

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

Die Rolle individueller NFAT-Faktoren in Lymphozyten und Keratinozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Paloma Lauber
aus München
Würzburg, 2. Überarbeitung März 2021

Referent: Univ.-Prof. i.R. Dr. rer. nat. Dr. sc. nat. Edgar Serfling

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und Funktion der Haut	1
1.2	Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten in der Epidermis.....	1
1.3	Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren	3
1.3.1	Isoformen von NFATc1	5
1.3.2	Signalwege zur Regulation der Transkriptionsfaktoren NFATc1-c4.....	6
1.3.3	Der Transkriptionsfaktor NFAT5.....	7
1.4	Entzündungen und Erkrankungen der Haut	8
1.5	Aufgabenstellung: Die Rolle individueller NFAT-Faktoren in Lymphozyten und Keratinozyten.....	9
2	Material.....	11
2.1	Geräte	11
2.2	Chemikalien	11
2.3	Puffer	12
2.4	Kits.....	13
2.5	Antikörper	13
2.6	Zellen und Zelllinien	13
2.7	Zellkultur	14
2.8	Primer.....	14
3	Methoden.....	16
3.1	Zellbiologische Methoden	16
3.1.1	Kultivierung von Zellen	16
3.1.2	Coating von Zellkulturplatten	16
3.1.3	Stimulation von KT12 NK-Zellen	16

3.1.4	Stimulation mit TPA/Ionomycin	16
3.1.5	Kultur und Stimulation von Keratinozyten	17
3.1.6	UV-Bestrahlung von Keratinozyten	17
3.2	Proteinbiochemische Methoden	18
3.2.1	Herstellung von Proteinextrakten	18
3.2.2	Herstellung von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten	18
3.2.3	SDS-PAGE	18
3.2.4	Western Blot.....	19
3.3	„Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS).....	20
3.4	Messung der Zytokinproduktion in Kulturüberständen	20
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	20
3.5.1	RNA-Extraktion	20
3.5.2	Messung von RNA- und Proteinkonzentrationen	21
3.5.3	Synthese von cDNA.....	21
3.5.4	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	22
3.6	Statistische Analyse der qRT-PCR-Daten	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Expression individueller NFAT-Proteine in KT12-Zellen	24
4.1.1	Analyse der Proteinsynthese von NFATc1/ α A, NFATc1/ β C und NFATc2.....	24
4.1.2	Untersuchung der Apoptoserate transfizierter KT12-Zell-Klone	25
4.1.3	Zytokin-Sekretion und -Expression von KT12 NK-Zellen mit NFATc1/ α A-, NFATc1/ β C- bzw. NFATc2-Überexpression.....	27
4.2	Expression individueller NFAT-Proteine in Keratinozyten.....	30
4.2.1	Analyse des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten	30

4.2.1.1	Untersuchung der Expression individueller NFAT-Faktoren im Zuge der Keratinozytendifferenzierung	30
4.2.1.2	Änderung der Expression Keratinozyten-spezifischer Proteine	34
4.2.1.3	Änderung des Expressionsmusters von Chemokinen	36
4.2.2	Analyse der Wirkung von UVB-Licht auf Keratinozyten	38
4.2.2.1	Änderung der Expression von NFAT-Faktoren nach UV-Bestrahlung	38
4.2.2.2	Einfluss von UVB-Licht auf Keratinozyten-spezifische Differenzierungsmarker	40
4.2.2.3	Änderung der Chemokinexpression durch UVB-Licht.....	42
5	Diskussion.....	45
5.1	NFAT-Expression in Lymphozyten: KT12-Zellen als Testzellen für NK-Zellen.....	45
5.2	NFAT-Expression in Keratinozyten.....	46
5.2.1	Die Rolle individueller NFAT-Faktoren bei der Keratinozytendifferenzierung.....	46
5.2.2	Einfluss von UVB-Licht auf die NFAT-Expression in Keratinozyten	48
5.2.3	Expression Keratinozyten-spezifischer Proteine	50
5.2.4	Chemokinexpression	52
6	Zusammenfassung.....	55
7	Literaturverzeichnis.....	57
I	Abkürzungsverzeichnis.....	
II	Abbildungsverzeichnis.....	
III	Tabellenverzeichnis.....	
IV	Danksagung.....	
V	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut als größtes Organ des menschlichen Organismus erfüllt als mechanische und physikalische Barriere wichtige Aufgaben. Neben einer Sinnes- und Kontaktfunktion und der Regulation des Wasserhaushaltes des Körpers kommt ihr vor allem eine Schutzfunktion zu. Die Haut bewahrt den Menschen vor toxischen und infektiösen Faktoren und schützt vor Umwelttoxinen, wie beispielsweise Chemikalien und ultravioletter Strahlung. Die Cutis besteht aus der zellreichen Epidermis und der ihr untergelagerten „bindegewebigen“ Dermis [1, 2]. Die Epidermis, die zu 95% Keratinozyten enthält, besteht aus mehreren Zellschichten, die von innen nach außen einen wachsenden Grad an Differenzierung aufweisen [3]. Die innerste Keratinozytenschicht, das Stratum basale, enthält als einzige Schicht mitotisch aktive Zellen, die auf epidermale Stammzellen zurückgehen. Diese können lebenslang abgestoßene Zellen der Zelloberfläche ersetzen und verletztes Epithel regenerieren. Suprabasale Zellschichten, wie das Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum, bestehen ausschließlich aus postmitotischen, sich differenzierenden und nicht mehr proliferierenden Zellen [4].

1.2 Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten in der Epidermis

Proliferation und terminale Differenzierung von Keratinozyten sind eng miteinander verbundene Prozesse, die in der Epidermis genau ausbalanciert sind und vom Zusammenspiel der einzelnen Schichten abhängen. Sobald sich eine Zelle von der untersten Schicht, vom Stratum basale, löst, wird die Zellteilung gestoppt und ein in seiner Abfolge genau abgestimmtes Differenzierungsprogramm beginnt. Die Keratinozyten migrieren dabei in Richtung Oberfläche und durchlaufen in den suprabasalen Zellschichten morphologische und biochemische Veränderungen, bis sie als terminal differenzierte Corneozyten in der obersten Zellschicht des Stratum corneum erscheinen und schließlich „abgeschliffen“ werden [2, 5]. Dieser kontinuierliche Prozess der Zellerneuerung der Epidermis des Menschen beansprucht ungefähr einen Monat. Wie diese Mechanismen im Detail reguliert und auf Transkriptionsebene gesteuert

werden ist Gegenstand intensiver Forschungen [2]. Die einzelnen Schritte des Verhornungsprozesses sind durch die Synthese spezifischer Strukturproteine und Enzyme charakterisiert, die sich je nach Stratum unterscheiden [6]. Neben Laminen und Integrinen sind – wie bereits der Name sagt – Keratine wichtiger Bestandteil der Keratinozyten. Diese sind essenziell für die Bildung des Zytoskeletts, das der Zelle mechanische Stabilität und Struktur verleiht [7]. Im Stratum spinosum kommt es zu einer Umstellung der Keratinsynthese. In den proliferierenden Basalkeratinozyten spielen zunächst die Keratine 5 (K5) und 14 (K14) die Hauptrolle [8], bis sie im Stratum spinosum von den differenzierungsspezifischen Keratinen 1 (K1) und 10 (K10) abgelöst werden, die sich zunächst zu dicken tonofibrillären Bündeln zusammenlagern. Im Stratum granulosum erfolgt die Bündelung dieser Tonofibrillen zu makrofibrillären Kabeln, die zur Ausbildung terminaler Keratinozytenstrukturen im Stratum corneum benötigt werden. Gleichzeitig werden auch andere Strukturproteine, wie beispielsweise Involucrin (Inv), Loricrin (Lor) und Trichohyalin, synthetisiert und vernetzt, um die Hornhülle der Zelle weiter zu verstärken (siehe Abb.1.1) [6, 9, 10]. Die Plasmamembran der Zellen wird im Zuge des Differenzierungsprozesses durch die sog. verhornte Hülle (cornified envelope) ersetzt, wobei das Strukturprotein Involucrin ein Gerüst bereitstellt, an welches anschließend andere Proteine vernetzt werden können [6]. Den Hauptbestandteil der verhornten Hülle bildet das Strukturprotein Loricrin, welches 70-85% der gesamten Proteinmasse ausmacht und im Stratum granulosum exprimiert wird [6, 9, 10]. Als Resultat des etwa 30-tägigen terminalen Differenzierungsprozesses entstehen im Stratum corneum differenzierte, kernlose, abgeflachte und vor allem aus Keratin bestehende Corneozyten, welche die Haut nach außen versiegeln und für ihre Widerstandsfähigkeit unerlässlich sind. Die Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten werden durch extrazelluläre Calciumkonzentrationen wesentlich beeinflusst, wie bereits Hennings et al. 1980 zeigten. Keratinozyten, die in einem Nährmedium mit einer Calciumkonzentration unter 0,05 mM kultiviert werden, proliferieren, differenzieren aber nicht zu mehreren Schichten. Wird die extrazelluläre Calciumkonzentration auf über 0,1 mM gesteigert, kommt es schnell zur Expression differenzierungsassoziierter Proteine mit Veränderungen der Zellmorphologie und der

Entwicklung von Zell-Zell-Kontakten [11]. In der Epidermis bildet extrazelluläres Calcium einen Gradienten mit höchsten Calciumkonzentrationen im Stratum granulosum und einen starken Abfall der Werte im Bereich des Stratum corneum (Abb. 1.1). Im Stratum basale herrschen sehr niedrige extrazelluläre Calciumkonzentrationen, so dass die Keratinozyten hier nur proliferieren [12, 13]. Die Mechanismen, die für die Bildung und Aufrechterhaltung dieses Calciumgradienten verantwortlich sind, sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung [14].

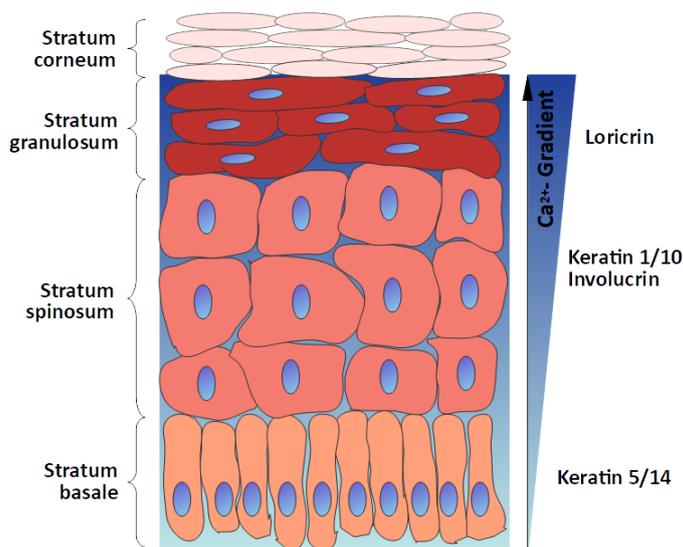


Abbildung 1.1: Der Calciumgradient entlang der Schichten der Epidermis. Das Bild veranschaulicht den steigenden Calciumgradienten entlang der Schichten der Epidermis (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum) und zeigt das Auftreten entsprechender Differenzierungsmarker (Keratin 5, 14, 1 und 10, Involucrin, Loricrin).

1.3 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der *Nuclear Factor of Activated T-cell* (NFAT) Transkriptionsfaktoren besteht aus den fünf Mitgliedern NFATc1 (NFATc, NFAT2), NFATc2 (NFATp, NFAT1), NFATc3 (NFATx, NFAT4), NFATc4 (NFAT3) und NFAT5 (TonEBP) (Abb. 1.2). Diese sind durch Homologien funktionell relevanter Domänen gekennzeichnet [15]. Dabei stimmt die DNA-bindende Domäne (RSD) zwischen NFATc1 und NFATc2 zu 73% Prozent überein, während zwischen NFATc1 und NFAT5 (TonEBP) nur 41-45% an vergleichbaren Sequenzhomologien vorliegen [16]. Dies lässt auf eine besondere Funktion von NFAT5 schließen [17].

NFAT-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems und der adaptiven Immunantwort [18]. Sie sind neben der Aktivierung und Proliferation von T- und B-Zellen auch für deren Differenzierung und den programmierten Zelltod verantwortlich [19–21]. Neben Immunzellen, wie T- und B-

Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen, und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spielt NFAT auch in nicht-immunologischen Zellen eine bedeutende Rolle [22]. Über Änderungen der Genexpression von NFAT wird vor allem – wenngleich nicht nur – das Immunsystem, sondern auch die Physiologie anderer Organsysteme reguliert, denn NFAT wird ubiquitär in vielen, wenn nicht allen Geweben von Säugetieren exprimiert [23]. NFATc1 beispielsweise kontrolliert Gene, die bei der Embryogenese für die Ausbildung der Herzscheidewand und -klappen notwendig sind [24]. Auch bei der Genese von Blutgefäßen, neuronaler Axone und der Differenzierung von Osteoklasten während der Knochenbildung kommt NFATc1 eine entscheidende Rolle zu [25]. Sogar in Haarfollikeln der Haut sorgt NFATc1 für eine Balance zwischen dem Ruhezustand und der Proliferation epidermaler Stammzellen [26]. Auch die Krebsentstehung bzw. Metastasierung wird mit dysregulierten NFAT- Signalwegen in Verbindung gebracht [23].

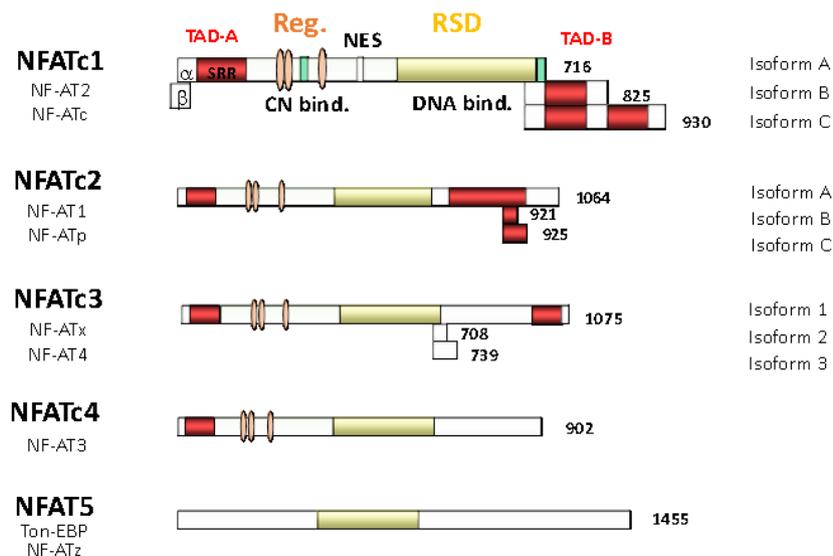


Abbildung 1.2: Darstellung der Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (mod. nach [21]).

Schematische Darstellung funktionell relevanter Bereiche der fünf NFAT-Faktoren anhand von NFATc1. Die N-terminalen Region beherbergt die regulatorische Domäne (Reg.), welche u.a. die Dephosphorylierungsstellen für Calcineurin (CN bind.) beinhaltet. An der zentralen Rel Similarity Domain (RSD) bzw. DNA-Bindedomäne (DNA bind.) erfolgt die Interaktion mit Fos/Jun (AP-1) und die Bindung an die DNA. Die Aktivierung der Transkription erfolgt mit Hilfe der Transaktivierungsdomäne (TAD-A) des N-Terminus bzw. über eine zusätzliche C-terminale TAD (TAD-B) bei längeren Isoformen. In der C-terminalen Region zeigen sich unterschiedliche Splice-Varianten in Abhängigkeit der Isoformen NFATc1/A/B/C.

1.3.1 Isoformen von NFATc1

Der NFATc1-Genlocus umfasst bei einer Gesamtlänge von ca. 150 kb DNA 11 Exone, zwei Promotoren P1 und P2 sowie zwei Polyadenylierungssignale pA1 und pA2 (Abb. 1.3) [27, 28]. Der induzierbare Promotor P1 befindet sich im 5'-Bereich von Exon 1, während sich der konstitutive Promotor P2 im 5'-Bereich zu Exon 2 befindet. Durch die Aktivität des Promotors P2 und die distale pA2-Stelle werden in ruhenden oder naiven Effektor-T-Zellen konstitutiv drei NFATc1/ β Isoformen, insbesondere die langen Isoformen β B und β C synthetisiert. In aktivierten Zellen wird der Promotor P1 induziert und führt zusammen mit der pA1-Stelle zur starken Synthese von NFATc1/ α A und zur Synthese von NFATc1/ α B bzw. NFATc1/ α C. Das kurze NFATc1-Protein NFATc1/ α A unterscheidet sich in seiner Struktur durch das Fehlen eines langen C-terminalen Peptids (250 AS) von den langen, wenn nicht allen anderen NFAT-Proteinen [28]. In aktivierten Zellen wird durch autoreaktive Rückkopplung die Aktivität des Promotors P1 verstärkt, wodurch es zu einem konstant erhöhten Niveau von NFATc1/ α A über einen längeren Zeitraum kommt [19, 27].

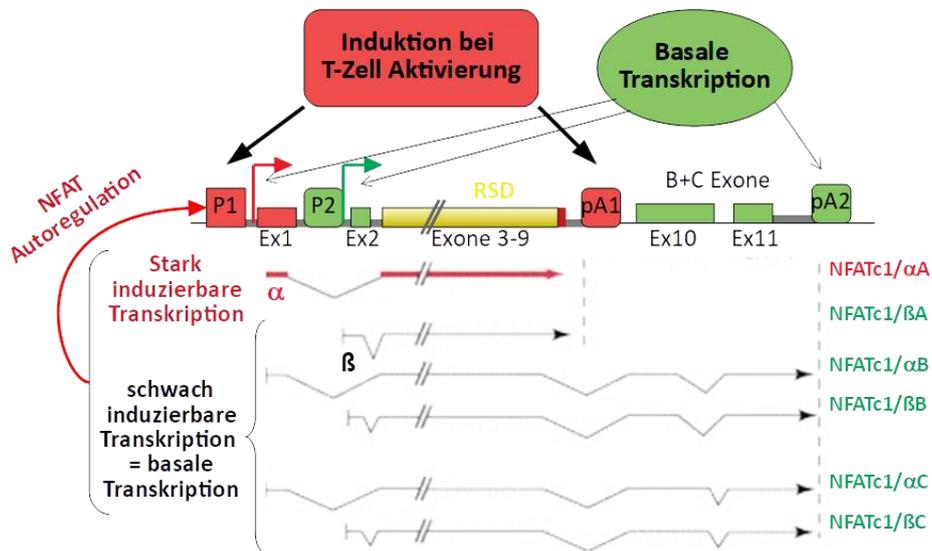


Abbildung 1.3: Der NFATc1-Genlocus (mod. nach [19]). Die beiden Promotoren P1 und P2, sowie die Polyadenylierungsstellen pA1 und pA2 kontrollieren die Transkription von NFATc1. Bei Aktivierung von T-Zellen und durch autoregulatorische Rückkopplung wird über den induzierbaren Promotor P1 verstärkt NFATc1/ α A exprimiert. Die übrigen Isoformen bzw. NFATc1/ β -Varianten entstehen vor allem bei basaler Transkription.

1.3.2 Signalwege zur Regulation der Transkriptionsfaktoren NFATc1-c4

Die Transkriptionsfaktoren NFATc1-c4 werden im Gegensatz zu NFAT5 durch den Ca^{2+} -Calcineurin-Signalweg aktiviert und reguliert. Durch die Interaktion eines präsentierten Antigens an den T-Zellrezeptor (TCR) an der Plasmamembran von T-Zellen wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt (Abb. 1.4). Die Phospholipase C- γ (PLC γ) wird dabei durch Antigenkontakt aktiviert und katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Letzteres bindet an IP₃-Rezeptoren an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und führt zur Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol. Dieser kurzzeitige Anstieg der Ca-Konzentration ist in Lymphozyten noch kein ausreichender Stimulus für die Translokation von NFAT in den Nukleus. Hierfür ist eine persistierende hohe Ca^{2+} -Konzentration erforderlich, die durch zusätzlichen Einstrom extrazellulären Calciums über CRAC-Kanäle (calcium-release-activated calcium channel) vermittelt wird [29]. Diese Kanäle werden durch STIM1 und STIM2 (Stromal interaction molecule 1 and 2) aktiviert, die im ER die Konzentrationsabnahme von Ca^{2+} detektieren. Durch die Anlagerung von Ca^{2+} -Ionen an Calmodulin (CAM, ein Calcium-Sensor-Protein) kommt es zur Konformationsänderung und dadurch zur Aktivierung von Calcineurin (CN), einer Serin/Threonin-spezifischen Protein-Phosphatase [30, 31]. Die aktivierte Phosphatase bindet daraufhin nahe des N-Terminus der NFAT-Transkriptionsfaktoren und dephosphoryliert die NFAT-Proteine, die im Zytosol inaktiv hyperphosphoryliert vorkommen [23, 32]. Die Dephosphorylierung der Faktoren führt zur Aktivierung und Verlagerung von NFAT in den Zellkern [33]. Im Nukleus erfolgt zusammen mit anderen Transkriptionspartnern, wie AP-1 (Fos, Jun) und Modulatoren, wie HDAC1 (Histondeacetylase 1), die Bindung von NFAT an spezifische Promotorregionen des Genoms und damit die einhergehende Aktivierung von Zielgenen, wie beispielsweise von Interleukin-Genen. [34, 35].

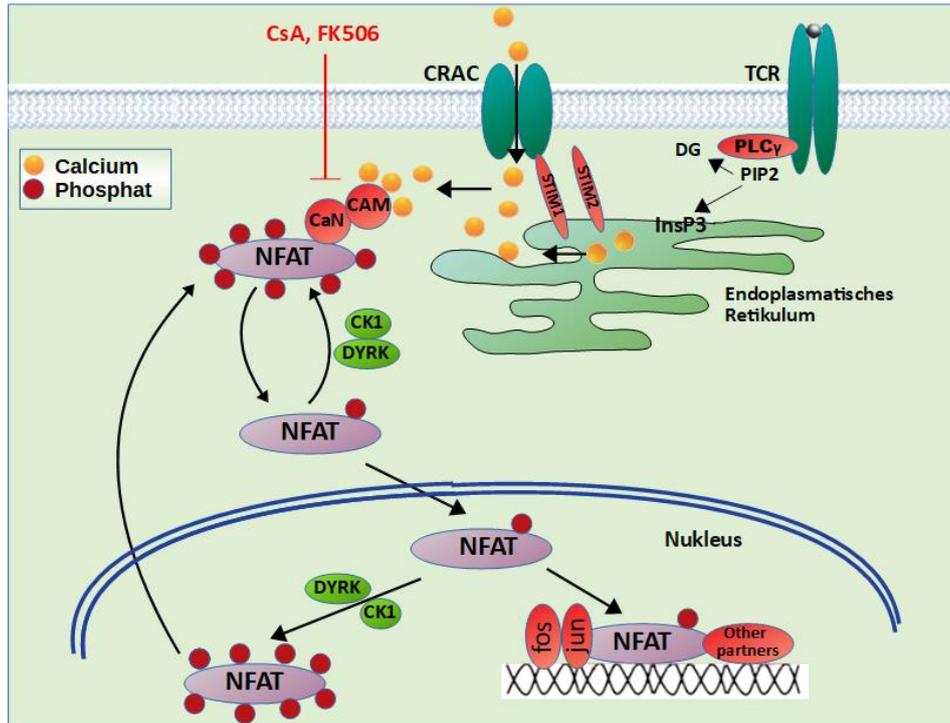


Abbildung 1.4: Der Ca^{2+} -Calcineurin-Signalweg und die Aktivierung von NFATc-Faktoren in Lymphozyten (mod. nach [23]). Die Bindung eines Antigenen an den Immunorezeptor TCR setzt eine Calcium-Signalkaskade intrazellulär in Gang. Diese führt über Calmodulin (CAM) und Calcineurin (CaN) zur Dephosphorylierung und somit zur Aktivierung von NFATc1-4. Nach Translokation in den Zellkern steuert NFATc als Transkriptionskomplex mit AP-1 (Fos, Jun) und anderen Faktoren die Genregulation. Proteinkinasen wie beispielsweise die Casein Kinase 1 (CK1) und die Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated Kinase (DYRK) sind für die Rephosphorylierung der NFAT-Proteine verantwortlich und verhindern so unter Ruhebedingungen die Aktivierung bzw. Translokation von NFAT. Im phosphorylierten Zustand kann die Verlagerung von NFAT aus dem Nukleus ins Zytoplasma erfolgen.

1.3.3 Der Transkriptionsfaktor NFAT5

Der Transkriptionsfaktor NFAT5/TonEBP ist das einzige Mitglied der NFAT-Familie, welches keine Calcineurin-bindende Domäne besitzt und somit nicht von Ca^{2+} bzw. Calcineurin reguliert wird [36]. Für die Expression von Zielgenen bildet NFAT5 im Vergleich zu den NFATc (NFATc1-c4) Proteinen keine Komplexe mit AP-1 (Fos, Jun). NFAT5 muss für die Bindung an die DNA und für die transkriptionelle Aktivität dimerisieren [16, 37]. Die Aktivierung von NFAT5 führt bei osmotischem Stress und Änderung der Tonizität zum nukleozytoplasmatischen Shuttle. Unter hypertonen Bedingungen werden die Phosphorylierung von NFAT5 sowie die Aktivität seines

Transaktivierungsbereichs erhöht und die nukleäre Akkumulation erfolgt. Ob und wenn ja, wie die Phosphorylierung bei der Aktivierung von NFAT5 eine Rolle spielt, ist allerdings noch unklar [36, 38–40]. Bei Hypertonizität induziert NFAT5 die Expression osmoprotektiver Gene und die Expression spezifischer Zytokine, wie z.B. von TNF α und Lymphotoxin- β in Lymphozyten [37]. In einem hypotonen Medium wiederum kommt es insgesamt zu einer starken Konzentrationsabnahme von NFAT5 und einer Anreicherung im Zytoplasma. Unter isotonen Bedingungen befindet sich der Transkriptionsfaktor in einem gering aktivierten Zustand und kann daher auf eine Zunahme und auf eine Abnahme des osmotischen Drucks reagieren [41].

1.4 Entzündungen und Erkrankungen der Haut

Die Barrierefunktion der Haut spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Organismus. Immunantworten der Haut müssen strikt ausbalanciert sein, um vor systemischen Inflammationsreaktionen zu schützen und gleichzeitig die Integrität des Gewebes zu erhalten [42]. Bei Verletzungen der Haut, bakteriellen und viralen Infektionen, Kontakten mit chemischen Substanzen oder bei Einwirkung von UV-Strahlung produzieren Keratinozyten zahlreiche Zytokine (IL-1, TNF- α , IL-10, GM-CSF etc.) und Chemokine (CXCL9, CXCL10, CCL20, CCL27 etc.), die für eine adäquate Immunantwort essenziell sind [43, 44]. Die von Keratinozyten freigesetzten Chemokine können bestimmen, inwiefern Immunzellen vom Hautepithel rekrutiert werden [44]. Insgesamt sind Keratinozyten mehrere Möglichkeiten geboten, pro-inflammatorische Signalkaskaden zu stimulieren bzw. zu verstärken und gleichzeitig die Infiltration, Aktivierung und Differenzierung von Leukozyten zu beeinflussen. Störungen der epidermalen Barrierebildung spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie vieler Hauterkrankungen. Psoriasis, atopische Dermatitis, Basal - bzw. Plattenepithelkarzinome, Ichthyosen und Genodermatosen, wie Morbus Darier, sind durch aberrante Differenzierung von Keratinozyten gekennzeichnet [14]. Zwei der häufigsten chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen, die atopische Dermatitis (AD) und die Psoriasis sind durch Fehler im Keratinisierungsprozess und durch überschießende Aktivierung von Lymphozyten charakterisiert. Störungen der

Hautbarriere führen zu gesteigerter DNA-Synthese, epidermaler Hyperplasie und zur vermehrten Zytokinproduktion [45]. Die rasche Freisetzung von Zytokinen, wie von TNF- α , IFN- γ , IL-1, und GM-CSF, induziert dabei lokale bzw. systemische Entzündungs- und Immunreaktionen [46].

1.5 Aufgabenstellung: Die Rolle individueller NFAT-Faktoren in Lymphozyten und Keratinozyten

Das Labor von Prof. Serfling beschäftigt sich seit Jahren mit der Synthese und Funktion individueller NFAT-Proteine – insbesondere mit der von NFATc1 – [19, 28]. Aus diesem Grund wurde als Hauptaufgabe für meine experimentellen Arbeiten eine detaillierte Analyse der Funktion individueller NFAT-Transkriptionsfaktoren in Lymphozyten festgelegt. Ein Ziel war es anfänglich, Klone von Lymphozyten (NK-Zellen) zu etablieren, die möglichst nur ein individuelles NFATc1-Protein, wie NFATc1/ α A oder NFATc1/ β C, und ein NFATc2-Protein (über-) exprimieren. Die Zellklone ließen sich erfolgreich generieren, die Überexpression von NFATc-Proteinen in KT12-NK-Zellen erbrachte jedoch nicht den erwarteten Effekt hinsichtlich einer deutlich gesteigerten (oder gehemmten) Lymphokinsynthese. Im Zuge der Experimente erwiesen sich die von uns gewählten KT12-Zellen als Testzellen für NK-Zellen als ungeeignet bzw. für die Analyse der Rolle individueller NFATc-Proteine als nicht weiterführend, sodass die Zielsetzung meiner experimentellen Arbeiten neu definiert werden musste.

Der zweite Teil meiner Dissertation widmete sich daher der Untersuchung der Funktion individueller NFAT-Transkriptionsfaktoren in Keratinozyten. Für ein besseres Verständnis dafür, wie verschiedene Komponenten der Epidermis die Integrität der Haut aufrechterhalten und welche Rolle dabei NFAT-Faktoren spielen, wurden primäre humane Keratinozyten und die humane Keratinozytenlinie HaCaT [47] kultiviert und unterschiedlichen Differenzierungsstimuli ausgesetzt. Um Inflammationsvorgänge und insbesondere die Antwort der Haut auf UV-Strahlung besser zu verstehen, wurden die Zellen mit UVB-Licht bestrahlt. Die in Kultur gehaltenen Zellen entsprechen Keratinozyten des Stratum basale der Epidermis. Nur Keratinozyten dieser Zellschicht können *in vitro* proliferieren und wachsen, und beginnen nach kurzer Zeit in Kultur zu

differenzieren. Die dabei sezernierten Proteine und exprimierten Gene spiegeln die ersten Schritte der terminalen Differenzierung von Keratinozyten wider. Änderungen im Expressionsmuster der Differenzierungsmarker Keratin 14, Keratin 10, Loricrin und Involucrin wurden daher nach Stimulation der Zellen mit Differenzierungssignalen bzw. UVB-Licht analysiert. In vivo wird der Keratinisierungsprozess durch das Wechselspiel zwischen Keratinozyten und Zellen des Immunsystems beeinflusst. Aufgrund der Tatsache, dass Keratinozyten mit der Sezernierung von Chemokinen die Aktivität von Leukozyten beeinflussen können, wurden Änderungen der Chemokinexpression von CCL20, CCL2, CCL17 und CXCL10 nach Stimulation mit Differenzierungssignalen und UVB-Licht untersucht.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller/Vertrieb
ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences
Brutschränke	Heraeus
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Fusion SL	Vilber Lourmat
GeneQuant™ pro RNA/DAN Calculator	Amersham Biosciences
Heizblock	Liebisch
Lichtmikroskop	Olympus
Mighty Small II	Hoefer
Multiple Gel Caster	Hoefer
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Quarzküvette	Hellma
Schüttelinkubatoren	Hartenstein
SimpliAmp Thermal Cycler	Thermo Fisher
Varifuge 3.0R	Heraeus
Vortexer	Hartenstein
Stratalinker® UV Crosslinker	Stratagene

2.2 Chemikalien

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Substanzen

Substanzen	Hersteller/Vertrieb
Agarose	Roth
Bradford-Konzentrat 5x	BioRad
Chloroform	Roth
DMSO	Roth
EDTA	Roth
Äthanol	Roth
2-Isopropanol	Roth
Ionomycin	Invitrogen
L-Glutamin	Serva

Substanzen	Hersteller/Vertrieb
β-Mercaptoethanol	Gibco
Methanol	Roth
Magermilch-Pulver	Roth
Natriumacetat	Merck Eurolab
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Ponceau Rot	Sigma Aldrich
SDS/Natriumlaurylsulfat	Carl Roth
SYBR® Green	Thermo Fisher Scientific
Tetradecanoyl-Phorbol-Acetate (TPA)	Sigma Aldrich
TRIS	Roth
Triton X-100	Roth
TRIzol	Invitrogen
Trypsin (0,25%)-EDTA (0,05%)	Gibco
Tween® 20	Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich

2.3 Puffer

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1 x PBS, 0,1% BSA, 0,02% Natriumacetat
4x Lämmli-Puffer	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 0,5% Bromphenolblau, 50% Glycerin
Laufpuffer (SDS PAGE)	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% SDS
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	137 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,6 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , (pH 7,4)
Puffer A (Präparation von Zytoplasma und Kern-Proteinextrakten)	10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF
Puffer C (Präparation von Zytoplasma und Kern-Proteinextrakten)	20 mM Hepes (pH 7,9), 0,4 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF
RIPA-Puffer (Herstellung von Proteinextrakten)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Desoxycholsäure, 0,1% SDS, 1mM EDTA
10x TBS	1,5M NaCl, 0,5 M Tris (pH 7,5)
TBS-T/ Waschpuffer (Western Blot)	1x TBS, 0,5g Tween 20 pro Liter ddH ₂ O

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer (Western Blot)	48 mM Tris-HCl (pH 8,4), 40 mM Glycin, 14 mM SDS, 20% Methanol

2.4 Kits

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
Direct-zol™ RNA MicroPrep Plus	Zymo Research
LEGENDplex™ Maus Th Cytokine Panel (13-plex)	BioLegend®
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Antikörper

Spezifische Antikörper	Isotyp	Klon	Firma	Katalog#
αCD3	Hamster, IgG1, k	145-2C11	BD Pharmingen™	564378
αCD28	Maus C3H x BALB/c IgG1, k	CD 28.2	BD Pharmingen™	556622
β-Actin	Maus, IgG1, k	8H10D10	Abgent	AM1021B
NFATc1	Maus, IgG1, k	7A6	BD Pharmingen™	556602
NFATc2	Maus, IgG2a, k	4G6-G5	BD Pharmingen™	556601

2.6 Zellen und Zelllinien

Tabelle 2.6: Liste der Zellen

Zellen	
KT12	Maus KT12 Hybridoma Zellen [47], erhalten von Prof. Th. Herrmann (Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg)
HaCaT	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie (Boukamp et al., 1988)
Primäre humane Keratinozyten	Foreskin keratinocytes erhalten von Prof. Marc Schmidt (Hautklinik, Würzburg)

2.7 Zellkultur

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Medien

Medium	Zusätze	Firma
RPMI 1640	FCS 10%, β -Mercaptoethanol (50mM) + 5 ml Pen/Strep	Gibco
DMEM	FCS 10%, + 5 ml jeweils Pen/Strep, nicht-essenzielle Aminosäuren und Na-Pyruvate	Gibco
EMEM	8% FCS mit Chelex-100-Hartz, 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin	Bio Whittaker

2.8 Primer

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Primer für qRT-PCR-Assays

Gen (Mensch)	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
β -Actin	CACCAACTGGGACGACAT	ACAGCCTGGATAGCAACG
HPRT	GCTGTGAAAAGGACCTCTC	CACAGGACTAGAACACCTGC
Keratin 14	ATCCAGAGATGTGACCTCCTCC	AGCCTCAGTTCTTGGTGCG
Keratin 10	GGAGCCTCGTGACTACAG	AGCTACCTCATTCTCATACTTC
Involucrin	GCCTTACTGTGAGTCTGGTTG	CTGGAGGAGGAACAGTCTTG
Loricrin	GAGAAAAAGCAGCCCACCC	GAACCGCTGCTACCGCCCCC
NFATc1 α A	ATGCCAAGTACCAGCTTT CCAGTCCCTTCC	CCTCAGAGCTTAAGGTTA GAAAGACAGAGTTACC
NFATc1 β C	ATGACGGGGCTGGAGCAGGACCCG GAGTTC	CCTGGCTCATTGGTCCACAGGTCAGA G
NFATc2	CCATTCCCATCTGCAGCAT	TCATAGGAGCCCGACTGATTG
NFATc3	GCAATCTCGTTGCCACTCTC	GGACGGAACAGGTGAGTGAT
NFATc4	AGGCCTACAGCCCCAGTG	CGCCCATTGGAGACATAAAA
NFAT5	TCACCATCATCTTCCCACCT	CTGCAATAGTCATCGCTGT
CCL2	CCGAGAGGCTGAGACTAAC	CTTGCTGCTGGTGATTCTTC
CXCL10	GCCAATTTTGTCCACGTGTTG	AAAGAATTTGGGCCCTTGG
CCL20	TACTCCACCTCTGCGGCAATCAGA A	GTGAAACCTCCAACCCAGCAAGGT T
CCL17	CACTGAAGATGCTGGCCCTGGTCAC	AGACCTCTCAAGGCTTTGCAGG
IL2	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACAG G	GCACTCAAATGTGTTGTCAGAGCCC
TNF α	GGTCGAATCTGGCTGGAGCGG	GGTAGGTGCAGGACCGGTGGG

Gen (Mensch)	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
IFN γ	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG
IL13	GGAGCTGAGCAACATCACACA	GGT CCT GTA GAT GGC ATT GCA
IL10	GTGATGCCCCAAGCTGAGA	CACGGCCTTGCTCTTGTTTT

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert. Die Kulturmedien für KT12-NK-Zellen, HaCaT-Zellen und für primäre humane Keratinozyten sind in Tabelle 2.7 aufgeführt. Die Zellzahlen für einzelne Experimente wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in Zellkulturschalen oder in Multiwell-Kulturplatten unterschiedlicher Größe gezüchtet.

3.1.2 Coating von Zellkulturplatten

Die Zellkulturschalen wurden vor Gebrauch mit dem Coating Matrix Kit (Gibco™) behandelt, um Wachstum und Verdopplungspotential von Keratinozyten zu verbessern. Anhaftende Zellen wurden später durch zweimaliges Waschen mit 1 x PBS sowie 3-5 min Inkubation mit 0,25% Trypsin-EDTA bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 15 ml-Röhrchen überführt, bei 1300 rpm 4 min zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

3.1.3 Stimulation von KT12 NK-Zellen

KT12 NK-Zell-Klone wurden mit plattengebundenen α CD3/CD28 Antikörpern aktiviert, die physiologische Stimulatoren des TCR-Komplexes imitieren. Für 12-well-Platten wurden 1 ml PBS mit 5 μ g/ml Anti-CD3 und 2 μ g/ml Anti-CD28 versetzt, und die Platten wurden 1h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden ca. 4×10^6 Zellen pro Well in Zellkulturmedium ausgesät. Für die Aktivierung der Zellen wurden die Platten 3 d bei 37 °C im CO₂-Inkubator kultiviert.

3.1.4 Stimulation mit TPA/Ionomycin

Keratinozyten und NK-Zellen wurden mit TPA/Ionomycin stimuliert. TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat) aktiviert als karzinogen wirkender Phorbol-ester membranständige Proteinkinase C (PKC) und führt so zur Zellproliferation [48]. Ionomycin wirkt gleichzeitig auf PKC-Mitglieder und führt zum Anstieg intrazellulärer

Ca²⁺-Konzentrationen [49]. Die TPA-Lösung von 0,1 mg/ml (in DMSO) wurde auf 10 ng/ml Endkonzentration in Kultur verdünnt. Ionomycin (5mM) wurde in einer Verdünnung 1:10000 (0,5 µM/ml) verwendet.

3.1.5 Kultur und Stimulation von Keratinozyten

In Anlehnung an die ursprünglich von Boukamp (1988) beschriebenen Kulturbedingungen wurden HaCaT-Zellen in Kulturmedium der Tabelle 2.7 (DMEM mit Zusätzen) kultiviert. Für Differenzierungsexperimente wurden die Zellen, wie in der Promotionsarbeit von Dr. Marc Schmidt (2001, Würzburg) ausgeführt, in einem „low-calcium“ Medium gehalten. Durch Zugabe einer 250 mM Calciumchlorid-Stocklösung (in Ca²⁺-/Mg²⁺-freiem PBS) wurde der Calciumgehalt der verwendeten Medien (EMEM) direkt auf 0,05 mM eingestellt. Um die Calciumionenkonzentration nicht zu beeinflussen, wurden dem FCS mittels Chelex-100-Harz Calciumionen entzogen [11]. Für die Aktivierung der Keratinozyten erfolgte die Kultivierung der Zellen in einem „high-calcium“ Medium, welches mit Calcium aus einer 250 mM Calciumchlorid-Stocklösung auf eine Endkonzentration von 1,0 mM eingestellt wurde.

3.1.6 UV-Bestrahlung von Keratinozyten

Flockhart et al. haben 2008 die Wellenlängen-abhängige Induktion von NFAT in Keratinozyten, bevorzugt nach Bestrahlung mit UVB-Wellenlängen, beschrieben. In Referenz zu dieser Arbeit wurden die Keratinozyten mit 254 nm- UVB-Wellenlänge im Stratalinker® UV crosslinker (Stratagene) bei 8 W bestrahlt. Zuvor wurden die Zellen für 24 h in einem „low-calcium“-Medium kultiviert. Die Bestrahlung erfolgte in PBS mit einer Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm². Anschließend wurden die Keratinozyten in „low-calcium“ Medium mit 0,1 µM/ml Ionomycin (1mM) für 30, 60 oder 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Platten zur Ablösung von anhaftenden Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05%) 1 min bei 37 °C gehalten. Die Kulturplatten wurden zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen bei 13000 rpm 4 min zentrifugiert und das Zellpellet eingefroren.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

Die Zellpellets der Proben wurden in 80-100 µl RIPA-Puffer re-suspendiert, 30 min auf Eis gelassen, erneut re-suspendiert und bei 4°C 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand als Gesamtzellextrakt in frische Eppendorf-Röhrchen überführt.

3.2.2 Herstellung von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten

Für die Herstellung von Zytoplasma- bzw. Kern-Proteinextrakten wurden bis ca. 1×10^7 Zellen je Probe mit PBS gewaschen und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Protokoll auf Eis bzw. im Kühlraum. Das Zellpellet wurde in 400 µl Puffer A re-suspendiert, 15 min schwellen gelassen und 5-6- mal durch 1 ml Spritzen mit Kanülen (26G 3/8 0,45x10mm) gedrückt, um die Zellmembran platzen zu lassen. Dann wurden 10 µl 10% NP-40 hinzugefügt, die Zellsuspension wurde gevortext und 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene zytoplasmatische Überstand wurde abgenommen und bei -20°C eingefroren. Das zurückbleibende Kernpellet wurde in 80 µl Puffer C aufgenommen, kräftig zerstoßen und 45 min stark geschüttelt. Nach 10-15 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand aus Kernproteinen bei -20°C eingefroren.

3.2.3 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Für die Fraktionierung von Polypeptiden wurden Sammel- und Trenngele hergestellt. Nach Abdichten der Gelkammern des Multiple Gel Casters (Hoefer) wurden zuerst 15 ml des Trenngels (Tabelle 3.1) eingefüllt. Nach dessen Polymerisation wurden 5 ml des Sammelgels (Tabelle 3.2) mit einem Kamm für die Geltaschen hinzugefügt.

Tabelle 3.1: Trenngel für SDS-Protein-Elektrophorese (für 8%-ige Gele)

Komponenten	Menge (in ml)
ddH ₂ O	6,9
30% Acrylamid-Mix	4,0
1,5M Tris pH 8,8	3,8
10% SDS	0,15
10% Ammoniumperoxidsulfat	0,15
TEMED	0,009

Tabelle 3.2: Sammelgel für SDS-Protein-Elektrophorese (für 10%-ige Gele)

Komponenten	Menge (in ml)
ddH ₂ O	4,1
30% Acrylamid-Mix	1,0
1,0M Tris pH 6,8	0,75
10% SDS	0,06
10% Ammoniumperoxidsulfat	0,06
TEMED	0,006

Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und 4 min bei 95 °C denaturiert. Mit 30 µl je Probe und 4 µl Proteinmarker (PageRuler™, Thermo Scientific) wurden dann die vollständig polymerisierten Gele beladen. Bei 25 mA wurden die Proteine 2 h in der Gelelektrophorese-Kammer in SDS-PAGE Laufpuffer (Tabelle 2.3) elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.4 Western Blot

Proteine, die zuvor beim SDS-PAGE in einem Gel aufgetrennt wurden, werden beim Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mittels Antikörperbindung detektiert. Hierfür wurden vier Whatman-Papiere und eine Nitrocellulose-Membran in Transferpuffer eingeweicht und anschließend mit dem Polyacrylamidgel zusammen in eine Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) eingebracht. Mit

Hilfe eines 2 h zum Gel senkrecht gestellten elektrischen Feldes wurde die Membran bei 0,35 mA geblottet. Danach erfolgte eine Färbung mit 0,1% Ponceau in 5% Essigsäure, um den Proteintransfer zu überprüfen. Die Membran wurde dann in einer 4%- Magermilch-Lösung, in TBS-T-Puffer, 1h bei RT geblockt, dreimal 10 min in TBS-T gewaschen und mit den Primärantikörpern (in TBS-T) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen in TBS-T die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (in TBS-T) 1h bei RT. Nach wiederholtem Waschen wurde die Membran unter leichtem Schwenken 1 min in Pierce Tm ECL-Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) inkubiert, um das an den spezifischen Primärantikörper gebundene Protein mit dem Fusion SL-Gerät (Vilber Lourmat) durch Chemilumineszenz detektieren zu können.

3.3 „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS)

Zur Analyse der Apoptoserate von NK-Zellen wurden die Pellets von $1-5 \times 10^5$ KT12-NK-Zellen in 100 μ l 1x Annexin V-Färbepuffer resuspendiert, und 1 μ l Annexin V-APC (1:100) wurde hinzugefügt. Nach 15-20 min Inkubation im Dunkeln bei RT wurden weitere 100 μ l Annexin V-Färbepuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Röhren gevortext und die Zellen mit dem BD FACSCanto™ II Flow Cytometry System analysiert.

3.4 Messung der Zytokinproduktion in Kulturüberständen

Die Quantifizierung der Zytokinproduktion im Kulturüberstand erfolgte nach dem Protokoll von LEGENDplex™ „Mouse Th Cytokine Panel“ (BioLegend) mittels Durchflusszytometrie. Der mehrfach Fluoreszenz-codierte Bead-based Immunoassay ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von 13 verschiedenen Zytokinen.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Extraktion

Das gesamte Kulturmedium mit Zellen wurde in Falcon-Röhren überführt, mit PBS gewaschen, bei 1600 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellpellets wurden für die Isolation von RNA in 1ml TRIzol (Invitrogen) resuspendiert und lysiert.

TRIzol besteht neben Phenol aus Guanidiniumisothiocyanat, das biologisches Material auflöst und - neben anderen Enzymen - RNasen denaturiert [50].

Bei Zellzahlen von ca. 1×10^7 pro Probe wurde die RNA mittels klassischer Phasentrennung extrahiert. Das Direct-zol™ RNA MicroPrep Kit (Zymo Research) wurde bei Zellzahlen $\leq 1 \times 10^6$ verwendet. Nach 5 min Inkubation der Zellpellets mit TRIzol bei RT zwecks vollständiger Zelllyse erfolgte die Zugabe von 200 μ l Chloroform. Durch sorgfältiges Vortexen, Inkubieren der Proben 3-5 min bei RT und durch 15-20 min Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm erfolgte eine vollständige Trennung der Suspension in drei Phasen: In eine untere organische Phase, eine DNA enthaltende Interphase und in eine obere RNA enthaltende wässrige Phase. Letztere wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt, und 500 μ l Isopropanol wurden zur RNA-Fällung hinzugefügt. Nach 3-5 min Inkubation bei RT und 30-45 min Zentrifugation (13000 rpm bei 4°C) wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 75%-Äthanol gewaschen, Luft-getrocknet und in 15-20 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. Die Lösung wurde im Heizblock 10 min auf 65 °C erwärmt und bei -20 °C eingefroren.

3.5.2 Messung von RNA- und Proteinkonzentrationen

RNA- und Proteinkonzentrationen wurden in Quarzküvetten mit dem GeneQuant™ pro bestimmt. Für die Messung der RNA-Konzentration wurden 2 μ l der Proben zu 98 μ l ddH₂O hinzugefügt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurden 2 μ l der Proben zu 998 μ l einer 1:5 Verdünnung von Bradford-Konzentrat in ddH₂O gegeben, und die Absorption wurde bei 595 nm photometrisch bestimmt.

3.5.3 Synthese von cDNA

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) anhand der RNA der Proben wurde das Protokoll des iScript™ cDNA Synthesis Kits (BioRad) befolgt. Dazu wurden 1 μ g RNA, 4 μ l 5x iScript Reaction Mix und 1 μ l iScript Reverse Transcriptase mit Nuklease-freiem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l ergänzt (siehe Tabelle 3.3). Das Reaktionsgemisch wurde im SimpliAmp ThermoCycler (Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll (Tabelle 3.4) inkubiert.

Tabelle 3.3: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Bestandteile	Volumen in μl
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nuclease-freies ddH ₂ O	Variabel
RNA template (100fg-1 μg RNA)	Variabel
Gesamtvolumen	20

Tabelle 3.4: Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese

Reaktion	Zeit und Temperatur
Priming	5 min bei 25°C
Reverse Transkription	30 min bei 42°C
RT Inaktivierung	5 min bei 85°C
Optionaler Schritt	Halten bei 4 °C

3.5.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Um die Transkription ausgewählter Gene unter unterschiedlichen Bedingungen zu ermitteln, wurden qRT-PCR Assays durchgeführt. Die Quantifizierung der cDNA erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, die in Echtzeit während der exponentiellen Phase eines PCR-Zyklus bei jedem Zyklus erfasst werden. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Roche) wurde verwendet, der sich an doppelsträngige DNA anlagert und so zur Fluoreszenz führt. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Reaktion ist proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts [51]. Die quantitative PCR wurde in Duplikaten (20 μl / 96-well) mit dem ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System nach dem Two-step RT-PCR-Protokoll des Herstellers durchgeführt (Applied Biosystems) (siehe Tabelle 3.6). Der Master Mix wurde nach dem Schema in Tabelle 3.5 pipettiert.

Tabelle 3.5: Pipettierschema für qRT-PCR Assays

Komponenten	20 μl /96 well
SYBR® Green	10 μl
ddH ₂ O	8,2 μl

Komponenten	20µl/96 well
Primer F/R	je 0,4 µl
cDNA	1 µl

Tabelle 3.6: Protokoll für die Durchführung der qRT-PCR (Two-step) Assays

Reaktion	Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1	50°C	2 min
		95°C	10 min
Amplifikation	40	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Schmelzkurve	1	95°C	15 sec
		60°C	20 sec
		85°C	0,2°C/min
Kühlung	1	40°C	10 sec

Die relative Expression wurde anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet [52]. Der Ct-Wert (threshold cycle) beschreibt dabei den Punkt einer exponentiell wachsenden Kurve, an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig über einen festen Schwellenwert ansteigt. Um den ΔCt -Wert zu ermitteln, wurde der durchschnittliche Ct-Wert einer Probe mit dem Durchschnitts-Ct-Wert einer endogenen Kontrolle – wie dem eines Haushaltsgens (hier β -Aktin bzw. HPRT) - durch Subtraktion verrechnet. Für die Bestimmung der ‚fold induction‘ eines gesuchten Gens wird der ΔCt -Wert einer stimulierten Probe in Bezug zu einem Kalibrator gesetzt (ergibt den $\Delta\Delta Ct$ - Wert). In dieser Arbeit wurde als Kalibrator der ΔCt -Wert unstimulierter Zellen verwendet.

Alle Berechnungen erfolgen zum Logarithmus der Basis 2, sodass der Wert von $2^{-\Delta\Delta Ct}$ bzw. von $2^{-\Delta Ct}$ ermittelt werden muss, um die Änderung der Expression des untersuchten Gens - bezogen auf einen Kalibrator bzw. auf eine endogene Kontrolle - zu erhalten.

3.6 Statistische Analyse der qRT-PCR-Daten

Der Mittelwert bzw. die jeweilige Standardabweichung (SD) von den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ bzw. $2^{-\Delta Ct}$ -Werten unabhängiger Versuche wurden mittels Excel 2002 kalkuliert. Ein Zweistichproben-t-Test der qRT-PCR-Daten wurde mit Excel 2002 zur Bestimmung des jeweiligen p-Wertes durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression individueller NFAT-Proteine in KT12-Zellen

Um die Rolle individueller NFAT-Transkriptionsfaktoren in Lymphozyten besser zu verstehen, wurden zu Beginn meiner experimentellen Arbeiten KT12 NK-Zellen mit NFATc1/ α A bzw. NFATc1/ β C und NFATc2- exprimierenden Vektoren in Zusammenarbeit mit dem Labor von Th. Herrmann (Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg) transfiziert. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind wichtige Akteure des angeborenen Immunsystems und - neben der Kontrolle von Virusinfektionen - für die Begrenzung von Tumorwachstum durch Erkennung und Eliminierung veränderter eigener Körperzellen verantwortlich. Aktivierte NK-Zellen kontrollieren die Immunantwort durch direkte Abtötung infizierter Zellen und Bereitstellung von Zytokinen bzw. Chemokinen [53]. KT12-Zellen sind Hybridoma-Zellen, die NK-Zellen entsprechen und sich leicht propagieren, infizieren und selektionieren lassen. Zudem lassen sie sich wie T-Zellen mittels α CD3-Antikörpern bzw. TPA/Ionomycin zur Proliferation stimulieren [47]. Neben der Untersuchung der NFATc-Proteinsynthese transfizierter KT12-NK-Zellen mit Western Blots wurden FACS-Analysen zur Bestimmung der Apoptoserate der Zellen durchgeführt. Auch wurde die Zytokinsekretion im Kulturüberstand der Zellen nach Stimulation detektiert und die Transkription von Zytokin-Genen mittels qRT-PCR-Assays überprüft.

4.1.1 Analyse der Proteinsynthese von NFATc1/ α A, NFATc1/ β C und NFATc2

Nach Etablierung von Zellklonen transfizierter KT12 NK-Zellen wurde die Synthese von NFATc-Proteinen mittels Western Blots überprüft. Für die Untersuchung der transfizierten Genkonstrukte auf Proteinebene wurden Proteinextrakte aus Kern und Zytoplasma von 20 h mit TPA/Ionomycin stimulierten bzw. unstimulierten NK-Zellen isoliert und NFATc1- bzw. NFATc2-Proteine nach SDS-PAGE mit entsprechenden Antikörpern detektiert (Abb. 4.1).

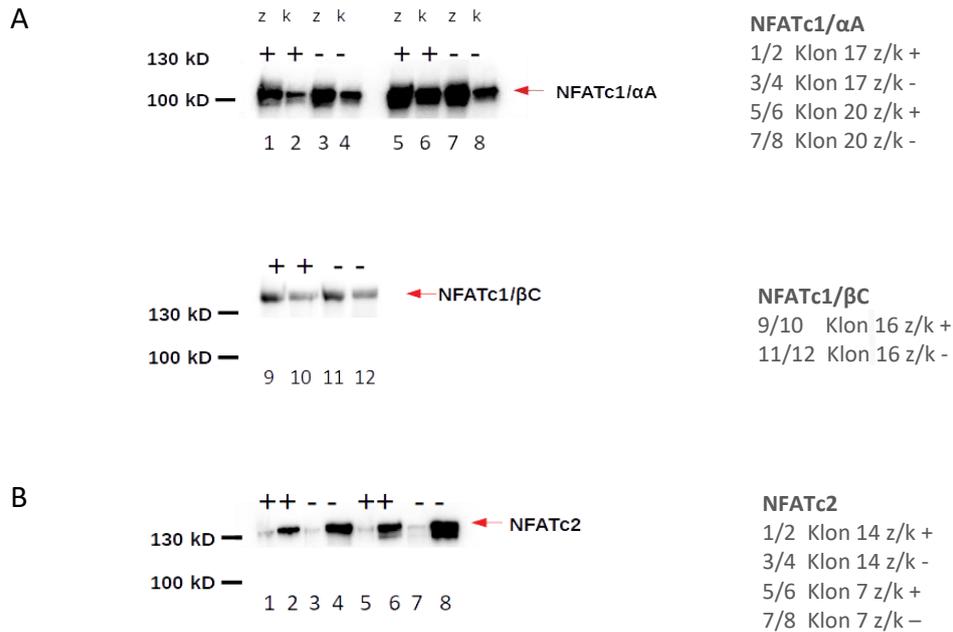


Abbildung 4.1: Überprüfung der Synthese von NFATc-Proteinen in KT12 NK-Zell-Klonen, die nach Transfektion mit Expressionsvektoren selektioniert wurden. Dargestellt sind die entsprechenden Proteinbanden von NFATc1/αA (A, oben), NFATc1/βC (A, unten) und NFATc2 (B) aus dem Zytoplasma (z) und den Zellkernen (k) von NK-Zellen unterschiedlicher Klone nach 20 h Stimulation mit TPA/Ionomycin (+) und ohne Stimulation (-). In A wurde ein monoklonaler Antikörper gegen NFATc1 verwendet, der alle NFATc1-Proteine erkennt. In B wurde die Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen NFATc2 inkubiert.

Für NFATc1/αA- bzw. NFATc1/βC- und NFATc2-Proteine zeigten sich dem jeweiligen Molekulargewicht entsprechende Proteinbanden. Die Synthese von NFATc1-Proteinen war im Zytoplasma der Zellklone stärker ausgeprägt als im Zellkern. Für NFATc2 zeigten sich stärkere Banden für die Proteinsynthese im Zellkern als im Zytoplasma der Zellen. Durch die Stimulation mit TPA/Ionomycin ließ sich insgesamt keine Änderung der Proteinsynthese im Vergleich zu unbehandelten NK-Zellen erkennen.

4.1.2 Untersuchung der Apoptoserate transfizierter KT12-Zell-Klone

B- und T-Zellen zeigen bei Überexpression von NFATc1/C bzw. NFATc2 und zusätzlicher Stimulation mit αCD3-Antikörpern hohe Apoptoseraten, bei Überexpression von NFATc1/A jedoch nicht [27, 28]. NFATc1/αA kann die Antigen-vermittelte Proliferation von Lymphozyten unterstützen und vor einem schnellen aktivierungsinduzierten Zelltod schützen.

Mit der Fragestellung, ob NFATc1/ α A auch in NK-Zellen einen anti-apoptotischen Effekt ausübt und ob sich Unterschiede zwischen den transfizierten NFATc-Proteinen zeigen, wurden FACS-Analysen durchgeführt, und die Sterberate der Zellen wurde nach 20h Stimulation mit TPA/Ionomycin bzw. 3d mit α CD3/CD28 untersucht (Abb. 4.2).

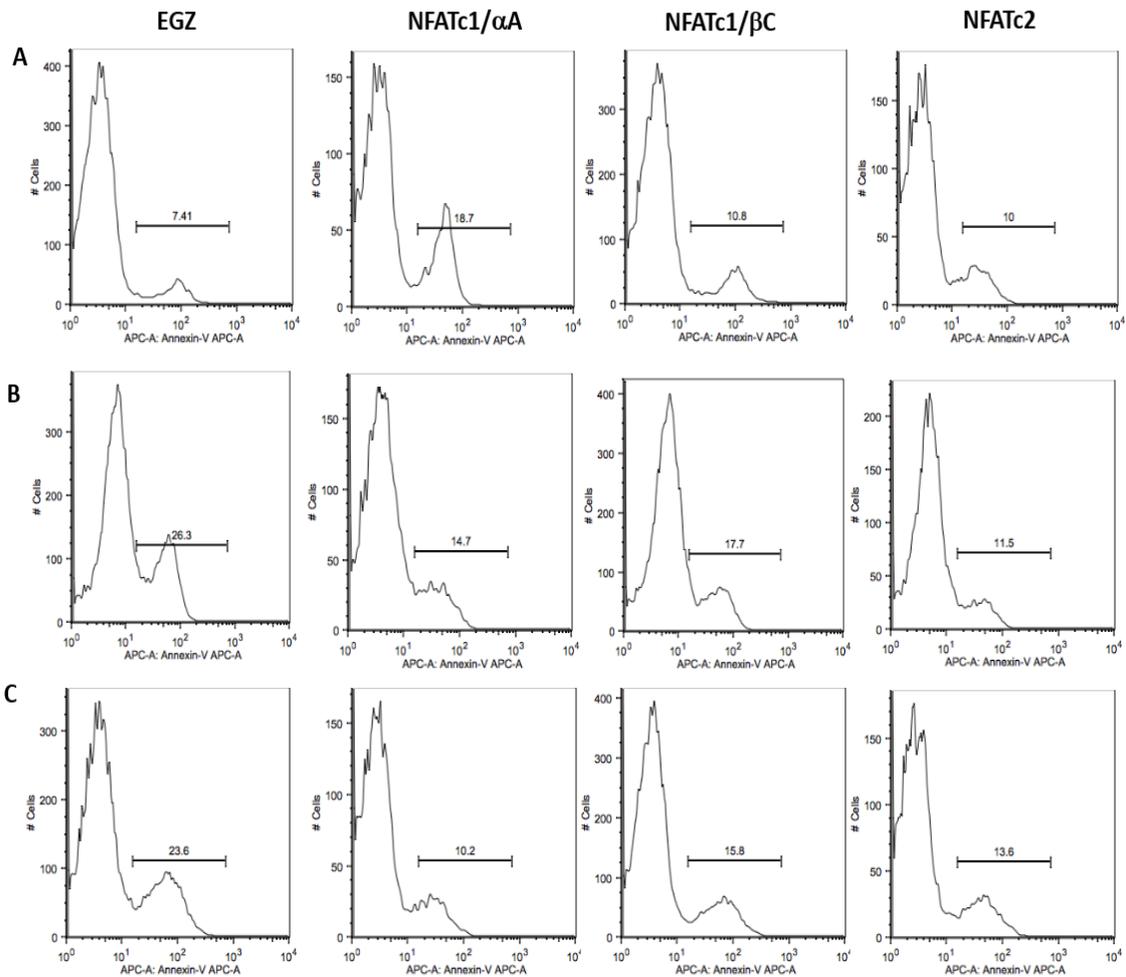


Abbildung 4.2: Analyse der Apoptose-Rate von KT12-NK-Zellen, die mit NFATc-exprimierenden Vektoren transfiziert wurden, vor (A) und nach Stimulation (B+C). Dargestellt sind die FACS-Analysen von (A) unstimulierten NK-Zellen, von (B) 20 h mit TPA/Ionomycin stimulierten und von (C) 3 d mit α CD3/CD28 stimulierten NK-Zellen.

Nach wiederholten Analysen der Apoptose-Raten von KT12-NK-Zellen am BD FACSCalibur Flow Cytometer (in Zusammenarbeit mit K. Muhammad) konnten hinsichtlich der Anzahl apoptotischer Zellen allerdings keine wesentlichen Unterschiede zwischen Zellen mit verschiedenen NFATc-Proteinen festgestellt werden. Die Apoptose-

Rate der Zellen zeigte sich insgesamt von der Überexpression von NFATc1/ α A-, NFATc1/ β C- bzw. NFATc2- Proteinen und von unterschiedlichen Stimulationsbedingungen unabhängig. Für NFATc1/ α A konnte kein anti-apoptotischer Effekt in KT12 NK-Zellen gezeigt werden.

4.1.3 Zytokin-Sekretion und -Expression von KT12 NK-Zellen mit NFATc1/ α A-, NFATc1/ β C- bzw. NFATc2-Überexpression

NK-Zellen können durch die Produktion von Zytokinen, wie Interferon γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), Einfluss auf Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen nehmen [53]. IFN γ und TNF α sind somit die wichtigsten Zytokine, die von NK-Zellen produziert werden. Darüber hinaus können NK-Zellen verschiedene andere Faktoren sezernieren, wie beispielsweise die immunregulierenden Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 und den Wachstumsfaktor GM-CSF [54]. NFAT-Faktoren regulieren die Expression vieler Zytokin-Gene, darunter auch die von proinflammatorischen Zytokinen. Um zu erforschen, inwiefern die Überexpression von individuellen NFAT-Proteinen die Zytokin-Produktion in NK-Zellen beeinflusst, wurden KT12 NK-Zellen nach einigen Tagen in Kultur auf die Sekretion von Zytokinen hin unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen untersucht. Hierfür wurde das LEGENDplex™ Maus Th Cytokine Panel (BioLegend) verwendet (und von K. Muhammad durchgeführt), welches die gleichzeitige Messung 13 verschiedener Zytokine ermöglicht. NK-Zellen wurden nach Präinkubation mit α CD3/CD28- Antikörpern 3 und 1 d bzw. mit TPA/Ionomycin 20h kultiviert, und der Überstand wurde gewonnen. Nach Stimulation mit α CD3/CD28- Antikörpern zeigte sich eine nur sehr geringe Menge an produzierten Zytokinen. Nach 20h Stimulation von KT12 NK-Zellen mit TPA/Ionomycin wurden die in Abbildung 4.3 dargestellten Messwerte im Zellkulturüberstand detektiert. Die Sekretion war dabei im Vergleich zur Stimulation mit α CD3/CD28- Antikörpern höher, aber insgesamt trotzdem sehr gering hinsichtlich der erwarteten Zytokinproduktion in NK-Zellen. Typisch für NK-Zellen ist die sehr schnelle, 2 bis 4 h dauernde Sekretion von IFN γ nach Aktivierung [55].

Bei unseren Zytokin-Sekretions Assays mit KT12-Zellen (Abb. 4.3) war die Sekretion von IL2 mit 550 pg/ml im Kulturüberstand von Zellen mit NFATc2-Überexpression am höchsten. Bei NFATc1/ α A-Überexpression ließ sich eine IL2-Sekretion von 130 pg/ml messen. Andere Zytokine, wie TNF α , IFN γ , IL13, IL10, IL9 und IL22, waren nur unter 50 pg/ml detektierbar. Die Sekretion weiterer Zytokine, wie von IL4, IL5, IL6, IL17a, IL17f bzw. IL21, war in KT12-NK-Zellen nicht messbar.

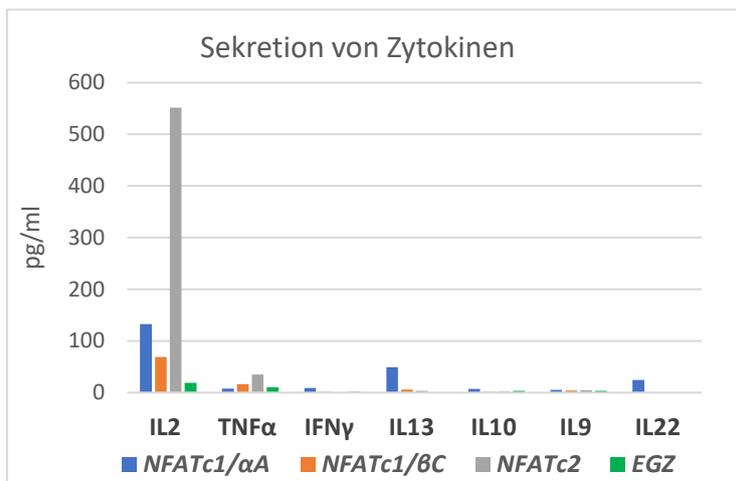


Abbildung 4.3: Zytokin-Sekretions Assays von NK-Zellen nach NFATc1/ α A-, NFATc1/ β C- und NFATc2-Überexpression und Stimulation. Zytokinsekretion im Kulturüberstand von KT12-NK-Zellen nach 20 h Stimulation mit TPA und Ionomycin (n=1, Sondierungsversuch).

Um die Korrelation von Zytokinproduktion und -expression auf transkriptioneller Ebene zu überprüfen, wurden qRT-PCR-Assays durchgeführt. Diese erfolgten nach 20 h Stimulation der Zellen mit TPA/Ionomycin bzw. 1 und 3 d nach Präinkubation mit α CD3/CD28- Antikörpern. Insgesamt zeigte sich für die Zytokine IL2, TNF α , IFN γ , IL13 bzw. IL10 eine Geninduktion unter allen Stimulationsbedingungen im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings war diese von der Überexpression individueller NFATc-Proteine unabhängig und meistens in KT12 NK-Kontroll-Zellen (EGZ in Abb. 4.4) am höchsten. Exemplarisch hierfür sind die Expressionswerte nach 20 h Stimulation der Zellen mit TPA/Ionomycin in Abb. 4.4 dargestellt. Die mRNAs aller Zytokine (bis auf die von IL2) wurden am stärksten in Zellen ohne ektopisch exprimierte NFATc-Proteine (in EGZ-Zellen) induziert (Abb. 4.4 A). Für IL2 zeigte sich der höchste Anstieg der Expression in Zellen mit NFATc2-Überexpression bei einer 'fold induction' von 110. Neben der Zunahme der Expression von IL2 - besonders in Zellen mit NFATc2-Überexpression - wurde in KT12-NK-Zellen generell die mRNA von IL2 am häufigsten

transkribiert (Abb. 4.4 B). Da auch im Kulturüberstand die gemessene Zytokin-Sekretion von IL2 nach NFATc2-Überexpression am höchsten war, lässt sich dahingehend eine Korrelation zwischen Sekretion und Genexpression von IL2 erkennen.

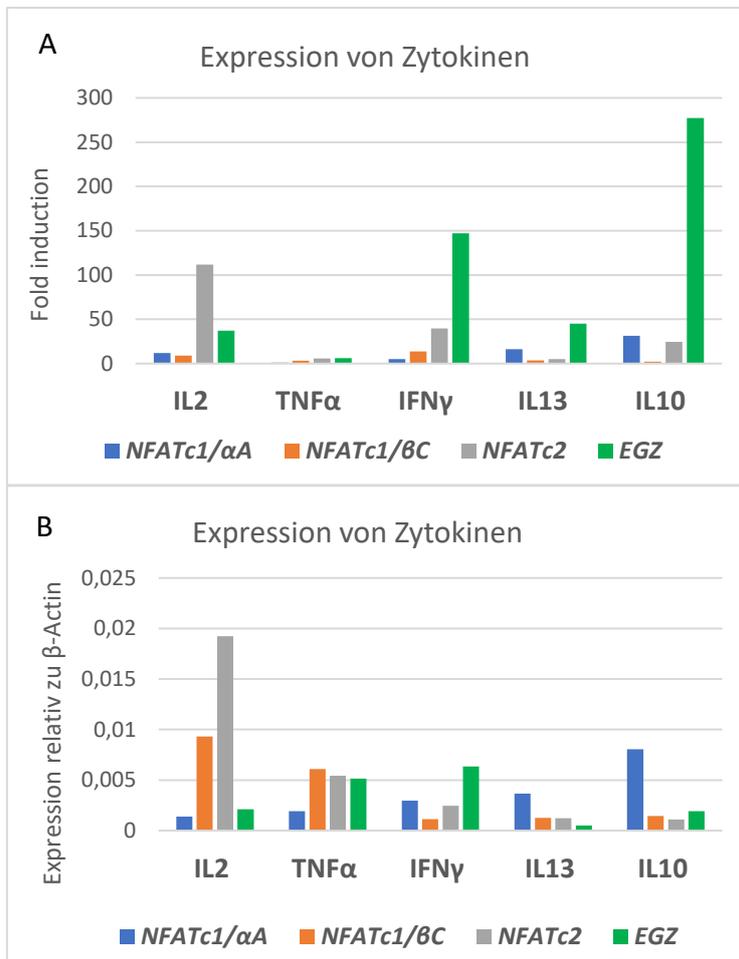


Abbildung 4.4: Darstellung der Zytokin-RNA-Expression von NK-Zellen nach NFATc1/αA-, NFATc1/βC- und NFATc2-Überexpression und Stimulation. qRT-PCR Assays der mRNA von KT12-NK-Zellen nach 20 h Stimulation mit TPA/Ionomycin. In A wird unter 'fold induction' der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert gezeigt. Unter B ist der $2^{-\Delta Ct}$ -Wert - bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH - dargestellt. (n=1, Sondierungsversuch)

Insgesamt zeigten die sehr niedrige Zytokin-Sekretion und die Induktion der Transkription besonders in nicht-transfizierten Zellen aber, dass KT12-Zellen nicht die Fähigkeit besitzen, bei Über-Expression von NFATc-Proteinen mit einer veränderten Zytokin-/Lymphokin-Expression zu reagieren. Aus diesem Grund erwiesen sich die KT12-Zellen als Testzellen für NK-Zellen ungeeignet und waren für die Analyse der Rolle individueller NFATc-Proteine bei der Zytokinproduktion nicht zielführend. Daher wurden die Versuche zu KT12-Zellen im Rahmen dieser Untersuchungen beendet und das Ziel meiner experimentellen Arbeiten neu definiert.

4.2 Expression individueller NFAT-Proteine in Keratinozyten

Für die Analyse der Rolle individueller NFAT-Faktoren in Keratinozyten wurden primäre humane Keratinozyten und die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT kultiviert. Mit dem Ziel, den Differenzierungsprozess von Keratinozyten und die Antwort auf UV-Strahlen besser zu verstehen, wurden Keratinozyten mit Differenzierungssignalen bzw. UVB-Licht stimuliert. Mittels qRT-PCR-Assays wurden Änderungen der Transkription von NFAT-Faktoren, Keratinozyten-spezifischen Proteinen und Chemokinen detektiert und analysiert.

4.2.1 Analyse des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten

4.2.1.1 Untersuchung der Expression individueller NFAT-Faktoren im Zuge der Keratinozytendifferenzierung

Die spontan immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT [56] wird wegen ihrer hochgradig erhaltenen Differenzierungsfähigkeit häufig für in vitro-Experimente zur Untersuchung der Regulation der epidermalen Keratinisierung verwendet [57, 58]. Primäre humane Keratinozyten lassen sich nur eine begrenzte Zeit in vitro kultivieren und benötigen spezielle Bedingungen für die optimale Proliferation [59]. HaCaT-Zellen sind dahingehend weniger anspruchsvoll und behalten auch nach zahlreichen Passagen ihr volles Differenzierungspotential mit der Expression differenzierungsspezifischer Marker [60]. Die ersten Versuche wurden daher mit HaCaT-Zellen durchgeführt und anschließend mit primären humanen Keratinozyten fortgesetzt. Für Differenzierungsexperimente wurden die Zellen, wie unter 3.1.5 beschrieben, in einem Medium mit 0,05 mM Calcium (low-calcium medium) kultiviert. Für die Aktivierung der Keratinozyten wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration auf 1 mM Calcium (high-calcium Medium) erhöht. HaCaT-Zellen zeigen lichtmikroskopisch eine spindelförmige Gestalt und eine lockere Gruppierung in ‚low-calcium medium‘ [58]. Unter Kulturbedingungen mit niedrigem Calciumgehalt wird die Formation desmosomaler Zellkontakte inhibiert. Die Keratinozyten können dann nur Monolayers ausbilden, ohne eine Schichtbildung aufzuweisen. Bei Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf mehr als 1 mM nehmen die Zellen durch Reorganisation des

Keratinzytoskeletts eine eher kuboide Form an und sind durch die Entstehung desmosomaler Zellkontakte dichter gepackt [11]. Diese morphologischen Umgestaltungen sind als Indiz für eine fortschreitende Zelldifferenzierung zu werten und wurden im Zuge der Differenzierungsexperimente dieser Arbeit lichtmikroskopisch festgestellt und überprüft.

Im Wechsel von Epithelzellproliferation zu Zelldifferenzierung ist die Calcium-/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin beteiligt. Bei der Differenzierung von Keratinozyten ist die Aktivität von Calcineurin und damit – aller Wahrscheinlichkeit nach – auch die NFAT-abhängige Transkription erhöht [61]. Um die Rolle von NFAT-Faktoren bei der Keratinozytendifferenzierung besser zu verstehen, wurde die Expression von NFATc1, c2, c3 und c4 sowie von NFAT5 in Keratinozyten mittels qRT-PCR untersucht. Hierfür wurden HaCaT-Zellen und primäre humane Keratinozyten nach einigen Tagen in Zellkultur mit unterschiedlichen Stimuli 24 h aktiviert. Neben Agonisten, wie TPA/Ionomycin, die die Keratinozytendifferenzierung induzieren können [62], wurden die Zellen mit dem Differenzierungsstimulus Ca^{2+} allein bzw. in Kombination mit Ionomycin behandelt. Die für die qRT-PCR-Assays verwendeten Primer sind in Tabelle 2.8 zusammengefaßt. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen dieser Arbeit sind als 'fold induction' individuell analysierter Gene - bezogen auf eine unstimulierte Kontrolle (Spalte 1) - dargestellt. Um nicht nur die Änderung der Expression der Gene im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu zeigen, sondern um auch Unterschiede in der Häufigkeit transkribierter Gene unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen aufzeigen zu können, wurden die ermittelten Ct-Werte in Relation zur endogenen Kontrolle GAPDH gesetzt. Zur Übersicht werden die Werte in Diagrammen als 'fold induction' bzw. relativ zu GAPDH präsentiert bzw. einander gegenübergestellt und die Daten der mRNA von HaCaT-Zellen und primären humanen Keratinozyten im Vergleich gezeigt. Bei p-Werten $> 0,05$ und somit keiner statistisch relevanten Beobachtung wurde auf die Angabe eines p-Wertes in den Balkendiagrammen verzichtet. In der Abbildung 4.6 ist die Expression von NFAT in HaCaT-Zellen bzw. unter 4.7 in primären humanen Keratinozyten präsentiert. Die Keratinozyten wurden auf die Expression aller fünf NFAT-Faktoren hin

untersucht. Die Daten für NFATc3 bzw. NFATc4 sind jedoch aufgrund sehr geringer Werte - mit Ct-Werten über 30 - nicht angegeben.

Interessanterweise konnte in HaCaT-Zellen je nach Stimulationsbedingung eine insgesamt bis zu zwanzig-fach häufigere Expression von NFAT5 im Vergleich zur Expression anderer NFAT-Faktoren detektiert werden (Abb. 4.6 A). Nach Stimulation mit TPA/Ionomycin zeigte NFAT5 eine 'fold induction' von 1,5 bzw. nach Stimulation mit Ca^{2+} /Ionomycin von 1,6 (Abb.4.6 B). Die Faktoren NFATc1/ α A und NFATc2 zeigten eine 'fold induction' von 3,5 bzw. 3,8 nach Stimulation mit TPA/Ionomycin und somit eine zweimal stärkere Induktion als NFAT5. Die Transkription der mRNA von NFATc1/ β C wurde durch TPA/Ionomycin ca. gleich stark wie NFAT5 induziert. Überraschenderweise übte in HaCaT-Zellen die Stimulation mit Ca^{2+} bzw. Ca^{2+} /Ionomycin einen geringen bis keinen Effekt auf die Expression von NFATc1- bzw. c2 im Vergleich zu primären humanen Keratinozyten aus.

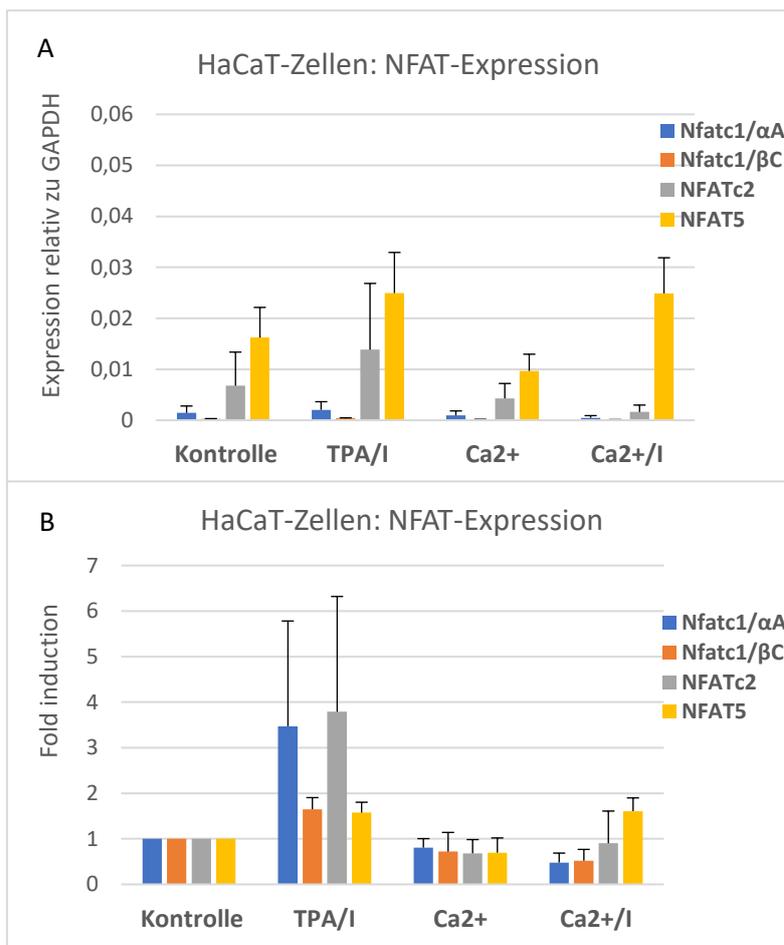


Abbildung 4.6: Analyse der NFAT-Expression von HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Differenzierungssignalen. qRT-PCR Daten der mRNA von HaCaT-Zellen nach 24h Stimulation mit TPA und Ionomycin (TPA/I), 24h Kultivierung in einem Medium mit 1,5 mM Calcium (Ca^{2+}) bzw. 1,5 mM Calcium und Stimulation mit Ionomycin (Ca^{2+} /I). Die Kontrolle bilden HaCaT-Zellen, die 24h in Medium mit 0,05 mM Calcium kultiviert wurden. In A ist der Mittelwert \pm SD der $2^{-\Delta\text{Ct}}$ - Werte bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH dargestellt (n=2). In der Abbildung B wird unter 'fold induction' der Mittelwert \pm SD des $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ - Wertes gezeigt (n=2).

In primären humanen Keratinozyten wurde NFAT5 sogar im Schnitt bis zu achtzig-fach häufiger exprimiert im Vergleich zu den Ca^{2+} -abhängigen NFATc-Faktoren (Abb. 4.7 A). Die mRNA von NFAT5 wurde dabei mit einer 'fold induction' von 1,2 in 'high calcium medium' und bei zusätzlicher Stimulation mit Ionomycin mit einer 'fold induction' von 2,1 induziert (Abb. 4.7 B). Durch die Stimulation mit Ca^{2+} stiegen zusätzlich zu NFAT5 auch die Werte von NFATc1/ α A bzw. -/ β C und -c2 an, mit bis zu doppelt so großer 'fold induction' im Vergleich zu NFAT5. Nach Stimulation mit Ca^{2+} /Ionomycin ließ sich neben NFAT5 auch eine erhöhte Transkription der kurzen NFATc1-Isoform NFATc1/ α A bzw. NFATc2 in primären humanen Keratinozyten detektieren, während sich für die lange Isoform NFATc1/ β C keine Induktion zeigte.

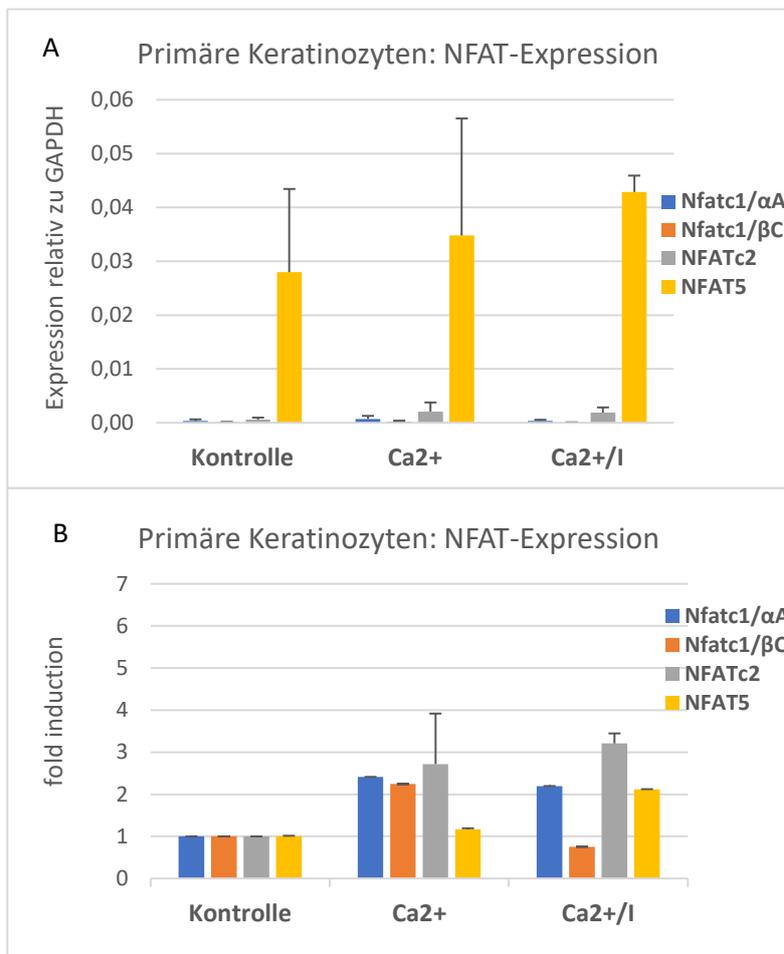


Abbildung 4.7: Analyse der NFAT-Expression primärer humaner Keratinozyten nach Stimulation mit Differenzierungssignalen. qRT-PCR Daten der mRNA primärer humaner Keratinozyten nach 24 h Kultivierung in Medium mit 0,2 mM Calcium (Ca^{2+}) und nach 24 h in 0,2 mM Calcium und Stimulation mit Ionomycin (Ca^{2+} /I). Die Zellen für die Kontrolle wurden in „low-calcium“ Medium für 24h kultiviert. Der Mittelwert \pm SD des $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Wertes relativ zu GAPDH- wird in A gezeigt (n=2). In B wird der Mittelwert \pm SD der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Wert dargestellt (n=2).

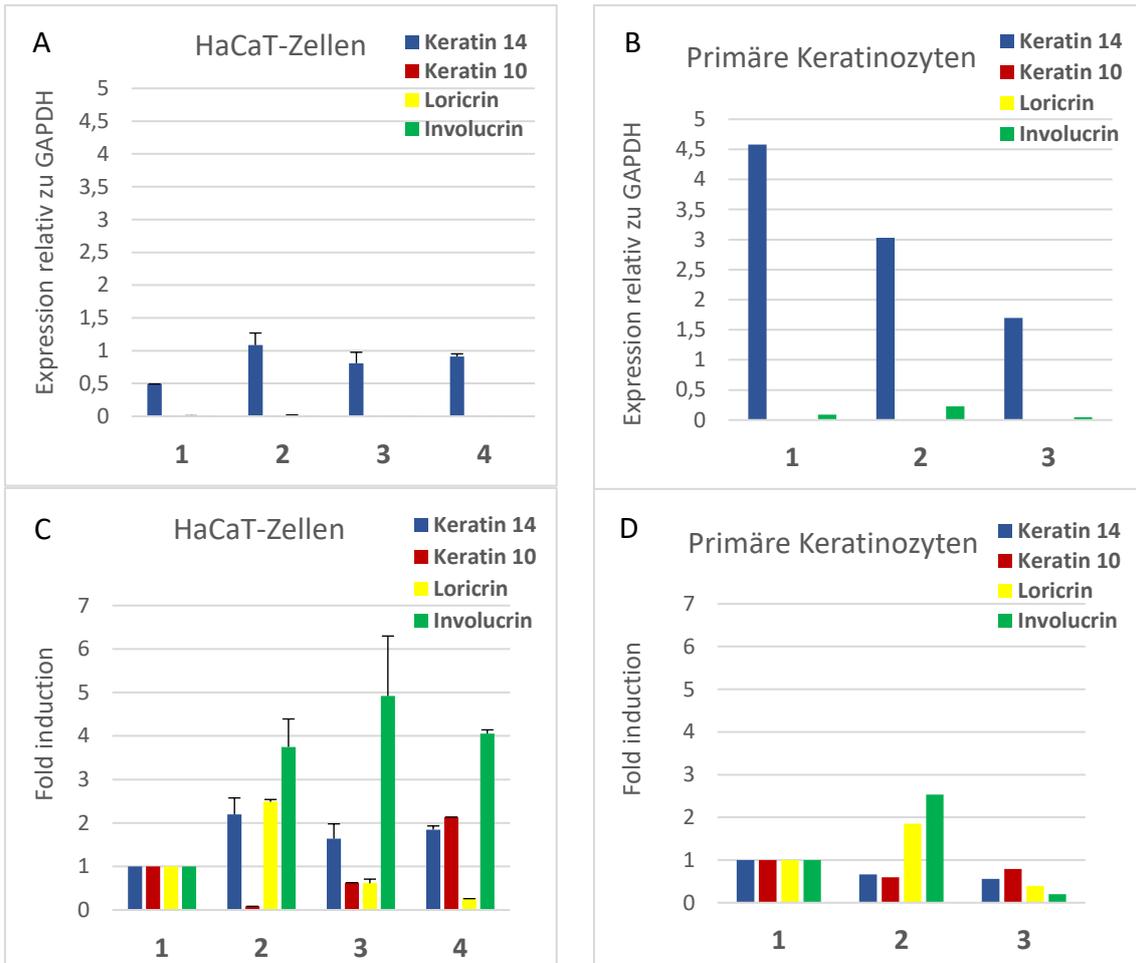
4.2.1.2 Änderung der Expression Keratinozyten-spezifischer Proteine

Um den Prozess der Hautdifferenzierung besser zu verstehen, wurden Änderungen der Expression von Differenzierungsmarkern in Keratinozyten analysiert. Die Zellen wurden unter den gleichen Stimulationsbedingungen kultiviert, wie unter 4.2.1.1 beschrieben. Unterschiede im Expressionsmuster der Keratinozyten-spezifischen Proteine Keratin 14, Keratin 10, Loricrin bzw. Involucrin wurden untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 4.8 dargestellt. Keratin 14 zeigte – wie zu erwarten - unabhängig von allen Stimulationsbedingungen im Vergleich zu den anderen untersuchten Strukturproteinen die höchste Expression. Diese war in primären Keratinozyten im Schnitt 3,5-fach höher als in der Keratinozyten-Zelllinie (Abb. 4.8 A+B).

Insgesamt ließ sich in HaCaT-Zellen bzw. in primären humanen Keratinozyten eine im Schnitt bis zu siebzig-fach bzw. dreißig-fach höhere Expression von Keratin 14 im Vergleich zu Keratin 10, Loricrin, bzw. Involucrin messen (Abb. 4.8 A).

In primären humanen Keratinozyten nahm die Expression von Keratin 14 im Zuge der Differenzierung der Zellen (Abb. 4.8 B+D, Spalten 2+3) der Erwartung entsprechend ab. Auch die Expression von Keratin 10 war nach Stimulation im Vergleich zur Kontrolle verringert. Involucrin bzw. Loricrin wiederum zeigten eine 2,5- bzw. 1,9- fache Steigerung der Expression in ‚high calcium medium‘ (Abb. 4.8 D, Spalte 2) und somit die stärkste Zunahme unter den Differenzierungsmarkern. Auch in HaCaT-Zellen wurde Involucrin am stärksten induziert, mit in ‚high calcium medium‘ bis zu fünf-fach erhöhten Werten (Abb. 4.8 C, Spalten 2-4). Die Expression von Keratin 14 nahm in HaCaT-Zellen nicht ab, sondern war unter allen Stimulationsbedingungen im Vergleich zur Kontrolle zwischen 1,6- und 2,2- fach gesteigert (Abb. 4.8 C, Spalte 2-4). Die Expression von Keratin 10 wurde in ‚high calcium medium‘ mit Ionomycin 2-fach induziert.

Die Zunahme der Expression von Involucrin nach Stimulation der Zellen mit dem Differenzierungssignal Calcium bzw. Calcium/Ionomycin kann als Indiz für die Ausbildung der verhornten Hülle in HaCaT-Zellen bzw. primären humanen Keratinozyten im Verhornungsprozess gewertet werden. Somit gilt die Steigerung der Expression von K10, Loricrin und Involucrin nach Stimulation mit Differenzierungssignalen als Hinweis für einen differenzierteren Phänotyp der Keratinozyten.



HaCaT-Zellen

- 1 Kontrolle: 0,05 mM Ca²⁺
- 2 0,05 mM Ca²⁺ + TPA/I
- 3 1,5 mM Ca²⁺
- 4 1,5 mM Ca²⁺ + Ionomycin

Primäre Keratinozyten

- 1 Kontrolle: 0,06 mM Ca²⁺
- 2 0,2 mM Ca²⁺
- 3 0,2 mM Ca²⁺ + Ionomycin

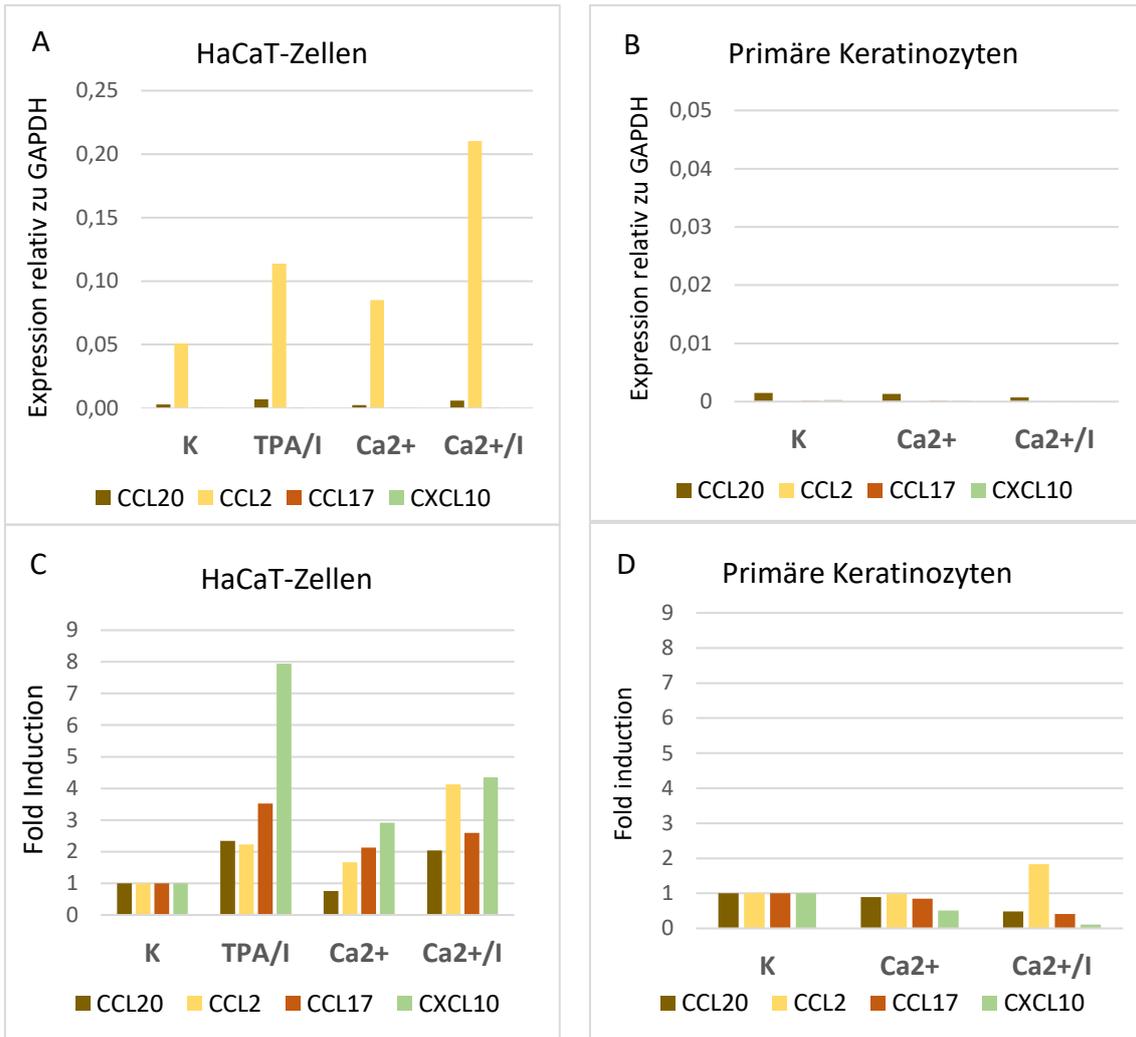
Abbildung 4.8: Untersuchung der Expression von Differenzierungsmarkern nach Stimulation mittels Differenzierungssignalen. Mittelwerte \pm SD der qRT-PCR Daten der mRNA von HaCaT-Zellen (A+C) (n=2) und qRT-PCR Daten der mRNA von primären humanen Keratinozyten (B+D) (n=1). HaCaT-Zellen wurden 24h mit TPA und Ionomycin (TPA/I) stimuliert, 24h in einem Medium mit 1,5 mM Calcium (Ca²⁺) bzw. 1,5 mM Calcium und zusätzlicher Stimulation mit Ionomycin (Ca²⁺/I) kultiviert. Die Kontrolle bilden HaCaT-Zellen, die 24h in Medium mit 0,05 mM Calcium kultiviert wurden. Primäre humane Keratinozyten wurden 24 h in Medium mit 0,2 mM Calcium (Ca²⁺) kultiviert und 24 h in 0,2 mM Calcium und zusätzlicher Stimulation mit Ionomycin (Ca²⁺/I). Die Zellen für die Kontrolle wurden in „low-calcium“ Medium für 24h kultiviert.

4.2.1.3 Änderung des Expressionsmusters von Chemokinen

Im Zuge der Differenzierungsexperimente wurde neben der Expression Keratinozyten-spezifischer Proteine die Expression von Chemokinen mittels qRT-PCR-Assays analysiert. Keratinozyten sind eine relevante Quelle für die Produktion von Chemokinen und sezernieren neben Th1-Chemokinen CXCL9 bzw. CXCL10 die Th2-Chemokine CCL17 bzw. CCL22 [63, 64]. Chemokine können durch autokrine bzw. parakrine Sekretionsmodi die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen [65]. Um die Rolle chemotaktischer Zytokine im Verhornungsprozess besser zu verstehen, wurden insbesondere die Chemokine CCL20, CCL2, CCL17 und CXCL10 nach 24 h Stimulation der Zellen mit TPA/Ionomycin, Ca²⁺ bzw. Ca²⁺/Ionomycin untersucht.

Generell zeigten HaCaT-Zellen im Schnitt nahezu hundert-mal höhere Expressionslevels an Chemokinen als primäre humane Keratinozyten (Abb. 4.9 A+B). In primären Keratinozyten waren die Expressionswerte von CCL2, CCL17 bzw. CXCL10 nahezu bei null, CCL20 wurde sehr gering exprimiert. Allein CCL2 wurde nach Stimulation mit Ca²⁺/Ionomycin 1,8-fach induziert, für alle anderen Chemokine zeigte sich eine Abnahme der Transkription (Abb. 4.9 B+D).

In HaCaT-Zellen wurde die mRNA von CCL2 insgesamt am häufigsten exprimiert, mit im Vergleich zur Kontrolle bis 4-fach höheren Werten nach Stimulation mit Ca²⁺/Ionomycin. Die stärkste Änderung der Expression zeigte jedoch CXCL10 mit 8-fach, 3-fach bzw. 4,3-fach erhöhten Werten nach Stimulation mit TPA/Ionomycin, Ca²⁺ bzw. Ca²⁺/Ionomycin (Abb. 4.9 C, Spalten 2-4). Auch die Expression der Chemokine CCL20, CCL2 und CCL17 wurde durch die Stimulation mit Proliferations- bzw. Differenzierungssignale mit einer durchschnittlichen 'fold induction' von 2,4 erhöht.



HaCaT-Zellen

- 1 Kontrolle: 0,05 mM Ca²⁺
- 2 0,05 mM Ca²⁺ + TPA/I
- 3 1,5 mM Ca²⁺
- 4 1,5 mM Ca²⁺ + Ionomycin

Primäre Keratinozyten

- 1 Kontrolle: 0,06 mM Ca²⁺
- 2 0,2 mM Ca²⁺
- 3 0,2 mM Ca²⁺ + Ionomycin

Abbildung 4.9: Analyse der Chemokin-Induktion nach Stimulation mittels Differenzierungssignalen. qRT-PCR Daten der mRNA von HaCaT-Zellen (A+C) und primären humanen Keratinozyten (B+D) (n=1). HaCaT-Zellen wurden 24h mit TPA und Ionomycin (TPA/I) stimuliert, 24h in einem Medium mit 1,5 mM Calcium (Ca²⁺) bzw. 1,5 mM Calcium und zusätzlicher Stimulation mit Ionomycin (Ca²⁺/I) kultiviert. Die Kontrolle bilden HaCaT-Zellen, die 24h in Medium mit 0,05 mM Calcium kultiviert wurden. Primäre humane Keratinozyten wurden 24 h in Medium mit 0,2 mM Calcium (Ca²⁺) kultiviert und 24 h in 0,2 mM Calcium und zusätzlicher Stimulation mit Ionomycin (Ca²⁺/I). Die Zellen für die Kontrolle wurden in „low-calcium“ Medium für 24h kultiviert.

4.2.2 Analyse der Wirkung von UVB-Licht auf Keratinozyten

4.2.2.1 Änderung der Expression von NFAT-Faktoren nach UV-Bestrahlung

Um die Rolle von NFAT-Faktoren bei der UV-Antwort von Keratinozyten besser zu verstehen, wurden die Zellen im weiteren Verlauf meiner Arbeit mit UVB-Licht bestrahlt. Flockhart et al. (2008) haben bevorzugt nach Bestrahlung mit UVB-Wellenlängen die Wellenlängen-abhängige Induktion von NFAT in Keratinozyten gezeigt und eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von NFATc1 beschrieben. In Referenz zu dieser Arbeit wurden HaCaT-Zellen und primäre humane Keratinozyten mit 254 nm- UVB-Wellenlänge im Stratalinker® UV crosslinker (Stratagene) bei 8 W bestrahlt. Die Zellen wurden mit einer Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm² behandelt und in ‚low-calcium medium‘ mit 0,1 µM/ml Ionomycin (1mM) 30, 60 oder 90 min bei 37 °C inkubiert. Der Versuchsansatz wurde jeweils dreimal mit HaCaT-Zellen bzw. primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Die Mittelwerte der qRT-PCR-Ergebnisse sind in den Diagrammen der Abbildung 4.10 dargestellt.

Auch in diesen Experimenten waren generell die höchsten Expressionlevels für die mRNA von NFAT5 unter allen NFAT-Transkriptionsfaktoren zu beobachten. HaCaT-Zellen zeigten dabei im Schnitt viermal so hohe Werte für NFAT5 als primäre humane Keratinozyten (Abb. 4.10 A/B). Unter Bestrahlung mit UVB-Licht konnte in HaCaT-Zellen sogar eine Induktion von NFAT5 mit ‚fold induction‘-Werten von ca. 3,6 bzw. 2,1 detektiert werden (Abb. 4.10 C, Säulendiagramme 3, 5 und 6). Bei Bestrahlung primärer humaner Keratinozyten zeigte sich eine 1,5-fache Induktion der mRNA von NFAT5 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 4.10 D, Diagramm 3). Die insgesamt größten Zunahmen der Expression nach UVB-Bestrahlung zeigten jedoch die kurze NFATc1-Isoform NFATc1/αA und NFATc2.

In HaCaT-Zellen wurde die Expression der mRNA von NFATc2 am stärksten induziert, mit durchschnittlich zwei-fach bzw. drei-fach höheren Werten als NFATc1/αA bzw. NFAT5. Nach 10mJ UV/cm²-Dosis und 30 min Inkubation mit Ionomycin war der höchste detektierbare Wert für NFATc2 im Vergleich zur Kontrolle 13-fach und für NFATc1/αA 7-fach erhöht (Abb. 4.10 C, Diagramm 5). Die niedrigsten durchschnittlichen Werte mit einer fold induction von ca. 1,4 zeigte die Expression von NFATc1/βC.

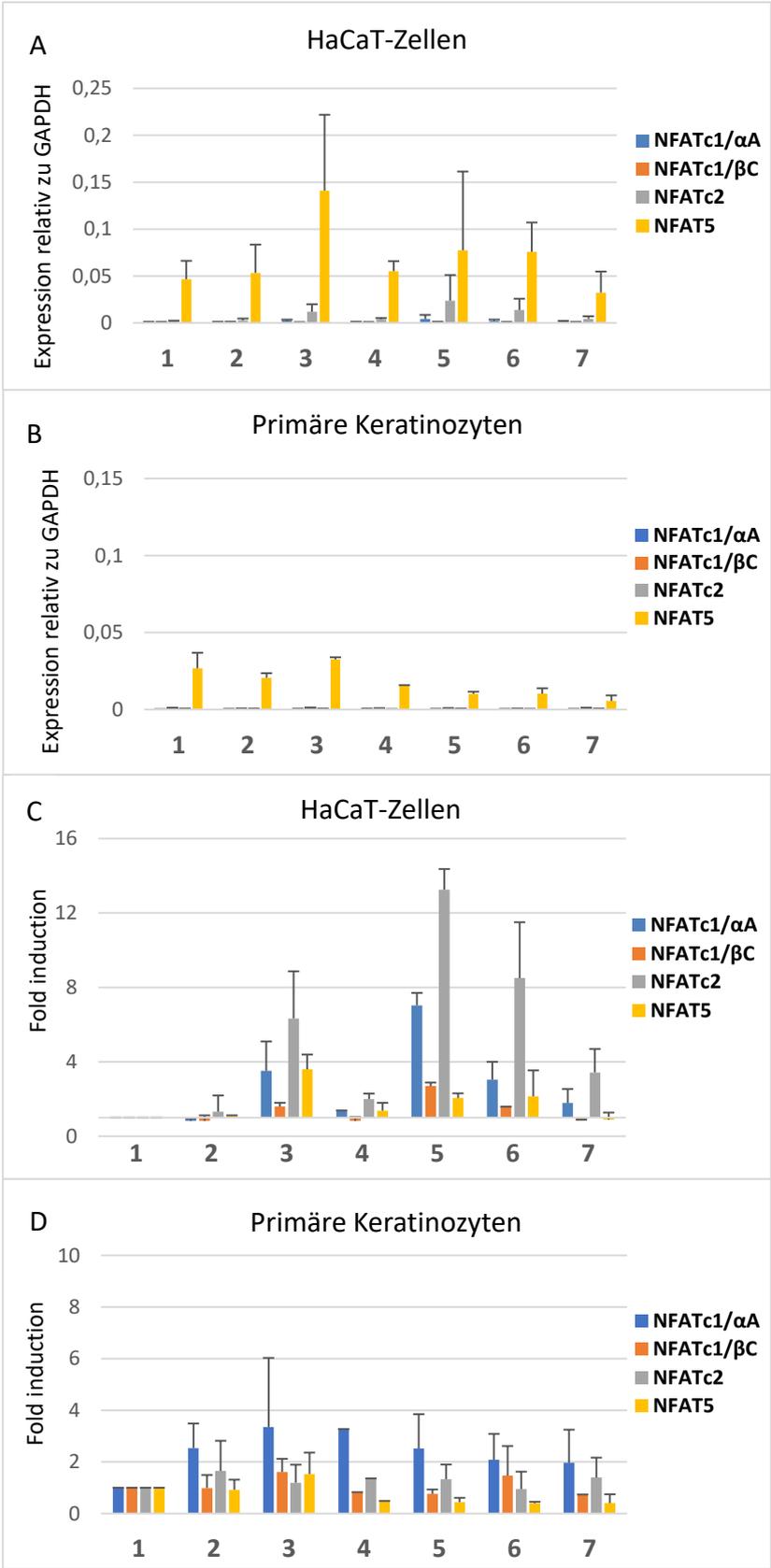


Abbildung 4.10:
Analyse der NFAT-Expression nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten. qRT-PCR Daten der mRNA von HaCaT-Zellen und primären humanen Keratinozyten. Der Mittelwert \pm SD des $2^{-\Delta Ct}$ -Wertes bezogen auf GAPDH und der Mittelwert \pm SD der, fold induction'-Werte sind dargestellt. Die Zellen wurden jeweils mit einer UV-Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm² bestrahlt und anschließend entweder 30, 60 oder 90 min mit 0,1 μ M/ml Ionomycin (I+) (1mM) bei 37°C inkubiert (n=3).

HaCaT-Zellen/ primäre humane Keratinozyten

- 1 Kontrolle
- 2 1mJ UV/cm², 30min I+
- 3 1mJ UV/cm², 60min I+
- 4 1mJ UV/cm², 90min I+
- 5 10mJ UV/cm², 30min I+
- 6 10mJ UV/cm², 60min I+
- 7 10mJ UV/cm², 90min I+

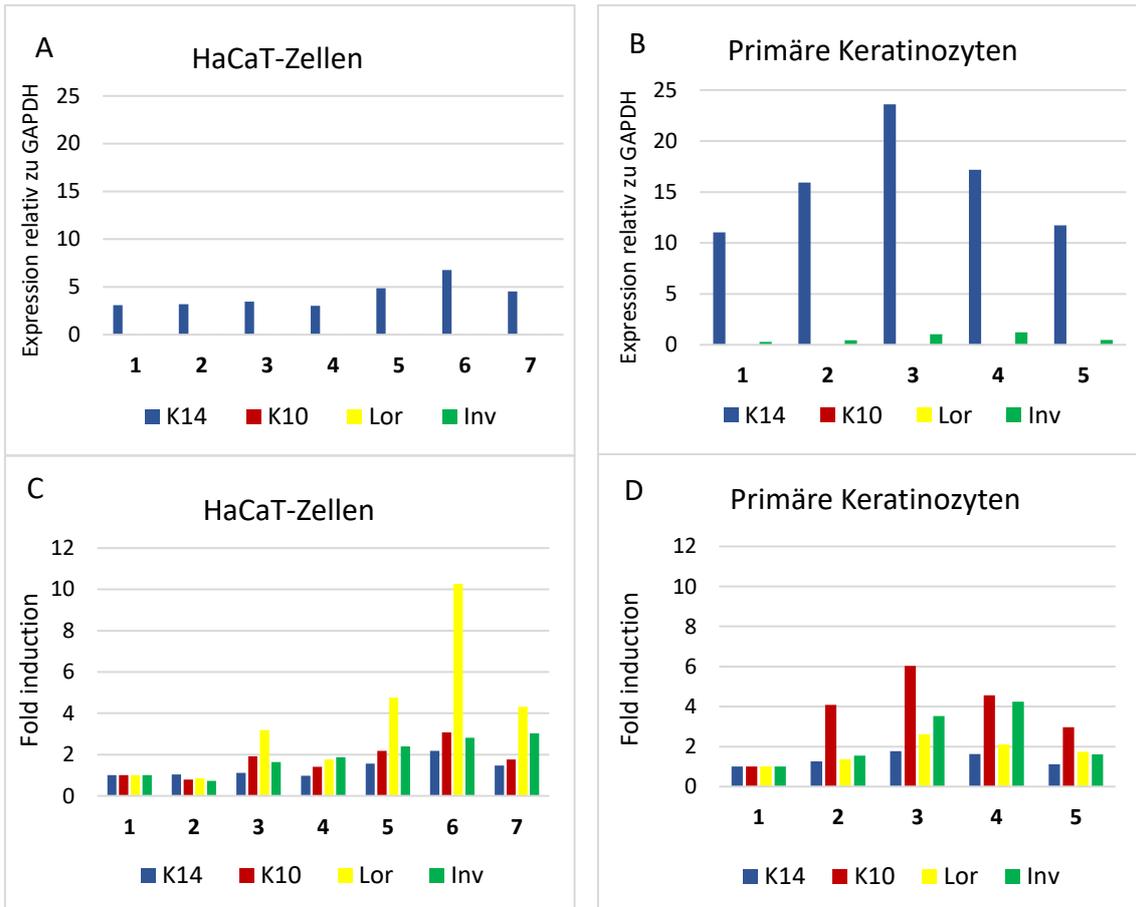
In primären humanen Keratinozyten war die größte Zunahme der Expression für NFATc1/ α A mit einer durchschnittlichen ca. 2,6-fachen 'fold induction' (Abb. 4.10 D, blau) und somit mit einer durchschnittlich zwei-fach bzw. dreieinhalb-fach stärkeren Induktion als NFATc2 bzw. NFAT5 detektierbar. Höchstwerte von NFATc1/ α A zeigten sich in Spalte 3 und 4 mit einer drei-fachen Expressionszunahme im Vergleich zur Kontrolle. Auf die Expression von NFATc1/ β C hatte die Bestrahlung mit UVB-Licht bei einem durchschnittlichen Wert von 1,1 die geringste Auswirkung.

Insgesamt hatten UVB-Strahlen sowohl in HaCaT-Zellen als auch in primären humanen Keratinozyten einen stimulierenden Einfluss auf die Expression von NFAT-Faktoren, mit unterschiedlich starker Induktion von NFATc1/ α A, NFATc1/ β C, NFATc2 bzw. NFAT5.

4.2.2.2 Einfluss von UVB-Licht auf Keratinozyten-spezifische Differenzierungsmarker

Die Corneozyten des Stratum corneum der Haut absorbieren UV-Strahlen und verhindern das tiefere Eindringen der Strahlen zu aktiven Keratinozyten subcornealer Zellschichten [66]. Für den Lichtschutz der Hautzellen scheint dabei das Strukturprotein Loricrin eine entscheidende Rolle zu spielen [67]. Für ein besseres Verständnis für die Auswirkung von UV-Strahlen auf Keratinozyten-spezifische Proteine wurde die Expression der Differenzierungsmarker Keratin 14 und 10, Loricrin bzw. Involucrin nach UVB-Bestrahlung der Keratinozyten mittels qRT-PCR-Assays analysiert.

HaCaT-Zellen wurden - wie unter 4.2.2.1 beschrieben - stimuliert. Primäre humane Keratinozyten wurden auch mit 1 bzw. 10 mJ/cm² UV-Dosis behandelt, aber statt 90 nur 30 bzw. 60 min in 'low-calcium medium' mit 0,1 μ M/ml Ionomycin (1mM) inkubiert. Wie bei den Differenzierungsexperimenten von 4.2.1.2 detektiert wurde auch hier die mRNA von Keratin 14 insgesamt am häufigsten in Keratinozyten exprimiert (Abb. 4.11). Gleichzeitig waren die K14-Expressionslevel in primären Keratinozyten im Schnitt 3-mal höher als in HaCaT-Zellen und somit dem Expressionsunterschied von 4.3.1 entsprechend (Abb. 4.11 A/B). Keratin 14 wurde in primären Keratinozyten durchschnittlich siebzig-fach bzw. in HaCaT-Zellen sogar fast tausend-fach häufiger induziert als Keratin 10, Loricrin bzw. Involucrin.



HaCaT-Zellen

- 1 Kontrolle
- 2 1mJ UV/cm², 30min I+
- 3 1mJ UV/cm², 60min I+
- 4 1mJ UV/cm², 90min I+
- 5 10mJ UV/cm², 30min I+
- 6 10mJ UV/cm², 60min I+
- 7 10mJ UV/cm², 90min I+

Primäre Keratinozyten

- 1 Kontrolle
- 2 1mJ UV/cm², 30min I+
- 3 1mJ UV/cm², 60min I+
- 4 10mJ UV/cm², 30min I+
- 5 10mJ UV/cm², 60min I+

Abbildung 4.11: Untersuchungen zur Expression von Differenzierungsmarkern in kultivierten Keratinozyten nach UV-Bestrahlung. qRT-PCR Daten der mRNA von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten. HaCaT-Zellen wurden jeweils mit einer UV-Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm² bestrahlt und anschließend 30, 60 oder 90 min mit 0,1 µM/ml Ionomycin (1mM) bei 37 °C inkubiert. Die primären Keratinozyten wurden mit einer UV-Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm² bestrahlt und danach 30 oder 60 min mit 0,1 µM/ml Ionomycin (1mM) inkubiert (n=1).

Nach Bestrahlung mit UVB-Licht konnte insgesamt sowohl in primären Hautzellen als auch in der Keratinozyten-Zelllinie eine Zunahme der Expression aller Differenzierungsmarker mit unterschiedlich starker Induktion der mRNAs detektiert

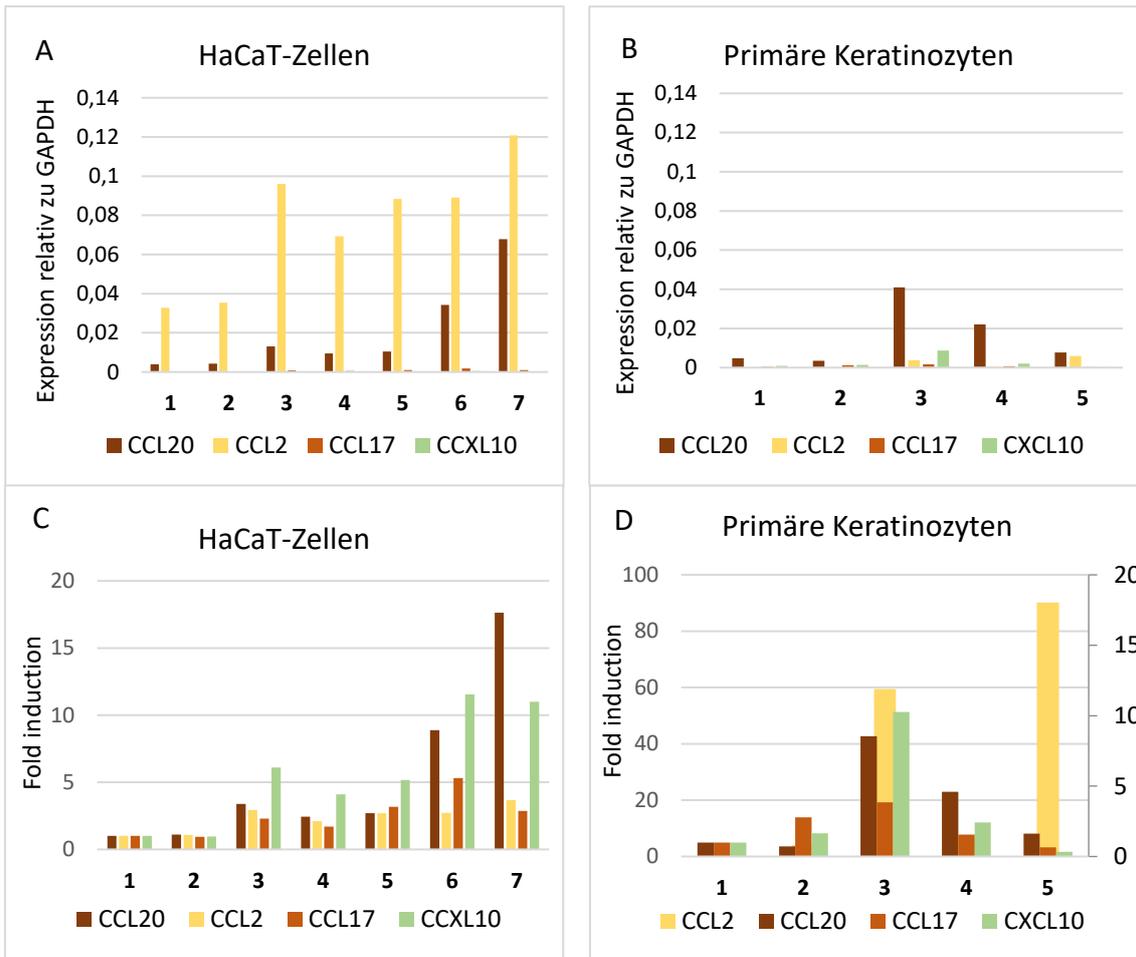
werden. Die geringste Veränderung nach UV-Strahlung zeigte jedoch Keratin 14, trotz generell hoher Expressionslevels, mit einer im Schnitt 1,4- bzw. 1,2-fachen 'fold induction' in HaCaT-Zellen bzw. primären Keratinozyten (Abb. 4.11 C/D).

Die größte Zunahme der Werte durch UVB-Licht zeigten in primären Keratinozyten Keratin 10 und Involucrin. Keratin 10 ist im Schnitt vier-fach angestiegen, während Involucrin drei-fach induziert wurde. Der Höchstwert von Keratin 10 zeigte sich nach einer UV-Dosis von 1mJ UV/cm² und 60 min Ionomycin-Behandlung, mit einer 6-fachen 'fold induction' im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.11 D, Diagramm 3).

Involucrin wurde mit einem Wert von 4-fach nach 10mJ UV/cm² Bestrahlung und 30 min Ionomycin-Behandlung am stärksten exprimiert. Die Werte von Loricirin sind mit einer durchschnittlichen zwei-fachen Zunahme der Expression eineinhalb bis zwei-fach schwächer als K10 und Inv angestiegen. UVB-Behandlung übt somit nicht nur einen stimulierenden Effekt auf die Expression von Loricirin sondern auch auf die Expression weiterer Keratinozyten-spezifischer Proteine subcornealer Zellschichten aus.

4.2.2.3 Änderung der Chemokinexpression durch UVB-Licht

Um die Funktion proinflammatorischer Mediatoren bei UVB-induzierten Entzündungskaskaden besser zu verstehen, wurde die Änderung der Expression der Chemokine CCL20, CCL2, CCL17 und CXCL10 nach UVB-Bestrahlung analysiert. Die Zellen wurden, wie unter 4.2.2.1 beschrieben, bestrahlt und die qRT-PCR-Daten sind in Abb. 4.12 dargestellt. In HaCaT-Zellen wurde die mRNA von CCL2 am häufigsten exprimiert und somit fast viermal stärker als das zweithäufigste Chemokin CCL20. Die mRNAs von CCL17 bzw. CXCL10 wurden gering exprimiert, mit im Schnitt hundertfünfzig-fach niedrigeren Messwerten (Abb. 4.12 A). Am stärksten wurden jedoch CCL20 bzw. CXCL10 mit durchschnittlichen 6- bzw. 6,5-fachen Werten nach UVB-Strahlung induziert. Höchstwerte zeigten beide Chemokine nach einer Dosis von 10 mJ UV/cm². Die Werte von CCL20 bzw. CXCL10 sind im Vergleich zur Kontrolle achtzehn- bzw. zwölf-fach angestiegen (Abb. 4.12 C, Spalten 6+7). Die Chemokine CCL2 und CCL17 wurden durch UV-Bestrahlung ebenfalls induziert, mit durchschnittlicher 'fold induction' von 2,5- bzw. 2,7-fach (Abb. C).



HaCaT-Zellen

- 1 Kontrolle
- 2 1mJ UV/cm², 30min I+
- 3 1mJ UV/cm², 60min I+
- 4 1mJ UV/cm², 90min I+
- 5 10mJ UV/cm², 30min I+
- 6 10mJ UV/cm², 60min I+
- 7 10mJ UV/cm², 90min I+

Primäre Keratinozyten

- 1 Kontrolle
- 2 1mJ UV/cm², 30min I+
- 3 1mJ UV/cm², 60min I+
- 4 10mJ UV/cm², 30min I+
- 5 10mJ UV/cm², 60min I+

Abbildung 4.12: Analyse der Chemokin-Expression nach UVB-Bestrahlung. qRT-PCR Daten der mRNA von HaCaT-Zellen (A+C) und primären Keratinozyten (B+D) HaCaT-Zellen wurden jeweils mit einer UV-Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm² bestrahlt und anschließend 30, 60 oder 90 min mit 0,1 µM/ml Ionomycin (1mM) bei 37 °C inkubiert. Die primären Keratinozyten wurden mit einer UV-Dosis von 1 bzw. 10 mJ/cm² bestrahlt und danach 30 oder 60 min mit 0,1 µM/ml Ionomycin (1mM) inkubiert (n=1).

Auch in primären humanen Keratinozyten zeigte sich ein Effekt der UVB-Bestrahlung auf die Expression von Chemokinen. Im Gegensatz zu HaCaT-Zellen wurde in primären

Keratinocyten die mRNA von CCL20 am häufigsten exprimiert. Für die anderen Faktoren zeigten sich sehr niedrige Expressionslevels, mit höchsten Werten für die Expression von CXCL10 (Abb. 4.12 B). Die mRNA von CCL2 wurde in Zellen der Kontrolle nur sehr gering exprimiert, durch UV-Strahlung aber leicht induziert, wodurch sich die hohen 'fold induction'-Werte von 60 bzw. 90 in primären Keratinocyten erklären lassen (Abb. 4.12 D, Spalten 3+5). Vergleichbar mit HaCaT-Zellen wurde CXCL10 durch UV-Strahlung am stärksten induziert und zeigte nach 1mJ UV/cm² und 60min I+ einen Höchstwert von 10 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.12 D, Spalte 3). Mit durchschnittlicher 'fold induction' von ca. 3,9 bzw. 3,7 wurden dabei die Expression von CCL20 bzw. CXCL10 nahezu gleich stark erhöht. Die geringste Zunahme durch UVB-Licht war für die mRNA von CCL17 mit im Vergleich zur Kontrolle zwei-facher Induktion messbar.

Zusammengenommen ließ sich in den untersuchten Keratinocyten eine durch UV-Licht induzierbare Expression von Chemokinen feststellen, mit dem stärksten Anstieg der Messwerte für CXCL10 und CCL20 in HaCaT-Zellen bzw. CCL2 in primären Keratinocyten.

5 Diskussion

5.1 NFAT-Expression in Lymphozyten: KT12-Zellen als Testzellen für NK-Zellen

Der erste Teil meiner experimentellen Arbeit widmete sich der Frage, welche Rolle individuelle NFAT-Transkriptionsfaktoren in Lymphozyten - insbesondere in natürlichen Killerzellen - spielen. Hierfür wurden NK-Zellen entsprechende KT12-Hybridoma-Zellen mit NFATc1/ α A- bzw. NFATc1/ β C- und NFATc2- exprimierenden Vektoren transfiziert und der Einfluss dieser auf die Lymphokinsynthese bzw. Apoptoserate von NK-Zellen untersucht. Ein besonderes Interesse galt hierbei den funktionellen Unterschieden bei Überexpression der NFATc1-Isoformen NFATc1/ α A bzw. NFATc1/ β C und NFATc2 im Vergleich. Das kurze NFATc1-Protein NFATc1/ α A unterscheidet sich nicht nur strukturell sondern auch funktionell von zahlreichen, wenn nicht sogar allen anderen NFAT-Proteinen [28]. Unter anderem ist die schnell induzierbare, starke Expression von NFATc1/ α A in aktivierten Zellen eine Besonderheit: Bei einer auf die Primärstimulation folgenden, wiederholten Stimulation von T-Lymphozyten erfolgt durch autoreaktive Rückkopplung die Translokation bereits bestehender NFATc1-Moleküle in den Kern sowie eine starke Aktivierung von Zielgenen wie *NFATc1* und *IL-2* [19]. Die Akkumulation der dabei gebildeten Isoform NFATc1/ α A ist für die Zytokinproduktion als Effektorfunktion sowie für die Proliferation bzw. das Überleben aktivierter Zellen verantwortlich: In T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die starke Induktion von NFATc1/ α A nicht zu einer Zunahme der Apoptoserate von B- und T-Lymphozyten führt, während NFATc2- und NFATc1/ β C-Proteine – im deutlichen Gegensatz zu NFATc1/ α A – eine proapoptotische Wirkung ausüben [27]. NFATc-Faktoren scheinen auch bei der Entstehung lymphoider und anderer bösartiger Erkrankungen eine Doppelfunktion auszuüben [28]: Während die konstitutive NFATc2-Aktivierung den Zellzyklus-Stillstand und die Apoptose induzierte, führte die konstitutive Überexpression von NFATc1/ α A zur Zunahme von Proliferation und maligner Zelltransformation von Fibroblasten [68]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NFATc2 als Tumorsuppressor und NFATc1/ α A als Onkogen fungieren. Ob einzelne NFAT-Faktoren neben ihrer Wirkung auf T- und B- Lymphozyten auch in NK-Zellen unterschiedliche Funktionen ausüben, konnte allerdings mit unseren Experimenten nicht abschließend geklärt werden. Die KT12-Testzellen in unserer

Versuchsreihe fielen durch eine geringe Fähigkeit zur Zytokin-Produktion auf, wohingegen allgemein NK-Zellen durch die Sekretion großer Mengen an Lymphokinen charakterisiert sind [53–55]. Erwiesenermaßen können KT12-Hybridoma-Zellen wie T-Zellen mittels anti-CD3-Antikörpern bzw. TPA/Ionomycin zur Proliferation stimuliert werden [47]. Nach Stimulation der Zellen mit TPA/Ionomycin bzw. α CD3/28-Antikörpern konnte allerdings keine veränderte Expression von NFAT-Proteinen auf Proteinebene festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich auch die Apoptoserate der Zellen von der Überexpression von NFATc-Proteinen bzw. von unterschiedlichen Stimulationsbedingungen unabhängig. Insgesamt lässt sich daher vermuten, dass die gewählten KT12-Hybridoma-Zellen als Testzellen für die Über-Expression von NFATc-Proteinen in NK-Zellen ungeeignet waren und die Experimente - einschließlich der Transfektion mit NFATc- exprimierenden Vektoren - mit anderen Testzellen, vor allem mit primären T-Lymphozyten - wiederholt werden sollten.

5.2 NFAT-Expression in Keratinozyten

Der zweite Teil meiner Arbeit galt der Analyse individueller NFAT-Transkriptionsfaktoren in Keratinozyten und der Rolle, die diese einerseits im Differenzierungsprozess der Epidermis und andererseits bei der Antwort auf UVB-Strahlen spielen. Die Analyse Keratinozyten-spezifischer Differenzierungsmarker erfolgte dabei als Kontrolle für den Differenzierungszustand der Zellen. Des Weiteren wurde die Chemokinexpression im Zuge der Keratinisierung und der UV-Antwort von Keratinozyten untersucht, um zu verstehen, ob bzw. welche Chemokine bei diesen Prozessen für das Wechselspiel zwischen Haut und Immunsystem eine Rolle spielen.

5.2.1 Die Rolle individueller NFAT-Faktoren bei der Keratinozytendifferenzierung

Bei der Differenzierung von Keratinozyten zu Korneozyten, welche den Körper vor Umwelteinflüssen schützen, spielen Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle. Während die Proliferation der basalen Keratinozyten in der Epidermis nahezu ohne Ca^{2+} vonstattengeht, nimmt die Konzentration von Ca^{2+} mit der Differenzierung der basalen Keratinozyten zu den suprabasalen Keratinozyten der Strata spinosum und granulosum

graduell zu. Daher liegt die Vermutung nahe, dass NFAT-Faktoren, deren Expression und Aktivität durch die Ca^{2+} -Calcineurin-Kaskade reguliert werden, bei der Differenzierung der Epidermis eine besondere Rolle spielen [61]. In einer Studie von Al-Daraji et al. (2002) wurde dabei erstmals mittels Konfokalmikroskopie in gesunder Haut bzw. bei Psoriasis die nukleäre Translokation von NFATc2 in humanen Keratinozyten durch TPA/Ionomycin bzw. erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentrationen nachgewiesen und die mRNA von NFATc1, -c3 und -c4 in kultivierten humanen Keratinozyten detektiert (nicht publizierte Beobachtung von Al-Daraji et al. (2002)). Die Expression des NFAT5-mRNA-Proteins konnte ebenfalls in kultivierten Keratinozyten nachgewiesen werden [38]. In unseren Experimenten wurde die Transkription aller bekannten NFAT-Faktoren im Zuge der Keratinozytendifferenzierung untersucht. Für die Faktoren NFATc3 und -c4 ließen sich nur sehr geringe Werte messen, was sich möglicherweise auf die Wahl der Primer für die qRT-PCR-Assays zurückführen lässt, da die Expression dieser Faktoren in Keratinozyten bereits in anderen Studien beschrieben wurde [61, 69, 70]. Erstaunlicherweise ließ sich in Keratinozyten generell eine insgesamt deutlich häufigere Transkription der mRNA von NFAT5 im Vergleich zu anderen NFAT-Faktoren detektieren, was die Frage nach einer besonderen Rolle von NFAT5 in Keratinozyten aufwirft. Auch lässt die Zunahme der Transkription von NFAT5 durch TPA/I und Ca^{2+} bzw. Ca^{2+} /I den Schluss zu, dass NFAT5 Regulationsmechanismen beeinflusst, die eine entscheidende Rolle in der terminalen Differenzierung von Keratinozyten zu Korneozyten spielen. Unsere Daten zeigen zudem auf transkriptioneller Ebene, dass neben NFAT5 auch NFATc1 bzw. -c2 zum Differenzierungsprozess beitragen könnten. Die durch Differenzierungsstimuli ausgelöste stärkere Induktion der kurzen Isoform NFATc1/ α A - verglichen mit der längeren Isoform NFATc1/ β C - könnte an der positiven Autoregulation des kurzen NFATc1-Proteins nach Aktivierung liegen, die in T- und B-Lymphozyten beschrieben wurde [27, 28]. Diese Beobachtung führt zu der Frage nach unterschiedlichen Funktionen verschiedener NFATc1-Isoformen im Verhornungsprozess. Von Al-Daraji et al. (2009) wurde eine unterschiedliche Kinetik der nukleären Translokation für NFATc1 bzw. -c2 bei Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -konzentration bzw. nach Stimulation mit TPA/I in humanen Keratinozyten gezeigt. In

dieser Studie wurde ein vom Differenzierungszustand der Zellen abhängiges Expressionsmuster der NFAT-Familienmitglieder detektiert. Dieser Umstand kann als Einflussnahme verschiedener NFAT-Proteine auf das zeitliche bzw. räumliche Muster der Genexpression während der Keratinozyten-Differenzierung gedeutet werden. Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass NFATc1 – und besonders NFATc1/ α A - bzw. NFATc2 und NFAT5 im Prozess der Hautdifferenzierung involviert sind und NFAT5 aufgrund hoher Expressionslevels eine besondere Rolle in Keratinozyten zu spielen scheint. Um die genaue Funktion einzelner NFAT-Faktoren bzw. individueller NFATc1-Isoformen besser zu verstehen und eventuell daraus einen therapeutischen Nutzen für Hauterkrankungen ziehen zu können, sollten weitere Untersuchungen einzelner NFAT-Faktoren bei humanen Hauterkrankungen erfolgen.

5.2.2 Einfluss von UVB-Licht auf die NFAT-Expression in Keratinozyten

HaCaT-Zellen und primäre humane Keratinozyten wurden mit UVB-Licht bestrahlt, um die Rolle individueller NFAT-Faktoren in Keratinozyten generell und bei der Antwort auf UV-Strahlen besser zu verstehen. Bei Säugetieren werden im Rahmen einer gezielten 'UV-Antwort' in Reaktion auf UV-Licht Signalkaskaden initiiert, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie p53, AP-1 und NF- κ B führen und dem Schutz der Zellen vor UV-Strahleneinwirkung dienen [71]. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch UV-getriggerte DNA-Schäden induziert die FasL-vermittelte Apoptose von Keratinozyten und kann so in den meisten Fällen die maligne Entartung von Säugetierzellen verhindern [40, 72, 73]. UV-Strahlen können über Calcium-abhängige Wege innerhalb von Minuten die Phosphatase Calcineurin in Keratinozyten aktivieren, wodurch NFATc-Proteine stark induziert werden. Huang et al. (2000) postulierte daher, dass die Aktivierung von NFAT Teil der 'UV-Antwort' von Keratinozyten sei.

Für die Funktion von NFAT in diesem Kontext gibt es allerdings widersprüchliche Berichte. Einerseits wird NFAT eine Rolle bei der UV-Strahlen-induzierten Entzündung bzw. Tumorpromotion durch eine u.a. NFAT-vermittelte Expression von inflammatorischen Zytokinen zugeschrieben [71]. Andererseits wurde für die Langzeitbehandlung von Organtransplantierten mit den beiden Immunsuppressiva

Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506), die Calcineurin und somit die Aktivierung von NFAT inhibieren, ein erhöhtes Hautkrebsrisiko gezeigt [74]. Gleichzeitig wurde nach UVB-Bestrahlung in mit Calcineurin-Hemmern vorbehandelten Hautzellen bzw. in künstlichen Hautmodellen eine Beeinträchtigung der DNA-Reparatur und Apoptose von Keratinozyten nachgewiesen [75, 76]. Die Inkonsistenz dieser Befunde wird von Shou et al. (2015) darauf zurückgeführt, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche primäre NFAT-Faktoren mit jeweils unterschiedlichen funktionellen Bedeutungen exprimieren [77]. In den Versuchen dieser Arbeit wurde die Transkription der Faktoren NFATc1 - NFATc1/ α A und NFATc1/ β C - bzw. NFATc2 und NFAT5 nach Bestrahlung von Keratinozyten mittels qRT-PCR Assays analysiert. Für alle untersuchten NFAT-Faktoren war in Abhängigkeit von der jeweiligen UV-Dosis eine Zunahme der Transkription detektierbar, was für die Beteiligung von NFAT-Faktoren an der UV-Antwort spricht. In primären Keratinozyten wurde NFATc1/ α A insgesamt am stärksten induziert, während in HaCaT-Zellen NFATc2 die stärkste quantitative Zunahme durch UVB-Strahlen aufwies. Für NFATc1 wurde von Flockhart et al. (2008) die nukleäre Translokation nach UV-Bestrahlung mittels indirekter Immunfluoreszenz-/Konfokalmikroskopie in HaCaT-Zellen beschrieben. Meine Experimente bestätigen somit die Aktivierung von NFATc1 durch UVB-Licht auf transkriptioneller Ebene und zeigen zusätzlich erstmalig die starke Induktion der kurzen NFATc1-Isoform NFATc1/ α A im Vergleich zu NFATc1/ β C und anderen Faktoren. Dies kann auf eine besondere Rolle des kurzen NFATc1-Proteins bei der UV-Antwort von Keratinozyten hinweisen: möglicherweise weicht die Funktion von NFATc1/ α A nicht nur in Lymphozyten [27, 28] sondern auch in Keratinozyten von anderen NFAT-Proteinen ab. Das kurze NFATc1-Protein könnte die Apoptose von Keratinozyten im Rahmen der UV-Antwort beeinflussen, indem es, wie in Lymphozyten auch in Keratinozyten antiapoptotisch wirkt.

Neben der Induktion von NFATc1 durch UVB-Licht konnte in unseren Experimenten auch jene von NFATc2 detektiert werden, während in der Studie von Flockhart et al. (2008) keine anderen untersuchten NFATc-Proteine - außer NFATc1 - eine Änderung der Kernlokalisierung nach UV-Strahlen zeigten. In keiner weiteren Studie ist bis dato die

Aktivierung von NFATc2 durch UVB-Licht untersucht bzw. detektiert worden, so dass unsere qRT-PCR-Daten die Induktion von NFATc2 erstmalig zeigen.

Gleichzeitig ließ sich bei unseren Versuchen die Zunahme der Expression des Transkriptionsfaktors NFAT5 nach UVB-Bestrahlung messen. Auch von Al-Daraji et al. (2009) konnte *in vivo* (in Hautbiopsien) ein Effekt von UVB-Strahlen auf NFAT5 beschrieben werden: es fiel eine Abnahme der Kernlokalisierung von NFAT5 durch UVB-Bestrahlung auf, wobei NFAT5 im Gegensatz zu NFATc-Proteinen vorwiegend im Nukleus von Keratinozyten lokalisiert und der Exportmechanismus hierfür noch unklar sei. Somit bestätigen unsere Daten, dass der Faktor NFAT5 neben NFATc1 bzw. -c2 an der UV-Antwort von Keratinozyten beteiligt ist. Zusammenfassend deuten unsere qRT-PCR-Daten darauf hin, dass NFAT-Faktoren in primären humanen Keratinozyten bzw. in HaCaT-Zellen durch UVB-Licht induziert werden. Sie zeigen des Weiteren, dass die Transkription der kurzen NFATc1/ α A-Isoform und die von NFATc2 durch UVB-Strahlen deutlich verstärkt wird. Welche Funktion einzelne NFAT-Faktoren in Keratinozyten ausüben und welche Gene von ihnen reguliert werden ist jedoch größtenteils unklar. Es gibt publizierte Daten, die darauf hinweisen, dass die antiapoptotische bzw. prokarzinogene Funktion der Cyclooxygenase COX-2 in Antwort auf UV-Strahlen zum Teil durch vorgeschaltete NFAT-Signale vermittelt wird [78]. Weitere Untersuchungen zu NFAT-Signalwegen und zu einzelnen NFAT-Faktoren bzw. NFATc1-Isoformen als Reaktion auf UV-Strahlung könnten sich daher im Kontext der epidermalen Karzinogenese als zielführend erweisen.

5.2.3 Expression Keratinozyten-spezifischer Proteine

Neben der Expression von NFAT-Faktoren wurde die Transkription von Keratinozyten-spezifischen Proteinen mittels qRT-PCR analysiert, um den Differenzierungszustand der Zellen zu überprüfen und gleichzeitig die Auswirkung von UVB-Strahlung auf den Keratinisierungsprozess besser zu verstehen. Die höchsten Expressionslevel konnten, wie erwartet, für K14 gemessen werden, da K5 bzw. K14 die prominentesten Keratine basaler Keratinozyten darstellen. Ihre Expression wird in suprabasalen Keratinozyten durch die Expression von K1 bzw. K10 in der interfollikulären Epidermis von Säugetieren

„abgelöst“ [79]. K5/K14 werden bei Eintritt der Zellen in das terminale Differenzierungsprogramm durch das Keratinpaar K1/K10 in postmitotischen und suprabasalen Zellen ersetzt [80]. Daher kann die Abnahme der Expression von K14 durch Differenzierungsstimuli wie TPA/I, Ca²⁺ bzw. Ca²⁺/I in unseren Versuchen als Hinweis für die ablaufende Differenzierung der Zellen gewertet werden. Auch der Anstieg der Gentranskription von K10, Loricrin und Involucrin - Proteinen, die für suprabasale Zellschichten der Epidermis typisch sind, bestätigt zusätzlich zu lichtmikroskopischen Merkmalen die Induktion der Differenzierung von Keratinozyten in unseren Experimenten. Für die Zunahme bzw. Abnahme der Expression epidermaler Strukturproteine nach Exposition der Haut gegenüber ultraviolettem Licht gibt es inkonsistente Befunde, die von Moravcová et al. (2013) auf Unterschiede einzelner Studien bezüglich der UVB-Quelle, der UV-Dosis und dem jeweils angewandten biologischen Modell zurückgeführt wurden. In unseren Experimenten zeigte sich eine für alle untersuchten Proteine von der UV-Dosis abhängige Zunahme der Transkription, besonders für K10, Involucrin bzw. Loricrin, aber auch für K14. Von Smith und Rees (1994) konnte in humanen Hautbiopsien gezeigt werden, dass UVB-Strahlen die mRNA-Spiegel von K5/K14- und K1/K10-Keratinpaaren in basalen bzw. suprabasalen Zellschichten erhöhen [81]. Zudem ist K10 nachweislich an der Hemmung des Zellzyklus-Eintritts beteiligt [82], sodass K10 eventuell durch die Begrenzung der Zellproliferation die UV-Antwort von Keratinozyten reguliert. Auch für Involucrin ist eine nach UV-Bestrahlung bzw. in sonnenexponierter Haut auftretende erhöhte Expression beschrieben worden [83]. Für das Strukturprotein Loricrin des stratum corneum wurde ebenfalls eine Rolle beim UV-Schutz tieferer Zellschichten der Epidermis beschrieben [67]. Insgesamt lässt sich daher vermuten, dass der Differenzierungsprozess von Keratinozyten *in vitro* durch UVB-Strahlen stark beeinflusst wird. Die terminale Differenzierung von Keratinozyten scheint somit ein Teil der UV-Antwort der Epidermis zu sein. Dies lässt sich dadurch erklären, dass *in vivo* meist die Dicke des stratum corneum nach UV-Exposition zunimmt, um Schutz vor weiteren UV-induzierten Schäden zu bieten bzw. proliferative basale Keratinozyten abzuschirmen [84, 85]. Die speziellen molekularen Mechanismen, welche nach UVB-Bestrahlung die Keratin-Genexpression

modulieren, sind allerdings noch unklar und müssten für ein besseres Verständnis des Differenzierungsprogrammes von Keratinozyten in weiteren Studien genauer untersucht werden.

5.2.4 Chemokinexpression

Um das Wechselspiel zwischen Immunsystem und Haut im Zuge des epidermalen Verhornungsprozesses sowie nach UVB-Exposition besser zu verstehen, wurde die Chemokinexpression von Keratinozyten auf transkriptioneller Ebene untersucht. Je nach Struktur werden Chemokine der CXC-, CC-, C- bzw. CX3C- Untergruppe zugeordnet, deren Funktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird. Keratinozyten sezernieren hauptsächlich Chemokine der CXC- bzw. CC- Familie, welche beispielsweise nach UVB-Strahlung Leukozyten aus dem Blutkreislauf zum Entzündungsherd rekrutieren können [86].

In unseren Differenzierungsexperimenten und bei Bestrahlung mit UVB-Licht konnte besonders die Induktion des Chemokins CXCL10 detektiert werden. CXCL10 ist ein durch IFN γ induzierbares Chemokin, welches an den CXCR3 Rezeptor verschiedener Zelltypen bindet [87]. Die Aktivierung des CXCR3 Rezeptors „lockt“ Immunzellen an Orte mit IFN γ -vermittelten Entzündungen und ist mit einer Vielzahl von Hauterkrankungen assoziiert. Rauschenberger et al. konnten (2019) durch Ko-Kultivierung von Keratinozyten mit T-Zellen zeigen, dass T-Zellen durch die Sekretion von IFN γ modulierend auf die Produktion von Chemokinen, wie CXCL10, in Keratinozyten einwirken. NFAT Faktoren spielen dabei insofern eine Rolle, als dass *in vivo* die Synthese von IFN γ der Kontrolle von NFATc1 und NFATc2 in aktivierten CD8⁺ T-Zellen und in zytotoxischen Zellen obliegt [88]. Da T-Zellen massive Veränderungen in der Genexpression von Keratinozyten bewirken, muss das Wechselspiel von Haut und Immunsystem fein ausbalanciert sein, um die Entstehung autoimmuner Hautkrankheiten zu vermeiden [89]. Neben der Transkription von CXCL10 wurde in primären Keratinozyten (unserer Versuche) auch jene der Chemokine CCL20, CCL2 und CCL17 durch UVB-Strahlen bzw. in HaCaT-Zellen auch zusätzlich durch Differenzierungsstimuli induziert. Die Produktion von CCL20 ist dabei vom Differenzierungsstatus der Zellen abhängig: CCL20 wird hauptsächlich von

Keratinocyten des Stratum spinosum nach Stimulation mit TNF- α produziert [90]. Nach UV-Bestrahlung oder bei kutanen Infektionen werden von Keratinocyten große Mengen an TNF- α synthetisiert, das wiederum entsprechend die Synthese von CCL20 induziert [90]. Bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen mit gestörter Barrierefunktion der Haut (wie der Psoriasis oder der atopischen Dermatitis) ist die CCL20-Expression ebenfalls gesteigert [91]. Das Chemokin CCL20 scheint somit bei der Differenzierung von Keratinocyten eine tragende Rolle zu spielen und Entzündungsreaktionen der Haut zu beeinflussen. Auch für CCL2 ist bekannt, bei Hauterkrankungen wie Psoriasis ein wichtiger Mediator zu sein [92]. Das Chemokin CCL17 wiederum spielt durch die Bindung an CCR4 Chemokinrezeptoren in Th2-Zellen bei verschiedenen allergischen Hautkrankheiten eine Rolle [93]. Insgesamt ist die Induktion der Transkription von CXCL10, CCL20, CCL2 und CCL17 durch Differenzierungsstimuli bzw. UVB-Licht, wie sie in unseren Experimenten exerziert wurde, ein indirekter Hinweis dafür, dass beim epidermalen Differenzierungsprozess und der Antwort auf UV-Strahlen die Interaktion zwischen Haut und Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Für ein besseres Verständnis des komplexen Wechselspiels zwischen Keratinocyten und Immunzellen bzw. um das Wissen um die Genese einzelner autoimmuner Hauterkrankungen zu erweitern, könnte die Durchführung weiterer Experimente, die die Interaktion zwischen Keratinocyten und Immunzellen prüfen, von großem Nutzen sein.

Generell beschreiben die Daten der qRT-PCR-Analysen meiner Experimente bei p-Werten $> 0,05$ eine Tendenz der ermittelten Genexpressionen. Zur Verifizierung statistisch relevanter Genexpressionsunterschiede müssten weitere Untersuchungen und ergänzende Versuche durchgeführt werden.

Insgesamt lassen sich die Unterschiede in der Gentranskription von HaCaT-Zellen bzw. primären humanen Keratinocyten dadurch erklären, dass HaCaT-Zellen im Vergleich zu primären Keratinocyten eine deutlich schwächere „Verhornung“ und eine weniger ausgeprägte Schichtbildung nach Calciumstimulation aufweisen [56]. Aus diesem Grund kann die Transkription von Genen, die bei der Differenzierung der Zellen eine Rolle spielen, im Vergleich zu primären Keratinocyten unterschiedlich ausfallen.

Nichtsdestotrotz ähneln HaCaT-Zellen primären Keratinozyten in ihrer Reaktion auf erhöhte Calciumspiegel und sind daher u.a. von Zamansky et al. (1991) als geeignetes *in-vitro*-Modellsystem für das Differenzierungsprogramm von Keratinozyten beschrieben worden [94].

6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NFATc1 spielt als Regulator der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Megakaryozyten in vielen immunologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Nach Aktivierung des Immunorezeptors von T- und B-Effektorzellen wird vor allem die Isoform NFATc1/ α A exprimiert, welche maßgeblich an der Zytokinproduktion sowie an der Proliferation und am Überleben aktivierter Zellen beteiligt ist [27]. Ziel der Arbeit war zunächst der Gewinn neuer Erkenntnisse über die Funktion der Isoform NFATc1/ α A (in Lymphozyten), um darüber hinaus weitere Gene, welche durch NFATc1 direkt gebunden und reguliert werden, identifizieren zu können. Hierfür wurden KT12 NK-Zellen mit NFATc1/ α A bzw. NFATc1/ β C und NFATc2- exprimierenden Vektoren transfiziert, geklont, stimuliert und anschließend auf ihre jeweilige Apoptoserate bzw. die Chemokinsynthese und -expression hin untersucht. Die gewählten KT12-Hybridomazellen erwiesen sich allerdings in ihrer intendierten Funktion als Testzellen für die Überexpression von NFATc-Proteinen in NK-Zellen als ungeeignet.

Fehlregulationen von NFAT-Signalwegen werden mit einer fehlerhaften Entwicklung des Immunsystems und mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sowie Krebs in Verbindung gebracht [22]. Um die Genese autoimmuner Hauterkrankungen und die Reaktion der Haut auf karzinogene Umwelteinflüsse wie UVB-Strahlen besser zu verstehen, erfolgte im zweiten Teil meiner Arbeit die Analyse der Rolle von NFAT-Faktoren in Keratinozyten. Unter Psoriasis, atopische Dermatitis und weiteren Krankheiten, die durch Defekte der Hautbarriere verursacht werden, leiden weltweit viele Millionen Menschen. Diese Hautkrankheiten sind mit einer fehlerhaften Differenzierung von Keratinozyten und einer überschießenden Aktivierung des Immunsystems assoziiert. In Folge einer langjährigen Vorschädigung der Haut durch UV-Licht kommt es zur Störung des regelrechten Verhornungsprozesses bis hin zur malignen Entartung einzelner Hautzellen.

In dieser Arbeit konnte die Beteiligung von NFAT-Faktoren am Differenzierungsprozess und an der UV-Antwort von Keratinozyten mittels qRT-PCR-Experimente gezeigt werden. Generell ließen sich in Keratinozyten besonders hohe Expressionslevel des

Transkriptionsfaktors NFAT5 - verglichen mit anderen NFAT-Faktoren - messen. Durch Stimulation mit Differenzierungssignalen bzw. UVB-Licht konnte tendenziell eine stärkere Induktion der kurzen NFATc1-Isoform- verglichen mit langen NFATc1-Isoformen - gemessen werden, was die Frage nach einer besonderen Funktion der kurzen NFATc1-Isoform in Keratinozyten aufwirft. Insgesamt zeigte sich der Differenzierungsprozess von Keratinozyten durch Calcium bzw. UVB-Strahlen in vitro induzierbar. Auch konnte im Zuge des Verhornungsprozesses und in Antwort auf UVB-Bestrahlung eine erhöhte Chemokintranskription als Zeichen einer Interaktion zwischen Keratinozyten und Zellen des Immunsystems detektiert werden.

Für die Entwicklung von Therapien, welche die Ursachen und Folgen einer dysregulierten Hautbarrierenbildung behandeln, sind weitere Studien notwendig. Um das Wechselspiel zwischen Haut und Immunsystem in Zukunft besser zu verstehen und kausale Therapien für Hauterkrankungen entwickeln zu können, ist es unabdingbar, das Wissen über die komplexen und dynamischen Prozesse der Haut zu vertiefen. Die Analyse der Funktion einzelner NFAT-Faktoren bzw. NFATc1-Isoformen bei der Keratinozytendifferenzierung und in Antwort auf UVB-Strahlen dürfte sich dabei als zielführend erweisen.

7 Literaturverzeichnis

1. Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 565–580.
2. Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 199–209.
3. Eckert RL, Crish JF, Robinson NA. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev.* 1997; 77: 397–424.
4. Fuchs E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl.* 1993; 17: 197–208.
5. Fuchs E. Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995; 11: 123–153.
6. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 328–340.
7. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63: 345–382.
8. Kartasova T, Roop DR, Holbrook KA, Yuspa SH. Mouse differentiation-specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network. *J Cell Biol.* 1993; 120: 1251–1261.
9. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci.* 2001; 114: 3069–3070.
10. Rousselle P, Gentilhomme E, Neveux Y. Markers of Epidermal Proliferation and Differentiation. In: Humbert P, Fanian F, Maibach HI, Agache P, eds. *Agache's Measuring the Skin.* Cham: Springer International Publishing; 2017: 407–415.
11. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell.* 1980; 19: 245–254.
12. Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol.* 1985; 84: 508–512.

13. Menon GK. Ultrastructural Localization of Calcium in Psoriatic and Normal Human Epidermis. *Arch Dermatol*. 1991; 127: 57.
14. Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K. Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol*. 2014; 24: 650–661.
15. Rao A. NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. *J Leukoc Biol*. 1995; 57: 536–542.
16. Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 7214–7219.
17. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 2538–2542.
18. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 472–484.
19. Serfling E, Chuvpilo S, Liu J, Höfer T, Palmetshofer A. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol*. 2006; 27: 461–469.
20. Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, et al. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol*. 1999; 162: 7294–7301.
21. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, et al. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2000; 1498: 1–18.
22. Müller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10: 645–656.
23. Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 810–820.
24. La Pompa JL de, Timmerman LA, Takimoto H, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature*. 1998; 392: 182–186.

25. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003; 17: 2205–2232.
26. Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell.* 2008; 132: 299–310.
27. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, et al. Autoregulation of NFATc1/A Expression Facilitates Effector T Cells to Escape from Rapid Apoptosis. *Immunity.* 2002; 16: 881–895.
28. Serfling E, Avots A, Klein-Hessling S, Rudolf R, Vaeth M, Berberich-Siebelt F. NFATc1/ α A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell Commun Signal.* 2012; 10: 16.
29. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature.* 1996; 383: 837–840.
30. Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry.* 1994; 33: 6859–6866.
31. Al-Shanti N, Stewart CE. Ca²⁺/calmodulin-dependent transcriptional pathways: potential mediators of skeletal muscle growth and development. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2009; 84: 637–652.
32. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.* 1997; 11: 824–834.
33. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, et al. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 11205–11209.
34. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature.* 1993; 365: 352–355.
35. Choo M-K, Yeo H, Zayzafoon M. NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation. *Bone.* 2009; 45: 579–589.

36. Tong EHY, Guo J-J, Huang A-L, et al. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *J Biol Chem*. 2006; 281: 23870–23879.
37. López-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF- κ B Families. *Immunity*. 2001; 15: 47–58.
38. Al-Daraji WI, Malak TT, Prescott RJ, et al. Expression, localisation and functional activation of NFAT-2 in normal human skin, psoriasis, and cultured keratocytes. *Int J Clin Exp Med*. 2009; 2: 176–192.
39. Lee SD, Colla E, Sheen MR, Na KY, Kwon HM. Multiple domains of TonEBP cooperate to stimulate transcription in response to hypertonicity. *J Biol Chem*. 2003; 278: 47571–47577.
40. Al-Daraji WI, Afolayan J, Zelger BG, Abdellaoui A, Zelger B. Modulation of NFAT-5, an outlying member of the NFAT family, in human keratinocytes and skin. *Am J Transl Res*. 2009; 1: 184–202.
41. Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 278: F1006-12.
42. Klicznik MM, Szenes-Nagy AB, Campbell DJ, Gratz IK. Taking the lead - how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. *Immunol Lett*. 2018; 200: 43–51.
43. McKenzie RC, Sauder DN. The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol*. 1990; 95: 105S-107S.
44. Lebre MC, van der Aar AMG, van Baarsen L, et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 331–341.
45. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1150–1158.
46. Nickoloff BJ, Naidu Y. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1994; 30: 535–546.
47. Makowska A, Kawano T, Taniguchi M, Cardell S. Differences in the ligand specificity between CD1d-restricted T cells with limited and diverse T-cell receptor repertoire. *Scand J Immunol*. 2000; 52: 71–79.

48. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 1982; 257: 7847–7851.
49. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol*. 1989; 143: 1283–1289.
50. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162: 156–159.
51. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1: 1559–1582.
52. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001; 25: 402–408.
53. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008; 9: 503–510.
54. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010; 115: 2167–2176.
55. Cook KD, Waggoner SN, Whitmire JK. NK cells and their ability to modulate T cells during virus infections. *Crit Rev Immunol*. 2014; 34: 359–388.
56. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988; 106: 761–771.
57. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1999; 112: 343–353.
58. van Wilson G. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2014; 1195: 33–41.
59. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest*. 2010; 120: 2619–2626.

60. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017: 7435621.
61. Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP. Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 9575–9580.
62. Zhao Y, Sudol M, Hanafusa H, Krueger J. Increased tyrosine kinase activity of c-Src during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 8298–8302.
63. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2013; 133: 303–315.
64. Sebastiani S, Albanesi C, De PO, Puddu P, Cavani A, Girolomoni G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2002; 293: 552–559.
65. Petering H, Kluthe C, Dulkys Y, et al. Characterization of the CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2001; 116: 549–555.
66. Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol.* 2005; 125: 183–200.
67. Ishitsuka Y, Roop DR. Loricrin Confers Photoprotective Function against UVB in Corneocytes. *J Invest Dermatol.* 2018; 138: 2684–2687.
68. Robbs BK, Cruz ALS, Werneck MBF, Mognol GP, Viola JPB. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol.* 2008; 28: 7168–7181.
69. Al-Daraji WI, Grant KR, Ryan K, Saxton A, Reynolds NJ. Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. *J Invest Dermatol.* 2002; 118: 779–788.
70. Mammucari C, Di Tommasi Vignano A, Sharov AA, et al. Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell.* 2005; 8: 665–676.

71. Huang C, Mattjus P, Ma WY, et al. Involvement of nuclear factor of activated T cells activation in UV response. Evidence from cell culture and transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000; 275: 9143–9149.
72. Pötter T, Göhde W, Wedemeyer N, Köhnlein W. Keratinocytes Exposed to Ultraviolet Radiation Reveal Three Down-regulated Genes with Potential Function in Differentiation and Cell Cycle Control. *Radiation Research*. 2000; 154: 151–158.
73. Panfilis G de. 'Activation-induced cell death': a special program able to preserve the homeostasis of the skin? *Exp Dermatol*. 2002; 11: 1–11.
74. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*. 1999; 397: 530–534.
75. Canning MT, Nay SL, Peña AV, Yarosh DB. Calcineurin inhibitors reduce nuclear localization of transcription factor NFAT in UV-irradiated keratinocytes and reduce DNA repair. *J Mol Histol*. 2006; 37: 285–291.
76. Yarosh DB, Pena AV, Nay SL, Canning MT, Brown DA. Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 1020–1025.
77. Shou J, Jing J, Xie J, et al. Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. *Cancer Lett*. 2015; 361: 174–184.
78. Flockhart RJ, Diffey BL, Farr PM, Lloyd J, Reynolds NJ. NFAT regulates induction of COX-2 and apoptosis of keratinocytes in response to ultraviolet radiation exposure. *FASEB J*. 2008; 22: 4218–4227.
79. Chen J, Cheng X, Merched-Sauvage M, Caulin C, Roop DR, Koch PJ. An unexpected role for keratin 10 end domains in susceptibility to skin cancer. *J Cell Sci*. 2006; 119: 5067–5076.
80. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*. 1980; 19: 1033–1042.
81. Smith MD, Rees JL. Wavelength-specific upregulation of keratin mRNA expression in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol*. 1994; 102: 433–439.
82. Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mittnacht S, Lane EB, Jorcano JL. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 3086–3094.

83. Moravcová M, Libra A, Dvořáková J, et al. Modulation of keratin 1, 10 and involucrin expression as part of the complex response of the human keratinocyte cell line HaCaT to ultraviolet radiation. *Interdiscip Toxicol.* 2013; 6: 203–208.
84. Mortensen LJ, Ravichandran S, Delouise LA. The impact of UVB exposure and differentiation state of primary keratinocytes on their interaction with quantum dots. *Nanotoxicology.* 2013; 7: 1244–1254.
85. Bertrand-Vallery V, Boilan E, Ninane N, et al. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK-4A). *Biogerontology.* 2010; 11: 167–181.
86. Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of Dermatological Science.* 2000; 24: S29-S38.
87. Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med.* 1995; 182: 1301–1314.
88. Klein-Hessling S, Muhammad K, Klein M, et al. NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nat Commun.* 2017; 8.
89. Rauschenberger T, Schmitt V, Azeem M, et al. T Cells Control Chemokine Secretion by Keratinocytes. *Front Immunol.* 2019; 10: 1917.
90. Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF- α regulated production of macrophage inflammatory protein 3 α /CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. *Journal of Dermatological Science.* 2001; 27: 130–139.
91. Schmuth M, Neyer S, Rainer C, et al. Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol.* 2002; 11: 135–142.
92. Mai W, Lu D, Liu X, Chen L. MCP-1 produced by keratinocytes is associated with leucocyte recruitment during elicitation of nickel-induced occupational allergic contact dermatitis. *Toxicol Ind Health.* 2018; 34: 36–43.

93. Gilet J, Chang Y, Chenivresse C, et al. Role of CCL17 in the generation of cutaneous inflammatory reactions in Hu-PBMC-SCID mice grafted with human skin. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 879–890.
94. Zamansky GB, Nguyen U, Chou IN. An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1991; 97: 985–994.

I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α	alpha
β	beta
Ca^{2+}	Calcium
Ca^{2+}/I	Calcium/Ionomycin
CAM	Calmodulin
CCL	CC-Chemokin-Ligand
cDNA	Komplementäre DNA
CK1	Casein Kinase 1
CN	Calcineurin
CN bind.	Calcineurin-Dephosphorylierungsstellen
CRAC-Kanäle	calcium-release-activated calcium channel
CsA	Cyclosporin A
Ct-Wert	Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus
CXCL9/10	CXC-Ligand 9/10
CXCR3 Rezeptoren	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
d	Tag
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA bind.	DNA-Bindedomäne
DYRK	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated Kinase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum

Abkürzung	Bedeutung
Ex	Exon
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FK506	Tacrolimus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase
I	Ionomycin
IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
Inv	Involucrin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
k	Zellkern
K	Keratin
kDa	Kilodalton
Lor	Loricrin
mod.	modifiziert
mRNA	Messenger- RNA
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIP2	Posphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C- γ
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationstest-Puffer

Abkürzung	Bedeutung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RPMI 1640	Roswell park memorial institute
RSD	Rel Similarity Domain
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
STIM1 und STIM2	Stromal interaction molecule 1 and 2
TAD-A/-B	Transaktivierungsdomäne
TBS	Trisgepufferte Saline
TBS-T	Trisgepufferte Saline mit Tween 20
TCR	T_Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	Tetradecanoylphorbol 13-acetat
TPA/I	Tetradecanoylphorbol 13-acetat/Ionomycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
z	Zytoplasma

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1.1	Der Calciumgradient entlang der Schichten der Epidermis	3
1.2	Darstellung der Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie	4
1.3	Der NFATc1-Genlocus	5
1.4	Der Ca ²⁺ -Calcineurin-Signalweg und die Aktivierung von NFATc-Faktoren in Lymphozyten	7

Abbildung	Titel	Seite
4.1	Überprüfung der Synthese von NFATc-Proteinen in KT12 NK-Zell-Klonen, die nach Transfektion mit Expressionsvektoren selektioniert wurden	25
4.2	Analyse der Apoptose-Rate von KT12-NK-Zellen, die mit NFATc-exprimierenden Vektoren transfiziert wurden, vor (A) und nach Stimulation (B+C)	26
4.3	Zytokin- Sekretions Assays von NK- Zellen nach NFATc1/ α A-, NFATc1/ β C- und NFATc2-Überexpression und Stimulation	28
4.4	Darstellung der Zytokin-RNA-Expression von NK-Zellen nach NFATc1/ α A-, NFATc1/ β C- und NFATc2-Überexpression und Stimulation	29
4.5	Phasenkontrastmikroskopie von HaCaT-Zellen	31
4.6	Analyse der NFAT-Expression von HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Differenzierungssignalen	33
4.7	Analyse der NFAT-Expression primärer humaner Keratinozyten nach Stimulation mit Differenzierungssignalen	34
4.8	Untersuchung der Expression von Differenzierungsmarkern nach Stimulation mittels Differenzierungssignalen	35
4.9	Analyse der Chemokin-Induktion nach Stimulation mittels Proliferations-bzw. Differenzierungs-Signalen	37
4.10	Analyse der NFAT-Expression nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten	39
4.11	Untersuchungen zur Expression von Differenzierungsmarkern in kultivierten Keratinozyten nach UV-Bestrahlung	41
4.12	Analyse der Chemokin-Expression nach UVB-Bestrahlung	43

III Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
2.1	Liste der verwendeten Geräte	11
2.2	Liste der verwendeten Substanzen	11
2.3	Liste der verwendeten Puffer	12
2.4	Liste der verwendeten Kits	13

Tabelle	Titel	Seite
2.5	Liste der verwendeten Antikörper	13
2.6	Liste der Zellen	13
2.7	Liste der verwendeten Medien	14
2.8	Liste der verwendeten Primer für qRT-PCR	14
3.1	Trenngel für SDS-Protein-Elektrophorese (für 8%-ige Gele)	19
3.2	Sammelgel für SDS-Protein-Elektrophorese (für 10%-ige Gele)	19
3.3	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	22
3.4	Reaktionsprotokoll für die cDNA-Synthese	22
3.5	Pipettierschema für qRT-PCR Assays	22
3.6	Protokoll für die Durchführung der qRT-PCR (Two-step) Assays	23

IV Danksagung

Allen denjenigen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben, möchte ich ausdrücklich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Edgar Serfling für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Vielen Dank für die lehrreiche Zeit und die Gelegenheit, eine experimentelle Arbeit im Labor anzufertigen und bei einem interessanten Projekt mitzuwirken. Für das Korrekturlesen möchte ich mich ebenso herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Khalid Muhammad meinen Dank aussprechen, der mich auf meinem Weg mit Rat, konstruktiven Anregungen und produktiven Gesprächen stetig begleitet und unterstützt hat.

Bei Herrn Dr. Stefan Klein-Heßling bedanke ich mich herzlich für die hilfreichen Anregungen, seine Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung in allen Belangen.

Vielen herzlichen Dank an Doris Michel für ihre technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft, welche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und Hilfe in der täglichen Laborpraxis bedanken ich mich bei Sabrina Giampaolo.

Meinen Eltern, Geschwistern, Freunden und meinem Verlobten Benjamin danke ich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während der Arbeit an dieser Doktorarbeit. Ich bin sehr dankbar für ihre Geduld und ermutigenden Zusprüche.

