Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin C (komm. Direktor Univ.- Prof. Dr. C. A. Schmidt) der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

Untersuchung der biologischen Wirkung und deren Bedeutung nach A20-Herunterregulation in peripheren T-Zellen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2016

vorgelegt von: Franka Busse geb. am: 15.10.1984 in: Ludwigsfelde

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. C. A. Schmidt
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. A. Neubauer
Ort, Raum:	Greifswald, Seminarraum O 55.0 der Klinik für Innere Medizin C
Tag der Disputation:	12.06. 2017

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1-5
1.1.	T-Zell-Immunologie	1
1.2.	IL-2	2
1.3.	NFkB-Signaltransduktionsweg	2
1.4.	A20 (TNFAIP3) – Inhibitor im NFκB-Signaltransduktionsweg	3-5
1.5.	Sézary-Syndrom – ein kutanes T-Zell-Lymphom	5
2.	Zielsetzung der Arbeit	6
3.	Material und Methoden	7-21
3.1.	Ficoll	7-8
3.2.	T-Zell-Selektion aus Mononukleären Zellen des peripheren Blutes	8-9
3.3.	Kultivierung von humanen T-Zellen	9
3.4.	T-Zell-Aktivierung	9-10
3.5.	m-RNA-Analytik	10-11
3.6.	Real-time quantitative PCR (TaqMan)	11-14
3.7.	Proteinisolation und Proteinbestimmung	14-15
3.8.	Western-Blot	15-18
3.9.	Gentransfer mittels transienter Transfektion durch Elektroporation	18
3.10.	Messung des Zellzyklus	19
3.11.	Zellproliferations-Messung mit BrdU Flow Kit	19-21
4.	Ergebnisse	22-48
4.1.	Stimulation von T-Zellen gesunder Blutspender und Bestimmung ihrer	22-29
	A20-Expression	
4.2.	Herunterregulation der Genexpression von A20 durch siRNA	30-32
4.3.	A20-Knockdown in der Zell-Linie Myla	33
4.4.	A20-Knockdown in T-Zellen mit Kombination aus siRNA s14259 und	34-38
	s14260 und anschließender Stimulation der T-Zellen	
4.5.	Stimulation von T-Zellen mit anschließendem A20-Knockdown durch	38-48
	Kombination aus siRNA s14259 und s14260	
5.	Diskussion	49-56
6.	Zusammenfassung	57
7.	Literaturverzeichnis	58-60

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Schema der A20-Interaktionen	3
2	Beispiel einer TaqMan-Amplifikationskurve	13
3	Schematischer Aufbau einer Wet Blot-Kammer	17
4	mRNA-Expression von A20 in T-Zellen gesunder Blutspender	22
5	mRNA-Expression von A20 in T-Zellen gesunder Blutspender	24
6	Proteinexpression von A20 in nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen	24
7	A20-mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf vor und nach Stimulation	25
8	IL2-mRNA-Expression in T-Zellen vor und nach Stimulation	26
9	Proteinexpression von A20 in nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen im	27
	zeitlichen Verlauf	
10	Zellzyklusverhalten nicht stimulierter und stimulierter T-Zellen im zeitlichen	29
	Verlauf (0h, 1,5h, 4h, 16h, 115h, 140h)	
11	A20-mRNA-Expression 12h nach A20-Knockdown	30
12	A20-Protein-Expression 12h nach A20-Knockdown	31
13	A20-mRNA-Expression nach Knockdown von A20 in der Zelllinie Myla	32
14	Zeitlicher Verlauf A20-mRNA-Expression nach A20-Knockdown	33
15	Zellzyklusverhalten stimulierter T-Zellen von drei Spendern nach A20-	36
	Knockdown im zeitlichen Verlauf (nach 24h, 48h, 72h, 96h, 114h)	
16	Zeitlicher Verlauf A20-mRNA-Expression nach Knockdown von A20	38
17	Zeitlicher Verlauf A20-Protein-Expression nach Knockdown von A20	39
18	Zeitlicher Verlauf Zellzyklusverhalten nach Knockdown von A20 beispielhaft	41
	an Probennummer 10084	
19	Zeitlicher Verlauf A20-m-RNA-Expression nach Knockdown von A20	43
20	Zeitlicher Verlauf, Mittelwerte aus vier Spenderproben, A20-mRNA-	44
	Expression nach Knockdown von A20	
21	Zeitlicher Verlauf A20-Protein-Expression nach Knockdown von A20	44
22	Zeitlicher Verlauf A20-m-RNA-Expression nach Knockdown von A20	46
23	Zeitlicher Verlauf A20-Protein-Expression nach Knockdown von A20	47
24	Proliferationsanalyse mit BrdU-Assay nach Knockdown von A20 an 4	47
	Spenderproben	

Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von vier unterschiedlichen	27
	Blutspendern vor und nach Stimulation	
2	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen 72h und 96h nach Herunterregulation	31
	von A20	
3	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von drei Spendern nach	35
	Herunterregulation von A20 zu fünf untersuchten Zeitpunkten	
4	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von einem Spender (Probennummer	37
	10067) im Vergleich, nach Herunterregulation von A20 zu fünf untersuchten	
	Zeitpunkten	
5	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von vier Spendern nach	40
	Herunterregulation von A20 zu drei untersuchten Zeitpunkten	
6	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von vier Spendern nach	45
	Herunterregulation von A20 zu drei untersuchten Zeitpunkten	
7	Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von vier Spendern nach	48
	Herunterregulation von A20 zu drei untersuchten Zeitpunkten	

1. Einleitung

1.1. T-Zell-Immunologie

Die Hauptaufgabe des Immunsystems des Menschen besteht in der Erkennung und Eliminierung von Krankheitserregern. Es wird zwischen unspezifischer (angeborener) und spezifischer (adaptiver) Immunabwehr unterschieden. Neben der Fähigkeit zur Abwehr besitzt das Immunsystem die Fähigkeit zwischen "Selbst" und "Nicht-Selbst" zu unterscheiden, außerdem besitzt es ein Gedächtnis. Weiterhin wird bei dem spezifischen Immunsystem zwischen humoraler und zellulärer Abwehr unterschieden. Die humorale Immunität besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die passiv im Blut, sowie in der Lymph- und Gewebeflüssigkeit zirkulieren. Sie sind im Gegensatz zu den Abwehrzellen nicht in der Lage, aktiv an den Ort einer Infektion zu wandern. Eine zelluläre Immunantwort liegt vor, wenn unmittelbar bestimmte Zellen des Immunsystems beteiligt sind. Die zelluläre Immunabwehr wird vor allem durch T-Zellen vermittelt. Sie werden in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen eingeteilt.

Reife T-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR), CD4 zur Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle oder CD8 zur Bindung an MHC-Klasse-I-Proteine. CD4 und CD8 sind Proteine der Zelloberfläche, die mit dem T-Zell-Rezeptor bei der Erkennung der MHC-Proteine kooperieren. Ca. 80% der Lymphozyten im Blut sind T-Zellen, sie haben somit allein zahlenmäßig eine große Bedeutung. T-Zellen binden nur an Antigene, die ihnen präsentiert werden. Nach Bindung des Antigens exprimiert die Zelle IL2 und IL2-Rezeptoren, sie stimuliert somit ihre eigene Proliferation. Naive CD4-positive T-Zellen entwickeln sich nach Aktivierung zu T-Helferzellen, sie erkennen Antigene und üben ihre Funktion über Wechselwirkung mit MHC-Klasse-II-Proteinen der Antigenpräsentierenden-Zelle aus. Sie haben somit ihre Bedeutung in der T-Zell-B-Zell-Kooperation. Naive CD8positive T-Zellen werden nach Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen. Sie erkennen Antigene von MHC-Klasse-I-Molekülen, diese wiederum werden von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und präsentieren zellinternes Antigen. Das Zusammenspiel der beiden T-Zell-Subpopulationen ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer suffizienten T-Zellantwort von elementarer Bedeutung für die Eliminierung von Krankheitserregern [25].

1.2. IL2

Das Zytokin Interleukin-2 wird vor allem von aktivierten T-Zellen produziert. Es wirkt auf sie T-Zellen autokrin und beeinflusst noch weitere Zellpopulationen. Bei NK-Zellen ist es beispielsweise für die effiziente Produktion von Interferon-y erforderlich, B-Zellen werden bei der Synthese von Immunglobulinen unterstützt. Interleukin-2 ist das effektivste Zytokin für die T-Zell-Expansion, besonders in Kombination mit einer CD28-Kostimulation können T-Zellen nach IL-2-Anregung bis zu tausendfach expandieren [26]. Es ist das erste Zytokin, das nach dem primären Kontakt einer T-Zelle mit ihrem Antigen produziert wird [27]. Es hat eine positive Wirkung auf Proliferation, Überleben und Zytokinproduktion.

1.3. NFkB-Signaltransduktionsweg

Der NFkB-Signalweg besitzt eine zentrale Rolle im Immunsystem. Über ihn wird die Aktivierung von Genen, die für Zytokine und andere Botenstoffe kodieren, gesteuert. Er ist damit ein wichtiges Element bei der Steuerung des Immunsystems. Seine Zielgene haben Apoptose hemmende und proliferationsfördernde Proteine zum Produkt. Diese Aktivierung besteht physiologisch nur vorübergehend. Es werden negative Feedbackmechanismen durch Proteine wie A20 oder CYLD zur Beendigung der NFkB-Aktivität vermittelt. Dies soll ein übermäßiges Wachstum bzw. unkontrollierte Vermehrung der Zellen verhindern. Eine konstitutive Aktivierung des NFkB-Signalweges ist kennzeichnend für viele maligne Erkrankungen. Darunter sind Formen von adulter T-Zell-Leukämie, von chronisch lymphatischer Leukämie, das MALT-Lymphom, aber auch Tumore, die durch Mikroorganismen wie dem Ebstein-Barr-Virus, dem Humanen Papillomavirus oder auch durch Helicobacter pylori ausgelöst werden können. Durch die ständige Aktivierung des NFkB-Weges in prämalignen Zellen und Zellen der Mikroumwelt (Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten, Mastzellen, T-Zellen und B-Zellen) werden verstärkt Zytokine, Wachstumsfaktoren, angiogenetische Faktoren sowie Proteasen gegen die extrazelluläre Matrix produziert. Neben gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptose führt dies in den Zellen der Mikroumwelt zur Produktion von Sauerstoffradikalen, die die DNA der prämalignen Zellen weiter schädigen und in den betroffenen Zellen zusammen mit dem konstitutiv aktivierten NFkB-Weg zur endgültigen malignen Transformation führen können [28].

Abbildung 1: Schema der A20-Interaktionen



Vereinfachte Darstellung der A20-Interaktionspartner im NFkB-Stoffwechselweg. Zytoplasmatische Rezeptoren können über unterschiedliche Botenstoffe aktiviert werden. Hier dargestellt sind: TCR (T-Zell-Rezeptor, wird aktiviert über antigenpräsentierende MHC-Moleküle), TLR4 (Toll-like-Rezeptor-4, Aktivierung durch unterschiedliche Stoffe, wie: IL1 (Interleukin 1), LPS (Lipopolysaccharide), dsR -NA (doppelsträngige RNA) und andere), TNFR (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor). TNFR wird durch den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) aktiviert. Diese Aktivierungen setzen weitere Signalkaskaden in Gang. Dargestellt sind: hellgrün: Kinasen, hellgrau: Proteine mit kom plexen Funktionen, gelb: Enzyme, blau: Transkriptionsfaktoren. A20 ist ein zentrales Molekül in diesen Mechanismen. Es inaktiviert RIP, NEMO und TRAF 6 und unterbindet so spezifische DNA-Protein-Interaktionen.

1.4. A20 (TNFAIP3) – Inhibitor im NFkB-Signaltransduktionsweg

1990 wurde A20 erstmals als ein TNF-induzierendes Gen in Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen identifiziert [15]. Ein anderer Name für A20 ist TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alpha induced protein 3). Das Gen ist auf Chromosom 6q23 lokalisiert und kodiert für ein 790 Aminosäuren großes zytoplasmatisches Zinkfinger-Protein [16]. Bekannte Funktionen sind die Hemmung der TNF-induzierten Apoptose und der NFkB-Aktivierung [17]. Weitere Zielmoleküle sind neben der IkB-Kinase u.a. RIP1, TRAF2 und TRAF6.

Die inhibitorische Wirkung von A20 basiert auf der gemeinsamen Aktivierung von zwei Ubiquitin-editierenden Domänen. Am N-Terminus befindet sich die Ovarian-Tumor-Domäne (OTU), welche als Deubiquitinierungs-Enzym funktioniert. Der C-Terminus besteht aus einer 7-Zinkfinger-Domäne, die als E3-Ubiquitin-Ligase fungiert [18].

A20 scheint als dual-funktionierendes Enzym die Ubiquitinierung von multiplen Zielproteinen und den programmierten Zelltod (PCD) zu regulieren [19; 20]. Es wird in B- und T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert und kann in diesen induziert werden [16; 19; 21].

Die Beobachtung, dass A20 den NFKB-Aktivierungsweg kontrolliert, führte zu der Hypothese, dass es an der Lymphom-Entstehung beteiligt sein kann und in diesen Tumorentitäten eine Schlüsselrolle spielt [1]. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine zytogenetische Veränderung, wie chromosomale Translokation oder Genmutation, im entsprechenden zellulären Signaltransduktionsweg zur Deregulation von NFKB und/oder zur Inaktivierung eines negativen Regulators und somit schließlich zu einer konstitutiven NFKB-Aktivierung führen kann.

In mehreren Studien wurde der A20-Status in verschiedenen Non-Hodgkin Lymphomen, vornehmlich B-Zell-Lymphomen, untersucht. In Hodgkin-Lymphomen und primär-mediastinalen Lymphomen konnten Mutationen von A20 nachgewiesen werden [22]. Weitere genetische Analysen identifizierten Deletionen im Chromosom 6q, welche mit Hodgkin-Lymphomen, aber auch Non Hodgkin Lymphomen, insbesondere Subtypen von B-Zell-Lymphomen assoziiert sind [14]. TNFAIP3 ist auf Chromosom 6q23 lokalisiert und es wird vermutet, dass A20 bei diesen Krebsarten als Tumor-Suppressor fungiert [4].

Es ist bekannt, dass diverse chronische Erkrankungen mit einem erhöhten Risiko für Lymphomentwicklung assoziiert sind [23]. Eine verminderte A20-Expression kann die Lymphomentstehung begünstigen.

Es wurde beobachtet, dass A20-knockout-Mäuse die TNF-induzierte NFκB-Aktivierung nicht beenden können. Diese Mäuse entwickelten schwere systemische Entzündungsreaktionen und Kachexie, und sterben noch während der Neonatalperiode [19]. Als Ursache dafür konnte die Expression von multiplen antiapoptotischen Faktoren und proinflammatorischen Zytokinen durch die konstitutive Aktivierung des NFκB-Signalweges nachgewiesen werden [24].

Die Regulation von A20 erfolgt durch einen negativen Feedback-Mechanismus. Bei Aktivierung des NFkB-Signalweges wird es mit den anderen Zielgenen exprimiert, woraufhin es diesen und somit seine eigene Expression inhibiert [16].

Mutationen des A20-Gens, meist nonsense oder frameshift Mutationen, können zur Bildung von einem verkürzten A20-Protein führen und somit einen Funktionsverlust zur Folge haben [4].

1.5. Sézary-Syndrom – ein kutanes T-Zell-Lymphom

Kutane T-Zell-Lymphome gehören zu den Non-Hodgkin-Lymphomen und sind neoplastische Veränderungen reifer, epidermotroper CD4-positiver T-Helfer-Zellen [6]. Diese infiltrieren die Haut und rufen Hautläsionen hervor [11].

Die Diagnosefindung gestaltet sich oft schwierig, weil die Erkrankung mit unspezifischen Symptomen und unterschiedlichsten Erscheinungsformen einhergehen kann. So liegen im Durchschnitt sechs Jahre zwischen dem Auftreten erster Hauterscheinungen und der endgültigen Diagnosestellung. Die beiden häufigsten Formen der kutanen T-Zell-Lymphome sind Mycosis fungoides (MF) und das Sézary-Syndrom, wobei letzteres die leukämische Variante der Mycosis fungoides darstellt. Es wird diskutiert, dass der Name "Mycosis fungoides" sich auf das Aussehen der Hautläsionen bezieht, die zum Teil pilzförmige Gestalt annehmen. Beim Sézary-Syndrom liegt eine Trias aus Erythrodermie, Lymphadenopathie und Sézary-Zellen vor. Diese sind große, im Blut zirkulierende Zellen mit einem stark gefurchten, zerebriformen Kern.

Sowohl Art und Umfang der Hautläsionen, als auch das Bestehen von Erkrankungen außerhalb der Haut sind die wichtigsten Einflussfaktoren für das Überleben der Patienten.

2. Zielsetzung der Arbeit

Bei lymphatischen Neoplasien wird oft ein aktivierter NFκB-Signalweg gefunden. NFκB (Nuclear factor kappa enhancer binding protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der für unterschiedliche biologische Prozesse, wie Immunität, Entzündung und Apoptose, von zentraler Bedeutung ist [15]. Neben einer falschen Aktivierung kann auch ein Verlust deaktivierender Prozesse zu einer Überaktivität dieses Signalwegs führen. Ein physiologischer Inhibitor dieser Signalkaskade ist das Protein A20 oder TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alphainduced protein 3). Dieses führt durch seine Ubiquitin-editierende Funktion zu einem verstärkten Abbau von Proteinen des NFκB-Signalweges.

In Vorarbeiten zum Sézary-Syndrom, einem T-Zell-Lymphom, konnte gezeigt werden, dass in der Hälfte der untersuchten Patientenproben ein Verlust des Tumorsuppressors A20 beobachtet wird. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der bekannten Aktivierung des NFkB-Signalweges bei dieser Erkrankung, da ein negativer Regulator dieser Signalkaskade entfällt.

Um eine mögliche Bedeutung der A20-Inaktivierung in T-Zellen für die Lymphomentstehung zu erhärten, sollte zunächst geklärt werden, welchen Einfluss die T-Zell-Stimulation auf die A20-Expression in T-Zellen gesunder Probanden hat. In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, welche biologische Effekte in T-Zellen gesunder Spender nach Ausschalten des Tumorsuppressors A20 beobachtet werden können.

Zusammenfassend ist das Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, welche Bedeutung ein Verlust des A20-Gens auf Zellwachstum und Apoptose in T-Lymphozyten hat.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen können sich neben einem verbesserten Verständnis der Pathogenese des Sézary-Syndroms auch neue therapeutische Ansätze ergeben.

Die im Nachfolgenden erläuterten Methoden wurden nach laborinternen Standards durchgeführt.

3.1. Ficoll

Die Buffy Coats werden aus der Transfusionsmedizin des Greifswalder Universitätsklinikums bezogen. Bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten entstehen die Buffy Coats als Nebenprodukt.

Aus diesen werden Mononukleäre Zellen mittels Ficoll gewonnen. Ficoll ist der Handelsname eines synthetisch hergestellten Polysaccharids und wird für die Dichtegradientenzentrifugation verwendet.

Hierfür werden 25ml Blut in mit Filter vorbereitete 50ml Leucosept-Tubes eingefüllt, welche bei 1000g 10min bei 18°C zentrifugieren. Unterhalb des Filters befinden sich die Erythrozyten, oberhalb des Filters das Plasma und der Leukozytenfilm. Die obere Phase wird nun in ein neues 50ml Tube überführt und auf 50ml mit PBS aufgefüllt, gewaschen und bei 300g für 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet resuspendiert und erneut mit 50ml PBS gewaschen. Nach diesem zweiten Waschschritt wird der Überstand wieder verworfen und das Pellet nun je nach Pelletgröße in 3-5ml PBS resuspendiert.

10µl Probe werden 1:50 mit Essigsäure verdünnt, diese lässt die in der Lösung verbliebenen Erythrozyten platzen, so dass diese nicht unter dem Mikroskop erscheinen.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Nach Auszählung der Zellen je Großquadrat wird die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet:

Zellen/ml = Zellen/Großquadrat x Kammerfaktor (104)

Außerdem muss die 1:50 Verdünnung in der Berechnung berücksichtigt werden.

Nach der Isolation der Mononukleären Zellen wurden die T-Zellen mit CD3-FITC markiert und anschließend der Anteil der T-Zellen mittels FACS bestimmt. Dieses Verfahren hat

sich bewährt, da bei hohem Ausgangsanteil an T-Zellen in der Probe die Ausbeute nach T-Zell-spezifischer-Selektion höher war. Ab einem Anteil von 30-40% markierter T-Zellen wurden die Mononukleären Zellen für die T-Zell-Selektion weiterverarbeitet.

3.2. T-Zell-Selektion aus Mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Selektion der T-Zellen aus den Mononukleären Zellen erfolgt mittels MACS Pan T cell Isolation Kit II. Dieses Kit besteht aus zwei wesentlichen Komponenten: einem Biotin-Antikörper-Cocktail und den Anti-Biotin Micro Beads. Der Antikörper-Cocktail besteht aus mit Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A. Die Micro Beads sind mit monoklonalem Antibiotin-Antikörper verbunden. Somit werden alle Zellen die nicht T-Zellen sind, also B-Zellen, NK-Zellen, Dentritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und erythroide Zellen magnetisch markiert. Während des gesamten Versuches wird kalt gearbeitet um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf je 10^7 Zellen.

Die Mononukleären Zellen werden bei 300g 10min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 40µl Puffer, bestehend aus PBS und 0,5% FBS, resuspendiert. Nach Zugabe von 10µl Biotin-Antikörper-Cocktail inkubieren die Proben bei 4-8°C für 10min. Dann werden erneut 30µl Puffer und anschließend 20µl Anti-Biotin-Micro-Beads hinzugegeben und gut vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15min bei 4-8°C werden die Proben mit einem 10bis 20-fachen des Labeling Volumens gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (300g 10min 4°C) wird das Pellet in 500µl Puffer resuspendiert.

Abhängig von der Zellzahl werden unterschiedlich große Säulen (MS-oder LS-Säulen) für die Selektion benutzt. Die mit Micro Beads magnetisch markierten Zellen werden in diesen Säulen zurückgehalten. Nach dem Equilibrieren der Säulen, mit 500µl bei den MS-Säulen und 3000µl bei den LS-Säulen, wird die Zellsuspension aufgetragen und sofort aufgefangen, es handelt sich hierbei um eine Negativselektion. Die Säule wird noch drei Mal mit 500µl bzw. 3000µl Puffer gespült und die Zellen aufgefangen. Nun befinden sich die T-Zellen in Lösung und die Zellzahl wird mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Die Überprüfung der Reinheit der T-Zell-Kultur erfolgte durch Detektion des T-Zell-spezifischen Oberflächenproteins CD3 mit einem FITC-gekoppelten (FITC = Fluorescein-Isothiocyanat) Anti-CD3-Antikörper und anschließender Messung im Durchflusszytometer. In allen beschriebenen Experimenten betrug die Reinheit der T-Zellen zwischen 94-99% mit dieser Methode.

3.3. Kultivierung von humanen T-Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen bei 37°C, 5% CO2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet. Wenn die Zellen sehr dicht waren (in der Regel nach 2-3 Tagen) wurde frisches Medium hinzugegeben. Weiterhin musste nach zwei Tagen die Zugabe von II2 erfolgen.

3.4. T-Zell-Aktivierung

Die Stimulation der T-Zellen erfolgt mit dem MACS T cell Activation/ Expansion Kit.

Das Kit besteht aus Anti-Biotin MACSiBead Particles, welche mit biotinylierten Antikörpern gegen menschliche CD2, CD3 und CD28 beladen werden. Die Kombination dieser Substanzen imitiert die Antigen-präsentierende Zelle und aktiviert somit die ruhenden T-Zellen. Für eine optimale Stimulation der T-Zellen beträgt das Verhältnis von MACSiBead Particles zu den Zellen 1:2. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt über den T-Zell-Rezeptor. Nach Aktivierung beginnen sich die Zellen zu teilen und zu differenzieren.

Herstellung der Beads:

Es werden je 100µl CD2-, CD3- und CD28-Biotin vermischt, sowie 500µl Anti-Biotin MAC-SiBead Particles und 200µl Puffer (PBS + 0,5% FBS) zugegeben. Die Lösung inkubiert mindestens 2h bei 2-8°C auf dem Schüttler. Die so hergestellten Beads sind bei 4°C 4 Monate haltbar.

Vorbereitung der Beads:

Für 1 x 10^6 Zellen werden 5µl Beads benötigt. Zu der benötigten Menge Beads wird 100-200µl vorgewärmtes RPMI 1640 Medium zugegeben und der Ansatz bei 300g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 100µl Medium resuspendiert.

Vorbereitung der Zellen:

Die Zellen werden bei 300g für 5min zentrifugiert und das Pellet je 1x106 Zellen in 180µl Medium resuspendiert. Die Zellen und die Beads werden in ein entsprechendes Gefäß

überführt, die Zelldichte soll 5x10^6 Zellen/ml/cm^2 betragen. Nun werden die Proben bei 37°C und 10% CO2 im Brutschrank bis zu 3 Tage inkubiert. Nach 3 Tagen wird das Medium gewechselt, die Zellen auf 2,5x10^6 Zellen/ml verdünnt und 0,2µl IL2/ml zugefügt. Bei der Kultivierung der Zellen müssen nach 14 Tagen neue Beads beigefügt werden.

Die Abnahme von RNA-, Protein-, Zellzyklus- und BrdU-Proben und deren Weiterbehandlung erfolgt zu den gewählten Zeitpunkten.

3.5. m-RNA-Analytik

RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA einer Zelle besteht aus ribosomaler RNA (rRNA), transfer-RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) und anderen RNAs. Die mRNA ist, als Transkriptionsprodukt der Gene, ein Intermediat zwischen der DNA und den Proteinen. Die Untersuchung von mRNA ermöglicht einen Einblick, welche Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt von der Zelle exprimiert werden.

Während des gesamten Versuches wird an einem nur für RNA-Isolation verwendeten Arbeitsplatz mit Abzug, sowie stets mit Handschuhen gearbeitet um eine Kontamination der Proben mit RNAsen zu vermeiden. Die RNA-Isolation wird mittels TRIzol® Reagent von Invitrogen durchgeführt.

Zunächst werden ca. 0,25x10⁶ bis 0,5x10⁶ Zellen durch Zentrifugieren bei 500g für 10min bei 20°C pelletiert. Das Zellpellet wird vom Medium befreit und in 800µl Trizol-Reagenz homogenisiert. Zu diesem Zeitpunkt kann die Probe für eine spätere Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert oder aber direkt weiter verarbeitet werden. Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 5min bei Raumtemperatur werden 200µl Chloroform dazugegeben und die Lösung ca. 15s per Hand geschüttelt, nach anschließender Inkubation für 2-3min wird die Lösung bei 12000g für 15min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend sind 3 Phasen sichtbar, die obere Phase enthält die RNA, die Interphase die DNA und in der unteren Phase befinden sich die Proteine. Die obere Phase wird nun abgenommen, in ein neues Tube überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Außerdem wird je Probe 1µl RNase-freies Glykogen zugefügt, dieses dient als RNA-Träger in der flüssigen Phase. Für 10min inkubieren die Proben bei Raumtemperatur und werden dann bei 12000g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und es folgt ein weiterer Waschschritt mit 500µl Ethanol (75%). Nun wird bei 7600g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, das Pellet trocknet an der Luft. Das RNA-Pellet wird in 15µl RNase-freiem Wasser (DEPC) durch repetitives Pipettieren gelöst und sofort auf Eis gestellt. Im Anschluss kann die RNA in cDNA umgeschrieben oder bei -80°C gelagert werden.

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese erfolgt mit SuperScriptTM II Reverse Transcriptase von Invitrogen.

Für jede Probe werden 5,5µl RNA, 0,5µl Randomprimer (250ng) und 0,5µl 10mM dNTP-Mix vermischt und für 5min bei 65°C im Cycler inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Beim anschließenden Abkühlen hybridisieren die Primer. Anschließend werden je Probe 2µl 5-fach Puffer, 1µl DTT und 0,5µl SuperScript RT (Reverse Transkriptase) hinzu gegeben. Anschließend läuft die reverse Transkription nach folgendem Temperaturprogramm ab: 2min 25°C, 15min 25°C, 50min 42°C, 15min 70°C und unendlich 4°C. Die gewonnene cDNA wird nun 1:10 mit Aqua dest. braun verdünnt, danach werden die Proben bei -20°C gelagert.

3.6. Real-time quantitative PCR (TaqMan)

Die hier angewendete quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (quantitative, real-time polymerase chain reaction; RQ-PCR) ermöglicht die Quantifizierung von PCR-Produkten mittels Generierung eines fluoreszierenden Signals während des PCR-Prozesses. Als Fluoreszenzfarbstoff wird Platinum Sybr-Green-qPCR-SuperMix von Invitrogen verwendet, dieser wird unspezifisch in die DNA eingebaut. Ein Anstieg des fluoreszierenden Signals spiegelt eine Vermehrung der DNA-Fragmente wieder. Die Quantifizierung erfolgt nicht über die absolute Menge an PCR-Produkt, sondern über die Kinetik der PCR-Reaktion. Die Quantifizierung von mRNA erfolgt indirekt über die Messung der Menge an cDNA, die mittels reverser Transkription aus RNA gewonnen wurde

Wie bei herkömmlichen PCR-Verfahren kann auch bei RQ-PCR-Verfahren in drei verschiedene Phasen unterschieden werden. Zunächst wird der Reaktionsansatz erhitzt und damit die doppelsträngige DNA denaturiert. Darauf folgt die Abkühlung, damit die Primer an die DNA hybridisieren können. Dann verlängert die DNA-Polymerase die Primer durch Anhängen von Nukleotiden. Damit ist der gewünschte DNA-Abschnitt verdoppelt und ein neuer Zyklus kann beginnen.

Für die Analyse einer Probe werden folgende Komponenten als Mastermix zusammengefügt:

A. dest.	9,5µl
SYBR-Green-SuperMix	12,5µl
Vorwärts-Primer 10µM	0,5µl
Rückwärts-Primer 10µM	0,5µl

Zum Mastermix hinzu kommen 2µl cDNA, die Proben werden als Dublette auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Weiterhin wird eine Matrizen-freie Kontrolle mitgeführt, um Kontaminationen mit DNA im PCR-System zu erfassen. Für jede Probe wird das "housekeeping gene" β2-Mikroglobulin und das entsprechende Zielgen detektiert.

Die Reaktion im Cycler findet bei folgendem Temperaturprogramm statt: 2min bei 50°C, 10min bei 95°C und anschließend 40 Zyklen : 15s bei 95°C und 1min bei 65°C, anschließend erfolgte die Abkühlung auf Raumtemperatur.

Die Amplifikationskurve der PCR besteht aus einer exponentiellen Phase und einer Plateauphase. Während der exponentiellen Phase überschreitet die Intensität des Fluoreszenzsignals einen Schwellenwert, dieser wird bei den Messungen festgehalten. Diesen Zyklus des PCR-Prozesses bezeichnet man als "Tresholdcycle" (CT). Der CT-Wert ist indirekt proportional zu der Konzentration der Zielsequenz. Je höher die Konzentration des zu bestimmenden DNA-Abschnittes, desto niedriger ist die Anzahl der PCR-Zyklen, die gebraucht wurde, um den Schwellenwert zu erreichen.

Weiterhin ermöglicht die Dissoziationskurvenanalyse die Identifikation von Primer-Dimeren und gibt Aufschluss über die Spezifität der PCR, sowie über eventuelle Kontaminationen der Reaktionskomponenten.

Die Datenaufbereitung ermöglicht die 7500 Sequence Detection Software. Für die Auswertung wird nun der CT-Wert benötigt. Dieser entspricht der Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. Aus den Fluoreszenzkurven mit logarithmischem Maßstab werden die CT-Werte in einem Bereich der Kurve ermittelt, in dem die Amplifikation linear bei logarithmischen Skalen verläuft. Dafür muss ein Schwellenwert

Abbildung 2: Beispiel einer TaqMan-Amplifikationskurve



Schematische Darstellung eines TaqMan-Amplifikationsplot. Zu Beginn der PCR ändert sich das Fluoreszenzsignal kaum. Als Maß für die Fluoreszenz dient der ΔRn-Wert. Der Rn-Wert entspricht dabei dem Quotienten der Emissionsintensität des "Reporter"-Farb - stoffs dividiert durch die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffes. Die Normalisierung durch den Referenzfarbstoff dient dem Aus - gleich unspezifischer Schwankungen.Die Quantifizierung der Genexpression erfolgt über den CT-Wert (*threshold cycle*), der die Zyklenzahl ausdrückt, an dem die "Reporter"-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert erreicht. Der Schwellenwert wird so gewählt, daß er die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben (Probe 1 und 2) in der exponentiellen Phase schneidet. Je hö - her die Ausgangskonzentration der Zielsequenz zu Beginn der PCR ist, desto eher wird der Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der CT-Wert.

gesetzt werden, welcher jede Kurve innerhalb des unteren 2/3 der exponentiellen Phase schneidet, aber über denen der Hintergrund liegt. Je niedriger der Schwellenwert im linearen Bereich definiert ist, desto größer ist die Sensitivität der Ergebnisse.

Die CT-Werte von den untersuchten Genen werden mit probenzugehörigen CT-Werten von β 2-Mikroglobulin (β 2-MG) als Standard normalisiert. Die Transkription von β 2-MG, als "housekeeping gene", dient als Referenzgen, da es nur sehr gering durch experimentelle Behandlung beeinflusst wird.

Für die Datenanalyse findet in Excel die $\Delta\Delta$ CT-Methode Anwendung, bei der zunächst für alle Duplikate einer Probe der Durchschnitts-CT-Wert des jeweiligen untersuchten Gens ermittelt wird. Der zu berechnende Δ CT-Wert ergibt sich aus der Differenz zwischen dem \emptyset CT des Zielgens (\emptyset CTZ) und dem des \emptyset CT von β 2-MG (\emptyset CT β).



Aus den Δ CT-Werten der Kontrollproben und der experimentellen Proben lassen sich die jeweiligen $\Delta\Delta$ CT-Werte kalkulieren.

 $\Delta\Delta$ CT = Δ CT (Kontrolle) - Δ CT (Experiment)

Die abschließende Gleichung gibt Aufschluss, um welches Vielfache sich das Expressionsniveau der untersuchten Gene von den behandelten Proben, bezogen auf die Kontrollproben, verändert hat (X-fache-Änderung).

X-fache-Änderung= 2 ^ (ΔΔCT)

3.7. Proteinisolation und Proteinbestimmung

Proteinisolation

Dafür werden ca. 5-10x10^6 Zellen benötigt, die T-Zellen der einzelnen Spender wurden zusammengeführt, um eine ausreichende Proteinkonzentration zu erreichen. Die Zellen werden bei 300g für 10min bei 4°C pelletiert. Das resultierende Zellpellet wird mit 10ml PBS gewaschen (300g, 10min, 4°C), um die Zellen vom Medium zu befreien. Anschließend wird das Pellet erneut mit 1ml PBS gewaschen (500g, 10min, 4°C) und in ein 1,5ml Tube überführt. Während der Zentrifugation wird frischer RIPA-Lysepuffer von Santa Cruz aus 1ml Lysepuffer mit je 10µl Protease-Inhibitoren Cocktail, PMSF und Sodium Orthoavanadate angesetzt. Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen je nach Größe des Pellets in 50-200µl Lysepuffer-Mix gelöst und 30s gevortext. Nach dem Zellaufschluss wird der Ansatz für 30-45min auf Eis, unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Anschließend werden die Zelltrümmer von den gelösten Proteinen durch einen abschließenden Zentrifugationschritt getrennt (10000g, 10min, 4°C), danach enthält der Überstand das Protein, welches abgenommen wird. Die Proteinlösung wird bei -80°C gelagert.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteine wird mit Hilfe des Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit von Pierce Biotechnology bestimmt. Die Ermittlung der Konzentration erfolgt in Dreifachbestimmung. Die Proben werden in drei Verdünnungen gemessen, 1:250 (2µl Probe + 500µl A.dest.), 1:500 (1µl Probe + 500µl A. dest.) und 1:1000 (1µl Probe + 1.000µl A.

dest.). Als Standard dient BSA (80 μ g/ml). Zum Herstellen der Verdünnungsreihe werden jeweils 200 μ l BSA in A1, A2, A3 und 100 μ l A. dest. in B1/2/3-H1/2/3 pipettiert. Von A1/2/3 in B1/2/3 werden 100 μ l übertragen und vermischt und entsprechend weiter bis G1/2/3 verfahren. Die letzten 100 μ l werden verworfen, so dass in H1/2/3 nur A. dest. vorliegt.

Die verdünnten Proben werden dreifach in A4-12 bis H4-12 aufgetragen. Die fertige Platte sieht folgendermaßen aus:

		0	0		-	0	-	•	•	40		40
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12
A	Standard 80µg/ml		g/ml	Probe 1 1:250			Probe 1 1:500			Probe 1 1:1000		
В	Standard 40µg/ml		g/ml	Probe 2 1:250			Probe 2 1:500			Probe 2 1:1000		
С	Standard 20µg/ml			Probe 3 1:250			Probe 3 1:500			Probe 3 1:1000		
D	Standard 10µg/ml			Probe 4 1:250		Probe 4 1:500		Probe 4 1:1000				
E	Standard 5µg/ml			Probe 5 1:250			Probe 5 1:500			Probe 5 1:1000		
F	Standard 2,5µg/ml			Probe 6 1:250			Probe 6 1:500			Probe 6 1:1000		
G	Standard 1,25µg/ml		µg/ml	Probe 7 1:250		Probe 7 1:500			Probe 7 1:1000			
н	A. dest.			Probe 8 1:250			Probe 8 1:500			Probe 8 1:1000		

Die Detektion der Proteine erfolgt mit frisch angesetztem Micro BCA Working Reagent (25 Teile MA Reagent, 24 Teile MB Reagent und 1 Teil MC Reagent). Für eine 96-Well Platte werden 5 ml MA, 4,8 ml MB und 0,2 ml MC benötigt. Je Well werden 100 µl Micro BCA Working Reagent aufgetragen. Die Platte wird bei 37 °C für 2 h im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert.

Anschließend erfolgt die Auswertung mit der Magellan Software V3.11 Tecan. Nach dem Datenexport können die Proteinmengen berechnet werden.

3.8. Western-Blot

Die Western-Blot Methode dient der Antikörper-spezifischen Detektion von Proteinen. Zu Beginn werden die Protein-Proben in SDS-Polyacrylamidgelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Die hierfür benötigten Gele werden jeweils frisch hergestellt. Die Konzentration des Acrylamids im Gel bestimmt die "Gittergröße" und wird angepasst an die Größe des Proteins, welches von Interesse ist, gewählt, um eine optimale Auftrennung zu erreichen.

Es werden SDS-Polyacrylamidgele nach folgendem Rezept hergestellt. Das Rezept bezieht sich auf die Herstellung von zwei Gelen.

Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)		
0,65 ml 30% Acrylamid	3,30 ml 30% Acrylamid		

3,05 ml	A.dest		
1,25 ml	0,5M Tris HCI (pH 6,8)	4,06 ml	A.dest
0,05 ml	10% SDS	2,5 ml	1,5M Tris HCI (pH 8,8)
25 µl	10% APS	0,1 ml	10% SDS
5 µl	TEMED	50µl	10% APS
		10µl	TEMED

Sammel- und Trenngel unterscheiden sich durch unterschiedliche Porengröße und pH-Werte.

Zuerst wird das Trenngel in die Kammer gegossen, mit A. dest überschichtet bis es nach ca. 15min auspolymerisiert ist. Die Überschichtung mit A.dest. sorgt später für eine gerade Trennlinie zwischen Trenn-und Sammelgel. Das Wasser wird mit Filterpapier entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Unmittelbar nach dem Gießen wird der Gelkamm eingesetzt, um die benötigten Taschen für die spätere Proteinbeladung des Gels zu erhalten.

Es folgt die Vorbereitung der Proteinproben. Es werden die bei der Proteinbestimmung errechneten Volumina verwendet, die 25µg Protein entsprechen. Die erforderliche Menge Reduktionspuffer hängt von diesem Volumen ab. Bei bis zu 12µl Protein werden 4µl, bei bis zu 24µl werden 6µl und bei bis zu 36µl werden 9µl Elektrophoresepuffer eingesetzt.

Die Proteinansätze werden für 5min bei 95°C im Heizblock erhitzt, um die Proteine zu denaturieren.

Die Gelelektrophoresekammer wird mit Laufpuffer von BIO-RAD (100ml 10x Tris/Glycine/ SDS Buffer + 900ml A. dest.) befüllt und die Geltaschen mit diesem gespült, um Luft zu entfernen. Die Proteinproben werden nun aufs Gel aufgetragen und ein Protein Größenstandard (5µl Fermentas Marker) für die spätere Auswertung des Westernblots mitgeführt.

Bei der hier eingesetzten SDS-PAGE wandern die Proteine zuerst in das Sammelgel, in dem sie aufkonzentriert werden und anschließend in das Trenngel, in dem die eigentliche Separation nach Größe erfolgt. Die Trennung erfolgt bei konstanten 150V für ca. 60min.

Während der SDS-PAGE wird die PVDF Membran (von Roth) zugeschnitten und für 2min in Methanol eingelegt. Die so vorbehandelte Membran wird zusammen mit 2 Whatman-Papieren und zwei Fiberpads für eine halbe Stunde in Transferpuffer äquilibriert. Der Transferpuffer wird frisch hergestellt, aus 100ml 10x Puffer (von Biorad), 200ml Methanol und 700ml A. dest..

Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Wet Blot-Kammer

Kathode



Anode

Schematische Aufbau einer Wet Blot Kammer. Ziel des Verfahrens ist der Transfer von Proteinen auf eine Membran und anschließender Nachweis mit Antikörpern. Der Transfers erfolgt von der Kathode zur Anode.

Das Sammelgel wird entfernt und das Trenngel 2x5min in Transferpuffer gewaschen. Das Blotten erfolgt durch das Wet-Blot Verfahren mit in Abb. 3 dargestellter Schichtenanordnung. In einer Gelelektrophoresekammer werden die Proteine bei 100V für 55min auf die Membran unter ständiger Kühlung geblottet.

Zur Beurteilung der Qualität des Blots, wird die mit Protein beladene Membran mit Panceau S Solution (0,1% Ponceau S, 5% Essigsäure) gefärbt. Ist das Proteinmuster auf der Membran überzeugend, wird die Membran zunächst entfärbt. Anschließend erfolgt das Blocken in 10ml Western-SuperStar Blocker für 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler, somit werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgedeckt. Es folgt die Inkubation mit einem entsprechenden Primärantikörper (verdünnt in Western-SuperStar Blocker) schüttelnd für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Nach zweimaligem Waschen der Membran für je 5min in speziellem Waschpuffer wird die Membran für 30min mit dem HRP konjugierten Sekundärantikörper (verdünnt in Western-SuperStar Blocker) versetzt. Dieser Inkubation folgen 4 Waschschritte, zweimal je 5min in Waschpuffer und zweimal je 5min in 1-fachem Assay-Puffer. Schließlich wird die Membran mit dem Chemiluminescent Detektion HRP Reagenz überschichtet und für 5min inkubiert. Die Membran wird anschließend in einer Filmkassette fixiert, die Membran in der Dunkelkammer mit einem Film exponiert und dieser entwickelt. Nachdem der Film getrocknet ist, werden die Markerbanden nachgezeichnet und die Ergebnisse ausgewertet. Alternativ zur

Exponierung von Filmen, wurden die Membranen in späteren Versuchen z.T. digital mit dem Molecular Imager Chemi Doc™ XRS+ von BIO-RAD ausgewertet. Dieses Gerät ermöglicht neben der Visualisierung auch die Quantifizierung der Proteinbanden.

3.9. Gentransfer mittels transienter Transfektion durch Elektroporation

Der Knockdown von A20 wird durch die transiente Transfektion zum Einschleusen von siRNA durch Elektroporation erreicht. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes entstehen in der Zellemembran vorübergehend Löcher, durch die siRNA in die Zelle gelangen kann.

Die Herunterregulation der Genexpression von A20 erfolgt auf posttranskriptionaler Ebene. Die synthetisch hergestellte doppelsträngige siRNA besitzt eine zum A20-Gen komplimentäre Sequenz. Nach Einbringen der siRNA in die Zelle wird sie in einen Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut und dieser bindet mit Hilfe der aufgenommenen RNA-Fragmente komplementär an der Ziel-mRNA, welche anschließend abgebaut wird, eine Verringerung der Genexpression ist die Folge.

Bei der Elektroporation wird durch einen elektrischen Impuls kurzfristig die Zellmembran permeabilisiert, so dass die siRNA aus der Lösung in die Zelle diffundieren kann. Die Transfektion der T-Zellen wird mittels Cell Line Nucleofector® Kit V der Firma Amaxa Biosystems durchgeführt.

Die Methode dient der Einschleusung von siRNAs (s14259, s14260), welche gegen A20 gerichtet sind. Die in Kultur befindlichen T-Zellen werden bei 300g 10min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet wird in human T-cell Nucleofector Solution (+Supplement) resuspendiert. Ein Transfektionsansatz besteht aus max. 7x10^6 Zellen, welche in 100µl Nucleofector Solution (+Supplement) gelöst werden, und 10µl der zu transfizierenden siRNA (1µg/µl). Dieser wird in eine Transfektionsküvette überführt und mit einem für die genutzten Zellen geeigneten Elektroporationsprogramm behandelt. Für die T-Zellen wird das Programm T-020 benutzt. Direkt nach der Elektroporation werden 250µl vorgewärmtes RPMI-Medium dazugegeben und das Gesamtvolumen auf eine Wellplatte aufgetragen, so dass die Konzentration der T-Zellen 5x10^6 Zellen je ml beträgt. Anschließend werden die Proben im Brutschrank kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für Messungen entnommen.

3.10. Messung des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist in zwei Phasen gegliedert, die Mitose (M) und die Interphase, welche aus G1-Phase, S-Phase und G2-Phase besteht, unterteilt.

Um das Stadium zu ermitteln in dem sich die Zellen befinden, werden die Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI), welches in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert, behandelt. Weil dieser prinzipiell auch an doppelsträngige RNA binden kann, ist für eine optimale DNA-Analyse die Vorbehandlung mit RNase notwendig. Die Fluoreszenzintensität des PI ist proportional zur DNA-Menge der untersuchten Zelle und somit abhängig von der Zellzyklusphase. Sie ist am geringsten (halb so groß) in der G1/G0-Phase, da die Zelle hier einen einfachen DNA-Gehalt besitzt, und am höchsten (doppelt so groß) in der G2/M-Phase, weil das Genom hier für die Teilung bereits verdoppelt wurde.

Es werden 0,5x10^6 Zellen der jeweiligen Probe abgenommen und diese bei 500g für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen zwei Mal mit 1ml PBS (ohne Ca2+ und Mg2+) gewaschen und dabei erneut bei 500g für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wird 1-2s gevortext und unter ständigem Vortexen wird den Zellen 500µl eiskaltes Ethanol tropfenweise zugegeben, so werden die Zellen in ihrem momentanen Zellzyklus-Stadium fixiert und die Membran für den späteren Farbstoff permeabel. Die Proben inkubieren dann für 30min bei 4°C oder können bei -20°C für eine spätere Behandlung gelagert werden.

Die Zellen werden bei 1500g 10min bei 4°C zentrifugiert und dann in einem vorher angesetzten Master-Mix gelöst. Dieser Master-Mix besteht je Probe aus 0,3ml PBS, 6µl RNase und 6µl Propidiumiodid. Das Pellet wird in 300µl PBS/RNase/PI resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben inkubieren im Dunkeln für 30min und werden durchflusszytometrisch analysiert.

3.11. Zellproliferations-Messung mit BrdU Flow Kit

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon welches am fünften Kohlenstoffatom ein Brommolekül anstelle einer Methylgruppe besitzt. Während der Synthesephase des Zellzyklus wird BrdU kompetitiv zum Thymidin in die zelluläre DNA eingebaut [29;30]. Über eine spezifische Antikörperreaktion erfolgt dann die Detektion des eingebauten BrdU. Hierbei muss die DNA als Einzelstrang vorliegen. Die verwendeten Antikörper sind mit einer

Peroxidase konjugiert, die Peroxidase löst nach Zugabe einer chromogenen Lösung eine Indikator-Reaktion aus. Die resultierende Farbentwicklung wird fotometrisch gemessen, wobei die Höhe der Extinktion direkt proportional zur DNA-Synthese und zur Zellkonzentration ist [31]. Sie wird zusätzlich von der BrdU- und Antikörperkonzentration, durch deren Inkubationsdauer sowie durch die Dauer der Enzym-Substrat-Reaktion bestimmt.

Die Messung der Zellproliferation erfolgt mittels eines BrdU-Assays (Kit von BD PharmingenTM; Cat. No. 559619)

> <u>Vorbereitungen:</u>

BrdU (1µM)	31µl BrdU (10mg/ml; 32,5mM in 1x PBS) in 1ml Kulturmedium verdünnen → 4 Monate bei 4°C stabil oder einfrieren bei -80°C	
BD Perm/Wash	10x Stock, 1:10 mit A.dest. verdünnen	
Staining Buffer	1x PBS + 3% hitzeinaktiviertes FBS + 0,09% Natriumazid (500ml PBS + 15ml FBS + 450mg NaN3)	
DNase (300µg/ml)	30µl DNase + 70µl PBS je Probe → Lagerung bei -80°C (nur 1x Auftauen!)	

Vor Versuchsbeginn werden die benötigten Lösungen frisch angesetzt:

BrdU-Einbau:

Die Zellen werden gezählt, 1x106 Zellen abgenommen und bei 1200 rpm für 10min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das Pellet in 1ml RPMI resuspendiert und in eine 12 Well-Platte überführt. Hier werden 10µl 1mM BrdU je ml Zellsuspension unter sterilen Bedingungen zugegeben. Es folgt eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 5h.

Fixierung/Permeabilisierung:

Die Zellsuspension wird in ein 15ml Tube überführt, mit 10ml PBS verdünnt und bei 1200rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgenommen und verworfen. Das Pellet wird in 1ml PBS resuspendiert, in ein 1,5ml-Tube überführt und bei 500rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird nach Abnahme des Überstandes in 200µl CytoFix/Perm resuspendiert und inkubiert auf Eis für 20-30min. Danach erfolgt die Zentrifugation bei 1000rpm für 5min bei 4°C. Der Überstand wird erneut verworfen, das Pellet gevortext, zweimal mit 1ml Perm/Wash gewaschen und bei 1000rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 300µl 90% FCS+ 10% DMSO resuspendiert und kann nun zur späteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren werden.

Nach dem Auftauen werden die Zellen in ca. 10ml PBS aufgenommen und bei 200rpm für

10min zentrifugiert. Danach erfolgt das Resuspendieren des Pellets in 100µl BD CytoPerm Plus Puffer und eine Inkubation bei 4°C für 10min. Anschließend werden die Zellen mit 1ml BD Perm/Wash gewaschen und bei 300rpm für 5min zentrifugiert.

<u>Re-Fixierung:</u>

Das Zellpellet wird in 100µl BD CytoFix/CytoPerm Puffer resuspendiert und inkubiert bei RT oder 4°C für 5min, anschließend werden die Zellen mit 1ml Perm/Wash gewaschen und bei 300rpm für 5min zentrifugiert.

> Dnase-Behandlung zur Exposition von eingebautem BrdU:

Die in 100µl DNase (300µg/ml) resuspendierten Zellen inkubieren bei 37°C für 1h, werden mit 1ml BD Perm/Wash gewaschen und bei 300rpm für 5min zentrifugiert.

BrdU-Färbung:

APC-anti-BrdU wird im Verhältnis 1:50 (1µl + 50µl BD Perm/Wash) verdünnt und die Zellen in 50µl APC-anti-BrdU resuspendiert. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 20min werden die Zellen mit 1ml BD Perm/Wash gewaschen und bei 300rpm für 5min zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Färbung der Gesamt-DNA der Zellen mit 20µl 7-AAD Lösung. Danach werden die Zellen in 1ml Staining Buffer resuspendiert und am FACS analysiert.

4. Ergebnisse

4.1. Stimulation von T-Zellen gesunder Blutspender und Bestimmung ihrer A20-Expression

Aus Buffy Coats, die aus der Transfusionsmedizin des Greifswalder Universitätsklinikums bezogen wurden, erfolgte die Gewinnung mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll. Es wurden je Versuch 8 Spenderproben aufgearbeitet. Die gewonnenen Mononukleären Zellen wurden mit CD3-FITC markiert und der Anteil der T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die vier Spenderproben mit dem größten prozentualen Anteil an T-Zellen wurden dann weiterbearbeitet, weil sich herausstellte, dass dann die im Folgenden gewinnbare Menge an T-Zellen am größten ist. Ab einem Anteil von 30-40% markierter T-Zellen wurden die Mononukleären Zellen für die T-Zell-Selektion weiterverarbeitet. Die Selektion erfolgte als Negativselektion. Anschließend wurden die gewon-



Abbildung 4: mRNA-Expression von A20 in T-Zellen gesunder Blutspender

Bestimmung der A20-m-RNA-Expression in peripheren T-Zellen gesunder Blutspender vor und nach Stimulation. Dargestellt sind die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen vor und nach (12h und 18h) Stimulation mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β 2MG; x-Achse: Probennummer der Spender (10017, 10020, 10023, 10024), als Kontrolle wur - de die Sézary-Zelllinie Hut-78 mitgeführt.; y-Achse: relative Anzahl der Kopien bezogen auf Referenz-Gen β 2MG.

nenen T-Zellen erneut mit CD3-FITC markiert und die Effizienz bzw. Reinheit der T-Zell-Isolation am Durchflusszytometer ermittelt, welche bei dieser Selektionsmethode bei allen Versuchen zwischen 94-98% lag.

Danach erfolgte die Stimulation der selektierten T-Zellen mit Anti-Biotin MACSiBead Particles. Diese biotinylierten Antikörper aktivieren den T-Zell-Rezeptor über CD2, CD3 und CD28. Von den unstimulierten und stimulierten T-Zellen wurde RNA isoliert, diese in c-DNA umgeschrieben und anschließend bezüglich ihre A20-Expression untersucht.

Die unstimulierten und stimulierten T-Zellen der einzelnen Spender wurden auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR (TaqMan) bezüglich ihrer A20-Expression untersucht. Als Referenzgen diente bei den Untersuchungen β 2-Mikroglobulin (β 2-MG), welches in T-Zellen konstitutiv exprimiert wird.

Nach Stimulation wurden in diesem Versuch zunächst zwei Zeitpunkte betrachtet, 12h und 16h nach Stimulation, als Kontrolle wurde die Sézary-Zelllinie Hut-78 mitgeführt (Abb. 4).

Es bestand ein deutlicher Unterschied der A20-m-RNA-Expression von nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen. In den nicht stimulierten T-Zellen zeigte sich eine 30- bis 60-fach höhere A20-Expression. In stimulierten T-Zellen ist bei verminderter A20-Expression der NFkB-Signalweg aktiviert, da A20 als Inhibitor fehlt. Durch Aktivierung von NFkB können T-Zellen nach Stimulation proliferieren.

Das Experiment wurde mit Proben neuer Blutspender wiederholt und zusätzlich die A20-Proteinexpression mit Westernblot untersucht.

Zunächst erfolgte die Darstellung der A20-m-RNA-Expression an zwei Spenderproben (Abb. 5). Es zeigte sich erneut eine niedrigere A20-Expression in stimulierten T-Zellen, jedoch waren die Expressionsunterschiede geringer als im Vorversuch, wie an der relativen Kopienzahl sichtbar wird. Als Kontrolle wurde die Mycosis fungoides Zell-Linie Myla dargestellt, die ein ähnliches A20-Expressionsniveau besitzt wie die Zell-Linie Hut-78.

Die Expressionsanalyse von A20-Protein, welche in Abb. 6 dargestellt ist, erfolgte mit Western-Blot, die Proteine der einzelnen Spender wurden nach Abnahme zusammengefasst, um eine ausreichende Konzentration von Protein zu erzielen.

Auf Proteinebene zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zu den Ergebnissen auf mRNA-



Abbildung 5: mRNA-Expression von A20 in T-Zellen gesunder Blutspender

nicht stimulierte T-Zellen

stimulierte T-Zellen (nach 16h)

Kontrolle

Bestimmung der A20-m-RNA-Expression in peripheren T-Zellen gesunder Blutspender vor und nach Stimulation. Dargestellt sind die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen vor und nach (16h) Stimulation mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenzgen β 2MG; x-Achse: Probennummer der Spender (10031 und 10033), als Kontrolle wurde die Mycosis fungoides-Zelllinie Myla mitgeführt.; y-Achse: relative Anzahl der Kopien bezogen auf Referenz-Gen ß2MG. Diagramm a und b Darstellung der selben Ergebnisse mit veränderter Skalierung der y-Achse.

Abbildung 6: Proteinexpression von A20 in nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen



Untersuchung der A20-Proteinexpression mit Western-Blot in humanen T-Zellen gesunder Spender vor und nach (16h) Stimulation. Dargestellt sind die A20-Banden der Proben: nicht stimulierter T-Zellen (1), stimulierter T-Zellen (2) und als Kontrolle die Zelll-Lnie Myla (3). Die Kontrolle der Gelbeladung erfolgte über Panceau-Färbung, hier nicht dargestellt.

Ebene. Die Ergebnisse des Westernblots zeigten eine höhere A20-Expression nach Stimulation der T-Zellen. Als Kontrolle wurde die Zell-Linie Myla mitgeführt.

In den nächsten Experimenten erfolgte die Untersuchung der A20-Expression durch Real-Time-PCR und Western-Blot in kürzeren Abständen nach Stimulation (1,5h und 4h), zum bereits untersuchten Zeitpunkt (16h) und zu einem späteren Zeitpunkt nach Stimulation (140h). Dieser zeitlichen Verlauf wurde mit neu gewonnenen Spenderproben durchgeführt.

Abbildung 7a zeigt exemplarisch die A20-m-RNA-Expression eines Spenders (hier mit Probennummer 10050 bezeichnet) zu den betrachteten Zeitpunkten. Abbildung 7b veranschaulicht die gemittelten Ergebnisse von vier untersuchten Spenderproben (10047,0050, 10053, 10054), welche auf der selben PCR-Platte aufgetragen wurden, zu den bereits genannten Zeitpunkten.


Abbildung 7: A20-mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf vor und nach Stimulation

nicht stimulierte T-Zellen (0h)

- T-Zellen 1,5h nach Stimulation
- T-Zellen 4h nach Stimulation
- T-Zellen 16h nach Stimulation
- T-Zellen 140h nach Stimulation

Bestimmung der A20-m-RNA-Expression vor Stimulation und 1,5h, 4h, 16h und 140h nach Stimulation.

a) Dargestellt sind exemplarisch die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen eines Spenders (Probennummer 10050) mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β2MG; x-Achse: nicht stimulierte T-Zellen, sowie T-Zellen 1,5h, 4h, 16h, 140h nach Stimulation.

b) Dargestellt sind die gemittelten TaqMan-Ergebnisse der T-Zellen von vier Blutspendern mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β2MG; x-Achse: dargestellt sind 5 Zeitpunkte 0h (nicht stimulierte T-Zellen), sowie Zeitpunkte 1,5h, 4h, 16h, 140h nach Stimulation.

Nicht stimulierte T-Zellen zeigten zu allen hier betrachteten Zeitpunkten eine höhere A20mRNA-Expression als stimulierte T-Zellen.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich ein allmähliches Absinken der A20-mRNA-Expression. Nach 16h ist die Menge an A20-mRNA bereits um das 3fache vermindert. Nach 140h ist die A20-Expression bei den hier betrachteten Zeitpunkten am geringsten, jedoch nicht wesentlich geringer als nach 16h.

Zusätzlich zu A20 wurde in den Proben noch die die IL2-Expression bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. IL2 wurde hier als Zielgen des aktivierten NFkB-Signalweges, als Marker für Aktivität der NFkB-Kaskade verwendet. Bei Stimulation der T-Zellen sank die A20-Expression und der NFkB-Signalweg war aktiviert. Dies konnte durch gleichzeitige Messung der IL2- und A20-Expression gezeigt werden. Die IL2-Expression stieg bei sinkender A20-Expression.

Nach 4h ist die IL2-Expression bei den hier betrachteten Zeitpunkten am höchsten, 4h und 16h nach Stimulation ist die Menge an amplifizierter c-DNA mit ca. 5100 Kopien/ml etwa



Abbildung 8: IL2-mRNA-Expression in T-Zellen vor und nach Stimulation



zeitlicher Verlauf aus vier gemittelten Spenderproben b)

Bestimmung der II2-m-RNA-Expression vor Stimulation und 1,5h, 4h, 16h und 140h nach Stimulation.

a) Dargestellt sind exemplarisch die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen eines Spenders (Probennummer 10050) mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β2MG; x-Achse: nicht stimulierte T-Zellen, sowie T-Zellen 1,5h, 4h, 16h, 140h nach Stimulation.

b) Dargestellt sind die gemittelten TaqMan-Ergebnisse der T-Zellen von vier Blutspendern mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β2MG; x-Achse: dargestellt sind 5 Zeitpunkte 0h (nicht stimulierte T-Zellen), sowie Zeitpunkte nach 1,5h, 4h, 16h, 140h nach Stimulation.

gleich. In nicht stimulierten T-Zellen wurden nur sehr geringe Mengen von IL-2 nachgewiesen, auch nach 140h ist die IL2-Expression gering.

Die vorbeschriebenen Proben wurden noch bezüglich ihrer A20-Protein-Expression mit Western-Blot untersucht, dargestellt in Abbildung 9. Die A20-Protein-Expression war in nicht stimulierten T-Zellen am geringsten und stieg nach Stimulation allmählich an, ihr MaAbbildung 9: Proteinexpression von A20 in nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen im zeitlichen Verlauf



Untersuchung der A20 Proteinexpression in humanen T-Zellen gesunder Spender vor und nach Stimulation. Dargestellt sind die Proben nicht stimulierter T-Zellen (0h), stimulierter T-Zellen nach 1,5h , 4h , 16h , 140h und als Kontrolle dient die Zell-Linie Hut-78.Die stärkste hier abgebildete Bande entspricht der A20-Bande. Die Gelbeladungs-Kontrolle erfolgte mittels Panceau-Färbung, hier nicht dar - gestellt.

Tabelle 1: Zellzyklusverhalten peripherer	T-Zellen von	vier	unterschiedlichen	Blutspendern	vor	und
nach Stimulation						

T-Zellen	Spender	G1-Phase	G2-Phase	S-Phase	Zelldetritus
vor Stimulation	10047	93	7	0	0
Oh	10050	98	2	0	0
	10053	98	2	0	0
	10054	95	5	0	0
Stimulation					
nach 1,5h	10047	88	12	0	0
	10050	91	9	0	0
	10053	87	13	0	0
	10054	88	12	0	0
nach 4h	10047	90	10	0	1
	10050	92	8	0	1
	10053	92	8	0	1
	10054	93	7	0	0
nach 16h	10047	91	10	0	1
	10050	95	5	0	2
	10053	91	9	0	1
	10054	94	6	0	1
nach 115h	10047	71	11	19	2
	10050	55	11	34	3
	10053	67	10	23	1
	10054	66	10	24	2
nach 140h	10047	58	5	38	8
	10050	59	2	41	12
	10053	53	8	41	11
	10054	47	7	46	8

Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spender (Nr. 10047, 10050, 10053, 10054) im zeitlichen Verlauf, Messungspunkte: vor Stimulation (0h), sowie 1,5h, 4h, 16h, 115h und 140h nach Stimulation.

ximum hatte sie bei den hier betrachteten Zeitpunkten nach 16h und 140h. Eine erhöhte A20-Protein-Expression in nicht stimulierten T-Zellen, wie es auf mRNA-Ebene der Fall war, konnte hier wieder nicht gezeigt werden. Als Kontrolle wurde die Sézary-Zell-Linie

Hut-78 mitgeführt, die A20-Expression in Hut-78 entsprach in etwa der A20-Protein-Expression in nicht stimulierten T-Zellen. Insgesamt war die A20-Bande (stärkste hier abgebildete Bande) nicht auf einer Linie, weil das mit Protein beladene Gel leicht verdreht in die Blottingkammer eingelegt wurde. Dies erklärt, dass die Banden auf der Membran nicht auf einer Linie abgebildet sind.

Außerdem wurden die gewonnenen Proben bezüglich ihres Zellzyklusverhaltens untersucht, dargestellt in Tabelle 1 und Abbildung 10. Nach 115h zeigten sich bei allen untersuchten Spenderproben Veränderungen im Zellzyklus. Der prozentuale Anteil der in der G1-Phase befindlichen Zellen verminderte sich, wohingegen sich der Anteil der in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen erhöhte. Außerdem stieg der Anteil apoptotischer Zellen vor allem nach 140h deutlich an.

Abbildung 10: Zellzyklusverhalten nicht stimulierter und stimulierter T-Zellen im zeitlichen Verlauf (0h, 1,5h, 4h, 16h, 115h, 140h)



G1-Phase

Ergebnisse der Zellzyklusanalyse aus vier Spenderproben zu sechs betrachteten Zeitpunkten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von nicht stimulierten und stimulierten T-Zel - len unterschiedlicher Spender (Nr. 10047, 10050, 10053, 10054) im zeitlichen Verlauf, x-Achse: Spenderproben-Nummer, y-Achse: Menge der in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen befindlichen Zellen in Prozent. Messungspunkte: vor Stimulation (0h), sowie 1,5h, 4h, 16h, 115h und 140h nach Stimulation, diese sind einzeln dargestellt in den Diagrammen a bis f.

4.2. Herunterregulation der Genexpression von A20 durch siRNA

Für die Herunterregulation (Knockdown) von A20 wurde die Transfektion, zum Einschleusen von siRNA, durch Elektroporation erreicht. Zunächst wurden erneut T-Zellen, wie auch bei den folgenden Versuchen, aus Buffy Coats durch Dichtegradientenzentrifugation und nachfolgender Negativselektion gewonnen. Anschließend wurde die Expression von A20 auf mRNA-Ebene, auf Proteinebene und die Auswirkungen auf den Zellzyklus der T-Zellen untersucht.

Zunächst wurde die A20-mRNA-Expression 12 Stunden nach Herunterregulation durch siRNA gemessen, um einen Eindruck zu erhalten, ob der Knockdown funktioniert hatte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Im ersten Versuch zeigte sich 12h nach dem Knockdown, dass in den behandelten Proben weniger A20 vorhanden war als in der Negativkontrolle. Nach 12h hatte die siRNA s14260 in drei der vier Spenderproben einen stärkeren Effekt auf die T-Zellen.

Nach Abnahme der Proben für die A20-mRNA-Expressionsanalyse wurden die T-Zellen wie in den Vorversuchen mit biotinylierten Antikörpern stimuliert.

Abbildung 11: A20-mRNA-Expression 12h nach A20-Knockdown



A20-mRNA-Expression 12h nach A20-Knockdown

Ergebnisse der Untersuchung auf A20-m-RNA-Expression 12h nach Knockdown durch siRNA gegen A20. Dargestellt sind die gemittelten TaqMan Ergebnisse von T-Zellen mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenzgen β 2MG; x-Achse: nicht stimulierter T-Zellen verschiedener Spender (Probennummer 10056, 10057, 10058, 10061) 12h nach A20 Knockdown; rot = Negativkontrolle, blau = Proben behandelt mit siRNA s14259, gelb = Proben behandelt mit siRNA s14260.

Abbildung 12: A20-Protein-Expression 12h nach A20-Knockdown



NK s14259 s14260

Untersuchung der A20-Proteinexpression in humanen T-Zellen gesunder Spender 36h nach A20-Knockdown. Dargestellt sind die von vier Spendern (Nr. 10056, 10057, 10058, 10061) zusammengefassten Proben: NK (Negativkontrolle), s14259 (mit siRNA s14259 behandelte Proben) und s14260 (mit siRNA s 14260 behandelte Proben). Rot markiert sind die A20-Banden. Die Gelbeladungs-Kontrolle erfolgte mittels Panceau- Färbung, hier nicht dargestellt.

Tabelle 2: Zellzy	vklusverhalten	peripherer	T-Zellen	72h und 96	6h nach H	Herunterreau	lation von	A20
	, all all a lot a little all all all all all all all all all a					ion anteon oga		

Zeitpunkt nach	Spender		G1-Phase	G2-Phase	S-Phase	Zelldetritus
Knockdown						
72h	10056	Negativkontrolle	75	8	17	15
		s14259	69	7	24	15
		s14260	73	5	22	17
	10057	Negativkontrolle	75	4	21	14
		s14259	82	4	14	15
		s14260	75	7	17	16
	10058	Negativkontrolle	90	1	10	9
		s14259	91	0	9	4
		s14260	90	1	9	7
	10061	Negativkontrolle	71	2	27	9
		s14259	67	0	33	8
		s14260	76	1	23	11
96h	10056	Negativkontrolle	74	10	17	23
		s14259	60	0	40	40
		s14260	53	6	41	32
	10057	Negativkontrolle	70	9	21	19
		s14259	67	2	30	11
		s14260	63	8	29	9
	10058	Negativkontrolle	62	7	31	13
		s14259	66	11	24	16
		s14260	61	4	35	14
	10061	Negativkontrolle	69	2	30	6
		s14259	60	9	31	9
		s14260	49	5	46	13

Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spender (Nr. 10056, 10057, 10058, 10061) 72h und 96h nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siRNA: Negativkontrolle, s14259 und s14260.

4. Ergebnisse

24h nach Stimulation, also 36h nach A20-Knockdown, wurde die A20-Proteinexpression mittels Westernblot untersucht (Abb. 12). Hierfür wurden die Proben der einzelnen Spender zusammengeführt um eine ausreichende Menge von Protein zu erhalten.

Im Western-Blot zeigte die Negativkontrolle die höchste A20-Expression. Im Ansatz mit siRNA s14259 behandelter Zellen konnte eine etwas geringere A20-Proteinexpression als in der Negativkontrolle beobachtet werden. In der Probe, in der der Knockdown mit s14260 durchgeführt wurde, konnte am wenigsten A20 nachgewiesen werden. Der Knockdown war somit auch auf Proteinebene erfolgreich.

Es wurden Auswertungen des Zellzyklusverhaltens der Zellen 72h und 96h nach Knockdown, dies entsprach 48h und 72h nach Stimulation, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Es fielen keine signifikanten Veränderungen zu den beobachteten Zeitpunkten auf, lediglich interindividuelle Schwankungen bezüglich der Phasenverteilungen konnten registriert werden.





Ergebnisse der Untersuchung auf A20-Expression in der Zell-Linie Myla 12h, 24h, 48h und 72h nach A20-Knockdown durch verschiedene siRNA's. Dargestellt sind die gemittelten TaqMan-Ergebnisse der Zell-Linie Myla mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β 2MG; x-Achse: untersucht wurden 4 unterschiedliche Zeitpunkte (12h (hellgrau), 24h, 48h, 72h (dunkelgrau)) der verschiedenen siRNAs: Negativkontrolle, nur s14259, nur s14260 und Kombination aus s14259 und s14260.

4.3. A20-Knockdown in der Zell-Linie Myla

In der Mycosis-Fungoides-Zell-Linie Myla wurde ein A20-Knockdown mit beiden siRNAs separat und als Kombination aus beiden untersucht (Abb. 13). Dies diente dem Herausfinden der effektivsten A20-Suppression für die folgenden Versuche. Diese Experimente wurden in der Zell-Linie Myla durchgeführt um Ressourcen, die für die Aufarbeitung von T-Zellen notwendig waren zu sparen. Es wurden vier Beobachtungszeitpunkte (12h, 24h, 48h und 72h nach Knockdown) festgelegt.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten zeigte sich, dass die Kombination der beiden siRNAs s14259 und s14260, zu der stärksten A20-Herunterregulation im Vergleich zum Knockdown mit nur einer siRNA führten. Aufgrund dieser Untersuchung wurde in den folgenden A20-Knockdown-Versuchen mit T-Zellen eine Kombination beider siRNAs verwendet.



Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf A20-mRNA-Expression nach A20-Knockdown

Ergebnisse der Untersuchung auf A20-Expression 24h, 48h, 72h, 96h nach Knockdown durch Kombination beider siRNA (s14259 und s14260) gegen A20. Dargestellt sind zu vier verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h und 96h) die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β2MG; x-Achse: Spender-Nr. 15-17. Negativkontrolle, hier rot dargestellt, Kombination aus siRNA s14259 und s14260.

4.4. A20-Knockdown in T-Zellen mit Kombination aus s14259 und s14260 und anschließender Stimulation der T-Zellen

Zunächst erfolgte der Knockdown von A20 mittels beschriebener Kombination aus siRNA s14259 und s14260, 8h später erfolgte die Stimulation der T-Zellen. Es wurden die A20mRNA- und Protein-Expression 24h, 48h, 72h und 96h nach Stimulation untersucht. Weiterhin erfolgte die Untersuchung des Zellverhaltens mittels Zellzyklusbestimmung zu den genannten Zeitpunkten.

In Abbildung 14 ist der zeitliche Verlauf der A20-mRNA-Expression dargestellt. Zu den hier betrachteten Zeitpunkten 24h, 48h, 72h und 96h war in beinahe jeder der drei Spenderproben eine Absenkung der A20-mRNA-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar. In den Proben 10066 zeigten sich 24h und 96h nach Knockdown starke Abweichungen im Vergleich zu den anderen Spenderproben. Nach 24h zeigte sich bei Nr. 10066 ein sehr hoher Wert mit > 40000 Kopien/ml, bei 96h war der Unterschied geringer. Trotzdem war hier die Expression von A20 in den mit siRNA behandelten Zellen höher als in der Negativkontrolle. Die Rohdaten der beiden Untersuchungspunkte deuteten auf eine Verunreinigung hin, in den anderen Proben konnte dies nicht beobachtet werden.

Die gewonnenen Proben sollten zusätzlich noch bezüglich ihrer A20-Proteinexpression untersucht werden. Jedoch waren die Proteinkonzentrationen zu gering, so dass kein Westernblot durchgeführt werden konnte. Die Proben wurden noch bezüglich ihres Zellzyklus-Verhaltens untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 15 dargestellt.

Proben- nummer	Zeitpunkt nach Knockdown		G1-Phase	G2-Phase	S-Phase	Zelldetritus
10066	24h	Negativkontrolle	91	4	5	9
		s14259+s14260	93	4	3	5
	48h	Negativkontrolle	67	14	20	17
		s14259+s14260	57	19	24	11
	72h	Negativkontrolle	64	10	27	9
		s14259+s14260	61	12	27	6
	96h	Negativkontrolle	63	12	25	9
		s14259+s14260	66	13	21	10
	144h	Negativkontrolle	61	9	30	8
		s14259+s14260	65	9	26	13
10067 a	24h	Negativkontrolle	92	6	3	4
		s14259+s14260	92	6	2	2
	48h	Negativkontrolle	44	19	38	7
		s14259+s14260	44	14	43	8
	72h	Negativkontrolle	56	19	25	4
		s14259+s14260	51	15	33	7
	96h	Negativkontrolle	60	9	31	20
		s14259+s14260	60	12	29	15
	144h	Negativkontrolle	60	11	30	12
		s14259+s14260	60	7	34	13
10067 b	24h	Negativkontrolle	91	6	0	3
		s14259+s14260	96	0	3	3
	48h	Negativkontrolle	-	-	-	-
		s14259+s14260	42	15	43	13
	72h	Negativkontrolle	57	13	30	7
		s14259+s14260	54	16	30	4
	96h	Negativkontrolle	56	11	34	10
		s14259+s14260	58	13	30	10
	144h	Negativkontrolle	62	9	29	12
		s14259+s14260	59	9	32	13
10068	24h	Negativkontrolle	92	8	1	3
		s14259+s14260	94	5	1	3
	48h	Negativkontrolle	51	17	32	14
		s14259+s14260	65	28	7	9
	72h	Negativkontrolle	64	14	22	4
		s14259+s14260	57	14	29	9
	96h	Negativkontrolle	60	15	25	10
		s14259+s14260	60	13	27	9
	144h	Negativkontrolle	62	12	25	13
		s14259+s14260	61	11	28	16

Tabelle 3: Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von drei Spendern nach Herunterregulation von A20 zu fünf untersuchten Zeitpunkten

Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens zu 5 betrachteten Zeitpunkten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spen der (10066, 10067 a, 10067 b, 10068) 24h, 48h, 72h und 96h nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siR -NAs: Negativkontrolle, s14259 und s14260.

Abbildung 15: Zellzyklusverhalten stimulierter T-Zellen von drei Spendern nach A20-Knockdown im zeitlichen Verlauf (nach 24h, 48h, 72h, 96h, 114h)



Ergebnisse der Zellzyklusbestimmungen von 4 T-Zell-Proben zu 5 Beobachtungszeitpunkten Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spender (Nr. 10066, 10067a, 10067b, 10068) 24h, 48h, 72h, 96h, 144h nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siRNA: Negativkontrolle, s14259 und s14260.

Die Probennummer 10067 trat zweimal auf (mit a und b gekennzeichnet), weil hier nach Dichtegradientenzentrifugation eine hohe Menge an Zellen gewonnen werden konnte. Die doppelte Messung des gleichen Spenders diente hier als Qualitätskontrolle und im Folgenden zur Optimierung und Kontrolle der vormals beschriebenen Arbeitsprozesse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Die Spenderproben 10067 a und 10067 b wurde unabhängig von einander aufgearbeitet, die Negativselektion, als auch Stimulation, Kultivierung und schließlich der Knockdown /Transfektion liefen in unterschiedlichen Arbeitsprozessen ab. Es zeigte sich, dass in den meisten Proben ähnliche Ergebnisse beobachtet werden konnten. Die Negativkontrolle der Probe 10067 b erbrachte nach 48h keine messbaren Zellzahlen.

Nach 24h zeigten sich in der Probe b, die mit siRNA gegen A20 transfiziert wurde, keine Zellen in der G2-Phase, dafür war der Anteil an Zellen in der G1-Phase im Vergleich zu 10067 a größer. In der Probe b gab es nach 48h einen höheren Anteil an Zelldetritus.

In Probe 10067 a, die mit siRNA s14259 und s14260 transfiziert wurde, konnten nach 72h

		G1-F	G1-Phase		G2-Phase		nase	Zelldetritus		
		10067		10067		10067		10067		
		a	b	a	a b a		b	a	b	
24h	Negativkontrolle	92	91	6	6	3	0	4	3	
	s14259 + s14260	92	96	6	0	2	3	2	3	
48h	Negativkontrolle	44	-	19	-	38	-	7	-	
	s14259 + s14260	44	42	14	15	43	43	8	13	
72h	Negativkontrolle	56	57	19	13	25	30	4	7	
	s14259 + s14260	51	54	15	16	33	30	7	4	
96h	Negativkontrolle	60	56	9	11	31	34	20	10	
	s14259 + s14260	60	58	12	13	29	30	15	10	
144h	Negativkontrolle	60	62	11	9	30	29	12	12	
	s14259 + s14260	60	59	7	9	34	32	13	13	

Tabelle 4: Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von einem Spender Probennummer 10067 im Vergleich, nach Herunterregulation von A20 zu fünf untersuchten Zeitpunkten

Ergebnisse des Zellzyklusverhaltens nach A20-Herunterregulation eines Spenders. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen eines Spenders (Nr. 10067) zu 5 untersuchten Zeitpunkten (24h, 48h, 72h, 96h und 144h) nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siRNA: Ne - gativkontrolle und einer Kombination aus s14259 und s14260.

4. Ergebnisse

mehr Zellen in der S-Phase als in der Negativkontrolle detektiert werden. In Probe 10067 b ist der Anteil der Zellen in der Negativkontrolle und s14259/ s14260 nach 72h gleich. 144h nach Knockdown zeigte sich in a und b eine Tendenz, dass mehr Zellen in der S-Phase sind als in der Negativkontrolle.

4.5. Stimulation von T-Zellen mit anschließendem A20-Knockdown durch Kombination aus s14259 und s14260

In folgenden Versuchen wurden die T-Zellen gesunder Blutspender erst stimuliert, anschließend erfolgte die A20-Herunterregulation.





Negativkontrolle

s14259 + s14260

Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf A20-mRNA-Expression nach Knockdown von A20



0

моск

Ergebnisse der Untersuchung auf A20 Expression 24h, 48h, 72h, 96h nach A20-Knockdown durch Kombination siRNA (s14259 und s14260) gegen A20. Dargestellt sind 4 Diagramme (a-d) der unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte (24h, 48h, 72h, 96h) und die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β 2MG; x-Achse: Namen der unterschiedlich behandelten Zellen, gelb =MOCK, rot = Negativkontrolle; grün= s14259 und s14260, gemittelte Daten von 4 Spendern (Proben-Nr. 10077, 10078, 10082, 10084).

Abbildung 17: zeitlicher Verlauf A20-Protein-Expression nach Knockdown von A20



Untersuchung der A20 Proteinexpression in humanen T-Zellen gesunder Spender 48h, 72h und 96h nach A20 Knockdown. Dargestellt im zeitlichen Verlauf (48h, 72h, 96h nach Knockdown) sind die Proben, MOCK, NK (= Negativkontrolle), Knockdown A20 durch siRNA s14259+s14260 behandelt wurden. Die Gelbeladungs-Kontrolle erfolgte mittels Panceau-Färbung, hier nicht dargestellt.

Bereits nach Stimulation sank in den anfänglichen Experimenten die A20-Gen-Expression. Hintergrund war das niedrigere A20-Ausgangsniveau zu dem der A20-Knockdown begonnen wurde. Das Fehlen von A20 in den Zellen konnte somit besser simuliert werden.

Bisher diente als Negativkontrolle eine scrambled (non sense) siRNA, in den folgenden Experimenten wurde noch eine zusätzliche Behandlung der Zellen untersucht. Eine weitere Zellpopulation je Spender wurde nur mit Elektroporation (MOCK) behandelt, ohne das Vorhandensein von siRNA. Dies dient dem Ausschluss eventueller unspezifischer Bindung der Negativkontrolle im Bereich der A20-Gen-Region. Die Vermutung war, dass sich MOCK und Negativkontrolle ähnlich verhalten müssten.

Es erfolgte die Festlegung auf die Beobachtungszeitpunkte 24h, 48h, 72h und 96h nach A20 Knockdown. Die mRNA-Expressionsdaten sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Proteinproben von 48h und 72h wurden auf dem selben Gel aufgetragen. Die Proben nach 96h sind auf einem separaten Gel gelaufen.

In dem in Abbildung 17 dargestellten Western-Blot zeigte sich nach 48h und 96h eine geringere A20-Expression als in der Negativkontrolle. 72h nach Knockdown konnte eine gleich starke A20-Expression beobachtet werden.

Im Folgenden wurden Zellzyklusanalysen angefertigt (Tabelle 5). Es wurden die Zeitpunkte 48h, 72h und 96h nach A20-Knockdown betrachtet und somit dieselben Zeitpunkte an denen auch die A20-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht wurde.

Tabelle 5:	Zellzyklusverhalten	peripherer	T-Zellen	von vier	Spendern	nach	Herunterregulation	von
A20 zu dre	ei untersuchten Zeitp	unkten						

Proben- nummer	Zeitpunkt nach Knockdown		G1-Phase	G2-Phase	S-Phase	Zeldetritus
	48h	МОСК	65	7	28	12
10077		Negativkontrolle	68	8	24	10
		s14259 + s14260	61	7	32	13
	72h	моск	86	4	11	16
		Negativkontrolle	88	2	10	13
		s14259 + s14260	76	4	20	12
	96h	моск	91	1	8	22
		Negativkontrolle	90	2	8	20
		s14259 + s14260	88	2	11	16
10078	48h	моск	57	9	34	15
		Negativkontrolle	57	12	32	14
		s14259 + s14260	58	9	34	14
	72h	моск	61	10	29	14
		Negativkontrolle	63	10	27	14
		s14259 + s14260	61	9	31	12
	96h	моск	80	2	18	24
		Negativkontrolle	82	3	15	23
		s14259 + s14260	81	2	17	32
10082	48h	моск	56	10	34	12
		Negativkontrolle	67	9	24	16
		s14259 + s14260	56	10	33	7
	72h	моск	72	6	22	16
		Negativkontrolle	75	6	19	13
		s14259 + s14260	64	7	29	9
	96h	моск	85	3	13	15
		Negativkontrolle	86	2	11	21
		s14259 + s14260	76	3	21	15
10084	48h	моск	60	10	30	12
		Negativkontrolle	60	11	30	13
		s14259 + s14260	57	8	34	10
	72h	моск	66	8	26	16
		Negativkontrolle	66	6	28	13
		s14259 + s14260	55	9	36	12
	96h	моск	73	4	23	16
		Negativkontrolle	76	4	20	20
		s14259 + s14260	64	5	30	20

Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens zu drei betrachteten Zeitpunkten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spender (Nr. 10077, 10078, 10082, 10084) 24h, 48h, 72h und 96h nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siRNA: Negativkontrolle, s14259 und s14260, außerdem wurden Zellen nach Elektroporation (MOCK) analysiert.

Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf Zellzyklusverhalten nach Knockdown von A20 beispielhaft an Probennummer 10084



Ergebnisse des Zellzyklusverhaltens exemplarisch an Hand einer Spenderprobe (Proben-Nr. 10084) zu drei betrachteten Zeitpunkten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen 48h (a), 72h (b) und 96h (c) nach A20-Knockdown. Hier dargestellt G1-Phase = gelb; G2-Phase = rot; S-Pha - se = grün; Zelldetritus = braun. Je Zeitpunkt sind die nur mit Elektroporation behandelten Zellen = MOCK, mit einer Negativkontrolle, so - wie eine mit s14259+s14260 behandelte Zellen dargestellt.

4.Ergebnisse

Abbildung 18 zeigt den zeitlichen Verlauf des Zellkyklusverhaltens nach A20-Knockdown exemplarisch an einer Spenderprobe. Nachdem A20 in den Zellen supprimiert wurde, haben sich die Anteile der in G0/G1-Phase und in S-Phase befindlichen T-Zellen verschoben. In der G1-Phase kam es zu einer prozentualen Verschiebung zwischen 3-11%. Die T-Zellen akkumulierten im zeitlichen Verlauf in der S-Phase, hier war eine Zunahme um 4 bis 10% im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar, wohingegen der G0/G1-Phasen-Anteil abnahm. Der Anteil der Zellen in G2/M-Phase blieb weitestgehend konstant.

Nach 48h waren bereits minimale Veränderungen bei zwei Spendern (Nr. 10077 und Nr. 10084) sichtbar. 72h nach Knockdown fiel auf, dass sich in allen Spenderproben mehr Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befanden und weniger in der G1-Phase. Auch nach 96h waren diese Veränderungen zu sehen. Insgesamt wurden hier nur die späteren Zeitpunkte betrachtet, da sich in Vorversuchen herausstellte, dass Zellzyklusveränderungen stimulierter T-Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt ab ca. 48h zu erwarten waren.

Das Experiment wurde mit T-Zellen von vier neuen Spendern (Nr. 10085, 10088, 10089, 10090) wiederholt. Es sollte untersucht werden, ob diese Ergebnisse reproduzierbar sind.

Erneut erfolgte zunächst die Stimulation der T-Zellen und anschließend der Knockdown von A20. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurde die A20-Expresssion auf m-RNA- und Proteinlevel untersucht, sowie mögliche Veränderungen im Zellzyklus detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19, 20 und 21 dargestellt.

Es zeigte sich, wie in den Vorversuchen, ein erfolgreiches Absenken der A20-mRNA-Expression nach transienter Transfektion. Insgesamt wurden unterschiedlich hohe Expressionsniveaus in den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten detektiert. Die Proben 24h und 48h, sowie 72h und 96h sind jeweils auf eine RealTime-PCR-Platte (96-well-Platte) aufgetragen worden und sind zur gleichen Zeit im Cycler gewesen. Die Expression nach 24h und 48h, bzw. 72h und 96h, ist also direkt miteinander vergleichbar. In Vergleichen zwischen früher und später betrachteten Zeitpunkten ließ sich lediglich eine Tendenz absehen, die relative Kopienzahl konnte nicht direkt verglichen werden. Insgesamt stieg die relative Kopienzahl mit der Zeit. Die A20 Herunterregulation mit siRNA gegen A20 war zu jedem Zeitpunkt erfolgreich.

Im Westernblot konnte ein erfolgreiches Absinken der A20-Protein-Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten dokumentiert werden, vgl. Abbildung 21.



Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf A20-m-RNA-Expression nach Knockdown von A20

s14259 + s14260

Ergebnisse der Untersuchung auf A20 Expression 24h, 48h, 72h, 96h nach Knockdown durch Kombination beider siRNA (s14259 und s14260) gegen A20. Dargestellt sind 4 Diagramme (a-d) der unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte (24h, 48h, 72h, 96h) und die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenzgen β 2MG; x-Achse: Probennummern (10085, 10088, 10089, 10090), je Spender Darstellung der Behandlungsart der Zellen, gelb =MOCK, rot = Negativkontrolle; grün= s14259 und s14260.

Es wurden noch Zellzyklusanalysen durchgeführt, hier wurden die Ergebnisse aus den Vorversuchen bestätigt, siehe Tabelle 6. Erneut waren Zellzyklus Veränderungen sichtbar, diese waren nicht so stark wie beim vorherigen Experiment. Die Veränderungen im Zellzyklus waren vor allem nach 96h zu beobachten, es kam erneut zu einem Anstieg der in der S-Phase befindlichen Zellen, der prozentuale Anteil der in der G1-Phase befindlichen Zellen sank.

Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf, Mittelwerte aus vier Spenderproben, A20-mRNA-Expression nach Knockdown von A20



Ergebnisse der Untersuchung auf A20-mRNA-Expression 24h, 48h, 72h, 96h nach A20-Knockdown durch Kombination von siRNA (s14259 und s14260) gegen A20. Dargestellt sind 4 Diagramme (a-d) der unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte (24h, 48h, 72h, 96h) und die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β 2MG; x-Achse: Namen der unterschiedlich behandelten Zellen, gelb =MOCK, rot = Negativkontrolle; grün= s14259 und s14260, gemittelte Daten von 4 Spendern (Proben-Nr. 10085, 10088, 10089, 10090).

Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf A20-Protein-Expression nach Knockdown von A20



Untersuchung der A20 Proteinexpression in humanen T-Zellen gesunder Spender 48h, 72h und 96h nach A20 Knockdown. Dargestellt im zeitlichen Verlauf (48h, 72h, 96h nach Knockdown) sind die Proben, MOCK, NK (= Negativkontrolle), Knockdown A20 durch siRNA s14259+s14260 behandelt wurden. Die Gelbeladungskontrolle erfolgte mittels Panceau Färbung, hier nicht dargestellt. Die vier Spenderproben (10085, 10088, 10089, 10090) wurden zu jedem Beobachtungszeitpunkt zusammengefasst.

Proben- nummer	Zeitpunkt nach Knockdown		G1-Phase	G2-Phase	S-Phase	Zelldetritus
10085	48h	моск	68	11	21	6
		Negativkontrolle	77	6	17	12
		s14259 + s14260	71	9	20	7
	72h	моск	69	9	22	8
		Negativkontrolle	72	9	19	12
		s14259 + s14260	73	7	20	12
	96h	моск	81	5	13	22
		Negativkontrolle	76	7	16	12
		s14259 + s14260	73	9	18	10
10088	48h	моск	81	6	13	10
		Negativkontrolle	84	7	10	10
		s14259 + s14260	80	4	16	8
	72h	моск	85	5	11	13
		Negativkontrolle	81	4	14	13
-		s14259 + s14260	80	5	15	18
	96h	моск	88	4	8	19
		Negativkontrolle	82	5	13	17
		s14259 + s14260	78	6	15	15
10089	48h	моск	65	10	26	10
		Negativkontrolle	66	11	23	13
		s14259 + s14260	62	10	27	8
	72h	моск	70	12	18	15
		Negativkontrolle	67	11	22	16
		s14259 + s14260	65	10	25	11
	96h	моск	75	12	12	12
		Negativkontrolle	74	8	18	17
		s14259 + s14260	66	10	25	11
10090	48h	моск	71	7	22	9
		Negativkontrolle	70	9	21	10
		s14259 + s14260	68	6	25	7
	72h	МОСК	70	6	24	10
		Negativkontrolle	74	7	19	7
		s14259 + s14260	64	8	28	10
	96h	МОСК	80	5	16	17
		Negativkontrolle	84	2	13	10
		s14259 + s14260	69	6	25	12

Tabelle 6: Zellzyklusverhalten peripherer T-Zellen von vier Spendern nach Herunterregulation von A20 zu drei untersuchten Zeitpunkten

Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens zu drei betrachteten Zeitpunkten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spender (Nr. 10085, 10088, 10089, 10090) 24h, 48h, 72h und 96h nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siRNA: Negativkontrolle, s14259 und s14260, außerdem wurden Zellen nach. Weiterhin wurde ein Teil der Zellen nur mit Elektroporation (= MOCK) behandelt. Das Experiment wurde mit T-Zellen von vier neuen Spendern (Nr. 10091-94) wiederholt, um zu untersuchen, ob diese Ergebnisse reproduzierbar sind.

Erneut erfolgte zunächst die Stimulation der T-Zellen und anschließend der Knockdown von A20. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurden die A20-Expresssion auf mRNA (Abb. 22) und Proteinebene (Abb. 23) untersucht, sowie mögliche Veränderungen im Zellzyklus nachgewiesen.

Veränderungen im Zellzyklus waren bei einer Spenderprobe (10092) frühestens nach 72h sichtbar. In allen anderen Proben zeigten sich die bereits vorbeschriebenen Veränderungen deutlich nach 96h, dann kam es zu einem Anstieg der in der S-Phase befindlichen Zellen, um 2-9%, der prozentuale Anteil der in der G1-Phase befindlichen Zellen sinkt.



Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf A20-m-RNA-Expression nach Knockdown von A20

Negativkontrolle

s14259 + s14260

Ergebnisse der Untersuchung auf A20 Expression 24h, 48h, 72h, 96h nach Knockdown durch Kombination beider siRNA (s14259 und s14260) gegen A20. Dargestellt sind 4 Diagramme (a-d) der unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte (24h, 48h, 72h, 96h) und die gemittelten TaqMan-Ergebnisse von T-Zellen mit relativer Kopienzahl der cDNA (y-Achse) bezogen auf das Referenz-Gen β2MG; x-Achse: Probennummern (10091-94), je Spender Darstellung der Behandlungsart der Zellen, gelb =MOCK, rot = Negativ kontrolle; grün= s14259 und s14260.

Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf A20-Protein-Expression nach Knockdown von A20



Untersuchung der A20 Proteinexpression in humanen T-Zellen gesunder Spender 48h und 72h nach A20- Knockdown. Dargestellt sind die Proben, die mit Elektroporation (MOCK), der Negativkontrolle (NK), Knockdown A20 durch siRNA s14259+s14260 behan delt wurden. Die Gelbeladungskontrolle erfolgte mittels Panceau Färbung, hier nicht dargestellt.

Weiterhin wurden diese Proben mittels BrdU-Assay untersucht, siehe Abbildung 24 Die T-Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine um 5-22% erhöhte Proliferationsrate.

Zusammenfassend sei hier darauf hingewiesen, dass für die Versuche der Zellzyklus-Analysen und bei der Zellproliferationsmessung mit BrdU für die Kontrolle und die mit spezifisch gegen A20 gerichtete siRNAs (s14259 + s14260) transfizierten Ansätze die gleiche Zellzahl ausgesät wurde. Dies wurde durchgeführt, um einen möglichen Fehler, welcher auf eine Ungleichverteilung der Zellzahl zurückzuführen ist, auszuschließen.

Abbildung 24: Proliferationsanalyse mit BrdU-Assay nach Knockdown von A20 an 4 Spenderproben 10091 10092 10093 10094



Ergebnisse der BrdU-Assay-Analysen. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen von vier Spenderproben (Nr. 10091, 10092, 10093, 10094). a) die mit Negativkontrolle transfizierten Zellen, b) die mit spezifisch gegen A20-gerichtete siRNA (s14259 + s14260) transfizierten Zellen. X-Achse: DNA-Gehalt der Zellen; Y-Achse: BrdU-Konzentration.

Tabelle 7: Zellzyklusverhalten peripherer	T-Zellen von	vier Spendern	nach	Herunterregulation \	von
A20 zu drei untersuchten Zeitpunkten		-		-	

Proben- nummer	Zeitpunkt nach Knockdown		G1-Phase	G2-Phase	S-Phase	Zelldetritus
10091	48h	моск	95	1	4	13
		Negativkontrolle	93	4	3	11
		s14259 + s14260	93	1	6	9
	72h	МОСК	88	5	6	14
		Negativkontrolle	90	3	7	17
		s14259 + s14260	90	1	9	13
	96h	моск	90	4	6	16
		Negativkontrolle	92	0	8	13
		s14259 + s14260	85	3	12	13
10092	48h	моск	73	6	21	16
		Negativkontrolle	70	8	22	17
		s14259 + s14260	82	3	15	12
	72h	моск	74	5	22	26
		Negativkontrolle	67	8	25	13
		s14259 + s14260	73	7	20	24
	96h	моск	72	5	23	16
		Negativkontrolle	77	5	18	15
		s14259 + s14260	62	4	34	24
10093	48h	моск	76	7	17	26
		Negativkontrolle	74	7	18	28
		s14259 + s14260	72	5	23	28
	72h	моск	68	8	24	27
		Negativkontrolle	68	8	24	25
		s14259 + s14260	63	6	30	16
	96h	моск	73	6	21	24
		Negativkontrolle	69	9	21	24
		s14259 + s14260	66	6	27	22
10094	48h	моск	75	6	20	16
		Negativkontrolle	77	3	20	14
		s14259 + s14260	75	6	20	12
	72h	моск	71	4	25	35
		Negativkontrolle	70	7	23	35
		s14259 + s14260	71	6	23	31
	96h	моск	74	6	20	29
		Negativkontrolle	75	5	20	33
		s14259 + s14260	67	3	29	35

Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens zu drei betrachteten Zeitpunkten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen in den Zellzyklusphasen (G1-, G2, S-Phase), sowie der Anteil an Zelldetritus, von stimulierten T-Zellen unterschiedlicher Spen der (Nr. 10091-94) 24h, 48h, 72h und 96h nach A20-Knockdown. Die Herunterregulation von A20 erfolgte mit siRNA: Negativkontrolle, s14259 und s14260, außerdem wurden Zellen nach. Weiterhin wurde ein Teil der Zellen nur mit Elektroporation (= MOCK) behandelt.

5. Diskussion

Neoplastische Zellen zeichnen sich gegenüber gesunden Zellen vor allem durch ihre hohe Proliferationsrate und ihre Apoptoseresistenz aus. Der Einfluß einer deregulierten A20-Expression als eine mögliche Ursache für die Entwicklung von T-Zell-Lymphomen wurde bisher nur wenig untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die A20-Expression und funktionelle Eigenschaften von A20 in stimulierten und nicht stimulierten T-Zellen gesunder Blutspender untersucht. Weiterhin erfolgte ein Ausschalten des A20-Gens durch Transfektion von siRNA in T-Zellen und anschließender Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der so behandelten Zellen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass A20-Inaktivierung ein häufiger Mechanismus für konstitutive NFkB-Aktivierung zu sein scheint, der über Stimulation der Zellproliferation und Zellüberleben zur Lymphomentstehung führt [1].

Der Transkriptionsfaktor NFkB (Nuclear factor kappa enhancer binding protein) reguliert diverse biologische Prozesse einschließlich Immunität, Entzündung und Apoptose [2].

Stimulation von T-Zellen

In dieser Arbeit erfolgte die T-Zell-Stimulation gesunder Blutspender über den T-Zell-Rezeptor (TCR) via CD2, CD3, CD28. Es gibt noch weitere Signaltransduktionswege, die die A20-Expression beeinflussen, wie beispielsweise Toll-like-Rezeptoren, TNF-Rezeptor, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und andere. Diese wurden hier nicht betrachtet, stellen aber für Folgeversuche einen interessanten und vielversprechenden Ansatzpunkt dar.

Die Betrachtung weiterer Signalkaskaden würde dem besseren Verständnis der Zellphysiologie und der Bedeutung des negativen Regulators A20 im NFkB-Weg in T-Zellen dienen. Weiterhin wäre zu untersuchen, ob neben dem A20-Verlust noch weitere Veränderungen des TCR-Signalweges die Proliferation der kutanen T-Zell-Lymphom-Zellen antreibt, oder, ob alternative Signalwege von Bedeutung sind. Daraus resultierende Ergebnisse könnten neue Behandlungsoptionen für bisher nicht zu heilende Erkrankungen eröffnen.

In den T-Zellen zeigte sich auf mRNA-Ebene nach Stimulation parallel zum Absinken von

5.Diskussion

A20 ein Anstieg der IL2-Expression und damit letztlich der NFκB-Aktivität. IL2 diente in den Versuchen als NFκB-Zielgen. T-Zellen produzieren IL2 zum Teil selbst, um ihre eigene Proliferation zu fördern. Zwischen Oh und 48h nach Kultivierung sind diese IL2-Werte noch gut auswertbar. Nach 2 Tagen musste der Zellkultur IL2 zugesetzt werden, damit die Zellen weiter proliferieren, so dass die Werte nach 48h kritisch betrachtet werden müssen, weil eine Beeinflussung durch die exogene Zugabe von IL2 nicht ausgeschlossen werden kann. In den hier dargestellten Ergebnissen betrifft dies nur eine Messung, nämlich nach 140h. Für weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang sollte ein anderes NFκB-Zielmolekül für die Aktivität dieses Signalweges herangezogen werden.

Bei den dargestellten A20-mRNA-Expressionsanalysen wurden Lymphom-Zell-Linien als Kontrollgruppen mitgeführt. Die A20-Expression in diesen Zell-Linien ist dem der A20-Expression in nicht stimulierten T-Zellen ähnlich. In den beschriebenen Experimenten wurde nicht immer dieselbe Lymphom-Zell-Linie, bezüglich Zell-Linien-Typ und RNA-Herstellungsdatum, mitgeführt, dies hätte zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse beigetragen. Jedoch konnte in Voruntersuchungen eine vergleichbare A20-Expression zwischen der Zelllinie Myla und Hut-78 gemessen werden, weiterhin erfolgt die cDNA-Gewinnung innerhalb des Labors nach einem gleichen Protokoll, so dass die Ergebnisse vergleichbar sein sollten.

Während der Untersuchungen wurde ein zeitlicher Verlauf der Abnahmezeitpunkte angefertigt, dies diente der Ermittlung des optimalen Abnahme-Zeitpunktes für zukünftige Experimente. So schien 16h nach Stimulation ein guter Abnahmezeitpunkt zu sein, da auch nach 140h kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu der Beobachtung nach 16h zu verzeichnen war. Gute Abnahmezeitpunkte für die Genexpressions-Untersuchungen nach Stimulation lagen also zwischen 4 und 16 Stunden.

Divergenz der A20-Expression nach Stimulation auf Proteinebene

Für die Western-Blot-Analysen wurden die Proben der einzelnen Spender zusammengefasst, um eine ausreichende Proteinkonzentration zu erhalten, hierdurch werden interindividuelle Schwankungen nicht erfasst.

Zu Beginn der Experimente imponierten gegensätzliche Ergebnisse bezüglich A20-

Expression auf mRNA- und -Proteinebene. Auf Proteinebene konnte nach Stimulation eine erhöhte A20-Protein-Expression durch Western-Blot nachgewiesen werden.

Das Material für die Proteinanalyse mehrerer Spender wurde, wie bereits beschrieben, zusammengefasst. Eine mögliche Erklärung der zwischen mRNA- und Proteinebene gegensätzlichen Befunde wäre die bestehende Zeitverzögerung zwischen Genexpression bis zur abgeschlossenen Proteinbiosynthese. Oder aber die Beobachtungen sind auf den negativen Rückkopplungsmechanismus von A20 zurückzuführen. Denn NFkB stimuliert nach Aktivierung die Expression von A20 und führt somit physiologischer Weise zu einem Beenden der eigenen Aktivität. An dem beobachteten Zeitpunkt hat sich dieser Rückkopplungsmechanismus eventuell bereits vollzogen, daher ließe sich A20-Protein vermehrt nachweisen.

Um eine ungleichmäßige Proteinbeladung zwischen den Kontrollen und den mit siRNA transfizierten Proben als Fehlerquelle auszuschließen, wurde eine Kontrolle der Gel-Beladung bei jedem Western-Blot durch Panceau-Färbung durchgeführt, weiterhin wurde der Protein-Ladungsstandards Aktin nachgewiesen. Alle Western Blots zeigten jeweils eine einheitliche Aktinmenge zwischen den Proben.

Die biologische Rolle von A20

In Studien zur Klärung der Rolle des NFkB-Weges bei malignen Erkrankungen wurde nachgewiesen, dass eine Assoziation von der konstitutiven Aktivität dieses Signalweges bei malignen Entartungen vorliegt [3; 4].

Bei B-Zell-Lymphomen wurde dies bereits nachgewiesen. Ein negativer Regulator dieses Signaltransduktionsweges ist das "early response"-Zielgen von NFkB A20. Der Verlust von Chromosom 6q ist eine häufige genetische Alteration in Non-Hodgkin-Lymphomen [1], auf Chromosom 6q befindet sich das A20-Gen.

Untersuchungen zum A20-Status in B-Zell-Lymphomen verdeutlichen, wie relevant der Inhibitor A20 bei vielen dieser Krankheitsbilder ist. Roland Schmitz et al. [4] zeigten, dass in 16 von 36 Hodgkin-Lymphomen (44%) und 5 von 14 Primär mediastinalen B-Zell-Lymphomen PMBLs (= Primär mediastinale B-Zell-Lymphome; = mediastinal grosszelliges B-Zell-Lymphom) (36%) somatische A20-Mutationen auftraten. Novak et al. [5] fanden eine Inaktivierung von A20 durch mono- oder biallelische Mutationen auch bei 25% von Mantelzell-

5.Diskussion

Lymphomen. Die biallelische Mutation von TNFAIP3 wiederum führt zu einem kompletten Verlust von A20-Protein in der Zelle.

Weiterhin wurden durch Honma et al. [1] bei 84 von 383 Non-Hodgkin-Lymphomen (22 %) Deletionen beschrieben. Die Bedeutung von A20 in der Gruppe der T-Zell-Lymphome wurde bisher noch wenig untersucht.

Das Sézary-Syndrom gehört zu den kutanen T-Zell-Lymphomen, der NFkB-Weg ist hier ebenfalls aktiviert. Dieses seltene Non-Hodgkin-Lymphom hat eine schlechte Prognose und bietet bisher nur wenige Behandlungsoptionen.

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde A20 als potentiell relevantes Glied in der NFkB-Signalkaskade beim Sézary-Syndrom identifiziert. Es wurden Proben von Sézary-Erkrankten untersucht, in 7 von 12 (58%) Proben wurden mono- oder biallelische A20-Deletionen nachgewiesen. Andere genetische Veränderungen wie Mutationen in den Exonen oder dem Promotor, oder aber Promotor-Methylierung wurden in den klinischen Proben von ben nicht gefunden [6].

Anders fielen die Untersuchungen bei chronisch lymphatischen Leukämien aus. Diese weisen zwar, wie das Sézary-Syndrom einen aktivierten NFkB-Weg auf, jedoch wurden hier keine oder nur sehr wenige Fälle mit Verlust der A20-Funktion gefunden [7]. Daher könnte bei einigen Lymphomen ein anderer Mechanismus die konstitutive Aktivität dieses Signalweges verursachen.

Bei einer Deletionsrate von 58% scheint A20 beim kutanen T-Zell-Lymphom Sézary-Syndrom jedoch von großer Bedeutung zu sein. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass weitere zytogenetische und molekularbiologische Mechanismen ebenfalls eine Rolle für die Krankheitsentstehung spielen.

Knockdown von A20

Während eine A20-Überexpression in B-Zell-Linien Apoptose induziert, ist eine Herunterregulation mit einer Apoptose-Resistenz und erhöhter Klonogenität assoziiert. Diese Effekte werden durch eine nachweislich erhöhte NFkB-Aktivität verursacht [1].

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Herunterregulation von A20 bei T-Zellen gesunder Blutspender verhält. Es sollte geklärt werden ob diese Beobachtungen auch in T-Zellen getroffen werden können um letztlich Informationen über mögliche Auswirkungen einer herabgesetzten A20-Expression in T-Zell-Lymphomen zu erhalten. Der in-vitro Knockdown wurde mit Transfektion von siRNA (s14259+s14260) durchgeführt, anschließend wurden die Auswirkungen auf mRNA-, durch Real-Time-PCR, und Protein-Ebene, durch Western-Blot, analysiert. Es wurden 3 verschiedene siRNAs, die an unterschiedlichen Zielsequenzen angreifen, eingesetzt. Eine Negativkontrolle (Nonsense-siRNA) und 2 spezifische siRNAs gegen das A20-Gen. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von A20 in T-Zellen funktioniert und die Methode erfolgreich etabliert werden konnte.

Die RNA für die Gen-Expressions-Analysen wurde 12h nach der siRNA-Transfektion isoliert, da bei diesem Zeitpunkt die geringste A20-Expression ermittelt wurde. Es ist daher notwendig Gen-Expressions-Analysen mit verkürzten Zeitintervallen zu erstellen, welche früher nach der Behandlung mit siRNA beginnt, um mögliche frühe Effekte der Herunterregulierung von A20 auf die Genexpression messen zu können. Zunächst sollten hierbei bisher identifizierte Gene betrachtet werden, die mit der A20-Funktion in engem Zusammenhang stehen. Weiterhin ist es denkbar weitere NFkB-Inhibitoren zu untersuchen, um die komplexen Signaltransduktionswege in T-Zellen besser verstehen zu können.

Grundlegende Informationen zur Pathogenese dieser Erkrankungen können so gewonnen und schließlich mögliche Zielmoleküle für eine spezifische Therapie dieser Neoplasien heraus gefiltert werden.

Im Anschluss daran müssten noch weitere funktionelle Untersuchungen dieser neuen Moleküle durchgeführt werden. Werden die Ergebnisse jedoch bestätigt, müssten die beobachteten Veränderungen in der Transkript-Menge mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht werden.

A20-Inaktivierung scheint ein häufiger Mechanismus für konstitutive NFkB-Aktivierung zu sein, der zur Lymphom-Entstehung über Stimulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens führen könnte [1].

Im weiteren Verlauf wurden die T-Zellen erst stimuliert und anschließend erfolgte der Knockdown von A20. Bereits nach Stimulation sank in den anfänglichen Experimenten die A20-Expression, das noch vorhandene A20 konnte somit durch den Knockdown signifikant abgesenkt werden. Denn der durchzuführende Knockdown konnte so auf einem niedrigeren Niveau angreifen. Ein Nichtvorhandensein von A20 konnte somit besser simuliert werden.

5.Diskussion

Anschließend könnten die resultierenden Ergebnisse miteinander verglichen und die Knockdown-Effektivität weiter gesteigert bzw. zellspezifisch die effektivste Transfektions-Methode etabliert werden.

Auswirkungen des A20-Knockdowns auf den Zellzyklus

Die Beeinflussung des A20-Expressionsstatus in den behandelten T-Zellen verursachte eine Akkumulation der Zellen in der Synthese-Phase des Zellzyklus, dies führte zu einer vermehrten Proliferation. Diese Beobachtungen wurde durch BrdU-Assays bestätigt und zeigten, dass ein A20-Verlust den Übergang von G1-Phase in die S-Phase beschleunigt.

Die Resultate von Zellzyklus- und Zellproliferationsmessungen könnten durch alternative Analysemethoden kontrolliert werden. Weiterhin wäre eine Apoptose-Messung in den T-Zellen nach A20-Knockdown interessant.

Das Ausschalten des negativen Regulators A20 führt also zu einer Aktivierung des NFkB-Signalweges und damit verbunden zu einer vermehrten Klonogenität in T-Zellen gesunder Blutspender. Außerdem sind andere genetische Veränderungen, das Existieren und die daraus resultierenden Abhängigkeiten von alternativen Signalwegen der Zellen denkbar.

In Zellen mit A20-Verlust könnte sich so eine Abhängigkeit von diesen alternativen Signalwegen entwickeln. Wenn diese nun identifiziert würden, könnten diese als potenzielle Therapieziele Bedeutung erlangen. Andersherum könnte beispielsweise eine Rekonstitution von A20 in defizienten Zellen bei Erkrankungen mit bereits nachgewiesener Abhängigkeit von diesem Signalweg zu einer Limitierung der Proliferation führen. Durch Re-Expression von A20 kam es zu Cytotoxizität und einer signifikanten Verringerung von NFkB-Zielgenen [4]. Bei Versuchen mit Diffus-Grosszelligen-B-Zell-Lymphom-Zelllinien konnte durch Reexpression von A20 in biallelisch deletierten Zellen Apoptose induziert und ein Zellwachstumsstopp herbeigeführt werden [8].

Eine vorherrschende These ist, dass A20 eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor besitzt. Weiterhin bemerken Compagno et al. [8], dass ein A20-Verlust zur NFkB-Aktivierung führt und dies wiederum onkogenes Potential hat, durch Inhibierung von Apoptose und Förderung der Zellproliferation. Wie bereits geschildert wirkt A20 bei einem Teil von Lymphomen wie ein Tumorsuppressor. In der Literatur zeigt sich jedoch auch noch ein anderes Bild, so scheint A20 bei Gliomen hingegen wie ein Tumor-Verstärker zu wirken [9]. Diese kontro-

versen Beobachtungen zeigen die verschiedenartigen A20-Effekte, die vermutlich gewebeund differenzierungsabhängig sind.

Bei allen durchgeführten Studien, die zu A20 an Lymphom-Zell-Linien vorgenommen wurden, ist zu bedenken, dass es sich um veränderte und dauerhaft stimulierte Zellen handelt. Rückschlüsse auf das Krankheitsbild im Menschen sind also nur bedingt möglich. Die Untersuchung von Patientenproben, die Reaktion der Lymphom-Zellen und T-Zellen auf Kultivierung, Stimulation und Manipulation der A20-Expression könnten hier von großem Interesse sein.

Eine Klassifikation von Tumoren und deren Tauglichkeit für deren NFkB-Hemmung wird benötigt um mögliche sehr spezifische Therapieoptionen zu entwickeln und so möglicherweise in den Funktionsmechanismus nur der erkrankten Zellen Eingreifen zu können.

Das Ausschalten des negativen Regulators A20 führt also zu einer Aktivierung des NFĸB-Signalweges und damit verbunden zu einer vermehrten Klonogenität in T-Zellen gesunder Blutspender. T-Zellen besitzen die Kapazität zur schnellen Proliferation innerhalb kurzer Zeit, wie bspw. bei der klonalen Expansion, die nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation von IL2 vermittelt wird. Zu einer ausgeglichenen Homöostase gehört jedoch nach Aktivierung auch wieder eine Überführung in den Ruhezustand, dies ist bei malignen Erkrankungen häufig nicht mehr gegeben.

Dieser Effekt konnte auch nach Stimulation der T-Zellen ohne A20-Verlust beobachtet werden, es zeigte sich nach Stimulation ein Absinken der A20-Expression, was letztlich in einer natürlichen Beendigung des NFkB-Signalweges resultiert.

NFkB und Chemo-Resistenz

Außerdem wird in der Literatur diskutiert, dass die Aktivierung von NFκB vermutlich mit einer Apoptose-Resistenz assoziiert ist und dies möglicherweise verantwortlich ist für ein vermindertes Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie [10]. Der Mechanismus ist folgender: nach Verabreichung von Zytostatika entstehen intrazellulär als Antwort auf diese Medikamente reaktive Sauerstoffgruppen, diese wiederum induzieren zelluläre Apoptose. Es wurde gezeigt, dass NFκB-Aktivierung zur Eliminierung von Sauerstoff-Radikalen [11] führt und somit zur treibenden Kraft für die Chemo-Resistenz [1]. Dies ist sicher nicht der einzige Pathomechanismus solch einer Resistenz-Entwicklung, aber ein wichtiger Teilaspekt.

Wichtig ist ebenfalls der immunologische Ansatz gerade auch in Bezug auf vermutete antiinflammatorische Wirkung von A20. In Experimenten mit A20-negativen Mäusen, zeigte sich, dass diese eine schwere generalisierten Inflammation durch verlängerte NFkB-Aktivität entwickelten [12].

Es konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus der TNFAIP3-Gen-Region für die Ausprägung von systemischem Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Zöliakie verantwortlich ist [13]. Die verminderte A20-Funktion oder -Expression könnte zur Pathophysiologie dieser Erkrankungen gehören. Es lässt vermuten, dass A20 ein häufiger Suppressor von beiden, Autoimmunerkrankungen und Lymphomen ist und damit möglicherweise eine entscheidende molekulare Verbindung zwischen Entzündung und Krebs darstellt [14].

Die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase durch ein Gleichgewicht von Proliferation, Überleben und Apoptose ist essentiell für eine effektive Immunantwort.

Nach erfolgter Immunantwort werden die T-Zellen, die nicht dem programmierten Zelltod unterliegen, wieder in eine Ruhephase des Zellzyklus überführt.

Es muss Mechanismen geben, die zirkulierende T-Zellen vor einer überschießender Proliferation schützen, ein solcher Mechanismus scheint A20 zu sein. Die weitere Aufklärung solcher Mechanismen ist von großem Interesse, da sie eine Möglichkeit bieten, eine übermäßige Proliferation der T-Zellen und somit maligne Entartung zu verhindern.

A20 und NFkB werden in nahezu allen Zellen exprimiert. Eine A20-Deletion wird häufig in B-Zell-Lymphomen gefunden, was eine Bedeutung bei der Entwicklung dieser Erkrankungen vermuten lässt.

Der hohe Anteil an A20-Deletionen weist auf eine große Relevanz dieses Inhibitors auch beim Sézary-Syndrom hin. Die weitere Aufklärung der biologischen Bedeutung könnte neben einem verbesserten pathogenetischen Verständnis möglicherweise auch bei dem Auffinden neuer therapeutischer Zielmoleküle helfen [6].

6. Zusammenfassung

Wichtige Signaltransduktionswege der Zelle sind bei malignen Erkrankungen häufig gestört. Ein Beispiel hierfür ist der NFkB-Signalweg. NFkB-Aktivierung kann zur Expression immun-modulatorischer Moleküle, sowie zu Entzündung und Proliferation von Zellen führen. Das Protein A20 wurde bereits als ein bedeutender Inhibitor im NFkB-Weg identifiziert.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei dem kutanen T-Zell-Lymphom, Sézary-Syndrom, genetische Veränderungen von A20 häufig sind und A20 eine mögliche tumorsuppressive Wirkung bei diesem Teil der kutanen T-Zell-Lymphome hat. Um die biologische Bedeutung eines A20-Verlustes in T-Zellen zu prüfen, wurden die Effekte von A20-Herunterregulation (Knockdown) in gereinigten peripheren T-Zellen gesunder Blutspender untersucht. Zunächst wurde die A20-Expression in nicht stimulierten und stimulierten T-Zellen verglichen. Es zeigte sich im Vergleich auf mRNA-Ebene eine verminderte A20-Expression und ein Anstieg der IL2-Expression nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor.

Interessanterweise zeigte sich auf Proteinebene ein umgekehrtes Verhalten, nach Stimulation wurde eine erhöhte A20-Expression nachgewiesen.

Weiterhin wurde untersucht, welche biologischen Veränderungen sich in T-Zellen gesunder Blutspender nach A20-Herunterregulation durch transiente Transfektion mit siRNA nachweisen lassen. Dafür standen zwei siRNAs zur Verfügung, die sich für eine effektive Herunterregulation von A20-mRNA bewährt hatten. In nicht stimulierten T-Zellen zeigte sich keine messbare biologische Auswirkung des A20-Knockdowns bezüglich Zellvitalität, Zellzahl und Zellzyklus-Status. Stimulierte T-Zellen hingegen zeigten eine verminderte A20-Expression auf mRNA- und Proteinebene, aber einen deutlichen Anstieg ihrer Replikationsaktivität nach A20-Knockdown. Dies manifestierte sich in einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus.

Der Verlust der A20-Expression in T-Zellen gesunder Probanden führte zu einer erhöhten NFkB-Aktivität und einem Ansteigen der Proliferation. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass der Verlust von A20 an einer malignen Transformation von T-Zellen beteiligt sein kann.

7. Literaturverzeichnis

- 1 **TNFAIP3 A20 fuctions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin Iymphomas.** Keiichiro Honma, Shinobu Tsuzuki, Masao Nakagawa, Hiroyuki Tagawa, Shigeo Nakamura, Yasuo Morishima, Masao Seto; Blood, DOI10.1182; 2009
- 2 *The Role of Ubiquitin in NF-kB Regulatory Pathways.* Brian Skaug, Xiaomo Jiang, Zhijian J. Chen; Annual Review of Biochemistry 78; 769-96; 2009
- 3 *A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme.* Barbara A. Malynn and Averil Ma; Journal of Experimental Medicine Vol. 206 No 5; 977-980; 2009
- 4 **TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma.** Roland Schmitz, Martin-Leo Hansmann, Verena Bohle, Jose Ignacio Martin Subero, Sylvia Hartmann, Gunhild Mechtersheimer, Wolfram Klapper, Inga Vater, Maciej Giefing, Stefan Gesk, Jens Stanelle, Reiner Siebert, Ralf Küppers; Journal of Experimental Medicine Vol. 206 No 5; 981-989; 2009
- 5 The NF-kB negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. Urban Novak, Andrea Rinaldi, Ivo Kwee, Subhadra V. Nandula, Paolo M. V. Rancoita, Mara, Compagno, Michaela Cerri, Davide Rossi, Vundavalli V. Murty, Emanuele Zucca, Gianluca Gaidano, Riccardo Dalla-Favera, Laura Pasqualucci; Blood. Vol. 113, No. 20; 2009
- 6 A20 Aberrationen bei T-Zell Lymphomen; Floriane Braun; Diplomarbeit; July 2010
- 7 *Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL.* Claudia Philipp, Jennifer Edelmann, Andreas Bühler, Dirk Winkler, Stephan Stilgenbauer, Ralf Küppers; International Journal of Cancer; May 2010
- 8 *Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma.* Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L; Nature; Jun 2009
- 9 Targeting A20 decreases glioma stem cell survival and tumor growth. Hjelmeland AB, Wu Q, Wickman S, Eyler C, Heddleston J, Shi Q, Lathia JD, Macswords J, Lee J, McLendon RE, Rich JN; PLoS Biol.; Feb 2010
- 10 A loss-offunction RNA interference screen for molecular targets in cancer. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, et al; Nature 441 (7089); 106- 110; 2006
- NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. Sakon S, Xue X, Takekawa M, et al; EMBO J. 22(15) 3898-3909; 2003

- 12 Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. Lee EG, Boone DL, Chai S, et al.; Science 289; 2350-2354; 2000
- 13 Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. Musone, S.L., K.E. Taylor, T.T. Lu, J. Nititham, R.C. Ferreira, W. Ortmann, N. Shifrin, M.A. Petri, M.I. Kamboh, S. Manzi, et al; Nat. Genet. 40

1062-1064; 2008

- 14 *A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme* Barbara A. Malynn, Averil Ma.; J. Exp. Med. Vol. 206 No. 5; 977-980; 2009
- 15 The NF-kB negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. Urban Novak, Andrea Rinaldi, Ivo Kwee, Subhadra V. Nandula, Paolo M. V. Rancoita, Mara, Compagno, Michaela Cerri, Davide Rossi, Vundavalli V. Murty, Emanuele Zucca, Gianluca Gaidano, Riccardo Dalla-Favera, Laura Pasqualucci; Blood. Vol. 113, No. 20; 2009
- 16 **The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel zinc finger protein** Opipari A et al; Journal of Biological Chemistry 265; 14705-14708; 1990
- 17 *Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation.* Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D.; Immunity. 12(3); 301-311; 2000
- 18 De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM; Nature 430 (7000); 694-699; 2004
- 19 *Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice.* Lee, E.G., D.L. Boone, S. Chai, S.L. Libby, M. Chien, J.P. Lodoce, and A. Ma; Science 289; 2350– 2354; 2000
- 20 *The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity.* Opipari, A.W. Jr., H.M. Hu, R. Yabkowitz, and V.M. Dixit; J. Biol. Chem. 267; 12424–12427; 1992.
- 21 Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. Sarma, V., Z. Lin, L. Clark, B.M. Rust, M. Tewari, R.J. Noelle, and V.M. Dixit; J. Biol. Chem. 270; 12343–12346; 1995
- 22 Inactivating mutations of TNFAIP3 (A20) indicate a tumor suppressor role for A20 in Hodgkin's Iymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma [abstract]. Schmitz R, Hartmann S, Giefing M, et al.; Hematol J. 92(S5); 41; 2007
- 23 Autoimmunity and lymphomagenesis. Goldin, L.R., and O. Landgren. Int. J. Cancer. 124; 1497–1502; 2009

- 24 *NFκB activation in development and progression of cancer.* Jun-ichiro Inoue, Jin Gohda, Taishin Akiama, Kentaro Semba; Cancer Sci. Vol 98. No 3; 268-274; 2007
- 25 *Biochemie Duale Reihe.* J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, Rainer Deutzmann; Thieme Verlag; p. 693-720; 2006
- 26 *The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2).* Lan, Selmi, Gershwin; Journal of Autoimmunity; 31; p.7-12; 2008
- 27 *Grundwissen Immunologie.* Schütt, Bröker; Spektrum Akademischer Verlag; 2. Auflage p.98; 2009
- 28 *NF-κB activation in development and progression of cancer;* Inoue, Gohda, Akiyama, Semba; Cancer Sci; 98; p.268-274; 2007
- 29 Genetics of human cell lines. III Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensivity. Dordjevic B and Szybalski W; J Exp Med 112; 509-531; 1960
- 30 X-ray sensitiziation by halopyrimidines. Szybalski W; Cancer Chemother. Rep. 58; 539-557; 1974
- 31 *Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response.* Porstmann T, Ternynck T, and Avrameas S; J.Immunol.Methods 82; 169-179; 1985
ORIGINAL ARTICLE

Tumor suppressor TNFAIP3 (A20) is frequently deleted in Sézary syndrome

FCM Braun^{1,4}, P Grabarczyk^{1,4}, M Möbs², FK Braun², J Eberle², M Beyer², W Sterry², F Busse¹, J Schröder¹, M Delin¹, GK Przybylski^{1,3} and CA Schmidt¹

¹Clinic for Internal Medicine C, University Greifswald, Greifswald, Germany; ²Department of Dermatology and Allergy, Skin Cancer Center, Charité—Humboldt University Berlin, Berlin, Germany and ³Department of Molecular Pathology, Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

Despite recent therapeutic improvements, the prognosis for patients suffering from Sézary syndrome (SS), a disseminated form of cutaneous T-cell lymphomas, is still poor. We identified bi- and monoallelic deletions of the tumor necrosis factor- α induced protein 3 gene (*TNFAIP3*; *A20*) in a high proportion of SS patients as well as biallelic A20 deletion in the SS-derived cell line SeAx. Furthermore, we demonstrate that inhibition of A20 activates the NF- κ B pathway thereby increasing the proliferation of normal T lymphocytes. On the other hand, the reconstitution of A20 expression slowed down the cell cycle in SeAx cells. Recently A20 inactivation has been reported in various B-cell lymphomas. In this study, we show that A20 is also a putative tumor suppressor in the T-cell malignancy—SS. *Leukemia* (2011) 25, 1494–1501; doi:10.1038/leu.2011.101;

published online 31 May 2011

Keywords: Sézary syndrome; FT-CGH; TNFAIP3; A20; cell cycle; apoptosis

Introduction

Primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) are characterized by clonally proliferating CD4 positive cells localized in the skin.¹ The Sézary syndrome (SS), an aggressive variant of CTCL, is typically characterized by erythroderma, generalized lymphadenopathy and circulating atypical T-cells with cerebriform nuclei, so-called Sézary cells. Despite recent therapeutic improvements, the prognosis of patients with SS is still poor. To establish more specific and targeted therapies, a better understanding of the underlying molecular mechanisms driving the aberrant proliferation is required. SS is characterized by unique chromosomal abnormalities,² however, which of the genetic alterations correspond to primary changes and contribute to disease initiation and which are secondary events, has not been clarified yet. Recent studies, employing high density comparative genomic hybridization (CGH) supported by array based transcriptional analysis revealed recurrent chromosomal gains and losses potentially relevant for the disease onset.¹ Particularly interesting is the NF-kB signaling pathway, as its constitutive activation has been identified as a key feature in CTCL, including SS.^{1,3}

Recently, one of the negative regulators of this signaling pathway, the tumor necrosis factor- α -induced protein 3 (*TNFAIP3; A20*), attracted particular attention. *A20* has initially

been identified as a TNF-induced gene in human umbilical vein endothelial cells.^{4,5} Its inhibitory effect on NF-κB is based on the co-operative activity of two ubiquitin-editing domains.^{6,7} This function of A20 has been recognized for a number of substrates involved in transmission of signals from cell surface receptors to NF-κB. Well known examples are the receptor-interacting protein 1 (RIP1),^{8–10} the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)^{9,11} and the I-κB kinase (IKK).^{9,12} Moreover, A20 was shown to adjust NF-κB and MAP Kinase signaling pathways as well as TNF-α-induced cell death by cooperation with the E3 ubiquitin ligases Itch and RNF11 and the adaptor proteins TAX1BP1 and ABIN-1.^{5,9,13} As a transcriptional target of NF-κB, A20 is a potent executor of a negative feedback loop mechanism leading to termination of NF-κB signaling.^{14,15}

Knock-out mice deficient for A20 fail to regulate TNF-αinduced NF-κB and cell death responses and die premature because of severe inflammation and cachexia.⁹ Although it was proven that these symptoms do not result from an extensive adaptive immune response,¹⁶ abnormally high numbers of lymphocytes were observed in these animals. This indicates that apart from the control of an innate immune response, A20 is further involved in homeostasis of lymphoid cells. The fact that T lymphocytes represent the only cells in which A20 expression does not require any induction,⁵ further underlines its significant role in T-cell control.

NF-kB has been reported as constitutively activated in CTCL cell lines as well as in peripheral blood lymphocytes of SS patients.³ This prompted us to perform a detailed analysis of the genomic region encoding *A20* in blood samples of SS patients to determine its potential role in the observed permanent NF-κB activity. Using high-resolution comparative genomic array hybridization, we found bi- and monoallelic *A20* deletions in a high proportion of SS samples. In addition, we demonstrated in a SS-derived cell line that restoration of *A20* slows down cell cycle progression, and on the other hand knockdown of *A20* in normal T cells promoted proliferation. The results presented here suggest *A20* as a putative tumor suppressor in this subset of CTCL.

Materials and methods

Clinical samples

Thirteen clinically well-characterized SS blood samples were included in the study. Diagnoses were established according to the WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas.¹⁷ Clinical information of patients and samples are summarized in Table 1 and in Supplementary Table. The amount of tumor cells in each sample was estimated on peripheral blood parameters, atypical lymphocytes and staining with the corresponding V β specific antibody and subsequent flow cytometry when



Correspondence: Professor CA Schmidt, Clinic for Internal Medicine C, Molecular Haematology, University Greifswald, Sauerbruchstr, 17475 Greifswald, Germany.

E-mail: christian.schmidt@uni-greifswald.de

⁴These authors contributed equally to this study.

Received 5 January 2011; revised 3 March 2011; accepted 29 March 2011; published online 31 May 2011

Table 1 Characteristics of the patient samples

Patient ID	Sex	Age	Sample material	WBC count/nl	Amount of tumor cells in sample (%)	A20 locus
245	F	53	Leuka.	15	80	NC
246	М	67	Leuka.	17	30	Del-bi
247	Μ	73	Leuka.	30	50-70	Del-mono
249	F	59	Leuka.	31	50	Del-mono
251	F	90	PBMC	32	40-50	Del-bi
252	Μ	74	Leuka.	13	30	NC
306	F	65	Leuka.	25	57	NC
308	F	72	PBMC	8	57	Del-bi
311	F	77	CD4+	4	>90	NC
312	Μ	59	CD4+	31	95	Del-mono
313	F	64	Leuka.	30	30	NC
314	F	95	PBMC	21	88	NC
315	М	59	PBMC	13	75	—

Abbreviations: CD4+, magnetically sorted CD4 positive cells; F, female; leuka., leukapheresis; M, male; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; WBC, white blood cell.

Status of A20 gene in Sézary syndrome clinical samples are as follows: NC—no change, Del-bi—biallelic deletion, Del-mono—monoallelic deletion. Cases with A20 deletion are marked in bold. Genomic DNA was checked by array-comparative genomic hybridization for genetic aberrations. Analysis of chromosome region 6q23 showed in 6/13 samples a deletion of A20. None of the tested patient samples showed mutations in the A20 coding sequence (exons 2–9) or mutations/methylations in the promotor region of A20.

applicable. The use of human material was approved by the Local Ethics Committee of the Charité (Berlin, Germany), and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

blood mononuclear cells Peripheral blood mononuclear cells were isolated from whole

blood or leukapheresis samples by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque-Plus (GE Healthcare, München, Germany). For enrichment of tumor cells, samples with an amount of greater than 90% of tumor cells within the CD4 positive cells were sorted with anti-CD4 microbeads (Miltenyi) according to the manufacture's recommendations.

Enrichment of primary SS tumor cells from peripheral

Cell lines, cell culture, viral vector production and transfection

The T-cell line Jurkat (acute T-cell leukemia-derived) and three CTCL cell lines HuT-78,¹⁸ MyLa¹⁹ and SeAx²⁰ were cultured in RPMI-1640 growth medium supplemented with 10% fetal calf serum, non-essential amino acids (MEM-NEA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1% sodium pyruvate at 37 °C and 5% CO₂. SeAx cells received in addition 100 U/ml IL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA).

The virus-producing HEK293GP cell line (Clontech, Heidelberg, Germany) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum and non-essential amino acids at 37 °C and 5% CO₂.

For virus production, HEK293GP cells were transfected with pMD2.G and pMIGR-A20, pMIGR (negative control) plasmids by calcium phosphate transfection. Target cells (SeAx) were transduced twice in 12 h intervals using viral supernatant supplemented with 4 µg/ml polybrene. The efficiency (GFP expression) was proven by flow cytometry 48–72 h after the last transduction. For knockdown experiments, 5×10^6 human T cells were washed and resuspended in a total volume of $100 \,\mu$ l V-solution (Lonza, Basel, Switzerland). Cells were electroporated using a nucleofector II electroporation system (Lonza). Transfected cells were transferred to 24-well plates containing 1 ml pre-warmed growth medium.

Activation of human T cells

Human peripheral blood T cells were isolated from healthy donors by magnetic beads depleting CD3-negative cells and activated using a human T-cell activation/expansion kit (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). T cells were expanded in RPMI-1640 at a concentration of 5×10^6 per ml, and after 3 days IL-2 was added (0.2 µg/ml) (PeproTech).

Fine tiling CGH

A custom designed high-density fine-tiling array of 385 000 oligonucleotides, 40–60 bp in length, was prepared using the Maskless Array Synthesizer (MAS) technology (NimbleGen Systems; Reykjavik, Iceland). This array covering 24 Mb of genomic regions was selected using the Human Genome Browser hg18 assembly (University of California, Santa Cruz, CA, USA). Among others, the array included the *A20* locus located on chromosome 6. After normalization with the reference DNA (healthy donor DNA from blood, Promega, Madison, USA) the mean fluorescence was analyzed using the SignalMap software (NimbleGen).

Sequence analysis of A20

Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells using Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All nine exons were amplified using Advantage GC Genomic LA Polymerase (Clontech) and sequenced by 3730XL/ 3130XL Genetic Analyzer (LGC Genomics, Berlin, Germany). Primer sequences used for amplification and sequencing are provided in Supplementary Materials and Methods.

Analysis of DNA methylation

Primer pairs surrounding CpG islands within the A20 promoter were designed using Primer3 online tool (Steve Rozen, Helen J Skaletsky (1998) Primer3). Genomic DNA was subjected to a bisulfate treatment using the CpGenome DNA Modification Kit (Chemicon International, Billerica. MA, USA) followed by PCR TNFAIP3 is frequently deleted in Sézary syndrome FCM Braun et al

amplification and sequencing (LGC Genomics). Genomic DNA from cells expressing *A20* was used as a non-methylated control. Methylated DNA from Jurkat cells served as a positive control. Sequencing results were checked for the presence of cytosine or thymidine peaks within the *A20*-preceding CpGs.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

TRIzol Reagent (Invitrogen) was used for total RNA extraction. Complementary DNA synthesis was performed using Super-Script II RT (Invitrogen). The mRNA expression of *A20* was analyzed by real-time quantitative PCR with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen) using 7500 Realtime PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The obtained data were calculated by $\Delta\Delta C_{\rm T}$ method. The $\beta 2MG$ was used as a reference gene for normalization. Primer sequences are provided in the Supplementary Materials and Methods.

Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA lysis buffer (Santa Cruz, Heidelberg, Germany). Equal protein amounts (25 µg per lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and equal protein transfer was proven by Ponceau staining (not shown). A20 protein levels were determined using mouse monoclonal antibody (ab13597, Abcam, Cambridge, UK) followed by goat anti-mouse-AP secondary antibody. The detection was performed with the Western-SuperStar Immunodetection System (Applied Biosystems). In case of lymphoma cell lines, exponentially growing CTCL cells were used for preparation of cell lysates. Enriched tumor T cells from patients were incubated in medium for 2 h or stimulated with PMA (50 ng/ml) and Ionomycin (250 ng/ml) for 2 h before protein extraction. Equal protein amounts (50 µg per lane) were separated by SDSpolyacrylamide gel electrophoresis and equal protein transfer was proven by Ponceau staining (not shown).

Vectors and siRNAs

A20 was amplified from pCR-TOPO-Blunt II-TOPO A20 (OriGene, Rockville, MD) using the primers TNFAIP3-fo (5'-CT GGGACCATGGCACAACTC-3'), TNFAIP3-re (5'-CGGAAGGTT CCATGGGATTC-3') and cloned into the retroviral vector pMIGR. The siRNA oligonucleotides for knockdown of A20 were provided by Ambion (Ambion, Applied Biosystems, Austin, TX, USA): s14259 (sense: 5'-CAAAGUUGGAUGAAGCUAATT-3', antisense: 5'-UUAGCUUCAUCCAACUUUGCG-3'), s14260 (sense: 5'-GGAUGUUACCAGGACAUUUTT-3', antisense: 5'-A AAUGUCCUGGUAACAUCCTG-3'). The siRNA with no specificity for any human gene with corresponding GC content was used as a negative control.

Viability and proliferation assays

Cell vitality was evaluated using Annexin-V-APC/-AAD staining kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA) followed by FACS analysis. Cell cycle status was measured by propidium iodide/ RNase staining. To assess the fraction of cells undergoing DNA replication, the BrdU incorporation assay was applied (Pharmingen). The results of all measurements were obtained by FACS analysis and calculated using WinMDI 2.9 software (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

Results and discussion

Frequent deletion of A20 in SS

The recurrent deregulation of the NF- κ B pathway accompanied by high frequency of 6q23 deletions reported in a number of lymphoid malignancies provoked us to analyze this chromosomal region in SS. We performed fine tiling CGH analysis using genomic DNA isolated from blood samples of 13 SS patients with high tumor cell content and two SS-derived cell lines: SeAx



Figure 1 Fine tiling comparative genomic hybridization (FT-CGH) of chromosome 6q23-27. (**a**) FT-CGH results in six Sézary syndrome patients and in the Sézary syndrome-derived cell line SeAx showing *TNFAIP3* (*A20*) deletions. The cutaneous T-cell lymphoma-derived cell line HuT-78 represents a non-deleted control. Three patients and the SeAx cell line showed bi-allelic deletions with the indicated minimal overlapping region of 90 kb. (**b**) Genome map (MapViewer; NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/) of the minimal common region of biallelic deletions including a single gene: *TNFAIP3* (13 818 8581–138 204 449 bp).

1496





(+/+) no change, (+/-) monoallelic deletion, (-/-) biallelic deletion

C A20 protein expression in sorted SS samples +/- induction



Figure 2 *A20* mRNA and protein expression in T-cell lines and Sézary samples. (**a**) *A20* mRNA and protein levels in T-cell leukemia cell line Jurkat and cutaneous T-cell lymphoma-derived cell lines HuT-78, MyLa and SeAx. The mRNA expression represents mean values (\pm s.d.) measured in four independent experiments. In western blot, Actin showed as a loading control. (**b**) *A20* mRNA expression in sorted SS samples (mean of four technical replicates). Clinical samples: 245, 252, 313, 314 (+/+; no deletion), 247, 312 (+/-; mono-allelic deletion), 308 (–/-; bi-allelic deletion). (**c**) A20 protein expression in sorted SS samples. Clinical samples: 313 (no deletion), 247, 312 (mono-allelic deletion), 308 (bi-allelic deletion); –/+ stimulation mimicking T-cell receptor engagement (PMA, Ionomycin). GAPDH showed as a loading control.

and HuT-78. Biallelic deletions of the A20-encoding regions on chromosome 6 were detected in three and monoallelic deletions in three other patient samples (Figure 1a). The *A20* status of the clinical samples is summarized in Table 1. CGH analysis of two

SS-derived cell lines revealed no alterations in the cell line HuT-78, whereas the cell line SeAx showed a biallelic *A20* deletion (Figure 1a), accompanied by lack of mRNA and protein expression (Figure 2a). No changes in copy number, methylation status or mutations were seen in HuT-78 or in two other T-cell lines Jurkat and MyLa, used as reference (not shown). Unlike A20-depleted SeAx, these three T-cell lines expressed A20 (Figure 2a).

The high frequency of genetic losses (6/13) indicated that depletion or inactivation of the *A20* gene could represent a relevant step in SS development. A20 inactivation has been recently reported in B-cell lymphomas, thus suggesting A20 as a crucial tumor suppressor in these diseases. Frequent deletions were described in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, primary mediastinal B-cell lymphoma. So far, *A20* deletions have been described only as rare events in T-cell neoplasms, and were reported in 14% of the chronic form of adult T-cell leukemia/lymphoma upon cytogenetic analysis.²² Here, for the first time we report A20 deletions in a high percentage of cases in a T-cell-derived disease.

To verify whether the genomic loss of A20 was also reflected by loss of A20 expression, we analyzed mRNA expression in enriched tumor cells (>90% purity) from one SS patient with biallelic deletions, two with monoallelic deletions and four without A20 deletion (Figure 2b). In the biallelic deleted sample (308) no A20 expression was detected whereas in samples with monoallelic deletion and without deletion the expression varied markedly. For selected samples we also analyzed A20 expression on the protein level and as A20 is an inducible gene, we analyzed non-stimulated and PMA/Ionomycin stimulated cells. The treatment resulted in strong induction of A20 protein in healthy control samples (Figure 2c). Interestingly, the patient sample carrying both alleles (313) showed strong A20 expression already under non-stimulating conditions. This result might be due to the positive selection of tumor samples, which may lead to A20 induction. In contrast, A20 protein expression in patient samples with monoallelic A20 deletion was weak (247) or, despite high mRNA level, even under stimulating conditions undetectable c(312), indicating further mechanisms for A20 inactivation beyond its genetic loss and transcriptional control. Apart from inefficient translation, reduced stability could explain the observed low A20 protein. As shown recently T-cell receptor stimulation causes rapid A20 cleavage initiated by the paracaspase activity of MALT1 protein followed by the proteasomal degradation.²³ As expected, no A20 signal was detected in the sample with biallelic A20 loss (308).

In B-cell lymphomas without A20 deletion inactivating mutations and promoter methylations were found.^{5,22,24} Genome-wide analysis of genetic lesions in 238 cases confirmed the high prevalence of A20 inactivation.²⁴ This prompted us to sequence the exons and exon-intron borders of the non-deleted alleles. In contrast to other A20-deficient malignancies, in which mutations are the most frequent mechanism of A20 inactivation, no such alterations were detected in our collection of SS samples. Moreover, neither mutations in the promoter nor changes in its methylation pattern were found.

A20 reconstitution slows down cell cycle progression in the A20-negative cell line SeAx

To verify the possible tumor suppressive properties of A20 in SS, we re-expressed the gene in the SS cell line SeAx with a biallelic A20 deletion (Figure 1a). Using a retroviral vector system, A20 was re-expressed in \sim 70% of cells (Figure 3a) resulting in high



Figure 3 A20 reconstitution in SeAx. The Sézary cell line SeAx was transduced with a retroviral vector encoding A20 (MIGR-A20) or the empty vector MIGR as a negative control. (a) Transduction efficiency of mock-transduced SeAx (MIGR) and SeAx re-constituted for A20 were determined with EGFP measurement. (b) A20 protein expression in non-transduced SeAx (nt) and SeAx at 85 h and at 110 h after transduction. Actin represents a loading control. (c) Cell vitality of mock-transduced SeAx (MIGR) and SeAx re-constituted for A20 were determined using Annexin-V-APC/-AAD (mean from five independent experiments). (d) Proliferation activity of mock-transduced SeAx (MIGR) and SeAx re-constituted for A20 were determined with the BrdU incorporation assay. Mean percentage (\pm s.d.) of BrdU-positive cells was calculated from results obtained in five independent experiments.

protein levels (Figure 3b). Unlike other A20-mutated or deficient lymphomas, no signs of cellular toxicity were detected in SeAx cells after A20 reconstitution, as determined by Annexin V/ 7-AAD staining and flow cytometry (Figure 3c). Similarly, no enhanced apoptotic rates were seen as determined by quantification of sub-G1 cell populations (data not shown). However, as compared with mock-transduced cells, the growth of A20-transduced cells was significantly reduced. Thus, cell cycle profiling revealed a higher percentage of A20-transduced cells at G0/G1 phase (Table 2), and in a BrdU-incorporation assays, A20-reconstituted SeAx cells showed a markedly lower BrdU content in genomic DNA than control cells (Figure 3d). These data confirmed a reduced proliferative capacity and are in line with the tumor-suppressive potential of A20. Reconstitution of A20 in the A20-negative SS cell line SeAx resulted in markedly delayed cell cycle entry and progression, which further supported the contribution of A20 loss to cell growth in SS. Interestingly, unlike in B-cell-derived A20-negative cell lines, no influence on cellular survival was observed upon A20 reconstitution in SeAx. This, however, may reflect the apoptosis resistance resulting from acquired secondary genetic

Table 2 Cell cycle of SeAx cells upon A20 re-expression

Cell cycle phase	G1/G0	S	G2/M
SeAx MOCK	49.8±2.3	33.6±1.5	16.6±0.9
SeAx A20	56.8±0.8	28.8±1.3	14.4±0.9
P	0.006	0.01	0.004

The Sézary cell line SeAx was transduced with a retroviral vector encoding A20 (MIGR-A20) or the empty vector MIGR as a negative control. The mean percentage of cells at G0/G1, S and G2/M (\pm s.d.) were calculated from five independent experiments.

aberrations, which is a common phenomenon observed in cell lines derived from different tumors.

A20 knockdown in normal T cells enhances activation-induced proliferation

To further prove a tumor-suppressive activity of A20, we analyzed the effects of A20 depletion in purified normal T cells



Figure 4 A20 knockdown in CD3 + T cells. Human CD3 + T cells isolated from healthy donors by negative selection with magnetic beads and stimulated using T-cell activation/expansion protocol. At 24 h later, cells were used for A20 knockdown. Mock and negative control siRNA-treated cells are shown as controls. (a) Knockdown efficiency was verified at the mRNA level at 24 h after siRNA transfection. Mean values (± s.d.'s) from four different T-cell donors are shown. (b) A20 protein expression of CD3 + T cells at 48 and 72 h after knockdown (actin as a loading control). (c) Proliferation of T cells isolated from four healthy volunteers treated with control siRNA (negative control) and A20-specific siRNAs was determined by the BrdU assay. (d) Mean (± s.d.) fold upregulation of the NF-κB target genes NFκB2, IL-6, IL-9, IL-13, LTA, IFNγ and TNFα mRNA measured five times in normal T cells after A20 knockdown, compared with scrambled-control treated cells.

from healthy donors. These cells showed constitutive A20 mRNA expression. A pool of two different siRNAs targeting A20 (s14259, s14260) was proven effective in depleting A20 mRNA in resting T cells (Figure 4a). However, there were no measurable biological consequences of A20 knockdown in normal T cells regarding cell vitality, cell number and cell cycle status (not shown). T cells, stimulated by a treatment mimicking TCR activation, showed meaningful decrease of A20 mRNA and protein upon siRNA treatment (Figure 4b). Contrary to resting cells, activated T cells showed a significant increase in their

а

replication activity in response to A20 depletion. This was manifested by reduced G0/G1 and increased S phase fractions as measured by DNA staining (Table 3). Furthermore, despite relatively high differences between the donors, the BrdU incorporation assay showed evidently more BrdU-labeled cells after A20 knockdown (Figure 4c). A clear transcriptional induction of various NF-κB target genes in A20 knockdowned T cells confirmed the role of A20 in regulating TCR-triggered NF-KB activation (Figure 4d). Taken together, we observed significantly accelerated proliferation following CD3/CD28

Leukemia

1499

1	Б	n	(
- 1	1		1

	G0/G1*	S*	G2/M
72 h			
Control siRNA	70.5 ± 4.7 62.0 ± 4.7 P = 0.03	22.0 ± 4.2 29.5 ± 4.7 P = 0.017	7.5±2.4 8.5±1.3 P=0.31
96 h			
Control siRNA A20 siRNA	80.0±5.9 68.8±5.3 P = 0.005	15.5 ± 4.2 25.3 ± 3.7 P = 0.003	4.0 ± 2.8 6.0 ± 2.9 P = 0.07

Human CD3+ T cells were isolated from healthy donors by negative selection with magnetic beads. The cells were activated and used for A20 knockdown by siRNAs (s14259, s14260) and negative control siRNA (not binding to any human RNA). Shown are the mean percentages (\pm s.d.) of results obtained from four different healthy donors. **P*<0.05. Statistically significant results are marked in bold.

stimulation. This suggests that even haplo-insufficiency of A20 may increase the proliferative potential of activated T cells and contribute to uncontrolled cell growth. Our data suggest that loss of A20 expression in T cells may lead to enhanced NF- κ B activity, increased proliferation and as a consequence may contribute to malignant transformation.

As shown in a knockout mouse model, loss of A20 results in a constitutively active IKK complex and as a consequence constitutive NF- κB activation. 25 More recently, studies performed in lymphoid cells revealed the vital role of A20 in signal transduction from B- and T-cell receptors to NF-kB. In this cellular context, A20 was identified as a negative regulator of the NF-kB pathway perturbing the association of CARMA1/ BCL10/MALT1 complex with the IKK regulatory subunit IKKy/ NEMO, which represents the crucial linkage between B- and T-cell receptors and NF- κ B. When overexpressed in a T cell line, A20 inhibited the PKC-driven NF-κB activation.²⁶ Its depletion in contrast enhanced the inducible production of IL-2 upon TCR-activation mimicking treatment.²⁷ Further, the deubiquitination activity of A20 was shown to be required for postinductive termination of IKK activity, regulation of the strength and duration of the IKK/NF-kB response triggered by TCR signaling. Moreover, removal of A20 abolished the need of CD28 costimulation to obtain a strong NF-KB activation.²³ All these findings strongly indicate the oncogenic properties of A20 loss, which leads to inappropriate or excessive NF-kB signaling and as a consequence might contribute to T-cell transformation.

We here show for the first time frequent deletion of A20 in SS samples. This finding is very well in line with the known constitutive NF- κ B activation in SS. We further show, that A20 expression is altered in SS samples without A20 deletion, indicative for other mechanisms leading to deregulation. The pathways involved and molecules affected remain to be determined.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the German José Carreras Leukemia Foundation (C.A.S.), Ministry of Science and Higher Education, Poland (GKP). Funding was provided in part by Framework VII EU (European Union/BMBF-0315207A) grant. The excellent technical assistance of Kathrin Assmus (Klinik für Innere Medizin C, Universität Greifswald) is gratefully acknowledged.

- 1 Caprini E, Cristofoletti C, Arcelli D, Fadda P, Citterich MH, Sampogna F *et al.* Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of sezary syndrome by combining genomic and expression microarrays. *Cancer Res* 2009; **69**: 8438–8446.
- 2 Van Doorn R, Van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K *et al.* Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood* 2009; **113**: 127–136.
- 3 Sors A, Jean-Louis F, Pellet C, Laroche L, Dubertret L, Courtois G *et al.* Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood* 2006; **107**: 2354–2363.
- 4 Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 2973–2978.
- 5 Malynn BA, Ma A. A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme. J Exp Med 2009; **206**: 977–980.
- 6 Heyninck K, Denecker G, De Valck D, Fiers W, Beyaert R. Inhibition of tumor necrosis factor-induced necrotic cell death by the zinc finger protein A20. Anticancer Res 1999; 19: 2863–2868.
- 7 Lin SC, Chung JY, Lamothe B, Rajashankar K, Lu M, Lo YC *et al.* Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. *J Mol Biol* 2008; **376**: 526–540.
- 8 Schmitz R, Hansmann M-L, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechtersheimer G *et al.* TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 2009; **206**: 981–989.
- 9 Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Ann Rev Biochem* 2009; **78**: 769–796.
- 10 Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. Nature 2004; 430: 694–699.
- 11 Chanudet E, Ye H, Ferry J, Bacon CM, Adam P, Müller-Hermelink HK *et al.* A20 deletion is associated with copy number gain at the TNFA/B/C locus and occurs preferentially in translocation-negative MALT lymphoma of the ocular adnexa and salivary glands. *J Pathol* 2009; **217**: 420–430.
- 12 Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 2000; 12: 301–311.
- 13 De Valck D, Jin DY, Heyninck K, Van de Craen M, Contreras R, Fiers W *et al.* The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases. *Oncogene* 1999; **18**: 4182–4190.
- 14 Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17971–17976.
- 15 Heyninck K, Beyaert R. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* 2005; **30**: 1–4.
- 16 Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. J Exp Med 2008; 205: 451–464.
- 17 Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. Blood 2005; **105**: 3768–3785.
- 18 Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC. Human cutaneous T-cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T-cell growth factor. *J Exp Med* 1981; 154: 1403–1418.
- 19 Kaltoft K, Bisballe S, Dyrberg T, Boel E, Rasmussen PB, Thestrup-Pedersen K. Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; **28A**: 161–167.
- 20 Kaltoft K, Bisballe S, Rasmussen HF, Thestrup-Pedersen K, Thomsen K, Sterry W. A continuous T-cell line from a patient with Sezary syndrome. Arch Dermatol Res 1987; 279: 293–298.
- 21 Novak U, Rinaldi A, Kwee I, Nandula SV, Rancoita PM, Compagno M et al. The NF-{kappa}B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* 2009; **113**: 4918–4921.

- 22 Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Tagawa H, Nakamura S, Morishima Y *et al.* TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2009; **114**: 2467–2475.
- 23 Duwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, Baens M, Kloo B, Ferch U et al. A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. J Immunol 2009; 182: 7718–7728.
- 24 Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. Nature 2009; 459: 712–716.
- 25 Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000; 289: 2350–2354.
- responses in A20-deficient mice. *Science* 2000; 289: 2350–2354.
 26 Stilo R, Varricchio E, Liguoro D, Leonardi A, Vito P. A20 is a negative regulator of BCL10- and CARMA3-mediated activation of NF-kappaB. *J Cell Sci* 2008; 121: 1165–1171.
- 27 Coonaert B, Baens M, Heyninck K, Bekaert T, Haegman M, Staal J et al. T-cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. Nat Immunol 2008; **9**: 263–271.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (http://www.nature.com/leu)