



NFATc3 in der akuten GvHD

NFATc3 in acute GvHD

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität
Vorgelegt von

Markus Sebastian Haßler

aus

Roth

Würzburg 2023

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Heike Rittner

1. Betreuer: PD. Dr. F. Berberich-Siebelt

2. Betreuer: Prof. Dr. H. Wajant

3. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Beilhack

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Bei Leukämien, Lymphomen und dem Multiplen Myelom stellt die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HCT) oft die letzte kurative Therapieoption dar. Spender-T-Zellen (v.a. CD8⁺-T-Zellen), die im Transplantat enthalten sind, erkennen nach Chemo-/Strahlentherapie verbliebene Reste des entarteten Empfängergewebes, eradizieren dieses und verhindern somit ein Tumorrezidiv (Graft-versus-Leukämie Reaktion/GvL). Häufig attackieren Spender-T-Zellen (v.a. CD4⁺-Th1-Zellen) aber auch nicht-malignes Gewebe (z.B. Haut, Leber und Darm), was bis zum Tod des Patienten führen kann (Graft-versus-Host Disease/GvHD). Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus, die oft schon prophylaktisch verabreicht werden, verhindern über eine unselektive Inhibition aller Mitglieder der NFAT-Transkriptionsfaktorfamilie (*Nuclear factor of activated T-cells*) die Aktivierung der Spender-T-Zellen. Es folgt eine klinische Besserung der GvHD-Symptomatik, während jedoch der GvL-Effekt ebenfalls supprimiert wird. Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am Mausmodell hatten gezeigt, dass die selektive Inhibition eines NFAT-Familienmitgliedes (NFATc1 oder NFATc2) in den Donor-T-Zellen zu einer signifikanten Besserung der aGvHD bei jedoch erhaltener GvL führt. Es wurde nun der Einfluss des dritten, in Lymphozyten exprimierten NFAT-Mitglieds NFATc3 im Kontext der aGvHD untersucht.

Zur Basisanalyse der neu kreierten *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* und *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* Mauslinien erfolgten durchflusszytometrische und Western-Blot-Analysen. Anschließend wurden *In-vivo*-Untersuchungen unter Verwendung eines etablierten *major-mismatch*-aGvHD-Modells (H-2^b→H-2^d) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine NFATc3- (+/- NFATc1-) Defizienz direkt *ex vivo* die CD4⁺/CD8⁺-Ratio durch Abnahme der CD4⁺- hin zu den CD8⁺-T-Zellen verschoben wird. Auch zeigte sich in den entsprechenden Genotypen eine Abnahme der naiven- und dafür *vice versa* eine Zunahme der Effektor-T-Zellen. In den wiederholt durchgeführten aGvHD-Versuchen zeigte sich *in vivo* als Korrelat der (ebenfalls erneut nachgewiesenen) Abnahme des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten in den Zielorganen eine geringere Expansion der NFAT-defizienten als der wildtypischen T-Zellen. Leider spiegelte sich dies nicht in dem *clinical score* zur Quantifizierung der aGvHD-Symptomatik wider. Auch das Körpergewicht der Versuchsgruppe nahm rapide ab. Ursächlich hierfür ist – als Korrelat zur direkt *ex vivo* nachgewiesenen Aktivierungsneigung – ein vermehrter Th1-Shift der NFATc3 (+/-NFATc1-) defizienten T-Zellen.

Eine Inhibierung von NFATc3 – im Gegensatz zu NFATc1 und NFATc2 – ist demzufolge kein sinnvoller Ansatzpunkt für eine mögliche, zielgerichtete aGvHD-Therapie. Der positive Effekt der reduzierten Proliferationsneigung der NFATc3-defizienten Lymphozyten wird durch deren vermehrte Aktivierungsneigung mit erhöhter Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen zunichte gemacht.

Summary

In malignant diseases such as multiple myeloma, leukemia and lymphoma the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT) often represents the final curative treatment option. Donor T cells (esp. CD8⁺ T cells) within the graft recognize and eradicate tumor cells which have remained after chemo- and radiotherapy. This graft-versus-leukemia (GvL) effect can prevent tumor relapses. However, donor T cells (esp. CD4⁺ Th1 cells) often attack non-malignant tissue (e.g. skin, liver, colon) with potentially life-threatening consequences for the host. (Graft-versus-host disease = GvHD). To prevent the development of aGvHD, calcineurin-inhibitors (CNI) like cyclosporin A (CsA) and tacrolimus are often administered prophylactically. By means of an unselective suppression of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factors, both drugs inhibit the activation of donor T cells. While leading to a clinical improvement of the GvHD-symptoms, coevally, the GvL effect is also suppressed. Previous research of our study group showed that a selective inhibition of one NFAT family member (NFATc1 oder NFATc2) in donor T cells leads to a significant decline of aGvHD symptoms while maintaining GvL. We have now analysed the influence of NFATc3, the third NFAT member expressed in lymphocytes, in context of aGvHD.

Initially we analysed the new created *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* and *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* mouse strains by western blot and flow cytometry. Subsequently, these were followed by *in vivo* studies, using an already established *major-mismatch*-aGvHD-model (H-2^b→H-2^d).

It could be shown that directly *ex vivo* a NFATc3- (+/- NFATc1-) deficiency leads to a reduction in the CD4⁺/CD8⁺ ratio. This is mainly caused by a diminution of CD4⁺ T cell population, while the CD8⁺ population remains unaffected. Furthermore, a lower number of naive but an increased number of effector T cells has been observed. This effect (which was also present in the aGvHD-experiments) correlated *in vivo* with a decreased expansion of NFAT-deficient T cells – compared to wild type T cells – in target organs. Unfortunately, the expected clinical improvement could not be demonstrated. The clinical score which objectifies the aGvHD-symptoms, as well as the body weight of the mice in the experimental group declined rapidly, comparable with or even worse than in the control group due to an increased Th1-shift of the NFATc3- (+/- NFATc1) deficient T cells. This also correlates with the increased effector function which has been observed in the previous *ex vivo* experiments.

In conclusion an inhibition of NFATc3 – in contrast to NFATc1 or NFATc2 – is not a useful target point for a more specific aGvHD-therapy. The positive effect of a reduced proliferation in NFATc3-deficient lymphocytes is over-compensated by their augmented activation.

1 Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

2	Einleitung	1
2.1	Das Immunsystem	1
2.2	T-Zellen	1
2.2.1	Der T-Zell-Rezeptor	1
2.2.2	Signaltransduktion durch den T-Zell-Rezeptor	3
2.2.2.1	Der Ras/MAPK-Signalweg	3
2.2.2.2	Der Proteinkinase C- θ -Signalweg	3
2.2.2.3	Der Calcium-Signalweg	3
2.2.3	Arten & Funktionen der T-Zellen	4
2.2.4	T-Zellreifung im Thymus	8
2.2.5	Die zentrale Selektion – das Aviditätsmodell	10
2.2.6	T-Zell-Differenzierung; Signal 1 + 2	11
2.2.7	T-Zell-Differenzierung; Signal 3	12
2.3	B-Zellen	14
2.3.1	Der B-Zell-Rezeptor	14
2.3.2	Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor	15
2.3.3	B-Zell-Populationen	15
2.3.4	Antikörperklassen	15
2.3.5	B-Zell-Entwicklung	17
2.3.5.1	B2- Zell-Entwicklung	17
2.3.5.2	B1- Zell-Entwicklung	19
2.3.6	Entwicklung zur Plasmazelle	20
2.4	NFAT	22
2.4.1	Einführung	22
2.4.2	NFAT-Familienmitglieder und Grundstruktur	23
2.4.2.1	NFAT-Familienmitglieder	23
2.4.2.2	NFAT-Grundstruktur	23
2.4.3	Aktivierung von NFAT	25
2.4.4	Inaktivierung von NFAT	25
2.4.5	Natürliche Regulationsebenen von NFAT	26
2.4.6	Pharmakologische Interaktionsmöglichkeiten	26
2.4.7	NFATc3-Knockout auf Keimbahnebene	28
2.4.8	NFATc3-Knockout im Thymus	29
2.4.9	CD4- und Mb1-Cre-Mauslinien	32
2.5	Die Graft-versus-Host Disease	34
2.5.1	Die Stammzelltransplantation	34
2.5.2	Ablauf der Stammzelltransplantation	34
2.5.3	Pathophysiologie der GvHD	35
2.5.4	Die akute GvHD	36
2.5.5	Die chronische GvHD	37

2.5.6	Pathophysiologie und Therapieansätze der aGvHD	37
2.5.7	Pathophysiologie und Therapieansätze der cGvHD	39
2.5.8	Nebenwirkungen der GvHD-Therapie	39
2.5.9	NFAT in der GvHD	40
3	Material und Methoden	42
3.1	Material	42
3.1.1	Chemische Reagenzien	42
3.1.2	Puffer und Lösungen	43
3.1.2.1	Puffer	43
3.1.2.2	Lösungen	44
3.1.3	Medien	44
3.1.4	Antibiotika	44
3.1.5	Antikörper Durchflusszytometrie	45
3.1.6	Antikörper Western Blot	46
3.1.7	Stimulatoren	46
3.1.8	Geräte und sonstige Materialien	47
3.1.8.1	Verbrauchsmaterialien	47
3.1.8.2	Geräte	47
3.1.9	Elektronische Datenverarbeitung	48
3.1.10	Negative T-Zell-Isolierung	48
3.1.11	Mauslinien	49
3.2	Methoden	49
3.2.1	Zelluläre Methoden	49
3.2.1.1	Zentrifugation von Zellen	49
3.2.1.2	Analyse der Zellzahl	49
3.2.1.3	Zellentnahme	50
3.2.1.4	Herstellung der Zellsuspensionen	51
3.2.2	Durchflusszytometrie	51
3.2.2.1	Oberflächenfärbung der T-Zellen	51
3.2.2.2	Intrazellulärfärbung der T-Zellen	52
3.2.2.3	Intranukleäre Färbung der T-Zellen	52
3.2.2.4	Oberflächenfärbung der B-Zellen	52
3.2.3	Bildgebende Verfahren	53
3.2.3.1	Bioluminescence Imaging (BLI)	53
3.2.3.2	Western Blot	53
3.2.3.2.1	Gele gießen	53
3.2.3.2.2	Gewinnung von Ganzzellextrakten	54
3.2.3.2.3	Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten	54
3.2.3.2.4	Aufkochen der Proteine	55
3.2.3.2.5	Gelelektrophorese	55
3.2.3.2.6	Blotting	55
3.2.3.2.7	Membranbehandlung und Antikörperzugabe	55
3.2.4	<i>In-vitro</i> -Experimente	56
3.2.4.1	Direkte <i>Ex-vivo</i> -Analyse der T-Zellreihe	56
3.2.4.2	Direkte <i>Ex-vivo</i> -Analyse der B-Zellreihe	56
3.2.4.3	Th-Differenzierungskulturen für drei & sieben Tage	56

3.2.4.4	Th-Differenzierungskulturen für fünf Tage	57
3.2.4.5	B-Zell-Kulturen	58
3.2.5	<i>In-vivo</i> -Experimente	59
3.2.5.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation zur Untersuchung der akuten GvHD	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Kleinere lymphatische Organe in der <i>Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre</i>-Mauslinie	60
4.2	Proteinexpression der NFAT-Mitglieder per Western Blot	61
4.2.1	Analyse von NFATc3	61
4.2.1.1	NFATc3 wird vermehrt in Th0- und Th2-Zellen exprimiert	61
4.2.1.2	Ein unvollständiger Knockout führt zu einer reduzierten NFATc3-Konzentration	62
4.2.1.3	<i>Bcl2</i> ist ein mögliches NFATc3-Target-Gen	63
4.2.2	Diskonkordante Expression von NFATc3 und NFATc1	64
4.2.3	Widersprüchliche Ergebnisse über die Beziehung von NFATc3 und NFATc2	65
4.3	Durchflusszytometrische Analyse	67
4.3.1	Eine NFATc1 und/ oder c3-Defizienz gehen mit einer erniedrigten CD4 ⁺ - und erhöhten Treg-Zellzahlen einher	67
4.3.2	<i>In-vitro</i> -Analysen zeigen in der <i>Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre</i> -Mauslinie keine relevanten Änderungen in der Zytokinproduktion	72
4.3.3	<i>In vitro</i> zeigen sich in der <i>Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre</i> -Mauslinie keine relevanten Änderungen in der Zytokinproduktion	76
4.3.4	Eine NFATc3-Defizienz hat keinen Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung	79
4.4	GvHD-Versuche	81
4.4.1	Auch bei NFATc3-Defizienz ist eine akute GvHD stark ausgeprägt	81
4.4.2	Bei NFATc1- und NFATc3-Defizienz ist die T-Zell-Expansion nochmals vermindert	88
5	Diskussion	94
5.1	NFAT in der aGvHD	94
5.2	Diskrepanz Befunde in den GvHD-Versuchen	95
5.3	Hinweise auf einen Feedback-Mechanismus zwischen NFATc3 und STIM1	96
5.4	IRF4 und <i>Bcl2-A1</i> als NFATc1- und <i>Bcl2</i> als NFATc3 Target-Gene	97
5.5	Gegenregulation von NFATc1 und NFATc3	98
5.6	NFATc3 ist für die Zytokinproduktion von CD4⁺-Zellen <i>in vitro</i> nur von untergeordneter Bedeutung	99
5.7	Der bei NFATc1 und -c3-Defizienz bestehende Block in der thymischen T-Zellreifung kann durch NFATc2 teilweise kompensiert werden	101
5.8	NFATc3 ist in der B-Zellreifung nur von untergeordneter Bedeutung	102
5.9	Eine NFATc3-Inhibition zur Therapie der aGvHD ist nicht sinnvoll	103

6	Literaturverzeichnis	105
7	Abkürzungsverzeichnis	111
8	Eidesstattliche Erklärung	113

Danksagung

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist eine evolutionär alte Form der Verteidigung des Organismus gegen pathogene Erreger. Diese exprimieren diverse Signalmoleküle, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), welche sowohl entscheidend für das Überleben als auch für die Pathogenität des Krankheitserregers sind. Diese PAMPs werden von in der Keimbahn konservierten Rezeptoren, den PRRs (pathogen recognition receptors) erkannt. Diese PRRs, wie zum Beispiel TLRs (Toll-like receptors) oder NLRs (NOD-like receptors) finden sich auf den Zellen des angeborenen Immunsystems. Die Aktivierung eines PRRs führt zur Ausschüttung von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen, welche die Zerstörung der Krankheitserreger selbst oder die der betroffenen Wirtszellen auslösen. Überdies wird das adaptive Immunsystem aktiviert. T- oder B-Zell-Rezeptoren finden sich auf den Zellen des angeborenen Immunsystems nicht. [3, 4, 5, S. 28 - 33]

Das adaptive Immunsystem ist der Mechanismus, welcher es dem Körper erlaubt, auf die Bedrohungslage durch verschiedene Pathogene individualisiert zu reagieren. Die zugehörigen Zelltypen lassen sich grundsätzlich in B- und T- Lymphozyten einteilen. Während B-Zellen für die Antikörperproduktion, also die humorale Immunantwort zuständig sind, vermitteln T-Lymphozyten die zellvermittelte Abwehrreaktion des Körpers. [7, S. 11] [5, S. 5-6]

2.2 T-Zellen

2.2.1 Der T-Zell-Rezeptor

Das zentrale Element reifer T-Zellen ist der T-Zellrezeptor (TCR). Dieser besteht bei über 90% der T-Zellen aus einer α - und einer β -Untereinheit ($\alpha\beta$ -TCR), welche beide in der Zellmembran verankert und untereinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Alternativ kann dieser aber bei einer Minderheit der T-Zellen aus einer γ - und einer δ -Untereinheit ($\gamma\delta$ -TCR) bestehen. Beide Rezeptortypen haben an ihren Antigenbindungsstellen hypervariable Bereiche, welche durch somatische Rekombination entstanden sind. Jeder TCR ist mit einem CD3-Komplex und einem Dimer aus zwei ζ -Ketten verbunden. Über ihren T-Zell-Rezeptor sind die Zellen in der Lage Peptide zu binden. Diese müssen hierfür von einer anderen Körperzelle mittels eines in der Zellmembran verankerten Moleküls des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex/ MHC) dargeboten werden. Die meisten Körperzellen tragen MHC-I, aber die „professionellen“ Antigen präsentierenden Zellen zusätzlich MHC-II. Hierzu gehören dendritische und B-Zellen sowie Makrophagen. Zur Antigenbindung muss allerdings nicht nur der hypervariable Rezeptorbereich an den Peptid-beladenen MHC binden können, es muss gleichzeitig auch das

passende Begleitmolekül für den jeweiligen MHC-Typ auf der T-Zelle vorhanden sein. Für MHC-I ist dies CD8 und für MHC-II CD4. [5, S. 34 - 45]

Der TCR kann Peptide zwar erkennen, jedoch selbst keine Signale weiterleiten. Dies ist die Funktion des CD3-Komplexes sowie der beiden ζ -Ketten. Diese verfügen in ihrem zytoplasmatischen Anteil über ITAM-Sequenzmotive (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), welche nach Aktivierung des TCR an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden. Über verschiedene Zwischenschritte wird eine Signalkaskade in das Innere der Zelle in Gang gesetzt, in deren Verlauf Transkriptionsfaktoren dreier unterschiedlicher Familien aktiviert werden. Bei diesen Transkriptionsfaktoren handelt es sich um AP1, NF- κ B und NFAT. Jeder der drei Faktoren transloziert nach Aktivierung aus dem Zytosol in den Zellkern. Hier bindet er an Promotor- und/oder Enhancer-Regionen bestimmter Gene. Die jeweiligen Genprodukte werden nun entweder vermehrt oder vermindert gebildet. Gleichzeitig führt die Signalkaskade auch zu einem mikroskopisch sichtbaren Umbau des Zytoskeletts und der membranständigen Moleküle. So werden TCRs in ihrem Komplex zusammen mit kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen konzentriert. Dieser SMAC (supramolecular activation cluster), auch als immunologische Synapse bezeichnet, entsteht nach Antigenerkennung und bleibt nur für kurze Zeit bestehen. [5, S. 57 - 59, 8]

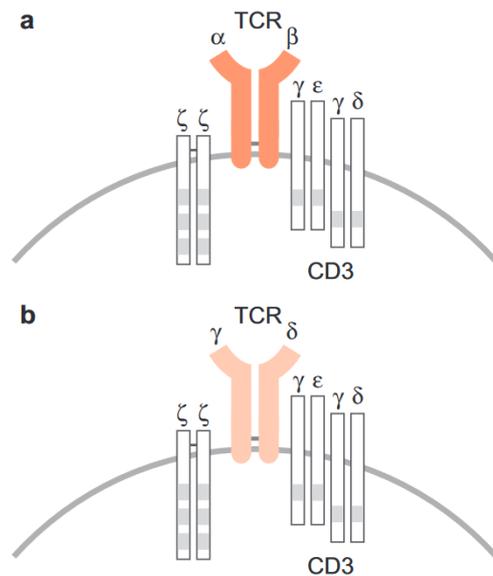


Abbildung 1: Sowohl der $\alpha\beta$ - als auch der $\gamma\delta$ -TCR sind mit einem CD3-Komplex und einem Dimer aus zwei ζ -Ketten assoziiert, welche in ihrem zytoplasmatischen Anteil über ITAM-Sequenzmotive verfügen. Die Abbildung wurde aus dem Buch „Grundwissen Immunologie“ [5, S. 39] entnommen.

Erstens verändert die Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) verschiedene Stoffwechselprozesse in der Zelle, während – zweitens – durch die Rekrutierung des Adaptorproteins ADAP die Zelladhäsionsfähigkeit der T-Zelle verbessert wird. Drittens orchestrieren die Vav-Proteine den Umbau des Zytoskeletts. Der vierte angestoßene Prozess ist die Aktivierung der Phospholipase C- γ , welche in mehreren Teilschritten erfolgt. Zunächst bindet diese an PIP3 und danach an die Proteine LAT und SLP-76. Nun wird PLC- γ durch die Tyrosinkinase Itk phosphoryliert, wodurch sie aktiviert wird. Die aktivierte PLC- γ spaltet das Membranlipid PIP2 in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3). IP3 diffundiert ins Zytosol, während DAG zellmembranständig bleibt. Beide Moleküle sind *second messenger*. Sie führen zur Aktivierung dreier Signalwege, in deren Verlauf die inaktiven Transkriptionsfaktoren AP1, NF- κ B und NFAT in ihre aktive und kernständige Form überführt. [9, S. 340 - 357]

2.2.2.1 Der Ras/MAPK-Signalweg

DAG aktiviert das Ras-Protein, welches dann die MAP-Kinase-Kaskade (MAP=mitogenaktivierte Proteinkinase) auslöst. In deren Verlauf wird zunächst die Kinase Raf (MAP3K), im Anschluss MEK1 (MAP2K) und zuletzt Erk (MAPK) phosphoryliert. Über weitere Zwischenschritte induziert Erk die Entstehung von Fos, einem der beiden Partner des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP1. [9, S. 351 - 352]

2.2.2.2 Der Proteinkinase C- θ -Signalweg

Auch die Proteinkinase C- θ wird durch DAG aktiviert. Diese phosphoryliert das Protein CARMA1, welches als Teil eines Komplexes nun TRAF6 aktiviert. Dieses Protein führt über Zwischenschritte zur Überführung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in seine aktive Form. Über den PKC- θ -Signalweg kann auch AP-1 aktiviert werden.[9, S 352 - 354]

2.2.2.3 Der Calcium-Signalweg

IP3 diffundiert ins Zytosol. Das Molekül bindet dort an seine Rezeptoren, welche insbesondere auf der äußeren Hülle des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. IP3-Rezeptoren sind Calcium-Kanäle. Bei Antigenbindung öffnen sich diese und Ca^{2+} kann, passiv seinem Gradienten folgend, aus dem ER ins Zytosol diffundieren. Die hierdurch reduzierte Ca^{2+} -Konzentration im ER induziert Konformationsänderungen in STIM1 und STIM2. Diese Transmembranproteine lagern sich an der Membran des ER zu Oligomeren zusammen. Die Oligomere binden unter anderem an ORAI1 und ORAI2. Es handelt sich um plasmamembranständige CRAC-Kanäle (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels), welche nun geöffnet werden. Extrazelluläres Ca^{2+} kann in die Zelle diffundieren. Durch den Einstrom des Ca^{2+} wird der Calciumspiegel im ER wieder auf sein Ausgangsniveau angehoben. Vor allem aber erhöht sich die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma weiter. Bei dieser hohen Konzentration binden Ca^{2+} -Ionen an das Protein Calmodulin. Dieses durchläuft eine Konformationsänderung und aktiviert weitere Enzyme, insbesondere Calcineurin. Die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert Serinreste auf dem Transkriptionsfaktor NFAT, wodurch dieser

sein Kernlokalisierungssignal exponiert, als aktives Protein in den Kern transloziert und an seine Sequenzmotive auf der DNA bindet [9, S. 346 - 350] [11]

Die Aktivierung der drei Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und NFAT sind unter anderem notwendig, um die Transkription des IL-2-Gens zu initiieren. Nur wenn alle drei Faktoren an ihre Sequenzmotive am IL-2 Promotor binden, kann dieser abgelesen werden. [9, S. 362 - 363]

2.2.3 Arten & Funktionen der T-Zellen

Anhand ihrer Oberflächenmoleküle und Funktionen lassen sich T-Zellen in CD4⁺-T-Helferzellen (Th) und CD8⁺-Cytotoxische T-Zellen (CTL) einteilen.

Aktivierte CD8⁺-CTL können infizierte Körperzellen oder Tumorzellen abtöten. Wenn sie mit ihrem TCR einen Komplex aus MHC-I und passendem Peptid als Antigen erkennen, werden zwei Abläufe parallel eingeleitet. Zum einen sezerniert die CTL aktiv Granzym B und Perforin. Beide Moleküle führen zur Lyse der Zielzelle. Zum anderen exprimieren die CD8⁺-T-Zellen nun verstärkt den Fas-Liganden (FasL, CD95L) auf ihrer Oberfläche, welcher an CD95 bindet. CD95 wird konstant auf fast allen Körperzellen exprimiert. Bei Bindung an CD95L wird ein Todessignal in die Zelle weitergeleitet, welches die Apoptose derselben initiiert. Da MHC-I auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus präsentiert wird, können CTL praktisch jede Sorte an infizierter Körperzelle abtöten. [5, S. 34 - 36, S. 75 - 76, S. 85 - 88]

Im Gegensatz zu den CD8⁺-CTL sind die aktivierten CD4⁺-T-Helferzellen nicht direkt an der Beseitigung von infizierten oder entarteten Körperzellen beteiligt. Vielmehr steuern sie indirekt über die Freisetzung von Zytokinen und die Interaktion mit anderen Zellen den generellen Ablauf der Immunantwort. CD4⁺-T-Zellen lassen sich funktionell anhand der sezernierten Zytokine charakterisieren. Diese erlauben es auch, ihnen Wirkungsbereiche in der physiologischen Infektionsabwehr zuzuordnen. Auch exprimiert jede Subpopulation spezifische Transkriptionsfaktoren, welche zu deren Klassifikation herangezogen werden können. Es werden die vier Hauptpopulationen Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Zellen unterschieden. Th1-, Th2- und Th17-Zellen werden unter dem Begriff konventionelle T-Zellen zusammengefasst. [12] [5, S. 126 - 131] [13, S. 228 - 230]

Th1-Zellen sezernieren nach Aktivierung vor allem IFN- γ und TNF- α . IFN- γ als Leitzytokin der Th1-Population rekrutiert und aktiviert Makrophagen. Diese bekämpfen ihrerseits intrazelluläre Infektionen von Viren und Bakterien. Physiologisch sind Th1-Zellen daher an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt. [12], [5, S. 127]

Th2-Zellen produzieren hauptsächlich die Interleukine IL-4, -5 und -13, wobei IL-4 als Leitzytokin zu betrachten ist. IL-4 und IL-13 sind strukturell und funktionell eng verwandt. IL-4 ist jedoch essenziell bei der Entstehung der Th2-Zelle, wobei IL-13 hier keine Rolle spielt. [13, S. 234 - 237] Th2-Zellen fördern die Proliferation und Ausreifung von B-Lymphozyten. Diese sezernieren dann vor allem Antikörper der Klassen IgG1 und IgE, welche wiederum eine hohe

Affinität zu Endoparasiten aufweisen. Durch die Produktion besagter Zytokine orchestrieren Th2-Zellen die Abwehr von Parasiten wie z.B. Würmern. [7, S. 70 -73] [12] [5, S. 127 -128]

Th17-Zellen sezernieren IL-22 sowie das namensgebende Interleukin 17. IL-17 setzt in den Stromazellen von infiziertem Gewebe eine Signalkaskade in Gang, in deren Verlauf neutrophile Granulozyten und Monozyten in das betroffene Gewebe einwandern und ausreifen. Diese bekämpfen Pilze und extrazelluläre bakterielle Erreger. [5, S. 128]

Den verschiedenen Subpopulationen der Th-Zellen lassen sich also recht klar umschriebene Wirkungsbereiche, meist ausgelöst durch den Infektionstyp zuordnen. Daher wird je nach vorherrschendem Subtyp gelegentlich von einer „Th1-Immunantwort“ oder einer „Th2-Immunreaktion“ etc. gesprochen.[14, S. 69 - 71]

Tregs, also die regulatorischen T-Zellen, sezernieren unter anderem die antiinflammatorisch wirkenden Leitzytokine TGF- β und IL-10. Auch exprimieren sie nach Aktivierung CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) auf ihrer Oberfläche. Als Mitglied der CD28-Rezeptorfamilie bindet CTLA4, genau wie CD28 selbst, an CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). Es hat jedoch eine 10-20 x höhere Affinität zu den besagten Rezeptoren und vermittelt genau die entgegengesetzte Wirkung von CD28. Es inhibiert die T-Zellaktivierung und -ausreifung. Dieser Effekt tritt ein, da es die B7-Moleküle zwar bindet, allerdings keine Signalkaskade in Gang setzt. Stattdessen wird der Abbau der B7-Moleküle eingeleitet. [13, S. 328 - 336]

Tregs sind eine wichtige Untergruppe an CD4⁺-T-Helferzellen, deren Hauptfunktion die Dämpfung von immunologischen Reaktionen ist. Es werden nochmals mehrere Unterkategorien der regulatorischen T-Zellen unterschieden. Natürliche Tregs (thymische Tregs, nTregs oder tTregs) sind T-Zellen, welche den Thymus bereits als solche ausdifferenziert verlassen. Periphere Tregs (pTregs) entstehen demgegenüber in der Peripherie *de novo* aus naiven CD4⁺-Zellen bei entsprechendem Zytokinmilieu. (Werden konventionelle CD4⁺-T-Zellen *in vitro* zu Tregs differenziert, bezeichnet man sie auch als induzierte oder iTregs). Tregs erlangen bei Stimulation unterschiedliche Effektorphänotypen. So existieren z.B. folliculäre Tregs, welche als dämpfender Gegenspieler den folliculären T-Helferzellen im Keimspektrum gegenüberstehen. [5, S. 128] Darüber hinaus sind spezielle Tregs-Zellen gefunden worden, welche Gewebshomöostase vermitteln. [15]

Neben den oben beschriebenen vier Hauptpopulationen an CD4⁺-T-Helferzellen können noch weitere Arten an T-Helferzellen abgegrenzt werden. (wobei die folgende Aufzählung keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt)

Folliculäre T-Zellen (T_{FH}) sezernieren in den B-Zellfollikeln IL-21 und IL-4, auch exprimieren sie CD40L auf ihrer Oberfläche. Sie unterstützen somit die B-Zellreifung und den Ig-Klassenswitch. [5, S. 128]

Zytotoxische CD4⁺-T-Zellen wiederum ähneln in ihrer Funktion stark den CD8⁺-CTL. (vgl. oben) Sie spielen in verschiedenen Abwehrreaktionen und meist bei chronischen Entzündungen eine

Rolle. Ihre genaue Herkunft und klinische Relevanz ist allerdings noch nicht genau erforscht.[16]

Auch bilden sich in der T-Zellreihe – analog zu den Plasmazellen der B-Zellreihe – Subpopulationen aus, welche Teil des immunologischen Gedächtnisses sind. [7, S. 81] Es werden zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}), T-Effektorgedächtniszellen (T_{EM}) und geweberesidente T-Gedächtniszellen (T_{RM}) unterschieden. Alle drei Subtypen können sowohl aus der $CD4^+$ - als auch aus der $CD8^+$ -T-Zellreihe entstehen. Die T-Gedächtniszellen unterscheiden sich in ihrer längeren Lebensdauer, geänderten Proteinexpression und dem Aktivierungsverhalten von den naiven und Effektor-T-Zellen. T_{CM} -Zellen befinden sich ähnlich den naiven T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen. Nach Aktivierung exprimieren sie, ähnlich den T_{FH} -Zellen, den für die B-Zellreifung notwendigen CD40-Liganden auf ihrer Oberfläche. (vgl. Abschnitt 2.3.6) T_{EM} -Zellen können, anders als naive T-Zellen, vom Blut auch direkt in periphere, nicht-lymphatische Gewebe einwandern. Nach Aktivierung sezernieren sie proinflammatorische Zytokine und differenzieren sich schnell zu T-Effektorzellen. Im Gegensatz zu den anderen beiden Subpopulationen zirkulieren die T_{RM} -Zellen nicht dauerhaft durch den Körper. Nachdem sie in Dermis oder Epidermis eingewandert sind, verbleiben sie in den jeweiligen Grenzonen des Körpers. Anhand der exprimierten Oberflächenmoleküle können naive T-Zellen ($CD62^{high}/CD44^{low}$) von T_{CM} - ($CD62^{high}/CD44^{high}$) und T_{EM} -Zellen ($CD62^{low}/CD44^{high}$) abgegrenzt werden. Eine klare Trennung zwischen Effektor-T-Zellen und T_{EM} -Zellen ist anhand der beiden Oberflächenmoleküle CD44 und CD62L nicht möglich. [9, S. 618 - 630, 17] [18]

2.2.4 T-Zellreifung im Thymus

Sowohl T- als auch B-Zellen entstehen aus denselben, hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Diese unreifen Zellen exprimieren noch keinen T-Zellrezeptor. Über die Blutbahn wandern sie in den Thymus ein, wobei sie diesen vom Cortex her in Richtung Mark durchwandern. Die hierbei durchlaufenen Reifestadien sollen sicherstellen, dass die aus dem Thymus austretenden, reifen T-Zellen nicht durch körpereigene Antigene aktiviert werden können. Die Folge einer solchen Autoaktivierung reichen, je nach Antigen, von leichten allergischen Reaktionen bis hin zu potenziell letalen Autoimmunerkrankungen. Zusammengefasst werden die unterschiedlichen Selektionsarten im Thymus unter dem Oberbegriff „zentrale Toleranz“. Ihr gegenüber steht die „periphere Toleranz“, die erneut apoptotische Prozesse, vor allem aber die Regulation durch Tregs beinhaltet, welche vorrangig in den sekundären lymphatischen Organen ihre Wirkung entfaltet. Als Thymozyt werden alle T-Zellen im Thymus, unabhängig vom Reifestadium, bezeichnet. [5, S. 108 - 111]

Die Vorläuferzellen, welche gerade erst in den Thymus eingetreten sind, exprimieren weder einen T-Zell-Rezeptor noch CD4 oder CD8. Sie werden daher als „double-negative thymocytes“ (DN) bezeichnet. Anhand der Expression von CD44, CD25 und CD117 können die DN-Zellen in die vier Differenzierungsschritte DN1-DN4 unterteilt werden. [1] Im Verlauf dieser Schritte vermehren sich die Zellen stark. Es wird durch somatische Rekombination die β -Kette des TCR gebildet. Die Genumlagerung in der somatischen Rekombination wird durch die Enzyme RAG1 und RAG2 koordiniert. Diese werden durch die gleichnamigen Gene kodiert. [5, S. 51 -54] [13, S. 230 - 237]

Die T-Zellen exprimieren nun sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Oberfläche. Sie werden als „double-positive thymocytes“ (DP) bezeichnet. Es lassen sich hier ebenfalls drei Zwischenstadien abgrenzen. Im DP-TCR⁻-Stadium exprimieren die Zellen noch keinen vollständigen TCR-Rezeptor. Sie bilden die α -Kette des TCR, wofür erneut die Enzyme RAG1 und RAG2 verwendet werden. Nach erfolgreicher somatischer Rekombination gehen die Zellen in das nächste Zwischenstadium über. Diese DP-TCR^{low}-Zellen exprimieren den fertigen TCR, allerdings nur in geringen Mengen. Die Zellen durchlaufen den Prozess der positiven Selektion. Wurde diese erfolgreich abgeschlossen, exprimieren sie wesentlich größere Mengen des TCR auf ihrer Oberfläche. Außerdem exprimieren die DP-TCR^{high}-Zellen große Mengen der Moleküle CD5 und CD69 auf ihrer Oberfläche (CD5^{high}+CD69^{high}). Auch dadurch kann dieser von den vorherigen Zwischenschritten abgegrenzt werden.

Nun geht der Thymozyt in die letzte thymische Reifephase über. Besitzt der TCR der Zelle eine Affinität passender Stärke zu einem Komplex aus Peptid und MHC-I, bildet sich CD4 auf der Oberfläche der DP-Zelle zurück und CD8 bleibt bestehen. Diese T-Zelle wird nun als „single-positive“ (SP) für CD8 bezeichnet. Bindet der TCR umgekehrt an einen Komplex aus Peptid und MHC-II, bildet sich CD8 zurück und CD4 bleibt bestehen. Die T-Zelle ist „single-positive“ (SP) für CD4. Negativ selektioniert werden die Thymozyten entweder im DP- oder im SP-Stadium. Nur etwa 2% aller Thymozyten durchlaufen alle Entwicklungsschritte. Der Rest wird durch die

unterschiedlichen Prozesse der zentralen Selektion abgetötet. Die überlebenden Zellen verlassen den Thymus als reife, naive T-Zellen. [1]

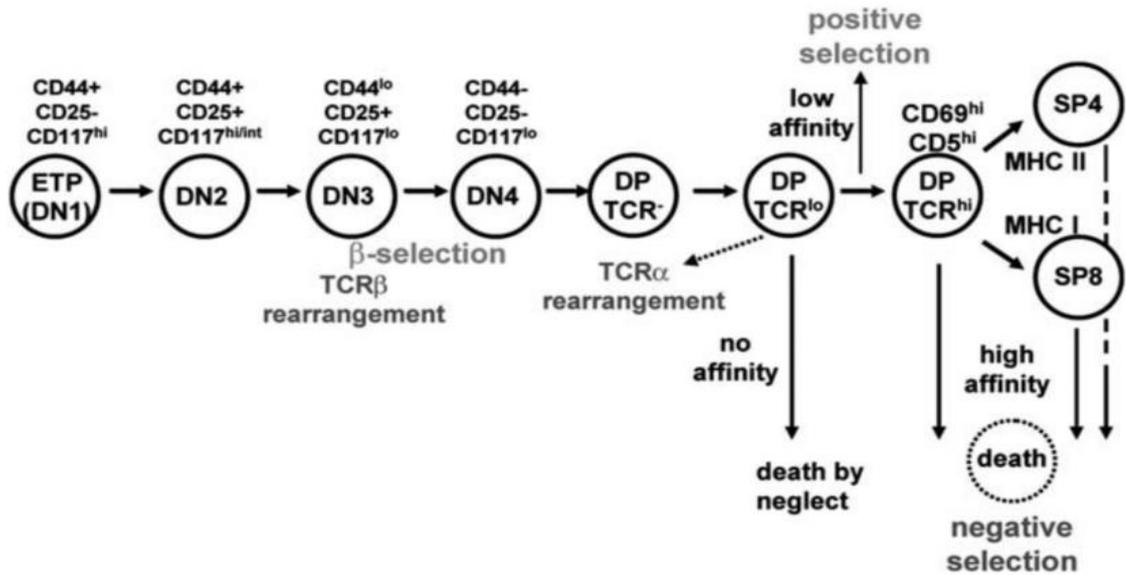


Abbildung 3: Während der T-Zellreifung im Thymus durchlaufen die unreifen Progenitorzellen diverse Entwicklungsschritte von der DN1- zur naiven SP-T-Zelle. Die Abbildung wurde aus dem Review von Labrecque et al. entnommen. [1, 2]

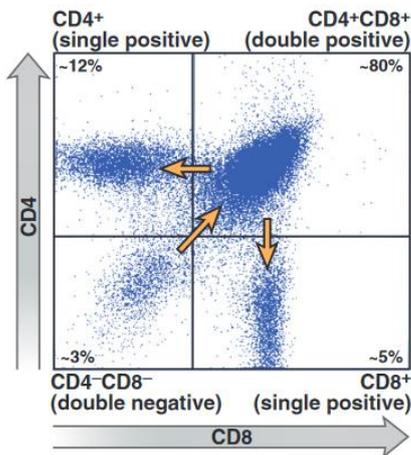


Abbildung 4: Das Nebeneinander verschiedener T-Zellentwicklungsstufen im Thymus führt im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse desselbigen zur typischen „Schwalbenform“. Die Abbildung wurde aus dem Buch „Cellular and Molecular Immunology“ entnommen. [2, 13, S. 199 - 204]

2.2.5 Die zentrale Selektion – das Aviditätsmodell

Der TCR bindet an Komplexe aus MHC und einem Peptidmolekül. Die Selektionsschritte der zentralen Toleranzentwicklung lassen sich mithilfe des Aviditätsmodells erklären. Der „Tod durch Vernachlässigung“ tritt ein, wenn der TCR keines der angebotenen MHC/Peptid-Komplexe binden kann. Der Mangel an Überlebenssignalen führt zum Untergang der Zelle. Der Begriff negative Selektion demgegenüber beschreibt den Umstand, dass ein zu hohes Maß an Bindung an den MHC/Peptid-Komplex ein Apoptosesignal für die Zelle generiert. Dies soll verhindern, dass eine T-Zelle versehentlich in der Peripherie durch körpereigene Peptide aktiviert werden kann. Positiv selektioniert werden daher nur diejenigen T-Zellen, welche ein gewisses Mindestmaß an Affinität zu dem MHC/Peptid-Komplex besitzen, allerdings auch keine allzu hohe Bindungsstärke aufweisen. Als vierte Variation der zentralen Toleranzentwicklung gibt es jene Zelltypen, deren Bindungsaffinität im oberen Bereich der positiven Selektion angesiedelt ist. Diese ist allerdings noch nicht stark genug, um die Zellen der negativen Selektion zuzuführen. Entsprechende T-Zellen entwickeln sich mit hoher Wahrscheinlichkeit zu tTregs, welche (auto-) immunologische Prozesse abmildern können. Dieser zusätzliche Mechanismus dient der Erhöhung der Trennschärfe zwischen positiver und negativer Selektion. [5, S. 108 - 111] [13, S. 203 - 206]

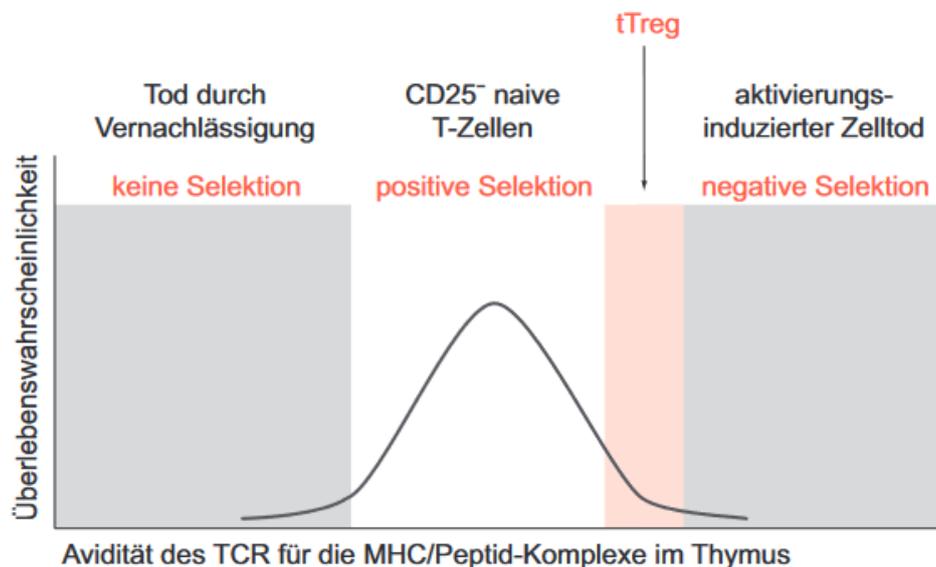


Abbildung 5: T-Progenitorzellen mit einer nur schwach ausgeprägten Avidität des TCR für die dargebotenen MHC/Peptid-Komplexe im Thymus, als auch solche mit einer zu stark ausgeprägten Bindungsaffinität gehen im Verlauf der T-Zellreifung unter. Jene Zellen mit einer Avidität an der Grenze zwischen positiver und negativer Selektion entwickeln sich mit hoher Wahrscheinlichkeit zu tTregs. Die Abbildung wurde aus dem Buch „Grundwissen Immunologie“ entnommen. [5, S. 109]

2.2.6 T-Zell-Differenzierung; Signal 1 + 2

Die reifen, aber naiven T-Zellen, welche gerade den Thymus verlassen haben, müssen sprachlich wie funktionell von den T-Effektorzellen und den regulatorischen T-Zellen abgegrenzt werden. Konventionelle T-Effektor- und regulatorische T-Zellen haben die Gemeinsamkeit, dass sie bereits ein passendes Antigen von einer dendritischen Zelle präsentiert bekommen haben. Sie haben sich daraufhin differenziert und wandern nun auf der Suche nach einem passenden Peptid/MHC-Komplex durch den Körper. Wird ihnen dieser von einer beliebigen Körperzelle dargeboten, werden sie aktiviert. Die für den Subtyp spezifische Reaktion wird in Gang gesetzt.

Demgegenüber verlassen naive T-Zellen den Thymus über die Medulla und gelangen so in den Blutkreislauf. Diesen können sie im Bereich spezialisierter Venen, den Hochendothelialen Venolen (HEV) verlassen. So gelangen sie in die T-Zell-Zone der Lymphknoten. Hier werden ihnen von reifen dendritischen Zellen MHC/Peptid-Komplexe präsentiert. Findet die T-Zelle kein passendes Antigen, verlässt sie den Lymphknoten wieder und gelangt über den Ductus thoracicus zurück in den Blutkreislauf. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis der naiven T-Zelle ein passendes Antigen dargeboten wird oder sie mangels Überlebenssignalen abstirbt. Wird ihr von einer reifen dendritischen Zelle ein passendes Peptid offeriert, erfolgt die Aktivierung der naiven T-Zelle. [13, S. 47 - 53]

Wie bei der T-Effektorzelle muss bei der naiven T-Zelle zur Aktivierung ein passender MHC/Peptid-Komplex über den TCR gebunden werden. Diese Bindung wird als erstes Signal bezeichnet. Anders als bei den T-Effektorzellen ist bei naiven T-Zellen allerdings noch ein zweites Signal notwendig, um diese erstmals zu aktivieren. Dieses wird generiert, indem CD28 durch CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) gebunden wird. CD28 ist ein Oberflächenmolekül, welches dauerhaft auf T-Zellen exprimiert wird. CD80 und CD86 sind Oberflächenstrukturen, die nur von aktivierten dendritischen Zellen exprimiert werden. [5, S. 85 - 87] [8]

Dieser Mechanismus erklärt, weshalb naive T-Zellen normalerweise nicht in der Peripherie aktiviert werden können. Die initiale Aktivierung vollzieht sich nur im Lymphknoten und in Gegenwart einer reifen dendritischen Zelle. Das zweite Signal dient dem Organismus somit als Schutz vor Autoreaktivität.

Wird dennoch eine naive T-Zelle per Zufall in der Peripherie aktiviert, verfällt sie in den Zustand der Anergie. Dies bedeutet, dass selbst eine erneute TCR-Bindung in Gegenwart einer Kostimulation die naive T-Zelle nicht mehr aktivieren kann. Diese lässt sich mit vielen weiteren Sicherheitsmaßnahmen dem übergeordneten Prinzip der peripheren Toleranz zuordnen. Vorgänge in der Peripherie ergänzen damit die zentrale Toleranz im Thymus. [5, S. 111 - 113]

Die Aktivierung von CD28 verstärkt die Bildung und Sekretion von IL-2, welches für die Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen von zentraler Bedeutung ist. Es wurde deshalb früher auch als T-cell growth factor (TCGF) bezeichnet. [5, S. 86] [8]

Der vollständige Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) besteht aus den drei Untereinheiten IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) und IL-2R γ_c (common γ -chain/ CD132). Der Komplex aus β - und γ_c -Kette, genannt IL-2R $\beta\gamma_c$, ist in niedriger Konzentration konstitutiv vorhanden. Er bindet IL-2 nur mit sehr geringer Affinität. Erst der vollständige Rezeptor, d.h. nachdem sich IL-2R α mit IL-2R- $\beta\gamma_c$ zusammenlagert hat, hat eine hohe Affinität zu IL-2. Auch initiiert IL-2 selbst über die Bindung an seinen Rezeptor eine vermehrte Produktion von IL-2R α . [19]

Für die naive T-Zelle ist die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor ein starkes Überlebens-, Proliferations- und Differenzierungssignal. Diese Wirkungen werden über unterschiedliche Signalkaskaden im Zellinneren vermittelt. Beispielsweise wird das antiapoptotisch wirksame Proteine Bcl2 vermehrt gebildet. Bcl2 ist auch Namensgeber der gleichnamigen Proteinfamilie, deren Mitglieder pro- oder antiapoptotisch wirken können. [20]

Im Endergebnis führt also die Antigenerkennung des TCR bei gleichzeitiger Bindung und Aktivierung von CD28 zur Bildung von IL-2 und IL-2R α . Dieses initiiert wiederum die Bildung und Sekretion von IL-2, welches dann selbst ebenfalls die Bildung von IL-2R α induziert. Es etabliert sich somit durch die Antigenerkennung eine positive Feedback-Schleife zugunsten der aktivierten T-Zellen. [13, s. 216 - 220]

Wie beschrieben, exprimieren T-Effektorzellen das relevante IL-2R α -Protein nur für einen kurzen Zeitraum nach der Antigenerkennung. Im Anschluss wird der Rezeptor wieder herunterreguliert. Demgegenüber zeichnen sich regulatorische T-Zellen dadurch aus, dass sie IL-2R α (CD25) zusammen mit den anderen Ketten des IL-2-Rezeptors konstitutiv exprimieren. IL-2 ist für die Funktion und das Überleben der Treg-Zelle essenziell. Da sie selbst jedoch kein IL-2 produzieren können, ist sie auf eine konstante Zufuhr aus dem umgebenden Gewebe angewiesen. [13, S. 218]

2.2.7 T-Zell-Differenzierung; Signal 3

Naive T-Zellen können nur in Gegenwart einer reifen dendritischen Zelle aktiviert werden. Diese initiiert über den TCR und CD28 die Differenzierung der T-Zelle. Währenddessen beginnt eine CD4⁺-T-Zelle, den CD40-Liganden (CD154) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Dieser kann an CD40 auf der Oberfläche der dendritischen Zelle binden. Hierdurch erhält die dendritische Zelle ebenfalls ein Wachstums- und Differenzierungssignal. Antigenpräsentierende Zelle und naive T-Zelle kommunizieren und stimulieren sich somit gegenseitig. [5, S.85 - 86]

Das umgebende Zytokinmilieu bei Antigenerkennung entscheidet, in welchen Subtyp sich eine naive T-Zelle entwickelt. In Anlehnung an Signal 1 (Antigenerkennung durch den TCR) und Signal 2 (Signalweiterleitung durch den CD28-Corezeptor) wird das Zytokinmilieu als Signal 3 bezeichnet. Dieses wird vornehmlich durch die dendritische Zelle geformt. Das Milieu ist nicht beliebig gewählt, sondern richtet sich nach der Infektion und damit der Art des präsentierten Antigens. Intrazelluläre Erreger induzieren beispielsweise die Bildung eines Zytokinmilieus,

welches die Entstehung von Th1-Zellen begünstigt. Eine Th1-Immunantwort eliminiert nun besonders effektiv intrazelluläre Erreger. Durch diesen Mechanismus wird eine möglichst effiziente Erregereradikation sichergestellt. [5, S. 86] [13, S. 230 - 241]

Die durch externe Zytokine gegebenen Signale werden mithilfe von mindestens zwei Transkriptionsfaktoren ins Zellinnere weitergeleitet. Hier induzieren sie die Produktion der für die jeweilige Subpopulation typischen Zytokine und Oberflächenmoleküle. Die beiden Transkriptionsfaktoren bestehen immer aus einem STAT-Molekül (signal transducer and activator of transcription) sowie einem „master regulator“. Meist erfolgt die Aktivierung durch eine positive Feedback-Schleife. Es bindet beispielsweise IFN- γ an seinen membranständigen Rezeptor. Nun geht das in inaktiver Konformation im Zytosol vorliegende STAT1 durch posttranslationale Modifikation, hier Phosphorylierung, durch die Zytokinrezeptor-bindende Januskinase in seine aktive Form über. STAT1-P wiederum fördert die Expression des „master regulators“ T-bet. In einem Transkriptionsfaktorennetzwerk mit STAT-Faktoren, NFAT und AP1 induziert T-bet anschließend die Bildung und Sezernierung von IFN- γ .

Th1-Zellen entwickeln sich also in Abhängigkeit von IL-12, das von aktivierten dendritischen Zellen sezerniert wird, sowie IFN- γ , welches in einem autokrinen Feedbackloop der T-Zelle funktioniert. Die direkt für die jeweiligen Rezeptoren aktivierten Transkriptionsfaktoren sind STAT4 und STAT1. Das folgend exprimierte T-bet stellt dann den sog. „master regulator“ dar.

Für die Th2-Differenzierung ist IL-4 von großer Bedeutung. Aber auch IL-25, IL-33 und TSLP (thymic stromal lymphopoietin) spielen eine Rolle. Die Transkriptionsfaktoren sind hier STAT6 und GATA-3.

Th17-Zellen entstehen aus naiven T-Zellen – zumindest in der Maus – in Gegenwart von IL-1, IL-6 und TGF- β . IL-21 und IL-23 stabilisieren die Entwicklung zur Th17-Zelle. STAT3 und ROR γ t sind entscheidend.

Wie in Abschnitt 2.2.3 aufgeführt, entstehen regulatorische T-Zellen entweder direkt im Thymus (tTregs) oder bilden sich in der Peripherie aus naiven T-Zellen (pTregs oder iTregs). *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass TGF- β in Gegenwart höherer Mengen IL-2 für die Differenzierung von naiven T-Zellen in iTregs von Bedeutung sind. TGF- β induziert Smad-Faktoren, die zusammen mit dem TCR-abhängigen NFAT FoxP3 induzieren.[21] Durch die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor (welcher unter anderem aus CD25 besteht, siehe Abschnitt 2.2.6) wird STAT5 aktiviert, welches die Expression von FoxP3 aufrechterhält. In der Durchflusszytometrie sind daher FoxP3 und CD25 neben CD4 die entscheidenden Marker zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen.

Die hier beschriebenen Signalwege sind nicht alleinig ausschlaggebend für die Differenzierung einer naiven T-Zelle hin zu einem bestimmten Subtyp. Bei jeder TCR-vermittelten Interaktion in der Gegenwart einer Kostimulation werden auch die Transkriptionsfaktoren AP1, NF- κ B und NFAT aktiviert. Diese regulieren unter anderem auch die Expression des jeweiligen „master regulators“, sind aber vor allem direkt an der Zytokinexpression beteiligt.

Interleukine, welche die Entwicklung hin zu einem Subtyp induzieren, werden häufig auch von dem entsprechenden Subtyp sezerniert. Gleichzeitig supprimieren jene Zytokine die Transkriptionsfaktoren, welche zur Ausbildung eines anderen Subtyps notwendig wären. Eine einmal eingeschlagene Differenzierungsrichtung wird durch die positive Rückkopplung deshalb langfristig beibehalten. Beispielsweise ist IFN- γ entscheidend für die Th1-Differenzierung und gleichzeitig Leitzytokin der Th1-Zellen. Zusätzlich inhibiert es die Th2- und Th17-Differenzierung. Trotzdem soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Subtypen-Differenzierung plastisch ist. Ändern sich die Umstände, können die Subtypen ineinander übergehen. Dies ist z.B. von Th17-Zellen in Autoimmunerkrankungen bekannt, welche zunächst zusätzlich T-bet und IFN- γ koexprimieren, um evtl. anschließend in einen ausschließlichen Th1-Phänotyp überzugehen. [22]

Die Zytokinzugabe zu den in den Abschnitten 3.2.4.3 und 3.2.4.4 aufgeführten Th-Differenzierungskulturen versucht die hier aufgeführten Entwicklungs- und Zytokinverhältnisse *in vitro* nachzubilden. [12] [13, S. 230 - 241, S. 334 - 336]

2.3 B-Zellen

2.3.1 Der B-Zell-Rezeptor

Das zentrale Element reifer B-Zellen ist der B-Zell-Rezeptor. T- und B-Zellrezeptoren sind differente Strukturen, jedoch weisen sie in Aufbau und Funktionsweise große Gemeinsamkeiten auf. Der gravierendste Unterschied besteht in der Antigenerkennung. Der klassische TCR der $\alpha\beta$ T-Zellen ist spezialisiert auf die Bindung von Proteinantigenen. Es besteht zusätzlich eine MHC-Restriktion. Demgegenüber kann der BCR Antigene unterschiedlicher Substanzklassen erkennen, eine MHC-Restriktion existiert hier nicht. [5, S. 38 - 42] Auch der BCR besteht aus einer Komponente zur Antigenbindung, welche mit Molekülen zur Signaltransduktion assoziiert sind. Es existiert ebenfalls ein Corezeptor. Dieser verstärkt das anfänglich schwache Rezeptorsignal bei Aktivierung deutlich.

Die Antigenbindungsstelle des BCR entsteht wie beim TCR durch somatische Rekombination. Die Struktur des Rezeptors entspricht jener eines Antikörpers, welcher durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert wurde. Jede Antikörperklasse kann als BCR fungieren, wobei eine B-Zellpopulation nur Rezeptoren einer Spezifität ausbildet. Es können jedoch Rezeptoren unterschiedlicher Klassen auf einer B-Zelle anzutreffen sein. [5, S. 38 - 39] [9, S. 379 - 384] [23]

Das Dimer aus Ig α und Ig β (CD79A und B) bildet die Komponente der Signaltransduktion. Bei Antigenbindung durch den Rezeptor werden die zytoplasmatisch gelegenen ITAM-Sequenzen von CD79 phosphoryliert, wodurch die intrazelluläre Signalweiterleitung initiiert wird. Der B-Zell-Corezeptor besteht aus den drei Proteinen CD19, CD21 (CR2; Komplementrezeptor 2) und CD81 (TAPA-1). Dieser wird aktiviert, indem beispielsweise CD21 an seinen Liganden, die

Komplementkomponente C3d, bindet. Im Rahmen der Aktivierung des Corezeptors wird der zytoplasmatische Abschnitt von CD21 phosphoryliert. Über Zwischenschritte wird das anfänglich schwache Signal des BCR deutlich verstärkt. Analog zur T-Zelle wird eine Signalkaskade ins Zellinnere weitergeleitet. In deren Verlauf werden ebenfalls die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und NFAT in ihre aktive Form überführt. [9, S. 357 - 360] [13, S. 165 - 168] [24]

2.3.2 Signaltransduktion durch den B-Zell-Rezeptor

Die Signaltransduktion in B-Zellen ist strukturell nahezu identisch zur Signaltransduktion in T-Zellen. (vgl. Abschnitt 2.2.2) Der BCR ist mit zwei ITAM-Sequenzmotiven assoziiert. Die Phosphorylierung dieser ITAM-Sequenzen erfolgt in B-Zellen durch die Src-Kinasen Lyn, Blk und Fyn. Fyn ist daher in beiden Lymphozytenarten anzutreffen. Die Funktion von ZAP-70 in T-Zellen wird in B-Zellen durch die verwandte Tyrosinkinase Syk übernommen. SLP-65 (BLNK) ersetzt in B-Zellen die Funktion von LAT und SLP-76. Vav, Akt und ADAP sind in beiden Lymphozytenarten vorhanden und erfüllen dieselben Funktionen. Auch die Phospholipase C- γ ist in B-Zellen anzutreffen. Während in T-Zellen die Isoform γ 1 vorliegt, ist in B-Zellen die Isoform γ 2 dominant. Letztere wird durch die spezifische Tec-Kinase Bruton-Tyrosinkinase (BTK) aktiviert. Der Funktionsumfang der beiden Isoformen ist vergleichbar, da auch in B-Zellen letztendlich die drei Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und NFAT aktiviert werden. [9, S. 357 - 360] [13, S. 165 - 169]

2.3.3 B-Zell-Populationen

Man unterscheidet zunächst zwei Populationen an B-Zellen. Während der Schwangerschaft entstehen die B-Zellen des Ungeborenen aus Vorläuferzellen in der fetalen Leber. Die kleine B1-Population leitet sich von diesen Progenitorzellen ab. Diese B-Zellen sind vor allem in der Peritoneal- und Pleurahöhle anzutreffen. Sie werden der angeborenen Immunität zugeordnet.

Etwa ab dem Zeitpunkt der Geburt entwickelt sich die große Mehrheit der B-Zellen aus hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark. Sie haben damit denselben Ursprung wie die Zellen der T-Zell-Reihe. Diese B-Zellen werden als B2-Population bezeichnet und sind Teil des adaptiven Immunsystems. [9, S. 379 - 401] [13, S. 192 - 199]

2.3.4 Antikörperklassen

Alle Antikörper haben dieselbe Grundstruktur. Sie bestehen aus zwei identischen, leichten und zwei identischen, schweren Ketten. Es lagert sich jeweils eine leichte mit einer schweren Kette zusammen. Disulfidbrücken verbinden die leichte und die schwere Kette, sowie die beiden schweren Ketten untereinander. Jede Kette besteht aus einer variablen Region, sowie

mindestens einem konstanten Anteil. Leichte Ketten besitzen nur einen konstanten Abschnitt, während schwere Ketten hingegen drei oder vier konstante Anteile aufweisen. Die Y-förmige Grundstruktur eines Antikörpers wird in ein Fab- sowie ein Fc-Fragment unterteilt. Unter dem Begriff Fab-Struktur werden die leichten und die gebundenen Anteile der schweren Ketten zusammengefasst. Das Fc-Fragment setzt sich dementsprechend aus den Anteilen der beiden schweren Ketten zusammen, welche nicht mit den leichten Ketten assoziiert sind. Funktionell ist der Fab-Teil des Antikörpers, genauer die variablen Regionen der Ketten, für die Antigenbindung zuständig. Diese sind durch somatische Rekombination im Reifeprozess der B-Zelle entstanden. Complementarity determining region (CDR) oder „hypervariable Region“ sind alternative Begriffe für diesen Abschnitt des Antikörpers. Das konstante Fc-Fragment vermittelt die weitere Reaktion im Anschluss an die Antigenbindung. [5, S. 9 - 10] [9, S. 179 - 181]

Es werden zwei Arten an Leichtketten, κ und λ , sowie fünf Formen der schweren Kette, α , γ , δ , ϵ und μ , unterschieden. Die Struktur und damit der Funktionsbereich des Antikörpers, wird durch die schwere Kette determiniert. Diese ist somit auch Grundlage für die Einteilung der Antikörper in die fünf Klassen IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. [9, S. 180 - 182]

IgM-Antikörper setzen sich aus fünf oder sechs Einheiten der Y-förmigen Grundstruktur zusammen. Diese sind über eine J-Kette (J = Joining) verbunden. Der naive BCR besitzt immer die Struktur eines IgM-Antikörpers. Diese ist somit auch stets die erste Antikörperklasse, welche im Anschluss an die Erkennung eines neuartigen Antigens sezerniert wird. Aufgrund ihrer großen Molekülmasse induziert diese Antikörperklasse sehr schnell eine Aktivierung des Komplementsystems. Die gebundenen Komplementfaktoren werden wiederum von Makrophagen erkannt. [5, S. 12]

Immunglobulin A ist nur in geringer Konzentration im Serum anzutreffen. Es ist jedoch die einzige Antikörperklasse, welche auf Körperoberflächen vorkommt. Hierfür müssen die Moleküle aktiv durch das Epithel transportiert werden. Die Hauptfunktion von IgA besteht in der Neutralisation, d.h. Pathogene werden gebunden und damit deren Adhäsion an Körperzellen verhindert. Es existieren zwei Subklassen des IgA-Moleküls, IgA1 und IgA2. Diese unterscheiden sich in der Masse der schweren Kette. Auch werden drei Zustandsformen des IgA beschrieben. Dieses liegt entweder als Monomer, als Dimer oder in seiner sekretorischen Form vor. [5, S. 14 - 15]

IgD wird als Monomer auf reifen, naiven B-Zellen exprimiert. Seine genaue Funktion ist nur ansatzweise erforscht. [9, S. 384] [25]

Auch IgE kommt nur in sehr geringer Konzentration im Serum vor. Mastzellen und eosinophile Granulozyten exprimieren den Fc-Rezeptor für IgE, mit welchem sie den Fc-Teil von IgE binden können. Erkennt dieses so mit der Zelle assoziierte IgE-Molekül sein Antigen, wird die jeweilige Zelle aktiviert. IgE agiert daher als „erworbener“ Rezeptor. [5, S. 15]

Die meisten Antikörper im Serum sowie im Extrazellularraum gehören zur Klasse der IgG-Antikörper. Es werden die vier Subklassen IgG1-IgG4 unterschieden. Sie können ein weites Spektrum an Reaktionen auslösen. Beispielsweise durchlaufen manche IgG-Moleküle nach Antigenerkennung eine geringe Konformationsänderung. Sie können sich daraufhin an ein zweites IgG-Molekül anlagern. Diese können nun wiederum den Komplementfaktor C1q aktivieren. Auch können NK-Zellen IgG-Antikörper auf Pathogenen über einen Fc-Rezeptor binden und im Anschluss das Pathogen abtöten. Viele weitere Funktionen sind bekannt. [5, S. 13 - 14, S. 69 - 75]

2.3.5 B-Zell-Entwicklung

2.3.5.1 B2-Zell-Entwicklung

Auch die Vorläufer der B2-Zellen durchlaufen bis zur Entstehung einer reifen, naiven B-Zelle diverse Zwischenstadien. Der größte Teil dieses Reifeprozesses läuft im Knochenmark ab. Die letzten Schritte finden in der Milz statt. Auch die B-Zellen unterliegen hierbei der Wächterfunktion einer zentralen Toleranz. In der T-Zell-Entwicklung induziert diese bei Ausbildung von Autoreaktivität meist direkt den Untergang der betreffenden Zelle. Demgegenüber existieren in der B-Zellreihe zwei Anpassungsmöglichkeiten, falls der BCR eine zu hohe Affinität zu körpereigenen Strukturen aufweist. Es handelt sich um die Rezeptoredition und die Rezeptormodulation. Diese Prozesse können die Apoptose gegebenenfalls noch abwenden. [5, S. 110]

Pro-B-Zellen entstehen als erster Entwicklungsschritt direkt aus der hämatopoetischen Stammzelle. Sie exprimieren noch keinen B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. In dieser Stufe wird die schwere Kette des $Ig\mu$ -Rezeptors durch somatische Rekombination gebildet. Hierfür werden – wie für den TCR – die Gene Rag1 und 2 aktiviert. Es handelt sich um einen zweizeitigen Vorgang, daher wird zwischen einer frühen und einer späten Pro-B-Zelle unterschieden. Misslingt die Bildung einer stabilen μ -H-Kette, stirbt die Zelle im Rahmen der negativen Selektion ab, da sie keine Überlebenssignale des Prä-BCR empfangen kann. Oberflächenmarker der Pro-B-Zelle sind Kit (CD117), der IL-7-Rezeptor und CD43. Eine späte Pro-B-Zelle beginnt zudem, CD24 zu exprimieren ($CD24^{low}$). [13, S. 192 - 195] [26] [9, S. 383]

Nach Bildung einer schweren μ -Kette, wird diese zusammen mit einem Leichtkettensatz sowie den Signalmolekülen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ auf der Zelloberfläche als Prä-B-Zellrezeptor exprimiert. Dieser definiert die große Prä-B-Zelle. Ein Ligand des Prä-BCR ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dieser werde durch die Zusammenlagerung der Einzelkomponenten aktiviert. Der Rezeptor induziert eine starke Proliferation der Prä-B-Zelle. Hierbei wird zum Beispiel die BTK aktiviert, welche auch in den weiteren Entwicklungsschritten essenziell ist. Auch arretiert der Prä-BCR die somatische Rekombination auf den IgH -Loki der Chromosomen. Das Allel, welches für die gebildete, schwere Kette kodiert, wird weiter abgelesen. Alle anderen Allele wurden bisher erfolglos rekombiniert oder sie werden nun in

ihrer Keimbahninformation stillgelegt. Hierdurch wird sichergestellt, dass ein B-Zellklon nur Antikörper einer einzigen Spezifität produzieren kann. Dieses Prinzip wird als „allelic exclusion“ bezeichnet. Auch induziert der Prä-BCR die Bildung einer κ -Leichtkette durch somatische Rekombination der entsprechenden Gene. Während dieses Vorgangs wird die schwere μ -Kette nicht mehr auf der Zelloberfläche, sondern nur noch intrazellulär präsentiert. Es wird also kein Prä-BCR mehr exprimiert. Die Zelle wird als kleine Prä-B-Zelle bezeichnet. Zunächst wird versucht, durch die Rekombination einer der beiden κ -Allele eine passende Leichtkette zu generieren. Bleibt dies erfolglos, wiederholt die Zelle den Vorgang mit den λ -Leichtkettenallelen. Sobald eine funktionsfähige Kette gebildet wurde, wird der Prozess arretiert. Dies garantiert, dass nur eine Leichtkettenart im späteren Antikörper vertreten ist. Dieses Prinzip wird als „light chain isotype exclusion“ bezeichnet. Kann keine stabile Leichtkette gebildet werden, wird die Zelle apoptotisch. Prä-B-Zellen exprimieren kein Kit mehr, dafür jedoch BP-1. Auch wird CD24 stark exprimiert (CD24^{high}). Die restlichen Marker sind identisch zur Pro-B-Zelle. [9, S. 384, 13, S 195 - 196]

Ist durch die VJ-Umlagerung eine funktionsfähige Leichtkette entstanden, wird der nun vollständige IgM-BCR in Assoziation mit Ig α und Ig β auf der Zelloberfläche exprimiert. Es handelt sich um eine unreife B-Zelle (immature B-cell). Der BCR ist entscheidend für das Überleben der B-Zelle. Ähnlich dem Prä-BCR, übermittelt er – auch ohne explizite Antigenbindung – Überlebenssignale ins Zellinnere. In diesem Entwicklungsstadium wird die B-Zelle im Knochenmark erstmals auf Autoreaktivität hin überprüft. Besitzt der BCR eine hohe Affinität zu körpereigenen Strukturen, wird die Zelle durch die Mechanismen der zentralen Toleranz entweder apoptotisch oder anerg. Im Gegensatz zu T-Zellen haben autoreaktive, unreife B-Zellen die Möglichkeit, ihren Rezeptor, genauer ihre leichten Ketten, nachträglich zu modifizieren. So können sie dem Mechanismus der zentralen Toleranz entgehen. Dies ist möglich, da die Rag-Proteine nach Bildung einer funktionalen Leichtkette nicht sofort inaktiviert werden. Durch eine erneute Genumlagerung kann ein neues Leichtkettenmolekül generiert werden. Die Spezifität des BCR verändert sich hierdurch. Dieser Vorgang wird als Rezeptor-Editing bezeichnet. Autoreaktive, unreife B-Zellen mit niedriger Antigenaffinität können aber unter Umständen der zentralen Toleranzinduktion entgehen. Die hieraus entstehenden, autoreaktiven B-Zellen werden als klonal ignorant bezeichnet. Unreife B-Zellen exprimieren den IgM-Rezeptor in hoher Konzentration auf ihrer Oberfläche, (IgM^{high}), allerdings nur geringe Mengen IgD (IgD^{low}). [9, S. 390 - 294] [13, S. 192 - 196] [27]

Die unreifen B-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in die Milz ein. Hier durchlaufen sie als transitionale B-Zellen die beiden Durchgangsstadien T1 und T2. T1-Zellen besitzen kein CD21, während die B-Zellen des T2-Stadiums diesen Teil des B-Zell-Corezeptors bereits exprimieren. Nach dem T2-Stadium zirkuliert die große Mehrheit der B-Zellen auf der Suche nach ihrem Antigen durch den Körper und die Lymphfollikel. Sie werden jetzt als reife (mature) oder follikuläre B-Zellen bezeichnet. Durch alternatives Splicen der IgM-RNA exprimieren reife B-Zellen nur noch wenig des eigentlichen IgM-BCR (IgM^{low}), dafür jedoch große Mengen des IgD-BCR (IgD^{high}). Ähnlich den IgD-Antikörpern (vgl. Abschnitt 2.3.4) ist über die genaue Funktion des IgD-Rezeptors nur wenig bekannt. [9, S. 396] [13, S. 196 - 199] Nach

Antigenerkennung entwickeln sich die folliculären B-Zellen zu Plasmablasten, Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. [13, S. 251 - 254]

Einige der T2-Zellen differenzieren sich jedoch nicht zu folliculären, sondern zu B-Zellen der Randzonen (marginal zone B-cells). Beim Menschen findet sich dieser B-Zelltyp vor allem in der weißen Pulpa der Milz, kann aber auch in peripheren Lymphknoten vorkommen. In Mäusen sind diese Zellen nur in der Milz anzutreffen. [13, S. 198] Dieser B-Zellsubtyp hat die Besonderheit, dass er sehr schnell und ohne die Anwesenheit von T-Helferzellen aktiviert werden kann. Die B-Zellen differenzieren sich daraufhin zu kurzlebigen Plasmazellen (short-lived plasma cell), welche IgM-Antikörper sezernieren. Im Vergleich zu den in der Keimzentrumsreaktion entstandenen Antikörpern, können diese nur ein begrenztes Spektrum an pathogenen Strukturen erkennen. Besonders in der Immunreaktion auf Polysaccharidantigene sind solche schnell produzierten IgM-Antikörper jedoch essenziell. Polysaccharide finden sich in großer Zahl in der Wand von bekapselten Bakterien wie Meningokokken oder Pneumokokken. Die IgM-Antikörper binden diese und verhindern somit eine überschießende Immunantwort auf die hochgradig immunogen wirkenden Bakterienkapseln. Patienten ohne Milz haben insofern ein stark erhöhtes Risiko zur Entwicklung dieser überschießenden Immunreaktion, genannt overwhelming post-splenectomy infection (OPSI). [26] [28, S. 390 - 394] Folliculäre, reife B-Zellen können in Abgrenzung zu unreifen B-Zellen als IgM^{low} + IgD^{high} beschrieben werden. Alternativ kann man sie auch als positiv für CD21 und CD23 (FcεRII) klassifizieren. Demgegenüber sind die B-Zellen der Randzone hoch positiv für CD21 (CD21^{high}), jedoch negativ für CD23. [27]

2.3.5.2 B1- Zell-Entwicklung

Die B-Zellen der B1-Linie leiten sich von Vorläuferzellen in der fetalen Leber ab. Diese sind im adulten Organismus vor allem in der Peritoneal- und Pleurahöhle anzutreffen. In Relation zu den B2-Zellen sind die B1-Zellen deutlich in der Minderheit, weisen jedoch einige Besonderheiten auf. Sie werden nicht dem adaptiven, sondern dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Auch können sie sich selbst erneuern, rekrutieren sich daher nicht aus einer Stammzellpopulation. [9, S. 399 - 401] [29]. B1-Zellen teilen viele Gemeinsamkeiten mit den B-Zellen der Randzonen. Sie können IgM-Antikörper sezernieren, ohne hierbei auf die Aktivierung durch eine T-Helferzellen angewiesen zu sein. Andererseits können diese Antikörper nur ein begrenztes Antigenpektrum binden. [9, S. 400] Es sind bisher zwei Subpopulationen der B1-Zellen bekannt, B1a- und B1b-Zellen. Beide Untergruppen sind positiv für CD43, jedoch sind ausschließlich die B1a Zellen positiv für CD5, woran die beiden Subpopulationen in der Durchflusszytometrie unterschieden werden können. [29, 30] B1-Zellen sezernieren durchgehend eine geringe Menge Antikörper gegen obligat pathogene Strukturen. Hierbei haben sie eine gewisse Präferenz für Polysaccharidantigene, worin sie wiederum den B-Zellen der Randzone gleichen. Da sie diese Antikörper ohne Hinweis auf eine konkrete Infektion sezernieren, werden diese auch „natürliche Antikörper“ genannt. Es wird vermutet, dass bis zu 50% der IgA-produzierenden Plasmazellen in einer Schleimhaut aus der B1-Linie abstammen. Der genaue Funktions- und Wirkungsbereich der B1-Zellen bzw. ihrer

Subtypen ist aktuell noch Gegenstand der Forschung. Auch leiten sich diese Informationen aus Mausmodellen ab. B1-Zellen wurden 2011 erstmalig im Menschen nachgewiesen. Auch hier ist die genaue Funktion noch Gegenstand der Forschung. [31]

2.3.6 Entwicklung zur Plasmazelle

Zur Aktivierung einer reifen, naiven B-Zelle sind zwei Signale erforderlich. Das erste Signal stellt immer die Antigenerkennung durch den BCR dar. Bei einem Proteinantigen bedeutet dies, dass die B-Zelle auf der Suche nach ihrem Antigen in ein sekundäres lymphatisches Organ eingewandert ist. Hier wurde ihr in der B-Zell-Zone (primärer Follikel) von einer folliculären dendritischen Zelle (FDC) oder einem Makrophagen ein passendes Antigen präsentiert. Daraufhin wandert die B-Zelle an die Grenze zur T-Zellzone, wo ihr das zweite Aktivierungssignal durch eine folliculäre T-Helferzelle vermittelt wird. Dies setzt voraus, dass bereits eine naive T-Zelle in der T-Zellzone durch jenes Antigen aktiviert wurde. Sie muss den Reifeprozess zur folliculären T-Helferzelle erfolgreich vollzogen haben. Damit die folliculäre T-Zelle der B-Zelle das Signal übermitteln kann, müssen die beiden Zellen in räumliche Nähe zueinander treten. Hierfür internalisiert die B-Zelle das in der B-Zellzone dargebotene Antigen. Es wird prozessiert und an einem MHC-II-Komplex gebunden auf der Oberfläche der B-Zelle exprimiert. An diesen Komplex kann die T-Zelle binden. Als „kognate Interaktion“ wird der Umstand bezeichnet, dass B- und T-Zelle dasselbe Antigen, jedoch an unterschiedlichen Epitopen binden.

Die folliculäre T-Zelle exprimiert CD40L (CD154) auf ihrer Oberfläche, welcher durch den CD40-Rezeptor auf der B-Zelle erkannt wird. Diese Bindung, weitere Rezeptor-Ligand-Interaktionen und andere, von der T-Zelle sezernierte Zytokine wirken als Proliferations- und Differenzierungsreiz auf die B-Zelle. Es entsteht ein Primärfokus und ein Keimzentrum (*germinal center*). Die B-Zellen entwickeln sich nun entweder zu Plasmazellen oder Plasmablasten. Für den Ablauf dieses Prozesses ist die Anwesenheit einer T-Zelle notwendig. Proteinantigene werden deshalb auch thymusabhängige Antigene (TD-Antigene) genannt. [9, S. 518 - 521] [5, S. 87 - 90]

Demgegenüber gibt es auch Antigene, welche B-Zellen in Abwesenheit von T_{FH}-Zellen aktivieren können. Diese werden als thymusunabhängige Antigene (TI-Antigene) bezeichnet. Es kann weiter in TI-1 und TI-2-Antigene differenziert werden. Bei den durch TI-Antigene aktivierten B-Zellen handelt es sich meist um B1-Zellen oder B-Zellen der Randzone. Diese großen Moleküle besitzen viele repetitiven Sequenzen, beispielsweise LPS aus der Bakterienzellwand. Jene werden durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf der B-Zelloberfläche gebunden, woraufhin ein Aktivierungssignal ins Zellinnere weitergeleitet wird. Die so aktivierten B-Zellen proliferieren und differenzieren sich. Es entstehen kurzlebige Plasmazellen. Deren Antikörper wurden nicht durch somatische Rekombination gebildet und haben auch keinen Prozess der Affinitätsreifung durchlaufen. Es handelt sich daher meist um Antikörper der IgM-Klasse, welche eine im Vergleich niedrige Affinität zu ihrem Antigen

aufweisen. Deren Bildung erfolgt allerdings innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls. [9, S. 519 - 521, S. 545 - 549, 13, S. 251 - 255]

Wurde eine naive B-Zelle von einer T_{FH} -Zelle aktiviert, kann sie zwei mögliche Entwicklungsrichtungen einschlagen. Entweder sie bildet einen Primärfokus aus oder sie tritt in die Keimzentrumsreaktion ein. Diese Abläufe sind sowohl räumlich als auch funktionell zu unterscheiden. Ein Primärfokus findet sich in den Marksträngen der Lymphknoten. Die B-Zellen proliferieren hier und entwickeln sich zu Plasmablasten. Dieser Zelltyp sezerniert IgM-Antikörper zu Beginn der Immunantwort, hat hiervor allerdings noch nicht den Prozess der somatischen Hypermutation durchlaufen. Es handelt sich wahrscheinlich um kurzlebige Zellen. [9, S. 527 - 531]

Wandert die B-Zelle in einen primären Follikel ein, kann sie hier in die Keimzentrumsreaktion eintreten. Es handelt sich nun um einen sekundären Follikel. Die B-Zelle durchläuft nun die somatische Hypermutation sowie den Prozess der Affinitätsreifung. Auch kann ein Wechsel der Antikörperklasse stattfinden. Nach Vollendung der Keimzentrumsreaktion wird die B-Zelle entweder zur Plasma- oder zur B-Gedächtniszelle. Der Transkriptionsfaktor Blimp-1 legt dabei die Entwicklung zur Plasmazelle fest. Nach Beendigung dieses Vorgangs verlässt die Plasmazelle das Keimzentrum. Sie wandert nun entweder in periphere (lymphatische) Gewebe wie Lymphknoten, Milz oder Mukosa oder in das Knochenmark ein. Periphere Plasmazellen besitzen nur eine recht kurze Lebensspanne (short-lived plasma cell). Knochenmarksständige Plasmazellen können jedoch über Jahrzehnte Antikörper produzieren (long-lived plasma cell). Es wird vermutet, dass fast die Hälfte der Antikörper im menschlichen Blut von diesen langlebigen Plasmazellen gebildet werden. [5, S 89 - 90] [9, S. 529 - 548] [13, S. 269 - 274]

Die genaue Abfolge der Entwicklungsschritte zwischen B- und Plasmazelle ist aktuell noch Gegenstand der Forschung. Auch in der Frage nach dem zeitlichen Ablauf sowie der Nomenklatur des Plasmablasten herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Der Primärfokus wird von manchen Autoren nicht als parallele Entität neben dem Keimzentrum betrachtet. Sie sehen ihn vielmehr als Entwicklungsschritt, welcher diesem vorausgeht. Jene Zellen, welche die IgM-Bildung zu Beginn der Immunantwort induzieren, werden nicht als Plasmablasten, sondern als kurzlebige Plasmazellen bezeichnet. Einige der aktivierten B-Zellen aus dem Primärfokus wandern in diesem Modell – einem Chemokingradient der folliculären dendritischen Zellen folgend – in den Follikel ein und formen daraufhin das Keimzentrum. Als Plasmablasten werden hier jene Zellen bezeichnet, die aus der Keimzentrumsreaktion hervorgehen. Sie verlassen dieses und wandern in das Knochenmark ein, sind daher als Vorläuferzellen der langlebigen Plasmazellen zu verstehen. In beiden Modellen tragen Plasmablasten sowohl Merkmale von B-, als auch von Plasmazellen. Sie sind in begrenztem Umfang zum Antikörperklassenwechsel imstande. Ob sie auch zur somatischen Rekombination fähig sind, genauso wie die Frage nach ihrer weiteren Entwicklung, ist Gegenstand der Forschung. [9, S. 527 - 549] [13, S. 260 -274] [32] Langlebige Plasmazellen finden sich vor allem im Knochenmark. In wesentlich geringerer Zahl kommen sie aber auch

in anderen, lymphatischen Geweben vor. CD138 ist der entscheidende Marker zur Identifikation dieser Plasmazellen (CD138^{high}). Es wurde allerdings gezeigt, dass CD138 nicht exklusiv auf Plasmazellen exprimiert wird. Er wird auf diversen Progenitorzellen der B-Zellreihe gebildet (CD138^{low}). In diesen Zellpopulationen ist dessen Dichte auf der Zelloberfläche aber etwa zehnfach geringer. [32] [33, 34]

2.4 NFAT

2.4.1 Einführung

Die Erstbeschreibung von NFAT erfolgte im Jahr 1988. Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor mit der Aktivierung des Interleukin-2-Gens im Kern von T-Lymphozyten assoziiert ist. Er wurde daraufhin *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) genannt. [35] Seither wurden mehrere Familienmitglieder, jeweils exprimiert in verschiedenen Isoformen, entdeckt. Die einzelnen Familienmitglieder und sogar Isoformen eines Mitglieds können gleiche, unterschiedliche oder teils sogar entgegengesetzte Wirkungen vermitteln. Auch unterliegen sie mitunter anderen Regulationsmechanismen. [11] NFAT ist essenziell in der Entstehung, Entwicklung und Aktivierung von Immunzellen, da es die Transkription diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Es ist entscheidend für die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-, Th2-, Th17- oder iTreg-Zellen. [11, 21] [36]

Jedoch ist NFAT auch in einer Vielzahl anderer Körperzellen und für verschiedenste Funktionen von Bedeutung. Beispielsweise wird mindestens ein NFAT-Mitglied in nahezu jeder Körperzelle exprimiert. NFAT wird während der Entwicklung von Pankreas, Neuronen, Blutgefäßen und aller Muskelarten benötigt. Auch in der Embryogenese und hämatopoetischen Entwicklung ist es von Relevanz. [10] [37]

NFAT ist zudem an Stoffwechselprozessen beteiligt. Es wurde nachgewiesen, dass NFATc1 die Expression von GLUT1 und GLUT3 auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen reguliert. Es spielt damit eine Schlüsselrolle in der Glykolyse der T-Zellen. [38, 39]

Des Weiteren ist NFAT in der Anergie-Induktion in reifen T-Zellen involviert. Diese findet statt, wenn der TCR ein passendes Antigen bindet, jedoch kein zweites Signal über den Corezeptor CD28 erhält. Infolgedessen wird zwar der Calcium-Calcineurin-, nicht jedoch die MAPK- und NF-κB-Signalwege aktiviert. Folglich kann sich NFAT nicht mit AP-1, sondern muss sich stattdessen mit anderen Transkriptionsfaktoren zusammenlagern oder es wirkt als Homodimer. Dies führt zum Abbau einiger Signaltransduktionsmoleküle, was Anergie in der T-Zelle induziert. [40]

An der Ausbildung der T-Zell-Erschöpfung (*exhaustion*), also der Hochregulation von inhibitorischen Membranproteinen und einer damit einhergehenden Funktionseinschränkung ist NFAT ebenfalls beteiligt. Dieses Phänomen tritt im Rahmen von chronischen Infektionen oder Krebserkrankungen auf. [41]

2.4.2 NFAT-Familienmitglieder und Grundstruktur

2.4.2.1 NFAT-Familienmitglieder

Es werden fünf Mitglieder der NFAT-Familie unterschieden. Hierbei handelt sich um NFATc1 (NFAT2), NFATc2 (NFAT1), NFATc3 (NFAT4), NFATc4 (NFAT3) sowie NFAT5 (TonEBP).

NFATc1 – c3 sowie NFAT5 sind die NFAT-Mitglieder, welche in Lymphozyten exprimiert werden, wobei NFATc2 und mehr noch NFATc1 die vorherrschenden Vertreter der NFAT-Familie in peripheren T-Effektor- und B-Zellen sind. [10, 42]

NFATc3 ist der Hauptvertreter der Transkriptionsfaktorfamilie im Thymus. Auf bisher wenig untersuchte Weise ist es entscheidend für den Übergang der Thymozyten vom DP- zum SP-Stadium. (vgl. Abschnitt 2.2.4) [42]

NFATc4 wird ausschließlich in nichtimmunologischen Geweben, wie z.B. Adipozyten exprimiert. Es ist daher hier nur von untergeordnetem Interesse. [43]

Während NFATc1-c4 in der Regel über den Calcium-Signalweg aktiviert werden, nimmt NFAT5 eine Sonderstellung ein. Es ist aus evolutionärer Sicht das älteste Mitglied der NFAT-Familie und kommt in nahezu allen Körperzellen vor. NFAT5 wird ausschließlich durch osmotischen Stress induziert, unterliegt daher nicht dem Calcium-Calcineurin-Signalweg. Daher ist es für unsere Arbeitsgruppe ebenfalls nur von sekundärem Interesse. [37, 44]

2.4.2.2 NFAT-Grundstruktur

In jedem NFAT-Protein werden im Zentrum zwei übergeordnete Bereiche voneinander abgegrenzt. Zum einen die hochkonservierte DNA-Bindungsstelle, welche auch als *Rel-homology region* (RHR) oder *DNA-binding domain* (DBD) bezeichnet wird, sowie zum anderen die N-terminal der RHR gelegene Regulationsdomäne von NFAT, die *NFAT-homology region* (NHR).

In der RHR finden sich zudem mehrere Stellen für die Anbindung des Jun- sowie eine Sequenz für die Bindung des Fos-Proteins. Proteine der Jun- und Fos-Familien bilden – gemeinsam mit weiteren Proteinen – das Heterodimer AP-1. Auch findet sich hier eine NLS (*nuclear localization sequence*). Die RHR ist hochkonserviert zwischen allen Mitgliedern der NFAT-Familie, also nahezu identisch. Sie ermöglicht es, dass unterschiedliche NFAT-Mitglieder an dieselbe DNA-Sequenz in Promotor- oder Enhancerregionen binden. [37, 45]

Auch in der NHR existieren Abschnitte mit unterschiedlicher Funktion. Eine NLS ist genauso vorhanden wie ein Kernexportsignal (NES=*nuclear export signal*). Zwei Bindestellen für Calcineurin und die serinhaltigen Regionen SRR 1 und 2 sowie SP 1-3 (SRR/*serine-rich region*; SP/*serine-proline motive*) sind ebenfalls anzutreffen. SRR und SP unterscheiden sich in ihrer

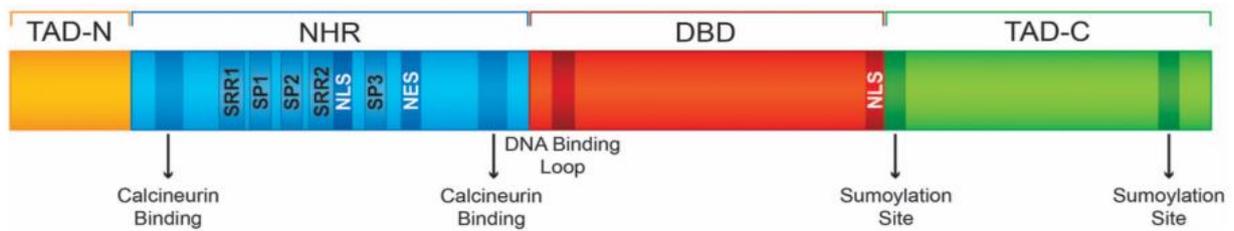


Abbildung 6: Ein NFAT-Transkriptionsfaktor besteht aus einer DBD und einer NHR. Am C-terminalen Ende findet sich meist (TAD-C), am N-terminalen Ende immer eine Transaktivierungsdomäne (TAD-N). Die Abbildung wurde aus Mognol et al. übernommen. [45]

Aminosäuresequenz. In beiden Motiven liegen aber viele Aminosäuren der Art Serin vor. Im inaktiven Zustand des Transkriptionsfaktors – NFAT befindet sich im Zytoplasma – sind diese phosphoryliert. Im Gegensatz zur RHR bestehen in der NHR Unterschiede zwischen den einzelnen Familienmitgliedern. Durch alternatives *Splicen* sowie den Gebrauch anderer Promotorsequenzen oder Polyadenylierungsstellen, können für NFATc1-c4 jeweils mehrere (bei NFATc1 z.B. sechs) Isoformen exprimiert werden. [11] [45] Bei nahezu allen Isoformen von NFATc1-c4 findet sich am C-terminalen Ende eine Transaktivierungsdomäne (TAD-C). Am N-terminalen Ende ist immer eine Transaktivierungsdomäne vorhanden (TAD-N). Je nach Autor wird die TAD-N zur NHR gezählt oder als eigene Entität beschrieben. [10, 45]

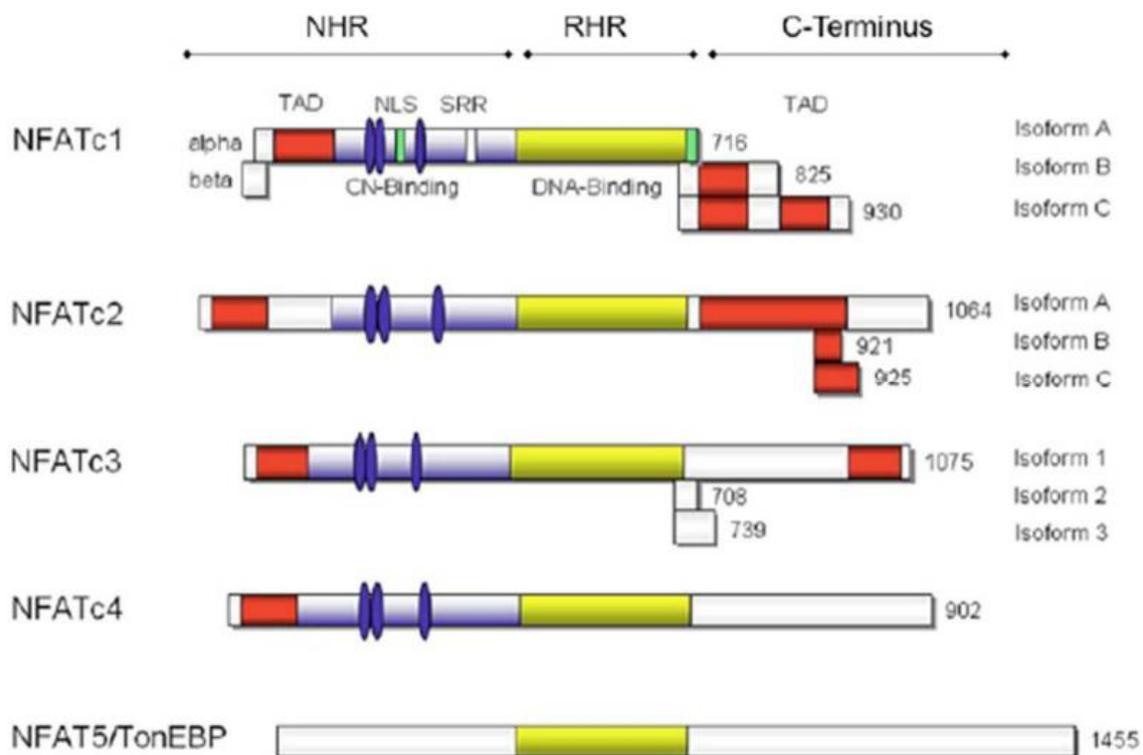


Abbildung 7: Schematische Darstellung aller NFAT-Transkriptionsfaktoren. Die Abbildung wurde aus der Masterarbeit von Dr. M. Qureischi übernommen. Es handelt sich um eine Abänderung einer Abbildung aus dem Review von Serfling et al. [46]

2.4.3 Aktivierung von NFAT

Das Calcineurin-Molekül besteht aus der katalytischen CaN-A- und der regulatorischen CaN-B-Untereinheit. Bei Calcineurin-B können die beiden Isoformen CaN-B1 und CaN-B2 unterschieden werden. CaN-B2 wird nur im Hoden exprimiert. [47] Erhöht sich im Rahmen des Calcium-Signalwegs die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, binden Ca^{2+} und Calmodulin an die CaN-B Untereinheit und überführen die Serin/Threonin-Phosphatase so in ihren aktiven Zustand. Diese kann daraufhin an ihrer Bindungsstelle in der NHR von NFAT ansetzen. Dieser hochkonservierte Bereich besitzt die Aminosäuresequenz PXIXIT. Der Buchstabe X repräsentiert hierbei eine beliebige Aminosäure. [37] Calcineurin dephosphoryliert nun die Serinreste der SRR und SP. NFAT durchläuft eine Konformationsänderung, in deren Folge die NLS freigelegt werden. Der aktivierte Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern. Mittels der RHR bindet NFAT an entsprechende Promotor- und/oder Enhancerregionen auf der DNA. Über die TAD wird die Transkription von Genprodukten initiiert oder inhibiert. Die Affinität von NFAT zum DNA-Strang ist nicht sehr hoch. Es bindet daher meist in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren an die DNA. [36] Als erstes beschrieben wurde hier AP-1. Dessen Anwesenheit ist in der T-Zell-Aktivierung und bei der Regulation von IL-2 und den meisten anderen Zytokingenen von zentraler Bedeutung. [37]

2.4.4 Inaktivierung von NFAT

Wenn sich das durch den Calciumsignalweg übermittelte Aktivierungssignal abschwächt oder erlischt, werden die Serinreste der SRR und SP erneut phosphoryliert. NFAT wird dadurch inaktiv und im Anschluss aus dem Zellkern in das Zytosol exportiert. Die Phosphorylierung der Serinreste wird durch NFAT-Kinasen kontrolliert. Funktionell werden hier zwei Gruppen unterschieden. *Maintenance*-Kinasen im Zytosol halten NFAT in Abwesenheit eines Aktivierungssignals im Ruhezustand, indem sie die vorhandene Phosphorylierung der Serinreste aufrechterhalten. *Export*-Kinasen befinden sich im Zellkern. Sie phosphorylieren das aktive NFAT, wodurch es inaktiviert und somit der Kernexport veranlasst wird. Die vier NFAT-Kinasen CK1, GSK3, DYRK1 und 2 sind bisher bekannt. (vgl. **Abbildung 2**) Jede Kinase phosphoryliert eine oder wenige serinhaltige Regionen. Eine Kinase kann sowohl als *Maintenance* -, als auch als *Export*-Kinase wirksam sein. [10, 48]

2.4.5 Natürliche Regulationsebenen von NFAT

Das wichtigste Aktivierungssignal für den Übergang von NFAT aus der ruhenden in die aktive Zustandsform ist die Dephosphorylierung der Serinreste. Diese wird durch Calcineurin am Ende des Calciumsignalwegs vollzogen. Die Aktivierung von NFAT wird jedoch auch noch auf anderen Ebenen reguliert.

Calcineurin (CN) wird durch den Calcium/Calmodulin-Komplex aktiviert. Es wird allerdings auch durch einige Moleküle, z.B. MCIP1, CABIN1, AKAP79 oder DSCR1 inhibiert. Bei diesen Proteinen handelt es sich somit um endogene Calcineurin-Inhibitoren (CNI/Calcipressine) (vgl. auch **Abbildung 2**) [37, 49]

Diverse Gerüst-Proteine interagieren mit NFAT und beeinflussen so dessen Aktivität. Beispielsweise supprimieren NRON und Caspase 3 die Aktivierung von NFAT. (vgl. **Abbildung 2**) [10]

Für manche NFAT-Isoformen wurden Mechanismen der posttranslationalen Modifikation beschrieben. Die Aktivität von NFATc1/C, einer langen Isoform von NFATc1, wird beispielsweise durch Sumoylierung reguliert. [50] [51, 52]

Die Bindungsaffinität von NFAT zur DNA ist recht schwach ausgeprägt. NFAT kooperiert daher häufig mit anderen Transkriptionsfaktoren, was schon für AP-1 erwähnt wurde. Je nach Bindungsmotiven in der Nähe der NFAT-Erkennungsstelle auf der DNA und je nach Anwesen- und Beschaffenheit eines zweiten Transkriptionsfaktors, kann NFAT unterschiedliche Wirkungen initiieren.

Auch wurde inzwischen in DN-Thymozyten ein neuer, IL-7-abhängiger, aber CN-unabhängiger Aktivierungsweg von NFATc1 entdeckt. (vgl. Abschnitt 2.4.8) [53]

2.4.6 Pharmakologische Interaktionsmöglichkeiten

Jede Regulationsebene bietet ein mögliches Ziel für eine pharmakologische Interaktion mit NFAT. Aktuell existieren mindestens vier Moleküle, welche durch die indirekte oder direkte Inhibition der NFAT-Aktivierung ihre Wirkung entfalten. Es handelt sich um Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus (FK506), VIVIT und ZIZIT. Die erstgenannten beiden Wirkstoffe sind Pharmaka, welche seit Jahrzehnten in der klinischen Praxis als Immunsuppressiva angewendet werden. VIVIT und ZIZIT sind experimentelle Wirkstoffe, genauer gesagt Peptide, die der PXXIT-Domäne in den NFAT-Proteinen entsprechen, aber eine höhere und damit kompetitive Affinität zu CN aufweisen.

CsA und FK506 sind pharmakologische Calcineurin-Inhibitoren (im Gegensatz zu den endogenen CNI MCIP1, CABIN1 etc.). Im Verlauf des Calciumsignalwegs wird die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin aktiviert, welche daraufhin NFAT in seine aktive Form überführt. Cyclosporin A formt mit dem Protein Cyclophilin A, Tacrolimus mit dem FK-

bindenden Protein (FKBP) einen Komplex. Beide Komplexe binden Calcineurin an unterschiedlichen Stellen, wodurch dessen Aktivierung verhindert wird. Calcineurin wird von vielen Zelltypen exprimiert, wobei die Konzentration in T-Zellen recht gering ist. Diese reagieren daher besonders stark auf die beiden Immunsuppressiva. [9, S. 350] [54] In der Klinik finden die beiden Medikamente Verwendung zur Therapie von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Psoriasis vulgaris. [55, 56] Es wird die fehlgeleitete, überschießende Immunreaktion abgemildert. Der zweite große Einsatzbereich der Calcineurininhibitoren ist die Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Stammzelltransplantationen.

Beide Pharmaka hemmen NFAT nur indirekt. In nahezu jedem Gewebetyp wird zumindest ein NFAT-Mitglied exprimiert. Auch vermittelt Calcineurin über die NFAT-Aktivierung hinaus noch weitere Wirkungen. Entsprechend haben CNI ein weites Nebenwirkungsspektrum. Nephrotoxizität, Neurotoxizität, arterielle Hypertonie, Infektanfälligkeit und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Zweitmalignoms sind einige davon. [57] Auch reduzieren Calcineurininhibitoren den überlebenswichtigen *Graft-versus-leukemia*-Effekt (GvL) im Anschluss an eine Stammzelltransplantation deutlich. [58]

Das Molekül VIVIT bindet selektiv an PXIXIT, eine der beiden Aminosäurestrukturen für die Interaktion mit Calcineurin auf dem NFAT-Molekül. VIVIT inhibiert somit NFAT, ohne Calcineurin in seiner Funktion zu beeinträchtigen. [37] Wie erwartet, waren im Mausmodell keine der CNI-typischen Nebenwirkungen nachweisbar. Insbesondere Nephro- und Neurotoxizität, sowie arterielle Hypertension waren nicht zu beobachten. Aufgrund der ungünstigen Kinetik des VIVIT-Moleküls, wurden keine Versuche über das präklinische Stadium hinaus durchgeführt. [59] ZIZIT ist eine modifizierte Version von VIVIT, welche eine erheblich bessere Dissoziationskonstante als VIVIT aufweist. Ob dieses – bei einem komplizierten Herstellungsverfahren – zukünftig die CNI in der Klinik ersetzen wird, bleibt abzuwarten. [60]

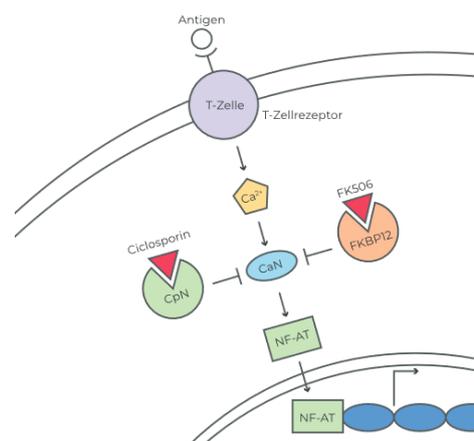


Abbildung 8: Die pharmakologischen Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus bilden mit unterschiedlichen Proteinen Komplexe, welche letztendlich an Calcineurin binden und dessen Aktivierung verhindern. Es wird somit unterbunden, dass NFAT dephosphoryliert und somit in seine aktive Konformation übergeht. Die Abbildung wurde aus dem Buch „Chemische Biologie“ entnommen. [6, S. 209]

2.4.7 NFATc3-Knockout auf Keimbahnebene

Im Vorfeld dieser Arbeit war bekannt, dass NFATc3 der vorherrschende Vertreter der NFAT-Familie im Thymus ist.[61] NFATc1 und NFATc2 werden im Thymus zwar ebenfalls exprimiert, allerdings in deutlich geringeren Konzentrationen als in reifen T- und B-Zellen. NFATc1 tritt vor allem im DN-, NFATc2 im SP-Stadium in Erscheinung. [62] Auch war gezeigt worden, dass Cyclosporin A *in vitro* und *in vivo* die Entwicklung von DP-Thymozyten zu SP-Zellen komplett blockieren kann. [63] Die T-Zell-Reifung im Thymus ist bei *Nfatc2*^{-/-} Mäusen sowie *Nfatc1*^{-/-} fötale Leberchimären oder *Nfatc1*^{f/f}.*Cd4cre* Mäusen nicht beeinträchtigt. Es wurde daher vermutet, dass NFATc3 beim Übergang der Thymozyten vom DP- zum SP-Stadium eine entscheidende Rolle zukommt.

Erstmals züchteten Oukka et al. 1998 eine Knockout-Mauslinie, bei welcher das NFATc3-Gen bereits auf Keimbahnebene deletiert wurde. Durch Verpaarung zweier Keimbahn-Chimären entstanden homozygote Nachkommen. Diese wurden nicht nach Mendelschen Regeln geboren. Der Prozentsatz an geborenen Knockout-Tieren war hierfür zu gering. Dies wurde durch eine erhöhte, intrauterine Mortalitätsrate erklärt. Ein Grund konnte nicht ermittelt werden. Die untersuchten Embryonen waren kleiner als ihre heterozygoten oder wildtypischen Geschwister, zeigten sonst aber keine Auffälligkeiten. Die vitalen c3ko-Mäuse hatten – zumindest bis zum Alter von 14 Monaten – eine normale Lebenserwartung.

Die Anzahl an Thymozyten im DP-Stadium war bei den Knockout-Tieren unverändert. Gleiches war für die Gesamtzellzahl im Thymus zu beobachten. Allerdings war die Zahl an SP-Zellen bei den c3ko-Mäusen um die Hälfte reduziert, ebenso die Anzahl an peripheren T-Zellen. CD4⁺- und CD8⁺-Zellen waren in gleichem Umfang betroffen. Wie vermutet, wirkt NFATc3 also im Übergang vom DP- zum SP-Stadium. Die Ausbildung von SP-Zellen war stark reduziert. Allerdings war sie nicht, wie unter Cyclosporin A-Therapie, komplett erloschen. Hieraus wurde geschlossen, dass NFATc1, NFATc2 oder andere Transkriptionsfaktoren den Funktionsverlust von NFATc3 teilweise kompensieren können.

Im Anschluss wurde nach dem Grund für den Rückgang der SP-Zellen gesucht. Eine Beeinträchtigung der positiven Selektion oder eine verstärkt ablaufende negativen Selektion können hierzu führen. DP-Thymozyten, welche die positive Selektion erfolgreich durchlaufen haben, exprimieren verstärkt CD5, CD69 und den reifen TCR auf ihrer Oberfläche. Durchflusszytometrische Untersuchungen an NFATc3-defizienten SP-Zellen zeigten keinen Defekt im TCR oder in der Ausbildung von CD5 und CD69. Zwar war eine verringerte Konzentration an CD5- und CD69-positiven Zellen nachweisbar, allerdings war diese konsistent zur Reduktion der SP-Zellzahl. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die positive Selektion durch die Abwesenheit von NFATc3 nicht beeinflusst wird.

Nun wurden DP-Thymozyten in einem *In-vitro*-Modell der negativen Selektion untersucht. Es zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate der NFATc3-defizienten Zellen. Thymozyten neigen also in Abwesenheit von NFATc3 zur Apoptose. Es wurde gefolgert, dass die Anwesenheit von NFATc3 DP-Thymozyten vor einer zu starken negativen Selektion schützt.

Die periphere Zahl an CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in der c3ko-Maus war verringert. Allerdings exprimierten eine prozentual höhere Anzahl Zellen die Marker CD44^{high} in Abwesenheit von CD62L (CD62^{low}). Die geringere periphere T-Zellzahl könnte also zum Teil auch durch eine verstärkte, periphere Aktivierungsneigung ausgelöst werden. Diese würde konsekutiv zu einer erhöhten, aktivierungsassoziierten Apoptoserate führen. Da eine erhöhte Konzentration des Fas-Liganden in Milzzellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine übermäßige FasL-Induktion als hierfür ursächlich postuliert. Da diese Daten jedoch anhand konventioneller *Nfatc3*^{-/-} gewonnen wurden, kann auch ein Wechselspiel zwischen verschiedenen *Nfatc3*^{-/-} - Zellpopulationen mitursächlich für die erhöhte Apoptoserate der peripheren T-Zellen sein. Die Proliferationsrate und Interleukinproduktion der NFATc3-defizienten Milzzellen war nicht beeinträchtigt.

Das Protein Bcl2 wird nur geringfügig im DP-Stadium, aber deutlich vermehrt beim Übergang zum SP-Stadium gebildet. [64] In NFATc3-defizienten Thymozyten war die Bcl2-Konzentration im SP-Stadium stark reduziert. Das im DP-Stadium wirkende NFATc3 könnte also unter anderem über eine Induktion des antiapoptotischen Bcl2 der negativen Selektion entgegenwirken. Ein Versagen der Bcl2-Induktion in NFATc3-defizienten DP-Thymozyten führt daher dazu, dass die Zellen in einem verstärkt ablaufenden, programmierten Zelltod untergehen.

Zusammenfassend orchestriert NFATc3 nach Oukka et al. im Thymus vor allem den Übergang vom DP- zum SP-Stadium. Anders als die Wirkung von Cyclosporin A vermuten lässt, wird nicht die positive Selektion, sondern vielmehr die negative Selektion durch NFATc3 reguliert. Die Autoren postulieren, dass das TCR-Signal in Abwesenheit von NFATc3 verstärkt bzw. die Grenze zwischen positiver und negativer Selektion abgesenkt wird. Es werden somit vermehrt Zellen negativ selektioniert, wodurch die niedrigere Anzahl an SP-Zellen resultiert. Auch die fehlende Induktion des antiapoptotischen Proteins Bcl2 trägt hierzu bei. Das stärkere TCR-Signal erkläre auch die periphere Übererregbarkeit der T-Zellen. Nachweisbar sei diese durch eine erhöhte FasL-Expression mit konsekutiv erhöhter, aktivierungsinduzierter Apoptoserate. [42]

2.4.8 NFATc3-Knockout im Thymus

Von Neilson et al. wurde gezeigt, dass durch eine Deletion der mit *LoxP-sites* versehenen regulatorischen B1-Untereinheit von Calcineurin mittels LckCre die positive Selektion im Thymus vollständig blockiert werden kann. In jenen Zellen findet kein Übergang mehr vom DP- zum SP-Stadium statt. Dabei konnte jedoch in keinem von vier untersuchten Modellen eine Beeinträchtigung der negativen Selektion nachgewiesen werden. Entgegen der These von Oukka et al. vermuteten die Autoren daher, dass NFAT – als Ca²⁺/CN-regulierte Familie – die positive Selektion im Thymus orchestriert. Bei Inaktivität von Calcineurin – und damit fehlender Aktivierung von NFAT – würden die Thymozyten somit nicht verstärkt negativ, sondern in geringerem Umfang positiv selektioniert werden. Die Thymozyten werden also

nicht aufgrund stärkerer TCR-Signale apoptotisch, sondern sterben vielmehr den „Tod durch Vernachlässigung“. Die Regulation der negativen Selektion wird von den Autoren vielmehr einem Protein oder Komplex zugeschrieben, welcher in der Signalkaskade oberhalb von Calcineurin anzutreffen sei. [42, 65]

Vorhergehende Publikationen zeigten nur einen geringen Defekt in der T-Zellentwicklung in Abwesenheit von NFATc1, [66, 67] bzw. keinen Defekt bei Fehlen von NFATc2, wobei diese Untersuchungen meist mit Keimbahnchimären durchgeführt wurden. [68, 69]

Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage kreierten Cante-Barrett et al. zwei neue, NFATc3-defiziente Mauslinien. In dem für NFATc3 kodierenden Allel wurden hierfür drei LoxP-Kassetten um die Neomycin-Kassette und das Exon 3 herum eingebracht. Durch die Meu-Cre40 entstand zunächst die NFATc3^{Δ/Δ}-Mauslinie. Ähnlich der durch Oukka et al. beschriebenen Mauslinie, wird NFATc3 in dieser bereits auf Keimbahnebene deletiert. Es ist somit in keiner Körperzelle mehr anzutreffen. Die vorbeschriebenen, phänotypischen Beobachtungen konnten hier größtenteils bestätigt werden. Entsprechend Oukka et al. zeigte die Analyse der NFATc3^{Δ/Δ}-Maus eine Reduktion in der peripheren T-Zellzahl. Eine Verringerung in der Gesamtzahl der Thymozyten war bei der NFATc3^{Δ/Δ}-Maus ebenfalls nicht nachweisbar. [42, 70]

Mit der *Nfatc3*^{fl/fl}.*Lck-Cre*⁺-Mauslinie kreierten Cante-Barrett et al. anschließend erstmals eine Mauslinie, in welcher NFATc3 selektiv in der T-Zellpopulation und hier erst ab dem DN3-Stadium deletiert wird. Dies ist möglich, da p56^{lck} im Thymus erstmals zwischen dem DN2- und DN3-Stadium exprimiert wird.

In der Basisanalyse der *Nfatc3*^{fl/fl};*Lck-Cre*⁺-Maus wurde zunächst die Konzentrationen von NFATc1 und NFATc2 im Wildtyp (*Nfatc3*^{fl/fl}) mit jenen in der Knockout-Maus (*Nfatc3*^{fl/fl};*Lck-Cre*⁺) verglichen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien. Eine vermehrte oder kompensatorische Expression von NFATc1 und NFATc2 in Abwesenheit von NFATc3 wurde somit als unwahrscheinlich angesehen. Auch konnte die bereits im Vorfeld beschriebene, niedrige Konzentration von NFATc1 und NFATc2 im Verhältnis zu NFATc3 im Thymus bestätigt werden. [62] Es zeigte sich, dass lebende *Nfatc3*^{fl/fl};*Lck-Cre*⁺-Tiere – ähnlich den Keimbahnchimären – phänotypisch kaum von wildtypischen Tieren zu unterscheiden sind. Wie erwartet, konnte eine verringerte Zahl an peripheren T-Zellen nachgewiesen werden. Jedoch wurde in der *Nfatc3*^{fl/fl};*Lck-Cre*⁺-Mauslinie – anders als in den Keimbahnchimären – erstmals eine deutliche Reduktion in der Gesamtzellzahl des Thymus nachgewiesen. Die Autoren folgerten daraus, dass die Deletion von NFATc3 im Thymus eine stärkere Reduktion der Thymozytenzahl zur Folge hat als eine Deletion auf Keimbahnebene.

In der *Nfatc3*^{fl/fl};*Lck-Cre*⁺-Maus war die Zahl an SP-Zellen vermindert. Während die Gesamtzahl an DP-Zellen unverändert blieb, fiel eine Erhöhung der Thymozyten im DN-Stadium auf. Innerhalb der DN-Population war eine erhöhte Zahl an Zellen in der DN3-Phase (CD44^{low}/CD25^{high}) und eine erniedrigte Zellzahl in der DN4-Phase (CD44^{low}/CD25^{low}) nachweisbar. In der DN3-Phase werden den Zellen die Überlebenssignale des Prä-TCR

übermittelt. [71] Da sie bei NFATc3-Ablation in dieser Phase akkumulieren, wurde gefolgert, dass sich NFATc3-defiziente T-Zellen aufgrund fehlerhafter TCR-Signalgebung nicht angemessen entwickeln. Sie werden nicht adäquat positiv selektioniert, sterben somit den „Tod durch Vernachlässigung“. Es resultiert eine geringere DN4-Population, eine verminderte Zellzahl im Thymus sowie eine reduzierte Zahl an peripheren T-Zellen. In einer anschließend durchgeführten *In vivo*-Versuchsreihe zur negativen Selektion zeigten die NFATc3-defizienten DP-Zellen der *Nfatc3^{fl/fl};Lck-Cre⁺*-Zellen keine signifikanten Abweichungen zur Kontrollgruppe. Auch konnte, anders als von Oukka et al. beschrieben, keine Konzentrationsänderung in pro- und/oder antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie in NFATc3-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Hieraus schlossen Cante-Barrett et al., dass die negative Selektion durch die Abwesenheit von NFATc3 nicht beeinflusst wird, wenn NFATc3 ab dem Übergang DN2 → DN3 fehlt.

In Abwesenheit der Calcineurin B1-Untereinheit wurde ein kompletter, in der *Nfatc3^{fl/fl};Lck-Cre⁺*-Mauslinie jedoch nur ein partieller Block der positiven Selektion beobachtet. Es wurde daher vermutet, dass mindestens eines der beiden anderen im Thymus exprimierten NFAT-Mitglieder, also NFATc1 oder NFATc2, den durch NFATc3-Deletion induzierten Block im DN3-Stadium teilweise retten kann. Die daraufhin untersuchten, NFATc2/c3-doppeldefizienten Mäuse zeigten keine Entwicklungsverzögerung im DN3-Stadium durch zusätzliche Abwesenheit von NFATc2. Bis auf kleinere Auswirkungen belegten die Versuche von Cante-Barrett et al. erneut, dass NFATc2 – wenn überhaupt – in der T-Zellreifung nur eine untergeordnete Rolle zukommt. [68, 69].

Obwohl in einer NFATc1-defizienten Maus (fötale Leberchimäre) kein Defekt der positiven Selektion nachgewiesen wurde, war eine verminderte Zellzahl im Thymus und eine verzögerte Repopulation desselbigen sowie anderer, lymphoider Organe vorbeschrieben. [66, 67] Zum Zeitpunkt der Publikation von Cante-Barrett et al. war die Generierung einer NFATc1/c3-doppeldefizienten Mauslinie nicht möglich. Bisher war nur versucht worden, NFATc1 auf Keimbahnebene zu deletieren. Allerdings waren die entsprechenden Embryonen aufgrund kardialer Fehlbildungen nicht lebensfähig. [72] Um diese Problematik zu umgehen, wurde auf eine Mauslinie zurückgegriffen, welche NFATc1 nukleär konstitutiv exprimiert. [73] In dieser *Nfatc1^{nuc}*-Maus konnte NFATc1 durch Zugabe von Doxycyclin supprimiert werden, da das entsprechende Allel unter der Kontrolle eines „tetracycline-responsive operators“ steht. Die Mauslinie wurde mit einer *Rag2^{-/-}*-Mauslinie verpaart. Die Rag-Gene sind für die somatische Rekombination essenziell. (vgl. Abschnitt 2.2.4) Ohne diese kann im Thymus kein (prä-)TCR gebildet werden. Somit findet keine T-Zell-Reifung über das DN-Stadium hinweg statt, da die vom Rezeptor ausgehenden Wachstums- und Differenzierungssignale fehlen. Während sich bei den *Rag2^{-/-}*-Mäusen erwartungsgemäß keine DP-Thymozyten zeigten, waren sie jedoch bei der *Rag2^{-/-};Nfatc1^{nuc}* Mauslinie nachweisbar. Erst durch Zugabe von Doxycyclin wurden erneut keine DP-Zellen mehr gebildet. Dies zeigt, dass NFATc1 die Entwicklung der DN- zu DP-Zellen in Abwesenheit der Überlebenssignale eines Prä-TCR zumindest teilweise retten kann. Der zu einem späteren Zeitpunkt von Patra et al. nachgewiesene, IL-7-abhängige Aktivierungsweg von NFATc1 in DN-Thymozyten bestätigte dies. Hierbei führt eine durch den IL-7-Rezeptor

ausgelöste Signalkaskade zur Phosphorylierung der regulatorischen Region von NFATc1. Dieses wird hierdurch aktiviert. Die IL-7-Signalkaskade ist insofern wichtig für das Überleben der DN-Thymozyten, da sie unabhängig von prä-TCR-Signalen und dem Calciumsignalweg funktioniert. [53] Entsprechend konnte zuvor eine NFATc1-Überexpression die Blockierung der NFATc3-defizienten Thymozyten in DN3 teilweise retten. [70]

Cante-Barrett et al. postulierten, dass in einer NFATc1/c3-doppeldefizienten Mauslinie eine komplette Blockade der positiven Selektion auftreten müsse. Dies entspräche dann dem Effekt bei Inaktivierung von Calcineurin durch Deletion der regulatorischen B1-Untereinheit.

2.4.9 CD4- und Mb1-Cre-Mauslinien

Leider konnten wir für weitere Untersuchungen nicht auf die *Nfatc3^{fl/fl};Lck-Cre⁺*- oder auch nur auf die *Nfatc3^{fl/fl}*-Mauslinie aus dem Crabtree-Laboratorium zurückgreifen, da alle diesbezüglichen Anfragen unbeantwortet blieben. Zur Generierung einer NFATc3-defizienten Mauslinie wandte sich unsere Arbeitsgruppe deshalb an die Wissenschaftler des EUCOMM Projekts in München. Diese kreierten nach der in Skarnes et al. [74] beschriebenen Methode Gen-defiziente Tiere für alle kodierten Proteine.

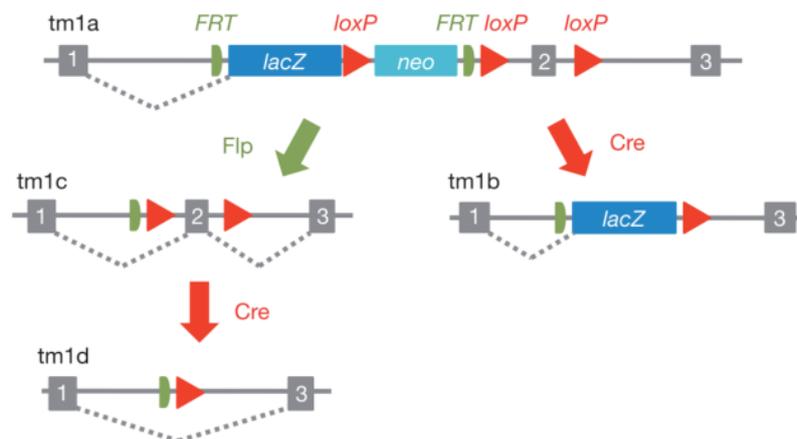


Abbildung 9 zeigt schematisch, wie unter Verwendung des FLP/FRT- Systems sowie der Cre-Rekombinase eine beliebige Knockout-Maus generiert werden kann. Die Abbildung wurde aus Skarnes et al. entnommen. [74]

Die Wissenschaftler von EUCOMM übersendeten uns die tm1a-Maus *Nfatc3^{tm1a(EUCOMM)Hmgu}*. Auch berichteten sie von einer erhöhten Jungtiersterblichkeit in der tm1b-Version der Tiere, was einem konventionellen Knockout entspricht. Durch Verpaarung der heterozygoten *Nfatc3^{tm1a(EUCOMM)Hmgu}*-Mäuse und Applikation des FLP/FRT-Systems generierten wir homozygote Nachkommen. Diese entsprachen der Bezeichnung tm1c in obigem Schema und wurden *Nfatc3^{fl/fl}* genannt.

Zur Untersuchung von NFATc3 in der T-Zellpopulation züchteten wir durch Verkreuzung mit *Cd4cre* eine tm1d-Version der Tiere. Diese wurden *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre* genannt und nachfolgend

untersucht. Das CD4-Antigen tritt in der T-Zellreifung erstmals im DP-Stadium in Erscheinung. In der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie ist NFATc3 deshalb ausschließlich während des Übergangs DN4 → DP und vor allem in DP- und SP-Thymozyten sowie in allen peripheren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen deletiert.

Zur Untersuchung der Funktion von NFATc1 wurde schließlich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen das Exon 3, welches für die regulatorische Domäne von NFATc1 kodiert, mit LoxP-Sequenzen markiert. Die homozygote Maus wurde entweder *Nfatc1^{fl/fl}* oder - nach alternativer Nomenklatur - *Nfat2^{fl/fl}* genannt. [75, 76] Wir verwenden inzwischen die offizielle Nomenklatur, also z.B. NFATc1. Ähnlich der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie, konnte NFATc1 nun mit der entsprechenden Cre-Rekombinase zellspezifisch deletiert werden. Zur Untersuchung von NFATc1 in der T-Zellreihe wurde die *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre*-Maus gezüchtet.

Um die gemeinsame Funktion von NFATc1 und NFATc3 untersuchen zu können, wurde eine doppeldefiziente Mauslinie erzeugt. Diese wurde *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre* genannt.

Zur Erforschung der Funktion von NFATc3 in der B-Zellpopulation wurde die Mb1-Cre in die *Nfatc3^{fl/fl}*-Maus gekreuzt. Das Mb1-Gen kodiert für die Igα-Signaluntereinheit des B-Zellrezeptors. [77] Abgesehen von der Plasmazelle, wird diese in allen Entwicklungsschritten ab der frühen Pro-B-Zelle stark exprimiert. [78] In der *Nfatc3^{fl/fl}.Mb1cre*-Maus ist NFATc3 deshalb in allen B-Zellstadien deletiert.

2.5 Die Graft-versus-Host Disease

2.5.1 Die Stammzelltransplantation

Bei vielen Erkrankungen des hämatologischen Formenkreises ist die Stammzelltransplantation die letzte, aber kurative Therapieoption. Sie findet Anwendung bei malignen Erkrankungen wie akuten und chronischen Leukämien oder in der Rezidivtherapie des Hodgkin-Lymphoms. Auch in der Therapie hereditärer Erkrankungen wie der Thalassämia major oder dem Wiskott-Aldrich-Syndrom werden gelegentlich Stammzellen transplantiert. [9, S. 895] [79]

Ätiologisch wird bei Stammzelltransplantation zwischen autologen und allogenen Transplantationen unterschieden. Bei autologer Transplantation werden dem Patienten körpereigene, aber angereicherte oder subtypen-spezifisch isolierte Immunzellen appliziert, welche ihm im Vorfeld entnommen wurden. Im Gegensatz dazu werden dem Patienten bei der allogenen Transplantation Zellen einer anderen Person zugeführt.

Das Ziel der Stammzelltherapie ist es stets, ein entartetes oder defektes Immunsystem des Patienten zu ersetzen. Bei malignen Erkrankungen erhofft man sich darüber hinaus, dass über den GvL-Effekt verbliebene Tumorzellen erkannt und abgetötet werden. Somit kann ggf. ein Rezidiv der Grunderkrankung verhindert werden. [9, S. 887 - 900]

2.5.2 Ablauf der Stammzelltransplantation

Vor Durchführung einer Stammzelltransplantation wurde über Jahrzehnte hinweg das erkrankte Immunsystem des Patienten vollständig entfernt. Dies sollte verhindern, dass Lymphozyten des Patienten die transplantierten Zellen abtöten (*Host-versus-Graft-Disease/HvGD*). Außerdem sollte für die neuen Zellen „Platz geschaffen“ werden. Nicht zuletzt wollte man möglichst viele der entarteten Zellen abtöten. Als myoablative Behandlungen haben sich die Chemotherapie, die Ganzkörperbestrahlung oder eine Kombination der beiden Verfahren etabliert. [9, S. 724 - 726]

Viele ältere Patienten würden eine hochdosierte Radiochemotherapie nicht überleben. Auch ist diese bei einigen Grunderkrankungen nicht notwendig. Heutzutage werden deshalb meist besser verträgliche, nicht-myoablative bzw. intensitätsreduzierte Regime in der Konditionierungsphase angewendet. [80, 81]

Potenzielle Nebenwirkungen der Radiochemotherapie können unterschiedlichste Gewebe- und Endorganschädigungen sein. Beispiele sind die oropharyngeale Mukositis oder das sinusoidale Obstruktionssyndrom. Auch führt der Mangel an Leukozyten zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Die gravierendste Komplikation der Stammzelltransplantation ist aber die *Graft-versus-Host Disease* (GvHD). [79]

2.5.3 Pathophysiologie der GvHD

Neben den Stammzellen werden bei der Transplantation auch reife Immunzellen inklusive T-Lymphozyten des Spenders auf den Patienten übertragen. Da diese im Thymus des Spenders ausgereift und selektioniert sind, erkennen sie die Körperzellen des Empfängers als fremd. Das resultierende Krankheitsbild wird als GvHD bezeichnet. Besonders gravierend tritt diese in Erscheinung, wenn sich MHC I- und/oder MHC II- Moleküle, in diesem Kontext und auch auf deutsch Haupthistokompatibilitätsantigene genannt, von Spender und Empfänger unterscheiden. Dieser Zustand wird als *major mismatch* bezeichnet. In einem solchen Fall geht die GvHD mit einer hohen Mortalitätsrate einher, weshalb ein *major mismatch* in der Klinik möglichst vermieden wird. [9, S. 724 - 726, S. 887 - 900] [82]

MHC I und MHC II werden im Menschen auch HLA (Humane Leukozyten-Antigene) genannt. Sie präsentieren den T-Zellen Fragmente von körpereigenen Proteinen. Viele weitere Proteine sind polymorph, unterscheiden sich also geringfügig zwischen zwei Personen. Im Gegensatz zu den Haupthistokompatibilitätsantigenen werden diese polymorphen Proteine auch als Nebenhistokompatibilitätsantigene bezeichnet. Die meisten von ihnen müssen noch identifiziert werden. Selbst bei vollständiger Übereinstimmung von MHC I und II reicht der durch diese Proteine induzierte *minor mismatch* aus, um bei bis zu 60% der Patienten eine GvHD auszulösen. [9, S. 889 - 891, 82] Diese entspricht im Prinzip der Immunantwort auf eine schwere, virale Infektion. Die Symptomlast ist bei einem *minor mismatch* im Vergleich zum *major mismatch* in der Regel deutlich geringer ausgeprägt. [9, S. 891]

Es wird die akute (aGvHD) von der chronischen Verlaufsform der GvHD (cGvHD) abgegrenzt. In der klassischen Einteilung tritt die aGvHD innerhalb und die cGvHD nach Ablauf der ersten 100 Tage im Anschluss an eine Stammzelltransplantation auf. In der aktuellen Leitlinie werden für beide Überbegriffe noch weitere Unterformen genannt. Die akute und chronische GvHD unterscheiden sich weniger in ihrem zeitlichen Auftreten, als vielmehr im Hinblick auf Risikofaktoren, Pathophysiologie, Symptomatik, Klassifikationssysteme und therapeutische Optionen. [83]

2.5.4 Die akute GvHD

30-60% aller Patienten entwickeln im Anschluss an eine Stammzelltransplantation eine aGvHD. Die Prävalenz ist hierbei indirekt proportional zum Grad der HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger. [84] In der aktuellen Leitlinie werden drei Formen der aGvHD unterschieden. Die klassische aGvHD, die „late-onset“ aGvHD sowie die persistierende und rekurrende aGvHD. Es sind in erster Linie die Organsysteme Haut, Leber und Darm betroffen. Bei den Symptomen handelt es sich dementsprechend um ein makulopapulöses Exanthem mit Erythrodermie und Juckreiz, wässrige Diarrhoen mit Tenesmen sowie eine Hyperbilirubinämie mit konsekutivem Ikterus. [83] Zur Objektivierung des Schweregrades der GvHD wird den drei Organsystem jeweils ein Punktwert zwischen null und vier zugeordnet. [83]

	Haut	Darm	Leber
	Klinisches Bild	Diarrhoe ml/Tag	Bilirubin mg/dl
0	Kein Erythem/Exanthem	Diarrhoe <500 ml/Tag Kinder: <10ml/kg/d oder < 4x/d	Bilirubin <2 mg/dl (<34 umol/l)
1	Makulopapulöses Exanthem <25% der Körperoberfläche ¹	Diarrhoe 500-1000 ml/Tag ² oder 3 – 6 Stühle/Tag oder Übelkeit ³ Kinder: 10-19,9ml/kg/d oder 4-6x/Tag	Bilirubin 2 – 3 mg/dl (34-51 umol/l)
2	Makulopapulöses Exanthem 25-50% der Körperoberfläche	Diarrhoe 1000-1500 ml/Tag oder > 6 Stühle/Tag ³ Kinder: 20-30ml/kg/d oder 7-10x/Tag	Bilirubin 3 -6 mg/dl (52-102 umol/l)
3	Generalisiertes Exanthem	Diarrhoe >1500 ml/Tag Kinder: >30ml/kg/d oder > 10x /Tag	Bilirubin 6 - 15 mg/dl (103-255 umol/l)
4	Generalisiertes Exanthem mit Blasenbildung und Desquamation > 5% KO	„akuter Bauch“ mit oder ohne paralytischen Ileus blutige Diarrhoe	Bilirubin >15 mg/dl (>255 umol/l)

Abbildung 10: Haut, Darm und Leber sind die primären Zielorgane einer aGvHD. Entsprechend der jeweiligen Klinik werden (beim Menschen) zur Objektivierung des Schweregrades Punktwerte von 0 – 4 vergeben. Die Abbildung wurde aus der Leitlinie zur allogenen Stammzelltransplantation entnommen. [83]

Zur Einschätzung des Gesamtschweregrades werden die einzelnen Punktwerte entsprechend einem Scoring-System erfasst. Hierfür werden in der Klinik entweder die Einteilungen nach Harris oder Glucksberg verwendet. [85, 86]

Gesamtschweregrad	Charakteristika
0	kein Stadium 1-4 irgendeines Organs
I	Stadium 1-2 Haut ohne Leber, oberer GI Trakt, oder unterer GI Trakt beteiligt
II	Stadium 3 Haut und/oder Stadium 1 Leber und/oder Stadium 1 oberer GI Trakt und/oder Stadium 1 unterer GI Trakt
III	Stadium 2-3 Leber und/oder Stadium 2-3 unterer GI Trakt, mit Stadium 0-3 Haut und/oder Stadium 0-1 oberer GI Trakt
IV	Stadium 4 Haut, Leber, oder unterer GI Trakt Beteiligung, mit Stadium 0-1 oberer GI Trakt

Abbildung 11: Im Scoring-System nach Harris wird (für den Menschen) anhand einer Beurteilung der betroffenen Organsysteme Haut, Leber und Darm ein Gesamtschweregrad ermittelt. Die Abbildung wurde aus der Leitlinie zur allogenen Stammzelltransplantation entnommen. [83]

2.5.5 Die chronische GvHD

Etwa die Hälfte der stammzelltransplantierten Patienten entwickelt eine cGvHD. Es werden auch hier drei Unterformen unterschieden. Die „de novo“ cGvHD tritt ohne vorherige aGvHD in Erscheinung. Die progressive cGvHD geht entweder direkt aus der aGvHD hervor oder bildet sich unter der Therapie einer aGvHD bei einer Prednisolonmenge von $>0,5\text{mg/kg/KG}$ oder Vergleichbarem aus. Die quieszente cGvHD entsteht nach abgeklungener aGvHD. [83] Von der cGvHD kann jedes Gewebe im menschlichen Körper betroffen sein. Besonders häufig attackiert werden die Mundschleimhaut, Speicheldrüsen, Haut, genitale Schleimhaut, Augen, Darm, Leber, Faszien, und die Lunge. Die Symptome des Patienten können dementsprechend vielfältig ausfallen. Beispiele sind die Ausbildung einer Poikilodermie, die Stenosierungen des Ösophagus oder eine Fasciitis. Zur Beurteilung der Symptomatik existiert in der Klinik ein ausführlicher Stagingbogen. Die cGvHD wird im Anschluss in die Grade mild, moderat und schwer eingeteilt. [87]

2.5.6 Pathophysiologie und Therapieansätze der aGvHD

Die akute Form der GvHD wird beinahe ausschließlich durch die Aktivierung reifer, naiver Spender-T-Zellen und deren Differenzierung in Th1-Zellen ausgelöst. [88, 89] Diese Aktivierung läuft in drei Phasen ab. Zunächst werden die APC des Empfängers aktiviert. Geschädigte Gewebe des Patienten sezernieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Diese aktivieren APC, welche daraufhin verstärkt MHC/Antigen-Komplexe und kostimulatorische Moleküle exprimieren. Die Gewebeschädigung ist auf die zugrundeliegende Erkrankung, eventuelle Infektionen und die Konditionierungstherapie zurückzuführen. Im zweiten Schritt werden reife T-Zellen des Spenders durch die Patienten-APC aktiviert. Bei einer HLA-identischen Transplantation erkennen die Spender-T-Zellen einige Nebenhistokompatibilitätsantigene als fremd an. Daraufhin proliferieren und differenzieren die T-Lymphozyten. In der dritten Phase wandern die aktivierten T-Zellen in die peripheren Gewebe ein und schädigen diese. Der ursächliche Gewebeschaden verschlimmert sich. Es etabliert sich ein positiver Rückkopplungsmechanismus. Infolgedessen kommt es zum Zytokinsturm. Unbehandelt ist die Letalität hoch.

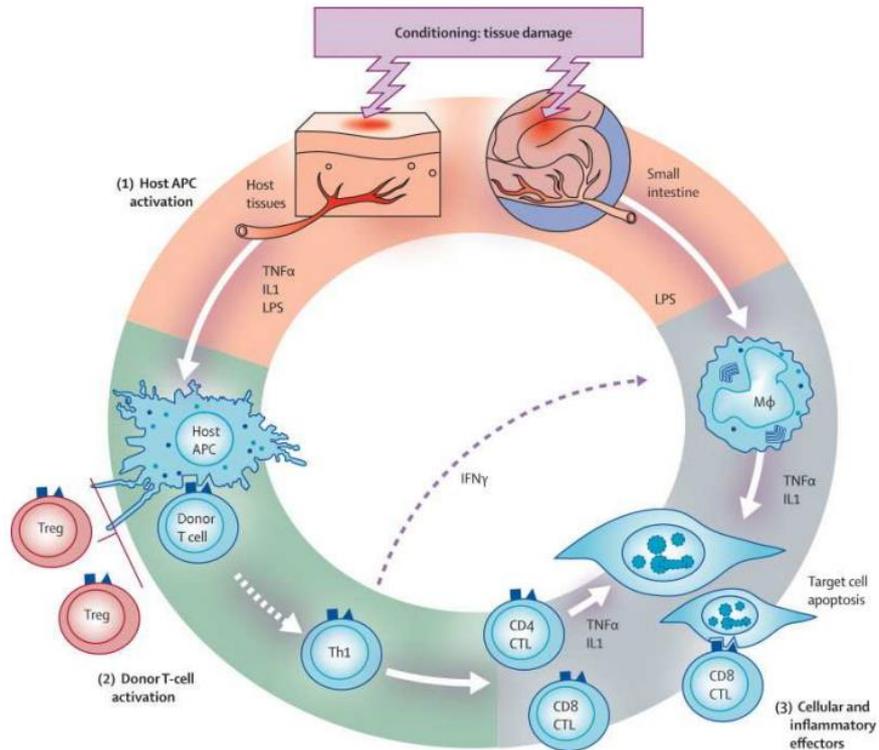


Abbildung 12: Durch den Gewebeschaden werden APC des Empfängers aktiviert. Diese bieten den naiven Spender-T-Zellen MHC/Antigen-Komplexe und kostimulatorische Moleküle dar, woraufhin sich diese differenzieren und proliferieren. Sie wandern nun in das vorgeschädigte Gewebe ein und schädigen dieses weiter. Die Abbildung wurde aus Ferrara et al. entnommen. [90]

Die Prophylaxe einer aGvHD besteht aus einem Calcineurininhibitor in Kombination mit Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil. Bei einer manifesten aGvHD muss die prophylaktische Medikation intravenös appliziert werden. Zusätzlich wird Prednisolon verabreicht. Je nach Symptomatik ist gegebenenfalls auch eine supportive Therapie notwendig. Bei unzureichender Wirkung der Erstlinientherapie stehen noch diverse andere Arzneimittel und Therapieverfahren zur Verfügung. Möglich wäre beispielsweise die Applikation von Antithyozytenglobulin (ATG) oder die Durchführung einer extrakorporalen Photophorese (ECP). [83]

2.5.7 Die Pathophysiologie und Therapieansätze der cGvHD

Die Pathophysiologie der aGvHD ist gut verstanden. Sie wird fast ausschließlich durch Spender-T-Zellen ausgelöst. Hingegen sind die Vorgänge in der cGvHD weniger gut erforscht, da die zugrundeliegende Pathophysiologie deutlich komplexer ist. [88] Es sind verschiedene sowohl allo- als auch autoreaktive T- und B-Zelltypen an der Ausbildung der Symptome beteiligt. Auch Zellreihen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile und Makrophagen sind involviert.

Es wird für die Pathophysiologie der cGvHD ebenfalls ein dreiphasiger Ablauf postuliert. Die Entzündung und der Gewebeschaden vor und im Anschluss an die Stammzelltransplantation bildet auch hier die erste Phase. Eine Schädigung des Spenderthymus kann konsekutiv zu einer fehlerhaften negativen Selektion führen. Eine Chronifizierung der Entzündung sowie allgemein fehlerhaft ablaufende Immunreaktionen sind die Folge. Falsch ablaufende Reparaturmechanismen stellen die dritte Phase dar. Eine Fibrosierung des entsprechenden Gewebes ist häufig die Folge. [88] Je nach Schweregrad der cGvHD wird diese ebenfalls mit Kortikosteroiden und CNI behandelt. [91]

2.5.8 Nebenwirkungen der GvHD-Therapie

Eine GvHD kann potenziell letal verlaufen. Es wurden deshalb viele Medikamente, Verfahren und Therapieregime etabliert. Leider gehen sie alle mit einer Vielzahl unerwünschter Effekte einher. Vorhandene Medikamente sind sehr nebenwirkungsreich. Nicht-medikamentöse Verfahren wie die T-Zelldepletion verschaffen hier aber nur bedingt Abhilfe. Die Patienten verfügen im Anschluss an die Konditionierungsphase über kein intaktes Immunsystem mehr. Die transplantierten T-Zellen sind daher wichtig für die Erregerabwehr. Eine T-Zelldepletion, genau wie die anderen Formen der Immunsuppression, geht also mit einer stark erhöhten Infektionsneigung einher.

Mindestens so wichtig ist, dass selbst nach einer starken Radiochemotherapie noch einzelne Tumorzellen im Körper des Patienten verbleiben. Diese werden von den Donor-T-Zellen erkannt und abgetötet. Sie initiieren den GvL-Effekt und sind somit wichtig für die Therapie der Grunderkrankung. Eine T-Zelldepletion kann zwar die Entstehung einer GvHD verhindern. Allerdings ist die Remissionsrate bei jenen Patienten – aufgrund des supprimierten GvL-Effekts – signifikant geringer. [9, S. 897] [84]

2.5.9 NFAT in der GvHD

Die GvHD wird hauptsächlich durch CD4⁺-T-Zellen vermittelt. Demgegenüber spielen CD8⁺-T-Zellen eher bei der Induktion des GvL-Effekts eine Rolle. [92, 93] Die Mitglieder der NFAT-Familie, v.a. NFATc1 und NFATc2, sind entscheidend für die Aktivierung von konventionellen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen benötigen die Transkriptionsfaktoren zwar ebenfalls, allerdings in weitaus geringerem Umfang. [21] Interessanterweise hatten Experimente – und nun klinische Studien – gezeigt, dass zusätzlich transferierte Tregs weiterhin in der Lage sind, die GvHD erfolgreich abzumildern, während der GvL-Effekt hierbei erhalten blieb. [58, 94, 95]

Vaeth et al. untersuchten daraufhin die Bedeutung von NFATc1 und NFATc2 in der Ausbildung der GvHD und des GvL-Effekts. Es wurde zunächst ein etabliertes *major-mismatch*-Mausmodell der GvHD verwendet. Ein *major mismatch* wird in der Klinik wegen der ausgeprägten GvHD-Symptomatik möglichst vermieden. (vgl. Abschnitt 2.5.3) Allerdings ist das entsprechende Tiermodell gut verstanden und spiegelt die pathophysiologischen Abläufe einer klinischen GvHD gut wider. Sie laufen bei einem *major mismatch* nur beschleunigt und intensiviert ab. In der Forschung wird deshalb gerne auf vergleichbare Modelle zurückgegriffen.

Zusammen mit Knochenmarkzellen wurden allogene, NFATc1- oder NFATc2-defiziente T-Zellen in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Im Vergleich zur Transplantation von wildtypischen T-Zellen, zeigte sich hier eine deutliche Reduktion der GvHD-Symptomatik. Doppeldefiziente T-Zellen erzeugten praktisch keine Symptome. Auch wiesen die transplantierten Spenderlymphozyten geringere Proliferationsraten auf. Eine verminderte Einwanderung ins Zielgewebe wurde unter anderem auf die reduzierte Expression des Homingrezeptors $\alpha 4\beta 7$ zurückgeführt. Gleichzeitig zeigte sich bei Applikation von NFAT einzeldefizienten T-Zellen eine erhöhte Repopulationsrate in den sekundären lymphatischen Organen. Bei Doppeldefizienz war diese sogar noch ausgeprägter. Auch bildeten die NFAT-defizienten T-Zellen weniger proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ oder TNF- α . In Abwesenheit eines NFAT-Mitglieds war sowohl die Zahl der CD4⁺-, als auch der CD8⁺-Zellen reduziert. Es zeigte sich jedoch eine leichte Verschiebung des CD8⁺/CD4⁺-Verhältnisses hin zu den CD8⁺-Zellen. Ebenso waren prozentual mehr regulatorische T-Zellen, sowohl in den sekundären lymphatischen Organen als auch im GvHD-Zielgewebe, nachweisbar.

In einem modifizierten Mausmodell wurde erneut die Relevanz von regulatorischen T-Zellen in der Pathogenese der GvHD nachgewiesen. Fehlende natürliche Tregs führten hierbei zu einer verstärkten Symptomatik. Es wurden erhöhte IFN- γ - und TNF- α -Konzentrationen in den entsprechenden Tieren nachgewiesen. Mithilfe wildtypischer und NFAT-defizienter Tregs wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von NFATc1- oder -c2 keinen Einfluss auf die Suppressionsfähigkeit der regulatorischen T-Zellen hat, denn diese konnten die Entwicklung einer GvHD-Symptomatik ebensogut verhindern wie wildtypische, regulatorische T-Zellen.

Zur Untersuchung des GvL-Effekts wurden Empfängertieren entweder ein B-Zelllymphom oder eine B-Zellleukämie transplantiert. Es zeigte sich, dass bei einer Stammzell-

transplantation besonders NFAT-einzeldefiziente T-Zellen einen Tumorrückfall erfolgreich verhindern können. Bei doppeldefizienten T-Zellen war dieses Phänomen geringer ausgeprägt. CD8⁺-Lymphozyten wurden in einem weiteren Ansatz gesondert untersucht. Die Abwesenheit von einem der beiden Transkriptionsfaktoren hatte keine Auswirkung auf die Bildung von Granzyme B oder Perforin. Nur doppeldefiziente CD8⁺-T-Zellen bildeten weniger der besagten Effektor-Zytokine. Auch zeigte sich eine erhaltene Gedächtnisfunktion der NFAT-defizienten CD8⁺-Zellen für pathogene Strukturen.

Es wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von NFATc1 oder -c2 die GvHD milder verläuft. Hierfür wurden zwei Gründe ausgemacht. Zum einen wird die Ausreifung von CD4⁺-T-Effektorzellen gehemmt. Andererseits waren die Treg weniger betroffen und konnten sich in den freien Nischen besonders vermehren. Der erhaltene GvL-Effekt wird auf die normale Funktion der CD8⁺-T-Zellen zurückgeführt. Verständlich wird dies dadurch, dass NFAT für die Aktivierung von konventionellen CD4⁺-T-Zellen wichtiger ist als für die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen oder Tregs. [50, 58] Derzeit ist eine gezielte NFAT-Inhibition klinisch nicht möglich. Bestehende Medikamente wie CNI blockieren unselektiv alle NFAT-Moleküle und darüber hinaus noch weitere Signalwege. IL-2 ist speziell für die Ausreifung, das Überleben und die Funktion von regulatorischen T-Zellen wichtig. Verschiedene Experimente zeigten, dass eine ergänzende Applikation von IL-2 eine GvHD-Symptomatik verhindern bzw. abschwächen könnte. Erste Studien unterstützen diese These. [96-98]

In der Arbeitsgruppe wird alternativ daran geforscht, spezifische NFAT-Inhibitoren zu finden bzw. einzelne NFAT-Familienmitglieder durch CRISPR/Cas9 vor der Transplantation spezifisch in T-Zellen zu deletieren. [99] Hierzu ist es parallel angezeigt, die Funktion aller T-Zell-exprimierten Familienmitglieder genau zu verstehen, sodass insbesondere noch die Funktion von NFATc3 bzw. die Auswirkungen seiner Deletion untersucht werden sollte.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemische Reagenzien

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid

Agarosepulver

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

β -Mercaptoethanol

Calciumchlorid

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dinatriumhydrogenphosphat

Essigsäure

Ethanol

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Glycerin

Glycin

Isopropanol

Kaliumchlorid

Magnesiumchlorid

Methanol

Natriumazid

Natriumchlorid

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Natriumhydrogenphosphat

Natriumhydroxid

Natriumpyruvat

Paraformaldehyd

Phosphorsäure

Ponceau S

Salzsäure

Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Triton-X

Trockenmilchpulver

Hersteller

Carl Roth GmbH

AppliChem

Carl Roth GmbH

Gibco/Life Technologies

AppliChem GmbH

Sigma Aldrich

Carl Roth GmbH

Carl Roth GmbH

Carl Roth GmbH

Hartenstein

Carl Roth GmbH

Sigma-Aldrich

Carl Roth GmbH

Sigma-Aldrich

Carl Roth GmbH

Carl Roth GmbH

Carl Roth GmbH

Carl Roth GmbH

AppliChem

Tween-20

Carl Roth GmbH

Trypanblau

Sigma Aldrich

3.1.2 Puffer und Lösungen

3.1.2.1 Puffer

Puffer

Zusammensetzung

BSS/BSA

BSS
BSA 0,1%

FACS-Puffer

PBS
BSA 0,1%

Fix/Perm-Puffer

FixPerm-Diluent 1:4
Fix-Perm

PBS (1x)

NaCl 137mM
Na₂HPO₄ 10mM
KCl 2,6mM
KH₂PO₄ 1,8mM
ddH₂O 100ml

1x BD Lysis Buffer (Erylyse)

Tris 100mM
EDTA 5mM
NaCl 200mM
SDS 0,2%
ddH₂O 500ml

High Detergent Buffer

HDB 1 50%
HDB 2 50%
50x PI 1:50

Sammelgelpuffer

TRIS 30,28g
SDS 2,162g
ddH₂O 500ml

Trenngelpuffer

TRIS 90,755g
SDS 2,162g
ddH₂O 500mg

10x Laufpuffer

SDS 10g
TRIS 30,3g
Glycin 144g
ddH₂O 1l

Blottingpuffer

TRIS 13g
Glycin 72,3g
Methanol 1l
ddH₂O 4l

3.1.2.2 Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Fix-Perm-Diluent	n.a.	invitrogen
Fix-Perm-Concentrate	n.a.	invitrogen
IC-Fixierungslösung	n.a.	invitrogen
Perm-Buffer 10x	n.a.	invitrogen
Cytofix/Cytoperm	n.a.	Thermo Fisher
5x Bradford Protein Assay	n.a.	Thermo Fisher
4xLämmli	n.a.	Eigenproduktion
Page Ruler Prestained	n.a.	Thermo Scientific
SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	n.a.	Thermo Fisher
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	n.a.	Thermo Scientific

3.1.3 Medien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
IMDM	FCS 10 % Pen/Strep 2ml β -Mercaptoethanol 50mM ddH ₂ O 500ml	Gibco Gibco Gibco
RPMI	FCS 5% Pen/Strep 2ml β -Mercaptoethanol 50mM Pyruvat 10ml ddH ₂ O 1l	Gibco Gibco Gibco Carl Roth GmbH

3.1.4 Antibiotika

Penicillin/Streptomycin	Gibco
-------------------------	-------

3.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie

Name	Klone	Fluoreszenz	Hersteller	Cat.
α-CD4	BGK1.5	Pac.Blue	BioLegend	100428
α-CD4	RM4-5	Br.Violett	BioLegend	100559
α-CD4	RM4-5	PerCP-Cy5	BioLegend	100539
α-CD4	RM4-5	FITC	eBioscience	11-0042-85
α-CD8	53-6.7	AmCyan	BioLegend	100752
α-CD8	53-6.7	APC	BioLegend	100712
α-CD8	53-6.7	PE-Cy7	BioLegend	100721
α-CD8	53-6.7	PE	BioLegend	100707
α-CD16/CD32 93		keine	eBioscience	2058648
Zombie NIR		AmCyan	BioLegend	423105
α-CD25	3C7	PE	StemCell	60010PE.1
α-CD62L	MEL-14	APC	BioLegend	104412
α-IFNγ	XMG1.2	APC	BioLegend	505810
α-B220	RA3-6B2	PerCP	BioLegend	103234
α-B220	RA3-6B2	APC	BioLegend	103211
α-TNFA	MP6-XT22	PE	eBioscience	12-7321-81
α-FoxP3	FJK-16s	APC	eBioscience	17577382
α-CD44	IM7	FITC	BioLegend	103006
α-CD43	1B11	PE	BioLegend	121226
α-IL2	JES6-5H4	APC	BioLegend	503810
α-IL4	11B11	APC	eBioscience	17-7041-81
α-IL4	11B11	PE	eBioscience	12-7041-81
α-IL10	3E55-16E3	APC	eBioscience	17-7101-81
α-IL13	eBio13A	PE	invitrogen	1984127
α-IL17	TC11-18H10.1	PE	BioLegend	506904
α-CD21	7E9	FITC	BioLegend	123407
α-CD23	eBioTY/11.8	PE	eBioscience	12-0731-81
α-CD24	30-F1	FITC	eBioscience	11-0241-82
α-CD5	53-7.3	PerCP-Cy5	eBioscience	45-0051-82
α-CD90.1	OX-7	FITC	BD Bioscience	554897
α-IgD	11-26c.2a	FITC	BioLegend	405714
α-IgM	RMM-1	PE	BioLegend	406507
α-CD40L	MR1	PE	invitrogen	1938004

α -Perforin	eBio0MAK-D	APC	eBioscience	17-9392-80
α -Granzym B	NG2B	PE	eBioscience	12-8898-80
α -CD178	MFL3	APC	eBioscience	17591180
α -CD138	281-2	PE	eBioscience	142505
α -GM-CSF	MP1-22E9	PE	invitrogen	2015753

3.1.6. Antikörper Western Blot

Name	Hersteller	Wirt	Cat.
α -NFATc3	Novus Biologicals	rabbit	NB100-92190
α -NFATc3	Santa Cruz	mouse	sc-8405
α -NFATc3	Santa Cruz	rabbit	sc-8321
α -NFATc1	BD Pharmingen	mouse	556602
α -NFATc1	immunoGlobe	rabbit	0102-05
α -NFATc2	Novus Biologicals	rabbit	NBP1-82583
α -Aktin	Invitrogen	mouse	MA5-15739
α -Erk	Santa Cruz	rabbit	sc-292838
α -Bcl2	Novus Biologicals	rabbit	NB100-56098
α -A1	MyBioSource	rat	MBS423203
α -HDAC	Santa Cruz	rabbit	sc-7872
α -Tubulin	Santa Cruz	mouse	sc-5286
α -IRF4	Santa Cruz	mouse	sc-48338

3.1.7 Stimulatoren

Stimulanz	Hersteller
Ionomycin	Sigma-Aldrich
TPA (PMA)	Sigma-Aldrich
Hamster IgG	MP biomedicals
α -CD3/CD28-AK	Gibco
Luciferin	PJK
Anästhetikum (Ketamin+Xylazin)	Apotheke Uni Würzburg
LPS	Sigma-Aldrich
CD40	R&D Systems
IgM	Dianova

3.1.8 Geräte und sonstige Materialien

3.1.8.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläschen	Menzel Gläser
Einweghandschuhe	Ansell
FACS-Röhrchen	BD Science
Gewebekulturplatten 6-,12- und 96-Well	Greiner
Objektträger	Langenbrinck
Pipetten 5, 10 und 25 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Laborhaus Scheller
Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner
Spitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt
Spritzen 1, 5, und 10 ml	Braun
Kanülen 20, 22 und 26 G	Braun
Zellsiebe	BD Falcon
Kulturschale	Cellstar
Laufkammer	BioRad
Gelkamm	BioRad
Gelkammer	BioRad
Western-Blot-Membran	GE Healthcare
Filterpapier	Hartenstein
Kühlpad	Hartenstein

3.1.8.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec
Brutschrank	Thermo Scientific
FACS-Canto II	BD Bioscience
Faxitron CP-160	Faxitron
IVIS Spectrum CCD imaging system	Caliper Life Science
Eismaschine	Genheimer
Lichtmikroskope	Leica
Neubauer-Zählkammer	Precicolor HBG
PCR-Maschine	MWG Biotec
Pipettierhilfe	Brand

Präparationsbesteck	Hartenstein
Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories
Tiefkühlschrank -20°C	Privileg
Tiefkühlschrank -70°C	Privileg
Vortexer	Hartenstein
Waage	Hartenstein
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich
Heizblock	Liebisch
Laborschüttler	Edmund Bühler
Proteinkonzentrationsmessgerät	GeneQuant
Sonifizierungsgerät	Sonics VibraCell
Laufkammer	BioRad
Blottingkammer	BioRad
Fusion SL	Vilber Lourmat

3.1.9 Elektronische Datenverarbeitung

Programm	Hersteller
FACSDiva 5.0	BD Bioscience, San José, CA, USA
FlowJo 8.8.6	Tree Star, Ashland, OR, USA
Excel Version 1908	Microsoft, Redmont, WA, USA
Word Version 1908	Microsoft, Redmont, WA, USA
Prism 8	GraphPad, La Jolla, CA, USA
Endnote X9.2	Clarivate Analytics, Jersey, USA
Living Image 4.0	Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA
FusionCapt Advance SL4	Vilber Lourmat, Eberhardzell, BW, DEU

3.1.10 Negative T-Zell-Isolierung

Die Aufreinigung nach CD4⁺-T-Lymphozyten erfolgte mit dem Dynabeads Untouched Mouse T Cell Isolation Kit von Invitrogen. Die Isolation von CD3⁺- und CD8⁺-T-Zellen wurde hingegen mit dem MojoSort Mouse T Cell Negative Selectio Kit von BioLegend durchgeführt. Alle Aufreinigungen wurden nach Herstellerangaben ausgeführt. Die Reinheit der T-Zellen betrug jeweils >90%.

3.1.11 Mauslinien

Gehalten wurden die Mäuse im Tierstall des Zentrums für Experimentelle und Molekulare Medizin (ZEMM). Einige wurden auch dem Tierstall des Instituts für Virologie und Immunologie (VIM) entnommen. Beide Einrichtungen befinden sich auf dem Gelände des Universitätsklinikums in Würzburg. Die Tiere wurden pathogenfrei gehalten. Die Genotypisierung der Mäuse wurde beim Absetzen der Jungtiere im Alter von vier Wochen durchgeführt. In den Graft-versus-Host-Versuchen waren Donor und Akzeptor im gleichen Alter (zwischen 8 und 12 Wochen) und vom selben Geschlecht.

Linie	Herkunft
B6. <i>Nfatc1</i> ^{fl/fl} . <i>Cd4cre</i>	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
B6. <i>Nfatc3</i> ^{fl/fl} . <i>Cd4cre</i>	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
<i>Nfatc1</i> ^{fl/fl} . <i>Nfatc3</i> ^{fl/fl} . <i>Cd4cre</i>	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
BALB/c (H2d)	Charles River Deutschland
B6.RAG1 k.o.	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
B6.L2G85.CD90.1	AG Beilhack, Zucht im ZEMM
B6.Nc1dS.luc	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
B6.Luc. <i>Nfatc1</i> ^{fl/fl} . <i>Cd4cre</i>	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
B6.Luc. <i>Nfatc3</i> ^{fl/fl} . <i>Cd4cre</i>	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
B6.Luc. <i>Nfatc1</i> ^{fl/fl} . <i>Nfatc3</i> ^{fl/fl} . <i>Cd4cre</i>	Berberich-Siebelt, Zucht im ZEMM
B6. <i>Nfatc1</i> ^{fl/fl} . <i>Mb1cre</i>	Berberich, Zucht im VIM
B6. <i>Nfatc3</i> ^{fl/fl} . <i>Mb1cre</i>	Berberich, Zucht im VIM

3.2 Methoden

3.2.1 Zelluläre Methoden

3.2.1.1 Zentrifugation von Zellen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lymphozyten bei 4°C mit 1500rpm zentrifugiert. Verwendet wurde hierfür die Zentrifuge Rotina 420R der Firma Hettich.

3.2.1.2 Analyse der Zellzahl

Zu 10µl der zu untersuchenden Zellsuspension wurden 90µl Trypanblau hinzugegeben. Trypanblau ist ein stark anionischer Farbstoff, welcher an intrazelluläre Proteine bindet. Er ist jedoch nicht zellpermeabel. Infolgedessen werden nur Zellen ohne funktionsfähige Zellmembran angefärbt. Dies trifft ausschließlich auf avitale Zellen zu. Mit einer Neubauer-

Zählkammer konnte somit die Zellzahl der ungefärbten, lebenden Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer ermittelt werden. Mithilfe der folgenden Formel wurde die Zelldichte in der Zellsuspension ermittelt.

$$D = N/Q \times V \times 10^4$$

D: Zelldichte (Zellen/ml)

N: Gesamtzellzahl aller vier Großquadrate

Q: Anzahl der Großquadrate

V: Verdünnungsfaktor

10^4 : Volumenfaktor für die Umrechnung von Zellen/ μ l auf Zellen/ml

3.2.1.3 Zellentnahme

Die Mäuse wurden durch CO₂ in Narkose versetzt und im Anschluss durch zervikale Dislokation getötet. Zur Präparation wurden sie auf einer Styroporunterlage festgesteckt. Sie wurden zur Desinfektion mit Ethanol besprüht. Unter Zuhilfenahme der sterilisierten Präparationsutensilien wurden die Gewebe entnommen.

Lymphknoten

Die zervikalen, axillären, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten wurden freipräpariert und exstirpiert. Sie wurden in einer mit BSS/BSA gefüllten Kulturschale zwischengelagert.

Milz

Das Organ wurde entnommen und in einer mit BSS/BSA gefüllten Kulturschale zwischengelagert.

Thymus

Das Organ wurde entnommen und in einer mit BSS/BSA gefüllten Kulturschale zwischengelagert.

Peritoneum

Das Peritoneum wurde freigelegt, ohne dieses zu eröffnen. Es wurden mit einer Spritze fünf bis zehn Milliliter Flüssigkeit (0,1% BSA in PBS) direkt in das Peritoneum injiziert. Dieses wurde nun 60 Sekunden lang vorsichtig per Hand massiert. Mithilfe einer Pasteur-Pipette wurde die Flüssigkeit entnommen und in ein 50ml Röhrchen überführt.

Knochenmark

Zur Gewinnung der Knochenmarkzellen wurden die Hinterbeine der Maus freigelegt. Es wurde möglichst viel Haut und Muskelgewebe entfernt. Am Übergang zum Becken wurden die Beine abgetrennt. Ebenso wurden die Füße entfernt. Unter Zuhilfenahme von Zellstoff wurde das restliche Muskelgewebe abgerieben. Die Epiphysen wurden mit einer Schere abgetrennt. Mithilfe einer Spritze wurden Ober- und Unterschenkelknochen von beiden Seiten mit jeweils 5ml BSS/BSA durchgespült. Die Zellsuspension wurde in einem 50ml Röhrchen aufgefangen.

3.2.1.4 Herstellung der Zellsuspensionen

Lymphknoten, Milz und Thymus wurden separat mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb gerieben. Die jeweilige Suspension wurde für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Die medullären und peritonealen Zellsuspensionen wurden direkt für fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand verworfen.

Die Pellets von Lymphknoten, Thymus, Knochenmark und Peritoneum wurden erneut mit 20ml BSS/BSA gewaschen. Im Anschluss wurden sie zur weiteren Prozessierung in RPMI oder einem anderen Kulturmedium aufgenommen.

Nach der erstmaligen Zentrifugation der Milzzellen wurde das Zellpellet mit zwei Millilitern BD Lysis Buffer vermischt. Die Suspension wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Erythrozyten lysierten unter diesen Bedingungen. Anschließend wurden 20ml BSS/BSA zur Suspension hinzugegeben. Dies stoppte die Lyse. Die Probe wurde erneut zentrifugiert. Die Milzzellen wurden zur weiteren Prozessierung in RPMI oder einem anderen Kulturmedium aufgenommen.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) wurden an einem FACS-Canto II der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Es wurde die Software FACSDiva 5.0 verwendet. Die anschließende Auswertung erfolgte mithilfe des Programms FlowJo, Version 8.8.6.

3.2.2.1 Oberflächenfärbung der T-Zellen

Die Zellen wurden geerntet und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Sie wurden für fünf Minuten mit 8000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Bei Zellen, die sich in Kultur befanden, wurde eine Lebend/Tot-Färbung durchgeführt. Hierfür wurde das Zellpellet in 80µl ZombieAqua (1:2000, verdünnt mit PBS) aufgelöst und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden zehn Mikroliter des Fc-Blocks (1:200, verdünnt in FACS-Puffer) hinzugegeben. Die Probe wurde gevortext und erneut für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Es wurden nun zehn Mikroliter des Oberflächenfärbemixes (1:300, verdünnt in FACS-Puffer) beigefügt und erneut resuspendiert. Die Probe wurde für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde zu jedem Reaktionsgefäß 500µl FACS-Puffer hinzugegeben. Dieses wurde für fünf Minuten bei 8000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert. Alternativ wurde im Anschluss eine Intrazellular- oder Intranuklearfärbung durchgeführt.

3.2.2.2 Intrazellulärfärbung der T-Zellen

Nach Durchführung der Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet in 250µl Cytofix/Cytoperm resuspendiert. Die Probe wurde für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe, bei welchen jeweils 500µl 1xPerm zur bestehenden Suspension hinzugegeben wurden. Die Probe wurde mit 8000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden 100µl des Intrazellulärmixes (1:250, verdünnt in 1xPerm) zum Zellpellet hinzugegeben. Es wurde resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500µl 1xPerm. Die Zellen wurden nun in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS-Gerät analysiert.

3.2.2.3 Intranukleäre Färbung der T-Zellen

Nach Durchführung der Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet in 500µl Fix/Perm-Diluent (drei Teile F/P-Diluent, ein Teil F/P-Concentrate) resuspendiert. Die Probe wurde für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe, bei welchen jeweils 500µl 1xPerm zur bestehenden Suspension hinzugegeben wurde. Es wurde mit 8000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden 100µl des FoxP3-Färbeansatzes (1:250, verdünnt in 1xPerm) zum Zellpellet hinzugegeben. Die Probe wurde resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500µl 1xPerm. Die Zellen wurden in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS-Gerät analysiert.

3.2.2.4 Oberflächenfärbung der B-Zellen

Die Zellen wurden gewonnen und gezählt. Es wurden für jede Färbung 2×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Es folgte ein Waschschriff mit drei Milliliter PBS ohne Salze. Das Zellpellet wurde daraufhin in 100µl PBS ohne Salze resuspendiert. Diese enthielten den Fc-Block in einer Konzentration von 1:50. Es wurde für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert, abgesaugt und in 100µl des Oberflächenfärbemixes resuspendiert. Dieser enthielt die Antikörper gegen IgM, IgD, CD138 und CD21 in einer Konzentration von 1:100. Der CD23-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:200 zugegeben. Alle weiteren Antikörper wurden 1:400 verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen erneut gewaschen. Die Probe wurde in 200µl PBS ohne Salze aufgenommen und analysiert.

3.2.3 Bildgebende Verfahren

3.2.3.1 Bioluminescence Imaging (BLI)

Die transplantierten T-Lymphozyten exprimierten unter dem Ubiquitin-Promotor das Enzym Luciferase. Luciferin ist das Substrat der Luciferase. Den Tieren wurde eine Mischung aus 250µl Anästhetikum (Ketamin und Xylazin) und 250µl Luciferinlösung (150µg/g Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Luciferin wurde daraufhin im Körper der Maus umgesetzt. Die hierbei entstehenden Emissionen wurden mittels Photonen-Detektion am IVIS Spectrum CCD Imaging System quantifiziert. Es konnte somit das Verteilungsmuster der T-Lymphozyten im Mausorganismus sichtbar gemacht werden. Auch konnten Rückschlüsse auf die Aktivität der T-Zellen in den verschiedenen Organsystemen gezogen werden. Ausgewertet wurden die Bilder mithilfe des Programms Living Image 4.0.

3.2.3.2 Western Blot

3.2.3.2.1 Gele gießen

Nach dem Zusammenbau der Gelkammer wurde das Trenngel wie folgt angesetzt:

Konzentration:	10%	8%
<u>Chemikalie</u>	<u>Volumen</u>	<u>Volumen</u>
Acrylamid	3,70ml	3,00ml
4xTrenngelpuffer	2,75ml	2,75ml
Wasser	4,60ml	5,30ml
APS	187µl	187µl
TEMED	15,4µl	15,4µl

Es wurde bis zur angegebenen Markierung in die Gelkammer gefüllt und im Anschluss mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde vorsichtig entfernt, nachdem das Trenngel ausgehärtet war. Das Sammelgel wurde wie folgt angesetzt:

Konzentration	6%
<u>Chemikalie</u>	<u>Volumen</u>
Acrylamid	1,40ml
4xSammelgelpuffer	1,75ml
Wasser	3,80ml
APS	84,0 µl
TEMED	7,00 µl

Das Sammelgel wurde ebenfalls in die Kammer pipettiert. Es wurde der Kamm in das Gel gesteckt und bis zur Polymerisierung des Sammelgels gewartet.

3.2.3.2 Gewinnung von Ganzzellextrakten

Die Zellen wurden aus der Zellkultur in ein 50ml Röhrchen überführt. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation in einem Milliliter PBS resuspendiert. Die Lösung wurde in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und ein Waschschrift durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde aufgeratscht und im Anschluss in 50µl HDB gelöst. Die Probe wurde im Kühlraum sonifiziert. Im Anschluss wurde jedes Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 10000rpm im Kühlraum zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wurde verworfen. Zwei Mikroliter des Überstandes wurden in ein drittes Reaktionsgefäß überführt und in einem Milliliter Protein Assay gelöst. Diese Probe diente der Messung der Proteinkonzentration.

3.2.3.2.3 Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Die Zellen wurden aus den Zellkulturen in 50ml Röhrchen überführt. Es folgten zwei Waschschriffe. Im Anschluss an die zweite Zentrifugation wurde das Zellpellet in einem Milliliter PBS aufgenommen und in ein 1,5ml Röhrchen überführt. Dieses wurde für drei Minuten bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und verworfen. Je nach Volumen der Pellets wurde eine entsprechende Menge kaltes CER I (vgl. Tabelle) zu dem entsprechenden Pellet hinzugegeben. Die Probe wurde für 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext und danach für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Es wurde kaltes CER II (vgl. Tabelle) zugesetzt. Die Probe wurde für fünf Sekunden auf höchster Stufe gevortext und eine Minute lang auf Eis inkubiert. Die Probe wurde erneut für fünf Sekunden gevortext und abermals auf höchster Stufe zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthält den Zytoplasmaextrakt. Deshalb wurde dieser sofort in ein neues 1,5ml Röhrchen überführt. Dieses wurde auf Eis gestellt oder direkt bei -80° Celsius weg-gefroren.

Es wurde NER (vgl. Tabelle) zu den Zellpellets hinzugegeben. Im Anschluss wurden diese jedoch nicht resuspendiert, sondern aufgeratscht. Die Probe wurde für 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Sie wurde auf Eis gestellt und alle zehn Minuten erneut für 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Der Vorgang wurde viermal wiederholt. Die Suspension wurde für zehn Minuten auf höchster Stufe (16100 rpm) im Kühlraum zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die Kernextrakte. Mit diesen wurde analog zu den Zytoplasmaextrakten verfahren.

Zur Messung der Proteinkonzentration wurden zwei Mikroliter des jeweiligen Extrakts in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde ein Milliliter Protein Assay hinzugegeben. Die Lösung wurde im Anschluss der Konzentrationsmessung zugeführt.

Pelletvolumen (µl)	CER I (µl)	CER II (µl)	NER (µl)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

*zu CER I und NER wird Proteaseinhibitor in der Verdünnung 1:100 hinzugegeben

3.2.3.2.4 Aufkochen der Proteine

Die Proteinlösung wurde mit 7,5µl des 4xLämmli und genug destilliertem Wasser vermischt, um ein Probenvolumen von 30µl zu generieren. Die Lösung wurde für fünf Minuten bei 92° Celsius aufgekocht und im Anschluss fünf Minuten lang mit 14000rpm zentrifugiert. Bis zum Beladen des Gels wurden die Proben auf Eis gestellt oder eingefroren.

3.2.3.2.5 Gelelektrophorese

Zunächst wurden die Gele in die Laufkammer eingesetzt und diese mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Die Kämme wurden vorsichtig aus den Gelen herausgezogen. Jede Tasche wurde mit sechs Mikroliter des 4xLämmli befüllt und danach mit Laufpuffer durchgespült. Hiermit wurden die Taschen von Gelresten befreit und deren Sichtbarkeit verbessert. Es wurde zehn Mikroliter des Markers (Page Ruler Prestained) in die entsprechende Tasche pipettiert. Von jeder der zu untersuchenden Proben wurden 30µl (enthalten im Idealfall 50µg Protein) in die jeweilige Tasche gefüllt. Hierbei war darauf zu achten, dass in allen Taschen dieselbe Proteinmenge vorlag. Leere Taschen blieben mit sechs Mikroliter 4xLämmli beladen. Es wurden zunächst 30mA bei 100V angelegt, bis die Proben innerhalb von etwa 10 Minuten durch das Sammelgel gelaufen waren. Danach wurden für 30 Minuten 50mA und 200V angelegt. Die Proteine wurden im Trenngel, ihrem Molekulargewicht entsprechend, separiert.

3.2.3.2.6 Blotting

Der Laufpuffer wurde verworfen, die gläserne Abdeckplatte der Gelkammer an einer Seite eröffnet und das Sammelgel abgesetzt. Die Western-Blot-Membran, bestehend aus Nitrocellulose, wurde zunächst mit Blotting-Puffer benetzt. Sie wurde im Anschluss mit einer Pinzette auf dem Gel platziert und mit drei Filterpapieren bedeckt. Nun wurde auch die andere Glasscheibe vom Gel abgelöst. Diese Seite wurde ebenfalls mit drei Filterpapieren bedeckt. Sollten sich Luftblasen gebildet haben, wurden diese vorsichtig ausgestrichen. Das Gel wurde in der Blottingapparatur eingespannt und diese mit dem gleichnamigen Puffer befüllt. Um Überhitzung zu vermeiden, wurde ein Kühlelement in den Puffer gegeben und das Gerät von extern in einer Eiswanne gekühlt. Für 75 Minuten wurde bei 250V und 350mA geblottet.

3.2.3.2.7 Membranbehandlung und Antikörperzugabe

Die Membran wurde aus der Apparatur genommen und in eine durchsichtige Schale gelegt. Zur Kontrollfärbung wurde eine kleine Menge Ponceau S auf die Membran gegeben. Sie wurde leicht geschüttelt. Die Membran wurde mindestens zweimal mit Wasser entfärbt, sodass hauptsächlich die membran-gebundenen Proteine sichtbar blieben. In einer Klarsichtfolie geschützt wurde die Membran kopiert. Sie diente als Referenz. Im Anschluss wurde die Membran in eine kleine Schale gelegt und etwa 25ml fettarme Milch (5-10%) hinzugegeben. Diese blockte die Membran unspezifisch mit Protein. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur

auf dem Schüttler wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Nun konnte der erste Antikörper auf die Membran gegeben werden. Dieser war in Milch gelöst. Zur Inkubation wurde die Membran über Nacht im Kühlraum bei 4° C auf dem Schüttler belassen. Im Anschluss wurde sie dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Nun wurde der in 10ml TBS-T gelöste Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde sie dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Es wurde darauf geachtet, passende Primär- und Sekundärantikörper zu verwenden. Zu einem murinen Primärantikörper musste also ein anti-Maus-Sekundärantikörper zugegeben werden. Es wurden zwei Milliliter der Entwicklerreagenz (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; 1:1 Mischung aus Reagenz A und B) für die Dauer von einer Minute bei Raumtemperatur auf die Membran pipettiert. Diese wurde rasch und gleichmäßig verteilt. Die Membran wurde daraufhin mit einer Pinzette aus der Schale genommen. Sie wurde auf eine markierte Klarsichtfolie gelegt. Im Dunkelraum wurde die Membran bei verschiedenen langen Belichtungszeiten analysiert. Verwendet wurde das Chemilumineszenz-Messgerät Fusion SL mit der Software FusionCapt Advance SL4. Nach erfolgter Aufnahme wurde die Membran für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde mit der Milchlösung geblockt. Beide Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss konnte ein neuer Primärantikörper auf die Membran aufgebracht werden. Dieser muss das Protein jedoch mit anderer Spezifität binden. Alternativ kann der neue Primärantikörper auch ein zweites Protein mit anderem Molekulargewicht detektieren.

3.2.4 In-vitro-Experimente

3.2.4.1 Direkte *Ex-vivo*-Analyse der T-Zellreihe

Die Mäuse wurden euthanasiert und die Organe entnommen. Direkt im Anschluss wurde ohne vorhergehende Kultivierung eine Oberflächen-, Intrazellular- und FoxP3-Färbung durchgeführt. Ein Lebend/Tot-Farbstoff kam hierbei nicht zum Einsatz.

3.2.4.2 Direkte *Ex-vivo*-Analyse der B-Zellreihe

Die Mäuse wurden euthanasiert und die Organe entnommen. Ohne vorhergehende Kultivierung wurden die B-Zellen direkt der Oberflächenfärbung zugeführt. Eine B-Zell-Aufreinigung oder eine Lebend/Tot-Färbung wurden nicht durchgeführt.

3.2.4.3 Th-Differenzierungskulturen für drei & sieben Tage

Milz und Lymphknoten wurden entnommen und aufgereinigt. Im Anschluss wurden die Milz- und Lymphknotenzellen einer Maus gepoolt. Die in der Suspension enthaltenen, naiven T-Zellen wurden der Differenzierung zugeführt. Hierfür wurden diese in einer Konzentration von 1×10^6 /ml ausgesät. Zur Th0-, Th1- und Th2-Differenzierung wurde RPMI und für die Th17-

Differenzierung IMDM als Medium verwendet. Zu allen Zellreihen wurde Concavalin A in einer Konzentration von 0,5µl/ml zugegeben. Das Lektin aktiviert über Zuckerbindungen den TCR. Auch löst es kostimulatorische Signale aus. Folgende Zytokine wurden zur Differenzierung verwendet:

Th-Subtyp	Interleukin	Konzentration
Th0	IL-2	10 ng/ml
	α-IFN γ	2,5µg/ml
	α-IL4	2,5µg/ml
Th1	IL-2	10 ng/ml
	IL-12	10 ng/ml
	IFN γ	50 ng/ml
	α-IL-4	2,5 µg/ml
Th2	IL-2	10 ng/ml
	IL-4	10 ng/ml
	α-IFN γ	2,5 µg/ml
Th17	TGFb	2,5ng/ml
	IL6	50ng/ml
	IL21	62,5ng/ml
	α-IFN γ	2,5 µg/ml
	α-IL-4	2,5 µg/ml

Nach 72 bzw. 168 Stunden wurden die Zellkulturen restimuliert und geerntet. Hierfür wurden TPA und Ionomycin zu den Zellkulturen hinzugegeben. Zwei Stunden später wurde zusätzlich GolgiSTOP und Golgi-PLUG zugesetzt. TPA und Ionomycin regen die Lymphozyten zur Zytokinproduktion an. GolgiPlug und GolgiStop blockieren die intrazellulären Transportprozesse. Die Sekretion der Zytokine wird verhindert. Stattdessen akkumulieren diese im Golgi-Apparat der Zelle. Dies erhöht die Nachweisbarkeit der Zellen in der Durchflusszytometrie. Nach weiteren drei Stunden wurden die Zellkulturen geerntet. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie gefärbt.

3.2.4.4 Th-Differenzierungskulturen für fünf Tage

24 Stunden vor Beginn des Experiments wurden die Zellkulturplatten (9cm Durchmesser) mit 300µl Hamster-IgG (1:20, verdünnt in PBS) vorgecoatet. Am Tag des Experiments wurde das Hamster-IgG vorsichtig abpipettiert. Die Kulturplatten wurden zweimal mit jeweils 500µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden gewonnen und prozessiert. Aufgereinigt wurden die CD4⁺-Zellen mithilfe des Dynabeads Untouched Mouse T Cell Kit. Die aufgereinigten CD4⁺-Zellen wurden in einer Konzentration von 1x10⁶/ml in IMDM ausgesät. Zu allen Kulturen wurde anti-CD3 (0,5µg/ml) und anti-CD28 (2µg/ml) hinzugegeben. Im Anschluss wurden zur T-Zelldifferenzierung folgende Zytokine zugesetzt:

Th-Subtyp	Interleukin	Konzentration
Th1	IL2	10ng/ml
	IL12	10ng/ml
	IFN γ	50ng/ml
Th2	IL2	10ng/ml
	IL4	100ng/ml
	α -IFN γ	1 μ g/ml
Th17	TGF β	2,5ng/ml
	IL6	50ng/ml
	IL21	62,5ng/ml
	α -IFN γ	1 μ g/ml
	α -IL2	5 μ g/ml
iTreg	IL2	10ng/ml
	TGF β	5ng/ml
	α -IFN γ	1 μ g/ml

Nach 48 Stunden wurden die Th1- und Th2-Zellkulturen vom Stimulus genommen. Die Th17- und iTreg-Zellen wurden hingegen belassen. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit TPA/Iono restimuliert. Es wurde GolgiSTOP/PLUG zugesetzt. Die Zellen wurden geerntet, gefärbt und analysiert.

3.2.4.5 B-Zell-Kulturen

Ohne vorhergehende Aufreinigung wurden die Zellen nach Organen und Genotyp getrennt. Sie wurden in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml in RPMI ausgesät. Es wurden jeweils zwei Kulturen angesetzt. Hierbei kamen folgende Stimulanzen zum Einsatz:

Kulturtyp	Stimulanz	Konzentration
LPS-Kultur	LPS	10 μ g/ml
IgM/CD40-Kultur	IgM	10 μ g/ml
	CD40	5 μ g/ml

Die Zellen wurden für fünf Tage in Kultur gehalten. Im Anschluss wurden die Lymphozyten ohne weitere Restimulation geerntet. Sie wurden für die Western Blots weiter prozessiert.

3.2.5 In-vivo-Experimente

3.2.5.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation zur Untersuchung der akuten GvHD

Die verwendeten Spendermäuse wurden von unserer Arbeitsgruppe gezüchtet. Sie entstammen somit der Tierhaltung des ZEMM. Die Empfängermäuse wurden von Charles River Deutschland bezogen (BALB/c, Haplotyp H2^d). Bei Versuchsdurchführung waren alle Mäuse zwischen acht und zwölf Wochen alt. Spender- und Empfängertiere waren vom selben Geschlecht.

Die zu transplantierenden Zellen wurden von Spendermäusen gewonnen. Je nachdem, ob Knochenmarkszellen, Wildtyp- oder Knockout-Lymphozyten gewonnen werden sollten, wurden jeweils unterschiedliche Mäuse verwendet. Die Lymphozyten waren eine Suspension aus Milz- und Lymphknotenzellen der jeweiligen Mausgruppe. Alle T-Lymphozyten wurden mithilfe des MojoSort Mouse CD3 T Cell Negative Selection Kit von BioLegend aufgereinigt.

Zur Konditionierung wurden alle Empfängermäuse einer Bestrahlung mit acht Gray durch das Faxitron CP-160 ausgesetzt. Die Transplantation von T-Zell-depletierten Knochenmarkszellen und Luciferase⁺-T-Lymphozyten erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach Bestrahlung. Hierfür wurde den Mäusen zunächst 250µl eines Anästhetikums (eine Mischung aus Ketamin + Xylazin) intraperitoneal appliziert. Im Anschluss wurde jeder Maus 5x10⁶ Knochenmarkszellen und 1,2x10⁶ T-Lymphozyten transplantiert. Die Zellen wurden den Versuchstieren retroorbital injiziert. [100]

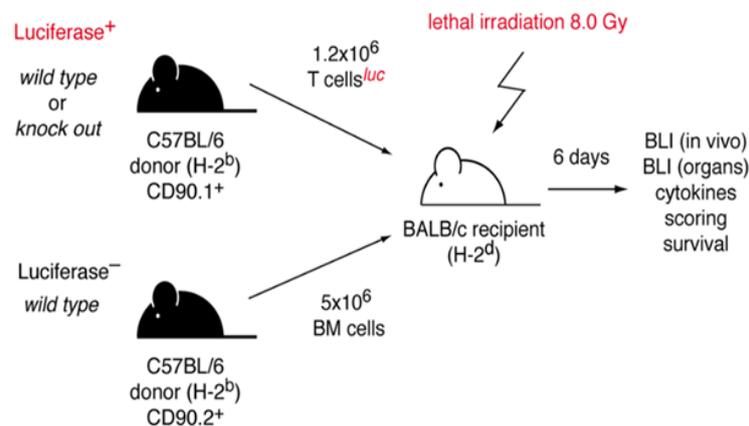


Abbildung 13: Nach der Bestrahlung werden den Empfängermäusen – im Rahmen des *major-mismatch*-aGvHD-Modells – T-Zell-depletierte Knochenmarkszellen sowie Luciferase⁺-Spender-T-Zellen appliziert. Die Empfängertiere entwickeln innerhalb von einigen Tagen eine schwere aGvHD. Die Abbildung wurde aus Vaeth et al. übernommen. [58]

Die Versuchstiere wurden vor und während des Versuchs täglich gewogen. Der Verlauf der GvHD wurde mittels BLI protokolliert. An d+6 wurden die Mäuse erneut anästhesiert. Ihnen wurden die Organe entnommen. Diese wurden nach einem standardisierten Schema mittels BLI aufgenommen. Im Anschluss wurden Milz und Lymphknoten der Mäuse zur Durchführung einer FACS-Färbung weiter prozessiert. Haut, Dün- und Dickdarm sowie Lunge und Leber der Versuchstiere wurden für zukünftige Versuche in Formalin eingelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Kleinere lymphatische Organe in der *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie

Die Tiere der neu kreierte *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*- und *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinien unterschieden sich in Größe, Gewicht und Lebensdauer nicht auffällig von wildtypischen Mäusen. Auch zeigten sich keine anderweitigen, phänotypischen Besonderheiten. Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl der untersuchten Tiere kann jedoch im Hinblick auf Fertilität und Wurfgröße noch keine zuverlässige Aussage getroffen werden. Es fiel jedoch auf, dass die lymphatischen Organe von *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Tieren wiederholt von geringerem Volumen als jene der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*- oder *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre*-Mäuse waren. Insbesondere waren sie jedoch kleiner als die Organe der wildtypischen Tiere. Eine statistische Auswertung der Organvolumina führten wir nicht durch, auch wurden keine Gesamtzellzahlen der Organe ermittelt. Trotzdem spiegelt **Abbildung 14** das Gesamtbild gut wider.

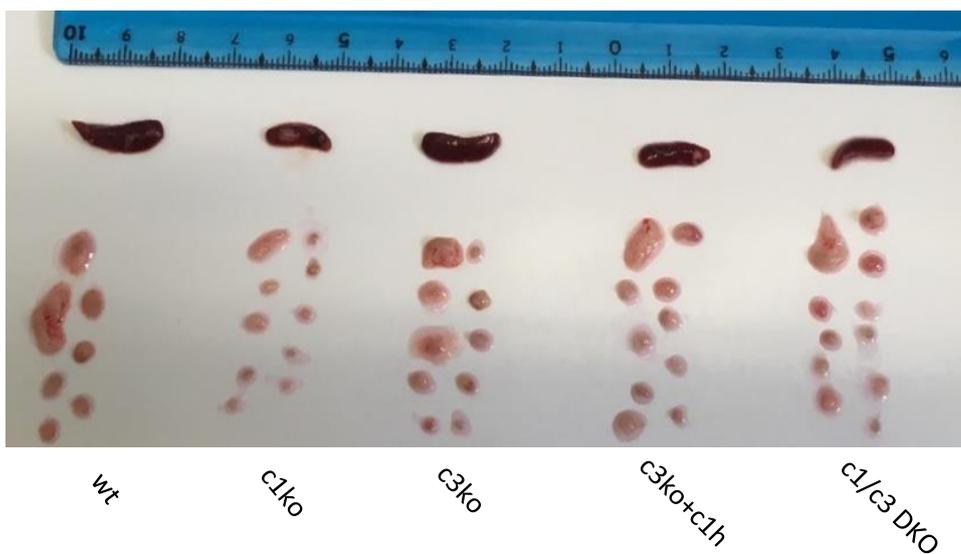


Abbildung 14: Die lymphatischen Organe der *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie sind kleiner als jene der wildtypischen oder der NFAT-einzeldefizienten Mauslinien. Nomenklatur: wt = Wildtyp; c1ko = *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre*; c3ko = *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*; c1ko+c1h = *Nfatc1^{fl/+}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*; c1/c3 DKO = *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*

4.2 Proteinexpression der NFAT-Mitglieder per Western Blot

4.2.1 Analyse von NFATc3

4.2.1.1 NFATc3 wird vermehrt in Th0- und Th2-Zellen exprimiert

Um das grundlegende Verständnis der Expression von NFATc3 zu vertiefen, wurden initial Western Blot-Analysen durchgeführt. Die NFAT-Transkriptionsfaktoren sind hierbei aufgrund ihrer Größe gut voneinander zu unterscheiden. Während man NFATc3 im Bereich zwischen 140 und 190 kDa antrifft, ist NFATc2 recht genau bei 130 kDa zu finden. Drei Gruppen der insgesamt sechs Isoformen von NFATc1 lassen sich im Western Blot nachweisen. Diese sind bei 86 kDa, 110 kDa und 140 kDa anzutreffen. In den hier durchgeführten Analysen ist die Bande bei 86 kDa, also der sog. kurzen Isoform NFATc1/ αA , am deutlichsten zu erkennen. Bei der Erstellung der Western Blots wurde entsprechend Abschnitt 3.2.3.2 vorgegangen.

Es wurden initial Gesamtzellextrakte aus isolierten Milz- und Lymphknotenzellen einer wildtypischen sowie einer *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Maus gewonnen. Die T-Zellen waren – wie in Abschnitt 3.2.4.3 beschrieben – in T-Zell-Subtypen differenziert worden. Eine T-Zell-Aufreinigung wurde vor der Aussaat nicht durchgeführt. In **Abbildung 15** ist zu erkennen, dass NFATc3 in wildtypischen Zellen v.a. in Th0- und Th2-Zellen, sowie in geringerer Konzentration auch in Th1-Zellen nachgewiesen werden konnte. Als Ladekontrolle im Zytoplasma wurde hier das als Doppelbande bei 42 und 44 kDa sichtbare ERK-Protein verwendet. Legt man die schwächere ERK-Bande der Th2-Expression als geringere Proteinkonzentration aus, wird die präferentielle NFATc3-Expression in Th2 noch deutlicher. In Th17-Zellen war NFATc3 kaum detektierbar, wobei auch die Ladungskontrolle kein Signal zeigte. In **Abbildung 15** ist NFATc3 in niedriger Konzentration in den *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre* Th-Subtypen sichtbar. Dies führen wir auf die nicht durchgeführte T-Zellaufreinigung zurück. B-Zellen, myeloide Progenitorzellen etc. können in diesem Genotyp noch NFATc3 produzieren. Sie wurden zwar nicht aktiviert, führen aber zu einer Hintergrundexpression.

Zusammenfassend konnten wir durch **Abbildung 15** nachweisen, dass NFATc3 in wildtypischen Tieren in Th0- und im Besonderen in Th2-Zellen exprimiert wird.

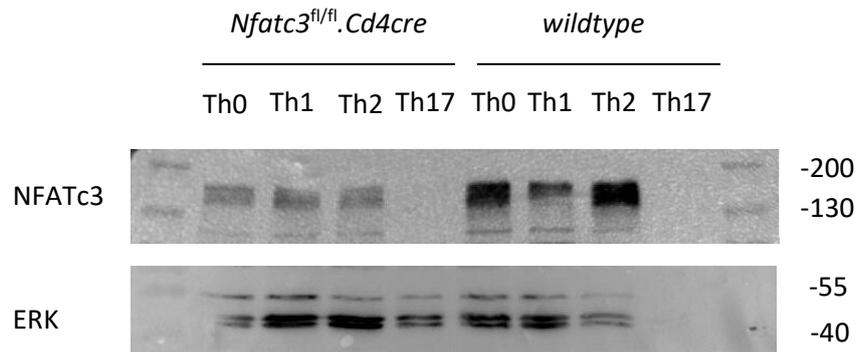


Abbildung 15. NFATc3 wird vermehrt in Th0- und insbesondere in Th2-Zellen und weniger in Th1-Zellen exprimiert. Milz- und Lymphknotenzellen aus Mäusen eines Genotyps wurden gepoolt und 3 Tage *in vitro* zu Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Zellen differenziert. Eine vorherige T-Zell-Aufreinigung wurde nicht durchgeführt. Vor der Ernte wurden die Zellen für 4h mit TPA/Iono restimuliert. Es wurden Gesamtzellextrakte gewonnen.

4.2.1.2 Ein unvollständiger Knockout führt zu einer reduzierten NFATc3-Konzentration

Im inaktiven Zustand ist NFATc3 im Zytoplasma anzutreffen. Nach Aktivierung wird es anschließend in den Zellkern transloziert. In **Abbildung 16** wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte von nicht und restimulierten, wildtypischen Zellen solchen von *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mäusen gegenübergestellt. Auch sind Extrakte einer vollständig NFATc3-defizienten Keimbahnchimäre (*Nfatc3^{-/-}*) sowie einer heterozygoten Maus (*Nfatc3^{+/fl}.Cd4cre*) untersucht worden. In den *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mäusen wird NFATc3 lediglich in den T-Zellen nicht mehr exprimiert. Im Gegensatz dazu wird NFATc3 in der *Nfatc3^{-/-}* - Maus in keiner Körperzelle mehr gebildet. Auch hier wurden die T-Zellen für fünf Tage in ihrer natürlichen Leukozytenpopulation kultiviert. Während die eine Hälfte der Zellkulturen vor der weiteren Verarbeitung für vier Stunden mit TPA/Iono restimuliert wurde, unterblieb dies bei den anderen Kulturen. Bei allen Zellen wurde anschließend Kern- und Zytoplasmaextrakte gewonnen. Wie erwartet, wird NFATc3 in den wildtypischen Zellen nach Restimulation vermehrt in den Zellkern transloziert. Auch ist sichtbar, dass bei heterozygoten Tieren (*Nfatc3^{+/fl}.Cd4cre*) durchaus noch NFATc3 gebildet werden kann, jedoch in deutlich reduzierter Konzentration. Als Kernmarker und Ladungskontrolle wurde hier HDAC verwendet. Ladungskontrollen im Zytoplasma wurden nicht durchgeführt. Die schwach sichtbaren Banden von NFATc3 in den Kernextrakten der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie führen wir erneut auf die fehlende T-Zellaufreinigung zurück, wobei auch in den Zellen aus konventionellen NFATc3-defizienten Tieren schwache NFATc3-Banden zu sehen waren. Damit kann dies ebenfalls eine unspezifische Hintergrundbande oder durch einen Fehler während der Versuchsdurchführung zustande gekommen sein.

Zusammenfassend konnten wir in **Abbildung 16** zeigen, dass NFATc3 bei Aktivierung in den Zellkern transloziert wird. Auch wurde nachgewiesen, dass heterozygote Zellen unterproportional wenig NFATc3 bilden.

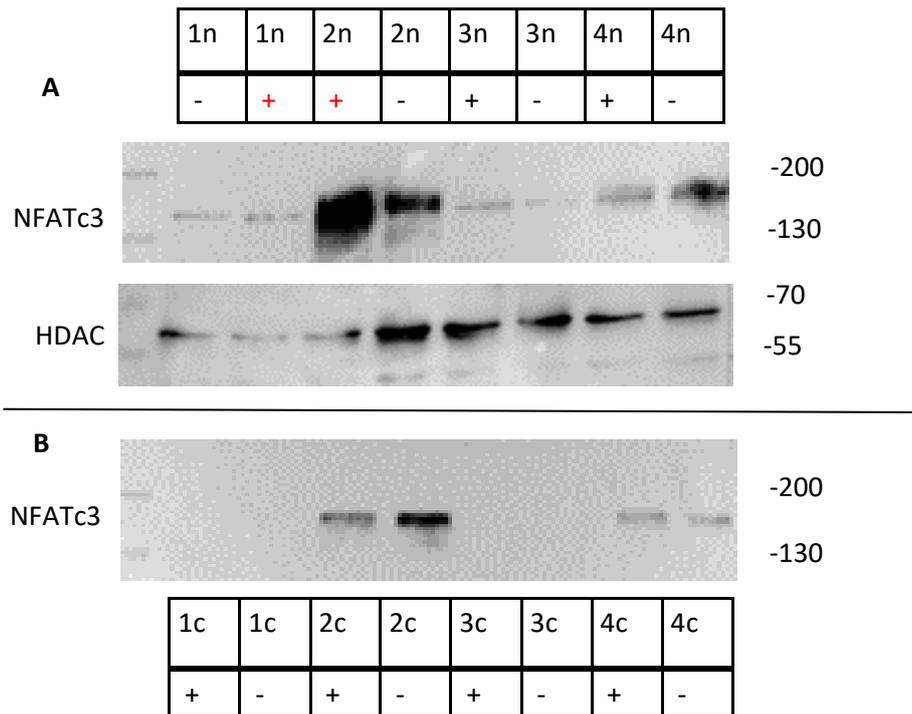


Abbildung 16: NFATc3 wird nach Stimulation in den Zellkern transloziert. Milz- und Lymphknotenzellen wurden gepoolt und anschließend für fünf Tage *in vitro* kultiviert. Vor Entnahme wurden ein Teil der Zellen für 4h mit TPA/Iono restimuliert. Anschließend wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte gewonnen und diese getrennt analysiert. Nomenklatur: 1 = *Nfatc3*^{-/-}; 2 = *wt*; 3 = *Nfatc3*^{fl/fl}.*Cd4cre*; 4 = *Nfatc3*^{+/+}.*Cd4cre*; n = Kernextrakte; c = Zytoplasmaextrakte; + = restimuliert; - = nicht restimuliert **A** Kernextrakte; HDAC wird ausschließlich im Zellkern exprimiert. Es ist hier bei 62kDa nachweisbar und fungiert als Kernmarker und Ladungskontrolle **B** Zytoplasmaextrakte

4.2.1.3 Bcl2 ist ein mögliches NFATc3-Target-Gen

In der weiteren Analyse von NFATc3-defizienten T-Zellen konnten wir nachweisen, dass eine NFATc3-Defizienz – wie für den Thymus beschrieben [64] – mit einer Minderproduktion von Bcl2 einhergeht. Entsprechend kann postuliert werden, dass es sich bei Bcl2 eventuell um ein direktes Target-Gen von NFATc3 handeln könnte.

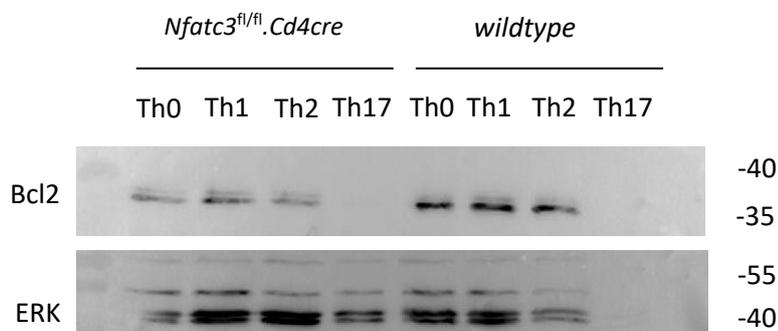


Abbildung 17: Bcl2 ist ein mögliches Target-Gen von NFATc3. Die bereits in Abschnitt 4.2.1.1 analysierten Extrakte wurden hier in Bezug auf die Bcl2-Produktion hin untersucht.

4.2.2 Diskonkordante Expression von NFATc3 und NFATc1

Ein Zusammenhang zwischen NFATc1- und NFATc3-Expression wurde bereits von Cantée-Barrett et al. postuliert. [70] Entsprechend konnten wir in den durchgeführten Western Blot-Untersuchungen ein entgegengesetztes Verhalten der Zellen im Hinblick auf die Expression von NFATc3 und NFATc1 nachweisen. In **Abbildung 18** ist eine vermehrte Expression von NFATc1 in Abwesenheit von NFATc3 deutlich zu erkennen. Auch zeigte sich, dass IRF4 und Bcl2A1, als bekannte NFATc1-Target-Gene, in Abwesenheit von NFATc3 vermehrt gebildet werden. Bcl2A1 ist Mitglied der Bcl2-Proteinfamilie. Sowohl Bcl2 als auch Bcl2A1 haben antiapoptotische Effekte. [101, 102]

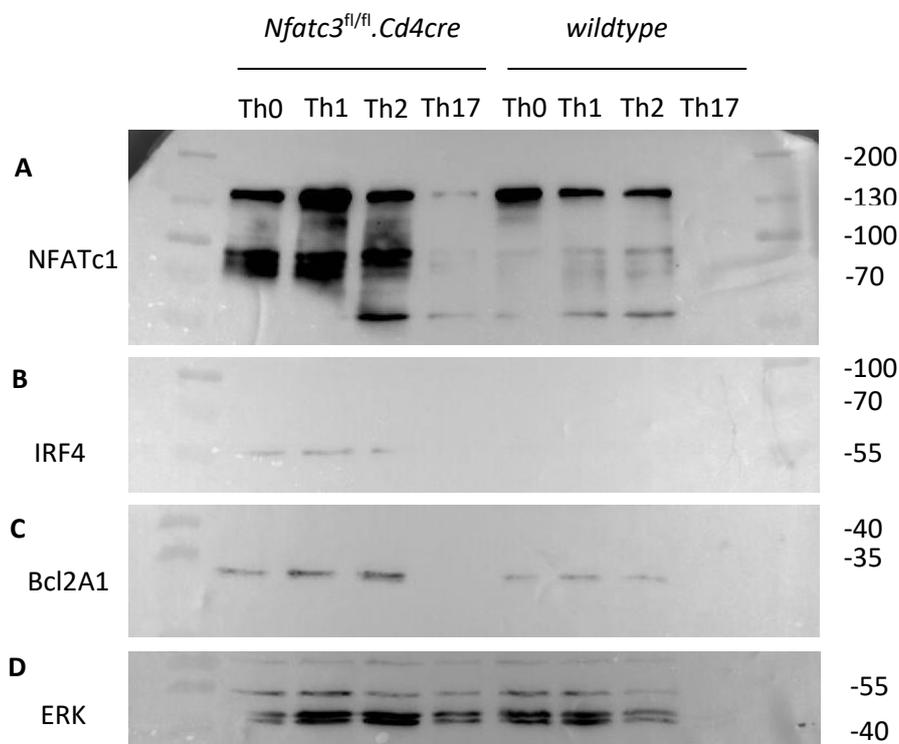


Abbildung 18: Vermehrte Expression von NFATc1 sowie von IRF4 und Bcl2A1 bei NFATc3-Defizienz. Die bereits in Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.3 untersuchten Extrakte wurden hier im Hinblick auf die Expression von NFATc1, IRF4 und Bcl2A1 hin analysiert. **A** NFATc1 **B** IRF4 (51,8kDa) **C** Bcl2A1 (20kDa) **D** ERK (42 und 44kDa)

Umgekehrt ist in **Abbildung 19** zu erkennen, dass *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre* -Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen vermehrt NFATc3 exprimieren. Auch nimmt die NFATc3-Produktion nach Stimulation mit TPA/Iono zu, wobei eine Ladungskontrolle für den genauen Vergleich der Proteinmengen pro Bande fehlt.

In den **Abbildungen 18 und 19** konnten wir nachweisen, dass eine NFATc3-Defizienz zu einer erhöhten NFATc1-Expression führt und *vice versa*. Auch werden BclA1 und IRF4 als NFATc1 Target-Gene bei NFATc3-Defizienz vermehrt gebildet.

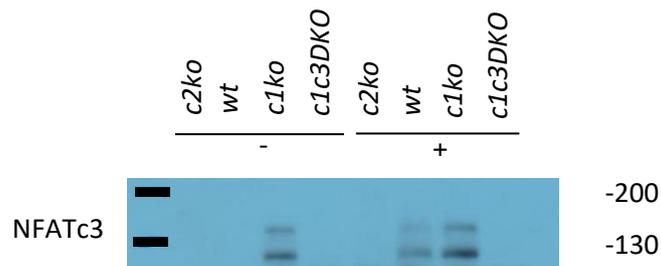


Abbildung 19: Vermehrte Expression von NFATc3 bei NFATc1-Defizienz sowie erhöhte NFATc3-Produktion nach Restimulation. Milz- und Lymphknotenzellen eines Genotyps wurden gepoolt und 5 Tage *in vitro* kultiviert. Vor Entnahme wurden einige Zellen für 4h mit TPA/Iono restimuliert. Es wurden Gesamtzellextrakte gewonnen. Nomenklatur: *c2ko* = *Nfatc2^{-/-}*; *wt* = Wildtyp; *c1ko* = *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre*; *c1/c3 DKO* = *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*; - = nicht restimuliert; + = restimuliert

4.2.3 Widersprüchliche Ergebnisse über die Beziehung von NFATc3 und NFATc2

Übereinstimmend mit anderen Daten unserer Arbeitsgruppe konnte in **Abbildung 20** erneut gezeigt werden, dass NFATc2 v.a. in Th0- und Th1-Zellen und in geringerem Umfang in Th2- und Th17-Zellen exprimiert wird. [103] In Bezug auf das Verhältnis von NFATc2 zu NFATc3 zeigen sich in den durchgeführten Experimenten widersprüchliche Ergebnisse. In **Abbildung 19** kann bei nicht-restimulierten NFATc2-defizienten Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen kein Unterschied in der NFATc3-Produktion ausgemacht werden. Nach Restimulation nimmt die NFATc3-Produktion bei wildtypischen Zellen jedoch deutlich zu, während dies bei NFATc2-Defizienz nicht der Fall ist. Hieraus kann man auf eine positive Rückkopplung von der NFATc2-Aktivität auf die NFATc3-Expression schließen. Wie in **Abbildung 20** dargestellt, führt eine NFATc3-Defizienz jedoch eher zu einer vermehrten NFATc2-Produktion. **Abbildung 20** lässt daher umgekehrt eher eine negative Rückkopplung der NFATc3- auf die NFATc2-Expression vermuten. Und zuletzt kann in **Abbildung 21** keine Auswirkung auf die NFATc2-Expression bei NFATc3-Defizienz nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten wir in Bezug auf das Verhältnis von NFATc2 zu NFATc3 aus den erhobenen Daten keine konklusiven Rückschlüsse ziehen. Eine Wechselwirkung von NFATc2 und NFATc3 scheint wahrscheinlich, diese ist jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als die Interaktion zwischen NFATc1 und NFATc3 und möglicherweise kontextabhängig.

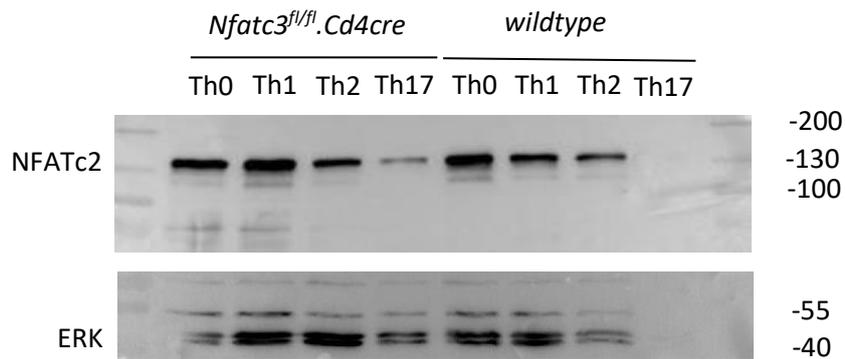


Abbildung 20: NFATc2 wird verstärkt in Th0- und Th1-Helferzellen exprimiert. Leichtgradige Mehrproduktion von NFATc2 bei NFATc3-Defizienz. Die bereits in den Abschnitten 4.2.1.1, 4.2.1.3 und 4.2.2 verwendeten Extrakte wurden hier im Hinblick auf die Expression von NFATc2 hin analysiert.

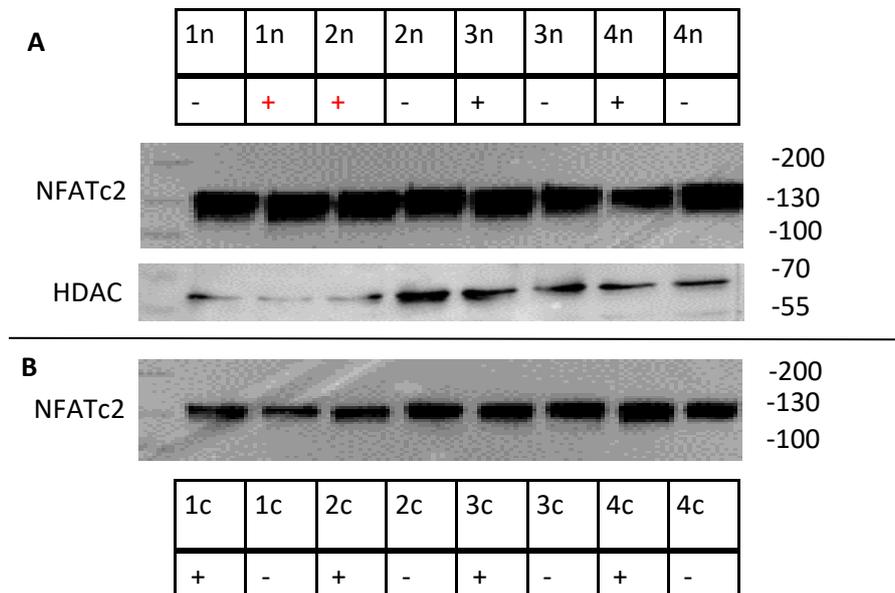


Abbildung 21: Die Konzentration von NFATc2 wird durch NFATc3-Defizienz nicht beeinflusst.

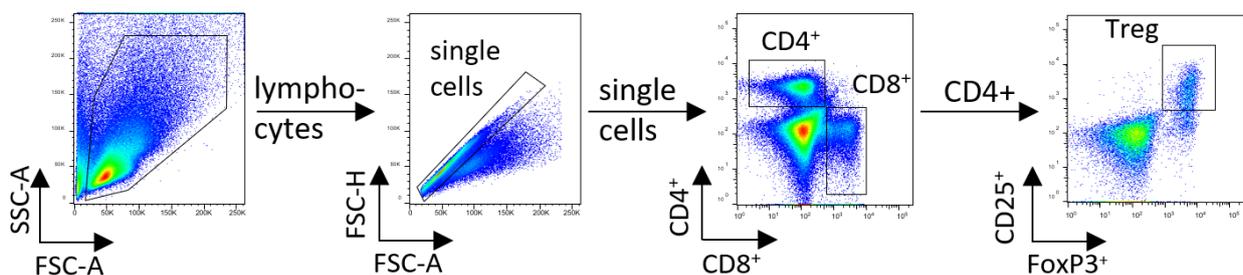
Die bereits in Abschnitt 4.u2.1.2 verwendeten Kern- und Zytoplasmaextrakte wurden hier auf die Expression von NFATc2 hin untersucht. 1 = *Nfatc3^{-/-}*; 2 = *wt*; 3 = *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*; 4 = *Nfatc3^{+/fl}.Cd4cre*; n = Kernextrakte; c = Zytoplasmaextrakte; + = restimuliert; - = nicht restimuliert **A** Kernextrakte; HDAC wird ausschließlich im Zellkern exprimiert. Es ist hier bei 62kDa nachweisbar und fungiert als Kernmarker und Ladungskontrolle **B** Zytoplasmaextrakte

4.3 Durchflusszytometrische Analyse

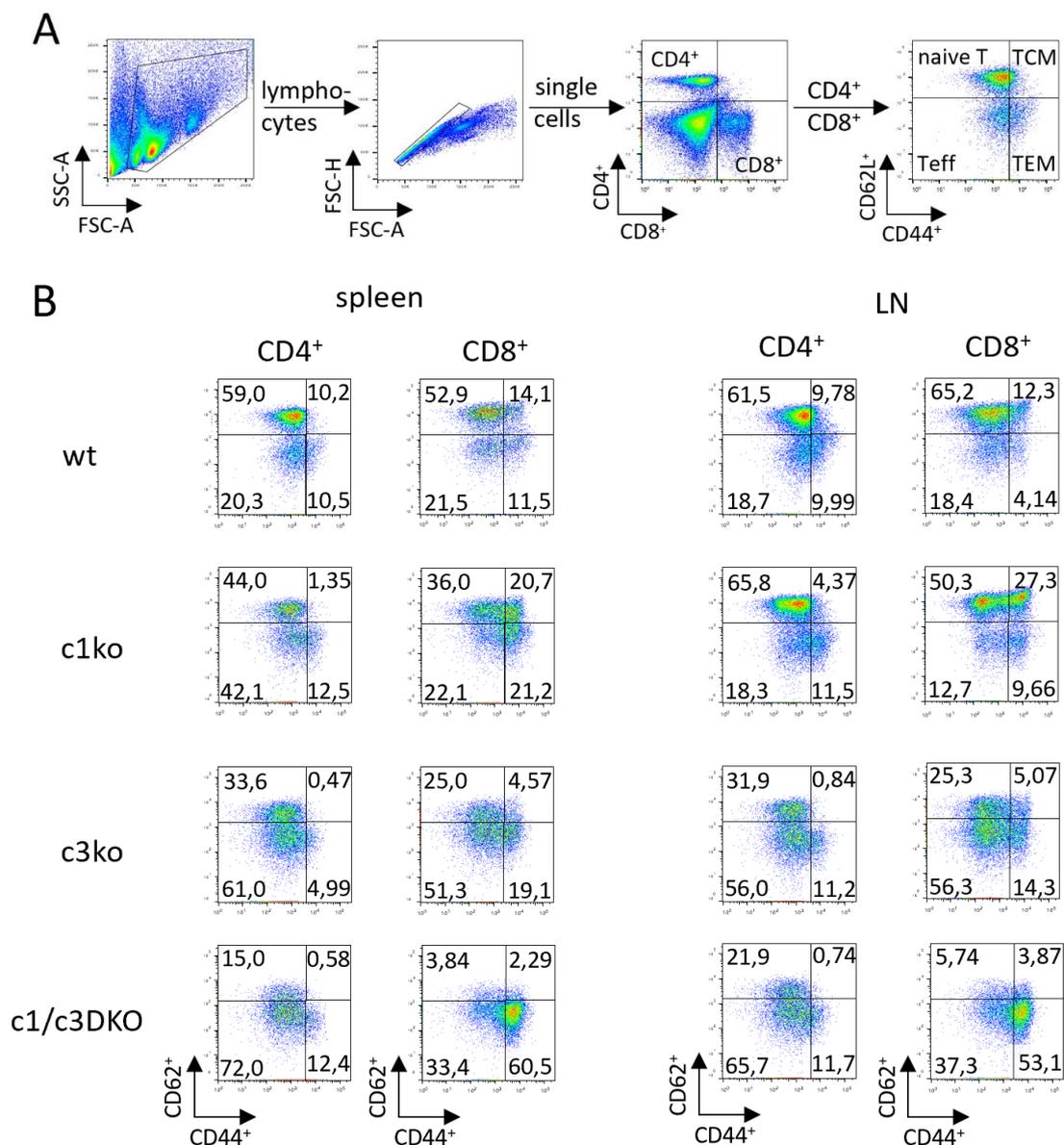
4.3.1 Eine NFATc1 und/ oder c3-Defizienz gehen *ex vivo* mit einer erniedrigten CD4⁺ - und erhöhten Treg-Zellzahlen einher

Zur Untersuchung der neu kreierten *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* und *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* Mauslinien führten wir *Ex-vivo*-Analysen der T-Zellreihen durch. Die beiden neuen Mauslinien wurden mit wildtypischen und *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre-*Tieren verglichen. Die Experimente wurden – wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben – durchgeführt. **Abbildung 22** zeigt auf, dass die gleichzeitige Abwesenheit von NFATc1 und NFATc3 zu einer deutlich ausgeprägteren Reduktion der CD4⁺-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen als die Abwesenheit von nur einem der beiden Transkriptionsfaktoren führt. Insbesondere in den doppeldefizienten Zellen kam es in Milz und Lymphknoten zu einer signifikanten Änderung im Verhältnis der CD4⁺- zu den CD8⁺-T-Zellen. Mit einem p-Wert von 0.056 ist dieses Verhältnis auch in den Milzzellen der NFATc3-defizienten Zellen fast signifikant. Während die prozentuale Anzahl der Treg-Zellen bei der NFATc1-Defizienz unverändert bleibt, ist eine deutliche Erhöhung der Treg-Zahlen bei der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* und der *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-*Mauslinie zu beobachten. Anzumerken ist, dass mit einem p-Wert von 0,09 die statistische Signifikanzschwelle bei den doppeldefizienten Treg-Zellen in der Milz auch fast erreicht wurde. Eine Änderung der Frequenz der CD8⁺-Zellen innerhalb der Milz- oder Lymphknotenzellen in An- oder Abwesenheit der NFAT-Faktoren war nicht nachweisbar.

A



In der weiteren Phänotypanalyse der verschiedenen T-Zell-Subtypen zeigte sich – aufgeführt in **Abbildung 23** – sowohl in den CD4⁺- also auch in den CD8⁺-T-Zellen eine Reduktion der naiven T-Zellen in den NFATc3-defizienten Zellen, welche bei zusätzlicher NFATc1-Defizienz noch aggravierte. Eine ähnliche Tendenz konnte auch für die T_{CM}-Zellen nachgewiesen werden, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Im Gegenzug konnte ein Anstieg der CD4⁺- und CD8⁺-T-Effektorzellen beobachtet werden. In den CD8⁺-Zellen ist ebenfalls ein Anstieg der T_{EM}-Zellen, insbesondere bei den DKO-Zellen nachweisbar. In den untersuchten CD4⁺-T-Lymphozyten wurde kein Anstieg der T_{EM}-Zellen beobachtet. Es kam im Gegenteil eher zu einem Rückgang dieser Zellpopulation, insbesondere in den NFATc3-defizienten Zellen der Milz. In den Lymphknoten war dieser Rückgang weniger stark ausgeprägt und auch in den doppeldefizienten Zellen nicht nachweisbar. Zu dieser Auswertung ist einschränkend anzumerken, dass T_{eff}- und T_{EM}-Populationen in dieser Färbung nicht klar voneinander abgegrenzt werden können. (beide Populationen sind CD62^{low}/CD44^{high}, vgl. Abschnitt 2.2.3). Hervorzuheben ist jedoch, dass die beschriebenen Veränderungen bei einer alleinigen NFATc1-Defizienz nicht nachzuweisen waren. Bei der Gating-Strategie wurde sich an Bosselut et al. orientiert. [18]



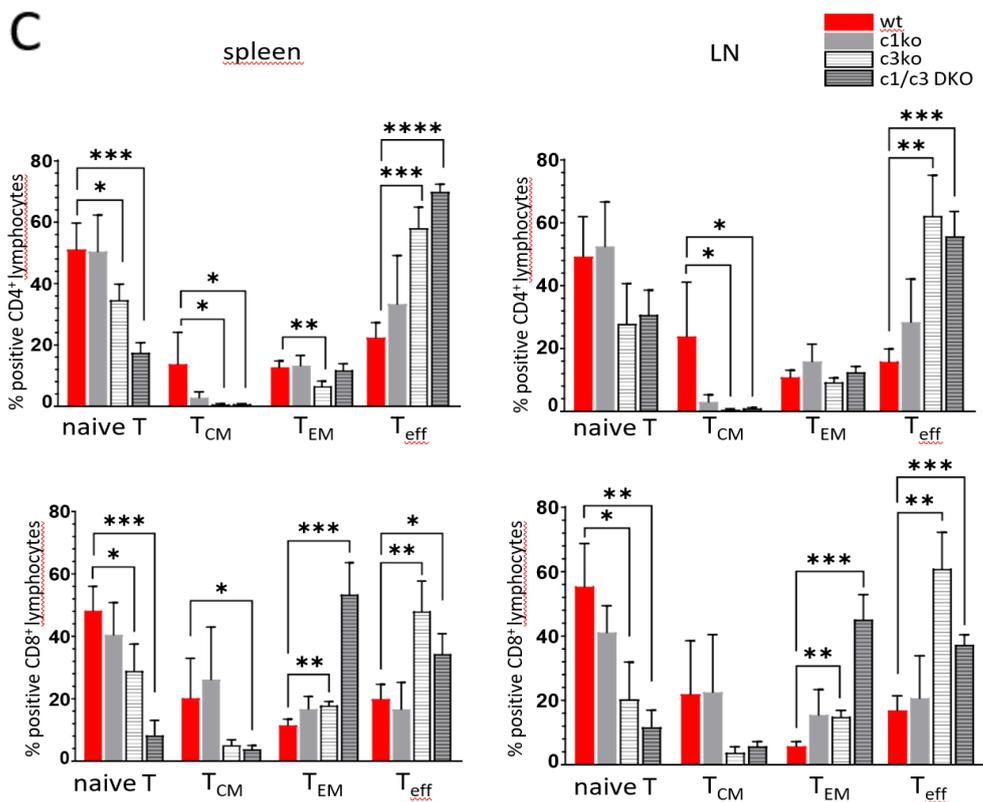


Abbildung 23: Eine NFATc3- (mit zusätzlicher NFATc1-) Defizienz geht insbesondere mit einem Anstieg der T_{eff} einher. Es wurden dieselben Zellkulturen wie in Abbildung 22 analysiert. **A** Gating-Strategie; **B** repräsentative Durchflusszytometrie-Plots; **C** die abgebildeten Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test* kalkuliert. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, **** p < 0.0001)

CD4 und damit Cd4Cre wird ab oder kurz vor dem DP-Stadium der Thymozyten exprimiert, während sich LckCre schon zwischen DN2 und DN3 auswirkt. In den Experimenten von Cantée-Barrett et. al wurde eine konditionelle NFATc3 mit LckCre verpaart und analysiert. Die hier vorbeschriebene, erhöhte Zellzahl im DN3-Stadium mit einhergehender, erniedrigter Zahl an DN4-Thymozyten in Abwesenheit von NFATc3 (und NFATc1) konnten wir bei der Analyse der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie daher nicht nachweisen. Während sich auch die DP- und CD8⁺-Zellzahlen in allen untersuchten Genotypen ähnlich präsentierten, zeigte sich in den NFATc3-defizienten Thymi sogar ein geringer Anstieg der CD4⁺-Thymozyten. In den doppeldefizienten Organen war hingegen ein Abfall derselbigen nachgewiesen worden. Dies ist kongruent mit den Untersuchungen von Cantée-Barrett et al. und Patra et al., dass ein durch NFATc3-Defizienz induzierter Block in der T-Zellreifung durch IL-7-induzierte NFATc1-Aktivierung (teilweise) kompensiert werden kann. Wir gehen davon aus, dass die vorbeschriebenen, erhöhten DN3-, sowie erniedrigten DN4- und SP-Population in den NFATc3- bzw. doppeldefizienten Zellen auf einer früheren Verschiebung während der Thymozytenentwicklung beruhen, die nur mit LckCre deutlich wird. Allerdings ist auch anzumerken, dass alle unsere diesbezüglich verwendeten Daten in lediglich einem Versuch, allerdings n=4, erhoben wurden. Der von Canteé-Barrett et al. vermutete, vollständige Block in der thymischen T-Zellreifung (bzw. der positiven Selektion) in einer NFATc1/c3-doppeldefizienten Mauslinie konnte somit so nicht nachgewiesen werden. Trotzdem zeigte sich eine eingeschränkte T-Zellreifung in

den NFATc1/c3-doppeldefizienten CD4⁺-Thymozyten, was hier auf einer direkten Beeinflussung im DP- oder sogar CD4⁺-SP-Stadium zurückzuführen sein muss. [53, 70]

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine NFATc3- bzw. eine NFATc1/c3-Defizienz *in vivo* mit einer erniedrigten Frequenz an CD4⁺-T-Zellen und konsekutiv mit einem erniedrigten CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis einhergeht. Innerhalb der CD4⁺-Population konnte ein prozentualer Rückgang der naiven T-Zellen, mit einem entsprechenden Anstieg der T-Effektorzellen nachgewiesen werden.

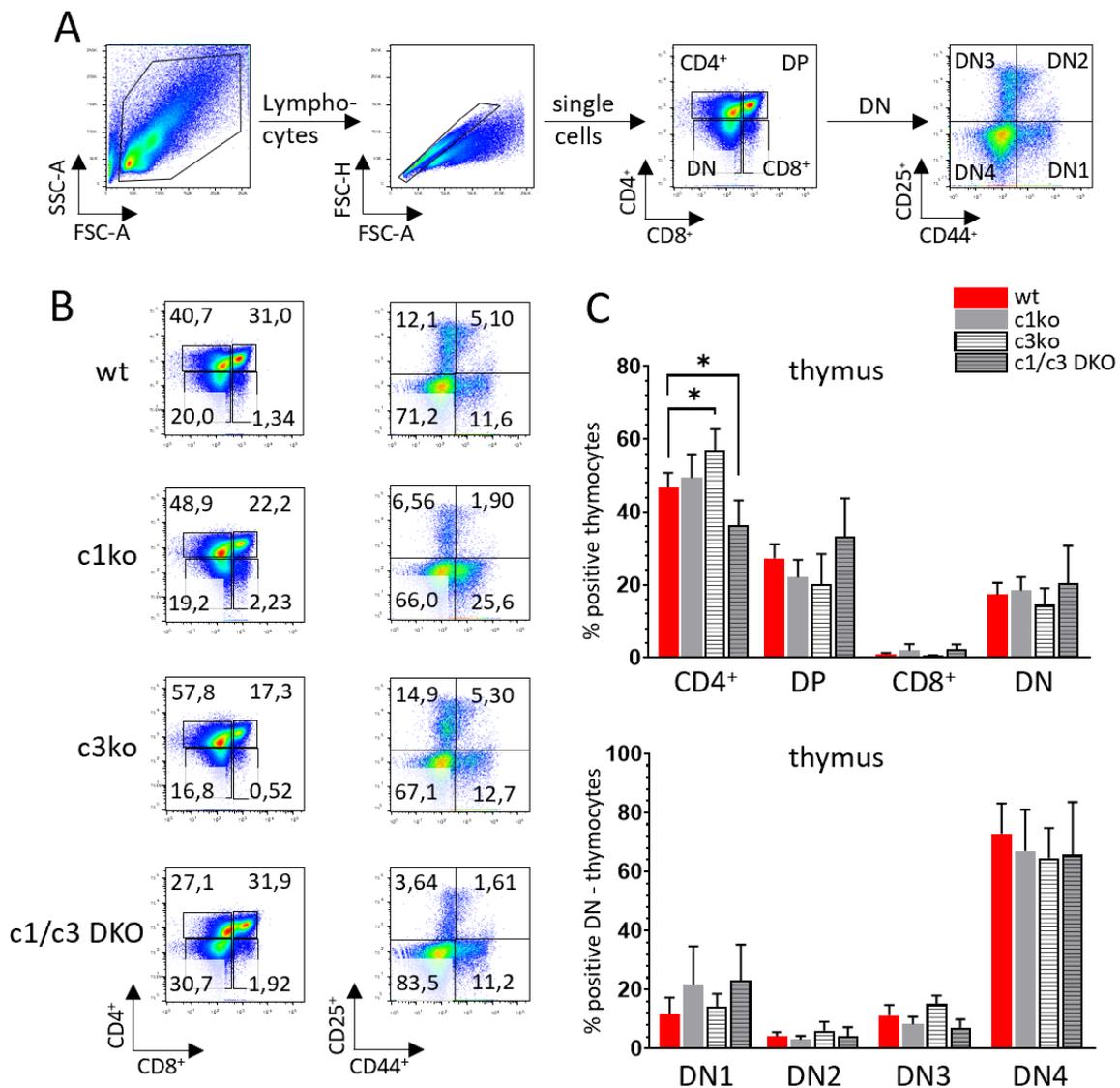


Abbildung 24: Die Frequenz der CD4⁺-Thymozyten ist in NFATc1/c3-defizienten Mäusen erniedrigt. Die Thymi wurden nach Extraktion direkt, d.h. ohne vorherige Zellkultur oder Stimulation der Untersuchung zugeführt. Eine Lebend/Tot-Färbung fand nicht statt. Es wurden vier Mäuse pro Genotyp analysiert. In Abschnitt A wird die Gating-Strategie, in B repräsentative Durchflusszytometrie-Plots dargestellt. Die in Abschnitt C abgebildeten Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test* kalkuliert. (* p < 0.05)

4.3.2 *In-vitro*-Analysen zeigen in der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie keine relevanten Änderungen in der Zytokinproduktion

Um die Auswirkung der NFATc3-Defizienz auf die Funktion der Th-Subtypen zu untersuchen, legten wir Zellkulturen entsprechend dem in Abschnitt 3.2.4.3 aufgeführten Protokoll an. Bei den ausgesäten Zellen handelt es sich um gepoolte Milz- und Lymphknotenzellen. Eine T-Zellaufreinigung wurde vor der Aussaat nicht durchgeführt. Um einen ggf. vorhandenen, zeitlichen Einfluss der NFATc3-Defizienz auf die T-Zellfunktion beurteilen zu können, wurden Zellkulturen für jeweils drei und sieben Tage angelegt. Die ausgewerteten Daten der wildtypischen und NFATc3-defizienten Zellen stammen von vier Mäusen, welche in vier zeitlich getrennt durchgeführten Versuchen analysiert wurden. Es war leider nur in zwei der vier Versuche möglich, passende NFATc1-defiziente Mäuse auszuwerten. Eine statistische Beurteilung der NFATc1-defizienten Zellen ist daher, bei lediglich zwei untersuchten Tieren, nicht möglich. Zum Vergleich sind die Graphen dennoch in der Auswertung mitaufgeführt. Im Gegenzug werden die Daten der hier ebenfalls gefärbten B220⁺-Zellen nicht gesondert gezeigt, da im weiteren Verlauf eine detailliertere B-Zelluntersuchung erfolgte. Kongruent zu den Ergebnissen der *Ex-vivo*-Analyse (vgl. **Abbildung 22**) konnten nach 72 Stunden Zellkultur – wie in **Abbildung 25** dargestellt – in allen NFATc3-defizienten T-Zellpopulationen im Vergleich zu den wildtypischen Zellen geringere Mengen CD4⁺-T-Zellen und erhöhte CD8⁺-T-Zellzahlen nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Tieren wurde die Signifikanzschwelle in diesem Experiment wiederholt knapp nicht erreicht. Auch die errechneten p-Werte für das Verhältnis CD4⁺/CD8⁺ bei NFATc3-Defizienz im Vergleich zu den wildtypischen T-Zellen lagen – je nach Th-Differenzierungskultur – zwischen 0.14 und 0.24 und sind somit noch nicht signifikant. (Daten nicht gezeigt) Nach sieben Tagen ist die Reduktion der CD4⁺-T-Helferzellen in keiner der Subpopulationen mehr nachweisbar. (Daten nicht gezeigt)

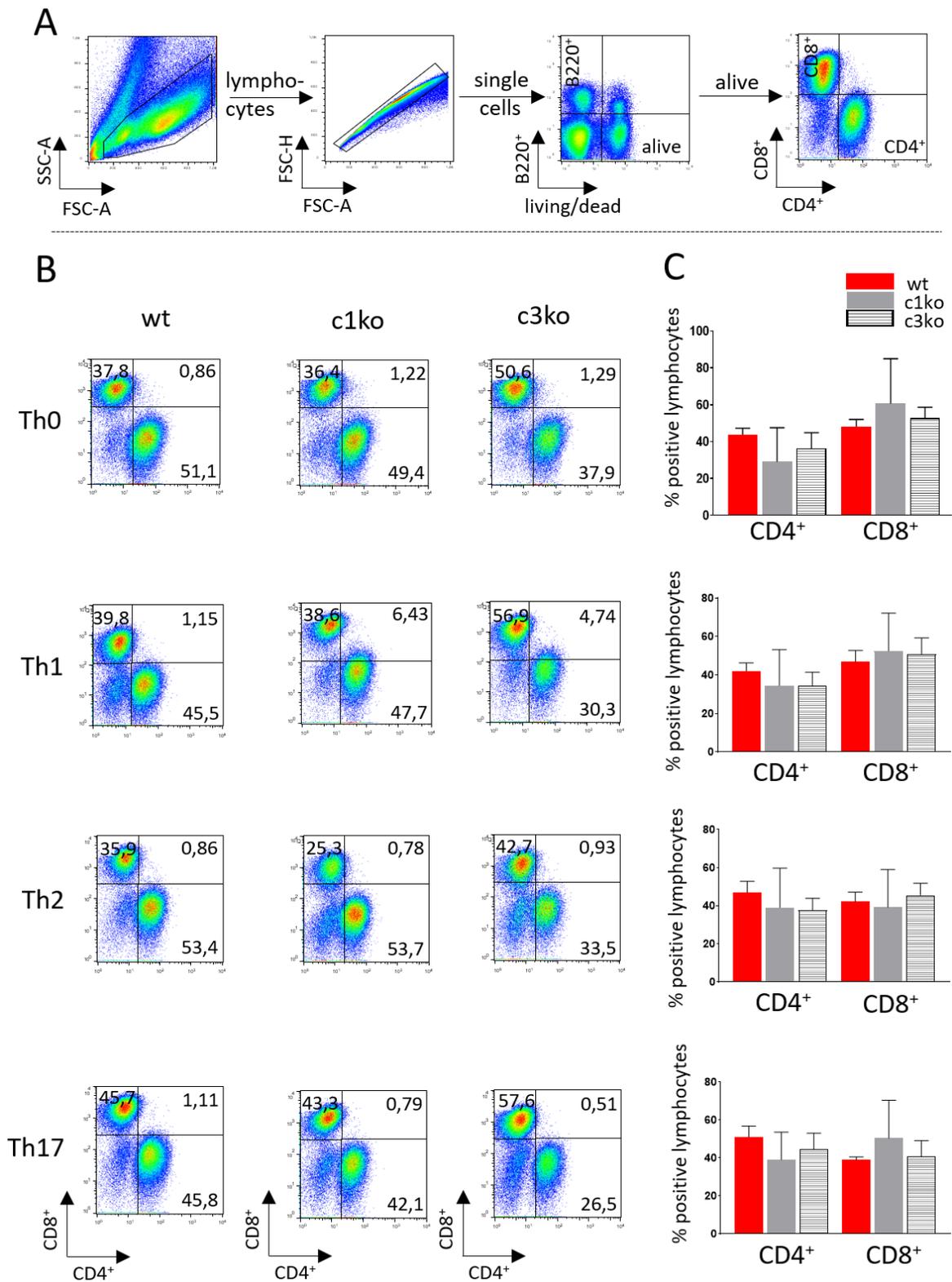
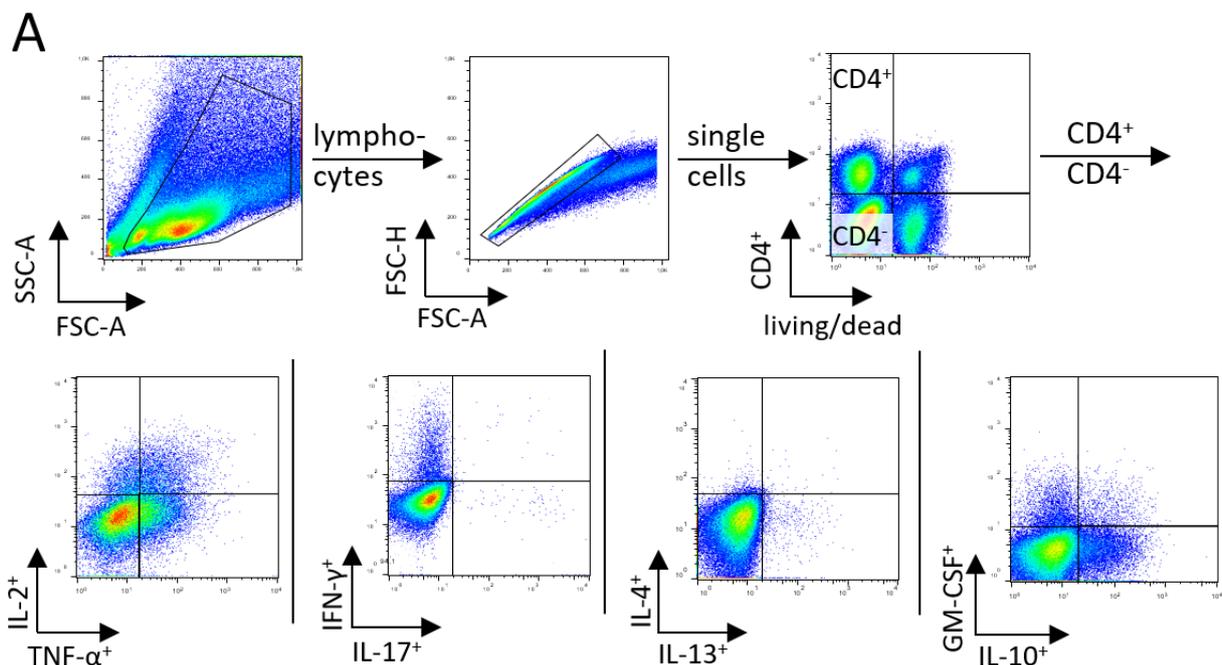


Abbildung 25: Unabhängig von der Differenzierungsrichtung zeigen sich in NFATc3-defizienten T-Zellpopulationen nach 72h geringere Mengen CD4⁺-und erhöhte Frequenzen an CD8⁺-T-Zellen. In Abschnitt A wird die Gating-Strategie, in Abschnitt B repräsentative Durchflusszytometrie-Plots der 72h-Kulturen dargestellt. Abschnitt C zeigt die statistische Auswertung der 3-Tages-Kulturen. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. Nach drei Tagen konnte zwischen den c3ko- und den wildtypischen CD4⁺-Zellen in der Th0-Kultur ein p-Wert von 0.16, in der Th1-Kultur von 0.11, in der Th2-Kultur von 0.07 und in der Th17-Kultur von 0.25 berechnet werden.

Um eine bei NFATc3-Defizienz eventuell auftretende, aberrante Zytokinexpression ebenfalls nachweisen zu können, wurden die (Leit-) Zytokine der verschiedenen Th-Subtypen in allen angesetzten Zellkulturen untersucht. Hierbei wurde GM-CSF in den wildtypischen und NFATc3-defizienten Zellen nur in zwei der vier Versuche analysiert, für die NFATc1-defizienten Zellen sogar nur in einem Versuch. Eine statistische Auswertung der GM-CSF-Daten ist daher nicht möglich. Für alle anderen der untersuchten Interleukine liegen vier Datensätze vor. Auch wurden die Zytokine separat für die CD4⁺- als auch für die nicht-CD4⁺-Zellen analysiert. Es ist davon auszugehen, dass sich nach 3- und 7-tägiger Stimulation in einer T-Zell-Kultur letztere Gruppe hauptsächlich aus CD8⁺-Zellen zusammensetzt. Da jedoch keine T-Zellaufreinigung erfolgte oder ein anti-CD8-Antikörper verwendet wurde, werden diese Kulturen hier als CD4⁻ (CD4-negativ) bezeichnet. Wie in **Abbildung 26** zu sehen ist, konnten nach 3-tägiger Zellkultur lediglich vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den NFATc3-defizienten und den wildtypischen Zellen nachgewiesen werden. In der Th0-Kultur zeigte sich in den CD4⁺-Zellen ein Anstieg der IL-4- und IL-13-produzierenden Zellen. In der Th2-Kultur war ein Anstieg der IL-17-Produktion in NFATc3-defizienten-CD4⁺-Zellen zu beobachten. Anzumerken ist, dass die gemessenen Zytokin-Niveaus ausgesprochen niedrig waren. Auch handelte es sich jeweils um Veränderungen in Zytokinen, welche für die entsprechenden Th-Milieus untypisch sind. In der Auswertung der CD4⁻-Populationen (nach 3-tägiger Stimulation) genauso wie in jener aller 7-tägigen Zellkulturen konnten keine signifikanten Abweichungen der Zytokin-Produktion zwischen den unterschiedlichen Genotypen nachgewiesen werden. Diese Auswertungen wurden daher hier nicht aufgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die bei NFATc3-Defizienz *in vivo* bestehende, ausgeprägte Frequenzreduktion der CD4⁺-T-Zellen in abgeschwächter Form nach 3-tägiger Zellkultur weiterhin nachgewiesen werden kann. Bei längerer Kultivierung ist dies nicht mehr möglich. Die vereinzelt auftretenden, signifikanten Abweichungen in den Zytokin-Niveaus sind untypisch für die entsprechenden Th-Milieus.



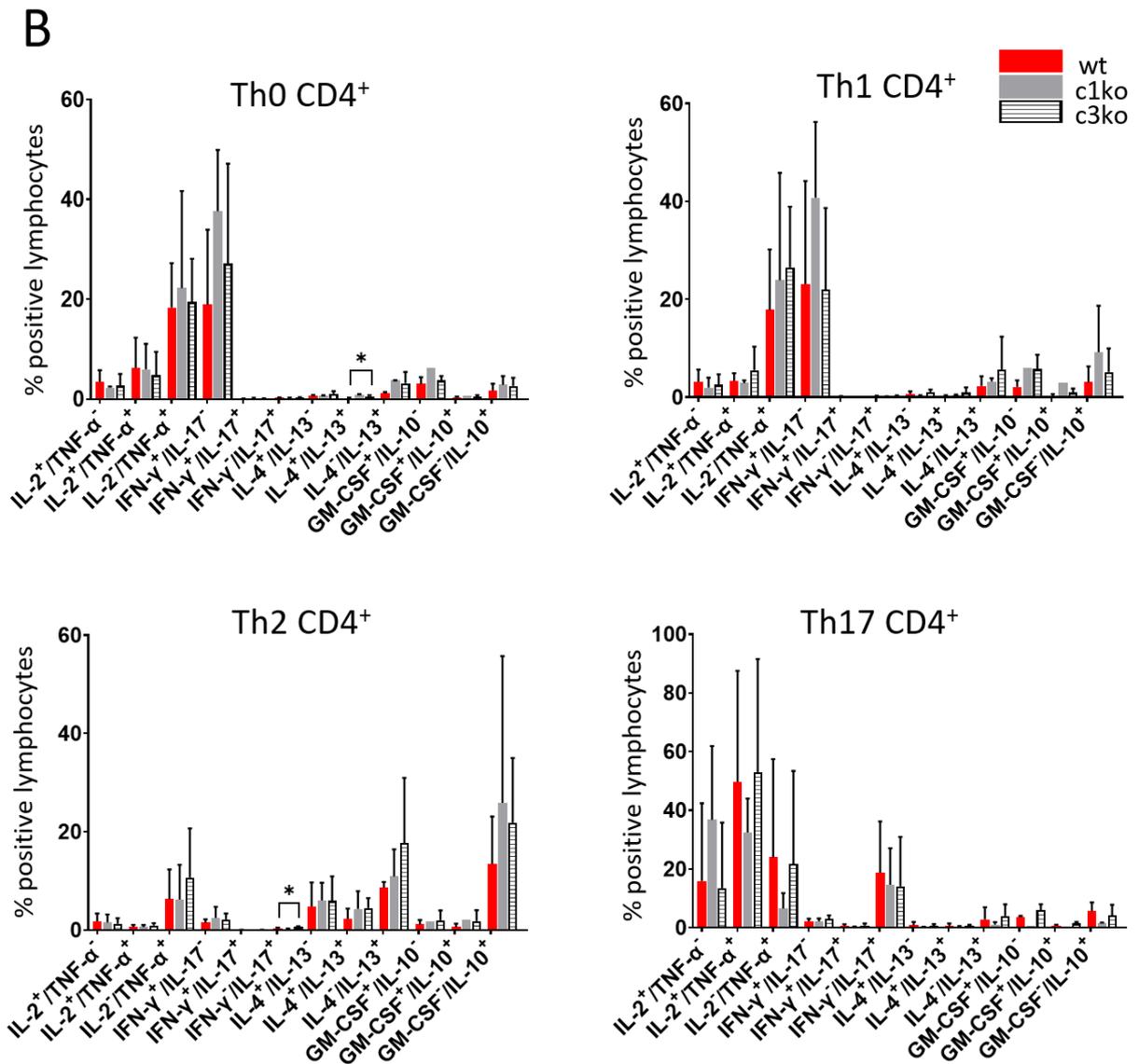
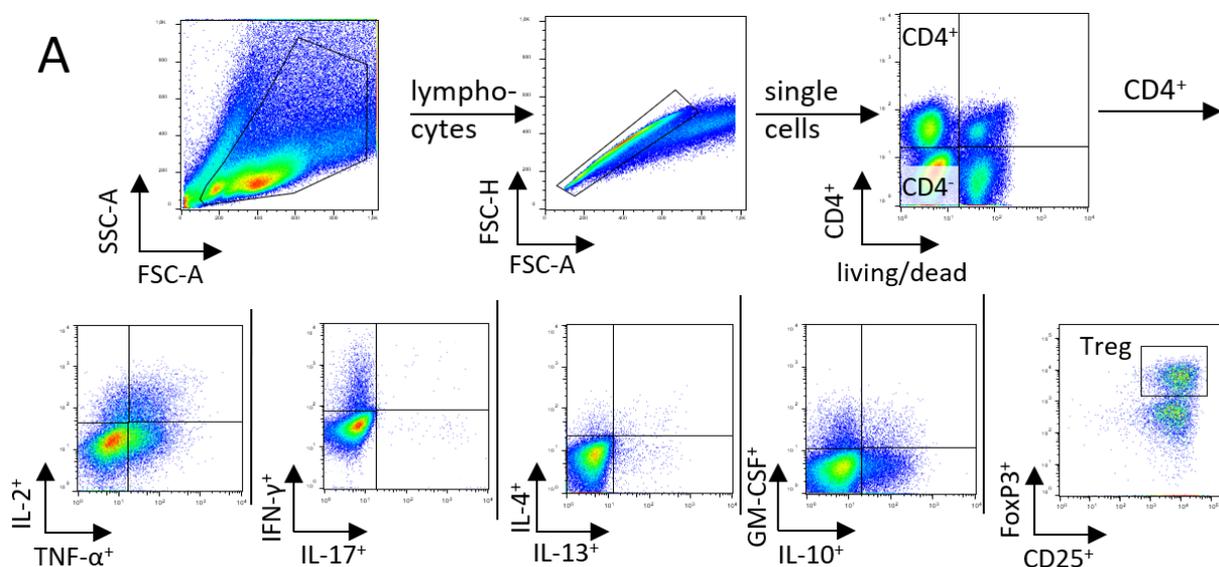


Abbildung 26: Nach 72h-Zellkultur zeigen sich keine relevanten Abweichungen in der Zytokinproduktion der verschiedenen Genotypen. In Abschnitt A wird die Gating-Strategie, in Abschnitt B die statistische Auswertung der 72h-Kulturen dargestellt. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* $p < 0.05$)

4.3.3 *In vitro* zeigen sich in der *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie keine relevanten Änderungen in der Zytokinproduktion

Um die neue NFATc1- und NFATc3-defiziente Mauslinie zu untersuchen, gingen wir ähnlich wie in Abschnitt 4.3.2 vor. Da wir zwischenzeitlich ein neues Protokoll für die Th-Differenzierungen etabliert hatten (vgl. Abschnitt 3.2.4.4), wurden die gepoolten Zellen aus Milz- und Lymphknoten für fünf Tage kultiviert, anschließend restimuliert und geerntet. Auch diesmal wurden die T-Zellen in ihrer natürlichen Leukozytenpopulation kultiviert. Zur Kalibrierung des Durchflusszytometers wurden Einzelfärbungen, jeweils separat für Oberflächen-, intrazelluläre- und intranukleäre Färbungen durchgeführt. Die ausgewerteten Daten der verschiedenen Genotypen stammen von vier Mäusen, welche in vier zeitlich getrennt durchgeführten Versuchen analysiert wurden. Bereits vor Durchführung der eigentlichen Färbungen imponierte mikroskopisch eine deutlich geringere Zellzahl in den NFATc1/c3-defizienten Zellkulturen, insbesondere in den Th1- und Th17-Differenzierungen. Wie in **Abbildung 27** aufgeführt, wurden daher die Leukozytenzahlen der einzelnen Genotypen – unterteilt in die verschiedenen Th-Differenzierungen – miteinander verglichen. Hierbei bestätigte sich der erste, visuelle Eindruck. Wenn auch weniger ausgeprägt, so waren die prozentualen Zellzahlen in den Th2-Differenzierungsansätzen mit NFATc1/c3-defizienten T-Zellen doch ebenfalls reduziert. Auch die Leukozytenzahlen in NFATc3-defizienten und NFATc1-defizienten Th17-Zellen waren geringer als bei Ansätzen mit wildtypischen Milz- und Lymphknotenzellen. Mit einem p-Wert von 0.062 konnte in der NFATc1-defizienten Th17-Differenzierung die Signifikanzschwelle fast erreicht werden. In den entsprechenden Zellkulturen waren keine auffällig hohen Zahlen an abgestorbenen Zellen nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass die geringeren Lymphozytenzahlen auf eine verminderte Proliferationsneigung und weniger auf eine vermehrte Apoptoseneigung zurückzuführen sind. Eine explizite Untersuchung wurde hierzu jedoch nicht durchgeführt. Interessanterweise steht dies im Kontrast zu NFATc2/c3-defizienten Zellen, in welchen durch unsere und andere Arbeitsgruppen eine Neigung zur Hyperproliferation aufgezeigt werden konnte. [103]



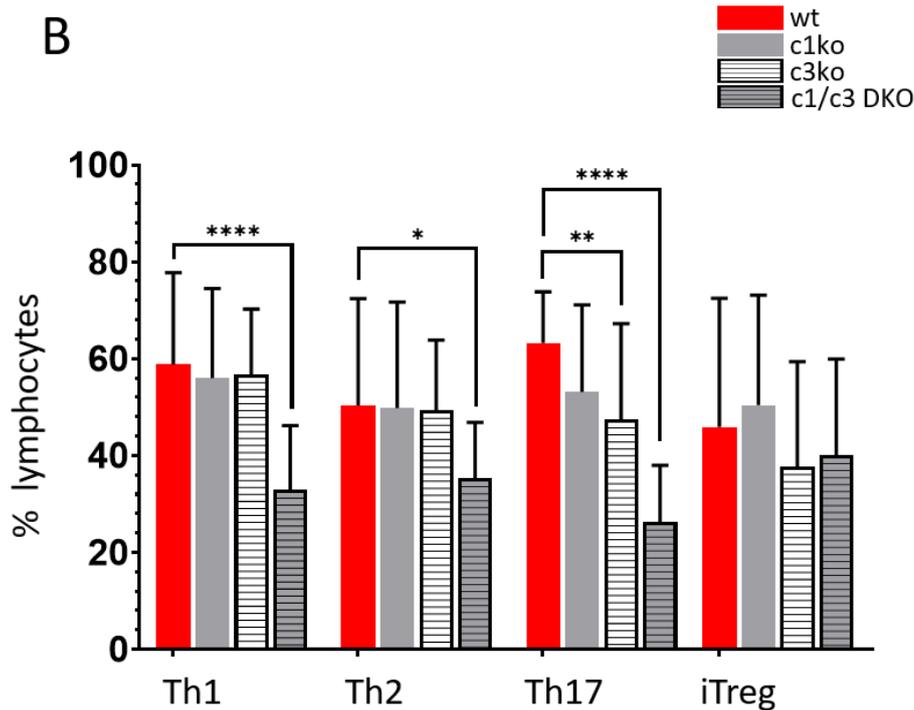


Abbildung 27: In NFATc1/c3-defizienten Zellkulturen zeigen sich deutlich reduzierte Frequenzen in den Leukozytenzahlen. In Abschnitt A wird die Gating-Strategie, in Abschnitt B die statistische Auswertung der Leukozytenzahlen der verschiedenen Zellkulturen aufgeführt. Wildtypische Th2, Th17- und iTreg-Daten bestehen aus 15 Einzelwerten. Die Daten für die anderen Genotypen setzen sich aus 20 Einzelwerten zusammen. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$)

Die Analyse der Zytokinproduktion in der *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie erfolgte analog zu jener der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie in Abschnitt 4.3.2. Darüber hinaus wurden hier jedoch noch Lymphozyten in iTreg-Zellen differenziert und analysiert. Da hier ebenfalls NFATc3-defiziente Zellen der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Maus untersucht wurden, ist dieser Versuch indirekt auch eine Ergebniskontrolle zu den in Abschnitt 4.3.2 aufgezeigten Experimenten. Auf eine erneute Analyse der CD4-Zellen wurde verzichtet. Als statistisch signifikant konnte lediglich ein Anstieg in den NFATc1-defizienten, IFN- γ - und IL-17-produzierenden Zellen in der Th2-Zellkultur nachgewiesen werden. Die gemessenen Zytokinniveaus waren erneut sehr niedrig (in einer der zum Vergleich herangezogenen, wildtypischen Proben waren keine Zellen nachweisbar). Wiederum aber sind die beiden Zytokine nicht typisch für Th2-Zellen. Mit diesem veränderten Protokoll konnten keine der in **Abbildung 25** aufgeführten signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion reproduziert werden. Entgegengesetzt zu den Ergebnissen zu nTreg aus **Abbildung 22**, ist in den iTreg-Zellkulturen – trotz hoher Fehlerabweichungen – tendenziell ein Rückgang der iTreg-Population in den NFATc3-defizienten und insbesondere auch in den NFATc1/c3-defizienten Zellen erkennbar. Dies ist passend zu früheren Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass NFAT-einzel- und doppeldefiziente Thymozyten sich zwar zu nTregs, jedoch nur eingeschränkt zu iTregs entwickeln. [21]

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass insbesondere in NFATc1/c3-doppeldefizienten Zellpopulationen signifikant rückläufige Frequenzen in den Leukozytenzahlen nachweisbar sind. Die in Abschnitt 4.3.2 vorgeschriebenen Veränderungen in der Zytokinexpression einzelner Th-Subtypen lassen sich nicht reproduzieren.

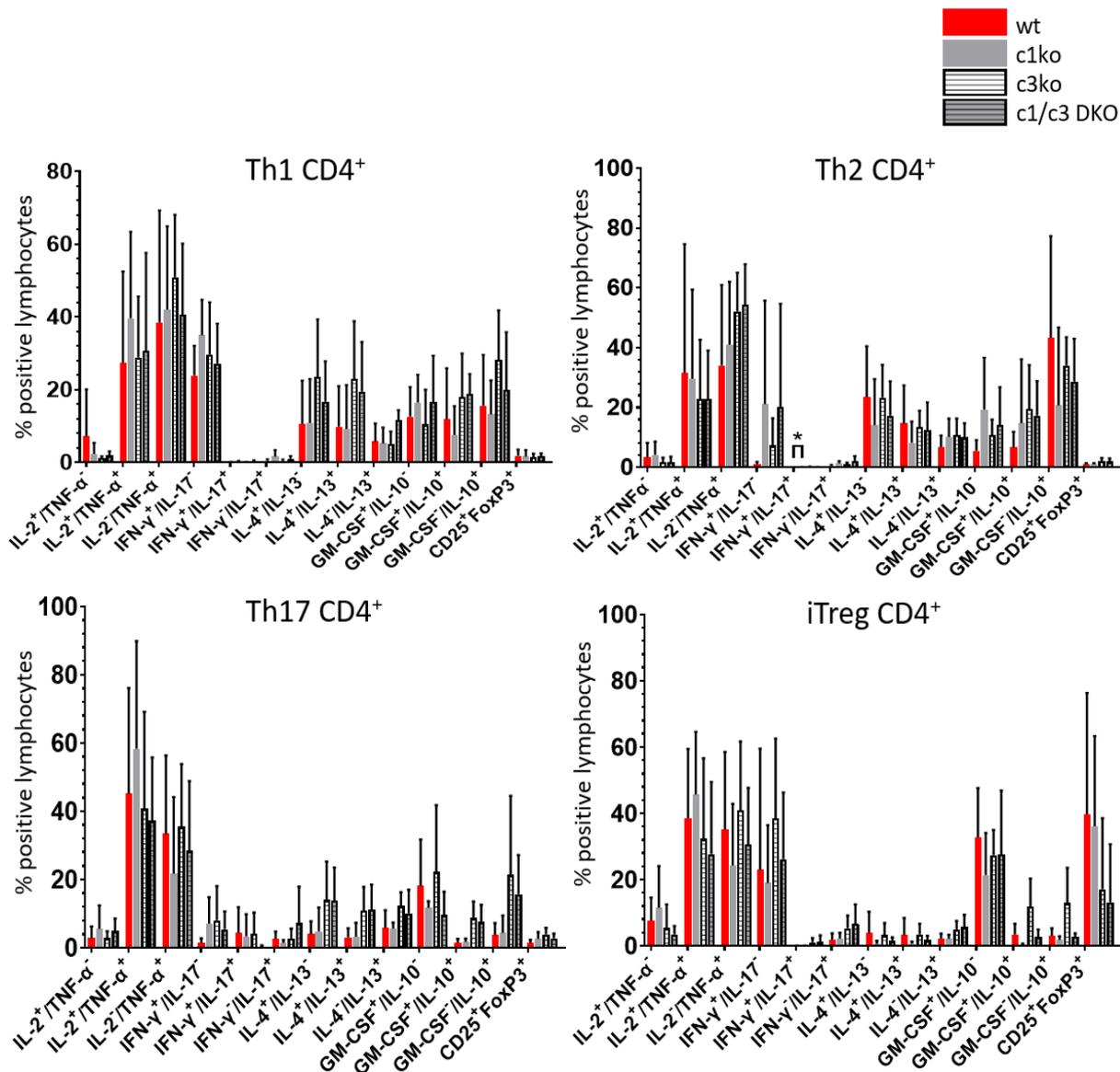
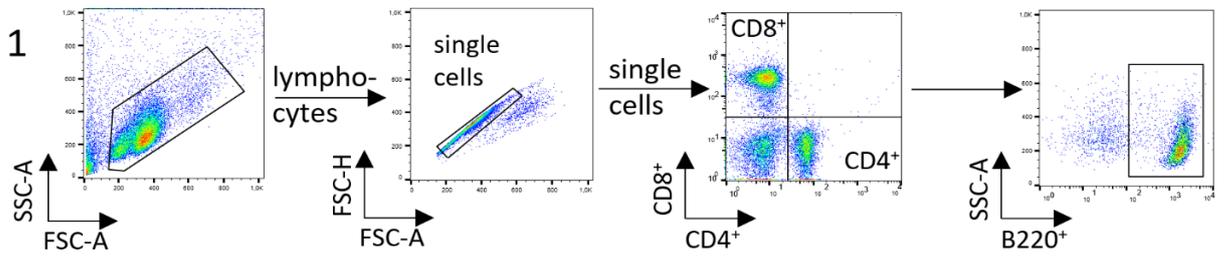


Abbildung 28: Reproduzierbare Einflüsse auf die Zytokinproduktion konnten in keiner der Zellkulturen der *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*- oder der *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Mauslinie nachgewiesen werden. Die angewandte Gating-Strategie wird in Abbildung 27, Abschnitt A aufgeführt. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* p < 0.05)

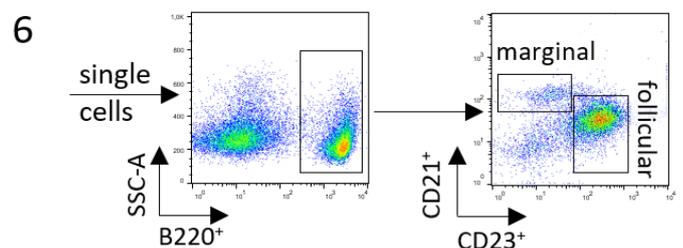
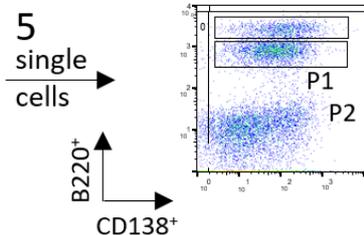
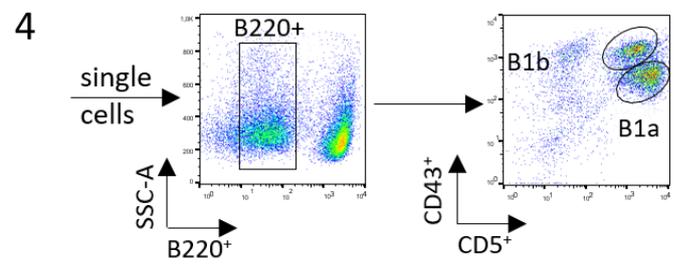
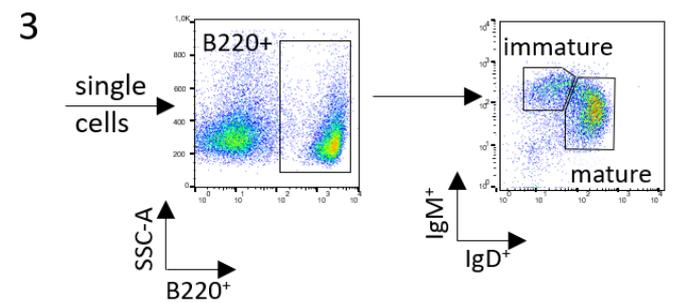
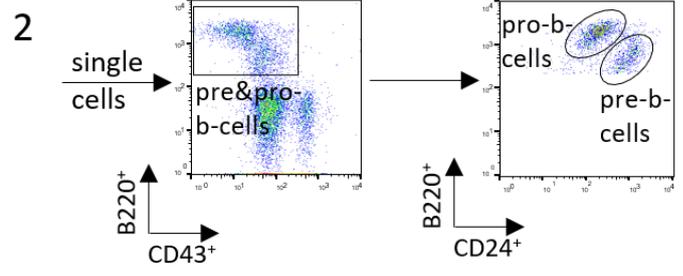
4.3.4 Eine NFATc3-Defizienz hat keinen Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung

A



Um die Funktion von NFATc3 in der B-Zellpopulation zu untersuchen, wurde die *Nfatc3^{fl/fl}.Mb1cre*-Mauslinie gezüchtet. Wie in Abschnitt 2.4.9 aufgeführt, kann in dieser Mauslinie NFATc3 in keiner der B-Zell-Entwicklungsstadien mehr exprimiert werden. Die Organe wurden entsprechend den Abschnitten 3.2.1.3 und 3.2.4.2 entnommen. Eine B-Zell-Aufreinigung oder Lebend/Tot-Färbung wurde nicht durchgeführt. Nach der Entnahme wurde ein Teil der Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden Einzelfärbungen für alle in den Oberflächenfärbungen verwendeten Farben durchgeführt, womit FMO-Kontrollen entfallen konnten. Wie in **Abbildung 29 B** gezeigt wird, ist in den NFATc3-defizienten LN-Zellen ein Anstieg der B1a-Population nachweisbar. Mit einem p-Wert von 0.07 konnte hier das Signifikanzniveau fast erreicht werden. Wirklich signifikante Änderungen bei NFATc3-Defizienz ließen sich in den anderen B-Zellpopulationen nicht nachweisen.

Da NFATc3 insbesondere im Thymus vertreten ist (vgl. Abschnitt 2.4.2), zeigte sich hier – wie erwartet – keine relevante Beeinträchtigung der B-Zell-Entwicklung.



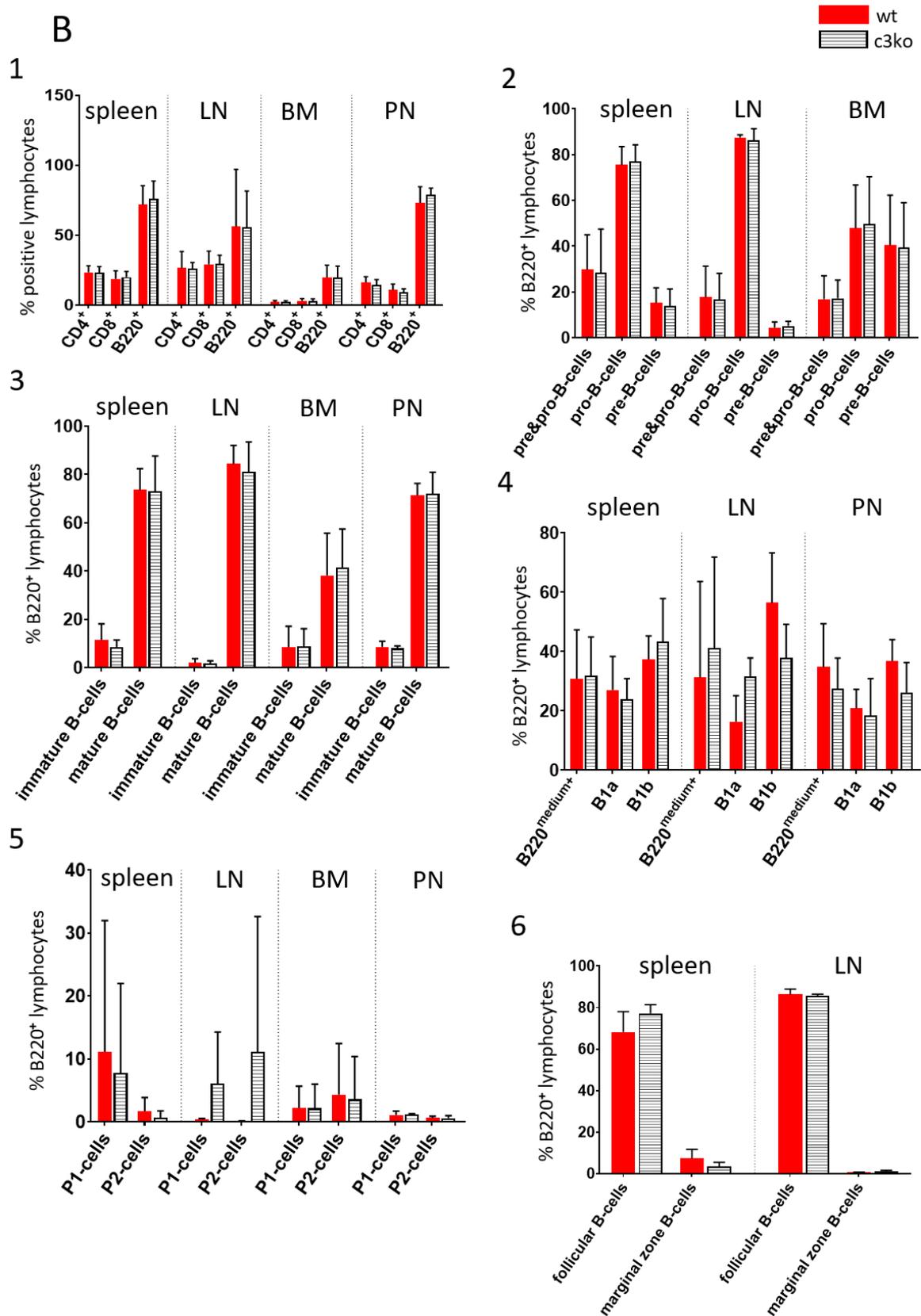


Abbildung 29: Zwischen der wildtypischen und *Nfatc3^{fl/fl}.Mb1cre*-Mauslinie sind keine signifikanten Unterschiede in den B-Zellpopulationen nachweisbar. Die angewandte Gating-Strategie wird in Abschnitt A, die statistischen Auswertungen in Abschnitt B aufgeführt. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* $p < 0.05$)

4.4 GvHD-Versuche

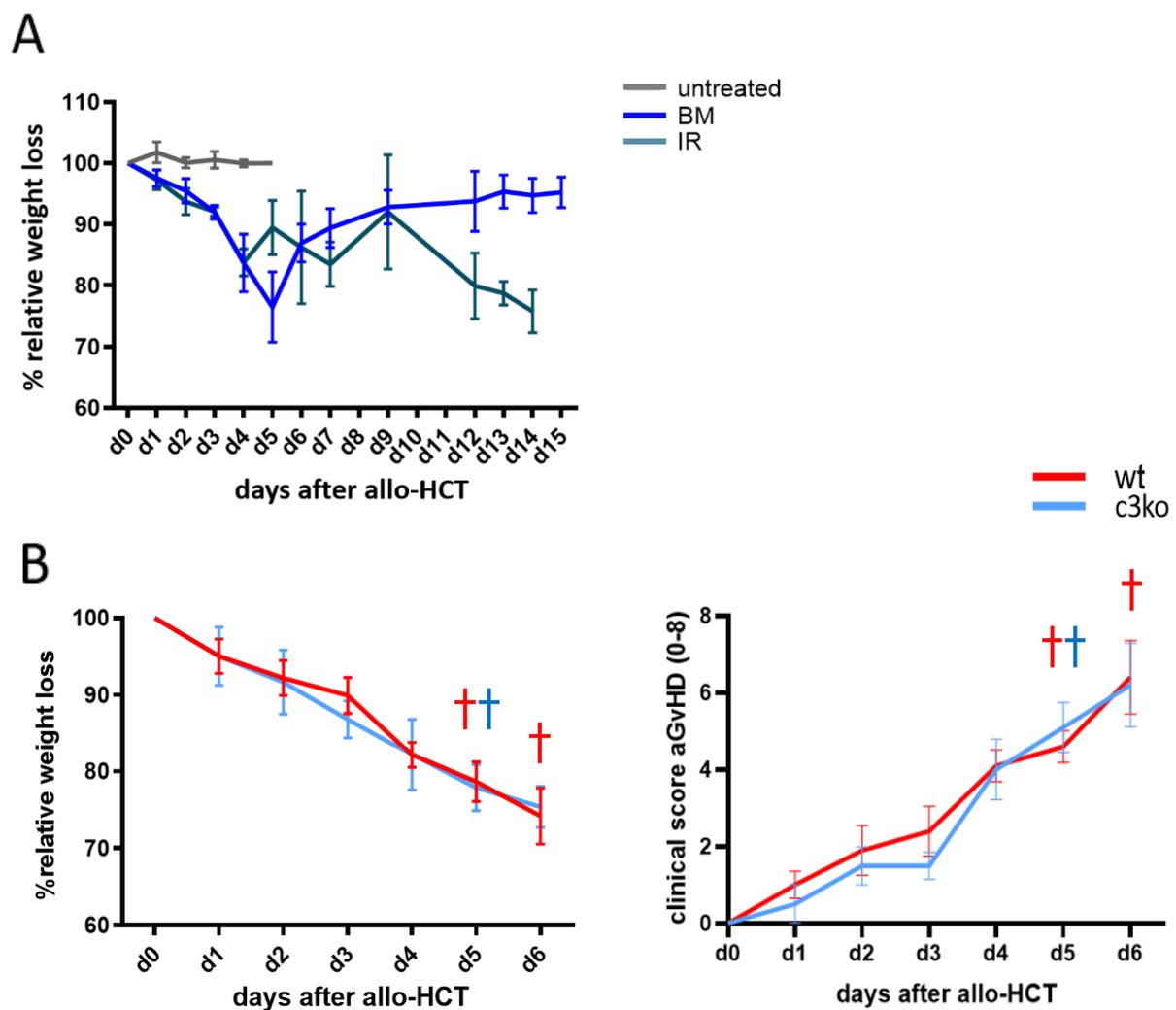
4.4.1 Auch bei NFATc3-Defizienz ist eine akute GvHD stark ausgeprägt

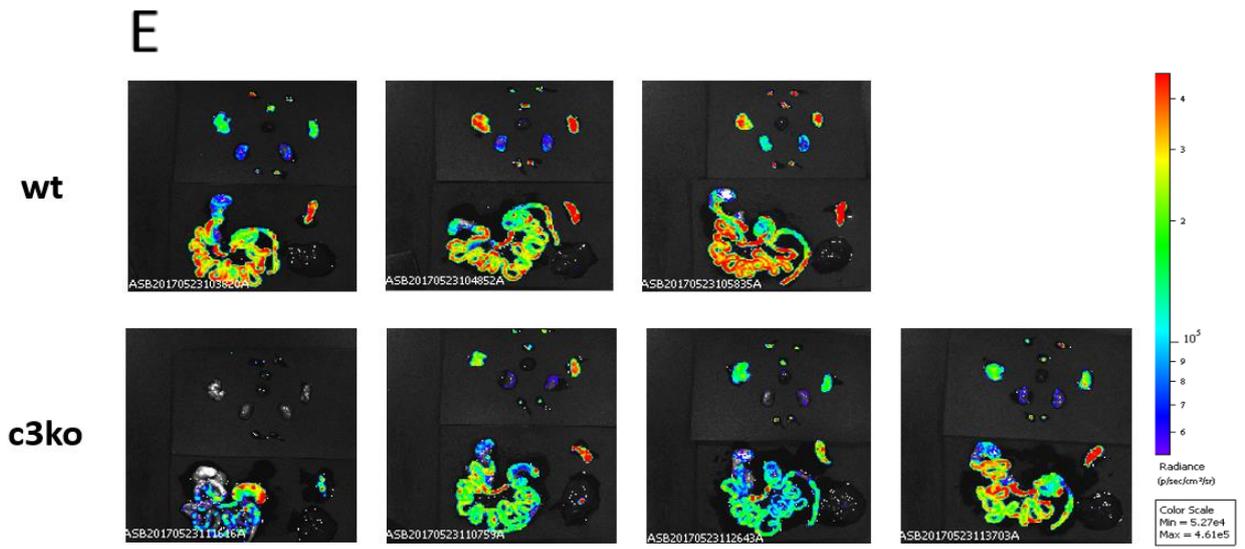
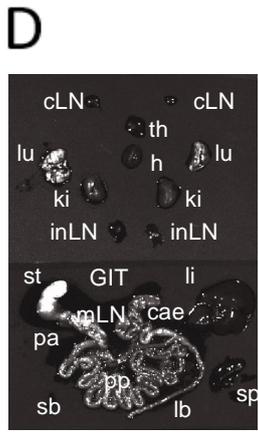
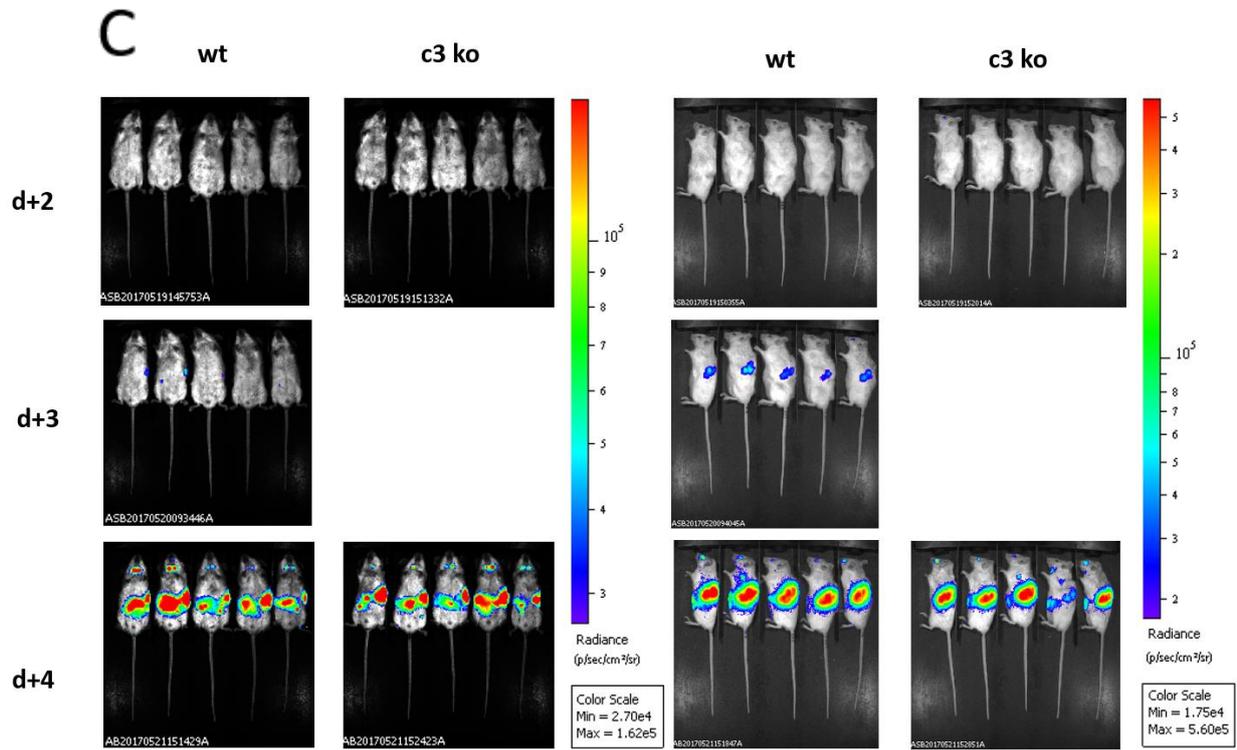
Um die Auswirkungen einer NFATc3- bzw. einer NFATc1- und NFATc3-Defizienz im Hinblick auf die Entwicklung einer akuten GvHD zu untersuchen, wurde in zwei zeitlich getrennten Versuchsdurchführungen – entsprechend Abschnitt 3.2.5 – eine *major-mismatch*-GvHD durch Beimischung von wildtypischen vs. NFAT-defizienten T-Zellen in einem Modell für allogene Stammzelltransplantation (H-2^b→H-2^d) induziert.

In dem ersten GvHD-Experiment wurden insgesamt vier Versuchsgruppen mit jeweils 5 Tieren untersucht. Bei diesen Gruppen handelt es sich zum einen um die Bestrahlungskontrolle, (*irradiation control*/IR) d.h. die Tiere wurden ausschließlich mit 8.0 Gray letal bestrahlt. In der *bone marrow*-Kontrollgruppe (BM) wurden den bestrahlten Mäusen zusätzlich noch Knochenmarkszellen appliziert. Da die Knochenmarkszellen aus RAG1-defizienten Mäusen gewonnen wurden, enthalten diese Zellen keine T- oder B-Lymphozyten und können so selbst keine GvHD induzieren. [100] In den eigentlichen Versuchsgruppen wurde den Mäusen zusätzlich zu den Knochenmarkszellen noch wildtypische T-Zellen (wt-Gruppe) bzw. NFATc3-defiziente T-Lymphozyten (c3ko-Gruppe) appliziert. Sowohl Spender- als auch Empfängertiere in diesem Versuch waren ausschließlich männlich und zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Knochenmarkszellen stammen von fünf Spendertieren. Sie wurden vor der retroorbitalen Applikation in die Empfängertiere gepoolt. Die wildtypischen T-Zellen wurden aus drei, die NFATc3-defizienten T-Lymphozyten aus zwei Milzen von Spendertieren mithilfe einer (negativen) CD3-Aufreinigung gewonnen. Auch hier wurden die Zellen entsprechend ihres Genotyps vor der intravenösen Gabe gepoolt.

In **Abbildung 30 A** wird der relative Gewichtsverlust der Kontrollgruppen im Anschluss an die Bestrahlung aufgezeigt. Wie erwartet, begann sich die BM-Kontrollgruppe einige Tage nach der Bestrahlung zu erholen, während die Tiere in der IR-Gruppe sukzessive weiter an Körpergewicht verloren. Zum Vergleich wird auch der Gewichtsverlauf einiger unbehandelter Mäuse aufgezeigt. Die Kontrollgruppen wurden 15 Tage lang nachbeobachtet. In **Abbildung 30 B** ist zu erkennen, dass der Gewichtsverlust der beiden *major-mismatch*-Gruppen voranschreitet und recht ähnlich verläuft. Es ist anzumerken, dass am fünften und sechsten Tag nach Versuchsbeginn jeweils eine Maus der wt-Gruppe verstorben ist. Am fünften Tag verstarb ebenfalls eine Maus der c3ko-Gruppe. Wie an den an Tag 2-4 durchgeführten BLI-Untersuchungen (**Abbildung 30 C**) zu erkennen ist, kann in den transplantierten T-Zellen bei NFATc3-Defizienz tatsächlich eine geringer ausgeprägte Proliferationsneigung nachgewiesen werden. Da sich an Tag 5 alle lebenden Tiere in schlechtem Zustand präsentierten, wurde hier bewusst auf eine BLI-Analyse verzichtet. Hervorzuheben ist, dass es insbesondere den Mäusen in der c3ko-Gruppe klinisch schlechter ging, als es die BLI-Daten initial vermuten ließen. Dies zeigte sich sowohl in den klinischen Scores als auch in den Gewichtsverläufen. (**Abbildung 30 B**) Am 6. Tag nach der Bestrahlung wurden die lymphatischen und nicht-lymphatischen Organe der beiden Versuchsgruppen entnommen und entsprechend dem in **Abbildung 30 D**

aufgeführten Schema erneut mittels BLI analysiert. Die entstandenen Bilder sind in **Abbildung 30 E** und die entsprechenden – nach Organsystemen getrennten – statistischen Auswertungen in **Abbildung 30 F** dargestellt. Bei NFATc3-Defizienz ist eine deutlich niedrigere T-Zellkonzentration in nahezu allen analysierten Organen erkennbar. Im Anschluss wurden durchflusszytometrische Analysen der T-Zellen beider Genotypen (entsprechend drei Mäuse mit wildtypischen und vier mit NFATc3-defizienten T-Zellen) durchgeführt. Die aus den Lymphknoten und der Milz gewonnenen Zellen wurden vereinigt und zunächst über Nacht in einem zytokinfreien Nährmedium aufgenommen und geruht. Daraufhin wurden die Zellen – wie in Abschnitt 3.2.4.3 beschrieben – restimuliert und analysiert. Die angewandte Gating-Strategie, repräsentative Einzelwerte und die entsprechende, statistische Auswertung sind in den **Abbildungen 31 A-C₄**, eine Analyse des CD4⁺-zu CD8⁺-Verhältnisses in **Abbildung 31 A_α** dargestellt. **Abschnitt 31 D** zeigt die Gesamtmengen der gemessenen Zytokine und die dazugehörige, statistische Auswertung.





F

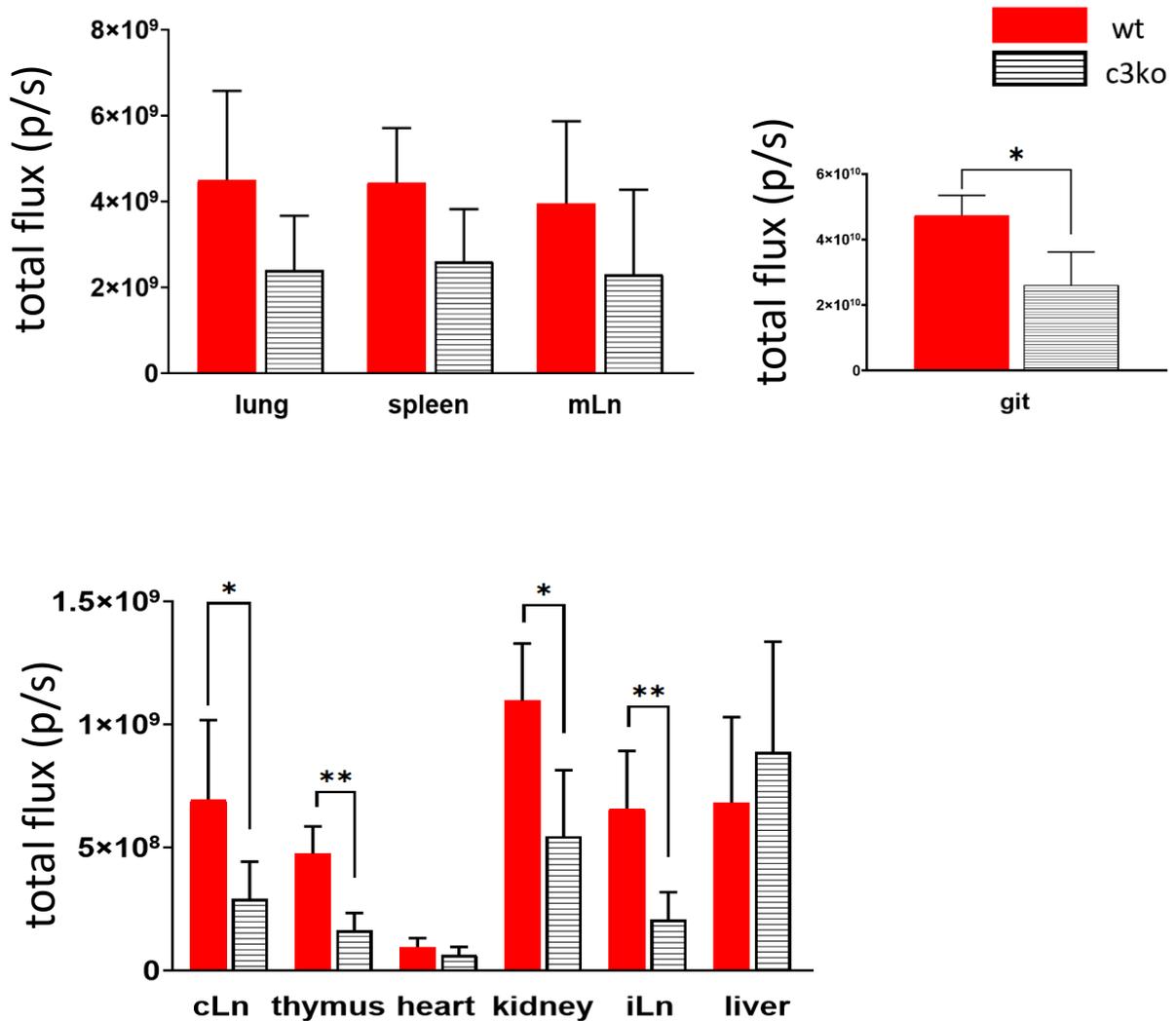
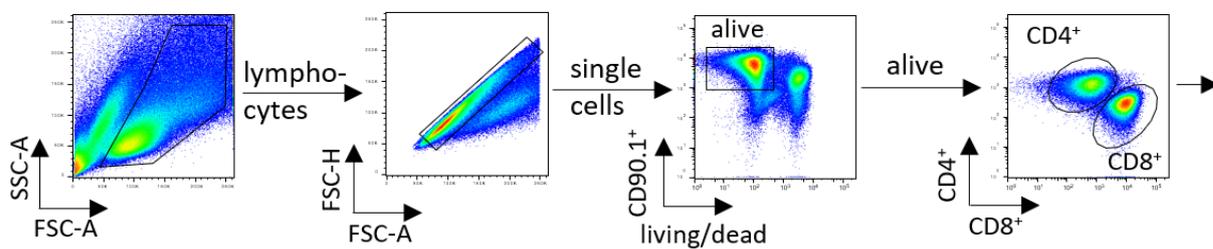
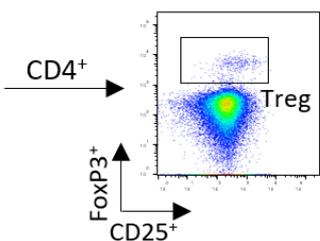


Abbildung 30: Bei NFATc3-Defizienz zeigt sich eine reduzierte Proliferationsneigung der transplantierten T-Zellen. A Gewichtsverlust einer unbehandelten (untreated)-, der BM- und IR-Kontrollgruppe. **B** Gewichtsverlust und clinical score der wt- und c3ko-Versuchsgruppe. **C** mittels i.v. Applikation von Luciferase wurde an den Tagen 2-5 die GvHD-Aktivität überwacht. An Tag 3 wurde die c3ko-Gruppe nicht aufgenommen. **D** schematische Darstellung der Organpräparation. **E** an Tag 6 wurden – nach vorheriger Luciferase-Applikation – die Organe entnommen und nach dem in **D** aufgeführten Schema die GvHD-Aktivität analysiert. **F** nach Organsystemen getrennte, statistische Auswertung der Luciferase-Aktivität. Mit einem p-Wert von 0.089 ist der Unterschied zwischen den Milzzellen noch nicht signifikant. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

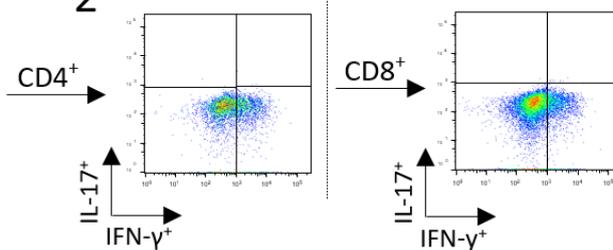
A



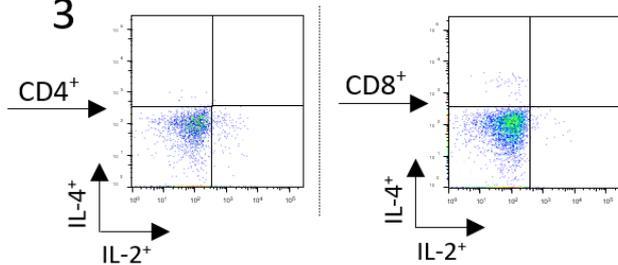
1



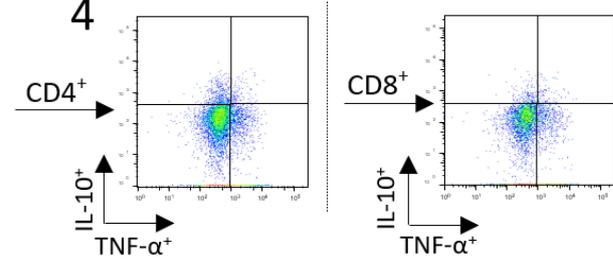
2



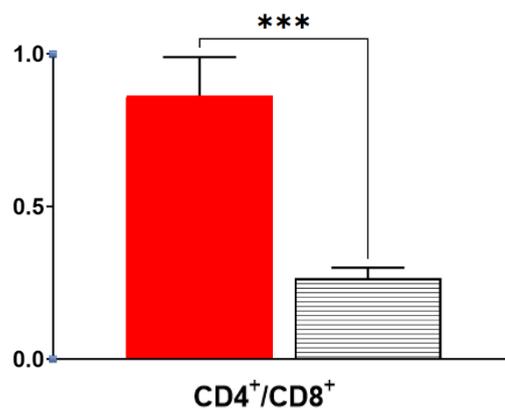
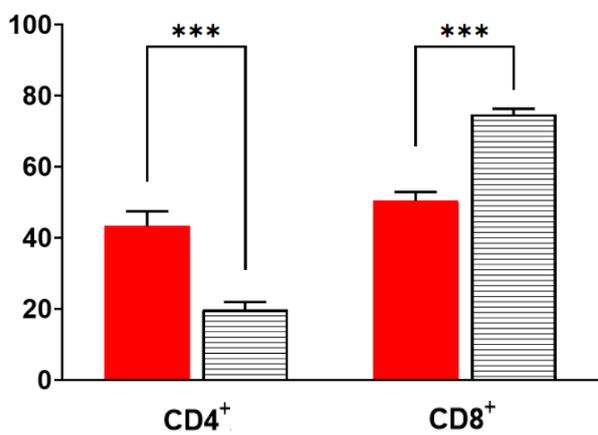
3



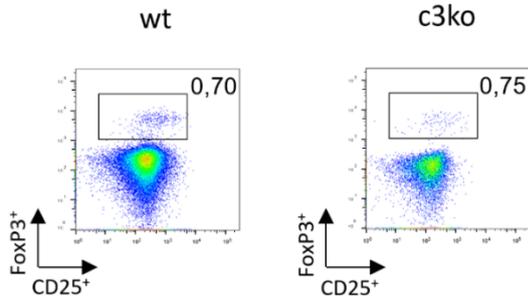
4



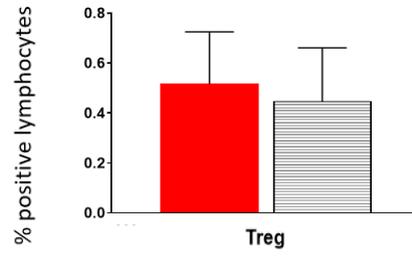
A _{α}



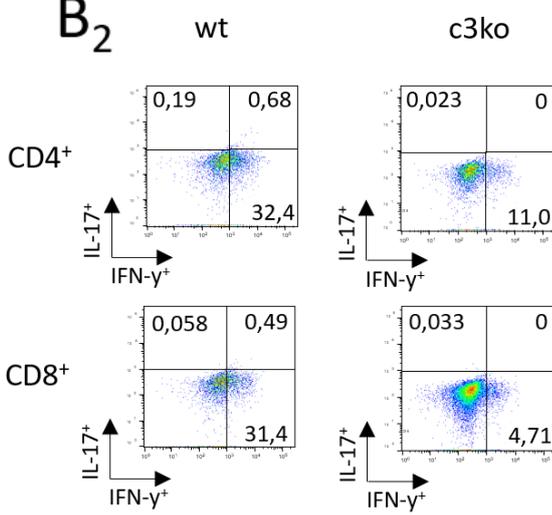
B₁



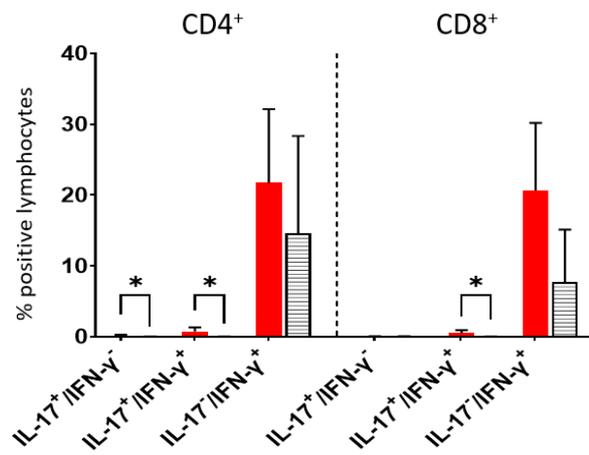
C₁



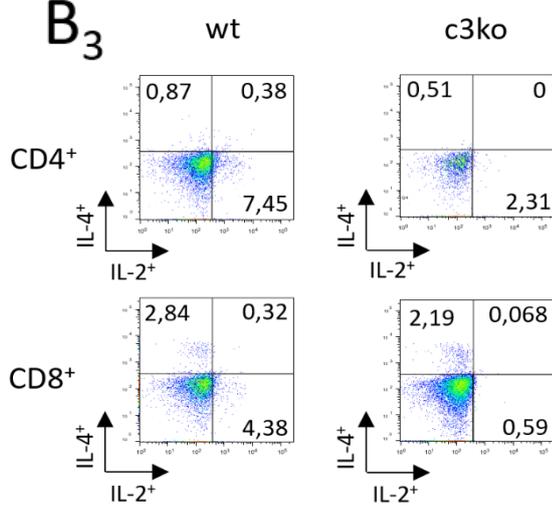
B₂



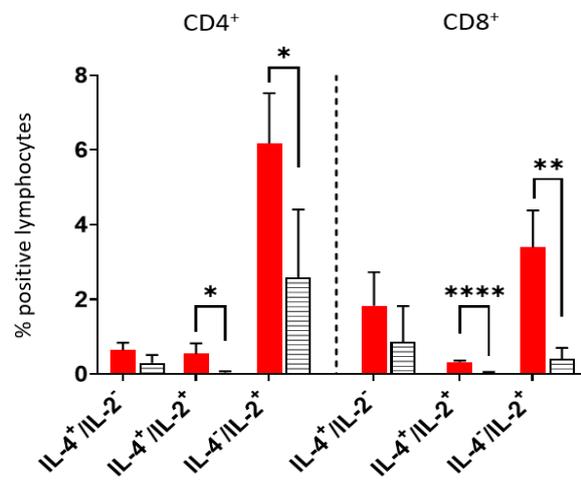
C₂



B₃



C₃



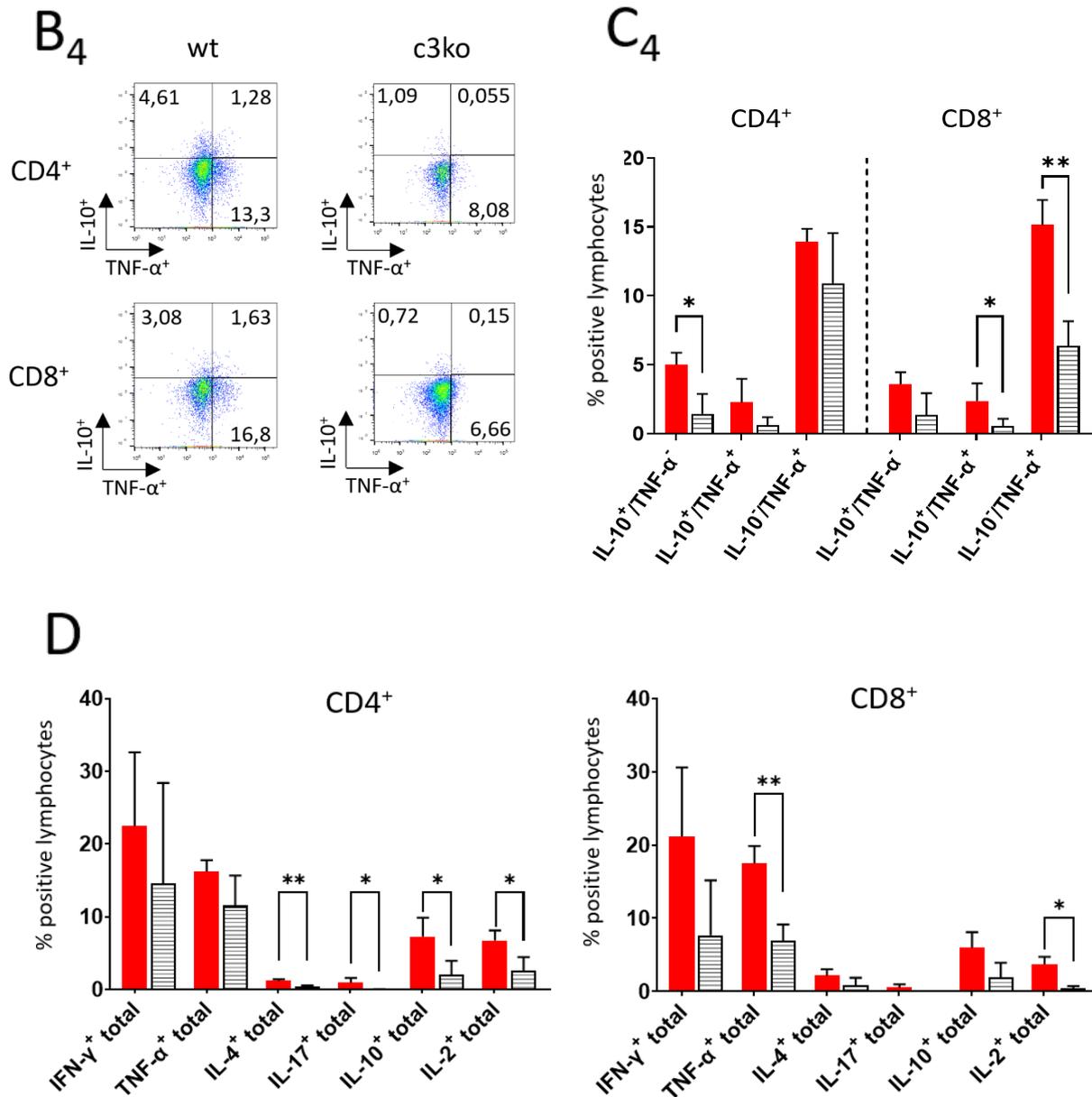


Abbildung 31: Bei NFATc3-Defizienz verschiebt sich das Verhältnis von CD4⁺- zu CD8⁺-T-Zellen zugunsten der CD8⁺-Zellen. Die angewandte Gating-Strategie wird in Abschnitt A, eine Analyse des CD4⁺-zu CD8⁺-Verhältnisses in Abschnitt A_α dargestellt. In den Abschnitten B₁ bis C₄ werden repräsentative Daten der durchflusszytometrischen Analysen für beide Genotypen sowie die dazugehörige, statistische Auswertung aufgeführt. In Abschnitt D werden die Gesamtmengen der Zytokine statistisch ausgewertet. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, **** p < 0.0001)

4.4.2 Bei NFATc1- und NFATc3-Defizienz ist die T-Zell-Expansion nochmals vermindert

Bei der erneuten GvHD-Induktion – entsprechend Abschnitt 3.2.5 – wurde derselbe Versuchsaufbau wie in Abschnitt 4.4.1 angewandt. Es wurden jedoch zwei weitere Versuchsgruppen in das Experiment miteinbezogen. Zusätzlich zu dem Knochenmark RAG1-defizienter Mäuse wurden den Tieren der c1ko-Gruppe T-Lymphozyten aus *Nfatc1^{fl/fl}.Cd4cre*-Mäusen retroorbital appliziert. Die Empfängertiere der DKO-Gruppe erhielten indessen T-Zellen aus *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre*-Spendertieren. Für die wildtypischen T-Lymphozyten wurden zwei, für die anderen Genotypen jeweils drei Spendertiere verwendet. Während der Versuchsdurchführung ist von Tag 5 auf Tag 6 jeweils eine Maus der wt-, der c1ko- und der c3ko-Gruppe gestorben. Die DKO-Tiere haben alle bis zur Organentnahme an Tag 6 überlebt.

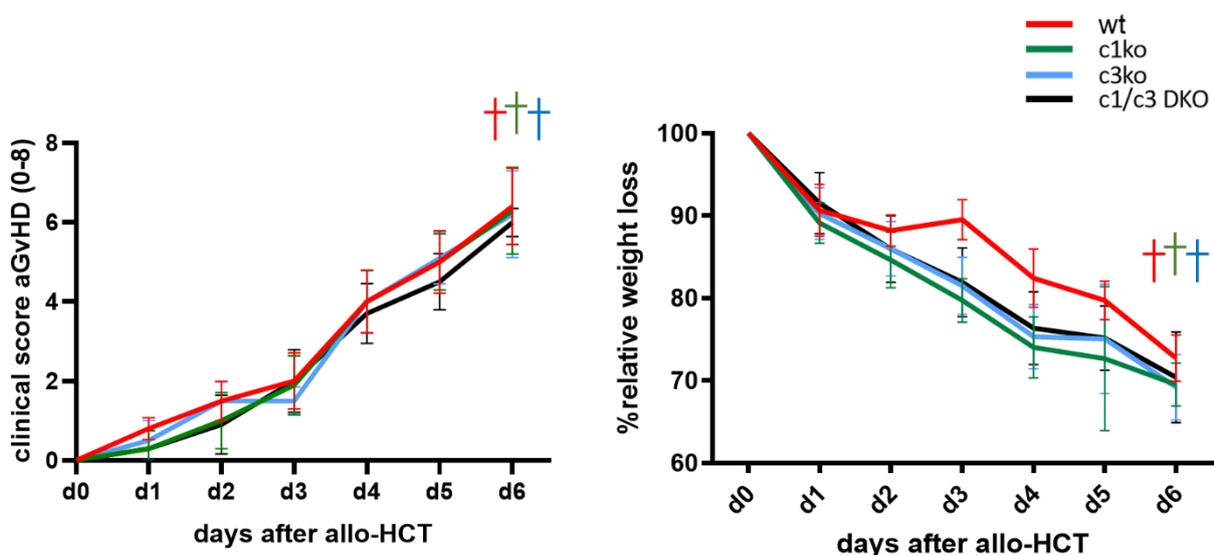
Wie in **Abbildung 32 A** erkennbar ist, konnten die Ergebnisse aus dem vorherigen Versuch reproduziert werden. Auch hier zeigten die NFATc3-defizienten T-Zellen – im Vergleich zu den wildtypischen T-Zellen – eine reduzierte Proliferationsneigung. Abermals verringert ist diese – kongruent zu den Ergebnissen der *In-vitro*-Untersuchungen – in den NFATc1- und NFATc3-defizienten T-Zellen. Für Mäuse mit wildtypischen T-Zellen, deren Auswirkungen bei diesem Modell zur GvHD-Induktion in der AG hinlänglich bekannt sind, sind nur Organaufnahmen von zwei Tieren durchgeführt worden. [58] In der statistischen Auswertung der BLI-Organaufnahmen (**Abbildung 32 B**) ist daher für die wildtypische Population allerdings keine Signifikanzbestimmung möglich. Die BLI-Analysen der c1ko- und c3ko-Mäuse setzten sich aus drei, die der DKO-Mäuse aus fünf Einzelwerten zusammen. Visuell ist ein deutlicher Abfall der BLI-Intensität in allen untersuchten Organen der c3ko- und DKO-Population zu beobachten. Teilweise zeigt sich dieser Rückgang schon in Relation zur c1ko-Population. In den Milzzellen ist der entsprechende Rückgang der T-Zellexpansion von der c3ko- zur c1ko-Population mit einem p-Wert von 0.068 fast signifikant. In den Zellen der inguinalen Lymphknoten der c3ko- (p-Wert 0.059) und der DKO-Population (p-Wert 0.076) ist dies ähnlich. Insgesamt ging es den Mäusen in den Versuchsgruppen in diesem Experiment erneut klinisch schlechter, als es die gering ausgeprägte Proliferations-/Expansionsneigung der NFAT-defizienten T-Zellen erwarten lassen würde. Dies spiegelt sich erneut in den klinischen Scores und den Gewichtsverläufen wider.

Wir führten zusätzlich durchflusszytometrische Analysen durch. Es wurden jeweils vier Mäuse von jedem Genotyp untersucht. Wurden einige der aufgezeigten Analyse noch am Tag der Organentnahme durchgeführt, wurden die restlichen Zellen – ähnlich dem ersten GvHD-Versuch - über Nacht in zytokinfreiem Nährmedium aufgenommen, am Folgetag restimuliert und untersucht. Ähnlich den Ergebnissen aus den *In-vitro*-Experimenten (vgl. **Abbildung 27**) konnte – wie in **Abbildung 33 Aα** dargestellt – insbesondere in der DKO-Versuchsgruppe ein signifikanter Abfall der Leukozytenzahlen nachgewiesen werden. Ein ähnlich starker Rückgang zeigte sich auch in der c1ko-Gruppe. In der c3ko-Gruppe war dieser Rückgang in diesem – wie auch im vorherigen Experiment – in dieser Ausprägung nicht nachweisbar. In der c3ko- wie auch in der DKO-Versuchsgruppe zeigte sich – ähnlich der in **Abbildung 22 C** dargestellten Ex-

in vivo-Analyse und der in **Abbildung 31 A α** dargestellten Auswertung des ersten GvHD-Versuchs – eine signifikante Änderung im Verhältnis der CD4⁺- zu den CD8⁺-T-Zellen zugunsten der CD8⁺-Zellen. Die angewandte Gating-Strategie ist in **Abbildungen 33 A** dargestellt. Die **Abbildungen 33 B und C** zeigen repräsentative Durchflusszytometrie-Plots der Treg-Zellzahlen der verschiedenen Genotypen und die dazugehörige, statistische Auswertung. Auf eine detaillierte Darstellung der anderen, untersuchten Zytokine – ähnlich dem ersten GvHD-Versuch – wurde verzichtet. In **Abbildung 33 D** ist die statistische Auswertung der Gesamtmengen der gemessenen Zytokine aufgeführt. Hier ist insbesondere ein Anstieg der gemessenen IFN- γ - und TNF- α -Mengen auffällig. Beide Zytokine werden von aktivierten Th1-Zellen sezerniert. (vgl. Abschnitt 2.2.3) Da die akute GvHD insbesondere von Th1-Zellen induziert wird (vgl. Abschnitt 2.5.6) könnte eine vermehrte Aktivierung der Th1-Zellen den schlechten klinischen Gesamtzustand bei eigentlich geringerer Proliferations- bzw. Expansionsrate der NFAT-defiziente Zellen erklären. Dies wurde mit späteren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt, bei welchen sich (allerdings in einem haploidentischen Mausmodell) ebenfalls eine klinisch ausgeprägte, akute GvHD bei NFATc3-Defizienz einstellte. Auch hier wurden erhöhte IFN- γ -Konzentrationen gemessen.

Zusammenfassend zeigte sich in den beiden GvHD-Versuchen, dass NFATc3- und insbesondere NFATc1/c3-defiziente T-Zellen in den Empfängertieren in geringerem Umfang expandierten. Es konnte konsekutiv eine Verschiebung von den CD4⁺- hin zu den CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Dennoch etablierte sich in den entsprechenden Versuchstieren eine manifeste GvHD, was auf eine vermehrte Aktivierung von Th1-Zellen zurückzuführen sein könnte.

A



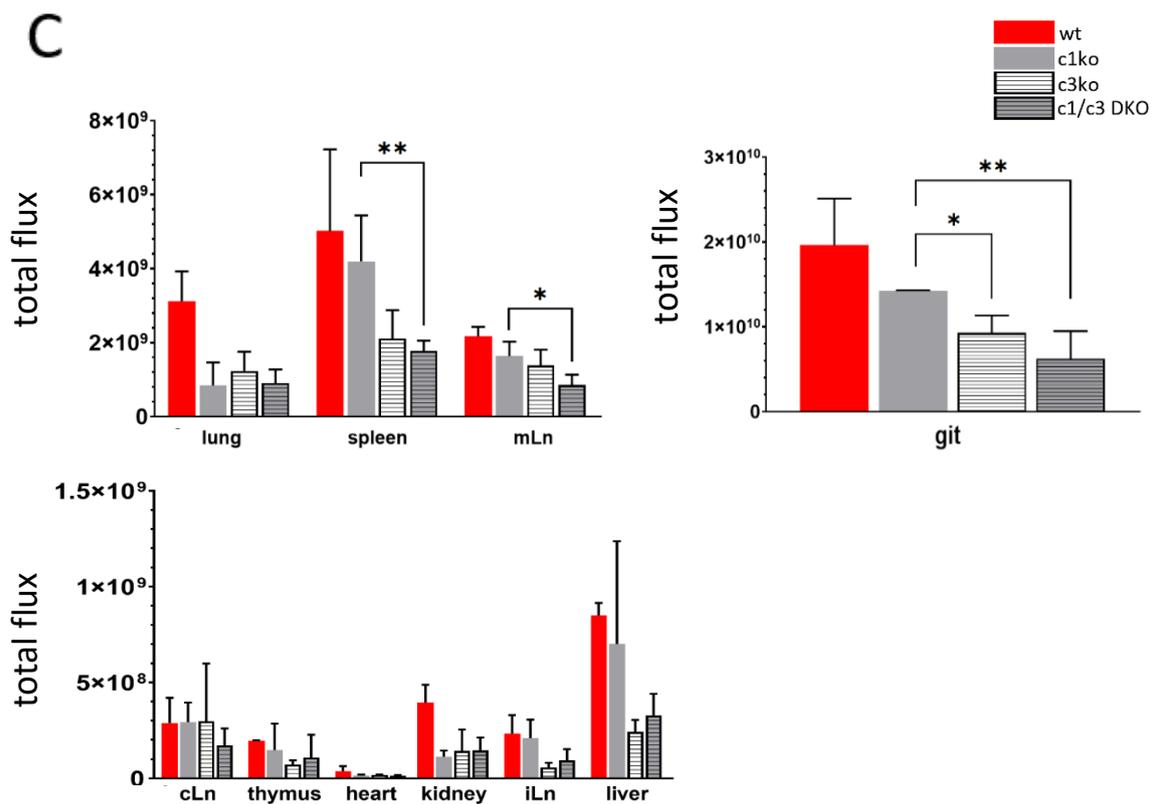
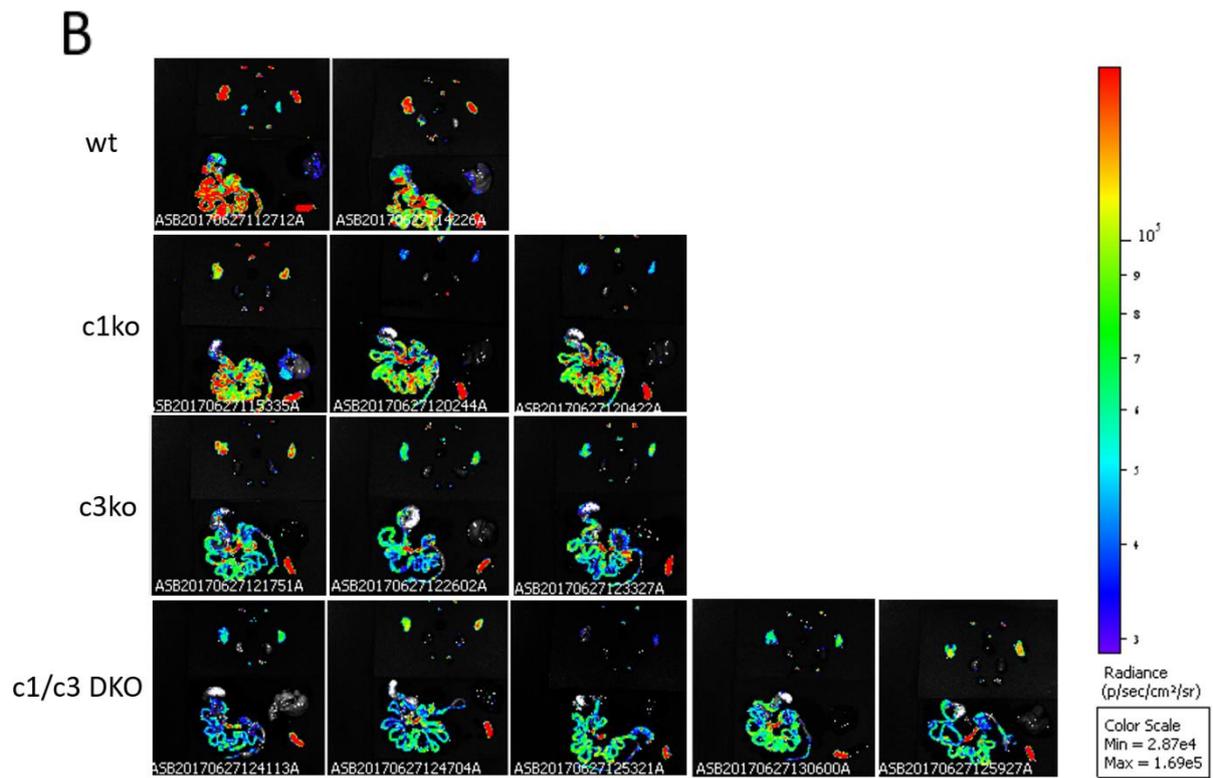
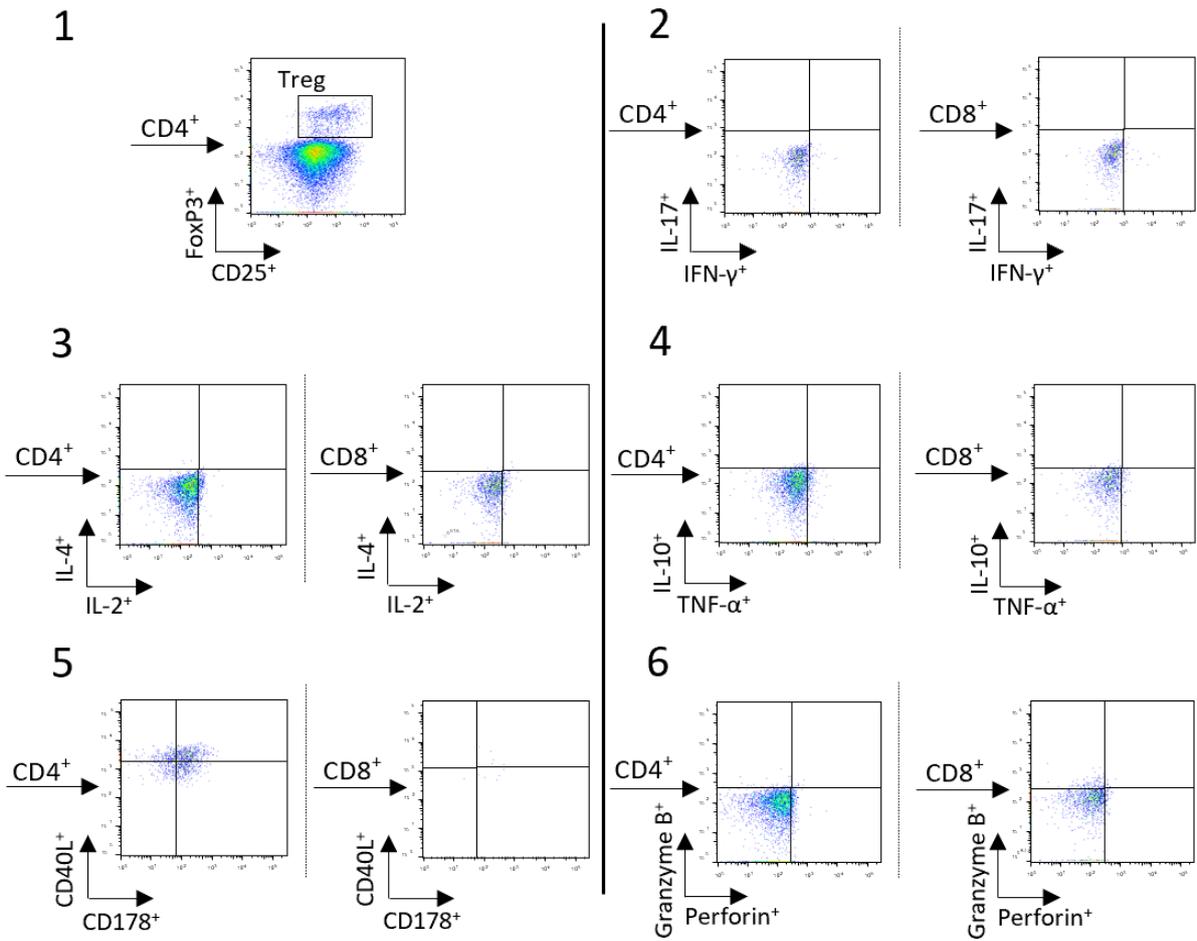
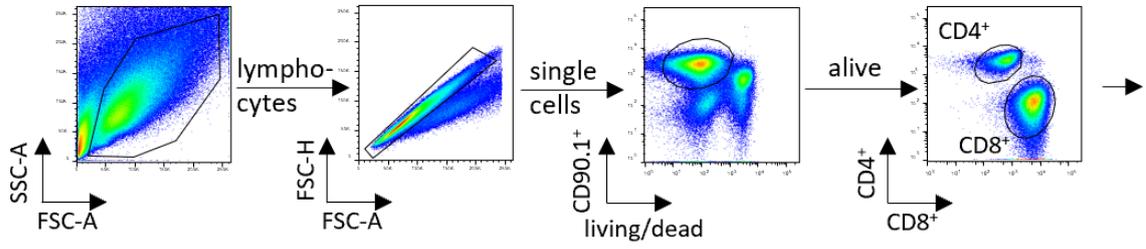
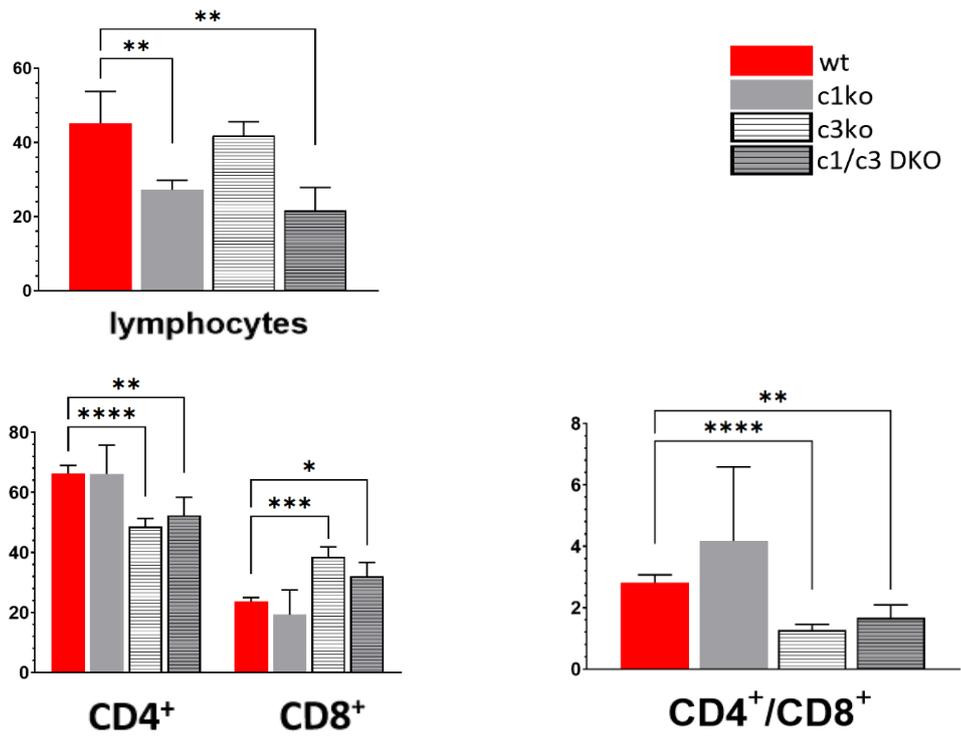


Abbildung 32 : Die Proliferationsneigung der Spender-T-Zellen ist in der DKO-Versuchsgruppe noch geringer ausgeprägt als bei alleiniger NFATc3-Defizienz. A Gewichtsverlust und clinical scores der wt-, c1ko-, c3ko- und c1/c3 DKO- Versuchsgruppen **B** an Tag 6 wurden – nach vorheriger Luciferase-Applikation – die Organe entnommen und nach dem in Abbildung 30 D aufgeführten Schema die GvHD-Aktivität analysiert. **C** Nach Organsystemen getrennte, statistische Auswertung der Luciferase-Aktivität. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* $p < 0.05$, **

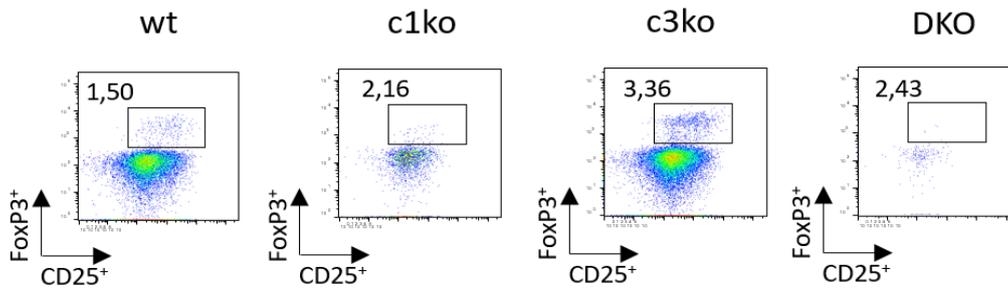
A



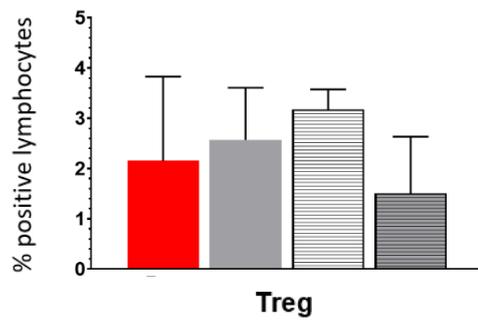
A_α



B



C



D

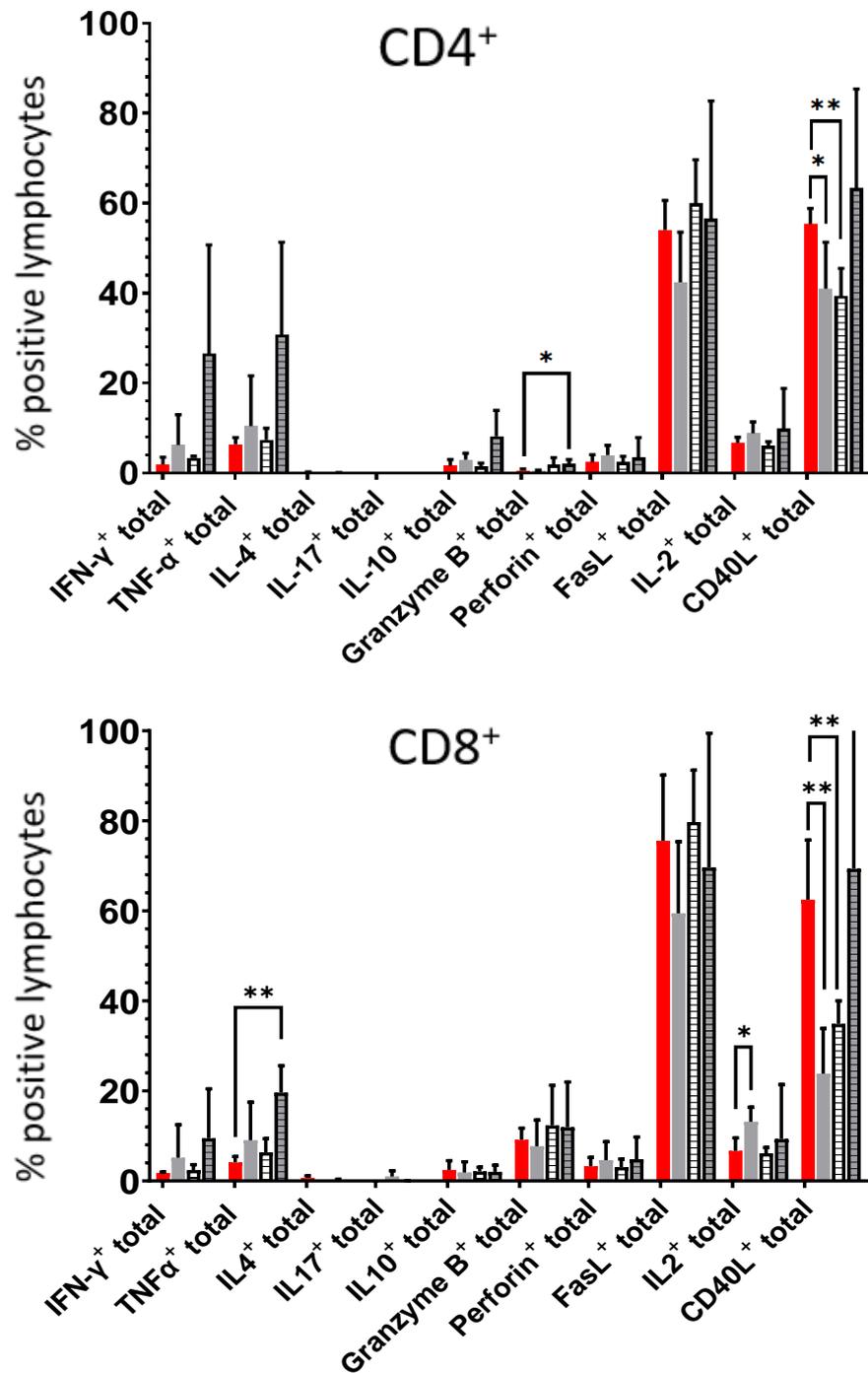


Abbildung 33: Bei gleichzeitiger NFATc1- und NFAT3-Defizienz kommt es zur Reduktion der Gesamtlymphozytenzahl; auch verschiebt sich das Verhältnis von CD4⁺- zu CD8⁺-T-Zellen zugunsten der CD8⁺-Zellen. Die angewandte Gating-Strategie wird in Abschnitt A, eine Analyse der Leukozytenzahlen sowie des CD4⁺- zu CD8⁺-Verhältnisses in Abschnitt A_α dargestellt. In den Abschnitten B und C werden repräsentative Durchflusszytometrie-Plots der Genotypen sowie die dazugehörige, statistische Auswertung der Treg-Zellzahlen dargestellt. In Abschnitt D werden die Gesamtmenngen aller untersuchten Zytokine statistisch ausgewertet. Die Populationen wurden mittels *unpaired t-test* verglichen. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, **** p < 0.0001)

5 Diskussion

5.1 NFAT in der aGvHD

Die GvHD ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation. Wie in Abschnitt 2.5.6 aufgeführt, wird die aGvHD von aktivierten Spender-T-Zellen und hier insbesondere von den Th1-Zellen induziert. [89] NFATc1 – c3 sind die NFAT-Mitglieder, welche in Lymphozyten exprimiert und durch den Ca^{2+} /Calcineurin-Signalweg aktiviert werden. Insbesondere NFATc1 und NFATc2 sind die vorherrschenden Vertreter der NFAT-Familie in peripheren T-Zellen. [10, 42] Die in der klinischen Praxis zur Therapie der aGvHD Anwendung findenden Medikamente wie CNI wirken unter anderem über eine unselektive Blockade aller NFAT-Moleküle. Es kommt zum gewünschten Rückgang der aGvHD, allerdings wird auch der therapeutisch wichtige GvL-Effekt beeinträchtigt. Darüber hinaus haben CNI noch diverse andere, schwere Nebenwirkungen (vgl. Abschnitt 2.4.6). Eine selektive Hemmung einzelner NFAT-Faktoren könnte daher zu einer zielgerichteteren und nebenwirkungsärmeren Behandlung der aGvHD führen. Vorhergehende Experimente unserer Arbeitsgruppe mit Mausmodellen zur GvHD/GvL hatten gezeigt, dass eine selektive Deletion von NFATc1 und/oder NFATc2 in den kotransplantierten T-Zellen diesen gewünschten Effekt haben könnte. Die NFAT-defizienten Spender-T-Lymphozyten wiesen eine reduzierte Proliferationsrate, eine verminderte Fähigkeit zur Einwanderung in das Zielgewebe sowie beeinträchtigte Effektorfunktionen auf. Es wurden höhere Treg-Frequenzen und eine trotz NFAT-Defizienz erhaltene Funktionsweise derselbigen nachgewiesen, was konsekutiv zu einer geringer ausgeprägten aGvHD führte. Auch die CD8^+ -T-Zellen zeigten trotz NFAT-Defizienz noch eine ausreichende Funktionsfähigkeit, wodurch der GvL-Effekt bei Einzeldefizienz sogar vollständig erhalten blieb. [58, 103]

Ob nun eine NFATc3-Ablation dieselbe Wirkung zeigt oder in Kombination mit NFATc1 der NFATc1/c2-Doppeldefizienz entspricht, war Gegenstand der hier vorgelegten Untersuchungen. Die Auswirkungen einer NFATc3- (bzw. NFATc1/c3-) Deletion auf die Entstehung und den Schweregrad einer aGvHD ist bisher noch nicht analysiert worden, da die entsprechende, konditionale NFATc3-defiziente Mauslinie lange nicht etabliert war. Auch generierten die wenigen, bisher zu NFATc3 durchgeführten Experimente teilweise unterschiedliche Ergebnisse. [42, 70] Mithilfe der neu kreierten *Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-*, *Nfatc1^{fl/fl}.Nfatc3^{fl/fl}.Cd4cre-* und *Nfatc3^{fl/fl}.Mb1cre-*Mauslinien führten wir daher *Ex-vivo*- sowie *In-vitro*-Analysen zur Funktion von NFATc3 in T- und B-Zellen durch. Anschließend wurden die Auswirkungen einer NFATc3- (und NFATc1/c3-) Defizienz im Rahmen eines *major-mismatch* aGvHD-Modells ($\text{H-2}^b \rightarrow \text{H-2}^d$) untersucht.

5.2 Diskrepante Befunde in den GvHD-Versuchen

Wie erhofft, konnten wir im Rahmen der *major-mismatch* GvHD-Versuche nachweisen, dass die transplantierten, NFATc3-defizienten T-Zellen und insbesondere die NFATc1/c3-doppeldefizienten T-Zellen in den Empfängertieren in deutlich geringerem Umfang proliferieren als es bei wildtypischen T-Zellen zu beobachten war. Die während der Versuchsdurchführung und auch die an Tag 6 erhobenen BLI-Daten zeigen, dass dieses Phänomen unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt auftritt. (**Abbildungen 30 und 32**) Wie in Abschnitt 5.1 aufgeführt, hatten vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine entsprechende, eingeschränkte Proliferationsfähigkeit von NFATc1-, NFATc2- oder NFATc1/c2-defizienten Spender-T-Zellen auch mit einer Linderung der GvHD-Symptomatik in den Versuchstieren einhergeht. [58]

Leider mussten wir jedoch feststellen, dass sowohl die Gewichtsverläufe als auch die *clinical scores* der NFATc3- und NFATc1/c3-Versuchsgruppen (**Abbildungen 30 und 32**) ähnliche bzw. sogar schwerwiegendere GvHD-Verläufe anzeigten, als dies in den wildtypischen Versuchsgruppen der Fall war. Ein besseres Verständnis der zunächst widersprüchlichen Befunde (ausgeprägte GvHD-Symptomatik bei jedoch geringerer Proliferationsneigung) und auch zu NFATc3 im Allgemeinen konnte aus der Interpretation der *ex vivo* und *in vitro* erhobenen Daten gewonnen werden.

5.3 Hinweise auf einen Feedback-Mechanismus zwischen NFATc3 und STIM1

Durch die Analyse der Western Blots konnten wir in **Abbildung 16** nachweisen, dass auch NFATc3 bei Aktivierung vermehrt in den Zellkern transloziert. In Abschnitt 2.4.2 und 2.4.3 wird aufgeführt, dass die SRR- und SP-Abschnitte der NHR-Domäne in den inaktiven NFAT-Molekülen phosphoryliert sind. NFAT ist in diesem Zustand im Zytoplasma anzutreffen. Wird nach Aktivierung des Ca^{2+} /Calcineurin-Signalwegs die Phosphatase Calcineurin in ihre aktive Form überführt, kann sie an die NHR von NFAT binden. Mithilfe der katalytischen CnA-Untereinheit kann Calcineurin nun die Serinreste der SRR und SP dephosphorylieren. NFAT durchläuft eine Konformationsänderung, es werden die NLS freigelegt und NFAT geht in seine aktive Zustandsform über. [10, 37]

In **Abbildung 16** zeigte sich ebenfalls, dass in heterozygoten Zellen (*Nfatc3^{+/-}.Cd4cre*) deutlich geringere Mengen NFATc3 nachgewiesen werden konnten als in wildtypischen Zellen. Dies kann nicht ausschließlich auf die Minderproduktion von NFATc3 im Rahmen der Heterozygotie zurückzuführen sein. Vielmehr scheint durch diese ein existierender, positiver Feedback-Loop für die NFATc3-Expression supprimiert zu werden. Eine Autoaktivierung – wie sie über die NFAT-Bindestelle auf Promotor P1 für die kurze NFATc1/ α A-Isoform vorbeschrieben ist [104] – ist für NFATc3 bisher nicht bekannt. Allerdings legten Experimente an Myoblasten nahe, dass STIM1 ein Target-Gen von NFATc3 ist. [105] Es scheint möglich, dass der in Myoblasten gefundene Signalweg auch in T-Zellen anzutreffen ist. Zumindest könnte dieser die deutlich geringere NFATc3-Konzentration in den heterozygoten Zellen erklären. Durch die Heterozygotie wird weniger NFATc3 und damit konsekutiv weniger STIM1 gebildet. Da somit auch weniger STIM1-Moleküle an ORAI1 binden können, kommt es zu einem geringeren Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle und hierdurch zu einer geringeren Aktivierung des Ca^{2+} /Calcineurin-Signalwegs.[11, S. 346 - 350] Konsekutiv überführt die Phosphatase Calcineurin weniger NFATc3 in seine aktive Zustandsform. Darüber hinaus steht im Rahmen der NFATc3-Heterozygotie dieselbe Menge NFAT-Kinasen für weniger NFATc3-Moleküle zur Verfügung. Beide Mechanismen führen dazu, dass insgesamt mehr NFATc3 in seiner inaktiven, phosphorylierten Zustandsform gehalten und konsekutiv insbesondere nukleäres NFATc3 verringert vorzufinden ist.

5.4 IRF4 und Bcl2A1 als NFATc1- und Bcl2 als NFATc3 Target-Gene

Der Transkriptionsfaktor IRF4 wird, als bekanntes Target-Gen, von NFATc1 und NFATc2 induziert. [39, 76, 99] Die drei Transkriptionsfaktoren regen über einen gemeinsamen Signalweg die Proliferation naiver T-Zellen an. [38, 106, 107] IRF4 ist in wildtypischen T-Zellen für die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th2-, Th17- und Tfh-, aber nicht von Th1-Zellen von Bedeutung. [108] Entsprechend konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Minderproduktion von IRF4 in transplantierten T-Zellen im Rahmen eines *major-mismatch* aGvHD-Versuchs zwar mit einem ungünstigen Th1-Shift einhergeht, jedoch gleichzeitig eine deutliche Reduktion der Proliferations- und Expansionsneigung in allen transplantierten T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Letztere führte zu einer Reduktion der klinischen GvHD-Symptomatik in den Versuchstieren. [99] Die in **Abbildung 18 B** aufgezeigte Mehrproduktion von IRF4 bei NFATc3-Defizienz könnte als Indiz für die supprimierende Wirkung von NFATc3 auf die IRF4-Expression interpretiert werden. Wahrscheinlicher scheint jedoch, dass eine NFATc3-Defizienz mit einer vermehrten NFATc1-Bildung einhergeht, welche wiederum nachweislich zu einer IRF4-Induktion führt. In dieser Hinsicht wäre eine alleinige NFATc3-Defizienz in den T-Lymphozyten bei einer allo-HCT ungünstig, da – konträr zu den vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe – bei vermehrter IRF4-Bildung mit einer Zunahme der GvHD-Aktivität zu rechnen wäre.

Bcl2A1 ist ein antiapoptotisches Mitglied der Bcl2-Familie. [109] Diese Proteine kontrollieren den intrinsischen Apoptoseweg der Zelle, indem sie die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma und damit letztendlich die Bildung des Apoptosoms regulieren. Die Bildung von Bcl2A1 wird in Lymphozyten durch NF- κ B, jedoch sehr wahrscheinlich auch durch NFATc1 und -c2 induziert.[9, S. 499 - 500] [110, 111] Die vermehrte Bildung von Bcl2A1 bei NFATc3-Defizienz (**Abbildung 18 C**) unterstützt diese These. Ob die Induktion eher auf NFATc1 oder NFATc2 zurückzuführen ist, kann allein anhand dieses Western Blots nicht mit Sicherheit gesagt werden. Da sich NFATc1 und NFATc3 jedoch gegenseitig zu regulieren scheinen (vgl. Abschnitt 5.5), ist eine Induktion wohl am ehesten auf NFATc1 zurückzuführen.

Zusätzlich konnten wir eine Minderproduktion von Bcl2 bei NFATc3-Defizienz durch **Abbildung 17** nachweisen. Schon bei Oukka et al. wurde postuliert, dass Bcl2, das anti-apoptotisch wirkende und namensgebende Mitglied der Bcl2-Familie, ein Target-Gen von NFATc3 sei. Die in NFATc3-defizienten Zellen nachgewiesenen, erhöhten Apoptose-Raten von DP-Thymozyten wurden unter anderem auf diese Bcl2-Minderproduktion zurückgeführt.[42] Da nun wiederholt ein Zusammenhang zwischen NFATc3- und Bcl2-Expression nachgewiesen wurde, scheint es wahrscheinlich, dass Bcl2 ein direktes NFATc3-Target-Gen ist.

5.5 Gegenregulation von NFATc1 und NFATc3

NFATc1 und NFATc2 sind die vorherrschenden NFAT-Mitglieder in peripheren T-Zellen. Während NFATc2 in hohen Konzentrationen in ruhenden T-Zellen nachzuweisen ist, wird NFATc1 über die Expression seiner sog. kurzen Isoform, NFATc1/ α A, im Rahmen der T-Zellaktivierung und Differenzierung – u.a. auch von NFATc2, vor allem aber in einem autokrinen, positiven Feedbackloop – induziert.[104, 112, 113] Durch frühere Analysen von NFAT-defizienten Mäusen oder Knochenmarkschimären konnte ermittelt werden, dass NFATc1 in T-Zellen die Ausbildung eines Th2-Phänotyps und NFATc2 umgekehrt die Entstehung eines Th1-Phänotyps – indirekt auch durch Blockade der Th2-Differenzierung – induziert. [66-68, 112, 114, 115] Die vorbekannte Expression von NFATc1 und NFATc2 in den verschiedenen Th-Subtypen ließ sich auch in unseren Experimenten (**Abbildungen 18 A und 20**) nachweisen. Die Expression von NFATc3 in peripheren T-Zellen ist bisher weniger intensiv untersucht worden. Interessanterweise konnten wir aufzeigen, dass NFATc3 und NFATc1 präferentiell in demselben Th-Subtyp (Th2) dominieren. (**Abbildung 15**) Auch war ersichtlich, dass bei NFATc3-Defizienz vermehrt NFATc1 gebildet wird und *vice versa*. (**Abbildungen 18 und 19**) NFATc1 wird in wildtypischen Zellen insbesondere im Rahmen der T-Zellaktivierung hochreguliert, da über den Promotor P1 die Autoregulation der Isoform NFATc1/ α A angeregt wird. Es ist daher in undifferenzierten Th-Zellen nur in geringen Konzentrationen anzutreffen. (**Abbildung 18 A**) IRF4 (und vermutlich auch Bcl2A1, siehe oben) ist ein Target-Gen von NFATc1. Eine entsprechende direkte Regulation von IRF4 durch NFATc3 ist nicht bekannt.

Wir konnten nun in **Abbildung 18 B** zeigen, dass IRF4 (und Bcl2A1) nicht nur in Th1- und Th2-Zellen, sondern insbesondere auch in Th0-Zellen bei NFATc3-Defizienz vermehrt gebildet wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass NFATc3 über eine direkte Repression der regulatorischen Elemente im NFATc1-Lokus die Expression von NFATc1 supprimiert. Würde die Suppression erst im Rahmen der (Re-)Stimulation bzw. Differenzierung der T-Zellen auftreten, dürfte IRF4 in Th0-Zellen nicht nachzuweisen sein. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass das NFATc3-Target-Gen Bcl2 auch in NFATc3-defizienten Th0-Zellen (**Abbildung 17**) vermehrt exprimiert wird. Insofern könnte NFATc1 über eine Bindung an der regulatorischen Untereinheit von NFATc3 auch die Expression von NFATc3 supprimieren. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass der NFATc1- bzw. NFATc3-Nachweis in Th0-Zellen jeweils nur in einem Western Blot gelang.

Eine weitere, mögliche Erklärung für das gegenläufige Verhalten von NFATc1- und NFATc3-Expression in den oben beschriebenen Th-Subtypen wäre die Existenz eines gemeinsamen, stabilisierenden Bindeproteins im Zytoplasma. Bei NFATc1-Defizienz stünden daher höhere Mengen des Bindeproteins bereit, um NFATc3 zu stabilisieren und *vice versa*. Weiterführende Experimente hierzu führten wir nicht durch, allerdings sind zum Beispiel für die Gerüstproteine Homer2 und Homer3 Interaktionen mit NFAT nachgewiesen worden. [116]

Unsere Experimente in Bezug auf die Interaktion von NFATc2 und NFATc3 zeigten keine eindeutigen Ergebnisse. (**Abbildungen 19-21**) Es ist wahrscheinlich, dass eine Wechselwirkung

zwischen den Transkriptionsfaktoren besteht, allerdings scheint diese wesentlich schwächer ausgeprägt als jene zwischen NFATc1 und NFATc3 und möglicherweise kontextabhängig zu sein.

5.6 NFATc3 ist für die Zytokinproduktion von CD4⁺-Zellen *in vitro* nur von untergeordneter Bedeutung

In den weiteren Experimenten zu NFATc3 (**Abbildungen 26 und 28**) konnten wir die Ergebnisse vorhergehender Untersuchungen bestätigen, dass eine singuläre NFATc3- oder NFATc1-Defizienz *in vitro* zu keinen (NFATc3) oder nur leichtgradigen (NFATc1) Veränderungen in der Zytokinproduktion von peripheren T-Zellen führt. [42, 66, 67, 117] Selbst im Rahmen einer NFATc1/c3-Doppeldefizienz konnten wir keine Beeinträchtigung in der Zytokinproduktion der T-Zellen feststellen. (**Abbildung 28**) Wir schließen hieraus, dass zumindest in Bezug auf die Zytokinproduktion *in vitro* die Abwesenheit von NFATc1 und/oder NFATc3 größtenteils durch NFATc2 oder einen anderen Transkriptionsfaktor kompensiert werden kann. Das der vorbeschriebene Th1-Shift in NFATc1-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte, mag auf unsere mit n=4 recht kleine Versuchsgruppe zurückgeführt werden, deutet aber eher daraufhin, dass die Wechselwirkungen *in vivo* insgesamt komplexer sind als *in vitro*.

Interessanterweise ist bekannt, dass auch eine singuläre NFATc2-Defizienz nur sehr reduzierte Auswirkungen auf die Zytokinproduktion der T-Zellen hat. [68, 115]. Ebenfalls zeigen NFATc2/c3-defiziente T-Zellen *in vitro* zwar einen Th2-Phänotyp, jedoch keine vollständige Blockade der Zytokinproduktion. [118] Im Gegensatz hierzu können NFATc1/c2-doppeldefiziente T-Zellen *in vitro* zwar aktiviert werden, jedoch kaum bis keine Zytokine sezernieren.[119] Eine NFATc2-Defizienz kann also von NFATc1 und NFATc3, jedoch nicht ausschließlich von NFATc3 kompensiert werden. Ebenso kann eine NFATc1-Defizienz zwar von NFATc2 und NFATc3, jedoch nicht ausschließlich von NFATc3 ausgeglichen werden. Dies zeigt insbesondere die herausgehobene Bedeutung von NFATc1 und NFATc2 für die Zytokinproduktion der T-Zellen. NFATc3 ist diesbezüglich – zumindest *in vitro* – nur von untergeordneter Bedeutung.

Wiederholt konnte in unserer und (anderen) Arbeitsgruppe(n) gezeigt werden, dass NFAT insbesondere für die Differenzierung und Proliferation der normalen Effektor-T-Zellen wichtig ist. Für die Proliferation von nTregs als auch von CD8⁺-Zellen *in vivo* scheint NFAT weniger relevant zu sein. [21, 39, 58] Auch zeigte sich, dass bei Defizienz eines spezifischen NFAT-Transkriptionsfaktors *in vivo* vermehrt Zytokine einer speziellen Th-Differenzierungsrichtung nachweisbar waren. [103] Bei Defizienz eines oder insbesondere mehrerer NFAT-Transkriptionsfaktoren nimmt also die Proliferationsneigung der CD4⁺-T-Zellen insgesamt ab, es kann hier jedoch innerhalb der CD4⁺-Population *in vivo* zu vermehrter Aktivierungsneigung kommen. Dies erklärt zum einen die reduzierte Organgröße insbesondere in unseren NFATc1/3-doppeldefizienten Mäusen. (**Abbildung 14**) Auch erschließt sich hieraus indirekt das

abnehmende CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis, da die Frequenz der CD8⁺-Zellen im Rahmen der NFAT-Defizienz größtenteils unbeeinflusst bleibt. (**Abbildung 22**) Der vorbeschriebene Selektionsvorteil von nTregs innerhalb der CD4⁺-Population aufgrund der geringeren NFAT-Abhängigkeit *in vivo* konnte in **Abbildung 22** ebenfalls nachgewiesen werden. Interessanterweise war die direkt *ex vivo* deutlich nachweisbare Verschiebung im CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis bei den im weiteren Verlauf durchgeführten Zellkulturanalysen nach 3 Tagen – zwar weniger stark ausgeprägt – jedoch weiterhin nachweisbar. (**Abbildung 25**) Nach 7-tägiger Zellkultur zeigte sich in den NFAT-defizienten Zellen keine Abweichung mehr gegenüber den wildtypischen Zellen. (Daten nicht gezeigt). Auch ist anzumerken, dass in den NFATc1/c3-doppeldefizienten Th1-, Th2- und Th17-Zellkulturen, jedoch nicht in den iTreg-Kulturen, ein signifikanter Rückgang der Leukozyten-Frequenzen nachweisbar war. (**Abbildung 27**) Es zeigte sich insofern, dass sich die direkt *ex vivo* festgestellten Änderungen der Proliferationsneigung der NFAT-defizienten CD4⁺-T-Zellen (exklusive der iTregs) *in vitro* fortsetzen.

Interessanterweise widerspricht die hier festgestellte, unveränderte Frequenz an iTreg bei NFATc1 und/oder c3-Defizienz bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in welchen gezeigt wurde, dass die Genese von iTreg – im Gegensatz zu nTreg – hochgradig NFAT-abhängig ist. [21] Eine Erklärung für das beobachtete Phänomen ist, dass *in vivo* im Rahmen der T-Zelldifferenzierungsprozesses eine optimale Aktivierung des TCR und entsprechender Korezeptoren wie CD28 stattfindet. Die hierdurch im Zellinneren ausgelöste Ca²⁺/Calcineurin-Signalkaskade führt nicht nur zur Aktivierung von NFAT sondern insbesondere auch zu jener von c-Rel/NF-κB.[120, 121] Es ist gezeigt worden, dass die Bindung dieses Transkriptionsfaktors an CNS3 für die Expression von FoxP3 in nTregs relevant ist. [122, 123] Im Gegensatz hierzu läuft die T-Zellaktivierung *in vitro* nur unter suboptimalen Bedingungen, z.B. ohne CD28-Kostimulation, ab. Dies führt wahrscheinlich weiterhin zu einer NFAT-, jedoch weniger zu einer c-Rel/NF-κB-Aktivierung (was der Anergie-Induktion in T-Zellen ähnelt). [124] In diesem Kontext ist für die TGF-β und IL-2 vermittelte iTreg-Differenzierung insbesondere die Bindung von NFAT/Smad3 an die CNS1-Sequenz des FoxP3-Lokus von Bedeutung. [125] Diesem Aktivierungsweg kommt in der nTreg-Differenzierung sonst nur eine untergeordnete Rolle zu. [21]

Eine mögliche Erklärung für unsere diskrepanten Befunde wäre, dass wir uns – um die Umgebungsbedingungen im Rahmen der aGvHD *in vitro* möglichst unverfälscht nachzuahmen – vor der Aussaat der Zellen bewusst gegen eine T-Zellaufreinigung entschieden. Da in unseren Zellkulturen also Monozyten, Makrophagen etc. anzutreffen sind, könnten diese die suboptimalen Aktivierungsbedingungen *in vitro* kompensiert und so zu einer starken T-Zellaktivierung beigetragen haben. Dies würde die hohe iTreg-Konzentration selbst in den NFATc1/c3-doppeldefizienten T-Zellpopulationen erklären. Die in unseren Experimenten durchgeführte iTreg-Differenzierung ist daher der nTreg-Entwicklung *in vivo* ähnlicher, als dies normalerweise der Fall wäre.

5.7 Der bei NFATc1 und -c3-Defizienz bestehende Block in der thymischen T-Zellreifung kann durch NFATc2 teilweise kompensiert werden

NFATc3 ist der vorherrschende Vertreter der Transkriptionsfaktor-Familie im Thymus. Es ist bekannt, dass NFATc3 insbesondere für den Übergang vom DP- zum SP-Stadium relevant ist. [63] NFATc1 und NFATc2 werden im Thymus ebenfalls exprimiert, allerdings in deutlich geringeren Konzentrationen als in reifen T- und B-Zellen. NFATc1 tritt vor allem im DN-, NFATc2 im SP-Stadium in Erscheinung. [62] Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 aufgeführt, (**Abbildung 24**) konnten wir die vorausgesagte, vollständige Blockierung in der thymischen T-Zellreifung (bzw. der positiven Selektion) in einer NFATc1/c3-doppeldefizienten Mauslinie nicht nachweisen. [70] Dennoch zeigte sich – durch einen Anstieg der DP- und Abfall der (CD4⁺-) SP-Population – eine eingeschränkte T-Zellreifung in den NFATc1/c3-doppeldefizienten CD4⁺-Thymozyten, was hier auf einer direkten Beeinflussung im DP oder sogar CD4⁺-SP-Stadium zurückzuführen sein muss. [53, 70]

Es gilt als gesichert, dass NFATc3 für den Übergang vom DP- zum SP-Stadium im Thymus relevant ist. Es besteht jedoch Uneinigkeit darüber, ob der Transkriptionsfaktor diese Wirkung über einen dämpfenden Effekt auf die negative Selektion (bzw. eine Absenkung der Schwelle zwischen positiver und negativer Selektion) [42], eine unterstützende Wirkung der positiven Selektion [70] oder ggf. eine Wirkung auf beide Selektionsarten ausübt. Während wir in unseren NFATc3-defizienten Zellen keinen signifikanten Abfall (im Gegenteil sogar einen Anstieg der CD4⁺-Population) einer Thymozytenpopulation nachweisen konnten, zeigte sich in den NFATc1/c3-doppeldefizienten T-Zellen wie vorbeschrieben ein Anstieg der DP- und ein Abfall der (CD4⁺-)SP-Population. Analog zu Oukka et al. konnten wir im weiteren Verlauf nachweisen, dass das anti-apoptotische Bcl2 vermutlich ein NFATc3-Target-Gen ist. (vgl. Abschnitt 5.4). Auch die vermehrte, periphere Aktivierungsneigung bei NFATc3- (und NFATc1/c3) -Defizienz konnte nachgewiesen werden. (**Abbildung 23**) Die bei Canté-Barrett et al. beschriebene Akkumulation der Zellen in der DN3-Phase (mit konsekutiv reduzierten Zellzahlen in der DN4-Phase) – und somit vor Erhalt der Überlebenssignale des Prä-TCR [71] – wurde in unserem Experiment nicht adressiert, da wir Cre unter Kontrolle von CD4 verwendet haben, sodass die Deletion erst mit Erreichen des DP-Stadiums geschieht.

Insgesamt sehen wir in unserem Experiment eher Belege für die These von Oukka et al, dass NFATc3 *in vivo* über eine Suppression der negativen Selektion bzw. über eine Anhebung der Grenze zwischen positiver und negativer Selektion die T-Zellreifung fördert. Wir gehen davon aus, dass die von Canté-Barrett et al. festgestellten Änderungen in den DN-Populationen am ehesten auf einer früheren Verschiebung in der Thymozyten-Entwicklung beruhen, die nur bei Verwendung der LckCre deutlich werden. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass wir keine Analyse der CD5-, CD69-Expression oder der TCR-Funktion in DP-Thymozyten – also jenen Zellen, welche die positive Selektion erfolgreich durchlaufen haben – durchgeführt haben. Auch wurden in den untersuchten Genotypen (oder den Entwicklungsstadien) keine

Analysen zu eventuellen Unterschieden in den Apoptose-Raten erhoben. Zuletzt ist auch anzumerken, dass unsere verwendeten Daten in lediglich einem Versuch, allerdings n=4, erhoben wurden.

Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 aufgeführt, zeigten sich in den NFATc3-defizienten Zellen nur minimale Abweichungen zu den wildtypischen Zellen. Dies ist kongruent mit den Untersuchungen von Patra et al., dass ein durch NFATc3-Defizienz induzierter Block in der thymischen T-Zellreifung durch eine IL-7-induzierte NFATc1-Aktivierung (teilweise) kompensiert werden kann.[53, 70] Bemerkenswert ist jedoch, dass der unter anderem von Canté-Barrett et al. postulierte, vollständige Block der thymischen T-Zellreifung auch in unseren NFATc1/c3-doppeldefizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte. Allerdings ist bekannt, dass eine Behandlung mit Cyclosporin A im Mausmodell durchaus einen vollständigen Block der thymischen T-Zellreifung im Übergang vom DP- zum SP-Stadium zur Folge hat. [63, 126] Hieraus könnte geschlossen werden, dass der Transkriptionsfaktor NFATc2 – obwohl sonst hier nur von untergeordneter Bedeutung – den Block in der T-Zellreifung bei Defizienz von NFATc1 und NFATc3 (teilweise) kompensieren kann.

5.8 NFATc3 ist in der B-Zellreifung nur von untergeordneter Bedeutung

In die B-Zellreifung sind eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren wie E2A, EBF1, PAX5 und diverse weitere involviert. [127-129] Insbesondere da eine Arbeitsgruppe unseres Instituts die Relevanz einer IL-7-vermittelten Aktivierung von NFATc1 in der Entwicklung von B-Zellen entdeckte – ähnlich der IL-7-induzierten NFATc1-Aktivierung in frühen Thymozyten – war es interessant, die Bedeutung von NFATc3 in der B-Zellreifung zu untersuchen. [53, 130, 131] Wie bereits in Abschnitt 4.3.4 und **Abbildung 29** aufgeführt, zeigte sich in NFATc3-defizienten Zellen keine signifikante Beeinträchtigung der B-Zellreifung. Dies bestätigt vorhergehende Untersuchungen, in welchen in NFATc2/c3-defizienten, reifen B-Zellen zwar Auffälligkeiten festgestellt werden konnten, die B-Zellreifung jedoch nicht beeinträchtigt war. [132] NFATc3 kommt somit in der B-Zellreifung nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

5.9 Eine NFATc3-Inhibition zur Therapie der aGvHD erscheint nicht sinnvoll

Wie in Abschnitt 5.2 angeführt, schienen die im Rahmen der GvHD-Versuche erhobenen Daten zunächst nicht recht zusammenzupassen. Die bereits *ex vivo* und *in vitro* aufgezeigte, reduzierte Proliferationsneigung der NFATc3- und insbesondere der NFATc1/c3-defizienten Zellen konnte hier durch die BLI-Daten ebenfalls nachgewiesen werden. Entscheidend war die anschließende, durchflusszytometrische Analyse der entsprechenden Versuchsgruppen. **(Abbildungen 31 und 33)** Es zeigten sich tendenziell höhere Spiegel der Th1-Leitzytokine IFN- γ und TNF- α , welche insbesondere in der Th1-induzierten aGvHD von Bedeutung sind. [89] Auch dies ist kongruent zu den *Ex-vivo*-Daten, welche eine erhöhte Aktivierungsneigung in den NFATc3- und/oder NFATc1/c3-defizienten Zellen aufzeigen. **(Abbildung 23)** Wie wir nachweisen konnten (vgl. Abschnitt 5.5), sind NFATc3 und NFATc1 in denselben Th-Subtypen anzutreffen und haben hier redundante Eigenschaften. Da bei NFATc1-Defizienz wiederholt eine Th1-Shift festgestellt werden konnte, scheint eine ähnliche Wirkung auch bei NFATc3-Defizienz naheliegend zu sein.[112] Im Hinblick auf die Aktivität der Tregs ergibt sich aus unseren Daten ein uneinheitliches Bild. [21] In dem ersten GvHD-Versuch war sowohl ein signifikanter Abfall der insbesondere für die Treg-Differenzierung notwendigen IL-2-Spiegel bei NFATc3-Defizienz als auch des Treg-Effektorzytokins IL-10 nachweisbar. Beide Messwerte waren so im zweiten GvHD-Versuch nicht reproduzierbar. Insgesamt zeigen sowohl unsere *In-vitro*-Versuche als auch vorhergehende Untersuchungen, dass eine reduzierte Treg-Frequenz in der GvHD als Folge der NFATc3 und/oder NFATc1-Defizienz als eher unwahrscheinlich erscheint. [21, 133]

Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass es einen, durch die niedrigere Proliferationsrate der transplantierten, NFATc3- bzw. NFATc1/c3-defizienten T-Zellen bedingten, positiven Effekt auf die Genese der GvHD gibt. Leider wird dieser durch die erhöhte Aktivierungsneigung und den Th1-Shift der T-Zellen zunichte gemacht. Es fällt auf, dass unsere Ergebnisse aus dem zweiten GvHD-Versuch in Bezug auf die NFATc1-defiziente Versuchsgruppe von vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe abweichen, in welchen eine signifikante Besserung der GvHD-Symptomatik bei Transplantation von NFATc1-defizienten T-Zellen beobachtet werden konnte. Sowohl Versuchsaufbau als auch der Genotyp der transplantierten T-Zellen waren bei Vaeth et al. [58] identisch zu dem hier durchgeführten Experiment. Zunächst erklärten wird die diskrepanten Befunde damit, dass die transplantierten Treg-Zellen in dem gezeigten Experiment während des Versuchsaufbaus oder der -durchführung untergegangen sein könnten. Da wir jedoch – wie oben beschrieben – Treg-Zellen als auch deren Leitzytokin IL-10 nachweisen konnten, erscheint dies als wenig plausibel. Wir gehen inzwischen davon aus, dass eine Aktivierung der NFATc1-defizienten Spender-T-Zellen vor der eigentlichen Versuchsdurchführung – beispielsweise durch eine unerkannte Infektion im Tierstall – die wahrscheinlichste Erklärung für die Genese einer schweren GvHD in den entsprechenden Empfängertieren ist. Zeitlich getrennt durchgeführte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass vorstimulierte NFAT-defiziente (und hier insbesondere NFATc1-

defiziente) Spender-T-Zellen – aus bisher ungeklärter Ursache – weiterhin eine schwere aGvHD induzieren können. [99] Da von einer mutmaßlichen Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die anderen Versuchsgruppen betroffen waren, stellte sich initial die Frage nach der generellen Aussagekraft der GvHD-Versuche. Da sich unsere Ergebnisse in Bezug auf die Ausprägung der GvHD allerdings mit späteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe – in welcher ebenfalls im Rahmen eines anderen Mausmodells eine schwere GvHD bei NFATc3-Defizienz imponierte – decken, gehen wir diesbezüglich nicht von einer Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse aus. Einer Vorstimulation scheint also bei NFATc3-defizienten Spender-T-Zellen keine Bedeutung in der Genese einer GvHD zuzukommen. Die Funktionsfähigkeit der CD8⁺-T-Zellen – und damit die Ausprägung des GvL-Effekts bei NFATc3- oder NFATc1/c3-Defizienz – wurde in unserer Versuchsreihe nicht explizit untersucht. Analog zu Vaeth et al. [103] sollten hierzu im weiteren Verlauf beispielsweise noch Versuche mit einem Lymphom- und/oder Leukämie-Modell durchgeführt werden. Aufgrund der in unseren GvHD-Experimenten auch bei NFATc1 oder NFATc1/c3-Defizienz nachgewiesenen, unveränderten Konzentrationen an Granzym B, Fas-Ligand oder Perforin (**Abbildung 33**) scheint eine Beeinträchtigung der CD8⁺-Zellen eher nicht vorzuliegen. Auch konnte für CD8⁺-Zellen – ähnlich zu Tregs – eine im Vergleich zu T_{eff} erhöhte Resilienz gegenüber NFAT-Defizienz nachgewiesen werden. [58]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass – um die Funktion von NFATc3 in der GvL-Reaktion zu verstehen – noch weitere Untersuchungen notwendig sind. Da eine selektive Inhibition von NFATc3 (oder NFATc1/c3) als mögliche Therapieoption für die Behandlung einer aGvHD jedoch nicht zielführend zu sein scheint, erübrigen sich GvL-Ansätze. Für translationale Ansätze erscheint es eher opportun, NFATc1 und/oder NFATc2 in humanen T-Zellen zu ablatieren sowie ihre Defizienz in weiteren und komplementierenden Tierversuchen zu GvHD/GvL zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Labrecque, N., Baldwin, T. und Lesage, S., *Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 16-26.
2. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 127-35.
3. Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R., *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
4. Kumar, H., Kawai, T. und Akira, S., *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
5. Bröker, B., Schütt, C. und Fleischer, B., *Grundwissen Immunologie*. 4. Aufl. 2019, Berlin: Springer Verlag.
6. Schmidt, M. F., *Chemische Biologie und Wirkstoffentwicklung*. 1. Aufl. 2020, Berlin: Springer Verlag.
7. Kaufmann, S. H. E., *Basiswissen Immunologie*. 7. Aufl. 2012, Berlin: Springer Verlag.
8. Porciello, N. und Tuosto, L., *CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **28**: p. 11-9.
9. Murphy, K. M. und Weaver, C., *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. 2018, Berlin: Springer Verlag.
10. Muller, M. R. und Rao, A., *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 645-56.
11. Vaeth, M. und Feske, S., *NFAT control of immune function: New Frontiers for an Abiding Trooper*. F1000Res, 2018. **7**: p. 260.
12. Zhu, J. und Paul, W. E., *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 247-62.
13. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. und Pillai, S., *Cellular and Molecular Immunology* 9. Aufl. 2018, Philadelphia: Elsevier.
14. Rink, L., Kruse, A. und Haase, H., *Immunologie für Einsteiger*. 2, Aufl. 2015, Berlin: Springer Verlag.
15. Chapman, N. M., et al., *mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated Treg subsets to protect tissue homeostasis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2095.
16. Takeuchi, A. und Saito, T., *CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 194.
17. Mueller, S. N., et al., *Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 137-61.
18. Bosselut, R. und Vacchio, M. S., *Preface. T-Cell Development*. Methods Mol Biol, 2016. **1323**: p. v-vi.
19. Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J. und Boyman, O., *Interleukin-2: Biology, Design and Application*. Trends Immunol, 2015. **36**(12): p. 763-777.
20. Radha, G. und Raghavan, S. C., *BCL2: A promising cancer therapeutic target*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017. **1868**(1): p. 309-314.
21. Vaeth, M., et al., *Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16258-63.
22. Bonelli, M., et al., *Helper T cell plasticity: impact of extrinsic and intrinsic signals on transcriptomes and epigenomes*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **381**: p. 279-326.
23. Yang, J. und Reth, M., *Receptor Dissociation and B-Cell Activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2016. **393**: p. 27-43.
24. Kurosaki, T., Shinohara, H. und Baba, Y., *B cell signaling and fate decision*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 21-55.

25. Gutzeit, C., Chen, K. und Cerutti, A., *The enigmatic function of IgD: some answers at last*. Eur J Immunol, 2018. **48**(7): p. 1101-1113.
26. Pieper, K., Grimbacher, B. und Eibel, H., *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
27. Hardy, R. R. und Hayakawa, K., *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 595-621.
28. Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E., *Taschenlehrbuch Histologie*. 6. Aufl. 2019, Stuttgart: Thieme Verlag.
29. Cunningham, A. F., et al., *B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 535.
30. Rothstein, T. L., et al., *Human B-1 cells take the stage*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1285**: p. 97-114.
31. Griffin, D. O., Holodick, N. E. und Rothstein, T. L., *Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70*. J Exp Med, 2011. **208**(1): p. 67-80.
32. Nutt, S. L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 160-71.
33. Wilmore, J. R., Jones, D. D. und Allman, D., *Protocol for improved resolution of plasma cell subpopulations by flow cytometry*. Eur J Immunol, 2017. **47**(8): p. 1386-1388.
34. Tung, J. W., et al., *Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6293-8.
35. Shaw, J. P., et al., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science. 1988. **241**: 202-205. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 4972-5.
36. Hermann-Kleiter, N. und Baier, G., *NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions*. Blood, 2010. **115**(15): p. 2989-97.
37. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
38. Vaeth, M., et al., *Store-Operated Ca(2+) Entry Controls Clonal Expansion of T Cells through Metabolic Reprogramming*. Immunity, 2017. **47**(4): p. 664-679 e6.
39. Klein-Hessling, S., et al., *NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8(+) T cells*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 511.
40. Macian, F., et al., *Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance*. Cell, 2002. **109**(6): p. 719-31.
41. Wherry, E. J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
42. Oukka, M., et al., *The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 295-304.
43. Yang, T. T., et al., *Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3892-904.
44. Lopez-Rodriguez, C., et al., *Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress*. Immunity, 2001. **15**(1): p. 47-58.
45. Mognol, G. P., et al., *Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2199.
46. Serfling, E., et al., *NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance*. Eur J Immunol, 2006. **36**(11): p. 2837-43.
47. Tarasova, E. O., Gaydukov, A. E. und Balezina, O. P., *Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission*. Biochemistry (Mosc), 2018. **83**(6): p. 674-689.
48. Okamura, H., et al., *A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4184-95.
49. Rothermel, B., et al., *A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8719-25.
50. Xiao, Y., et al., *Lack of NFATc1 SUMOylation prevents autoimmunity and alloreactivity*. J Exp Med, 2021. **218**(1).

51. Nayak, A., et al., *Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase*. J Biol Chem, 2009. **284**(16): p. 10935-46.
52. Gill, G., *Something about SUMO inhibits transcription*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 536-41.
53. Patra, A. K., et al., *An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development*. Nat Immunol, 2013. **14**(2): p. 127-35.
54. Clipstone, N. A. und Crabtree, G. R., *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 695-7.
55. Lau, C. S., et al., *2018 update of the APLAR recommendations for treatment of rheumatoid arthritis*. Int J Rheum Dis, 2019. **22**(3): p. 357-375.
56. Michalska-Bankowska, A., et al., *Clinical and molecular evaluation of therapy with the use of cyclosporine A in patients with psoriasis vulgaris*. Int J Dermatol, 2019. **58**(4): p. 477-482.
57. Hogan, W. J. und Storb, R., *Use of cyclosporine in hematopoietic cell transplantation*. Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 367S-371S.
58. Vaeth, M., et al., *Selective NFAT targeting in T cells ameliorates GvHD while maintaining antitumor activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(4): p. 1125-30.
59. Yu, H., van Berkel, T. J. und Biessen, E. A., *Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders*. Cardiovasc Drug Rev, 2007. **25**(2): p. 175-87.
60. Qian, Z., et al., *Structure-based optimization of a peptidyl inhibitor against calcineurin-nuclear factor of activated T cell (NFAT) interaction*. J Med Chem, 2014. **57**(18): p. 7792-7.
61. Masuda, E. S., et al., *NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2697-706.
62. Amasaki, Y., et al., *Distinct NFAT family proteins are involved in the nuclear NFAT-DNA binding complexes from human thymocyte subsets*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2324-33.
63. Jenkins, M. K., Schwartz, R. H. und Pardoll, D. M., *Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion*. Science, 1988. **241**(4873): p. 1655-8.
64. Gratiot-Deans, J., et al., *Bcl-2 expression during T-cell development: early loss and late return occur at specific stages of commitment to differentiation and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10685-9.
65. Neilson, J. R., et al., *Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 255-66.
66. Yoshida, H., et al., *The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 115-24.
67. Ranger, A. M., et al., *Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 125-34.
68. Hodge, M. R., et al., *Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 397-405.
69. Xanthoudakis, S., et al., *An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1*. Science, 1996. **272**(5263): p. 892-5.
70. Cante-Barrett, K., Winslow, M. M. und Crabtree, G. R., *Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 103-10.
71. Hathcock, K. S., et al., *The requirement for pre-TCR during thymic differentiation enforces a developmental pause that is essential for V-DJbeta rearrangement*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20639.
72. de la Pompa, J. L., et al., *Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum*. Nature, 1998. **392**(6672): p. 182-6.
73. Winslow, M. M., et al., *Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass*. Dev Cell, 2006. **10**(6): p. 771-82.
74. Skarnes, W. C., et al., *A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 337-42.

75. Aliprantis, A. O., et al., *NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3775-89.
76. Martinez, G. J., et al., *The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells*. Immunity, 2015. **42**(2): p. 265-278.
77. Hobeika, E., et al., *Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13789-94.
78. Sakaguchi, N., et al., *B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties*. EMBO J, 1988. **7**(11): p. 3457-64.
79. Copelan, E. A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
80. Sorrow, M. L., et al., *Long-term outcomes among older patients following nonmyeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced hematologic malignancies*. JAMA, 2011. **306**(17): p. 1874-83.
81. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Hämatopoetische Stammzelltransplantation und Zelluläre Therapie e. V., *LEITLINIEN zur allogenen Stammzelltransplantation: Konditionierung*. November 2020, zuletzt gesehen am 20.12.22]; URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/konditionierung/@@guideline/html/index.html>.
82. Passweg, J. R., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13696.
83. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Hämatopoetische Stammzelltransplantation und Zelluläre Therapie e. V., *LEITLINIEN zur allogenen Stammzelltransplantation: Graft-versus-Host Erkrankung, akut*,. Juli 2022, zuletzt gesehen am 20.12.22]; URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-akut/@@guideline/html/index.html>.
84. Ferrara, J. L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
85. Harris, A. C., et al., *International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*. Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(1): p. 4-10.
86. Glucksberg, H., et al., *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors*. Transplantation, 1974. **18**(4): p. 295-304.
87. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Hämatopoetische Stammzelltransplantation und Zelluläre Therapie e. V., *LEITLINIEN zur allogenen Stammzelltransplantation: Graft-versus-Host Erkrankung, chronisch*,. Juli 2022, zuletzt gesehen am 30.12.22]; URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-chronisch/@@guideline/html/index.html>.
88. Cooke, K. R., et al., *The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2017. **23**(2): p. 211-234.
89. Jiang, H., et al., *T Cell Subsets in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Tumor*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 761448.
90. Ferrara, J. L., Levy, R. und Chao, N. J., *Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 1999. **5**(6): p. 347-56.
91. 2019, h. w. o. c. d. o. g. g.-v.-h.-e.-c. g. h. i. h. l. E. V. M.
92. Hill, G. R., Krenger, W. und Ferrara, J. L., *Cytokine Dysregulation in Acute Graft-versus-Host Disease*. Hematology, 1997. **2**(6): p. 423-34.
93. Uri, A., et al., *During acute graft versus host disease CD28 deletion in donor CD8(+), but not CD4(+), T cells maintain antileukemia responses in mice*. Eur J Immunol, 2018. **48**(12): p. 2055-2067.

94. Edinger, M., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1144-50.
95. Trenado, A., et al., *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1688-96.
96. Bluestone, J. A., *The yin and yang of interleukin-2-mediated immunotherapy*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2129-31.
97. Koreth, J., et al., *Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2055-66.
98. Matsuoka, K., et al., *Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease*. Sci Transl Med, 2013. **5**(179): p. 179ra43.
99. Majumder, S., et al., *Rapid and Efficient Gene Editing for Direct Transplantation of Naive Murine Cas9(+) T Cells*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 683631.
100. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
101. Vogler, M., *BCL2A1: the underdog in the BCL2 family*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 67-74.
102. Nam, S. und Lim, J. S., *Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development*. Arch Pharm Res, 2016. **39**(11): p. 1548-1555.
103. Dietz, L., et al., *NFAT1 deficit and NFAT2 deficit attenuate EAE via different mechanisms*. Eur J Immunol, 2015. **45**(5): p. 1377-89.
104. Chuvpilo, S., et al., *Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 881-95.
105. Phuong, T. T., et al., *Positive feedback control between STIM1 and NFATc3 is required for C2C12 myoblast differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **430**(2): p. 722-8.
106. Man, K., et al., *Transcription Factor IRF4 Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection*. Immunity, 2017. **47**(6): p. 1129-1141 e5.
107. Miyakoda, M., et al., *Differential requirements for IRF4 in the clonal expansion and homeostatic proliferation of naive and memory murine CD8(+) T cells*. Eur J Immunol, 2018. **48**(8): p. 1319-1328.
108. Huber, M. und Lohoff, M., *IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision*. Eur J Immunol, 2014. **44**(7): p. 1886-95.
109. Tuzlak, S., et al., *The BCL-2 pro-survival protein A1 is dispensable for T cell homeostasis on viral infection*. Cell Death Differ, 2017. **24**(3): p. 523-533.
110. Hock, M., et al., *NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2345-53.
111. Ulleras, E., et al., *NFAT but not NF-kappaB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3081-9.
112. Zhou, B., et al., *Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10704-11.
113. Serfling, E., et al., *NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination*. Trends Immunol, 2006. **27**(10): p. 461-9.
114. Heyer, J., et al., *Inefficient termination of antigen responses in NF-ATp-deficient mice*. Immunobiology, 1997. **198**(1-3): p. 162-9.
115. Serfling, E., et al., *The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1498**(1): p. 1-18.
116. Huang, G. N., et al., *NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins*. Science, 2008. **319**(5862): p. 476-81.
117. Chen, J., et al., *Role of NFATx (NFAT4/NFATc3) in expression of immunoregulatory genes in murine peripheral CD4+ T cells*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3109-17.

118. Rengarajan, J., Tang, B. und Glimcher, L. H., *NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 48-54.
119. Peng, S. L., et al., *NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation*. Immunity, 2001. **14**(1): p. 13-20.
120. Hori, S., *c-Rel: a pioneer in directing regulatory T-cell lineage commitment?* Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 664-7.
121. Bettelli, E., Dastrange, M. und Oukka, M., *Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5138-43.
122. Fontenot, J. D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 329-41.
123. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 808-12.
124. Borde, M., et al., *Transcriptional basis of lymphocyte tolerance*. Immunol Rev, 2006. **210**: p. 105-19.
125. Walker, M. R., et al., *De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4103-8.
126. Poetschke, H. L., et al., *Cross-linking the TCR complex induces apoptosis in CD4+8+ thymocytes in the presence of cyclosporin A*. Dev Immunol, 1996. **5**(1): p. 1-15.
127. Bain, G., et al., *E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements*. Cell, 1994. **79**(5): p. 885-92.
128. Lin, H. und Grosschedl, R., *Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 263-7.
129. Nutt, S. L., et al., *Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 556-62.
130. Giampaolo, S., et al., *B cell development is critically dependent on NFATc1 activity*. Cell Mol Immunol, 2019. **16**(5): p. 508-520.
131. Miller, J. P., et al., *The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 705-11.
132. Samanta, D. N., et al., *B cell hyperresponsiveness and expansion of mature follicular B cells but not of marginal zone B cells in NFATc2/c3 double-deficient mice*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4797-802.
133. Bopp, T., et al., *NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 181-7.

7 Abkürzungsverzeichnis

ATG	Antithymozytenglobulin
BLI	Bioluminescence Imaging
BM	bone marrow-Kontrollgruppe
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CDR	Complementarity determining region
CRAC-Kanäle	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channels
CsA	Cyclosporin A
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DAG	Diacylglycerin
DBD	DNA-binding domain
ECP	extrakorporale Photophorese
FasL	Fas-Liganden
FDC	follikulären dendritischen Zelle
FKBP	FK-bindenden Protein
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-leukemia
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HvGD	Host-versus-Graft-Disease
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IR	irradiation control/Bestrahlungskontrolle
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
iTregs	induzierte Tregs
MAP	mitogenaktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
NES	nuclear export signal
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NHR	NFAT-homology region
NLR	NOD-like receptor
NLS	nuclear localization sequence
nTregs oder tTregs	natürliche Tregs oder thymische Tregs
OPSI	overwhelming post-splenectomy infection
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PRR	pathogen recognition receptor
pTregs	periphere Tregs
RHR	Rel-homology region
SMAC	supramolecular activation cluster
SP	serine-proline motife
SRR	serine-rich region
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAD	Transaktivierungsdomäne

TCGF	T-cell growth factor
T _{CM} -Zelle	zentrale T-Gedächtniszelle
TCR	T-Zellrezeptor
TD-Antigene	thymusabhängige Antigene
T _{eff}	T-Effektorzelle
T _{EM} -Zelle	T-Effektorgedächtniszelle
T _{FH} -Zelle	Follikuläre T-Zelle
TI-Antigene	thymusunabhängige Antigene
TLR	Toll-like-Rezeptoren
T _{RM} -Zelle	geweberesidente T-Gedächtniszelle
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
$\alpha\beta$ -TCR	TCR, bestehend aus α - und β -Untereinheit
$\gamma\delta$ -TCR	TCR, bestehend aus γ - und δ -Untereinheit

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „NFATc3 in der akuten GvHD“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “NFATc3 in acute GvHD” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die tatkräftige Unterstützung von vielen Seiten.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Doktormutter, Frau PD. Dr. Friederike Berberich-Siebelt für ihre stete Unterstützung, ihre Zeit und ihr offenes Ohr bei allen Problemen. Bei keiner Frage wurde ich allein gelassen und konnte immer auf ihren Rat zählen. Durch ihre geduldigen Erklärungen und hilfreichen Rückfragen brachte sie mir wissenschaftliches Arbeiten nahe. Ohne deine unübertroffene Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Den weiteren Mitgliedern meines Promotionskomitees, Herrn Professor Dr. Harald Wajant und Herrn Professor Dr. Andreas Beilhack danke ich für konstruktives Nachfragen und vor allem für die Zeit, die sie diesem Projekt entgegengebracht haben.

Auch bei Dr. Musga Qureischi und insbesondere Dr. Anika König möchte ich mich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in dieses komplexe Themenfeld, die Hilfe bei technischen Fragestellungen und der Laborarbeit im Allgemeinen bedanken. Euer Rat hat mir immer sehr geholfen!

Benjamin Lunz und Nadine Winter möchte ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche danken. Ohne euch wären vielen Projekte nicht realisierbar gewesen!

Besonders danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre und die jederzeit ein aufmunterndes Wort für mich bereithielten.