung führte. Nach jedem Zyklus erfolgte eine Koloskopie, in der die Entwicklung der Karzinogenese sowie der Entzündungsgrad des Darms festgehalten wurde. Durch die chronische Entzündung des

Darms wird das Tumorwachstum im Kolon beschleunigt und Karzinome werden ab dem 40. Tag sichtbar.

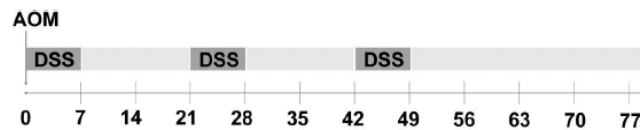
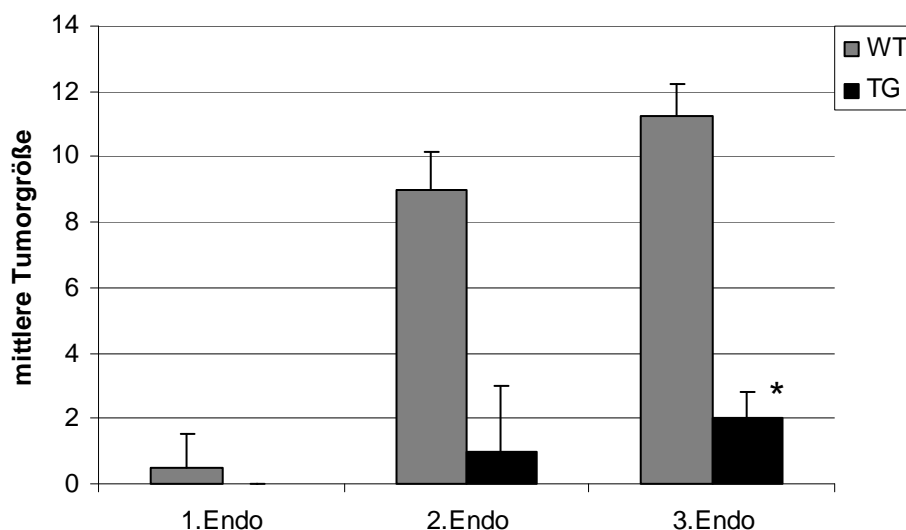


Abbildung 45: Zeitlicher Ablauf des AOM/DSS Modells

Wie in Abbildung 46 zu sehen, gab es Unterschiede in der Tumorgröße und Tumoranzahl zwischen wild-typ und transgenen dE2Smurf2 Mäusen. So waren die transgenen Mäuse in der Tumorentwicklung protektiert und hatten signifikant eine geringere Tumorgröße als die WT-Mäuse. Aber auch in der Tumoranzahl unterschieden sich die transgenen von den wild-typ Mäusen.



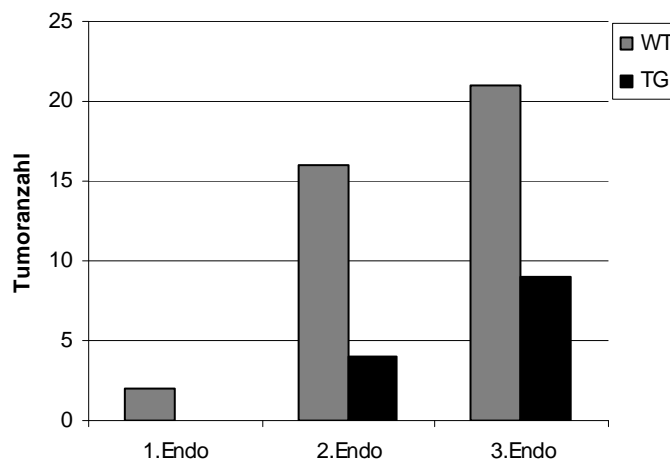


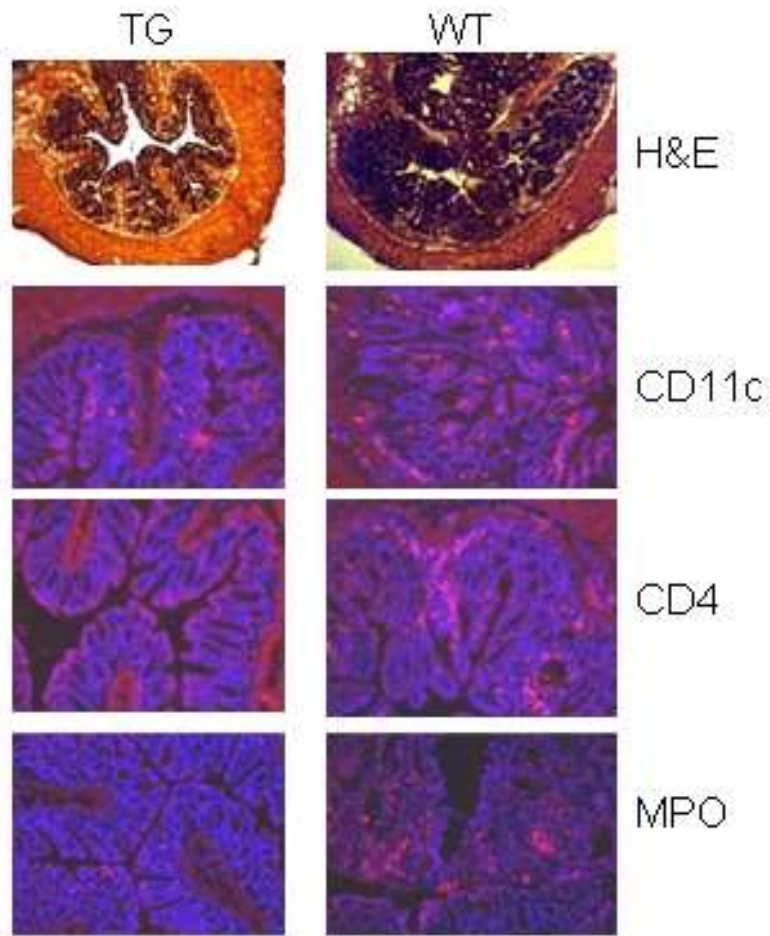
Abbildung 46: Protektion der transgenen dE2Smurf2 Mäuse gegenüber den WT-Mäusen in der Tumorentwicklung; Koloskopiebilder ab dem 60. Tag sowie statistische Auswertung der Tumorgröße und -anzahl von WT und TG Mäusen nach den jeweiligen Zyklen; Endo=Endoskopie; n=5 * p<0,05 student t-Test; Daten repräsentativ für 6 unabhängige Versuche

Dies deutet auf eine Schlüsselrolle des TGF β Signalweges und damit des dE2Smurf2 Gens in T-Zellen bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen.

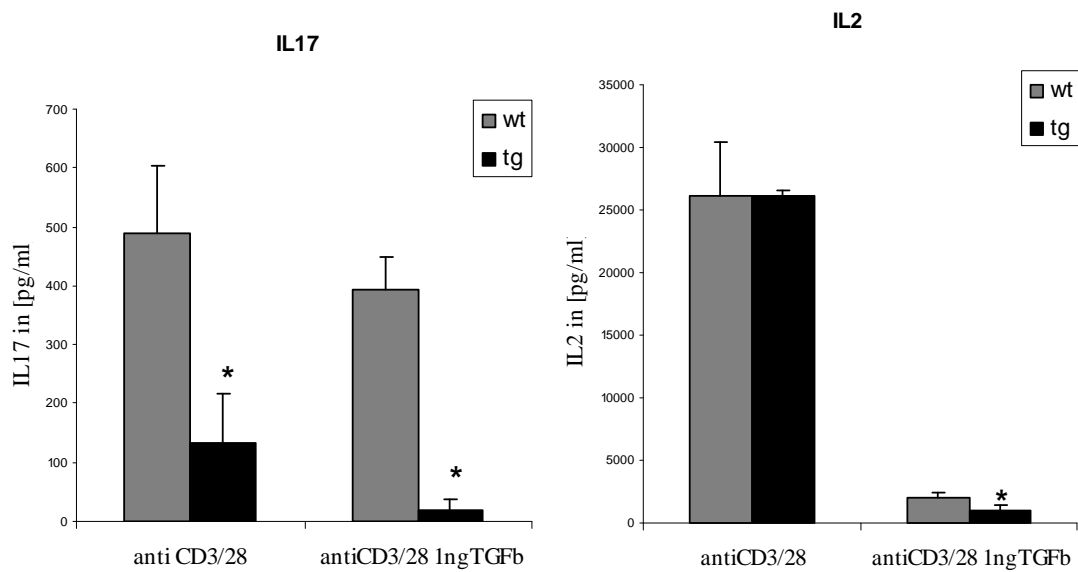
Die Tumorentwicklung ist in diesem Modell von dem Entzündungsgrad des Darms abhängig. Um zu untersuchen, ob die geringere Tumoranzahl und -größe der transgenen Mäuse auf eine geringere Inflammation des Darms zurückzuführen ist, wurden Darmsektionen der AOM/DSS behandelten Mäuse entnommen und diese immunhistochemisch gegen die Entzündungsmarker CD4, CD11c, und MPO als auch H&E gefärbt. Wie in Abbildung 47a gezeigt, konnte eine massive Infiltration von mononukleären Zellen wie den CD4⁺ T-Zellen und polymorphkernige Zellen, wie den Dentritischen Zellen und Neutrophilen beobachtet werden. Auch die H&E Färbung zeigte eine allgemeine massive Infiltration von Zellen in das Darmgewebe der Lamina propria, was ebenfalls auf eine starke Inflammation des Darms bei den wild-typ Tieren hinwies. Die transgenen Mäuse hatten demgegenüber eine mildere Entzündung, sind also vor der Kolitisentstehung im DSS-Modell geschützt, was mit einer geringeren Tumorentstehung einherging.

Aufgrund der Möglichkeit, daß T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Kolontumoren spielen, wurde die Expression von T-Zell-Zytokinen aus AOM/DSS behandelten WT und TG Mäusen im Zytomix untersucht (Abbildung 47b). Es konnte eine geringere Zytokinproduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL17, IL4, INF γ , IL6 und IL2 in transgenen T-Zellen beobachtet werden. Zusätzlich konnte die jeweilige

Zytokinexpression der transgenen T-Zellen im Vergleich zu den WT T-Zellen nochmals stärker durch geringe Dosen TGF β vermindert werden.



A



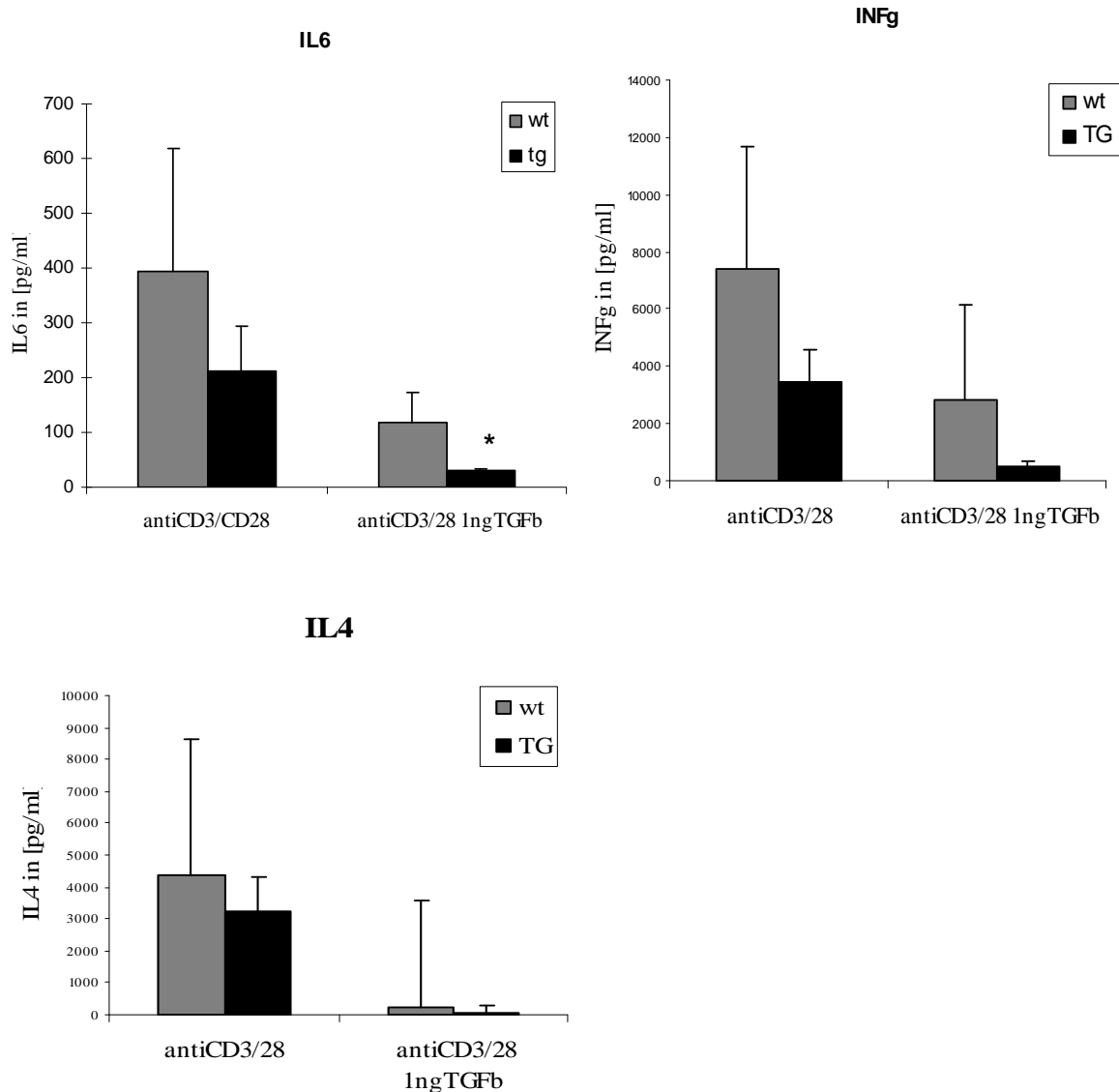
**B**

Abbildung 47: (A) Immunhistochemische Färbung von wild-typ (WT) und transgenen (TG) Darmschnitten gegen CD4, CD11c und Neutrophilen (MPO) sowie H&E Färbung (B) Zytokinexpression von T-Zellen aus AOM/DSS behandelten WT und TG Mäusen; n=4 *p<0,05 student t-Test

Dabei konnte nach Restimulation der isolierten CD4⁺ T-Zellen mit α CD3/ α CD28 und TGF β im Zytomix festgestellt werden, daß die Produktion besonders der Zytokine IL17, IL6 und IL2 im Vergleich zu den WT T-Zellen bei den transgenen T-Zellen signifikant vermindert werden konnte. Dies ist durch eine verringerte Proliferation der transgenen T-Zellen in Gegenwart des TGF β zurückführbar (siehe Kapitel 3.12.4). Besonders das Interleukin 6 hat eine bedeutende Rolle bei der Tumorentwicklung im Kolon (Becker, Fantini et al. 2004). Die signifikant geringere Expression des IL6 bei den transgenen T-Zellen ist letztendlich mit

ausschlaggebend für die Protektion der Tumorentwicklung im entzündungsabhängigen Tumormodell.

3.14.2 APC^{min} –Modell (*Adenomatous polyposis coli*)

Neben dem chemisch induzierten Tumormodell AOM/DSS gibt es ein Tiermodell, indem sich Tumore spontan entwickeln. Tiere, die heterozygot sind für das Tumorsuppressor Gen APC, entwickeln ca. drei Monate nach ihrer Geburt Adenokarzinome im Kolon. Die Tumorentwicklung in diesem Tiermodell ist entzündungsunabhängig. Durch das Kreuzen der APC^{min} Mäuse mit den dE2Smurf2 transgenen Mäusen konnte untersucht werden, ob das dE2Smurf2 Gen eine Rolle bei der spontanen, entzündungsunabhängigen Entwicklung von Tumoren spielt. Wie in Abbildung 48 dargestellt, konnte eine signifikante Reduktion der Tumorgöße bei den APC^{min}Smurf2 im Vergleich zu den APC^{min} Kontrollmäusen beobachtet werden. Daneben lag auch die Tumoranzahl in den APC^{min}Smurf2 Mäusen niedriger als bei den heterozygoten Vergleichsmäusen (Daten nicht gezeigt).

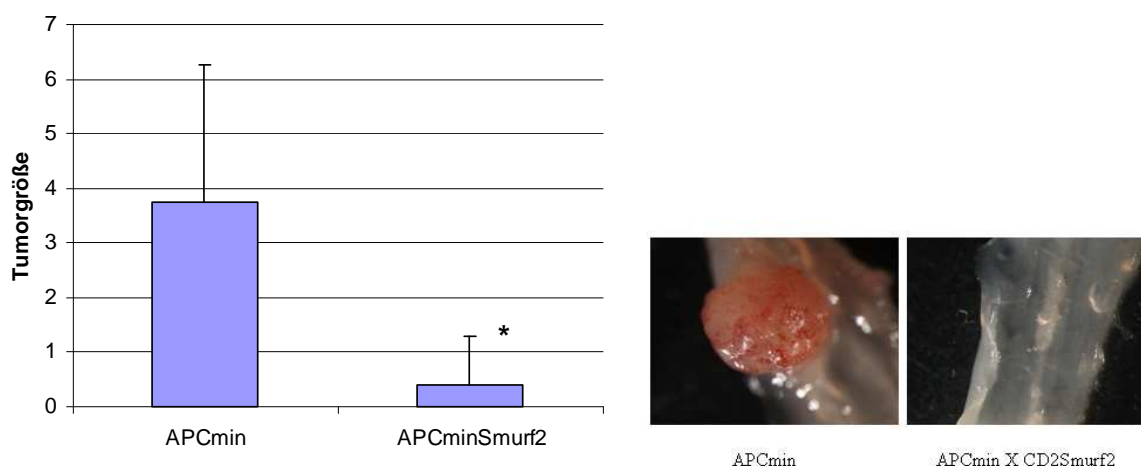


Abbildung 48: Tumorentwicklung von APC^{min} und APC^{min}Smurf2 Mäusen; n=6 *p<0,05 student t-Test

Damit ist auch eine wichtige Rolle des dE2Smurf2 Gens bei der entzündungsunabhängigen Tumorentwicklung festzuhalten. Dies könnte auf die gesteigerte Expression des Perforins in den transgenen CD8⁺ T-Zellen und somit auf eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber Tumoren zurückgeführt werden (3.12.5). Allerdings müßte die gesteigerte Zytotoxizität in einem Assay noch nachgewiesen werden.

3.14.3 Tumorentwicklungsprognose bei Patienten mit Kolonkarzinomen

Die bis hier erlangten Daten der Spleißform des Smurf2-Gens (dE2Smurf2) zeigten, daß dE2Smurf2 den TGFβ Signalweg positiv reguliert und es auf den Tumorentwicklungsprozess

einen inhibierenden Einfluß hat (Kapitel 3.12.4 und 3.14). Daneben kommt dem dE2Smurf2 auch im Menschen vor (3.7) und stellt sich als attraktives Zielprotein für die Modulation von chronischen intestinalen Entzündungen und dem damit verbundenen erhöhten Risiko einer Karzinogenese heraus. Um Prognosen für die Tumorentwicklung bei Patienten zu erstellen, wurden cDNA Proben von Tumorbiopsien auf die Expression von WTSmurf2 und dE2Smurf2 in der *real time* PCR hin untersucht. So wurde mit Hilfe der TNM-Klassifikation die Größe der Tumore (T), der Lymphknotenbefall (N) sowie die Metastasierung (M) der Kolontumor tragenden Patienten festgehalten. Es sollte herausgefunden werden, ob Patienten mit einer geringeren Tumorgöße und/oder Lymphknotenbefall eine höhere Expression an dE2Smurf2 aufweisen und damit eine bessere Prognose haben als Patienten mit einer niedrigen Expression oder vergleichsweise höheren Expression des WTSmurf2 Gens. Leider konnte keine Korrelation zwischen Tumorgöße bzw. Lymphknotenbefall und der dE2Smurf2 bzw. WTSmurf2 Expression beobachtet werden (Abbildung 49).

dE2Smurf2		
N>1	N>=1	N<1
1,12775152	1,07343632	1,08790535
T>3	T<3	
0,83607115	0,86882609	
WTSmurf2		
N>1	N>=1	N<1
6,11341226	5,4384969	5,32490576
T>3	T<3	
4,78402471	4,75548965	

Abbildung 49: Statistische Auswertung und Korrelation zwischen Smurf2 und Lymphknotenbefall (N) oder Smurf2 und Tumorgöße (T); relative Expression zu β Aktin, n=50

3.15 Akute Entzündung des Darms (Überlebensexperiment)

Um in einem Überlebensexperiment die unterschiedliche Entzündung des Darms zwischen WT und TG Mäusen zu zeigen, wurde den Mäusen über 14 Tage eine 3%ige DSS Lösung über das Trankwasser verabreicht. Dabei wurde eine akute Entzündung des Darms induziert und die Überlebensrate zwischen WT und TG ermittelt. Da die transgenen $CD4^+$ T-Zellen sensitiver gegenüber $TGF\beta$ waren, langsamer proliferierten und dahingehend weniger proinflammatorische Zykine bildeten, wäre es zu erwarten, daß die transgenen Mäuse weniger Entzündung des Darms zeigten und dadurch eine höhere Überlebensrate hätten als die WT Mäuse. Wie in der Abbildung 50 zu erkennen ist, bestätigte sich die Vermutung. Die transgenen Tiere hatten eine signifikante Überlebensrate gegenüber den Kontrolltieren (WT). Somit konnte nachgewiesen werden, daß dE2Smurf2 eine starke Entzündung des Darms

durch geringere Proliferation und Zytokinausschüttung unterdrückt. Die Spleißform von Smurf2 hatte somit einen positiven Effekt auf die Entzündung des Darms und förderte die Überlebensrate der Mäuse.

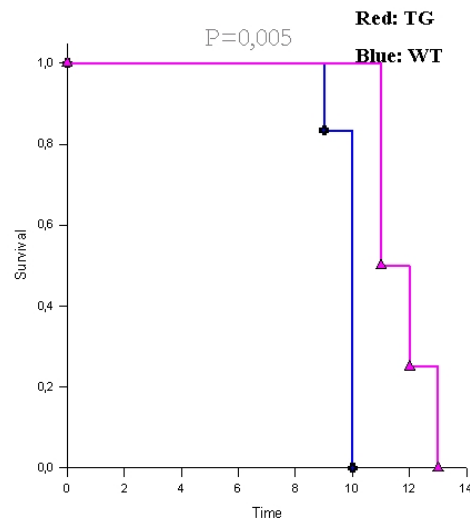


Abbildung 50: Überlebensrate von wild-typ (blau) und transgenen (rot) Mäusen bei akuter Entzündung des Darms; n=5; p=0,005

3.16 Transferkolitis-Modell

Im adoptiven Transfer-Modell werden naive $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, gewonnen aus immunokompetenten Donortieren, in immunodefiziente SCID oder $RAG^{-/-}$ Empfängertiere intraperitoneal injiziert. Nach einer Latenzphase entwickeln die transplantierten Tiere eine Kolitis, die mit der humanen Kolitis Ulcerose vergleichbar ist. Bei der Entzündungsreaktion ist vor allem die Mukosa betroffen, Submukosa und Muskularis propria sind nur in einigen bestimmten Gebieten des Kolons von der Entzündung berührt. Die Entzündung des Darms erfolgt durch das „Primen“ der naiven $CD4^+$ T-Zellen mit einem bakteriellen Antigen von der normalen Darmflora, präsentiert durch Dendritische Zellen im Mesenterischen Lymphknoten (Leithäuser 2002). Durch zusätzliche Vergabe von $CD4^+CD25^+$ (nTregs) Zellen kann jedoch die Kolitis unterdrückt werden (Maloy 2001). Um die Auswirkung der Überexpression des dE2Smurf2 Gens in naiven T-Zellen auf die Entwicklung einer Kolitis zu untersuchen, wurden eine gleiche Anzahl von naiven WT sowie TG T-Zellen in $RAG2^{-/-}$ Mäuse intraperitoneal injiziert. Nach drei bis fünf Wochen wurden in der Koloskopie eine starke Entzündung des Kolons der WT $RAG2^{-/-}$ Mäuse beobachtet. Interessanterweise zeigten die Mäuse, die mit den TG naiven Zellen behandelt worden sind, eine signifikant stärkere Entzündung des Darms als die WT Mäuse (Abbildung 51). Erste Hinweise deuteten darauf hin, daß die stärkere Entzündung des Darms auf eine überschießende Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL17 zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt). Dies

bestätigten auch *in vitro* Versuche in denen naive T-Zellen zu TH17 stimuliert wurden (3.12.4) und die transgenen Zellen eine stärkere Produktion an IL17A zeigten als die WT Zellen. Somit deuten die Daten daraufhin, daß das dE2Smurf2, in diesem Modell unter Ausschluß der T regulatorischen Zellen, eher eine proinflammatorische Wirkung auf den Darm hat.

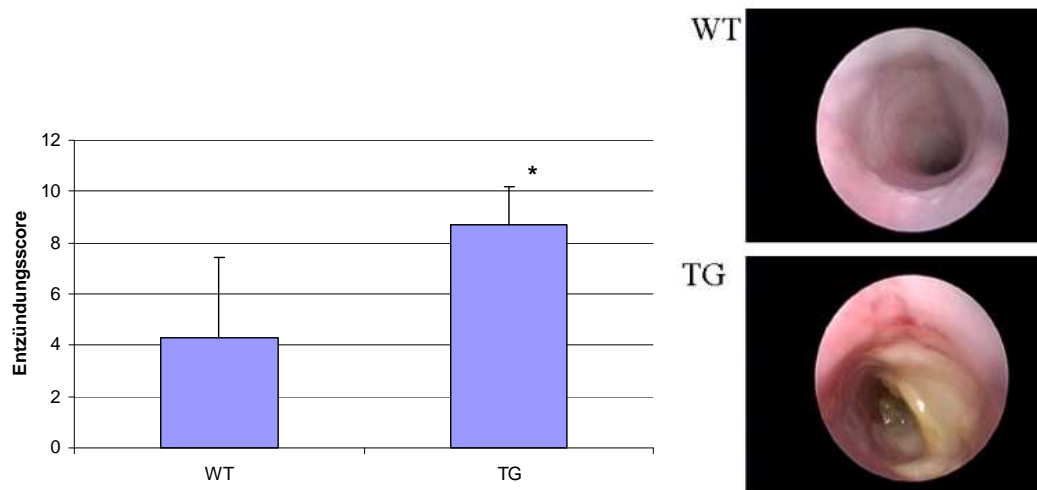


Abbildung 51: Adoptiver T-Zell Transfer von WT und TG CD4+CD25- Zellen in RAG2^{-/-} Mäuse; Koloskopiebilder von WT und TG Mäusen drei Wochen nach T-Zell Transfer, statistische Auswertung des Entzündungsscore, zusammengesetzt aus Granularität, Durchscheinen der Darmwand, Fibrin-Produktion, Vaskularität des Darms und Beschaffenheit des Stuhls; *p<0,05 n=5 student t-Test. Daten repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

3.17 Expression von Smurf2 in Dendritische Zellen hergestellt aus dem Knochenmark

Um zu untersuchen, ob Smurf2 (allgemein) auch im angeborenen Immunsystem eine Rolle spielt, wurde die Expression von Smurf2 in dendritischen Zellen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) untersucht. Dabei wurden Knochenmarks Zellen isoliert und diese über sieben Tage mit GM-CFS (Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor) zu Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen differenziert. Nach der Isolation der CD11c positiven dendritischen Zellen (BMDC) wurden diese zeitabhängig mit LPS stimuliert. LPS ist ein toxischer Bestandteil, der auf der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien zu finden ist. Es wirkt über den Toll like Rezeptor (TLR) 4. Wie in Abbildung 52a zu sehen ist, nahm die Smurf2 Expression mit zunehmender Stimulationsdauer mit LPS ab. Dabei konnte eine signifikante Erniedrigung der Smurf2 Expression nach 8 Stunden festgestellt werden (Abbildung 52b). Da Smurf2 in T-Zellen durch TGFβ induziert werden konnte, wurden die dendritischen Zellen zusätzlich zu LPS auch mit TGFβ stimuliert, um

nachzuweisen, ob die Reduktion von Smurf2 durch LPS reversibel ist. Dabei konnte die Expression von Smurf2, signifikant zur LPS Stimulation, wieder gesteigert werden (Abbildung 52b). Die Daten sprechen demzufolge für eine Modulation des TGF β Signalweges durch LPS, die durch TGF β Stimulation reversibel war.

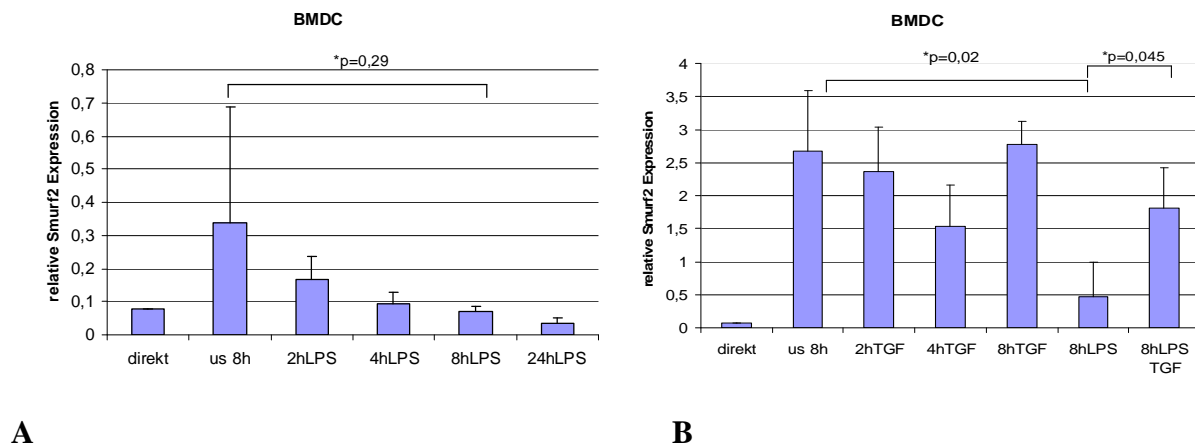


Abbildung 52: Stimulation von dendritischen Zellen hergestellt aus dem Knochenmark mit LPS und TGF β (A) Zeitabhängigen Stimulation mit LPS (B) Stimulation von LPS zusammen mit TGF β ; n=4 student t-Test. Daten repräsentativ für drei Versuche.

3.18 Herstellung einer Smurf2 „Knock out“ Maus

Die bisher erhaltenen Daten von Smurf2 aus der T-Zell spezifischen transgenen Maus (adaptive Immunsystem) und den dendritischen Zellen (angeborenes Immunsystem) führten zu der Frage, was für Konsequenzen aus einem Fehlen des Proteins in Bezug zu Entzündungen und Tumorentwicklung folgen. Dies kann durch einen sogenannten „Knock out“ untersucht werden, der in embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination und das Cre/loxP System hergestellt werden kann.

3.18.1 Vektorkonstruktion für das konditionale „Gene targeting“ des Smurf2-Gens

Für die Herstellung eines konditionalen *Knock outs* muß ein Exon gefunden werden, welches nach seinem Ausschluß aus dem Genom, zu einer Verschiebung des Leserasters des Gens und damit zu einem funktionell nicht mehr aktiven Protein führt. Da für das Smurf2 Gen bereits ein Spleißen des Exon2 bekannt ist, wurde das Exon3 für das konditionale Targeting verwendet. Dabei wurde das Exon3 in einen Vektor (pRapidflirt) zwischen zwei loxP-Seiten (*Locus of crossover (x) in P1*) kloniert. Die Cre Rekombinase des Bakteriophagen P1 erkennt diese loxP-Seiten, die aus 13bp bestehen, und deletiert durch intramolekulare Rekombination die loxP flankierte DNA-Sequenz. Das *Gen Targeting*-Konstrukt ist 5' von einem kurzen

0,9kb und 3' von einem 4,2kb langem, zur endogenen Zielsequenz, homologen Sequenzarm flankiert. Zur Selektion der rekombinanten ES-Zellen enthält das Gen Targeting-Konstrukt eine von loxP-Seiten flankierte *neo*-Selektionskassette (siehe Abbildung 53).

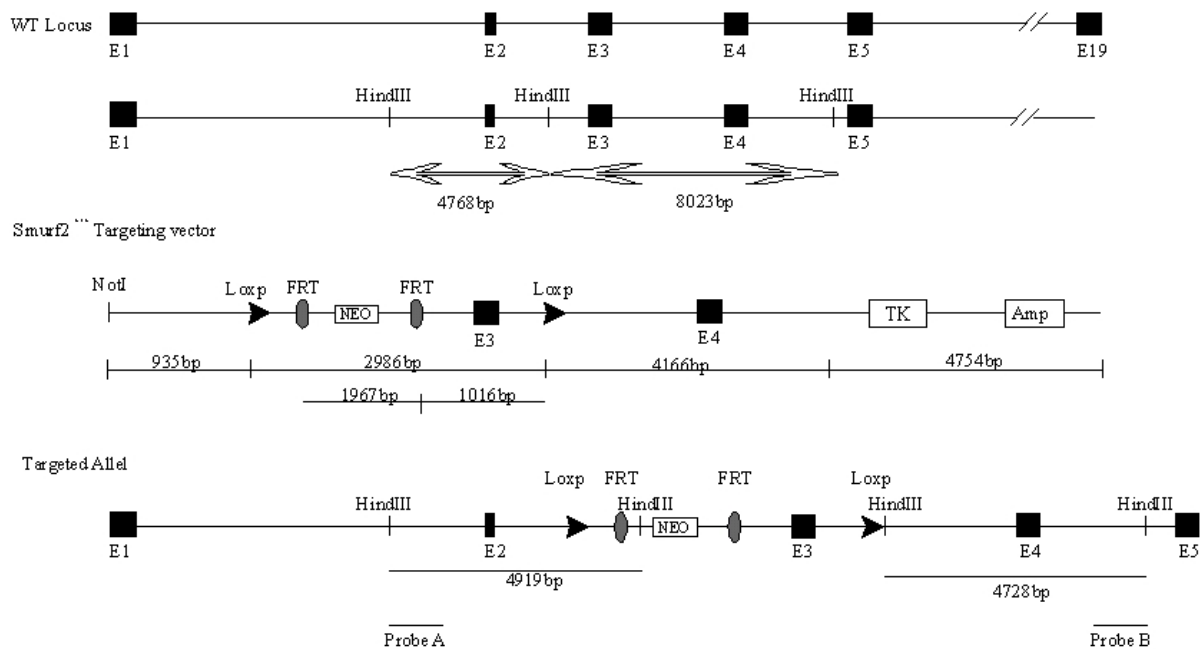


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Gen Targeting-Konstruktes sowie des wild-typ (WT) Allels vor und nach homologer Rekombination

3.18.2 Isolierung homolog rekombinanter embryonaler Stammzellen (ES)-Zell-Klone

Nach der Herstellung des *Targeting*-Konstruktes wurde dieses mit *NotI* linearisiert und in großen Mengen mit Phenol/Chloroform aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Transfektion durch Elektroporation in *Bruce4* ES-Zellen. Nach Selektion mit Geneticin (G418) wurden 1000 resistente ES-Zellkolonien isoliert und je 5 Kopien der Klone hergestellt. Diese dienen der Analyse der genomischen DNA auf das homologe Rekombinationsereignis durch den Southern Blot. Nach homologer Rekombination kann mit der Sonde B eine WT-Bande von 8kb und eine 4,7kb große Bande für das mutierte Allel nachgewiesen werden (Abbildung 53), nachdem die genomische DNA mit *HindIII* verdaut worden ist.

Die genomische DNA der ES-Zellklone liegt bereits vor, muß aber noch auf ihre homologe Rekombination hin im Southern Blot untersucht werden.

4 Diskussion

Das pleiotrope Zytokin TGF β spielt neben seiner Rolle bei der Entwicklung von Geweben und Organen auch eine wichtige Rolle im Immunsystem. So beeinflusst es u.a. die Proliferation, Differenzierung, Migration, und Apoptose von Immunzellen (Georelik 2002; Li 2006). Die Regulation des TGF β Signalweges durch die Ubiquitin Ligase Smurf2 ist daher ein wichtiger Mechanismus der Zelle, auf post translationaler Ebene, auf verschiedene Signale zu reagieren. Somit findet eine sensible Kontrolle des Signal *outputs* statt. Das WTSmurf2 unterbindet dabei die Signalweiterleitung des TGF β in den Zellkern, indem es den TGF β RII und die Smad-Moleküle 2, 3 und 4 polyubiquitiniert und damit zur Degradation im 26S Proteasom markiert (Kavsak 2000; Bonni, Wang et al. 2001; Izzi 2004; Ogunjimi 2005). Es reguliert den Signalweg daher negativ. Eine Dysregulation sowie Veränderungen des TGF β Signalweges führt meistens zu humanen Erkrankungen sowie Krebs. So konnte bisher für die HECT Ubiquitin Ligasen Nedd4, Smurf1, Smurf2 und WWP1 beobachtet werden, daß sie vor allem in Krebszellen überexprimiert werden und als oncogene Proteine wirken (Chen 2007). Aber auch dem TGF β selbst wird eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung zugeschrieben. Es ist ein wichtiges Schlüsselzytokin für die Immuntoleranz. So kann es zum einem als Tumorsuppressor aber zum anderen auch als Tumorpromotor wirken (Massague 2008). Doch der genaue Mechanismus, wann seine Funktion „switched“, ist noch weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Isoform von Smurf2 (dE2Smurf2) isoliert werden, die in einer T-Zell spezifischen Überexpression immunsupprimierend auf die Regulation von chronischen Entzündungen wirkt und damit die Entwicklung von Kolontumoren unterdrückt. Die immunsupprimierende Wirkung beruht dabei auf einer gesteigerten Sensitivität der T-Zellen gegenüber dem TGF β . Diese erhöhte Sensitivität ist letztendlich auf eine gesteigerten Expression des TGF β RII und damit auf einer erhöhten Signalweiterleitung in den Zellkern zurückzuführen.

Weiterhin konnten in dieser Arbeit eine humane Relevanz von dE2Smurf2 festgestellt werden. Eine weitere noch unentdeckte Isoform von Smurf2 konnte ebenfalls aus humanen CD4⁺ T-Zellen, gewonnen aus Blut eines Morbus Crohn Patienten, identifiziert werden. Zudem konnte noch eine neue nicht kodierende RNA der Ubiquitin Ligase Smurf2 aus murinen T-Lymphozyten isoliert werden.

4.1 Unterschiedliche Lokalisation der Smurf2 Spleißvarianten in der Zelle

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß mit einer Überexpression der verschiedenen GFP-Smurf2-Konstrukten eine unterschiedliche Lokalisation der Smurf2 Proteine in Cos7-Zellen einhergeht. Dabei wird das WTSmurf2 über die ganze Zelle exprimiert, währenddessen die Spleißform dE2Smurf2 in „Spots“ exprimiert wird. Interessanterweise konnten dabei Lysosomen und frühe Endosomen als Kompartimente identifiziert werden, die in der Co-Lokalisation involviert sind. Co-Lokalisationen mit dem TGF β RII konnten nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte im Western Blot gezeigt werden (Daten nicht gezeigt), daß beide Proteinformen membranständige Proteine sind. Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Kavsak und Kollegen, die in Mv1Lu Zellen nachgewiesen haben, daß mit einer Überexpression einer konstitutiven aktiven Form des WTSmurf2 dieses vorwiegend im Nukleus exprimiert wird. Eine Translokation in das Zytoplasma findet erst dann statt, wenn neben dem Smurf2 auch das Smad7 überexprimiert wurde (Kavsak 2000). Dabei konnte eine Kolo-kalisation des Smurf2 mit dem TGF β RII nachgewiesen werden. Somit konnten sie zeigen, daß das Smad7 die Subzelluläre Lokalisation von Smurf2 kontrolliert.

In diese vorliegenden Arbeit, konnte dahingegen keine Veränderung der Lokalisation der verschiedenen Spleißformen von Smurf2 durch zusätzliche Expression des Smad7 beobachtet werden. Auch verschiedenen Stimulationen mit TGF β zeigten keine Veränderung der Lokalisation. Wie beschrieben, besitzt die Ubiquitin Ligase Smurf2 eine N-terminale C2-Domäne. Diese C2-Domäne ist hoch konserviert und kommt in vielen verschiedenen Proteinen vor, wie z.B. Synaptotagmin oder Protein Kinase C α , um nur weniger zu nennen. Für diese Proteine wurde herausgefunden, daß sie meherer Ca²⁺-Ionen binden, dadurch aktiviert werden und dann an Phospholipide, wie z.B. der Zellmembran, binden können (Corbin 2007). Für die Ubiquitin Ligase Smurf2 konnte herausgefunden werden, daß die C2-Domäne in einem Ca²⁺ unabhängigen Mechanismus an spezielle zelluläre Membranen bindet (Wiesner 2007). Da die dE2Smurf2 Form ein Spleißen des Exon2 in der C2-Domäne erfährt, stellt sich die Frage, ob sich bei der daraus resultierenden Konformationsänderung des N-terminalen Bereiches sich eine Änderung in der Ca²⁺ Bindefähigkeit und/oder sich daraus eine Änderung in der Membranbindung erfolgt. Verschiedene Stimulationen der GFP transfizierten Zellen ergaben keine Änderung in der Lokalisation der verschiedenen Smurf2 Varianten. So wurden die Zellen u.a. mit Ionomycin stimuliert, um den Ca²⁺ Influx in die Zelle zu erhöhen und damit eine eventuelle Ca²⁺ Bindung an die C2-Domäne zu erhöhen und dadurch eine Translokation des Protein in der Zelle zu erreichen. Aber auch eine Stimulation

der Zellen mit EGTA, einem Chelatierer von Ca^{2+} Ionen, zeigte keine Wirkung in der Veränderung der Lokalisation.

Somit kann gesagt werden, daß durch das hervorgerufene Spleißen des Exon 2 eine Konformationsänderung der C2-Domäne von Smurf2 stattfindet, die in Cos7 Zellen zur unterschiedlichen Lokalisationen der Proteine führt, wobei die Membranbindung an verschiedene Kompartimente der Zelle von Smurf2 nicht Ca^{2+} abhängig ist. Zudem kann die Lokalisation der beiden Proteine durch unterschiedliche Stimulationen mit TGF β oder INF γ nicht verändert werden. So ist zu sagen, daß durch die Konformationsänderung der C2-Domäne von dE2Smurf2 eher eine Bindung an endosomale/lysosomale Membranen stattfindet, währenddessen die WTSmurf2 Form eher an die zelluläre Außenmembran in Cos7 Zellen bindet. Daraus resultiert eine unterschiedliche Funktion der Smurf2 Formen voneinander.

4.2 Positive Regulation des TGF β Signalweges durch die Isoform von Smurf2

Wie bisher für Smurf2 postuliert wurde, ist die Ubiquitin Ligase Smurf2 bei der negativen Regulation des TGF β Signalweges durch die Degradation des TGF β RII (Kavsak 2000) beteiligt. Daneben, daß das Protein den Rezeptor zur Degradation ubiquitiniert, ist es auch bei der Degradation von Smad Transkriptionsfaktoren involviert (Massague 1999; Lin 2000; Bonni, Wang et al. 2001; Zhang, Chang et al. 2001; Izzi 2004; Moren, Imamura et al. 2005). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß mit einer Überexpression von dE2Smurf2 eine gesteigerte Signalweiterleitung von TGF β in den Zellkern verbunden ist. Dies konnte sowohl *in vitro* in Cos7 Zellen beobachtet werden als auch *in vivo* bei transgenen CD4^+ T-Zellen. Sowohl der Smad2 als auch der Smad3 Transkriptionsfaktor wurde unter TGF β Stimulation stärker phosphoryliert als die Kontrollen und zeigte damit eine stärkere Zielgenaktivierung (Reporterassay). Diese gesteigerte Aktivierung der Smad Transkriptionsfaktoren ist mit einer gesteigerten Expression des TGF β Rezeptors II verbunden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß durch eine Überexpression der Isoform von Smurf2 eine gesteigerte Expression des TGF β Rezeptors II in den CD4^+ und CD8^+ Zellen stattfindet. Somit sind die T-Lymphozyten sensitiver gegenüber Stimulationen mit TGF β als die wild-typ Zellen. Untersuchungen von Wiesner und Kollegen (Wiesner 2007) zeigten, daß die C2-Domäne von Smurf2 mit der C-terminalen HECT-Domäne intramolekular interagiert und die Aktivität der Smurf2 Ubiquitin Ligase damit inhibiert. Dies führte zu der Hypothese für die gesteigerte Rezeptorexpression:

Aufgrund der verstärkten Interaktion zwischen dem überexprimierten dE2Smurf2 und WTSmurf2, wird die WT Form zur Degradation ubiquitiniert und abgebaut. Dies hat dann zur Folge, daß der Rezeptor durch das WTSmurf2 nicht mehr abgebaut werden kann und dadurch eine gesteigerte Phosphorylierung der Smad Transkriptionsfaktoren stattfindet. Schließlich findet eine Verstärkung des TGF β Signals in den Zellkern statt. Somit fungiert die dE2Smurf2 Form als Regulator seiner eigenen Isoformen. Gleichzeitig konnte aber auch gezeigt werden, daß durch die Überexpression der WTSmurf2 Form der Abbau reversibel ist und ein Abbau von dE2Smurf2 durch WTSmurf2 erfolgt. Für den Abbau konnte das inhibitorische Smad7-Molekül als wichtiger Kofaktor identifiziert werden. Dies bestätigt auch Ergebnisse von Wiesner und Kollegen, die zeigen konnten, daß das Smad7 eine relevante Rolle bei der Ubiquitinierung von Smurf2 durch die mutierte C2-Domäne spielt (Wiesner 2007).

4.3 Protektion der entzündungsabhängigen Entwicklung von Kolontumoren bei dE2Smurf2 transgenen Mäusen

Chronische Entzündungen wie sie bei Morbus Crohn und Kolitis Ulcerosa vorkommen, erhöhen das Risiko an Tumoren zu erkranken. So liegt die Inzidenzrate an Kolorektalen Karzinomen zu erkranken bei Morbus Crohn und Kolitis Ulcerosa Patienten im Schnitt höher als bei Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung (Bernstein 2001). Bei der Entwicklung von Tumoren spielen T-Lymphozyten eine große Rolle. So produzieren die CD4⁺ T-Zell Untergruppen (TH1 und TH2) proinflammatorische Zytokine wie INF γ und IL4, die zum Wachstum des Tumors anregen. So konnte gezeigt werden, daß eine TH2 Antwort die Entwicklung von Kolorektalen Karzinomen im experimentellen murinen System als auch beim Menschen eher beschleunigt. Wohingegen eine TH1 Immunantwort eher für eine verbesserte Prognose der Krankheit spricht (Waldner 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch eine Überexpression der Spleißvariante von Smurf2 die transgenen Tiere in dem kolitisassoziierten Kolonkarzinom Modell in ihrer Tumorentwicklung gehemmt und somit protektiert waren. Dies konnte auf eine gesteigerte Immunsuppression des Darms zurückgeführt werden, was mit einer geringeren Produktion an proinflammatorischen Zytokinen einherging. Die geringere Produktion an Zytokinen konnte dabei zum einem mit einer verringerten Proliferationsrate der transgenen CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von TGF β erklärt werden. Aufgrund einer höheren Sensitivität gegenüber TGF β zeigten die transgenen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* eine verringerte Proliferationsrate verglichen mit den wild-typ Zellen. Zum anderen konnte gezeigt

werden, daß dE2Smurf2 sich *in vivo* immunsuppressiv auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie INF γ , IL4, IL17 und IL6 auswirkte.

Daneben, daß CD4⁺ T-Zellen eine proinflammatorische Rolle bei der Entwicklung von Karzinomen spielen, haben sie auch einen anti-Tumor Effekt. Durch die tumorspezifische Sekretion von TGF β können CD4⁺ Effektor Zellen zu Foxp3 exprimierende TGF β induzierte T regulatorische Zellen (TiTreg) konvergiert werden (Fantini 2004). Dadurch ist es den Zellen und dem Tumor möglich die Entzündung zu unterdrücken und damit das Tumorwachstum in Regression zu bringen (Becker, Fantini et al. 2006; Waldner, Schimanski et al. 2006).

Interessanterweise konnten keine Unterschiede bei der *in vitro* Generierung von Foxp3 exprimierenden TiTregs beobachtet werden, obwohl die transgenen CD4⁺ T-Zellen sensitiver gegenüber TGF β sind und eine gesteigerte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Smad3 zeigten. Beides sind wichtige Faktoren, die bei der Foxp3 Induktion involviert sind (Jana 2009). Auch *in vitro* Analysen durch transiente Transfektion der WT und dE2Smurf2 Konstrukte in primäre T-Zellen, zeigten keinen Einfluß der Smurf2-Varianten bei der Generierung von TiTregs (Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt worden). Weder eine Induktion durch dE2Smurf2 (gesteigerte TGF β RII Expression) noch eine Repression durch WTsmurf2 (Abbau des TGF β RII) zeigten einen Einfluß in der Induktion von Foxp3 in CD4⁺ T-Zellen.

TGF β und damit dE2Smurf2 gilt als Schlüsselmolekül für die immunologische Toleranz und dient der Unterdrückung kolitisassozierten Kolonkarzinomen.

4.4 Protektion der transgenen dE2Smurf2 Mäuse im entzündungsunabhängigen Kolontumor-basierten APC^{min/+} Modell

Daneben, daß CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Bekämpfung von Kolorektalen Karzinomen spielen, sind auch CD8⁺ T-Zellen bei der anti-Tumor Antwort involviert. So konnte beobachtet werden, daß bei Patienten mit Kolorektalen Karzinomen eine positive Korrelation zwischen CD8⁺ T-Zellen in Tumoren und der Überlebensrate der Patienten besteht (Naito 1998). Gleichzeitig konnten in einer weiteren Studie eine erhöhte Expression von Gene, die spezifisch für zytotoxische T-Zellen sind, wie z.B. Perforin, Granzym B und INF γ , in Patienten beobachtet werden, die keine Anzeichen von frühen metastatischen Invasionen haben (Waldner, Schimanski et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die transgenen dE2Smurf2 Mäuse, nach dem Einkreuzen des APC^{min} Gens, in der spontanen Tumorentwicklung im Kolon protektiert waren. Das APC-

Gen ist ein Tumorsuppressor Gen, welches nach einer nonsens Mutation im Kodon 850 bei der spontanen Entwicklung von Kolorektalen Karzinomen involviert ist. Da dieses Modell auf der spontanen und nicht auf der entzündungsabhängigen Ebene Karzinome entwickelt, spielen neben den CD4⁺ T-Zellen auch eventuell CD8⁺ T-Zellen bei der Protektion gegenüber der Tumorentwicklung in transgenen dE2Smurf2 Mäusen eine Rolle. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß auch die transgenen CD8⁺ T-Zellen eine gesteigerte Expression des TGFβRII aufwiesen, aber konträr zu den CD4⁺ T-Zellen eine konstitutiv gesteigerte Phosphorylierung des Smad3 Transkriptionsfaktors zeigten. Einhergehend mit diesen Daten sind auch die CD8⁺ T-Zellen sensitiver gegenüber TGFβ Stimulationen wie die CD4⁺ T-Zellen. Gleichzeitig konnte neben der gesteigerten TGFβ Signalweiterleitung auch eine gesteigerte Expression von Genen beobachtet werden, die für zytotoxische T-Zellen charakteristisch sind. So zeigten die transgenen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den wild-typ Zellen nach polyklonaler Aktivierung eine gesteigerte Expression von Perforin, Granzym B und INFγ, die nach zusätzlicher Stimulation mit TGFβ dramatisch gesänkt wurde. Diese Proteine führen letztendlich zur Apoptose der Tumorzellen, wodurch der Phänotyp der transgener dE2Smurf2 im APC^{min} Modell erklärt werden könnte. Interessanterweise stehen jedoch die beobachteten *in vitro* Daten im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten der Gruppe um Joan Massague. Sie publizierten, daß in einem Smad3 abhängigen Mechanismus das TGFβ inhibierend auf die Expression zytotoxischer Gene, wie Perforin, Granzym A und B, FasL und INFγ wirkt (Thomas 2005). Dies zeigt, daß TGFβ die Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten supprimiert. In dieser Arbeit fand jedoch eine Aktivierung des zytotoxischen Genprogramms durch TGFβ bzw. dE2Smurf2 statt, wodurch die Mäuse in ihrer Tumorentwicklung protektiert waren. Somit dient das dE2Smurf2 Protein als attraktives therapeutisches Zielprotein bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei der Behandlung von Kolorektalenkarzinomen.

4.5 Gesteigerte Expression des proinflammatorischen Interleukins 17 in transgenen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß durch eine Stimulation naiver transgener CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit TGFβ und IL6 diese im vermehrten Maße zu TH17 Zellen differenzierten, was sich in einer gesteigerten Sekretion des proinflammatorische Zytokin IL17A äußerte. Obwohl im kolitisassoziertem Kolonkarzinom Modell (AOM/DSS) eine signifikante Inhibition des IL17 beobachtet worden ist, konnte eine gesteigerte Expression des IL17A *in vitro* als auch *in vivo* (Daten nicht gezeigt) im Transfer Kolitis

Modell gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der gesteigerten TGF β RII Expression, wodurch die transgenen T-Zellen eher auf eine Stimulation mit TGF β mit niedrigen Konzentrationen ansprechen als die wild-typ Zellen. Aufgrund der gesteigerten Sensitivität gegenüber TGF β , differenzieren die naiven Zellen nach entsprechender Aktivierung vermehrt in TH17 Zellen. Welcher Mechanismus aber dazu führt, daß die CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* vermehrt IL17 produzieren, und signifikant weniger während TGF β Stimulation in dem AOM/DSS Modell, ist noch weitgehend unklar. Naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen werden von den nTregs (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) getrennt isoliert und dann *in vitro* für die Stimulation oder *in vivo* für die Transfer Kolitis eingesetzt werden. Somit könnte eine erniedrigte IL17 Produktion im AOM/DSS Modell dadurch erklärt werden, daß eventuell die natürlichen regulatorischen T-Zellen supprimierend auf die TH17 Differenzierung einwirken. Das dE2Smurf2 Gen spielt somit eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von TH17 Zellen. Interessanterweise beeinflusst es jedoch nicht die Differenzierung von naiven CD4⁺ Zellen zu TGF β induzierten T regulatorischen Zellen, die die Gegenspieler der TH17 Zellen sind.

4.6 Entdeckung einer neuen nicht kodierenden RNA

Neben der neue Spleißvariante (dE2Smurf2) von Smurf2 konnte gleichzeitig eine neue nicht kodierende RNA in der Maus identifiziert werden. Die isolierte mRNA besitzt eine Länge von 2,2kb mit einem polyA Schwanz und enthält einen Einschub eines Introns/Exons von 112 Basenpaaren zwischen Exon 3 und 4 der WTSmurf2 Form. Dabei tritt im Leseraster ein Stopkodon in diesem Intron/Exon auf, welches zur Beendigung des offenen Leserasters führt. Theoretisch sollte vom Startkodon bis zum ersten Stopkodon ein Protein von 55 Aminosäuren kodiert werden. Durch *in vitro* Translations Experimente in Retikulozytenlysaten konnte keine Expression dieser Länge beobachtet werden. Zusätzlich stellt sich die funktionelle Relevanz der entdeckten nicht kodierenden RNA (ncRNA). Aufgrund des Fehlens eines extensiven offenen Leserasters stellt die ncRNA ein Intermediat zwischen *messenger* RNA und translatierten Protein dar. Da auch die ncRNA im Exon2 gespleißt wird, wie die mRNA des dE2Smurf2 Gens, muß sie eine biologische Relevanz besitzen. Bekannte ncRNAs sind u.a. micro und siRNAs sowie rRNA und tRNA, um nur ein paar zu nennen. Sie besitzen u.a. eine regulatorische Rolle und gehören zur Gruppe der *small nucleolar* RNAs (Eddy 2001). So konnte eine Vielzahl an small ncRNA in Prokaryoten beschrieben werden, die transaktivierend wirken und die mRNA Translation und Stabilität regulieren. Fürs Säugetiergenom konnten dahingehend mehrere Tausend ncRNAs identifiziert werden (Makunin 2006). Doch

der genaue Mechanismus, wie funktionell diese ncRNAs sind, ist noch weitgehend unklar. So konnte in der vorliegenden Arbeit nur ihre biologische Rolle bei der Aktivierung des Smad3-Promotors beobachtet werden. Eine Überexpression zusammen mit der cDNA der Spleißvariante dE2Smurf2 führte zu einer 100 fachen Steigerung der Promotoraktivität verglichen zum dE2Smurf2 Protein. Doch wie genau die ncRNA wirkt ist nicht bekannt. So kann sie eventuell direkt Einfluß auf den Promotor nehmen oder aufgrund der vielen kleinen offenen Leseraster in der 2,2kb großen mRNA viele kleinere Proteine kodieren, die dann ihrerseits Einfluß auf den Promotor nehmen. Über den genauen Mechanismus kann aber nur spekulieren. Bei der Generierung von Foxp3 exprimierender Zellen und der Expression des TGF β RII in CD4⁺ T-Zellen konnte keine Relevanz der ncRNA beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit kann nur gesagt werden, daß die ncRNA zusammen mit der Spleißvariante dE2Smurf2 exprimiert wird und exzessiv auf den Promotor von Smad3 wirkt. Eine Wirkung auf die Foxp3 Expression konnte dabei ausgeschlossen werden. Doch wie die ncRNA auf den Promotor wirkt ist letztendlich unklar.

5 Zusammenfassung

TGF β ist ein Schlüsselmolekül zellvermittelter Immuntoleranz. So spielt es neben seiner pleiotropen Rolle in Immunzellen auch bei der Tumorentwicklung eine große Rolle. Das TGF β hat bei der Tumorentwicklung eine duale Rolle. So dient es in frühen Phasen als Tumorsuppressor, währenddessen es in späten Phasen der Entwicklung als Tumorpromotor wirkt. Eine strikte Regulation des TGF β Signalweges ist daher für ein funktionierendes Immunsystem von essentieller Bedeutung. Die Ubiquitin Ligase Smurf2 ist dabei ein wichtiger negativ Regulator des TGF β Signalweges.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Spleißform des Smurf2 (dE2Smurf2) aus murinen CD4⁺ T-Zellen isoliert werden, deren Funktion *in vitro* und *in vivo* in T-Lymphozyten untersucht worden ist. Für diese Spleißform konnte zudem eine humane Relevanz nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Überexpressionen in Cos7 Zellen konnte eine veränderte Lokalisation der Smurf2 Spleißformen (WT und dE2) festgestellt werden. Dabei konnten lysosomale und endosomale Kompartimente bei der Kolokalisation mit dem dE2Smurf2 Konstrukt beobachtet werden. Das Spleißen des Exons2 führte dabei zu Änderungen der Topologie der N-terminalen C2-Domäne, wodurch sich eine veränderte Lokalisation in der Zelle beschreiben ließ. Mit der veränderten intrazellulären Verteilung erfuhr auch die Funktion der dE2Smurf2 Ubiquitin Ligase eine Änderung. So konnte überraschenderweise eine positive Signalinduktion des TGF β Signalweges beobachtet werden, was im Gegensatz zum beschriebenen WT Smurf2 stand. Durch eine Überexpression des dE2Smurf2 Proteins in T-Lymphozyten wurde der TGF β Signalweg in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen positiv reguliert, dabei wurde der TGF β RII vermehrt exprimiert und gleichzeitig fand eine verstärkte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3 nach TGF β Stimulation statt. Die transgenen T-Lymphozyten waren somit sensitiver gegenüber TGF β . Dies führte zur Hypothese, die durch *Western Blot* Analyse bestätigt werden konnte, daß das dE2Smurf2 nach Überexpression seine WT-Form bindet und dadurch degradiert. Die Degradation der Ubiquitin Ligase war dabei Smad7 abhängig. Zur Analyse des Einflusses der Ubiquitin Ligase dE2Smurf2 auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen, sowie ihre Rolle bei der T-Zell Proliferation, konnte gezeigt werden, daß durch die höhere Sensitivität gegenüber TGF β naive T-Zellen unter Einfluß von TGF β und IL6 vermehrt in TH17 Zellen differenzierten. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Proliferationsrate transgener naiver CD4⁺ T-Zellen bei geringen Mengen von TGF β stark vermindert war. Weiterhin konnte

gezeigt werden, daß bei einer Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen in TH1 Zellen, diese signifikant weniger das proinflammatorische Zytokin INF γ produzierten.

So zeigten *in vivo* Versuche, daß die transgenen Tiere in der Entwicklung von Kolorektalen Karzinomen protektiert waren. Sowohl im kolitisassiziierten Tumor Modell als auch bei der spontanen Entwicklung von Tumoren im APC^{min} Modell. Dies konnte zum einen auf eine deutlich verminderte Entzündung (geringere Produktion an Zytokinen durch verminderte Proliferation) des Darms und zum anderen durch eine stärkere Produktion an zytotoxischen Genen, wie Perforin, INF γ und Granzym B erklärt werden.

Interessanterweise konnte jedoch im Transfer Kolitis Modell eher eine proinflammatorische Wirkung des dE2Smurf2 Proteins nachgewiesen werden. So wiesen die immundefizienten Mäuse, in denen die transgenen T-Zellen injiziert wurden, eine signifikant stärkere Kolitis auf als die Kontrollen. Dies konnte mit einer Überproduktion an IL17 sezernierenden T-Zellen erklärt werden.

Klonierungsexperimente führten zudem zur Identifikation einer bisher nicht beschriebenen nicht kodierenden RNA. Diese zeigte in Kombination mit dem dE2Smurf2 Protein in einer Reporteragen Analyse eine Hyperaktivierung des Smad3 Promotors.

Diese Daten liefern zum einen ein genaueres Modell über die Regulation des TGF β Signalweges sowie wichtige Erkenntnisse zur Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankung und daraus resultierende Tumorerkrankungen. So entwickelt sich das dE2Smurf2, Teil des TGF β Signalweges, als attraktives Zielprotein für die Modulation von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und (kolitisassoziierte) Kolonkarzinomen.

6 Literaturverzeichnis

Abdollah, M.-S., Tsukazaki, Hayashi, Attisano, Wrana (1997). "TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling." J Biol Chem **272**: 27678-27685.

Acosta-Rodriguez, N., Lanzavecchia, Sallusto (2007). "Interleukin 1-beta und 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**: 942-948.

Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2006). "TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer." Cytokine Growth Factor Rev **17**(1-2): 97-106.

Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**(4): 491-501.

Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2005). "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer." Cell Cycle **4**(2): 217-20.

Bennett (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**: 20-21.

Bernstein, B., Kliever, Wajda (2001). "Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study." Cancer **91**: 854-862.

Blobe, S., Lodish (2000). "Role of transforming growth factor beta in human diseases." N Engl J Med **342**: 1350-1385.

Bonifacio, W. (1998). "Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways." Annu Rev Cell Biol **14**: 19-57.

Bonni, S., H. R. Wang, et al. (2001). "TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation." Nat Cell Biol **3**(6): 587-95.

- Brunkow (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**: 68-73.
- Chen, C. M., L. E. (2007). "The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 587-604.
- Cho, M. (2006). "STAT3 and NF-kappaB signal pathways is required for IL23 mediated IL17 production in spontaneous arthritis animal model IL1 receptor antagonist deficient mice." J Immunol **176**: 5652-5661.
- Chong, P. A., H. Lin, et al. (2006). "An expanded WW domain recognition motif revealed by the interaction between Smad7 and the E3 ubiquitin ligase Smurf2." J Biol Chem **281**(25): 17069-75.
- Ciechanover, A. (2004). "Intracellular Protein Degradation: From a vague idea thru the Lysosome and the Ubiquitin-Proteasome System and onto human diseases and drug targeting." Exp Biol Med **231**: 1197-1211.
- Ciechanover, A. O. S. (2000). "Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction." Bioassays **22**: 442-451.
- Corbin, E., Landgraf, Falke (2007). "Mechanism of Specific Membrane Targeting by C2 Domains: Localized Pools of Target Lipids Enhance Ca²⁺ Affinity." Biochemistry **46**: 4322-4336.
- Crohn, G., Oppenheimer (1932). "Regional ileitis." JAMA **99**: 1323-1329.
- Datto, W. (2005). "Ubiquitin-mediated degradation: A mechanism for fine-tuning TGFbeta signaling." Cell: 2-4.
- Derynck, Z. (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." Nature **425**: 577-584.
- Duerr, B., Zhang, Davis, Preston, Chensny, Brown, Ehrlich, Weeks, Aston (1998). "Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on Chromosome 12." Am J Genet **63**: 95-100.

Ebisawa, T., M. Fukuchi, et al. (2001). "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation." J Biol Chem **276**(16): 12477-80.

Eddy, S. (2001). "Non-Coding RNA Genes and the Modern RNA World." Nature Reviews Genetics **2**: 919-929.

Fantini, B., Monteleone, Pallone, Galle, Neurath (2004). "Transforming growth factor beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down regulation of Smad7." J Immunol **172**: 5149-5153.

Fantini, M. C., C. Becker, et al. (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." J Immunol **172**(9): 5149-53.

Fantini, M. C., C. Becker, et al. (2006). "Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis." Gut **55**(5): 671-80.

Fukuchi, M. F., Y.; Masuda, N.; Miyazaki, T.; Nakajima, M.; Sohda, M.; Manda, R.; Tsukada, K.; Kato, H.; Kuwano, H. (2002). "High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7162-5.

Georelik, F. (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." Nat Rev Immun **2**: 46-53.

Gerd Bouma, W. S. (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nature Reviews Immunology **3**: 521-533.

Gershon (1975). "A disquisition on suppressor T cells." Transplant Rev **26**: 170-185.

- Grakoui, B., Sumen, Davis, Shaw, Allen, Dustin (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**: 221-227.
- Hata, L., Wotton, Lagna, Massague (1997). "Mutations increasing autoinhibition inactivate tumor suppressors Smad2 and Smad4." Nature **388**: 82-87.
- Hayashi, A., Qiu, Cai, Xu, Grinnell, Richardson, Topper, Gimbrone, Wrana, Falb (1997). "The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling." Cell **89**: 1165-1173.
- Hershko, C. (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
- Hori, N., Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**: 1057-1061.
- Huang, C. T. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity **21**: 503-513.
- Imamura, T., Nishihara, Oeda, Hanai, Kawabata, Miyazono (1997). "Smad6 inhibits signalling by the TGFbeta superfamily." Nature **389**: 622-626.
- Itoh S, I. F., Goumans, ten Dijke (2000). "Signaling of transforming growth factor beta family members through Smad proteins." Eur J Biochem **267**: 6954-6967.
- Ivanov, M., Zhou, Tadokoro, Lepelley, Lafaille, Littman (2006). "The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 (+) T helper cells." Cell **126**(1121-33).
- Iyer, W., Akhtari, Zhao, Seth (2005). "Targeting TGFbeta Signaling for Cancer Therapy." Cancer Biology and Therapy **3**: 261-266.

Izzi, L. A., L. (2004). "Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation." Oncogene **23**(11): 2071-8.

Jana, J., Haribhai, Waukau, Glisic, Grossman, Mishra, Wen, Wang, Williams, Ghosh (2009). "The role of NF-kappaB and Smad3 in TGFbeta-mediated Foxp3 expression." Eur J Immunol **39**: 2571-2583.

Kaminska, W., Danilkiewicz (2005). "TGFbeta signalling and its role in tumour pathogenesis." Acta Biochemica Polonica **52**: 329-337.

Kavsak, P. R., R. K.; Causing, C. G.; Bonni, S.; Zhu, H.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. (2000). "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation." Mol Cell **6**(6): 1365-75.

Khattari, C., Yasayko, Ramsdell (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**: 337-342.

Kingsley (1994). "The TGF-beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." Genes Dev **8**: 133-146.

Korn, B., Oukka, Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Ann Rev Immunol **27**: 485-517.

Korn, O., Kuchroo, Bettelli (2007). "Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties." Semin Immunol: 362-371.

Kretschmar, M., F. Liu, et al. (1997). "The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase." Genes Dev **11**(8): 984-95.

Laurence, T., Davidson, Kanno, Chen, Yao (2007). "Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation." Immunity **26**: 371-81.

- Leithäuser, K., Trobonjaca, Reimann (2002). "Early Events in the Pathogenesis of a Murine Transfer Colitis." Pathobiology **70**: 156-163.
- Li, W., Sanjabi, Robertson, Flavell (2006). "Transforming growth factor beta regulation of immune response." Annu Rev Immunol **24**: 99-146.
- Lin, X. L., M.; Feng, X. H. (2000). "Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **275**(47): 36818-22.
- Makunin, J. M. I. (2006). "Non-coding RNA." Human molecular Genetics **15**: 17-29.
- Maloy, P. (2001). "Regulatory T cells in the control of immune pathology." Nat Immunol **2**: 816-822.
- Mangan PR, H. L., O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**: 231-4.
- Markus F Neurath, S. F., Laurie H Glimcher (2002). "The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity." Nat Med **8**(6): 567-573.
- Massague, J. (1990). "The transforming growth factor-beta family." Annu Rev Cell Biol **6**: 597-641.
- Massague, J. (1996). "TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins." Cell **85**(7): 947-50.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-91.
- Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." Cell **134**(2): 215-30.
- Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." Genes Dev **14**(6): 627-44.

Massague, R. S. L. J. (1999). "Ubiquitin-dependent degradation of TGFb activated Smad2." Nat Cell Biol **1**: 472-478.

Massague, S., Wotton (2006). "Smad transcription factors." Genes Dev **19**: 2783-2810.

Mc Geachy, C. (2008). "Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road." Immunity **28**: 445-453.

Meersseman, V., Nelles, Blumenstock, Kraft, Wuytens, Remacle, Kozak, Tylzanowski, Niehrs, Huylenbroeck (1997). "The c-terminal domain of Mad-like signal transducers is sufficient for biological activity in the *Xenopus* embryo and transcriptional activation." Mech Dev **61**: 127-140.

Moren, A., T. Imamura, et al. (2005). "Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases." J Biol Chem **280**(23): 22115-23.

Moser M, M. K. M. (2000). "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development." Nature Immunol **1**: 199-205.

Naito, S., Shiiba, Ohuchi, Saigenji, Nagura, Ohtani (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." Cancer Res **58**: 3491-3494.

Nakao, I., Souchelnytskyi, Kawabata, Ishisaki, Oeda, Tamaki, Hanai, Heldin, Miyazono, ten Dijke (1997b). "TGFbeta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." Embo J **16**: 5353-5362.

Neufert C., B. C., Neurath MF. (2007). "An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression." Nature Protocols **2**(8): 1998-2004.

Neurath, M. F. (2005). "Animal models of inflammatory bowel diseases." Ernst Schering Res Found Workshop(50): 119-32.

Neurath, S. W. C. N. B. W. M. F. (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nature Protocols **2**(3): 541-546.

O'Shea J.J., M. A., Lipsky P. (2002). "Cytokines and Autoimmunity." Nature Reviews Immunology **2**: 37-45.

Ogunjimi, A. A. B., D. J.; Pece-Barbara, N.; Le Roy, C.; Di Guglielmo, G. M.; Kavsak, P.; Rasmussen, R. K.; Seet, B. T.; Sicheri, F.; Wrana, J. L. (2005). "Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain." Mol Cell **19**(3): 297-308.

Ogura, B., Inohara, Nicolae, Chen, Ramos (2001). "A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**: 603-606.

Ohashi, N., T. Yamamoto, et al. (2005). "Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF-beta." FEBS Lett **579**(12): 2557-63.

Parronchi, R., Annunziato, Sampognaro, Becchio, Giannarini, Maggi, Pupilli, Tonelli, Romagnani (1997). "Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease." Am J Pathol **150**: 823-832.

Patterson, P. (2000). "TGF-beta related pathways. Roles in Caenorhabditis elegans development." Trends Genet **16**: 27-33.

Pipkin, L. (2007). "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works." Curr Opin Immunol **19**: 301-208.

Podolsky (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**: 417-429.

Rexroth, T. (2005). "Gastroenterologie." Hans Huber.

Robinson, A. (2004). "Ubiquitin-protein ligases." Cell Science **117**: 5191-5194.

Roncarolo, L. (2000). "The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity." Curr Opin Immunol **12**: 676-683.

Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol **22**: 531-562.

Sakaguchi, S., Asano, Itoh, Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**: 1151-1164.

Sanchez-Munoz, D.-L., Yamamoto-Furusho (2008). "Role of cytokines in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(27): 4280-4288.

Shi, Y. M., J (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.

Souchelnytskyi, T., Egström, Wernstedt, ten Dijke, Heldin (1997). "Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the c terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor beta signaling." J Biol Chem **272**: 28107-28115.

Stinchcombe, B., Booth, Griffiths (2001). "The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges." Immunity **15**: 751-761.

Strober, F., Blumberg (2002). "The immunology of Mucosal Models of Inflammation." Annu Rev Immunol **20**: 495-549.

Strober, W., I. Fuss, et al. (2007). "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." J Clin Invest **117**(3): 514-21.

Strober, W. and I. J. Fuss (2006). "Experimental models of mucosal inflammation." Adv Exp Med Biol **579**: 55-97.

Strober, W., I. J. Fuss, et al. (1998). "Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: new insights from murine models of inflammation." Scand J Immunol **48**(5): 453-8.

Szabo, S. J. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**: 655-669.

ten Dijke, G., Itoh F, Itoh S (2002). "Regulation of cell proliferation by smad proteins." J Cell Physiol **191**: 1-16.

Thomas, D. A. M., J. (2005). "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance." Cancer Cell **8**(5): 369-80.

Veldhoen M, H. R., Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**: 179-89.

Wahl, W., Moutsopoulos (2006). "TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege." Immunol Rev **213**: 213-227.

Waldner, M., C. C. Schimanski, et al. (2006). "Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells." World J Gastroenterol **12**(45): 7233-8.

Waldner, M. J. N., M. F. (2009). "Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development." Semin Immunopathol.

Wen, F. (2004). "Inflammatory bowel disease: Autoimmune or Immune-mediated Pathogenesis." Clin Dev Immunol **11**: 195-204.

Wiesner, S. O., A. A.; Wang, H. R.; Rotin, D.; Sicheri, F.; Wrana, J. L.; Forman-Kay, J. D. (2007). "Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain." Cell **130**(4): 651-62.

Wildins (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." Nat Genet **27**: 18-20.

Wilks, M. (1875). "Lectures on Pathological Anatomy, 2nd ed." London: Churchill.

Wirtz, S. N., M. F. (2007). "Mouse models of inflammatory bowel disease." Adv Drug Deliv Rev **59**(11): 1073-83.

Xie W., M. J. C., Reiss D.J., Rimm D.L., Camp R.L., Haffty B.G. and Reiss M. (2002). "Alterations of Smad signaling in human breast cancer carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study." Cancer Res **62**: 497-505.

Yang, H., Ren, Gorska, Chytil, Aakre, Carbone, Matrisian, Richmond, Lin, Moses (2008). "Abrogation of TGFbeta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis." Cancer Cell **13**: 23-35.

Yang, P., Nurieva, Chang, Wang, Watowich (2007). "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells." J Biol Chem **282**: 9358-63.

Zhang, Y., C. Chang, et al. (2001). "Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 974-9.

Zhumabekov T., C. P., Tolaini M., Kioussis D. (1995). "Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice." Journal of immunological methods **185**: 133-140.

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosin-monophosphat
AOM	Azoxymethan
APC	Antigen presenting cell
ATP	Adenosin-triphosphat
BMDC	Bone marrow dendritic cell
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	cirka
Ca ²⁺	Kalzium
CD	cluster of differentiation
cDNA	complimentary DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
d.h.	das heißt
DC	dendritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DSS	Dextran Sodium Sulfat
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmun encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	Embrionale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Durchflußcytometer)
FCS	Fötale Kälberserum
Fwd	forward
g	Schwerkraft
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
HECT	homologous to E6-AP C-terminus
Hs	homo sapiens
IBD	inflammatory bowel disease
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IP	Immunpräzipitation
kb	kilo Basenpaare
LB	Luria Bertani
LBP	Latenz binding protein
loxP	Locus of crossover (X) in P1
LPS	Lipopolysaccharid
mA	milli Ampere
max	maximal
mg	milligram
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mm	mus musculus
MHC	major histo
min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
ncRNA	non-coding RNA

NFkappaB	Nucleo factor kappa B
ng	nanogramm
nm	nanometer
nTreg	natürliche T regulatorische Zellen
P	Phosphat
PA	Polyacrylamid
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Rev	reverse
RING	really interesting gene
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunden
Smurf	Smad ubiquitin regulating factor
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TBST	Tris buffered saline / Tween
TE	Tris/EDTA
TG	transgen
TGFβ	Transforming growth factor beta
TH	T helper
TiTreg	TGFβ induced T regulatorische Zellen
TLR	Toll like receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
U	Units
u.a.	unter anderm
Ub	Ubiquitin
V	Volt
WT	wild-typ
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Lebenslauf

Publikationsliste

An folgenden Publikationen konnte ich während meiner Promotionsarbeit mitwirken:

1. Becker C., Dornhoff H., Neufert C., Fantini MC., Wirtz S., Huebner S., Nikolaev A., Lehr HA., Murphy AJ., Valenzuela DM., Yancopoulos GD., Galle PR., Karow M., Neurath MF. 2006. Cutting edge: IL-23 cross regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol.* 2006 Sep 1; 177(5):2760-4
2. Atreya I., Schimanski CC., Becker C., Wirtz S., Dornhoff H., Schnürer E., Berger MR., Galle PR., Herr W., Neurath MF. 2007. The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Gut.* 2007 Nov;56(11):1572-8

Folgende Posterbeiträge entstanden während meiner Promotionsarbeit:

1. DDW San Diego 2008
Dornhoff H., Becker C., Neurath MF.
Smurf2 activity in T lymphocytes protects mice from experimental colon cancer
Gastroenterology
2. ECI Berlin 2009
Dornhoff H., Becker C., Neurath MF.
Smurf2 activity in T lymphocytes protects mice from experimental colon cancer
Eur.J.Immunol

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Heike Dornhoff, geboren am 28.08.1978, an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mainz, im November 2009

Heike Dornhoff