

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

**Analyse der NFATc1-Genexpression durch eGFP-BAC-Reportermäuse**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Matthias Hock  
aus Würzburg  
Würzburg, Februar 2013





Referent: Prof. Dr. rer. nat. Edgar Serfling

Koreferent: Prof. Dr. Albrecht Müller

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2013

Der Promovent ist Arzt.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren .....	1
1.1.1 Die Proteinstruktur der NFAT-Transkriptionsfaktoren.....	1
1.1.2 Wichtige Signalwege zur Regulation der NFAT-Faktoren .....	3
1.1.3 Die Aktivierung von Signalkaskaden .....	6
1.1.4 Der Faktor NFATc1 .....	7
1.2 Der IL-2-Promoter als Beispiel eines NFAT-Targets.....	9
1.3 NFAT-Faktoren und die immunologische Toleranz.....	10
1.5 Das <i>NFATc1</i> -Gen.....	11
1.5.1 Die Regulation von NFATc1 .....	11
1.5.2 Die Autoregulation von NFATc1/ $\alpha$ A .....	12
1.6 Protein- und Fluoreszenz-Eigenschaften des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP).....	13
1.7 Das eGFP-BAC Reporterkonstrukt.....	15
1.8 Das Funktionsprinzip des <i>Nfatc1-eGFP</i> -BAC Konstrukts .....	16
1.9 Fragestellung.....	17
<b>2. Material</b> .....	<b>18</b>
2.1 Allgemeine Materialien .....	18
2.2 Chemikalien.....	18
2.3 Instrumente.....	20

2.4	Enzyme/Kits.....	21
2.5	Antikörper für FACS .....	21
2.6	Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie .....	22
2.7	Oligonukleotide.....	22
2.8	Genmarker.....	23
2.9	Puffer und Lösungen .....	23
2.10	Zellkulturmedien.....	25
2.11	Mäuse.....	25
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1	Aufbereitung der Maus-Schwanzspitzen zur Genotypisierung.....	26
3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	26
3.3	DNA-Gelelektrophorese .....	27
3.4	Zellkultivierung.....	28
3.4.1	Isolation von Leukozyten .....	28
3.4.2	Isolation von T - Lymphozyten.....	28
3.4.3	Stimulation von Gesamt-Milz-Zellen .....	29
3.4.4	Stimulation von CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten .....	29
3.4.5	Mixed Lymphocyte Reaction (MLR).....	29
3.4.6	Restimulation von Gesamt-Milz-Zellen .....	30
3.5	Western Blot .....	30
3.5.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	30

3.5.2	Messung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	31
3.5.3	Standardisierung der Proteinkonzentrationen .....	31
3.5.4	SDS-PAGE .....	31
3.5.5	Western Blot und Antikörperfärbung.....	32
3.6	Semiquantitative RT-PCR .....	33
3.6.1	RNA-Extraktion .....	33
3.6.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und Beurteilung der RNA Qualität .....	33
3.6.3	Synthese von einsträngiger cDNA durch RT-PCR .....	34
3.7	“Fluorescence Activated Cell Sorting” (FACS) .....	34
3.7.1	FACS-Färbung von Zellmembran-Antigenen .....	34
3.7.2	FACS-Färbung von intrazellulären Zytokinen.....	35
3.7.3	FACS-Färbung mit Annexin V und Propidium Iodid .....	35
3.7.4	PKH26 Membranfärbung .....	36
3.8	Zellfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	36
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1	Die GFP-Expression der Reportermauslinien B6 NFATc1GFP BAC1-6..	38
4.2	Charakterisierung der GFP Population .....	39
4.2.1	Die GFP-negative Population besteht aus apoptotischen und nektrotischen Zellen.....	39
4.2.2	Die GFP-Expression zeigt keine Unterschiede zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen .....	41

4.3	FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz in T- und B- Zellen verschiedener Mauslinien .....	43
4.4	Die GFP-Expression der NFATc1-eGFP-Reportermäuse ist induzierbar und CsA-sensitiv.....	44
4.5.	Korrelation zwischen der Expression von NFATc1 und GFP in Gesamtmilzzellen und T-Lymphozyten .....	46
4.5.1	Korrelation der mRNA-Synthese von NFATc1 und GFP in Milzzellkultur .....	46
4.5.2	Korrelation der mRNA-Synthese von NFATc1 und GFP in T-Zellkulturen .....	47
4.5.3	Korrelation der Proteinsynthese von NFATc1 und GFP in Milzzellkulturen .....	49
4.5.4	Korrelation von NFATc1- und eGFP-Expression auf Einzel-Zellebene .....	50
4.6	Die Korrelation der GFP-Expression mit Lymphozytenaktivierung und Zytokinproduktion .....	52
4.6.1	Die GFP-Expression korreliert bei Primärstimulation von Milzzellen mit der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zytokinproduktion .....	52
4.6.2	Milzzellen zeigen bei Restimulation einen hohen Anteil an IL-2 Produzenten, aber keine Zunahme der GFP-Fluoreszenz .....	54
4.6.3	Die GFP-Expression im Kulturverlauf .....	55
4.7	Die Analyse der GFP-Expression in Subpopulationen von T-Lymphozyten. ....	56
4.7.1	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> nTregs zeigen eine stark abgeschwächte GFP-Induktion bei Stimulation mit $\alpha$ CD3/CD28 .....	56



4.7.2	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> iTregs zeigen eine stark abgeschwächte GFP-Induktion bei Stimulation mit $\alpha$ CD3/CD28 .....	58
4.7.3	Alloreaktive CD25 <sup>+</sup> und CD69 <sup>+</sup> T-Zellen zeigen eine erhöhte GFP Expression <i>in vitro</i> .....	59
4.7.4	TGF- $\beta$ inhibiert die Zunahme der GFP-Expression in aktivierten T-Zellen .....	60
4.8	Die GFP-Expression in Thymozyten .....	62
4.8.1	Thymozyten zeigen die schwächste mittlere GFP-Fluoreszenz ....	62
4.8.2	FACS-Analyse der GFP-Expression in CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> – Populationen aus Thymus und peripherem Blut.....	63
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
5.1	Bei Primärstimulation reflektiert die GFP-Expression die Induktion von NFATc1 .....	65
5.2	Fehlende Induktion von GFP bei Restimulation .....	68
5.3	NFATc1 und Apoptose .....	69
5.4	NFATc1 ist hoch exprimiert in CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> DN Thymozyten .....	70
5.5	Verminderte Expression von GFP in natürlich vorkommenden und induzierbaren regulatorischen T-Lymphozyten .....	71
5.6	TGF- $\beta$ inhibiert die Zunahme der eGFP-Fluoreszenz in T-Zellen .....	72
5.7	Perspektiven.....	73
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>



## **1. Einleitung**

### **1.1 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren**

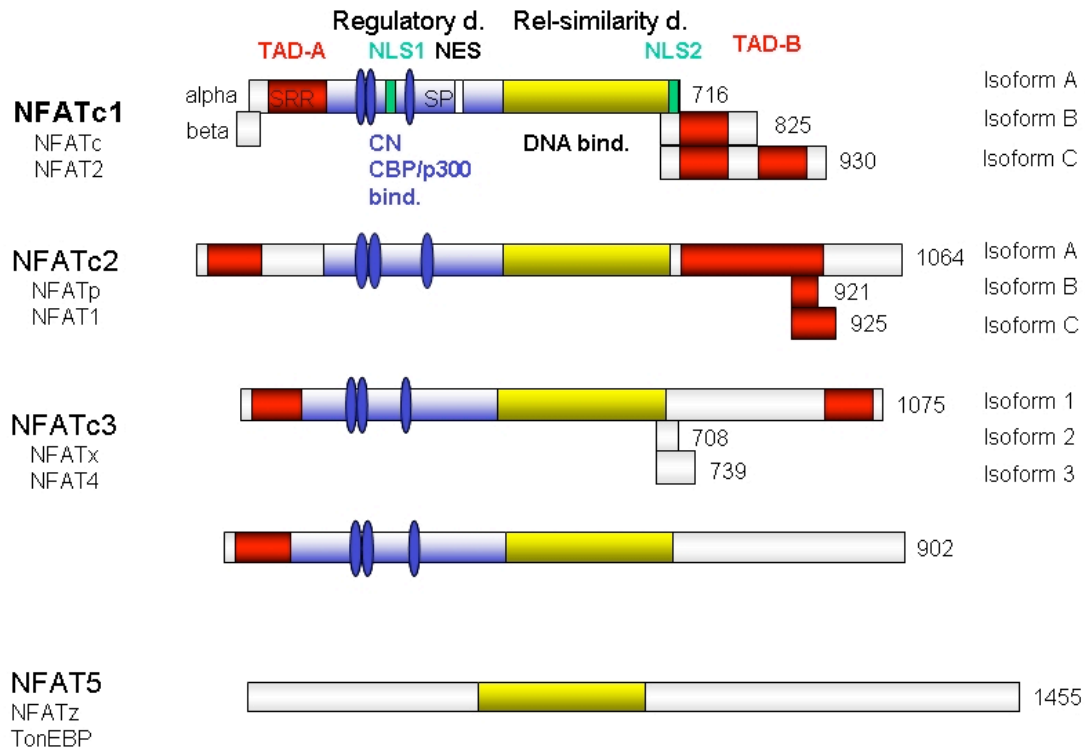
Die Mitglieder der Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren (NFATc1-c4, NFAT5) besitzen homologe DNA-Bindestellen (RSD) und werden über das Calcium/Calmodulin-System (NFATc1-c4) bzw. über Änderungen der Osmolarität (NFAT5) gesteuert. Vor allem im Immunsystem, aber auch bei der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und beim Knochenmetabolismus wird über Änderungen der Genexpression von NFAT die Physiologie dieser Organsysteme reguliert (zur Übersicht siehe Crabtree und Schreiber 2009).

#### **1.1.1 Die Proteinstruktur der NFAT-Transkriptionsfaktoren**

Wie viele Mitglieder anderer Proteinfamilien sind auch die der NFAT-Transkriptionsfaktoren („Nuclear Factor of activated T-cells“) durch Homologien funktionell relevanter Domänen gekennzeichnet (Rao et al., 1995). Während zwischen NFATc1 und 2 73 % der DNA-bindenden Domäne übereinstimmen, liegen zwischen NFATc1 und NFAT5/TonEBP nur 41-45 % an vergleichbaren Sequenzen vor (Lopez-Rodriguez et al., 1999). Dies ist vor allem auf die besondere Funktion von NFAT5 zurückzuführen (Miyakawa et al., 1999). Ein Überblick über die Struktur der NFAT-Faktoren ermöglicht die Gliederung der Proteine in drei konservierte Regionen mit wichtigen regulatorischen Funktionen (Abb.1). Neben der N-terminalen Region (NHR, NFAT homology region) liegt in der Proteinmitte ein aufgrund der Strukturhomologie zur Rel-Domäne von NF- $\kappa$ B-Faktoren als Rel-Similarity-Domain (RSD) bezeichneter Abschnitt. Wichtiger Bestandteil der NHR stellt ein Abschnitt mit hohen Konzentrationen an Serin- und Prolinresten (SP1/2, SRR1/2) dar, der zusammen mit der nukleären Lokalisationssequenz (NLS, Nuclear Localisation Signal) die regulatorische Region (RR, Regulatory Region) bildet. Dephosphorylierung dieser Aminosäuren durch die Calcium-Calmodulin-abhängige Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin führt zur Exponierung der NLS, während die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen, wie die c-Jun N-terminale-Kinase (JNK), Duale

spezifische Tyrosin-phosphorylierungsregulierte Kinasen (DYRK), und vor allem Casein Kinase 1 (CK1) und Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3) zum Verbleib im Zytoplasma bzw. zum Transport aus dem Kern führt (Klemm et al., 1997; Gwack et al. 2006). Die Aktivierung der Transkription erfolgt in erster Linie mit Hilfe der nicht konservierten Transactivation-Domäne (TAD) des N-Terminus, wobei die längeren Isoformen über eine zusätzliche, wenn auch schwache C-terminale TAD verfügen (Luo et al., 1996). Der Vergleich der DNA-bindenden Domänen von NFAT (RSD) und NF- $\kappa$ B (Rel-Domain) zeigt trotz der nur zwanzigprozentigen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen eine sehr ähnliche Tertiärstruktur (Wolfe et al., 1997), was jedoch Unterschiede im Bezug auf Regulation und Funktion beider Faktoren nicht ausschließt (zur Übersicht siehe Serfling et al., 2006). Die zentrale RSD wurde anhand der Interaktion mit einem NFAT-Bindemotiv aus dem IL-2 Promoter als DNA-Bindedomäne mit einer Größe von 300 Aminosäuren (AS) identifiziert, wobei der entscheidende Anteil, welcher die Nukleotidsequenz GGAAA bindet, auf eine Länge von 187 AS eingegrenzt wurde (Rao et al., 1995). Neben der DNA-Bindung ist die RSD Ort der Interaktion mit den wichtigen Transkriptionspartnern Fos/Jun (Chen et al., 1998), die am IL-2 Promoter und an mehreren weiteren Promotoren die NFAT-Aktivität positiv unterstützen. Inhibitorisch wirkt sich dagegen die Interaktion mit dem Repressor ICER aus. Dieser ist in der Lage, direkt an die RSD zu binden und über NFAT/ICER-Komplexe die Zytokinexpression zu verhindern (Bodor et al., 1998). Der konservierte C-Terminus spielt eine wesentliche Rolle bei der Bildung verschiedener Isoformen durch alternatives Splicing unter Verwendung zweier poly-A Sequenzen und hat darüber hinaus wichtige regulatorische Funktionen (Chuvpilo et al., 1999). So erfolgt die Feinabstimmung der Transkription von NFAT-Zielgenen u.a. durch Sumoylierung des C-Terminus der langen NFATc1/C Isoform. Dies erfolgt durch Assoziation mit Ubc9-A, einem SUMO-konjugierendem Enzym an den Modifizierungsstellen (Aminosäurereste 702 und 914) beim Menschen. Die kurze Isoform NFATc1/A verfügt dagegen nur über die schwache Bindestelle an Position 349. Die Bindung von sumoyliertem NFATc1 mit Histondeacetylasen am IL-2 Promoter führt zu einer verminderten IL-2 Produktion, zum

anderen zur verstärkten Synthese von IFN- $\gamma$  und IL-13, eventuell als Folge der Dissoziation inhibierender Transkriptionspartner (Nayak et al., 2009).



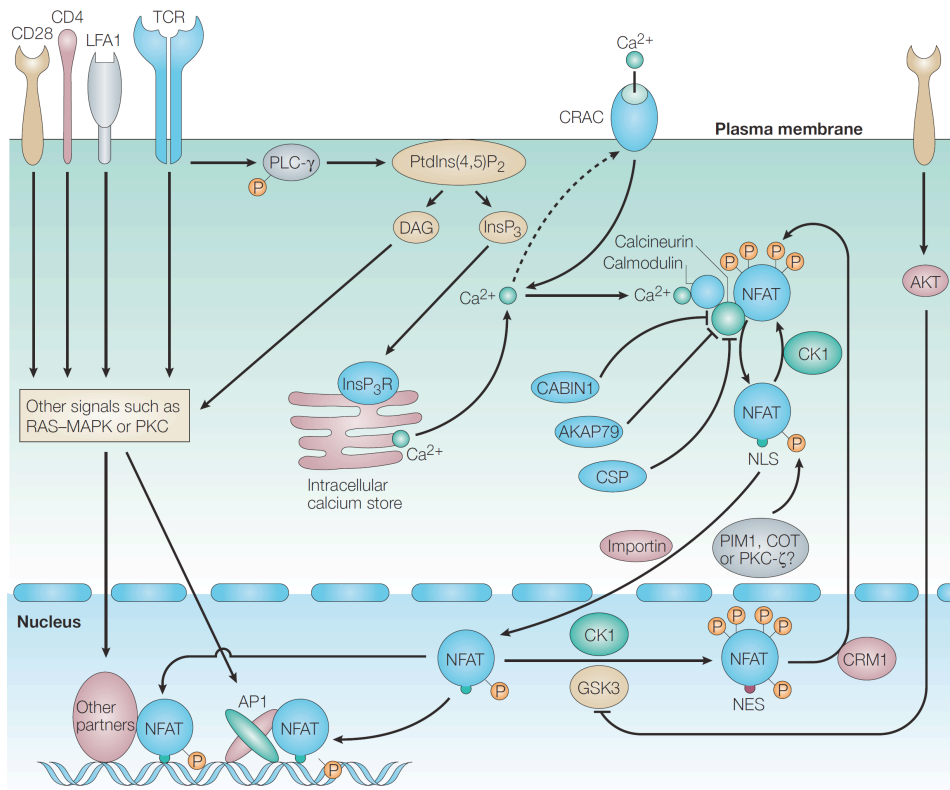
**Abb.1 Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (mod. nach Serfling et al., 2000).** NFATc1 (NFAT2), NFATc2 (NFAT1), NFATc3 (NFAT4), NFATc4 (NFAT3) und NFAT5 (TonEBP) zeigen hoch konservierte Regionen. Darstellung funktionell relevanter Bereiche anhand von NFATc1. Die N-terminale „Regulatory Domain“ enthält v.a. die Serin- und Prolinreichen AS-Sequenzen, (SP1/2, SRR1/2) als Substrat für Calcineurin CBP/p300 bzw. Proteinkinasen (GSK3, CK1, p38 u.a) sowie das NLS (Nuclear Localisation Signal). Die zentrale „Rel-similarity Domain“ (RSD) dient der DNA-Bindung sowie der Interaktion mit Fos/Jun (AP-1). Der C-Terminus zeigt unterschiedliche Splice-Varianten in Abhängigkeit der Isoformen NFATc1/A/B/C.

### 1.1.2 Wichtige Signalwege zur Regulation der NFAT-Faktoren

Der zentrale Regulator der NFAT-Transkriptionsfaktoren ist die Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin (CN) (Beals et al., 1997). Nach Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) durch Antigenrezeptoren katalysiert diese die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG)

und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). Letztes bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums und führt durch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> zum Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytosol. Dieses kurzzeitige Kalziumsignal stellt jedoch keinen adäquaten Stimulus zur Translokation von NFAT dar. Vielmehr ist eine persistierende hohe Ca<sup>2+</sup>-Konzentration notwendig, die durch den Einstrom extrazellulären Kalziums über CRAC-Kanäle vermittelt wird (Timmerman et al., 1996). Die Anlagerung von insgesamt 4 Ca<sup>2+</sup>-Ionen an die Helix-Loop-Helix Motive (EF1-4) von Calmodulin (CM) führt zu Konformationsänderung und neben der Interaktion mit verschiedenen Kinasen auch zur Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin (zur Übersicht siehe Al-Shanti et al., 2009). Die Bindung erfolgt an der katalytisch wirksamen Untereinheit der A-Domäne von Calcineurin (CNA), wobei weitere 4 Ca<sup>2+</sup>-Ionen an die B-Domäne (CNB) binden und zur Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>/CM/CN-Komplexes führen (Klee et al., 1998). Pharmakologisch stellt diese Untereinheit den Angriffspunkt für Immunsuppressiva dar. Komplexe aus Cyclosporin A (CsA) bzw. FK506 mit den jeweiligen Rezeptoren, Cyclophilinen bzw. FK506-Binding-Proteinen (FK506 BP) binden diese Untereinheit des Heterodimers und hemmen spezifisch die enzymatische Aktivität von Calcineurin (Siekierka et al., 1989; Wei Li et al., 1993). Nach der Bindung des aktivierten Calcineurins an konservierte AS-Sequenzen (<sup>110</sup>SPRIEITPS<sup>118</sup>) im N-Terminus der NFAT-Transkriptionsfaktoren (s. Abb.2) erfolgt die Dephosphorylierung von 13 der 14 SP- und SRR-Motive (Garcia-Cozar et al., 1998; Aramburu et al., 1998; Okamura et al., 2000). Damit verbunden sind die Maskierung der NES, die „Freilegung“ der NLS und die Translokation von NFAT in den Nukleus. Ein komplexes Zusammenspiel ergibt sich aus der Aktivität der Proteinkinasen JNK, p38, DYRK, GSK3, CK1, die sowohl im Zytosol die Phosphorylierung aufrecht erhalten, und somit Calcineurin antagonisieren, als auch bei Lokalisation in den Kern den Export von NFAT einleiten. Signale des T-Zell-Rezeptors (TCR) führen über den PI<sub>3</sub>K/Akt-Signalweg zur Phosphorylierung und Inhibierung dieser Enzyme. Neben dem Synergismus von AP-1- und NFAT-Proteinen in der DNA-Bindung übt der Ras/Raf/Erk-Signalweg durch die Phosphorylierung der N-terminalen TAD und der dadurch

vermittelten Rekrutierung von Coaktivatoren, wie CBP/p300, weiteren positiven Einfluss auf die NFAT-Aktivität aus (Avots et al., 1999).



**Abb.2 Signalwege zur Aktivierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten (Macian et al., 2005).** Die Aktivierung des TCR führt zur Phosphorylierung der Phospholipase C-γ1 (PLC-γ1) und zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5,-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>). Das relativ schwache Ca<sup>2+</sup>-Signal aus dem Endoplasmatischen Retikulum wird durch CRAC-vermittelten Einstrom extrazellulären Kalziums verstärkt und führt über Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Komplexe zur Aktivierung von Calcineurin. Inhibitorischen Einfluss üben Calcineurin-binding-Protein 1 (CABIN1), Calcipressin (CSP) und das A-Kinase-Anker-Protein 79 (AKAP79) auf die Serin/Threonin-Phosphatase aus. Dephosphorylierung von NFAT und „Freilegung“ der Nukleären Lokalisationssequenz (NLS) vermitteln die Translokation über Importine und die DNA-Bindung zusammen mit Transkriptionspartnern, wie Jun/Fos (AP-1). Die Phosphorylierung von NFAT erfolgt im Zytoplasma bzw. Nukleus durch mehrere Proteinkinasen, wie Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), Casein Kinase 1 (CK1) u.a..

### 1.1.3 Die Aktivierung von Signalkaskaden

*In vitro* imitieren  $\alpha$ CD3/CD28 Antikörper die physiologische Stimulatoren des TCR-Komplexes. *In vivo* erfolgt die Präsentation kurzer Peptidantigene über MHC I/II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen (APC). Dabei kommen den verschiedenen Komponenten des TCR-Komplexes unterschiedliche Aufgaben zu. Die Antigenerkennung erfolgt über den variablen Abschnitt der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten des TCRs, während der konstante Anteil die Transmembrandomänen bildet und Sulfidgruppen zur gegenseitigen kovalenten Verbindung enthält. Zur Signaltransduktion liegen assoziierte CD3-Ketten vor, von denen die  $\zeta$ -Ketten die wichtigsten sind. Die zytoplasmatische Komponenten der CD3-Ketten verfügen über ITAMS („Immuno-receptor tyrosine-based activation motifs“), welche durch die Tyrosinkinase Lck, bei Interaktion mit MHC II-Molekülen phosphoryliert werden und ZAP-70 Kinasen aktivieren. Davon ausgehend werden drei Hauptsignalwege initiiert. Zum einen erfolgt über die Aktivierung der PLC- $\gamma$ 1 die Kalzium-vermittelte Translokation von NFAT in den Kern. Überwiegend durch kleine GTP bindende Protein (Ras, Rac) und MAP-Kinasen werden die Transkriptionsfaktoren Fos und Jun (AP-1) aktiviert. Der TCR-Komplex steht in enger Verbindung zu CD28-Molekülen, die als Kostimulatoren über die Bindung an die Liganden B7-1 bzw. B7-2 von APCs einen wichtigen Anteil zur Verstärkung der NFAT-Induktion in T-Zellen leisten (Zur Übersicht: Weiss und Littmann, 1994; Acuto und Michel, 2003; Nurieva et al., 2007). Eine weitere Stimulationsmöglichkeit bietet das karzinogen wirkende Phorbolster TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat, Tumor promoting Agent), welches direkt membranständige Proteinkinasen C (PKC) und damit AP-1 über die Ras/Raf/Erk-Kaskade aktiviert (Castagna et al., 1982). Ionomycin besitzt als Stoffwechselprodukt von *Streptomyces globatus* neben der synergistischen Wirkung an der PKC einen hydrolytischen Effekt, der zur verstärkten Freisetzung von  $IP_3$  und damit zum Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt (Chatila et al., 1989). Die Kombination aus TPA/Ionomycin stellt einen „gängigen“ pharmakologischen Stimulus für Lymphozyten dar. Eine weitere wichtige Signalkaskade, die durch TCR-Stimulierung ausgelöst wird, ist



die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Faktoren, die wie NFATs für die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten wichtig sind.

#### **1.1.4 Der Faktor NFATc1**

Die strukturellen Homologien von NFATc1-4 implizieren bereits funktionelle Überlappungen der Faktoren, wobei diese wichtige Aufgaben sowohl innerhalb als auch außerhalb des Immunsystems erfüllen. Bis auf wenige Ausnahmen äußert sich die Inaktivierung eines NFAT-Gens (NFAT<sup>-/-</sup>) in einem relativ milden Phänotyp der Maus. NFATc2<sup>-/-</sup> Mäuse eine altersabhängige Zunahme an Monozyten in frisch isolierten Milzen, wobei trotz Hyperproliferation und Splenomegalie das Verhältnis von CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und die Zahl an B-Zellen nicht wesentlich verändert war. Ebenso liegen bei der Produktion von IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  in T-Zellen nur leichte Abweichungen vor. Allerdings unterliegt die IL-4 Produktion einer deutlichen Dysregulation. So zeigt sich ein initialer IL-4 Mangel bei Restimulation, dagegen eine IL-4 Überproduktion sowie Eosinophilie im Rahmen einer überschießenden Th<sub>2</sub>-Aktivität (Xanthoudakis et al., 1996; Hodge et al., 1996). Während die Deletion von NFATc2 keinen Einfluss auf die Thymusentwicklung hat, werden Defekte bei NFATc3<sup>-/-</sup> Mäusen in einer 3-fach verminderten Organgröße sowie einer reduzierten Zahl CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelpositiver (DP) Zellen deutlich. Letzteres ist die Folge einer gestörten positiven Selektion, was sich in einer verstärkten Aktivierung peripherer T-Zellen widerspiegelt (Oukka et al., 1998). Der auffälligste Phänotyp ist bei Defektmutationen von NFATc1 zu beobachten. NFATc1<sup>-/-</sup> Embryonen sterben zwischen dem 13,5 und 17,5 Tag der Embryonalentwicklung als Folge einer fehlenden Entwicklung der Aorten- und Pulmonalklappen und eines proximalen Ventrikelseptumdefekts. NFATc1 wird während der Organogenese selektiv im Endothel von Mäusen hoch exprimiert (Tag 8,5 bis 12,5) und hat wesentlichen Einfluss auf die Herzentwicklung (Ranger et al., 1998). Wichtige Sequenzen für diese komplexe gewebsspezifische Regulation von NFATc1 in Vorläuferzellen der Gefäßklappen liegen im 1. Intron in Form von NFATc1- und Hox-Bindestellen vor. Erstere sind verantwortlich für die Autoregulation der NFAT-Expression, letztere verhindern die Aktivierung dieses Enhancers in anderen Zelltypen

(Zhou et al., 2004). Durch Bildung einer NFATc1<sup>-/-</sup>/RAG-1<sup>-/-</sup> Chimäre konnte der letale Effekt der NFATc1-Deletion umgangen werden (Yoshida et al., 1998). Die phänotypische Analyse ergab eine stark reduzierte Zahl an CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP Thymozyten, wobei der Einfluss von NFATc1 auf die T-Zellreifung durch veränderte Verhältnisse an CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>low</sup> und CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> DN Zellen deutlich wird. Periphere T-Lymphozyten mit NFATc1-Defekt zeigen bei vergleichbarer IL-2 Produktion nach Stimulation nur 70 % der Proliferationsraten der Wildtypkontrollen. Ebenso unbeeinflusst ist die Differenzierung in Th<sub>1</sub>-Zellen und die Expression von IFN-γ und TNF-β, während Th<sub>2</sub>-Zellen weniger IL-4 und IL-6 sezernieren. Um überlappende Effekte der Transkriptionsfaktoren zu verhindern wurde eine NFATc2<sup>-/-</sup>/NFATc3<sup>-/-</sup> Doppelknock-out (DKO) Mutante erstellt. Hier zeigten sich im Rahmen einer überschießenden Th<sub>2</sub>-Reaktion neben offensichtlichen Defekten, wie Lymphadenopathie, Splenomegalie, Pneumonitis und allergischer Blepharitis, extrem hohe Th<sub>2</sub>-Zytokinspiegel (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) bei Stimulation von T-Zellen, während die Produktion von Th<sub>1</sub>-Zytokinen (IFN-γ, IL-2, TGF-β) vermindert war (Ranger et al, 1998). Auffällig waren vor allem die konstitutive Aktivierung und Dominanz von NFATc1 im Kern der DKO-T-Zellen sowie die fehlerhafte Expression des Fas-Liganden (CD95). Die Kreierung von NFATc1<sup>-/-</sup>/NFATc2<sup>-/-</sup> DKO-Mäusen erfolgte ebenfalls auf Basis von RAG-1<sup>-/-</sup> Mutanten, wobei der Immundefekt durch Repopulation des Knochenmarks mit fetalen Leberzellen ausgeglichen wurde (Peng et al., 2001). Während Proliferation und Regulation von Oberflächenmarkern, wie von CD69 und CD62L, den Daten der Kontrollpopulation entsprachen, zeigten sich gravierende Defizite in der Effektorfunktion von T-Zellen. Sowohl die Produktion der Th<sub>1</sub>-Zytokine IL-2, TNF-α und IFN-γ, als auch der Th<sub>2</sub>-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 im Rahmen der Th<sub>2</sub>-Antwort waren stark reduziert, desgleichen die Expression des CD40- und Fas-Liganden (CD95). Diese „Knock-out“ Experimente lassen sowohl spezifische Funktionen einzelner Faktoren, als auch eine überlappende Wirkung auf Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten vermuten. Mögliche Hinweise auf gegensätzliches Verhalten zeigten sich in der starken Expression von NFATc1 bei Stimulation von T-Zellen, während die

Expression von NFATc2 durch Stimulation kaum beeinflusst wird (Ranger et al., 1998).

## 1.2. Der IL-2-Promoter als Beispiel eines NFAT-Targets

In T-Lymphozyten werden eine Vielzahl von Promotoren, meist ausgestattet mit mehreren Bindestellen, von den Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie reguliert. Neben dem IL-2 Gen als prominentesten Vertreter regulieren die NFAT-Faktoren die Expression weiterer Zytokine, wie von IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Serfling et al., 2000; Rao et al., 1997) sowie von Rezeptoren, wie dem CD-40-Liganden (Tsitsikov et al., 1994) oder den Fas-Liganden (CD95) in aktivierten T-Zellen (Latinis et al., 1997). Innerhalb von 1-2 h nach Aktivierung von T-Effektorzellen durch Antigene und Kostimulatoren kann bereits die mRNA von IL-2 nachgewiesen werden. Zur Regulation des IL-2 Promoters liegen insgesamt fünf NFAT-Bindestellen im Bereich von -45 bp bis -280 bp (Duran et al., 1988; Shaw et al., 1988; Rooney et al., 1995) vor. Von diesen tragen u.a. die proximalen (-135) und distalen (-280) purinreichen Sequenzen (Pu-b<sub>p/d</sub>) zur NFAT-vermittelten und somit CsA/FK 506-sensitiven Induktion der IL-2 Expression bei (Serfling et al., 1991). Beide stellen als ARRE-1/2 (Antigen receptor-responsive element), ebenso wie das CD28RE (CD28 Responsive element) (-160) Bindestellen für NFAT-Proteine mit anderen Transkriptionsfaktoren dar. So unterstützen sich NFAT- und AP-1-Proteine gegenseitig bei Bindung an die DNA. Der Transkriptionsfaktor Oct bindet zwar auch an das Pu-b<sub>d</sub> - Element, beeinflusst jedoch nicht die DNA-Bindung von NFAT- bzw. AP-1-Faktoren (Rooney et al., 1995). Wie AP-1 bindet auch FoxP3 alleine nur mit schwacher Affinität an ARRE-2, während durch die Interaktion mit der RHD von NFAT ein stabiler FoxP3-NFAT-DNA-Komplex entsteht, über den FoxP3 supprimierenden Einfluss auf die NFAT-Aktivität am IL-2 Promoter ausüben kann. Sowohl bei Interaktion mit AP-1 als auch FoxP3 kontaktiert NFAT stets die Nukleotidsequenz GGAAA innerhalb des Bindungsmotivs (Wu et al., 2006). Der Einfluss der kostimulatorischen Signale des CD-28 Rezeptors wird bei Mutationen im Bereich von -160 deutlich. Homologe Sequenzen finden

sich in den Promotern von IL-3 und GM-CSF und sind für den positiven Effekt des CD28-Signals auf die Promoteraktivität, vermittelt über AP-1/NFAT, verantwortlich (Fraser und Weiss, 1992).

### **1.3 NFAT-Faktoren und die immunologische Toleranz**

Während der Mechanismus der zentralen Toleranz im Rahmen der negativen Selektion im Thymus abläuft und durch die Präsentation von körpereigenen Antigenen vermittelt wird, findet die Induktion der peripheren Toleranz in den übrigen lymphatischen Organen statt. Der Prozess der „Anergy“ wird dabei über professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) vermittelt und führt zur funktionellen Inaktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten durch ein überwiegend TCR-vermitteltes  $Ca^{2+}$ -Signal bei fehlender Kostimulation (Schwartz, 2003; Baine et al., 2009). Im in vitro Modell kann dies über die Stimulation von T-Lymphozyten mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern imitiert werden. So können bei Überexpression von NFATc1/C und NFATc2 in T-Zellen unter diesen Bedingungen hohe Apoptoseraten beobachtet werden, während dies bei Überexpression NFATc1/A nicht der Fall ist (Chuvpilo et al., 2002). Einfluss auf einen weiteren Mechanismus der peripheren Toleranz kann über die Regulation des Fas-Liganden (CD95Ligand) durch NFATc1/AP-1 Bindestellen am Promoter des CD95Ligand-Gens (Latinis et al., 1997) ausgeübt werden. Die Interaktion von CD95-CD95Ligand führt über AICD (Activation induced cell death) zur Apoptose. Eine weitere Form der immunologischen Suppression basiert auf der Aktivität regulatorischer T-Zellen (Tregs), die als  $CD25^+CD4^+FoxP3^+$  T-Lymphozyten charakterisiert sind. Die Rolle von FoxP3 als Schlüsselgen der Treg-Funktion wird durch Defektmutationen deutlich, die in Mäusen zum Tod innerhalb weniger Wochen nach Geburt führen (Brunkow et al., 2001) und im Menschen Ursache des IPEX-Syndrom (Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome) sind (Ochs et al., 2005). Weitere Eigenschaften von Tregs liegen in der fehlenden IL-2-, IL-4- und IFN $\gamma$ -Produktion bei Restimulation sowie in der konstitutiven Expression von CTLA-4 (Chikuma et al., 2003; Rudd et al., 2009) begründet. Die Rolle von

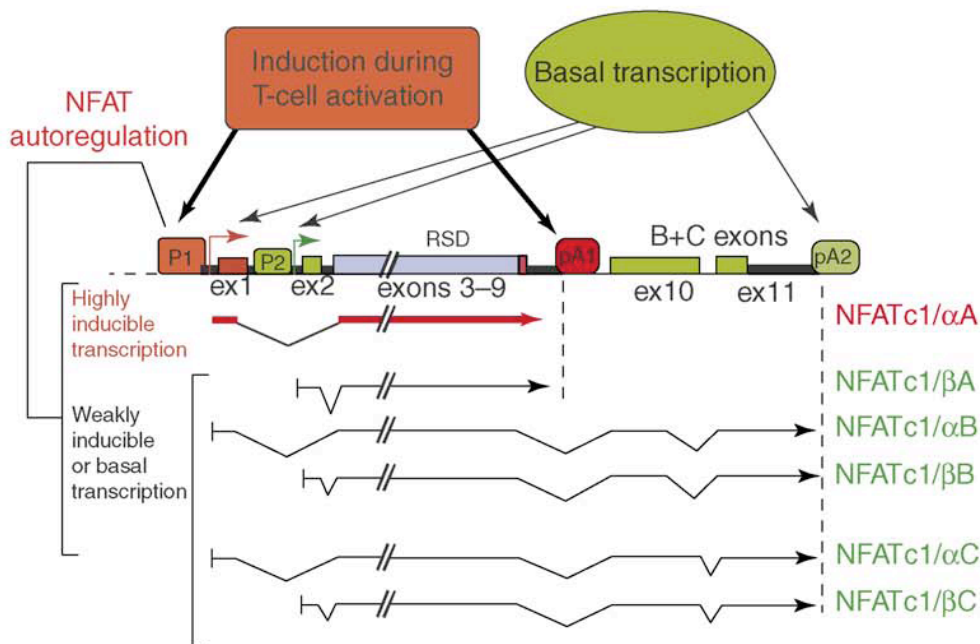
NFAT - im Zusammenhang mit der Expression dieser Gene - wird bei Mutationen der NFAT-FoxP3 Interaktionsstellen deutlich, wodurch der inhibitorische Einfluss von FoxP3 auf die IL-2 Expression aufgehoben wird bzw. die Expression von CTLA-4 verhindert wird (Wu et al., 2006). NFAT hat somit je nach Interaktionspartner, AP-1 oder FoxP3, positiven oder negativen Einfluss auf die Effektorfunktion von T-Lymphozyten.

## **1.5 Das *NFATc1*-Gen**

### **1.5.1 Die Regulation von *NFATc1***

Der humane und murine *NFATc1*-Genlocus befindet sich jeweils auf Chromosom 18 und umfasst bei einer Gesamtlänge von ca. 150 kb DNA 11 Exone, die zwei Promotoren P1 und P2 sowie zwei Polyadenylierungssignale pA1 und pA2 (s. Abb. 3) (Chuvpilo et al., 2002; Serfling et al., 2006). Die Promotoren P1 und P2 sind im 5'-Bereich von Exon 1 und 2 lokalisiert und durch ein Intron von 4 kb von einander getrennt. Als charakteristisches Merkmal regulatorisch bedeutsamer DNA-Sequenzen wurden in beiden Promotoren zahlreiche CpG-Inseln als Ansatzstellen für DNA-Methylierung gefunden. Während Zellen des Nierenparenchyms mit niedriger *NFATc1*-Aktivität hypermethylierte und somit inaktivierte Anteile zeigten, waren die Sequenzen in T-Effektorzellen vollständig demethyliert. Im 5'- Bereich des Gens wurden außerdem DNase I-hypersensitive Chromatin-Stellen identifiziert (HSS), von denen HSS3 als Enhancer die P1-Aktivität verstärkt (Chuvpilo et al., 2002). Insgesamt sind im *NFATc1*-Gen 6 Isoformen kodiert. Exon1 (44 AS) und Exon2 (27 AS) kodieren für das  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ - Peptid. Während P2 vor allem in ruhenden Lymphozyten aktiv ist und zusammen mit dem distalen pA2-Signal die Transkription der langen Isoformen *NFAT1 $\beta$ B/ $\beta$ C* reguliert, wird P1 in aktivierten Zellen induziert und führt dort zur starken Synthese von *NFATc1/ $\alpha$ A*. Das Transkriptionseende wird in diesem Fall durch die proximale pA1-Sequenz, am 3'-Ende von Exon 9, bestimmt. Die beiden langen Isoformen B und C

unterscheiden sich im C-Terminus (128 AS bzw. 246 AS), der durch alternatives Splicing entsteht (Chuvpilo et al., 2002; Serfling et al., 2006).



**Abb.3 Der *NFATc1*-Genlokus (Serfling et al., 2006).** Der *NFATc1*-Genlokus wird von den Promotoren P1 und P2 sowie den Polyadenylierungssignalen pA1 und pA2 flankiert. Bei T-Zell Aktivierung wird vor allem *NFATc1/αA* hoch exprimiert, während die übrigen Isoformen vor allem bei basaler Transkription entstehen.

### 1.5.2 Die Autoregulation von *NFATc1/αA*

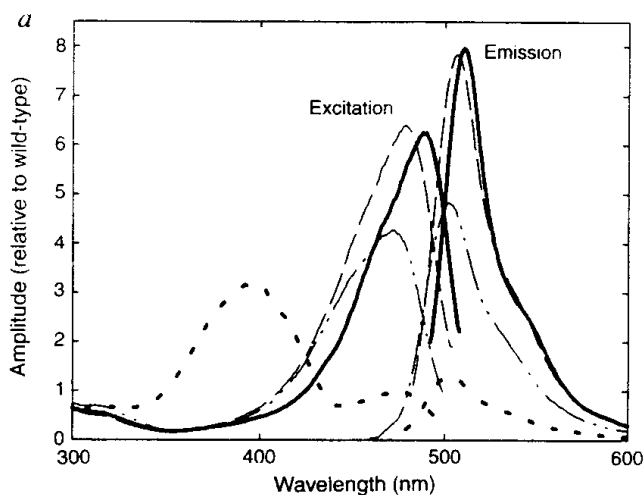
Die mehr als 15-fache Induktion der *NFATc1/αA*-RNA-Bildung - bei Stimulation von T-Effektorzellen im Vergleich zur weniger als 5-fachen Zunahme der mRNA-Menge der langen Isoformen (Chuvpilo et al., 2006) - beruht auf dem Mechanismus einer positiven Autoregulation durch Bindung von NFAT an den *NFATc1*-P1-Promoter. Neben Bindestellen verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie GATA, NF-κB und CREB, enthält der P1-Promoter auch zwei NFAT-Bindestellen, darunter eine starke, tandemförmige  $NFAT_{\text{tand}}$ -Bindestelle (Position -675) und eine proximale an Position -90. Mutationen beider Bindestellen führten zum Verlust der P1-Aktivität. Mit Luciferasekonstrukten verschiedener Länge konnte gezeigt werden, dass die

wichtigsten regulatorischen Elemente im proximalen 0,8 kb Segment des P1-Promoters liegen. Diese induzierten bei unterschiedlichen Stimulationen eine sehr ähnliche Genaktivität, jedoch fehlte eine Induktion des P1-Promoters bei Stimulation mit TPA+Iono (Chuvpilo et al., 2002). Dieser Gegensatz zur starken P1-Induktion im *Nfatc1*-Gen lässt weitere wichtige regulatorische Domänen außerhalb der Promoterregion vermuten. Während *NFATc2* *in vitro* entscheidend an der NFATc1-Synthese beteiligt ist, ist ein Defekt der *Nfatc1*-Induktion in *NFATc2*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zu beobachten. Dieser offenbare Widerspruch könnte durch die kompensatorisch erhöhte NFATc1/AP-1 Aktivität begründet sein (Zhou et al., 2002).

## 1.6 Protein- und Fluoreszenz-Eigenschaften des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP)

Als Osamu Shimomura 1962 erstmals das Protein Aequorin aus dem Fluoreszenzsystem der Qualle *Aequora victoria* extrahierte, charakterisierte er es als das bisher einfachste Fluoreszenzsystem, das *in vitro* unter Ca<sup>2+</sup>-Einfluss zur Emission von blauem Licht angeregt wurde. Diese Emission unterschied sich vom grünlichen Licht der Qualle (Shimomura et al., 1962). In weiteren Analysen zeigte sich, dass innerhalb des Fluoreszenzsystems ein Ca<sup>2+</sup>-vermittelter Energietransfer von Aequorin, dem Blau-fluoreszierendes Protein (BFP) (Emissionsmaximum von  $\lambda_{\max(\text{BFG})}=470$  nm), auf GFP (Exzitationsmaximum:  $\lambda_{\max(\text{GFG})}=460$  nm, Emmisionsmaximum:  $\lambda_{\max(\text{GFG})}=508-515$  nm) stattfand (Morise et al., 1974). 1994 gelang erstmals Martin Chalfie und Kollegen die heterologe Expression von GFP in *E. coli* und *Caenorhabditis elegans*. Seit der Sequenzierung der cDNA (Prasher et al., 1992) findet GFP vielfältigste Anwendung in molekularbiologischen Studien zur Genexpression sowie zur Interaktion von Proteinen. Durch zahlreiche Abwandlungen der Gensequenz wurden die Fluoreszenzeigenschaften den technischen Anforderungen bzw. den physiologischen Gegebenheiten in Säugetierzellen angepasst, was unter anderem zur Entwicklung des eGFP (enhanced GFP) führte (Helm et al., 1995; Thastrup et al., 1995). Für die Entdeckung, Klonierung

und Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften von GFP erhielten Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien den Chemie-Nobelpreis 2008. Das Wildtyp-GFP besitzt ein Molekulargewicht von 26,9 kDa und besteht aus 238 AS, die mit insgesamt 11  $\beta$ -Faltblatt-Strängen ein fassförmiges Protein bilden, das im Inneren eine  $\alpha$ -Helix-Kette enthält (Ormö et al., 1996). Dieser Anteil enthält das eigentliche Fluorophor (4-(p-Hydroxybenzyliden)-5-imidazolinon), welches aus einer  $^{65}\text{Ser-Tyr-Gly}^{67}$  Sequenz besteht und durch spezielle posttranslationale Modifikationen, in Form von Ringbildung, Dehydratation und Oxidation, autokatalytisch kontrolliert wird (Heim et al., 1994). Die Tatsache, dass die Fluoreszenz allein auf der Proteinstruktur und damit der genetische Information des 717 bp großen GFP-Gens beruht, macht es zu einem universellen Marker, der unabhängig vom Organismus der Qualle funktioniert (Tsien et al., 1998). Natives GFP hat zwei Absorptionsmaxima im ultravioletten und blauen Spektralbereich, d.h. bei 395 nm und 475 nm, wobei letzterer nur eine schwache GFP-Emission hervorruft. Das durch Punktmutationen entstandene eGFP zeigt eine sechsfach stärkere Fluoreszenz-Intensität (Abb.4).

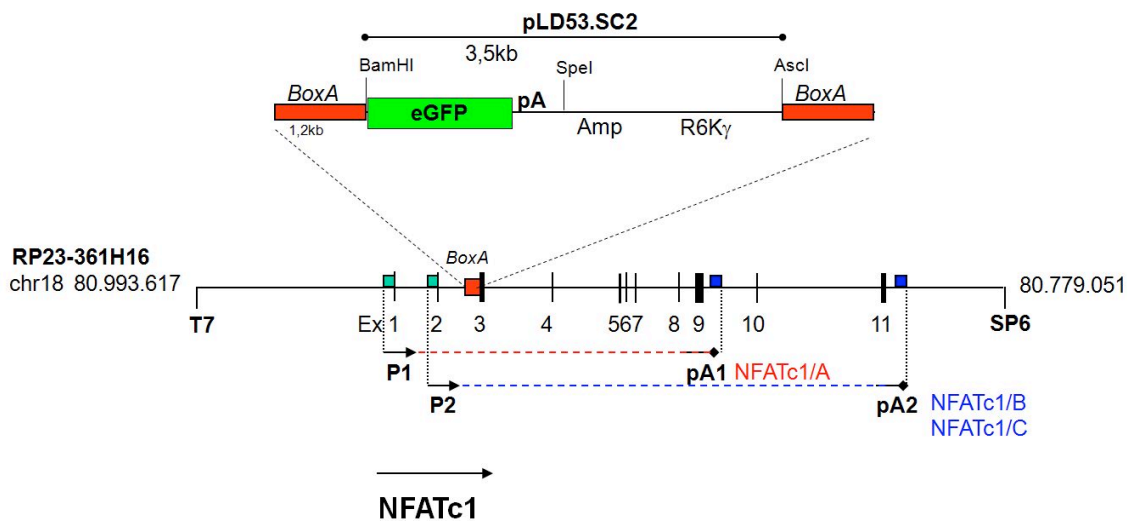


**Abb.4 Beispiele zum Einfluss von Punktmutationen auf das Wellenspektrum von GFP (Heim et al., 1995).** Exzitations- und Emissions-Spektrum von Wildtyp-GFP (gepunktet), sowie von mutiertem GFP:  $\text{Ser}^{65} \rightarrow \text{Ala}^{65}$  (Strich, Punkte),  $\text{Ser}^{65} \rightarrow \text{Cys}^{65}$  (Striche),  $\text{Ser}^{65} \rightarrow \text{Thr}^{65}$  (Linie).



## 1.7 Das eGFP-BAC Reporterkonstrukt

Um die Expression von NFATc1 zu untersuchen wurde ein „Bacterial Artificial Chromosome-(BAC)-Konstrukt entwickelt, welches die eGFP-cDNA als Reporter im *Nfatc1*-Gen beinhaltet. Das 214 kb große Konstrukt soll durch die großen DNA-Abschnitte am 5'- und 3'-Ende des *Nfatc1*-Gens möglichst alle regulatorisch wirksamen DNA-Abschnitte des *Nfatc1*-Gens enthalten. Die Erstellung des BAC- Konstrukts, durchgeführt von Dr. Stefan Klein-Heßling, beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination in *E.coli*. Hierzu wurde ein DNA-Fragment (BoxA) vor dem 5'-Ende von Exon 3 (Position 80895391) amplifiziert und mittels der Schnittstellen *Ascl* und *BamHI* in den Vektor pLD53.SC2 ligiert (Gong et al., 2003). Der so entstandene Shuttlevektor enthält außerdem die eGFP-cDNA mit einem SV40-Polyadenylierungssignal und einer Ampicillinresistenz (s. Abb.5). Das *Nfatc1*-Gen liegt als BAC-Konstrukt im Plasmid pBACe3.6 vor. *E. coli* Bakterien wurden mit der Recombinase A (RecA) durch Transformation mit dem Vektor pSV1.RecA versehen und bei 30 °C über eine Tetracyclin-Resistenz selektioniert. Nach Transformation des Shuttlevektors kann das Rec A Protein die homologe Rekombination des Vektors mit dem BAC-Konstrukt im Homologiebereich BoxA vermitteln und damit die Integration der eGFP-cDNA an das 5'-Ende von Exon 3 im NFATc1-Gen katalysieren. Positive Rekombinanten wurden durch Ampicillin-Selektion angereichert und mittels PCR identifiziert.



**Abb.5 Das *Nfatc1*-eGFP-BAC Reporterkonstrukt.** Integration der eGFP-cDNA über den Shuttlevektor pLD53.SC2 mittels homologer Rekombination. BoxA entspricht der Intronsequenz am 5'-Ende von Exon 3. Mittels Vorkerninjektion wurde die linearisierte hier dargestellte Gensequenz in Blastozysten eingebracht. Durch zufällige Integration in das Genom entsteht eine transgene Maus, die das Reporterkonstrukt. T7 und SP6 stellen als plasmidspezifische Promotersequenzen die endständigen Anteile des Konstrukts dar.

Nach der Isolation der Konstrukte erfolgte die Vorkerninjektion in Blastozysten von B6 x DBA/2 F2-Hybriden. Die Identifikation der entstandenen transgenen Tiere erfolgte mittels Genotypisierung durch eGFP-spezifische Primer sowie - um das integrierte Konstrukt auf Vollständigkeit zu überprüfen - durch PCR-Reaktionen der T7- und SP6-Sequenzen.

## 1.8 Das Funktionsprinzip des *Nfatc1*-eGFP-BAC Konstrukts

Mit der Integration der eGFP-cDNA distal des 2. Codons am 5'-Ende von Exon 3 liegt die Genexpression unter der Kontrolle der beiden Promotoren P1 und P2 des *Nfatc1*-Gens. Fertige Transkripte bestehen somit entweder aus Exon1-GFP oder Exon2-GFP und enden am SV40 Polyadenylierungssignal, was auf Proteinebene entsprechende Fusionsproteine  $\alpha$ GFP bzw.  $\beta$ GFP entstehen lässt. Durch den Transfer zusätzlicher DNA in das Mausgenom wird die endogene *Nfatc1*-Gen-Aktivität nicht beeinflusst. Das integrierte *Nfatc1*-eGFP-Reporter-Gen soll die Regulation des *Nfatc1*-Gens wiedergeben.

## 1.9 Fragestellung

In Transfektionen von P1-Luciferase-Konstrukten in EL-4 T-Zellen zeigte sich bei Stimulation mit TPA/Iono eine deutlich geringere Aktivität als bei der Stimulation des endogenen *Nfatc1*-Gens (Chuvpilo et al., 2002). Diese Diskrepanz der Genregulation zwischen proximalen Promoterelementen und dem gesamten Gen lässt auf weitere regulatorische Domänen außerhalb der P1-Promoter-Sequenz schließen. Mit dem 214 kb umfassenden *Nfatc1*-eGFP-BAC-Reporterkonstrukt sollte ein DNA-Abschnitt analysiert werden, der möglichst die komplette Regulation des *Nfatc1*-Gens widerspiegelt, was in dieser Arbeit anhand der Korrelation der BAC- und NFATc1-Expression untersucht werden sollte. Insbesondere die starke Expression von NFATc1/ $\alpha$ A - bedingt durch die positive Autoregulation des P1-Promoters - sowie die CsA-Sensitivität sollten durch die GFP-Fluoreszenz wiedergegeben werden. Ziel war es, durch die *Nfatc1*-BAC-Expression Rückschlüsse auf die Regulation des *Nfatc1*-Gens zu erhalten.

## 2. Material

### 2.1 Allgemeine Materialien

Eppendorfröhrchen (1,5 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Eppendorfröhrchen mit Sicherheitsverschluss (1,5 ml)	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Hartenstein
Glasplatten für Gelelektrophorese	Hoefler
Kanülen	Becton Dickinson
LS-Säulen	Miltenyi Biotec
Messpipetten (5ml, 10ml, 25 ml)	Greiner bio-one
Parafilm	Hartenstein
PCR Röhrchen (0,2 ml)	Brand
Petrischalen	Cellstar
Pipetten	Discovery comfort
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Plastikflaschen (14 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Röntgenfilm	Kodak
Sterile Filter	Schleicher & Schuell
Sterile Spritzen (2 ml)	Becton Dickinson
Whatmann paper	Schleicher & Schuell
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Greiner bio-one
Zellsiebe (70 µl Porendicke)	SPL Life Science

### 2.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Carl Roth
2-Isopropanol	Carl Roth
Acetat	Carl Roth
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
APS	Sigma-Aldrich
Äthanol	Carl Roth

β-Mercaptoethanol	Carl Roth
BioRad Protein assay (5x Bradford Reagenz)	BioRad
BSA Fraktion V	Carl Roth
Brefeldin A	eBioscience
Bromphenolblau	Merck
CD4 (L3T4) MicroBeads	Miltenyi Biotec
Chloroform	Carl Roth
Cyclosporin A	Novartis Pharma
DMSO	Carl Roth
dNTPs	MBI-Fermentas
ECL Chemilumineszenz	Thermo Scientific
EDTA	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Fetales Kälberserum	Gibco BRL
Formaldehyd	Carl Roth
Gentamicin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
IC Fixation Buffer	eBioscience
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Serva
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich
MEM	Gibco
Methanol	Carl Roth
Natriumacetat	Merck Eurolab
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat	Merck Eurolab
Natriumpyruvat	Carl Roth
Penicillin (10000 IU/ml)	Serva
Permeabilization Buffer	eBioscience
Ponceau Rot	Sigma Aldrich
Propidiumiodid (PI, 1 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O)	Roche Applied Science
RPMI 1640	Gibco BRL

Salzsäure	Carl Roth
SDS/Natriumaurylsulfat	Carl Roth
Streptomycinsulfat (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
TPA	Sigma Aldrich
Tris	Carl Roth
Triton X-100	Gibco BRL
Trizol Reagenz	Invitrogen
Trypan Blau 0,1 %	Gibco BRL
Tween 20	Carl Roth
X-Vivo 15	Bio Whittaker

### 2.3 Instrumente

Autoklav	Memmert, Systec
Brutschränke	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
Einmalküvetten	Hartenstein
FACSCalibur	BD bioscience
FACSCanto II	BD bioscience
Gefrierschränke (-20 °C, -70 °C)	Bosch, Privileg, Heraeus
Geldokumentation	Herolab
Gelelektrophoresekammern	peqlab Biotechnology
Gelkamera	Hoefer, Stratagene
Heizblöcke	Liebisch, Eppendorf
Konfokales Lasermikroskop	Leica
Lichtmikroskop	Olympus
Magnetrührer	Ika Combimag
Mikrozentrifugen	Eppendorf
Netzgeräte	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
PCR-Maschinen	MWG Biotech
pH-Meter	Ingold K 455

Photometer	Amersham Bioscience
Quarzküvette	Hellma
Schüttelinkubatoren	Hartenstein
Sterile Sicherheitswerkbank	Clean Air
Vortexer	Hartenstein
Wasserfilter	Millipore
Western Blot Apparaturen	Hofer
Zeiss AXIO Imager Z1	Zeiss
Zentrifugen	Heraeus, Hettich
Zytospinzentrifuge	Shandon

## 2.4 Enzyme/Kits

First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	SIGMA
Proteinase K (900 u/ml, 18,9 mg/ml)	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase (recombinant)	MBI Fermentas
Dynabeads Flow Comp Mouse CD4/CD8	Invitrogen
Dynal Mouse T-Cell Negative Isolation Kit	Invitrogen
Mouse Regulatory T-Cell Staining Kit #2	eBioscience

## 2.5 Antikörper für FACS

Antigen	Typ	Format	Katalognr.	Hersteller
CD4	Ratte anti-Maus	PE	553048	BD Pharmingen
CD4	Ratte anti-Maus	Biotin	553728	BD Pharmingen
CD8	Ratte anti-Maus	Biotin	553029	BD Pharmingen
CD8	Ratte anti-Maus	APC	553142	BD Pharmingen
CD19	Ratte anti-Maus	PE	557399	BD Pharmingen
CD25	Ratte anti-Maus	PE	553866	BD Pharmingen
CD69	Ratte anti-Maus	Biotin	553235	BD Pharmingen
II-2	Ratte anti-Maus	PE	554428	BD Pharmingen
CD161/CD32	Ratte anti-Maus	unkonjugiert	553142	BD Pharmingen
CD90.1	Maus anti-Maus	Alexa 647	202508	Biolegend
CD90.2	Maus anti-Maus	PE	105308	Biolegend

## 2.6 Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

Antigen	Typ	Format	Katalognr.	Hersteller
NFATc1	Kaninchen anti-NFATc1	unkonjugiert		Immunoglobine
NFATc1	Maus anti-NFATc1	unkonjugiert	IG209	BD Pharmingen
			556602	
NFATc1 $\alpha$	Kaninchen anti-NFATc1	unkonjugiert		Immunoglobine
Maus IgG	Esel anti-Maus	Alexa Fluor 488	IG457	Invitrogen
			A21202	
Kaninchen IgG	Esel anti-Kaninchen	Alexa Fluor 555		Invitrogen
			A31572	
Maus IgG	Ziege anti-Maus	HRP		Sigma-Aldrich
			A9917	
Kaninchen IgG	Ziege anti-Kaninchen	HRP		Sigma-Aldrich
			A0545	

## 2.7 Oligonukleotide

Sequenzrichtung: 5' → 3'

eGFPfor: AGGGCGATGCCACCTA (16)

eGFPprev: GACTGGGTGCTCAGGTA (17)

RTPCRMnc1E1for: ATGCCAAGTACCAGCTTTCC (20)

RTPCRMnc1E3rev: CTCCAACGTCGTGGAAAACTG (21)

RTGCRMnc1E2for: GACCCGGAGTTCGACTTCGA (20)

RTPCRMnc1GFPprev: ATGCGGTTCCACCAGGGTGTC (20)

5'BAC-T7rev: ATAGCCTCACAAGAGATAGC (20)

PCRmb-actin\_for: CCAGGTCATCACTATTGGCAAGGA (24)

PCRmb-actin\_rev: GAGCAGTAATCTCCTTCTGCATCC (24)



## 2.8 Genmarker

Gene Ruler™ 100 bp DNA „ladder“	MBI Fermentas
Page Ruler™ prestained Protein “ladder”	MBI Fermentas

## 2.9 Puffer und Lösungen

PBS, PBS/BSA, BSS/BSA 0,1%:

Bereitgestellt vom Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg

50x TAE-Puffer (1l ddH<sub>2</sub>O):

Tris	242,0 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	100,0 ml
Essigsäure	57,1 ml
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000,0 ml

1x TBE (1l ddH<sub>2</sub>O):

Tris	10,8 g
Borsäure	5,5 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	0,7 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000,0 ml

10x TBS (1l ddH<sub>2</sub>O):

NaCl	87,7 g
Tris	12,1 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000,0 ml

10x TE-Puffer (1l ddH<sub>2</sub>O):

Tris	12,11 g
EDTA	3,72 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000,0 ml

1x “Tail Tip”-Puffer:

EDTA	1 mM, pH 8,0
------	--------------

SDS	1 %
Tris-HCl	50 mM, pH 8,0
NaCl	20 mM

10x Western Blot Lauf-Puffer (1l ddH<sub>2</sub>O):

Tris	30,3 g
Glycin	144,2 g
SDS	10,0 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000,0 ml

1x Western Blot Waschpuffer (1l ddH<sub>2</sub>O):

Tris	2,42 g
NaCl	8,0 g
Tween	0,5 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000,0 ml

1x Western Blot Blocking-Lösung:

WB Waschpuffer	1 x
Magermilchpulver	4 %

FACS-Puffer:

PBS, pH 7,4	1 x
BSA	0,1 %
Natriumacetat	0,02 %

4 x SDS-Ladepuffer:

Tris-HCl	0,2 M, pH 6,8
SDS	8 %
Glycerin	40 %
Bromophenol blau	0,4 %

## 2.10 Zellkulturmedien

RPMI 1640 Medium Plus (500 ml):

RPMI 1640	459 ml
FCS	25 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)	1 ml
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Natriumpyruvat	5 ml

X-Vivo (400 ml):

RPMI 1640	180 ml
X-Vivo 15	180 ml
Natriumpyruvat	5 ml
MEM-NEAA	5 ml
L-Glutamin	5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
FCS	25 ml
Gentamycin	360 $\mu$ l

## 2.11 Mäuse

BL 6 eGFP-BAC Reportermause BAC 1-6

BL 6 Wildtyp

BalbC Wildtyp

### **3. Methoden**

#### **3.1 Aufbereitung der Maus-Schwanzspitzen zur Genotypisierung**

Zur Identifikation transgener Tiere wurden ca. 4 Wochen alten Mäusen ca. 5 mm der Schwanzspitzen abgetrennt und in nummerierte Eppendorfröhrchen platziert. Zu jeder Probe wurden 17 µl „Tail Tip“-Puffer und 3 µl Proteinase K (900 u/ml, 18,9 µg/ml) gegeben und diese, nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren, für 1,5 h bei 55 °C inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden 500 µl ddH<sub>2</sub>O dazugegeben und die Probe 5 min gekocht. Die Aufbewahrung bis zur PCR-Analyse erfolgte bei 4 °C.

#### **3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Alle Stock-Lösungen wurden nach dem Auftauen gevortext und kurz zentrifugiert. Die PCR-Reaktionen wurden auf Eis angesetzt. Im Sinne der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der einzelnen Reaktionen wurden Mastermix-Lösungen in der aufgeführten Reihenfolge angefertigt und im letzten Schritt 1-3 µl DNA-Lösung dazu gegeben.

##### **10x Mastermix (15 µl/tube):**

1. 97,5 µl ddH<sub>2</sub>O
2. 25,0 µl 10x Puffer mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fermentas)
3. 25,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
4. 2,5 µl Taq DNA Polymerase (5 u/µl)

##### **10x Primermix (9 µl/tube)**

1. 75,0 µl ddH<sub>2</sub>O
2. 5,0 µl dNTPs (10 mM)
3. 5,0 µl Forward-Primer (10 pg/ml)
4. 5,0 µl Reverse-Primer (10 pg/ml)

Es wurde folgendes PCR-Programm mit 35 Zyklen zur Genotypisierung der GFP-BAC Reportermause verwendet. Zur Amplifikation der cDNA wurden 24-28 Zyklen verwendet.

***PCR-Programm:***

Initiale Denaturierung: 95,0 °C, 3 min

PCR-Zyklus:

1. Denaturierung: 95,0 °C, 40 s
  2. Annealing: 54,0 °C, 40 s
  3. Extension: 72,0 °C, 70 s
  4. Letzte Extension: 72,0 °C, 10 min
- Ende: 4,0 °C

**3.3 DNA-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung amplifizierter DNA-Sequenzen wurde folgendes Gel verwendet.

Agarose-Gel (1,5 %):

1x TAE	100,0 ml
Agarose	1,5 g
Ethidiumbromid	5,0 µl

Nach kurzem Aufkochen wurde das Gel in eine kleine Plastikschaale gegossen und mit einem Kamm Aussparungen in Form von Geldaschen gebildet. In diese wurden nach Abkühlen des Gels 5 µl der PCR-Produkte mit Ladepuffer, flankiert von Größenmarkern, pipettiert und bei 120 mV im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Anschließend folgte die Dokumentation mittels Gelphotographie unter UV-Licht.

### **3.4 Zellkultivierung**

#### **3.4.1 Isolation von Leukozyten**

Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet, und die Milz wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle aus dem Situs entfernt. Zur Gewinnung von Zellen aus Lymphknoten erfolgten zusätzlich ventrale Schnitte zum Hals und den Vorder- und Hinterläufen mit anschließender Präparation zervikaler, axillärer, inguinaler sowie mesenterialer Lymphknoten. Die isolierten Organe wurden in eiskaltes BSS/BSA-Medium gebracht. Zur Homogenisierung wurden Milzen und Lymphknoten unter sterilen Bedingungen zwischen einem Spritzenstempel und einem Zellsieb (Porendurchmesser 40 µl) zerrieben. Die Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min bei 4 °C) wurde der Überstand abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen in BSS/BSA wurde zur Hämolyse das Zellpellet in 7 ml Taq-Puffer aufgenommen und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation und Resuspension in 10 ml RPMI-Medium wurde die Zellzahl, nach Zusatz von Trypan-Blau im Verhältnis 1:1 zum Volumen der Zellsuspension, in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und eine Konzentration von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

#### **3.4.2 Isolation von T - Lymphozyten**

Zur Gewinnung von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten wurden Milz und Lymphknoten ca. 6 Wochen alter Mäuse präpariert und Zellsuspensionen hergestellt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 90 µl MACS-Puffer (Miltenyi Biotec) je  $10^7$  Zellen resuspendiert. Zur positiven Selektion wurde mit 10 µl CD4<sup>+</sup> beads (Miltenyi Biotec) je  $10^7$  Zellen die Suspension bei gelegentlichem Invertieren 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl MACS-Puffer je  $10^8$  Zellen resuspendiert und auf eine Säule im Magnetfeld gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit je 3 ml MACS-Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Elution der über die CD4<sup>+</sup> beads gebundenen Lymphozyten mit 5 ml Puffer durchgeführt. Nach Überführen in RPMI-Medium wurde die Zahl der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bestimmt und die Zelldichte auf  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die positive bzw. negative Isolation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>

Lymphozyten für MLRs erfolgte mit CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> - beads (Invitrogen Dynabeads) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des „DynaMouse T-Cell Negative Isolation Kit“ bzw. von „Dynabeads Flow Comp Mouse“.

### **3.4.3 Stimulation von Gesamt-Milz-Zellen**

Gesamt-Milz-Zellen wurden mit ConA oder TPA/Iono jeweils mit oder ohne CsA behandelt. Die ConA Stockkonzentration von 5 mg/ml - gelöst in DMSO - wurde für jeden Ansatz frisch in RPMI auf 5 µg/ml, 1 µg/ml oder 0,2 µg/ml verdünnt. TPA-Stocklösungen von 0,1 mg/ml in DMSO wurden auf 10 ng/ml Endkonzentration in Kultur verdünnt. Ionomycin (5mM) wurde 1:10000 auf 0,5 µM verdünnt. Die CsA-Endkonzentration lag bei 200 ng/ml, ausgehend von einer Stocklösung von 1 mg/ml in DMSO.

### **3.4.4 Stimulation von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten**

Isolierte CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wurden mit den plattengebundenen T-Zell-Rezeptorantikörper  $\alpha$ CD3 (3 µg/ml) bzw.  $\alpha$ CD28 (1 µg/ml) stimuliert. Für 48-well-Platten wurde pro Napf ein Volumen von 360 µl PBS mit entsprechenden Antikörperkonzentrationen verwendet. Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttelinkubator. Vor Überführung der Zellen wurden zwei Waschschriffe mit PBS durchgeführt.

### **3.4.5 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)**

Die Stimulation GFP-positiver T-Zellen erfolgte durch MLR nach negativer Isolation der T-Zell-Responder-Population. Als Stimulatoren wurden CD4/CD8 depletierte Milzzellen von Balb/C-Mäusen verwendet. Die Reaktion erfolgte 72 h in 96-well Platten mit 200 µl RPMI-Medium. Das Verhältnis zwischen Stimulatoren und Respondern betrug 1:4 bei einer Gesamtzellzahl von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well.

### **3.4.6 Restimulation von Gesamt-Milz-Zellen**

Frisch isolierte Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten wurden 48 h mit ConA (1 µg/ml) in RPMI-Medium primär stimuliert. Vor dem Umsetzen der Zellen in IL-2-Kultur erfolgte ein Waschschrift in BSS/BSA, erneutes Auszählen und Einstellen einer Dichte von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml X-Vivo-Medium. Die IL-2 Stocklösung (1 mg/ml) wurde 1:20000 auf eine Endkonzentration von 5 ng/ml in Kultur verdünnt. Die unter dem Proliferationsstimulus stetig zunehmende Zell-Population wurde bei Überschreiten einer Zelldichte von  $3-4 \times 10^6$ /ml durch Zugabe frischen X-Vivo-Mediums mit IL-2 expandiert. Die Dauer der Ruhephase lag, in Abhängigkeit der Teilungsaktivität und der Zellgröße, die lichtmikroskopisch abgeschätzt wurde, bei 5-7 Tagen. Für die Sekundärstimulation wurde nach Zentrifugation das IL-2-Medium abgesaugt und durch RPMI-Medium mit TPA (10 ng/ml) und Iono (0,5 µM) mit oder ohne CsA ersetzt. Bei Messung der IL-2-Produktion wurde gleichzeitig Brefeldin A (1 mg/ml) zur Kultur gegeben. Die Restimulationszeit betrug 6h.

## **3.5 Western Blot**

### **3.5.1 Herstellung von Proteinextrakten**

Die bei -70 °C tiefgefrorenen Zellpellets wurden ca. 10 min auf Eis aufgetaut. Um bei der Resuspension das Verklumpen zu Vermeiden, wurde das Röhrchen zunächst schnell über einen Eppendorf-Ständer gezogen. Nach Zugabe von 80-100 µl RIPA<sup>+</sup> Puffer wurde der Vorgang wiederholt und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Um zu verhindern, dass die visköse DNA der Zellen die Pipettenspitzen verstopft, wurde die Suspension zunächst mit abgeschnittenen Pipettenspitzen resuspendiert und anschließend mit der Pipette in Lösung gebracht. Die Proben wurden bei 4 °C 20 min auf dem Schüttler inkubiert, 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.



### 3.5.2 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellextrakte wurden 2 µl des Zellaufschlusses zu 998 µl einer 1:5 Verdünnung von Bradford-Konzentrat in ddH<sub>2</sub>O gegeben, und die Absorption wurde bei 595 nm photometrisch gemessen. Nach einmaligem Erstellen einer BSA-Standardkurve und Berechnung der Konzentrationen stellte sich heraus, dass diese mit dem vom Photometer angegebenen Werten übereinstimmen, so dass bei nachfolgenden Messungen die automatisch berechneten Konzentrationen verwendet wurden.

### 3.5.3 Standardisierung der Proteinkonzentrationen

Proben mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen wurden durch Zugabe von RIPA<sup>+</sup> Puffer angeglichen. Je nach Endvolumen wurde die Probe mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und die Lösung anschließend gevortext. Bis zur Gelelektrophorese wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.5.4 SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden folgende Gele verwendet:

#### ***Sammelgel (5 %, 8 ml):***

H <sub>2</sub> O	5,5	ml
30 % Acrylamid Mix	1,3	ml
Tris 1,5 M pH 6,8	1,0	ml
SDS 10 %	0,08	ml
APS 10 %	0,08	ml
TEMED	0,008	ml

#### ***Trenngel (15 %, 10 ml) für GFP-WB***

H <sub>2</sub> O	2,3	ml
30 % Acrylamid Mix	5,0	ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	ml

SDS 10 %	0,05 ml
APS 10 %	0,05 ml
TEMED	0,002 ml

***Trenngel (8 %) für NFATc1-WB:***

H <sub>2</sub> O	4,6 ml
30 % Acrylamid Mix	2,7 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10 %	0,1 ml
APS 10 %	0,1 ml
TEMED	0,006 ml

Nach Abdichten der Gelkammern wurden die Lösungen eingefüllt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 5 min bei 95 °C denaturiert und gevortext. Die Gele wurden mit Proteinmarkern (Page Ruler™, Fermentas) und einem Volumen von 37 µl je Probe beladen und diese in 1x SDS-PAGE Laufpuffer bei 42 mA im elektrischen Feld aufgetrennt.

**3.5.5 Western Blot und Antikörperfärbung**

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden 3 h mit 250 mA auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde kurz luftgetrocknet und in 5% Magermilch in TBS/T 1h bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (Maus NFATc1 1:1000, Kaninchen □GFP 1:1000) wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Membranen wurden am nächsten Tag in WB-Waschlösung dreimal kurz gewaschen und mit den Sekundärantikörpern, verdünnt in 5 % Magermilch (αMaus IgG-HRP, αKaninchen IgG-HRP jeweils 1:10000), 1 h bei Raumtemperatur und 1h bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran 5 min in ECL-Lösung unter leichtem Schwenken inkubiert und ein Film in der Dunkelkammer aufgelegt. Die Belichtungszeit variierte zwischen 30-60 min. Der Film wurde anschließend entwickelt und fixiert.

## **3.6 Semiquantitative RT-PCR**

### **3.6.1 RNA-Extraktion**

Die Isolation von RNA erfolgte mittels klassischer RNA-Extraktion durch Phasentrennung. Zuvor wurde das gesamte Kulturmedium mit Zellen (ca.  $1 \times 10^7$ ) unter sterilen Bedingungen in Greiner-Röhrchen überführt und nach einmaligem Waschen der Kulturschale mit BSS/BSA-Puffer zentrifugiert (1600 rpm, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Trizol aufgenommen, gut resuspendiert, in RNase freie Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Um das Risiko der RNA-Degradierung durch RNAsen zu minimieren, wurde mit sterilen Filterspitzen pipettiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform wurden die Röhrchen 15 s geschüttelt und bei Raumtemperatur 2-3 min inkubiert. Die anschließende Zentrifugation mit 13000 rpm 15 min bei 4 °C führte zur vollständigen Trennung in eine organische Phase, Interphase und wässrige Phase; letztere mit einem Anteil von 50-60 Prozent des Gesamtvolumens. Die wässrige Schicht wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und unter Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol die RNA-Fällung eingeleitet. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C), die zur Bildung eines RNA-Pellets führte. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1ml Äthanol (75 Vol%) gewaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das RNA-Pellet kurz luftgetrocknet und in 15-25  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lösung wurde im Heizblock 10 min auf 60 °C erwärmt. Eventuell aufgetretene Verklumpungen der RNA wurden vorsichtig mit der Pipettenspitze gelöst, und die Lösung wurde bei -20 °C eingefroren.

### **3.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Beurteilung der RNA Qualität**

Vor der Synthesereaktion wurde die RNA-Konzentration photometrisch (bei 260 nm) gemessen. Hierfür wurden 2  $\mu$ l der RNA-Lösung in 98  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 1:50 verdünnt. Zur qualitativen Untersuchung auf DNA-Kontamination bzw. Degradation wurde 1 $\mu$ g RNA im Agarosegel (1,5 %) elektrophoretisch

aufgetrennt. Eine gute Qualität der RNA ließ sich anhand distinkter Bandenabgrenzung der 18S und 28S rRNAs, sowie fehlender DNA-Kontamination in den Geltaschen erkennen.

### **3.6.3 Synthese von einsträngiger cDNA durch RT-PCR**

Zur Synthese des komplementären cDNA-Strangs wurde die gefrorene RNA-Lösung auf Eis aufgetaut und kurz zentrifugiert. Es wurden 1,5 µg RNA, 1,0 µl „random hexamer primer“ (0,2 µg/µl) mit nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl ergänzt. Um die RNA-Stränge zu denaturieren erfolgte nach kurzem Vortexen und Zentrifugation eine 5 min Inkubation bei 70 °C. Auf Eis wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (20 u/µl) und 2 µl 10mM dNTP-Mix dazugegeben. Die Bindung der Primer erfolgte bei 5 min Inkubation bei 25 °C. Der Ansatz wurde mit 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20u/µl) auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Die Synthesereaktion lief 10 min bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 37 °C ab. Das Erhitzen auf 70 °C, 10 min, führte zum Abbruch der Reaktion. Die cDNA konnte direkt zur Amplifikation durch PCR verwendet werden. Um semiquantitative Aussagen zur Häufigkeit von mRNAs treffen zu können wurde die RNA-Menge anhand der Signalstärke des „housekeeping“-Gens β-Actin für die entsprechenden Ansätze der PCR-Reaktionen abgeglichen. Dies geschah durch wiederholtes Testen verschiedener Verdünnungen und Volumina der synthetisierten cDNA.

## **3.7 “Fluorescence Activated Cell Sorting” (FACS)**

### **3.7.1 FACS-Färbung von Zellmembran-Antigenen**

Zur Antikörperfärbung von Oberflächenmolekülen der Zellmembran wurden jeweils 1-5 x 10<sup>5</sup> Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 1 ml FACS-Puffer und Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in 20 µl Fc-Block-Lösung (1:100 Fc-Block in FACS-Puffer) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Zu jeder Probe wurden 10 µl des Antikörper-Mastermix gegeben, sodass bei einem

Endvolumen von 30 µl eine Verdünnung von 1: 120 erreicht wurde. Die Zellen wurden im Dunkeln auf Eis 30 min inkubiert. Bei Verwendung von Biotin-gekoppelten Primärantikörpern wurde nach einmaligem Waschen das Zellpellet in FACS-Puffer mit APC-Streptavidin (1:100) aufgenommen und die Probe 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen in 1 ml FACS-Puffer wurde das Pellet in 50-100 µl Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und am BD FACSCalibur Flow Cytometer analysiert.

### **3.7.2 FACS-Färbung von intrazellulären Zytokinen**

Zur Messung der IL-2 Produktion wurden Milzzellen 24h mit ConA, TPA/Iono oder CsA behandelt. Nach 18 h Inkubation wurde Brefeldin A (1 mg/ml) zur Hemmung der Zytokinsekretion in die Kultur gegeben und auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Nach weiteren 6h Kultur wurden 1-5 x 10<sup>5</sup> Zellen in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und in 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 µl Fixierungslösung (eBioscience) durch leichtes Vortexen gelöst. Anschließend erfolgte 20 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zu den fixierten Zellen wurde 1 ml in ddH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnter Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gegeben und die Probe 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Wiederholen dieses Schrittes wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen. 1 µl αIL-2-PE Antikörper (0,2 µg/ml) wurde dazugegeben und die Probe bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 min inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation mit 1500 rpm in 1 ml Permeabilisierungspuffer wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 50-100 µl FACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen gegeben und mit dem BD FACSCalibur Flow Cytometer analysiert.

### **3.7.3 FACS-Färbung mit Annexin V und Propidium Iodid**

Zur Analyse der Apoptoserate wurden 1-5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 100 µl 1x Annexin V-Färbepuffer resuspendiert und 1 µl Annexin V-APC dazugegeben (1:100). Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden weitere 100 µl Puffer hinzugefügt. Unmittelbar vor der Messung wurde 1 µl Propidium Iodid

dazu pipettiert, die Probe kurz gevortext und im BD FACSCalibur Flow Cytometer analysiert.

#### **3.7.4 PKH26 Membranfärbung**

Zur Markierung von Zellen mit PKH26 wurden  $2,5 \times 10^6$  frisch isolierte CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in PBS gewaschen und mit 1500 rpm 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 250 µl Diluent C (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Zur Suspension wurden 250 µl PKH 26 ( $4 \times 10^{-6}$  M in Diluent C) gegeben und zügig mit der Pipette gemischt, um eine möglichst uniforme Färbung zu erreichen. Die Suspension wurde 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Färbeprozess durch Zugabe von 500 µl BSS/BSA und Inkubation 1 min gestoppt. Nach Verdünnung in 1 ml RPMI und 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm, 4 °C, wurde der Überstand abgesaugt, die gefärbten Zellen wurden weitere dreimal mit RPMI-Medium gewaschen, und eine Probe im BD FACSCalibur Flow Cytometer analysiert. Kultivierung erfolgte mit plattengebundenen CD3/CD28 Antikörpern.

#### **3.8 Zellfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Analyse der GFP- und NFATc1-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie wurden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach 24h Stimulation mit TPA / Iono auf eine Dichte von  $1,0 \times 10^6$ /ml verdünnt, einmal in FACS-Puffer gewaschen und jeweils  $0,7-1,0 \times 10^5$  Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert (2 min, 750 rpm). Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur kurz getrocknet. Die Färbung erfolgte mit dem FoxP3-Staining Kit (eBioscience). 1 Teil Fix/Perm-Puffer wurde mit 3 Teilen „Diluent“-Lösung verdünnt und ca. 0,5 ml auf die Zellen gegeben. Die Fixierung erfolgte 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 1 x Permeabilisierungslösung (Perm-Puffer 1:10 in ddH<sub>2</sub>O) jeweils 5 min gewaschen. Der Erst-Antikörper wurde über Nacht bei 4°C in 1 x Permeabilisierungslösung inkubiert (Kaninchen anti-NFATc1 □ 1:50, Kaninchen anti-NFATc1 1:100). Nach zweimaligem Waschen wurde mit dem Zweit-

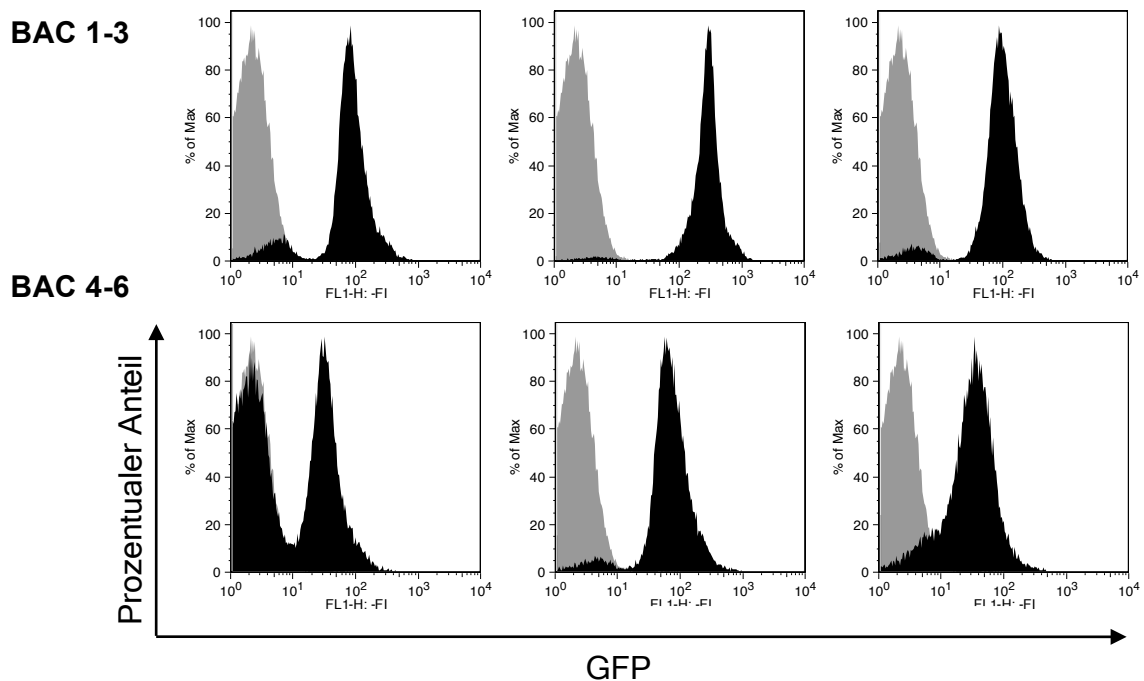
Antikörper 1h bei Raumtemperatur gefärbt (Cy3 anti-Kaninchen 1:300). Nach zwei weiteren Waschschrinen wurden die Zellen in Flouromount-Medium mit DAPI (1:10000) eingedeckt und in einer Mappe bis zur Fluoreszenzmikroskopie aufbewahrt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die GFP-Expression der Reportermauslinien B6 NFATc1GFP BAC1-6

Da die Genregulation und Expression von *Nfatc1* und eGFP von der Integration des BAC-Konstrukts abhängen, wurde in den sechs transgenen Mauslinien die vollständige Integration des eGFP-BAC Konstrukts durch PCR-Reaktionen über Sequenzen des 5'- und 3'- Endes überprüft. Hierfür wurden Primer für die plasmidspezifischen Sequenzen von T7 (5'-Ende) und SP6 (3'-Ende) verwendet. Während die Linien BAC 1-3 positive Signale bei der Amplifikation beider Sequenzen zeigten, war BAC 4 in beiden Fällen negativ. BAC 5 zeigte nur ein Signal bei der PCR von T7 (5'), BAC 6 nur bei der Reaktion der SP6-Primer (3'). Um die eGFP-Expression der transgenen Tiere (BAC 1-6) zu untersuchen, wurden Milzzellen isoliert, mit Annexin V gefärbt und die GFP-Fluoreszenz mittels FACS gemessen. Dabei wurde die Analyse auf die Population lebender Zellen begrenzt. Die Linien BAC 1-3 zeigten eine sehr ähnliche Verteilung der GFP-positiven Populationen, mit jeweils nur kleinen Anteilen GFP-negativer Zellen. Während die Mäuse der Linien BAC 1 und 3 vergleichbare Intensitäten der grünen Zellpopulation aufwiesen, war in Lymphozyten von BAC 2-Mäusen die höchste Fluoreszenzintensität zu beobachten. Der Phänotyp von BAC 4 unterschied sich am deutlichsten von BAC 1-3. Zum Einen lag fast die Hälfte der lebenden Zellen als „nicht grüne“ Population vor, zum Anderen zeigte die grüne Population die geringste Fluoreszenzintensität. Der Phänotyp von BAC 5-Mäusen, die nur über das komplette 5'-Ende des *Nfatc1*-Gens verfügen zeigte eine ähnliche Verteilung der Zell-Populationen wie in BAC 1- und 3-Mäusen. Die GFP-positive Population in BAC 6-Mäusen, denen das 5'-Ende des Genkonstrukts fehlt, entsprach in ihrer Intensität der von BAC 4-Mäusen, jedoch zeigten sie einen deutlich geringeren Anteil an GFP-Zellen.





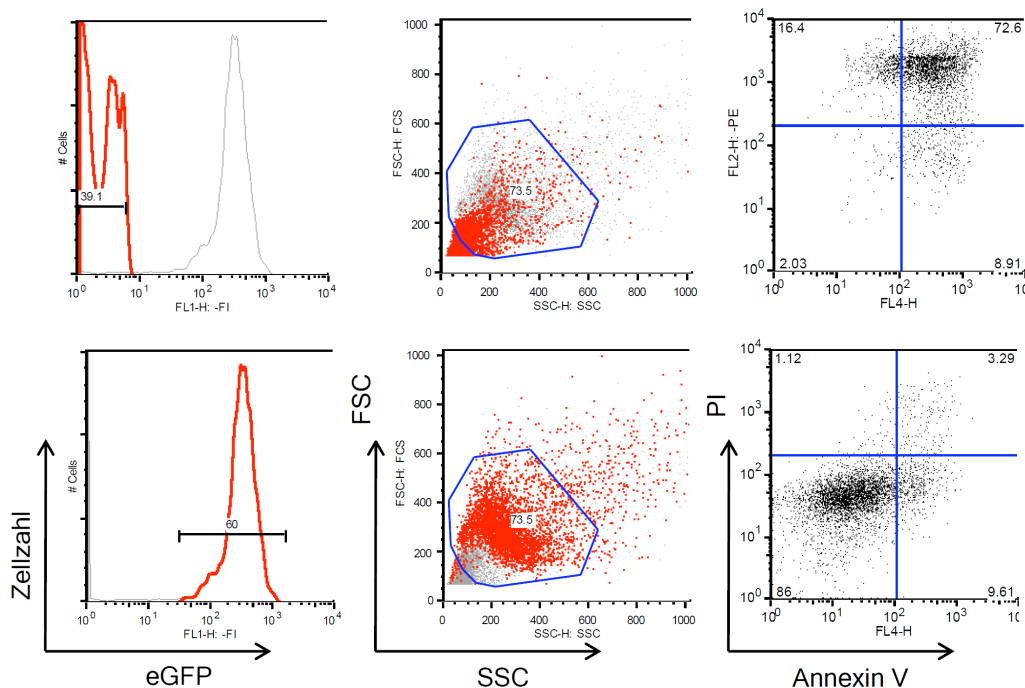
**Abb.6 Die GFP-Expression unstimulierter Milzzellen unterscheidet sich zwischen GFP-BAC-Reportermausen mit kompletter bzw. unvollständiger Integration.** Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenz der Mauslinien BAC 1-6. BAC 1-3 enthalten das vollständige eGFP-BAC Reporterkonstrukt (214kb). Den Linien BAC 4-6 fehlt entweder ein Abschnitt des 3'-Endes (BAC 5) oder des 5'-Endes (BAC 6) bzw. Anteile beider Enden des Konstrukts (BAC 4). Grau=WT-Kontrolle. Schwarz=Fluoreszenzfärbung der BAC-Reportermaus.

## 4.2 Charakterisierung der GFP Population

### 4.2.1 Die GFP-negative Population besteht aus apoptotischen und nekrotischen Zellen

Während durch überschießende Lymphozytenreaktivität und Hyperproliferation in NFATc2<sup>-/-</sup> bzw. NFATc2<sup>-/-</sup>+NFATc3<sup>-/-</sup> Doppel-defizienten Mäusen diesen NFAT-Faktoren eher proapoptische und antiproliferative Eigenschaften zugeschrieben werden können (Rao et al., 1997; Ranger et al., 1998; Serfling et al., 2003), führte die Induktion von NFATc1/α nicht zu verstärktem Rezeptor-vermitteltem AICD (Chuvpilo et al., 2002). Um den Zusammenhang zwischen der GFP-Fluoreszenz bzw. NFATc1-Aktivität und Apoptose darzustellen,

wurden Färbungen mit dem Membranfarbstoff Annexin V und dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) durchgeführt. In frühen Apoptosestadien erfolgt über einen „Flip-Flop“-Mechanismus die Translokation von Phosphatidylseringruppen (PS) von der Innenseite zur Außenseite der Zellmembran. Annexin V bindet dabei an die PS-Gruppen der Zelloberfläche. Bei beginnender Nekrose erhöht sich die Membranpermeabilität, sodass PI durch die Membran diffundiert und mit der DNA interkaliert. Somit gelingt durch Doppelfärbungen die Differenzierung in lebende Zellen (PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>-</sup>), apoptotische Zellen (PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>+</sup>) und nekrotische Zellen (PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup>) (Vermes et al., 1995; Suzuki et al., 1997). Gesamtmilzzellen wurden nach 24h Stimulation mit ConA (1 µg/ml) mit Annexin V und PI gefärbt und analysiert. Es zeigte sich eine klare Aufteilung der GFP-positiven bzw. GFP-negativen Population. Die GFP<sup>-</sup>-Zellen bestanden demnach aus nekrotischen PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen, der grüne Anteil der Kultur aus lebenden PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>-</sup> doppelnegativen Zellen. Beide Populationen enthielten auch apoptotische PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>+</sup>-Zellen. Demnach entsprach die grüne Population dem Anteil lebender Zellen, während GFP<sup>-</sup>-Zellen sich im Stadium der Nekrose befanden. Hieraus kann geschlossen werden, dass NFATc1 in aktivierten Lymphozyten - ebenso wie in Effektor T-Zellen - nicht zur Induktion der Apoptose führt (Chuvpilo et al., 2002), sondern es eher zur Herabregulation der NFATc1-Expression beim Übergang in die Nekrose kommt. Weiterhin könnte es durch die Diffusion des GFP-Moleküls durch die Membran nekrotischer Zellen zu einem weiteren Verlust des GFP-Signals kommen.

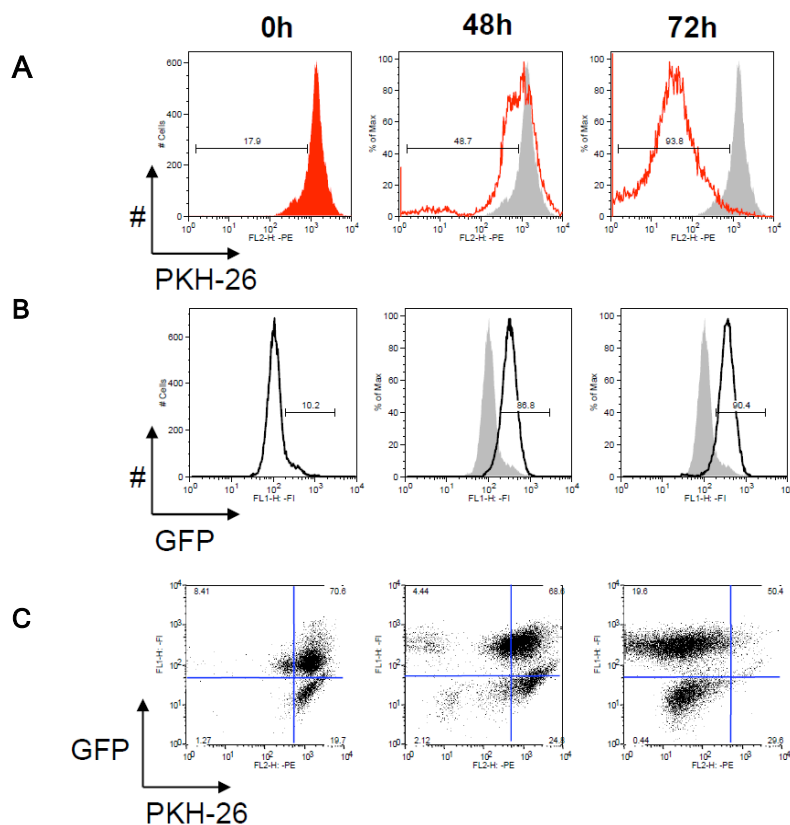


**Abb.7 Die GFP-negative Population besteht aus nekrotischen PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen, die GFP-positive Population aus lebenden PI<sup>-</sup> / Annexin V<sup>-</sup> doppelnegativen Zellen.** Dargestellt ist die FACS-Analyse isolierter Milzzellen nach 24h Stimulation mit ConA (1 µg/ml) und Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI).

#### 4.2.2 Die GFP-Expression zeigt keine Unterschiede zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen

Um neben dem Einfluss auf die Apoptose mögliche Effekte auf die Proliferation zu zeigen wurde die GFP-Expression in proliferierenden und ruhenden T-Lymphozyten untersucht. Isolierte CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit PKH-26 gefärbt, mit plattengebundenen αCD3/CD28 Antikörpern 72h kultiviert und zu den Zeitpunkten 0h, 48h und 72h durch FACS analysiert. Der Membranfarbstoff verlor durch die Zellteilung an Intensität, so dass proliferierende Zellen identifiziert und ihre GFP-Expression untersucht werden konnte. Die Teilungsaktivität der Gesamtpopulation wurde ab 48h Kulturzeit deutlich. Zuvor fand keine Veränderung der PKH-26-Fluoreszenz statt. Hier lag die Trennung der Kultur in einen noch ruhenden Anteil und eine kleine teilungsaktive Population vor. Nach drei Tagen befanden sich über 90 Prozent der Zellen in Proliferation. Die Zunahme der GFP-Expression erreichte ebenfalls nach drei

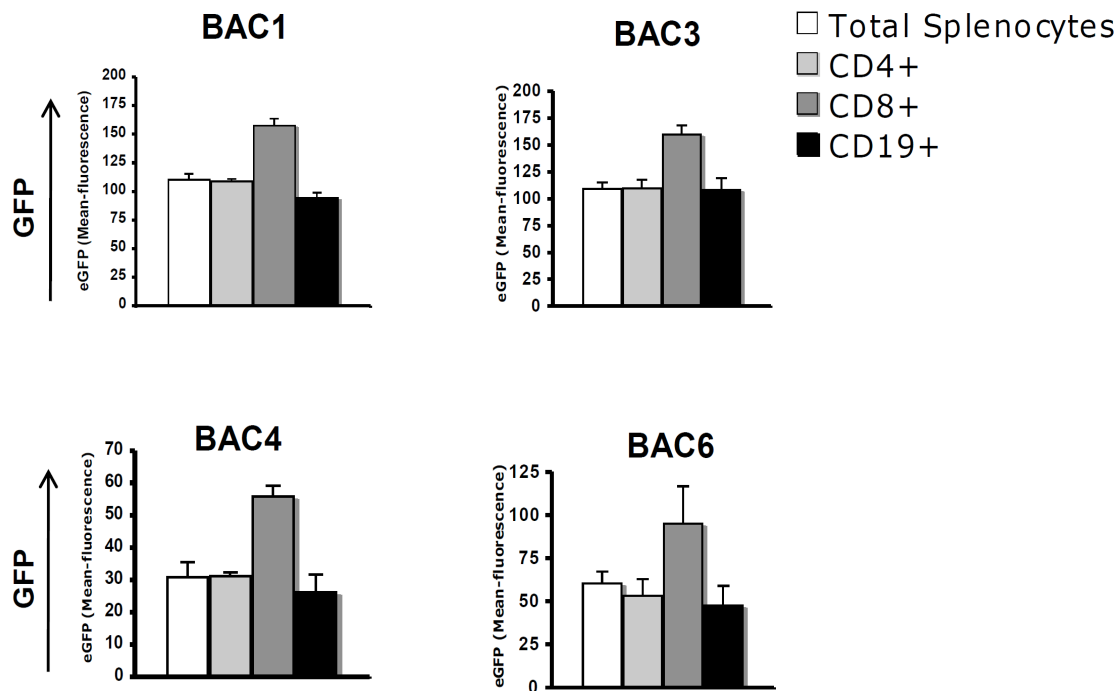
Tagen das Maximum. Die fehlenden Unterschiede der GFP-Expression wurden vor allem beim Vergleich der proliferierenden (linker, oberer Quadrant) und ruhenden Zellpopulationen (rechter, oberer Quadrant) zum Zeitpunkt 48h und 72h (C) deutlich. Somit lässt sich keine enge Korrelation zwischen der Proliferation und NFATc1/eGFP-Expression erkennen. Vielmehr scheint die NFATc1-Expression nach Eintritt in den Zellzyklus ziemlich konstant zu bleiben.



**Abb.8 Proliferierende und nicht proliferierende CD4<sup>+</sup> Zellen zeigen keine Unterschiede in der GFP-Expression.** Dargestellt ist die im Rahmen der Zellteilung abnehmende PKH-26-Intensität der gesamten Population, A. Zunahme der GFP-Fluoreszenz der Gesamtkultur, B. Zusammenhang zwischen PKH-26-Intensität und GFP-Fluoreszenz, C. Die Analyse der  $\alpha$ CD3/CD28-Kultur erfolgte nach der Färbung isolierter T-Lymphozyten mit PKH-26 zum Zeitpunkt 0h.

### **4.3 FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz in T- und B- Zellen verschiedener Mauslinien**

Da sich die Gesamtmilzpopulation im Hinblick auf die GFP-Fluoreszenz als eine homogene Population darstellen lässt, wurden zur weiteren Differenzierung die GFP-Fluoreszenz verschiedener Lymphozyten-Populationen analysiert. Es wurden Milzzellen frisch isoliert, mit  $\alpha$ CD4-, CD8- und CD19-Fluoreszenzantikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) in den untersuchten Mauslinien die höchste Intensität aufwiesen. BAC 1 und 3, die über das komplett integrierte Reporterkonstrukt verfügen, zeigten wie bei der Analyse der GFP-Fluoreszenz von Gesamtmilzzellen die höchsten Intensitäten in allen Zellreihen. Im Vergleich untereinander lagen nahezu identische Mittelwerte vor. CD8<sup>+</sup> Zellen von BAC 1 zeigten in relativen Einheiten eine mittlere Fluoreszenz von 158, Lymphozyten aus BAC 3 Werte von 160,5. CD4<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten entsprachen in ihrer Fluoreszenz der GFP-Intensität der gesamten Kultur. Trotz niedriger mittlerer Intensitäten der CD8<sup>+</sup> Zellen in BAC 6 (95,65) und BAC 4 (65,2) zeigte sich ein vergleichbares Verhältnis zu den übrigen Werten. Die gute Vergleichbarkeit der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen Lymphozytenpopulationen sowie der Nachweis der vollständigen genomischen Integration des BAC-Konstrukts führte dazu, dass für die durchgeführten Untersuchungen nur Nachkommen der Mauslinien BAC1 und BAC3 verwendet wurden.

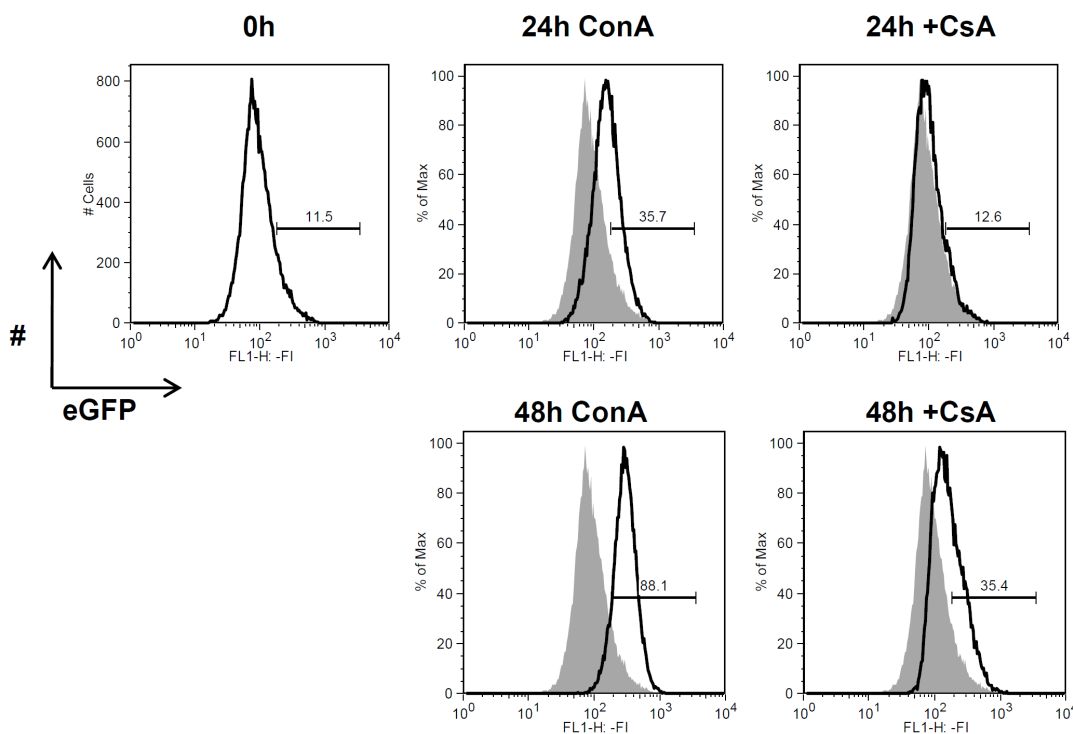


**Abb.9** In den Mauslinien BAC 1,3,4 und 6 zeigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine höhere GFP-Expression als CD4<sup>+</sup> T- und CD19<sup>+</sup> B-Zellen. Die GFP-Fluoreszenz nativer CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> Lymphozyten wurde in relativen Einheiten (Mean-fluorescence) gemessen und die mittlere Intensität aus je drei unabhängigen Experimenten berechnet.

#### 4.4 Die GFP-Expression der NFATc1-eGFP-Reportermause ist induzierbar und CsA-sensitiv

Die starke Induktion von NFATc1 in aktivierten T-Zellen und die inhibitorische Wirkung des Immunsuppressors Cyclosporin A (CsA), vermittelt über die Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin, sind wichtige Eigenschaften der Genexpression in Effektor-T-Zellen, vor allem in Hinblick auf die Autoregulation von NFATc1/αA (Rao, 1994; Serfling et al., 1994; Serfling et al, 2006). Um die GFP-Expression in aktivierten Zellen zu untersuchen wurden Gesamtmilzzellen isoliert, 48h mit ConA (1 µg/ml) bzw. ConA (1 µg/ml) + CsA (100 ng/ml) kultiviert und die GFP-Expression durch FACS analysiert. Die Stimulation mit ConA führte innerhalb von 24h zum Anstieg der Fluoreszenzintensität um das Zwei- bis Dreifache und betrug nach 48h ca. das Vierfache des Ausgangswertes.

Unter Einfluss von CsA wurde die Zunahme der GFP-Expression in den ersten 24h vollständig unterbunden. Nach 48h kam es unter CsA zur Zunahme der Fluoreszenz, vergleichbar mit der 24h Kultur unter Stimulation mit ConA. Änderungen der GFP-Fluoreszenz äußerten sich stets als Verschiebungen der gesamten Kurve im FACS und betrafen somit die gesamte Population. Die GFP-Fluoreszenz hatte in allen durchgeführten Experimenten nach 48h Kultur das Intensitätsmaximum erreicht. 72 h Kultivierung führte zu keiner weiteren Erhöhung. Die GFP-Expression ist somit analog zu NFATc1 induzierbar und CsA sensitiv.



**Abb.10** Der inhibitorische Effekt von CsA auf die induzierbare GFP-Expression beschränkt sich auf die ersten 24h der Kultur von Milzzellen. Darstellung der Induktion von GFP in Kulturen aus Gesamtmilzzellen unter Stimulation mit ConA bzw. ConA+CsA. Die GFP-Fluoreszenz wurde zum Zeitpunkt 0h, 24h, und 48h gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

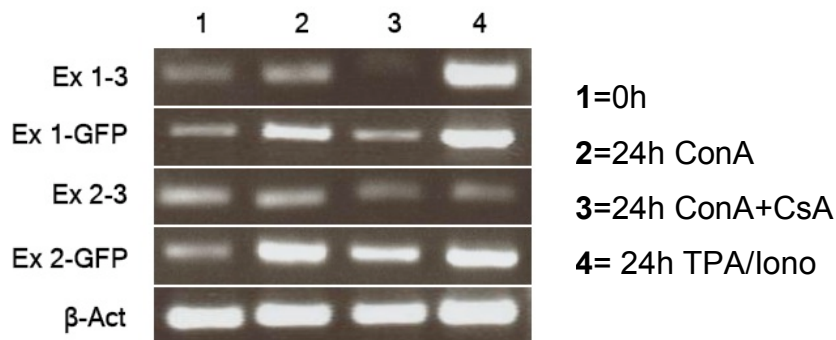
## **4.5. Korrelation zwischen der Expression von NFATc1 und GFP in Gesamtmilzzellen und T-Lymphozyten**

### **4.5.1 Korrelation der mRNA-Synthese von NFATc1 und GFP in Milzzellkultur**

Unter der Kontrolle der Promotoren P1 und P2 und den Polyadenylierungssignalen pA1 und pA2 von *Nfatc1* erfolgt die Transkription von insgesamt sechs verschiedenen mRNAs. NFATc1/ $\alpha$ A wird bei T-Zellaktivierung stark induziert und unterliegt einer positiven Autoregulation, während die langen Isoformen NFATc1B und C konstitutiv exprimiert werden (Chuvpilo et al., 1999; Serfling et al., 2006). Um die Regulation der GFP-Expression dem konstitutiv aktiven P2-Promoter bzw. dem induzierbaren P1-Promoter zuordnen zu können, wurden in einer RT-PCR Isoform-spezifische Primerpaare verwendet. Zur Messung der P1-vermittelten NFATc1 mRNA-Produktion diente ein Primer im Exon 1 ( $\alpha$ -Isoform), für den P2-Promoter ein Primer im Exon 2 ( $\beta$ -Isoform). Der Reverse-Primer stammt aus Exon 3. Die Messung der Expression der eGFP-mRNA des Transgens unter der Kontrolle der beiden Promotoren erfolgte mit den beiden aufgeführten 5'-Primern, zusammen mit einem Reverse-Primer aus dem eGFP-Insert. Nach Isolation der Milzzellen aus GFP-BAC-Reportermausen blieben diese entweder unstimuliert (Spur 1), wurden 24h mit ConA allein (Spur 2) oder zusammen mit CsA (Spur 3) oder mit TPA und Ionomycin induziert (Spur 4). Auf die RNA-Präparation folgten die cDNA-Synthese und eine Isotyp-spezifische PCR-Reaktion (Abb. 4.9). Nach 24h Stimulation der Milzzellen zeigte sich mit ConA eine Induktion der  $\alpha$ -Formen von NFATc1 und GFP, wobei diese unter Einfluss von CsA auf dem Niveau nicht stimulierter Zellen zum Zeitpunkt 0h blieb. CsA hemmte somit gleichermaßen die Induktion von NFATc1/ $\alpha$  und GFP und damit die P1-Promoteraktivität des endogenen NFATc1-Lokus sowie des BAC-Konstrukts. Während ConA in der verwendeten Konzentration von 1  $\mu$ g/ml die Zellen relativ gering stimulierte, wurde durch Behandlung der Zellen mit TPA/Iono eine sehr starke Induktion des P1-Promoters erreicht, was sich in der wesentlich stärkeren Expression von NFATc1/ $\alpha$  und GFP widerspiegelte. Im Gegensatz zu den P1-regulierten Elementen des endogenen NFATc1-Lokus bzw. des BAC-Konstrukts befand sich die Expression der P2-kontrollierten Anteile auf relativ



konstantem Niveau. Dies traf vor allem für das endogene NFATc1/β zu, welches sowohl in den frisch isolierten Leukozyten als auch unter den verschiedenen Kulturbedingungen keine Veränderungen aufwies. Die GFP-Isoform stimmte in ihrer Regulation im Wesentlichen damit überein, zeigte jedoch - unabhängig von der Art der Stimulation - in frisch isolierten Zellen eine geringere Expression als in Milzzellen nach 24h Kultivierung. Die Transkripte des eGFP-BAC-Reporterkonstrukts unterliegen der Kontrolle der Promotoren P1 und P2, was zur Bildung einer induzierbaren und CsA-sensitiven GFPα-Isoform führt, während GFPβ konstitutiv exprimiert wird.

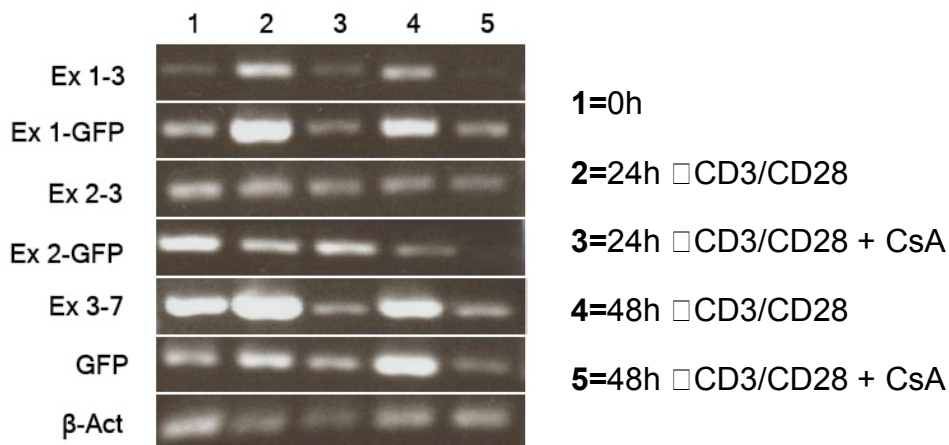


**Abb.11 In Milzzellen korreliert die mRNA-Synthese des GFP-BAC Reporterkonstrukts mit der NFATc1-Expression.** Dargestellt sind die PCR-Produkte der α(Ex1-3)- und der β(Ex2-3)-Isoformen von NFATc1, sowie die entsprechenden PCR-Produkte α(Ex1-GFP) und β(Ex2-GFP) des GFP-BAC Reporterkonstrukts nach Amplifikation von cDNA aus Gesamtmilzzellen mit isoformspezifischen Primern unter verschiedenen Induktionsbedingungen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.5.2 Korrelation der mRNA-Synthese von NFATc1 und GFP in T-Zellkulturen

Um die GFP-Expression dem induzierbaren P1-Promoter und dem konstitutiv aktiven P2-Promoter zuordnen zu können wurden entsprechend der RT-PCR mit RNA aus Gesamtmilzzellen für isolierte CD4<sup>+</sup>-Zellen Isomer-spezifische Primerpaare verwendet. Zusätzlich wurde die Expression des gesamten *Nfatc1*-Gens unter Verwendung von Primern aus den Exons 3 und 7 untersucht. In

gleicher Weise wurde die Induktion des gesamten GFP analysiert. Nach Isolation von Gesamtmilzzellen aus NFATc1-GFP-BAC Reporter-mäusen und Aufreinigung der CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde die RNA entweder zum Zeitpunkt 0h (Spur 1), oder nach 24h (Spur 2,3) bzw. 48h (Spur 4,5) Kultivierung mit αCD3 (3 µg/ml)/CD28 (1 µg/ml)-Antikörpern mit oder ohne CsA (200 ng/ml) extrahiert. Nach der cDNA-Synthese erfolgten die PCR-Reaktionen (Abb.12).



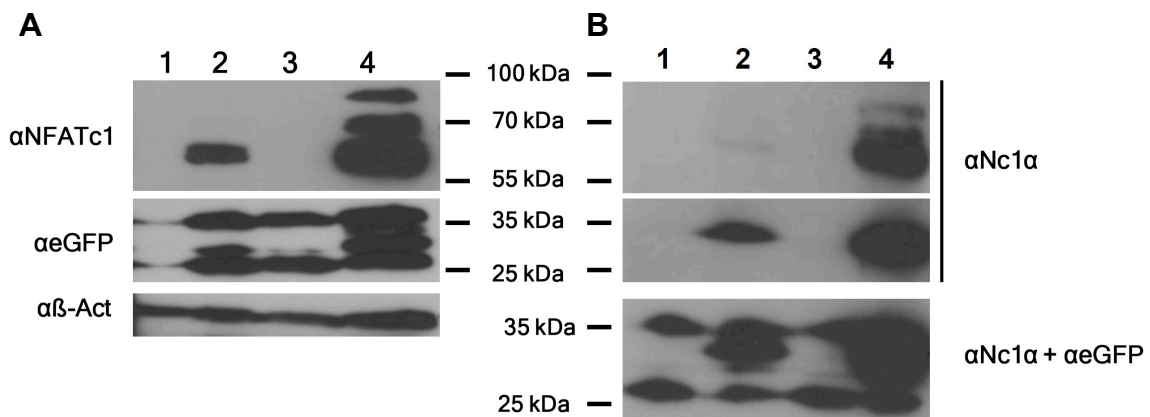
**Abb.12 In isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen korreliert die mRNA-Synthese des NFATc1-GFP-BAC Reporterkonstrukts mit der NFATc1-Expression.** Dargestellt sind die PCR-Produkte der α(Ex1-3)- und β(Ex2-3)-Isoformen von NFATc1 bzw. α(Ex1-GFP) und β(Ex2-GFP) des GFP-BAC Reporterkonstrukts nach Amplifikation von cDNA aus verschiedenen stimulierten CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach 24h Stimulation zeigten isolierte CD4<sup>+</sup>-Zellen eine Induktion der α-Isoformen des endogenen NFATc1 sowie des GFP-Reporterkonstruktes. Gleiches galt für die Expression des gesamten *Nfatc1*-Gens und GFP-Gens. In Gegenwart von CsA blieb diese nach 24h auf dem Niveau unstimulierter Zellen. Nach einer Kultivierung von 48h lag ein ähnliches Bild vor, wobei sich α-NFATc1 und GFPα in etwas geringerem Maße induziert zeigten, während die Expression des gesamten GFP-Gens zu diesem Zeitpunkt am stärksten war. Unter Einfluss von CsA wurde die Induktion von GFP und NFATc1 inhibiert. Im Gegensatz zur Induzierbarkeit der α-Isoformen lag bei den β-Isoformen von NFATc1 und GFP keine Induzierbarkeit bzw. Inhibition vor. Besonders NFATc1/β zeigte eine konstante Expression unabhängig von der Art der

Stimulation, während GFP $\beta$  leichten Änderungen unterlag. Folglich korreliert - wie in Gesamtmilzzellen - auch in isolierten T-Zellen die Regulation des GFP-BAC Reporterkonstruktes gut mit der endogenen *Natc1* Genexpression.

#### 4.5.3 Korrelation der Proteinsynthese von NFATc1 und GFP in Milzzellkulturen

Proteinextrakte aus 24h Kulturen von Gesamtmilzzellen mit verschiedenen Stimulationen wurden isoliert und NFATc1 bzw. GFP nach SDS-PAGE mit entsprechenden Antikörpern detektiert (Abb.13), um die Korrelation in der Expression beider Gene auf Proteinebene zu untersuchen. Die NFATc1-Expression nach 24h Kultur mit ConA zeigte eine deutliche Induktion der kurzen Isoform NFATc1/A (78 kDa), welche durch CsA komplett inhibiert wurde. TPA/Iono führte zur starken Expression von NFATc1A, wobei auch die langen und mittleren Isoformen NFATc1/C (103 kDa) und B (89 kDa) verstärkt synthetisiert wurden.



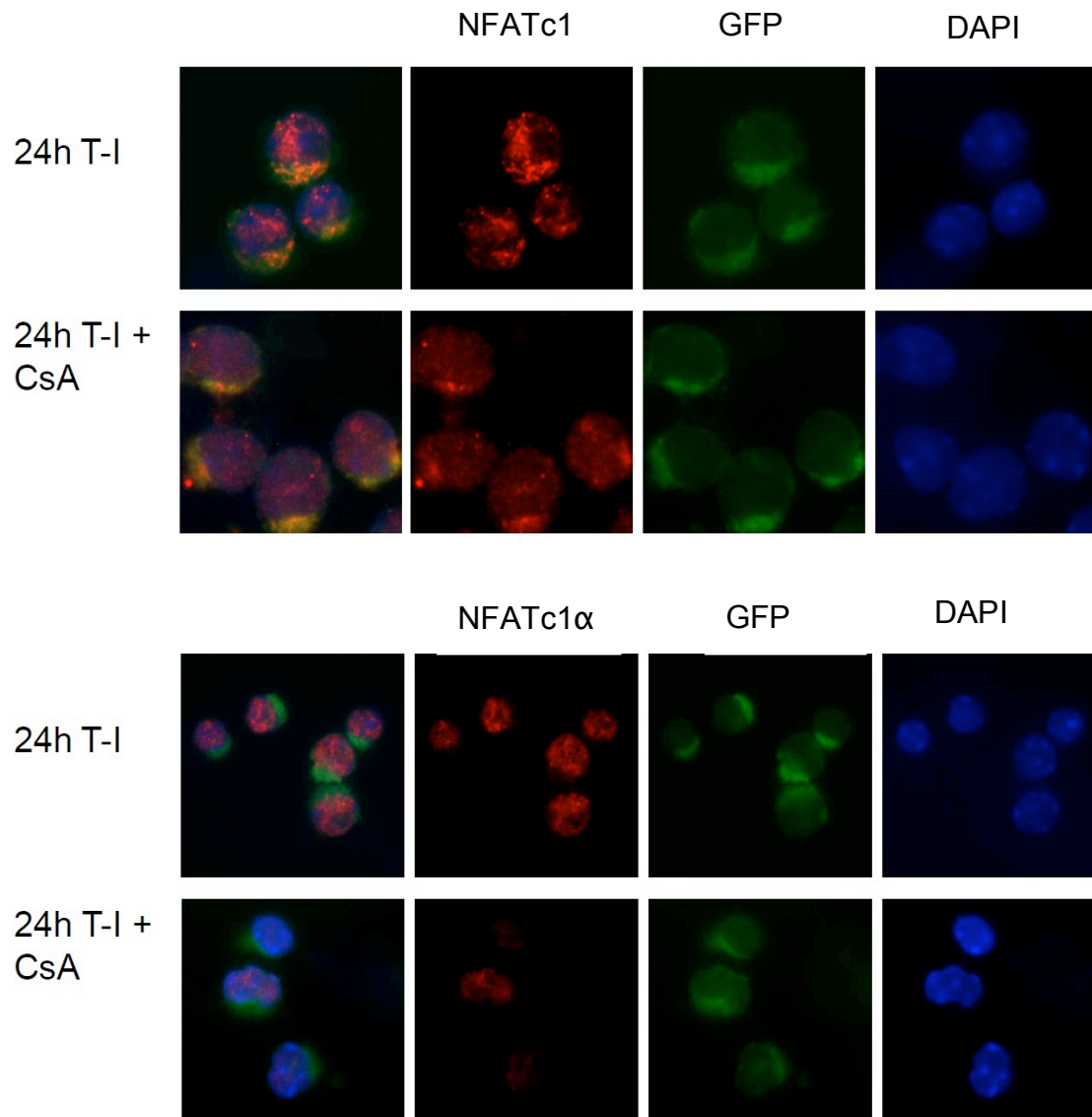
**Abb.13 In Gesamtmilzzellen korreliert die Expression von NFATc1 mit GFP.** Dargestellt ist NFATc1- und GFP-Protein aus Gesamtzellextrakten von Milzkulturen, entweder frisch isoliert zum Zeitpunkt 0h (1) oder nach 24h Stimulation mit ConA (2), ConA + CsA (3) oder TPA/Iono (4). In A wurden monoklonale Antikörper gegen NFATc1 bzw. GFP verwendet. In B wurden mit  $\alpha$ -Peptid spezifischen Antikörpern dieselben Membranen wie in A inkubiert.

Der GFP-Western Blot zeigte aus Proteinextrakten frisch isolierter Zellen zwei schwache Banden von 25 kDa und ca. 35 kDa, was im Bereich des 27 kDa Molekulargewichtes von GFP lag. Diese Banden waren - unabhängig von der Art der Stimulation - nach 24h Zellkultur verstärkt. Bei Behandlung mit ConA kam es zur Ausbildung einer weiteren Bande bei 28-30 kDa, die unter Einfluss von CsA nur schwach zu sehen war. TPA/Iono führte zur deutlich stärkeren Expression des in Spur 2 induzierten Signals und zur Ausbildung einer weiteren Bande bei 35 kDa. Inkubation der Membranen mit einem Antikörper, der spezifisch für das  $\alpha$ -Peptid von NFATc1 $\alpha$  war, zeigte die bereits im NFATc1 Western Blot vorhandenen Signale bei Stimulation mit ConA (2) und TPA/Iono (4), die der kurzen Isoform A entsprachen. Zusätzlich bildeten sich in den gleichen Spuren zwei Banden auf Höhe des Molekulargewichtes von GFP im Bereich von 30-35 kDa. Die Zuordnung zu den vier GFP-Banden zeigte, dass diese Signale des  $\alpha$ NFATc1-Antikörpers mit der nur durch TPA/Iono induzierbaren Bande des GFP Antikörpers übereinstimmt. Das positive Signal des  $\alpha$ NFATc1-Western Blots in Spur 2 und das Fehlen der entsprechenden Bande im GFP-Western Blot ließ sich durch die geringere Induktion der kurzen Isoform bei Stimulation mit ConA erklären. Die gebildete Menge an NFATc1/ $\alpha$ A ermöglichte zwar die Bindung von  $\alpha$ NFATc1-Antikörpern, war jedoch nicht ausreichend für GFP Antikörper, die vermutlich eine geringere Affinität aufwiesen. Von den insgesamt vier GFP-Banden zeigten somit zwei die gleiche Induktion wie die NFATc1-Genprodukte, d.h. Induktion von NFATc1-Proteinen durch ConA bzw. TPA/Iono und Inhibition durch CsA, während die anderen zwei Banden konstitutiv exprimiert wurden.

#### **4.5.4 Korrelation von NFATc1- und eGFP-Expression auf Einzel-Zellebene**

Um die Koexpression der NFATc1- und eGFP-Proteine auf Einzelzellebene zu analysieren wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen 24 h mit TPA/Iono mit bzw. ohne CsA inkubiert und Cytopspins mit Antikörpern gegen NFATc1 bzw. NFATc1 $\alpha$  gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop zeigten sich die nukleäre Translokation von NFATc1 bei Stimulation mit TPA/Iono sowie die starke Expression der kurzen Isoform im Kern (Abb.14). CsA führte zur deutlichen Reduktion der Signalintensität in

beiden Fällen. Wie bereits aus den FACS-Analysen (Abb.7, 8), in denen sich stets eine uniforme Population GFP positiver Zellen zeigte ersichtlich war, finden sich auch hier nur GFP-positive Zellen.



**Abb.14 Koexpression von NFATc1 und eGFP in CD4<sup>+</sup>-Zellen nach Stimulation mit TPA/Iono mit bzw. ohne CsA.** Färbung isolierter T-Zellen mit Antikörpern gegen NFATc1 und NFATc1 $\alpha$  zeigt die Induktion bzw. Inhibition der nukleären Translokation von NFATc1 sowie dessen positive Korrelation mit eGFP.

Aufgrund der geringeren Sensitivität des Fluoreszenzmikroskops konnten keine Unterschiede in der Intensität des eGFP-Signals bei den verschiedenen Stimulationen beobachtet werden. Beim Vergleich des Signals der NFATc1-

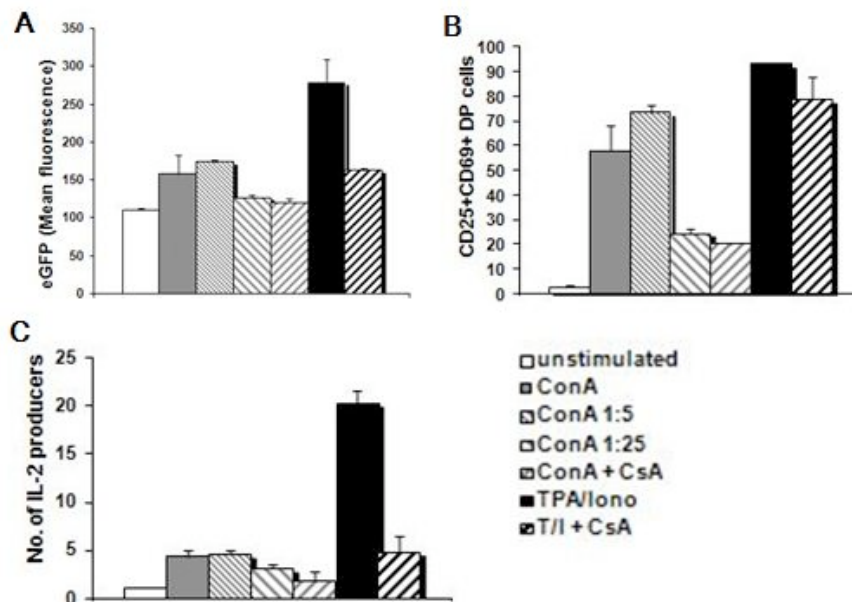
Antikörper mit den Änderungen der GFP-Fluoreszenz in der FACS-Analyse bei Stimulation von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten oder Gesamtmilzzellen mit ConA, TPA/Iono, bzw. Inhibition mit CsA zeigt sich die Korrelation der Expression beider Proteine. Da in keinem der Ansätze NFATc1-negative – d.h. nicht grüne Zellen - gefunden wurden, konnte eine Korrelation in diesem Fall nicht nachgewiesen werden.

#### **4.6 Die Korrelation der GFP-Expression mit Lymphozytenaktivierung und Zytokinproduktion**

##### **4.6.1 Die GFP-Expression korreliert bei Primärstimulation von Milzzellen mit der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zytokinproduktion**

Der IL-2-Promotor, als Prototyp eines NFATc1-Targets, verfügt über insgesamt fünf NFAT-Bindestellen (-45 bp bis -280 bp) und ist in seiner Expression, vermittelt über die NFAT-Bindung an die DNA, CsA sensitiv (Serfling et al., 1998; Rooney et al., 1995). Um die Abhängigkeit der GFP- und damit NFATc1-Expression von der Stimulationsstärke zu untersuchen wurden Milz-Zellkulturen 20 h mit verschiedenen ConA-Konzentrationen (5, 1 oder 0,2 µg/ml) oder TPA (10 ng/ml)/Iono (5 µM) mit oder ohne CsA (200 ng/ml) aktiviert. Gleiche Ansätze wurden zur Messung der CD25/CD69-Expression als Aktivierungsmarker und der Produktion von IL-2 verwendet. Die IL-2 Produktion wurde durch intrazelluläres FACS mit IL-2-Antikörpern gemessen. Die Zellen dieses Ansatzes wurden 6h vor der Färbung mit Brefeldin A behandelt. Mit ConA behandelte Zellen zeigten bei der Konzentration von 1 µg/ml tendenziell höhere Fluoreszenzwerte (0,7-facher Anstieg) als bei der Maximalkonzentration von 5 µg/ml (0,6-facher Anstieg), während die Verwendung von 0,2 µg/ml ConA keine Unterschiede zu nicht-stimulierten Zellen hervorrief. Die Kombination aus ConA und CsA verhinderte den Anstieg der GFP-Fluoreszenz in der 24h Kultur. TPA/Iono führte zur deutlichsten Zunahme der GFP-Expression um das 2,5- bis 3-fache. Dieser Effekt wurde durch CsA fast komplett verhindert und die Zunahme auf ca. das 0,5-fache reduziert (Abb. 16 A). Gleiches Verhältnis galt für die Expression der Aktivierungsmarker CD25/69 (Abb. 16 B). Der Anteil CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> doppelpositiver Zellen an der Gesamtpopulation hatte ein Maximum von 93 Prozent bei der Stimulation mit TPA/Iono und wurde durch

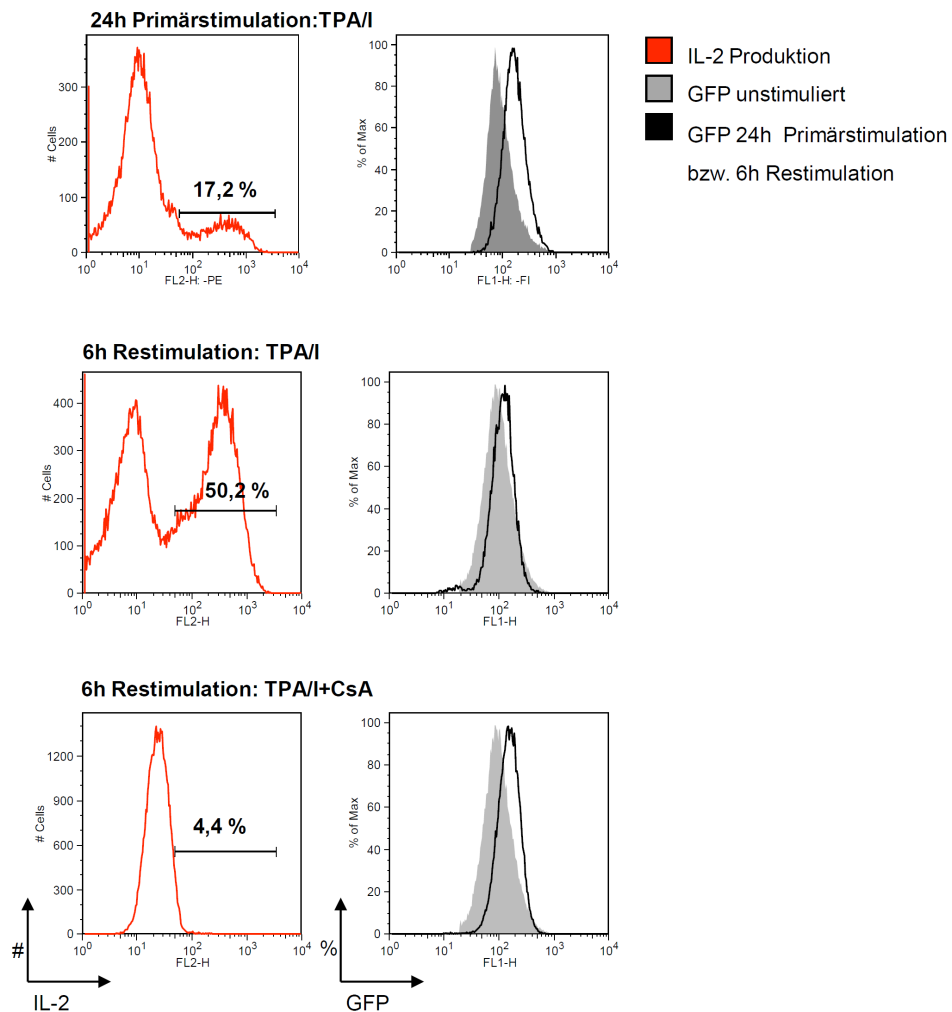
den inhibitorischen Effekt von CsA auf 78 Prozent reduziert. Die Verdünnungsreihe von ConA führte zu Anteilen von 58, 73 und 24 Prozent, mit CsA von 20 Prozent. In der Kultur mit TPA/Iono produzierten nach 24h 20 Prozent der Zellen IL-2. Unter dem Einfluss von CsA fiel dieser Anteil auf 5 Prozent (Abb. 16 C). Die Stimulation mit ConA führte zu einem geringen Anstieg der IL-2-Produktion von 1 Prozent in nicht stimulierten Zellen auf 3-4 Prozent unter Stimulation. Die GFP-Fluoreszenz zeigte somit quantifizierbare Veränderungen, die mit der Aktivierung von Lymphozyten und der IL-2-Produktion korrelierten.



**Abb.16 Die GFP-Expression in Milzzellkultur korreliert mit der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zytokinproduktion.** Darstellung der stimulationsabhängigen GFP-Expression, gemessen an der mittleren Fluoreszenz (A), Expression der Aktivierungsmarker CD25/CD69 (B) und IL-2 Produktion (C), jeweils in prozentualen Anteilen an der Gesamtpopulation. Die Analyse erfolgte mit 24h Kulturen von Gesamt-Milzzellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen: ConA (5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,2 µg/ml), ConA (1 µg/ml) + CsA (200 ng/ml), TPA (10 ng/ml)/Iono (0,5 µM), TPA/Iono + CsA.

#### 4.6.2 Milzzellen zeigen bei Restimulation einen hohen Anteil an IL-2 Produzenten, aber keine Zunahme der GFP-Fluoreszenz

Neben der Induktion von NFATc1 bei Primärstimulation ist vor allem die hohe Expression der kurzen Isoform durch Restimulation von T-Effektorzellen ein wichtiges Merkmal ihrer Genregulation (Chuvpilo et al, 1999). Die Aktivität des IL-2-Promotors, als typisches Target von NFATc1 (Serfling et al., 1989), wurde anhand der IL-2-Produktion zusammen mit der GFP-Fluoreszenz untersucht.



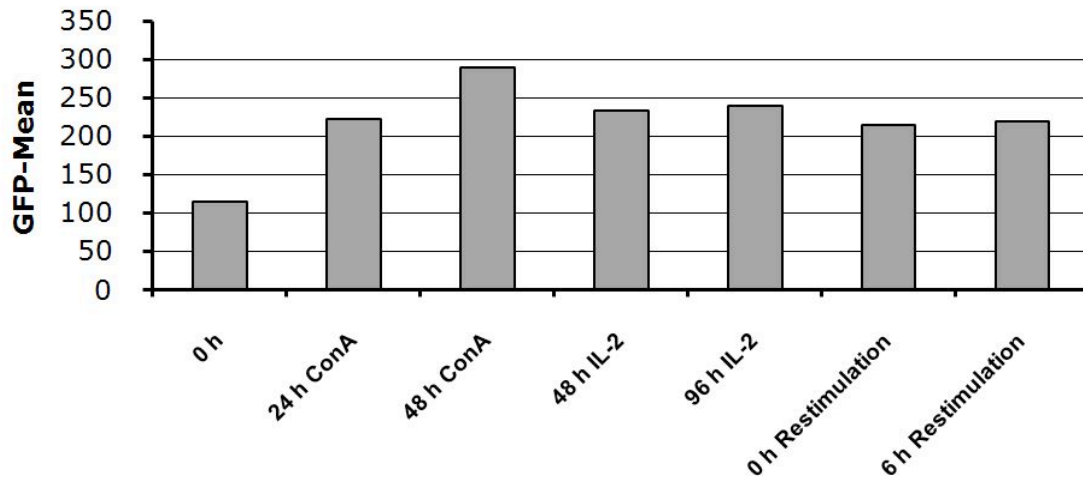
**Abb.17 Starke Induktion der IL-2 Produktion bei Restimulation von Gesamtmilzzellen, bei fehlender Zunahme der GFP-Fluoreszenz.** Darstellung der IL-2-Produktion durch intrazelluläres FACS bei Primärstimulation (TPA/Iono) sowie bei Sekundärstimulation unter TPA/Iono mit oder ohne CsA. Die Messung der zugehörigen GFP-Fluoreszenz erfolgte an nicht fixierten Zellen aus denselben Ansätzen.



Bei Stimulation mit TPA/Iono zeigten frisch isolierte Milzzellen einen Anteil an IL-2 Produzenten von 17,2 % der Gesamtpopulation sowie eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz. Zellen wurden weitere 24 h mit gleicher Stimulation kultiviert, wobei nach insgesamt 48 h keine signifikante Zunahme der IL-2 Produktion mehr zu beobachten war. Nach fünftägiger Expansion durch IL-2 in X-Vivo-Medium folgte die 6h Restimulation mit Erhebung der gleichen Parameter. Der unter diesen Bedingungen typischerweise hohe Anteil an Effektorzellen spiegelte sich in der ausgeprägten IL-2-Produktion bei Stimulation mit TPA/Iono wider (50,2 % der Population), während unter Einfluss von CsA die Zytokinproduktion fast vollständig aus blieb. Trotz der verstärkten Zellaktivierung wurde keine Änderung der GFP-Fluoreszenz beobachtet. Diese bewegte sich auf dem Niveau unstimulierter Zellen.

#### **4.6.3 Die GFP-Expression im Kulturverlauf**

Wie bereits dargestellt konnte eine Zunahme der GFP-Expression bei Primärstimulation sowie eine Korrelation mit Aktivierungsmarkern und Zytokinproduktion (4.6.1) aufgezeigt werden, während in der Restimulation ein analoges Verhalten ausblieb (4.6.2). Zwischen beiden Stimulationen erfolgt über einen Zeitraum von 3-5 Tagen die Ruhephase der Kultur, in der die Zellexpansion durch exogenes IL-2 sowie die verbleibende Restaktivität der Lymphozyten aufrecht erhalten wird. Die GFP-Fluoreszenz in Gesamtmilzzellen wurde über den gesamten Zeitraum gemessen. Der Zunahme der GFP-Expression um das 2-fache nach 24 h und fast das 3-fache nach 48 h Stimulation mit ConA folgt ein leichter Abfall, der sich nach 4 Tagen IL-2 Kultur noch auf Niveau der 24 h Stimulation befindet. Ein Effekt bei Restimulation blieb aus.



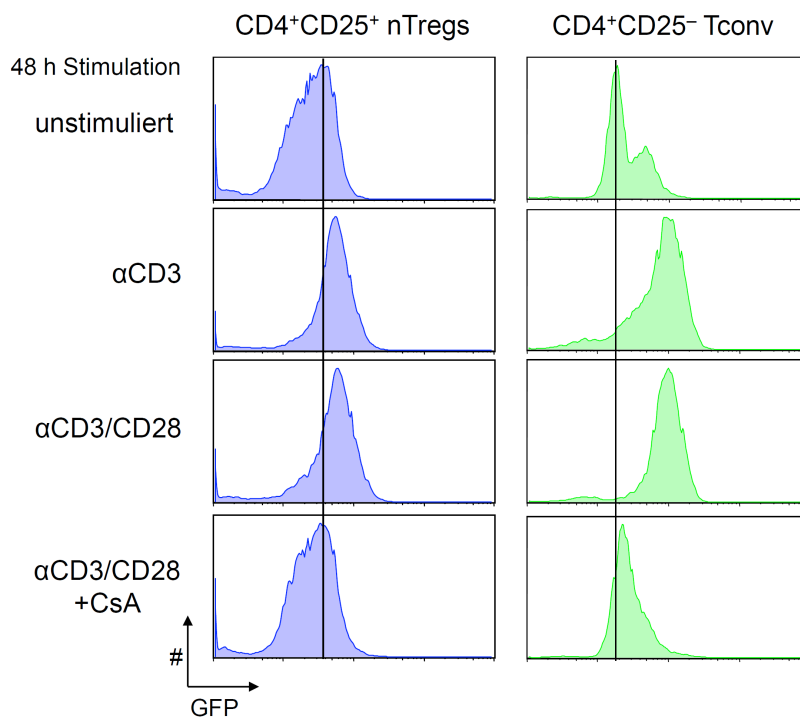
**Abb.18 GFP-Expression der Zellkultur.** Darstellung der Änderungen der GFP-Fluoreszenz bei Primärstimulation mit ConA für 48h, Expansion mit IL-2 für 4 Tage und Restimulation mit TPA/Iono für 6 h.

## 4.7 Die Analyse der GFP-Expression in Subpopulationen von T-Lymphozyten

### 4.7.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs zeigen eine stark abgeschwächte GFP-Induktion bei Stimulation mit $\alpha$ CD3/CD28

Natürliche regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs) sind im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tconv) durch die hohe Konzentration des Transkriptionsfaktors FoxP3 und niedrige NFATc1-Expression charakterisiert (Sumpter et al., 2008; Toergerson et al., 2009). Die unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren ermöglichten die Trennung der CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen über Säulenaufreinigung im Magnetfeld und 48h Kultivierung unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit plattengebundenen  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern. Ausgehend von der GFP-Fluoreszenz unstimulierter Zellen zeigten T-Effektorzellen in Abhängigkeit der Stärke des Stimulus einen entsprechend starken Anstieg der Intensität. Die Kultivierung mit  $\alpha$ CD3/CD28 führte zur Ausbildung einer uniformen Population mit hoher GFP-Expression. Ohne Kostimulation wurden ähnlich hohe Fluoreszenzwerte erreicht, jedoch mit einem größeren Anteil von Zellen mit niedriger Fluoreszenz und einem breiteren Kurvenverlauf im Diagramm. Die Zunahme der GFP-Fluoreszenz wurde mit

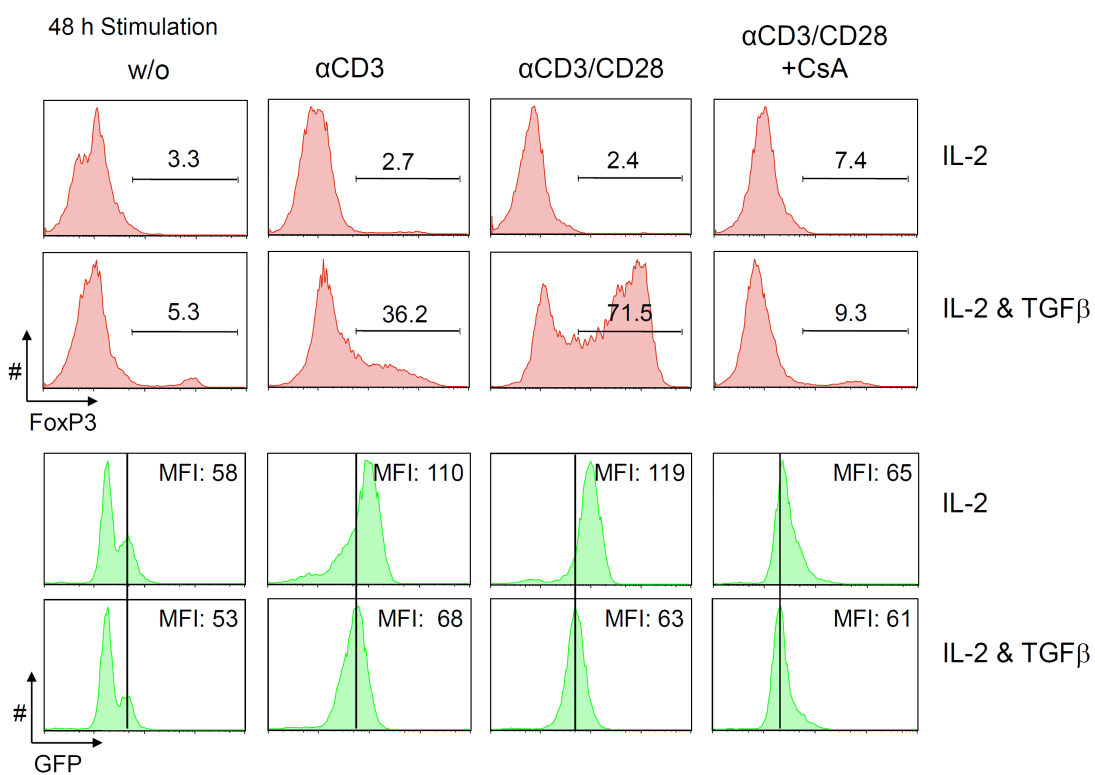
CsA komplett verhindert. Regulatorische T-Zellen zeigten wesentlich geringere Veränderungen der GFP-Expression. Plattengebundene  $\alpha$ CD3-Antikörper führten mit oder ohne  $\alpha$ CD28 nur zur sehr geringen Zunahme der Fluoreszenz, während Zellen unter Einfluss von CsA keinen Unterschied zu unstimulierten nTregs zeigten. Die Zunahme der NFATc1-Expression bei Stimulation von Tcons, im Gegensatz zur gleichbleibenden Expression von NFATc1/c2 in nTregs (Sumpter et al., 2008), ebenso wie die deutlich schwächere nukleäre Translokation von NFATc1 in nTregs (Vaeth et al., unveröffentlichte Daten) wird somit durch analoge Veränderungen der GFP-Fluoreszenz widergegeben.



**Abb.19 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs zeigen unter Stimulation eine deutlich geringere Zunahme der GFP-Fluoreszenz als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tconv.** FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz von nTregs und Tconv nach 48 h Kultur ohne Stimulation oder nach Stimulation mit Platten-gebundenen Antikörpern  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD3/CD28 oder mit  $\alpha$ CD3/CD28 + CsA.

#### 4.7.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> iTregs zeigen eine stark abgeschwächte GFP-Induktion bei Stimulation mit $\alpha$ CD3/CD28

Während CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs im Rahmen der T-Zellentwicklung aus dem Thymus abstammen, können sogenannte induzierte regulatorischer T-Zellen (iTregs) durch Stimulation von naiven T-Lymphozyten mit  $\alpha$ CD3/CD28 unter Einfluss der Zytokine IL-2 und TGF- $\beta$  erzeugt werden (Walker et al, 2005).



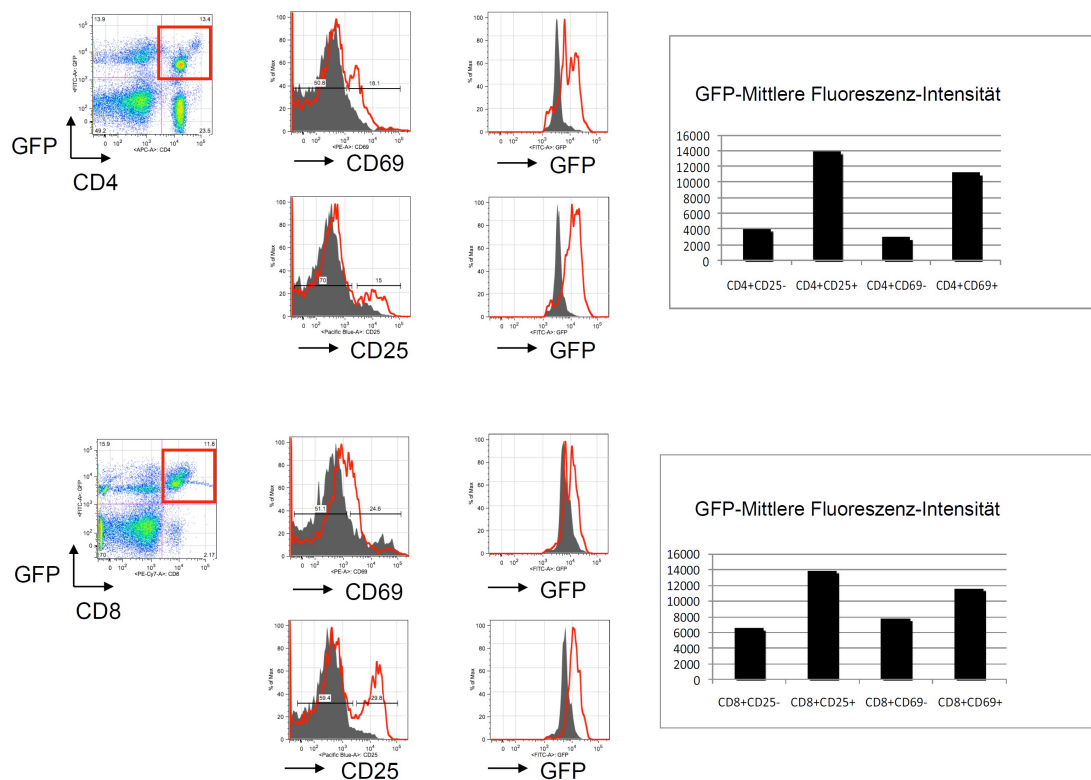
**Abb.20 Die Induktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> iTregs führt zu einem deutlich geringeren Anstieg der GFP-Fluoreszenz verglichen mit konventionellen T-Zellkulturen.** A, FACS-Analyse der Induktion der Foxp3-Expression durch 48 h Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 und IL-2 + TGF- $\beta$ . B, Zunahme der GFP-Fluoreszenz in konventionellen T-Zellen unter Stimulation und IL-2, während TGF- $\beta$  behandelte Populationen mit hohen Anteilen von iTregs (IL-2 + TGF- $\beta$ ) fast keine Zunahme zeigen. Das hier gezeigte Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Martin Vãth durchgeführt.

Bei 48h Stimulation mit  $\alpha$ CD3 zeigten 36,2 bzw. 71,5 Prozent der Zellen die Expression von Foxp3 als Treg-Marker. Ohne TGF- $\beta$  erfolgte keine Expression

von Foxp3. Die somit entstandenen T-Zellkulturen aus konventionellen Effektorzellen und iTregs zeigten wie die entsprechenden isolierten Subpopulationen eine unterschiedliche GFP-Expression, die mittels FACS analysiert wurde. Die Aktivierung des T-Zellrezeptors unter Einfluss von IL-2 führte in diesem Experiment zur Zunahme der GFP-Fluoreszenz um das Zweifache und wurde durch CsA inhibiert. Die Induktion regulatorischer T-Lymphozyten durch IL-2 + TGF- $\beta$  zeigte demgegenüber keine wesentlichen Veränderungen der Fluoreszenzintensität.

#### **4.7.3 Alloreaktive CD25<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup> T-Zellen zeigen eine erhöhte GFP Expression *in vitro***

Um eine selektive Aktivierung einzelner Zellpopulationen *in vitro* zu erreichen wurde zur Simulation einer Abstoßungsreaktion („Graft versus Host Reaction“) eine „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR) durchgeführt. Die Aktivierung alloreaktiver, GFP positiver T-Zellen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) der Reportermause (B6) erfolgte durch T-Zell-depletierte Milzzellen (BalbC) in der allogenen Reaktion. Als Negativkontrolle wurde eine syngene MLR mit T-Zellen der B6-Reportermaus und depletierten Milzzellen einer B6-Wildtypmaus verwendet. Die Identifikation der Population alloreaktiver T-Zellen erfolgte anhand der GFP-Fluoreszenz sowie der Expression von Aktivierungsmarkern (CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>). Die syngene MLR als Negativkontrolle wurde entsprechend analysiert. Nach 72h zeigten sich aktivierte (CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Zellen in den allogenen Reaktionen. Die Analyse der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität dieser Zellen zeigte eine deutliche Induktion im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen. Der deutlichste Anstieg der Intensität um das Drei- bis Vierfache war bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>- Zellen zu beobachten, während die GFP-Fluoreszenz der CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>- Zellen um ca. eineinhalb bis zweifach zunahm.

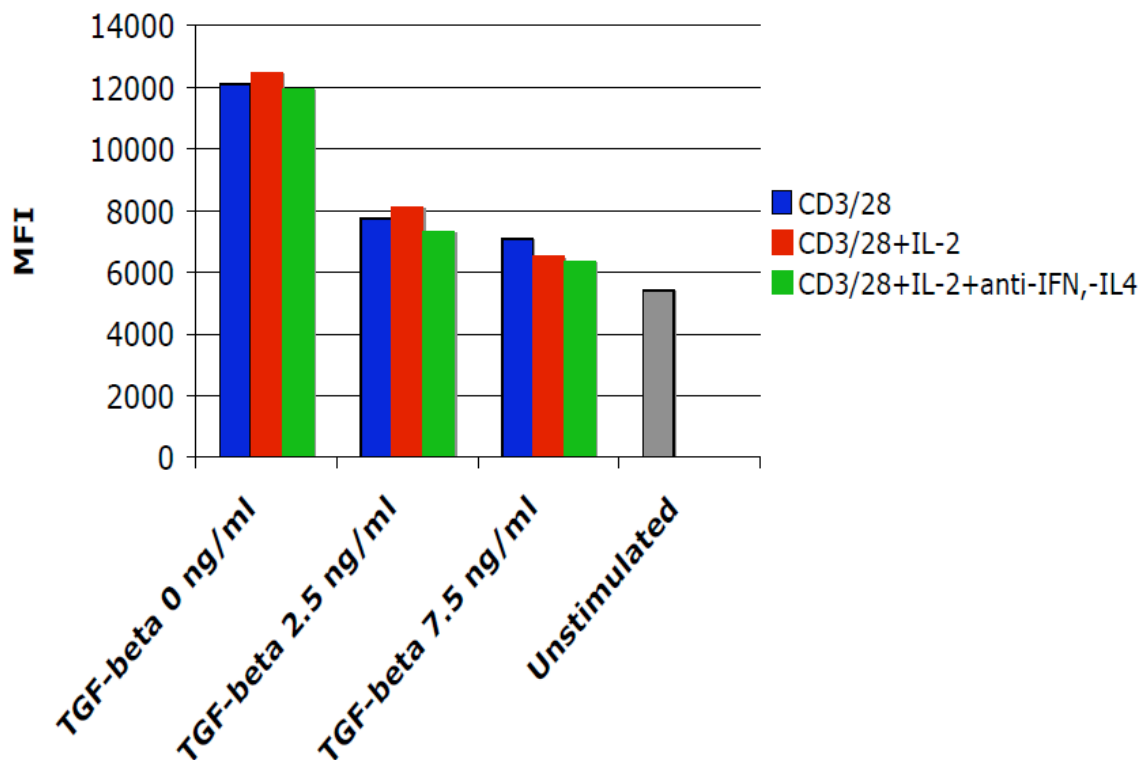


**Abb.21 Deutliche Induktion der GFP-Expression in alloreaktiven CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen in Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) *in vitro*.** Identifikation der Population der Responderzellen durch GFP-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Expression. Der Vergleich der CD25<sup>+</sup> und CD25<sup>-</sup> sowie CD69<sup>+</sup> und CD69<sup>-</sup> T-Zellen zeigt eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz bei Aktivierung.

#### **4.7.4 TGF- $\beta$ inhibiert die Zunahme der GFP-Expression in aktivierten T-Zellen**

Die Bindung von TGF- und NFAT an eine hoch konservierte Enhancer-Region des *FoxP3*-Gens führt zur Demethylierung und initialen Induktion von FoxP3, wobei sich die Smad3-Bindung im wesentlichen auf die ersten 12 h der CD4<sup>+</sup>-Stimulation beschränkt, während die NFAT-Aktivität zur Aufrechterhaltung der Foxp3-Expression beiträgt (Tone et al., 2007). FoxP3 wiederum inhibiert die Expression von NFATc1 (Torgerson et al., 2009). Um die Rolle von TGF- $\beta$  auf die NFATc1-Expression zu untersuchen wurde die Änderung der GFP-Fluoreszenz unter verschiedenen TGF- $\beta$ -Konzentrationen gemessen. Die

Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit TGF- $\beta$  und  $\alpha$ CD3/CD28 Antikörpern zeigte nach 72h Kultur eine Sensitivität der GFP-Fluoreszenz-Intensität gegenüber TGF- $\beta$ . Während ohne TGF- $\beta$  die Aktivierung des T-Zellrezeptors durch Antikörper unter verschiedenen Kulturbedingungen eine vergleichbare Zunahme der GFP-Expression bewirkte, wurde der Anstieg der Fluoreszenz durch 2,5 ng/ml TGF- $\beta$  um ca. 40% reduziert. 7,5 ng/ml TGF- $\beta$  führten zu einer weiteren Abnahme der GFP-Expression auf annähernd das Niveau unstimulierter Zellen.

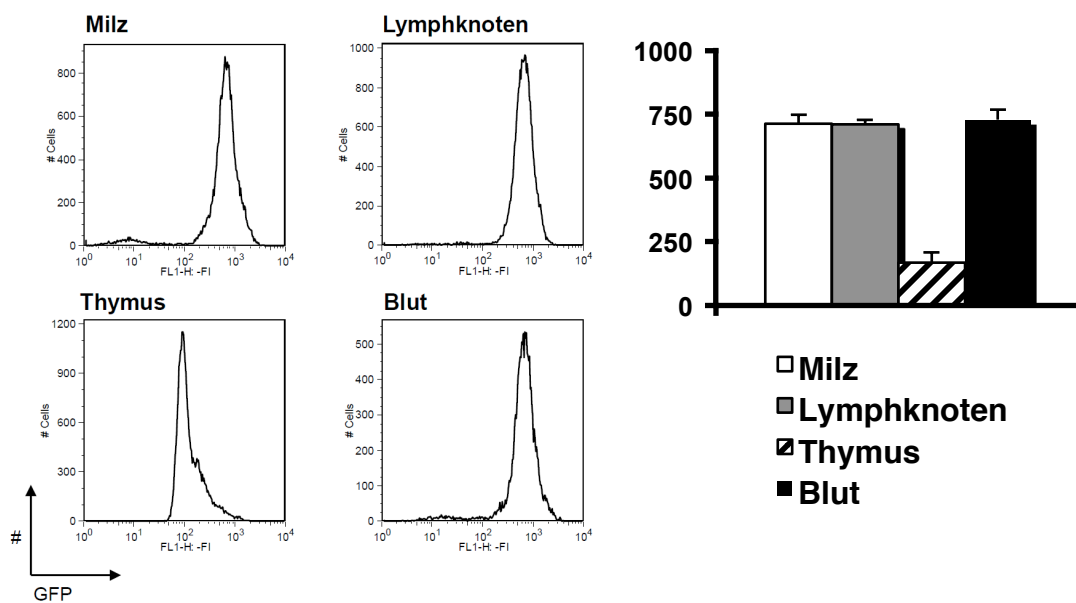


**Abb.22 Konzentrationsabhängige Inhibition der GFP-Induktion durch TGF- $\beta$ .** Vergleichbare Zunahme der GFP-Fluoreszenz bei Stimulation von CD4<sup>+</sup>-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern unter verschiedenen Kulturbedingungen und ebenso einheitliche Reduktion der GFP-Fluoreszenz durch TGF- $\beta$ .

## 4.8 Die GFP-Expression in Thymozyten

### 4.8.1 Thymozyten zeigen die schwächste mittlere GFP-Fluoreszenz

Neben dem Vergleich der Mauslinien untereinander war vor allem die GFP-Expression in lymphatischen Organen von Interesse. Hierfür wurden Zellen aus Milz, Lymphknoten, Thymus, Blut und Knochenmark isoliert und durch FACS analysiert. Die in Milz, Lymphknoten und Blut enthaltenen Zellen zeigten vergleichbare mittlere Fluoreszenzwerte während Thymozyten eine deutlich geringere Intensität aufwiesen, was Anlass zur weiteren Analyse der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Thymozyten-Subpopulationen gab.

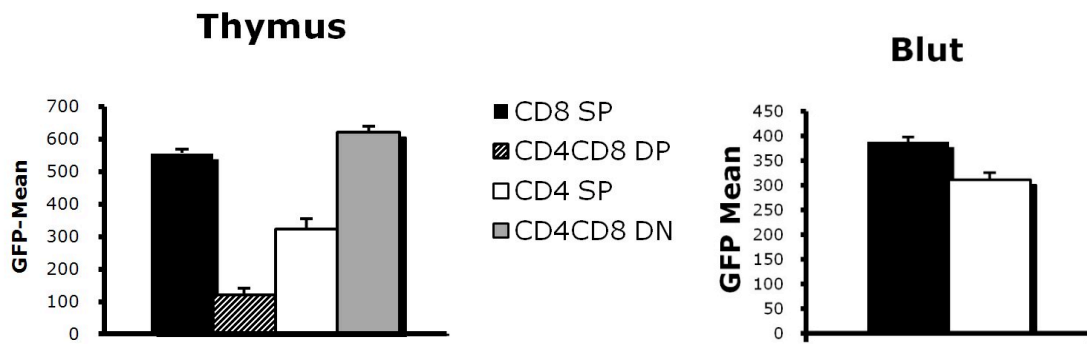


**Abb.23 Thymozyten zeigen die schwächste GFP-Fluoreszenz verglichen mit den Zellen anderer lymphatischer Organe.** Darstellung der FACS-Daten der GFP-Fluoreszenz von Zellen der Milz, der Lymphknoten, des Thymus und des Blutes von NFATc1 BAC-Reportermäusen sowie deren mittlerer Fluoreszenzintensität.



#### 4.8.2 FACS-Analyse der GFP-Expression in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> – Populationen aus Thymus und peripherem Blut

Aufgrund der deutlich geringeren GFP-Expression von Thymozyten - verglichen mit den Zellen anderer lymphatischer Organe - erfolgte die Analyse der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen, um Hinweise auf die Rolle von NFATc1 bei der Entwicklung von T-Lymphozyten zu gewinnen. Nach der Migration der T-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark in den Thymus durchlaufen diese verschiedene Stadien der Rezeptorexpression. Ausgehend von Pro-T-Zellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN), die in ihrer Reifung definierte Differenzierungs-Stufen durchlaufen (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> → CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> → CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> → CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>), exprimieren Prä-T-Zellen die  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors. In Assoziation mit der prä- $\alpha$ -Kette entsteht der prä-T-Zell-Rezeptor-Komplex, und nach Rekombination des  $\alpha$ -Genlokus bilden überlebende Thymozyten als CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP-Zellen beide Korezeptoren auf der Zellmembran. Im Rahmen der positiven und negativen Selektion entstehen je nach MHC-Restriktion CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (zur Übersicht siehe Rothenberg und Taghon, 2005). Hier scheint vor allem NFATc3 im Prozess der positiven Selektion und beim Überleben CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>DP Thymozyten eine wichtige Rolle zu spielen (Oukka et al., 1998), während NFATc1 zur Expansion in DN-Zellen (CD 25<sup>low/-</sup>CD44<sup>-</sup>), als unmittelbare Vorstufe der DP-Thymozyten, benötigt wird (Yoshida et al., 1998). Die Untersuchung der GFP-Expression in Lymphozyten erfolgte durch Färbung frisch isolierter Zellen mit fluoreszenzmarkierten CD4- und CD8-Antikörpern und FACS-Analyse. In CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN Zellen lag eine deutlich höhere GFP-Expression vor als in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP Zellen (ca. sechsfach). Die starke Hochregulation in DN Thymozyten lässt vermuten, dass NFATc1 zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren - wie dem T-Zell-Faktor-1-Gene (TCF-1) oder der Rho-GTPase - ein wichtiger Faktor der T-Zell-Entwicklung ist (Verbeek et al., 1995; Galandrini et al. 1997).



**Abb.24 GFP-Fluoreszenz der CD4/CD8 Populationen im Thymus sowie im peripheren Blut.** CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DN Zellen zeigen eine deutlich stärkere GFP-Expression als CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DP Zellen, und CD8<sup>+</sup> SP Leukozyten zeigen eine stärkere GFP-Fluoreszenz als CD4<sup>+</sup> SP Zellen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Bei Primärstimulation reflektiert die GFP-Expression die Induktion von NFATc1

Charakteristisches Merkmal der NFATc1-Expression ist die starke Induktion des Gens nach antigener Stimulation von Lymphozyten bzw. nach Induktion mit TPA/Iono oder  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern. Durch positive Autoregulation wird vor allem NFATc1/A hoch exprimiert (Zhou et al., 2002; Chuvpilo et al., 2002). NFATc1/B und C werden vor allem durch P2 reguliert, welcher nicht von NFAT gebunden wird und somit keiner positiven Regulation unterliegt. Cyclosporin A inhibiert über Calcineurin diesen Verstärkermechanismus der kurzen Isoform, so dass die NFATc1/A-Expression auf das Niveau ruhender Lymphozyten herab reguliert wird (Serfling et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden transgene Reportermause untersucht, die die GFP-cDNA unter der Kontrolle der Promotoren P1 und P2 von NFATc1 exprimieren, was die Analyse der NFATc1-Expression auf Einzelzellebene anhand der GFP-Fluoreszenz im FACS erlaubt. Um die Regulation des *Nfatc1*-Gens möglichst genau durch das GFP abbilden zu können, beschränkte sich die Analyse auf Mauslinien, die über das komplett integrierte BAC-Konstrukt verfügten (BAC1, BAC3). Bei Primärstimulation von Gesamtmilzzellen bzw. T-Lymphozyten durch TPA/Iono, ConA bzw. CD3/CD28-Antikörper zeigten sich die Induktion der GFP-Fluoreszenz im FACS sowie die Sensitivität gegenüber CsA (Abb.8, 13). In Gesamtprotein-Extrakten aus Milzzellen führte 24h Stimulation mit ConA und TPA/Iono zu einer deutlichen Zunahme der NFATc1-Expression (Abb.10, A). Die Ergebnisse konnten durch einen spezifischen NFATc1 $\alpha$ -Antikörper bestätigt werden, der das  $\alpha$ -spezifische Peptid erkennt (Abb.10, B). Beim Vergleich mit den FACS-Daten geht die Induktion von NFATc1 bzw. NFATc1 $\alpha$  mit einer erhöhten GFP-Fluoreszenz einher. Entsprechend werden die Zunahme der NFATc1-Expression auf Proteinebene und der Anstieg der GFP-Fluoreszenz durch die Behandlung mit CsA supprimiert. Die Darstellungen des GFP durch Western Blots zeigen stets 2-4 Banden unterschiedlicher Größe, von denen eine durch ConA und TPA/Iono induzierbar bzw. durch CsA

supprimierbar ist. Diese Bande von 34 kDa konnte mittels  $\alpha$ -spezifischer Antikörper als NFATc1 $\alpha$ -GFP Fusionsprotein identifiziert werden (Abb.10, B, Spuren 2 und 4). Bei einer eGFP-cDNA-Sequenz von 795 bp ergibt sich ein Molekulargewicht des eGFP von 29,4 kDa. Zusammen mit Exon 1 (127 bp) lässt sich für das NFATc1 $\alpha$ -eGFP-Fusionsprotein eine Größe von ca. 34,1 kDa berechnen. Dieses Molekulargewicht stimmt genau mit der, von den  $\alpha$ NFATc1 $\alpha$ - und  $\alpha$ GFP-Antikörpern erkannten Bande überein. Das Fusionsprotein dessen Expression unter der Kontrolle des P2 Promoters liegt (NFATc1 $\beta$ -eGFP), besitzt ein Gewicht von ca. 32,5 kDa. Dies entspricht der zweiten Bande (ca. 32 kDa), die nicht durch den NFATc1 $\alpha$ -Antikörper identifiziert wird. Hier liegt ebenfalls eine leichte Stimulationsabhängigkeit vor. Die übrigen zwei Banden (27 kDa, 37 kDa), die durch den GFP-Antikörper dargestellt wurden, werden unter Kulturbedingungen unabhängig von der Art des Stimulus verstärkt exprimiert. Hierbei handelt es sich womöglich um Splicevarianten des Konstrukts.

Weitere Unterschiede in der Regulation von NFATc1 und dem BAC-Konstrukt könnten durch das Fehlen wichtiger Regulationsabschnitte des NFATc1-GFP-Fusionsproteins entstehen. So fehlen dem Reporterkonstrukt große Anteile des endogenen *Nfatc*-Gens, das mit dem 3'-Ende und den Poly-A-Signalen über wichtige Domänen verfügt, welche die Regulation auf mRNA- und Protein-Ebene im Hinblick auf Molekülstabilität z.B. Ubiquitylierung steuern können. Um die GFP-Expression genauer den einzelnen Promotoren zuordnen zu können, wurden semiquantitative RT-PCRs aus Gesamt-Milzzellen und isolierten CD4<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt (siehe Abb.9 und 10). Hier werden besonders die Korrelation von NFATc1 $\alpha$  mit dem NFATc1 $\alpha$ -GFP Fusionsprotein deutlich (Ex 1-3, Ex1-GFP) sowie die konstitutive Expression der  $\beta$ -spezifischen Isoformen (Ex2-3, Ex2-GFP). Die Daten auf Gesamtzell-Niveau werden von Bildern der Doppelfärbung von NFATc1 und GFP in CD4<sup>+</sup>-Zellen untermauert. Wie bereits in FACS-Analysen lebender Zellen zu erkennen war sind alle Leukozyten GFP-positiv. Das ebenfalls in allen stimulierten T-Lymphozyten detektierbare Signal des NFATc1- bzw. NFATc1 $\alpha$ -Antikörpers lässt eine positive Korrelation vermuten. Die Färbung stimulierter T-Zellen mit zwei Antikörpern gegen NFATc1 und NFATc1 $\alpha$  zeigt in allen Zellen die

Induktion und nukleäre Translokation bei Stimulation mit TPA/Iono bzw. die Inhibierung des Kerntransportes durch CsA. Aufgrund der geringeren Sensitivität des Fluoreszenzmikroskops können jedoch keine Aussagen über Intensitätsunterschiede des GFP getroffen werden. Zusätzlich führt die Fixierung der Zellen zur leichten Abschwächung des GFP-Signals. Während die Stimulation der gesamten Population von Milzzellen bzw. T-Lymphozyten zur einheitlichen Zunahme der GFP-Fluoreszenz führt, kann in „Mixed Lymphocyte Reactions“ selektiv die GFP-Induktion in aktivierten, alloreaktiven T-Lymphozyten gemessen werden. Diese zeigen eine hohe Expression von CD25 und CD69 und eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz um das Drei- bis Vierfache (Abb.19). Dies veranschaulicht zum einen die Rolle von NFATc1 für die Effektorfunktion von aktivierten T-Zellen, zum anderen die Beteiligung an Abstoßungsreaktionen von Organtransplantaten. So wird bei Nierentransplantationen durch die Therapie mit CsA bzw. FK-506 die NFATc1-Aktivität gehemmt (Sommerer et al., 2010). Der Vergleich der GFP-Fluoreszenz mit der IL-2-Produktion und der Expression von Oberflächenmarkern (CD25/CD69) in der Primärstimulation zeigte ebenfalls regulatorische Gemeinsamkeiten von NFATc1 und GFP auf. Der IL-2-Promotor als Prototyp eines NFATc1-Targets mit nachgewiesenen NFAT-Bindestellen und Integration in typische NFAT-Signalwege – wie dem Calciumsignal und den TCR-Signalen – kontrolliert über sein Genprodukt die Zellproliferation (T-cell growth factor). Während naive T-Zellen einen IL-2-Rezeptor mit niedriger Affinität ( $IL-2R\alpha\beta\gamma_c$ ) exprimieren, kommt es durch die Assoziation einer zusätzlichen  $\alpha$ -Kette (CD25) einige Stunden nach Beginn der IL-2-Produktion zur Ausbildung von Rezeptoren hoher Affinität ( $IL-2R\alpha\beta\gamma_c$ ). Dies ermöglicht im Rahmen der Immunantwort die klonale Expansion und Differenzierung und sichert das Überleben aktivierter T-Lymphozyten durch eine autokrine Stimulation durch IL-2 (Smith, 1988; Schluns et al., 2003). CD69 stellt zusammen mit dem CD40Liganden einen der ersten Rezeptoren dar, die bei der Aktivierung von Lymphozyten exprimiert werden (Lopez-Cabrera et al., 1993). Die Stimulation durch TPA/Iono induziert den höchsten Anteil an IL-2-Produzenten von 20 % sowie die höchste CD25/CD69 Expression (90 %), was mit dem deutlichsten Anstieg der GFP-Fluoreszenz um bis auf das Dreifache einhergeht (Abb.14).

Das für die NFATc1-Aktivierung notwendige Calciumsignal wird über Ionomycin vermittelt, welches zur Freisetzung von  $IP_3$  und zum Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt (Chatila et al., 1989). Durch TPA wird über den Ras/Raf/Rac-Signalweg die weitere Verstärkung der NFATc1-Aktivität erreicht (Castagna et al., 1982; Avots et al., 1999), so dass die Kombination beider Pharmaka den stärksten Effekt auf die Induktion von *Nfatc1* bzw. GFP hat. Das Kriterium der CsA-Sensibilität wird in diesem Kontext ebenfalls erfüllt, wobei der negative Effekt des Immunsuppressors auf die CD25/CD69-Rezeptorexpression nur temporär ist und somit stark den Kulturbedingungen unterliegt bzw. durch Aktivierung von CD28-Signalwegen vermindert wird (Redelman, 1988; June et al., 1987). Die geringere Zunahme der GFP-Expression im Rahmen der ConA-Stimulation korreliert mit einem entsprechend niedrigeren CD25/CD69 - Rezeptorstatus sowie geringerer IL-2 Produktion. So wird die GFP-Signalintensität bei ConA- und vor allem TPA/Iono-Stimulation stärker und unter CsA-Hemmung geringer.

## 5.2 Fehlende Induktion von GFP bei Restimulation

Neben der Induzierbarkeit bei Primärstimulation naiver T-Lymphozyten, ist die schnell induzierbare, starke Expression von NFATc1/ $\alpha A$  eine Besonderheit, die den Transkriptionsfaktor von den anderen Mitgliedern der NFAT-Familie unterscheidet. Bei erneuter Stimulation kommt es nach der Expansion der Zellkultur, zur Translokation bereits bestehender NFATc1-Moleküle in den Kern und zur starken Aktivierung von Zielgenen, darunter der *NFATc1*- und *IL-2*-Gene (Serfling et al., 2006). Eine weitere Ursache der starken Zytokinexpression stellt schnelleres Remodelling der DNA bei Restimulation – verglichen mit Primärstimulation – dar. Diese Strukturveränderungen, welche über verschiedene Transkriptionsfaktoren und epigenetische Veränderungen induziert werden, treten im Promotorbereich des *IL-2* Gens, das die Nukleotide von Position -300 bis -14 umfasst, auf und ermöglichen eine hohe Genexpression (Rao et al., 2001). Vergleichbare Prozesse laufen bei vielen weiteren Genen in Eukaryonten ab und könnten ebenfalls zur verstärkten

Induktion von NFATc1/ $\alpha$ A führen. Während die starke Induktion der kurzen Isoform von NFATc1 bei Restimulation mit TPA/Iono für 6 h über Western Blot nachgewiesen werden konnte (Daten nicht abgebildet), konnte bei Analyse des GFP keine Zunahme der Fluoreszenzintensität im FACS gemessen werden (Abb.15). Einen weiteren Beleg der suffizienten Restimulation liefert die Analyse der IL-2 Produktion durch intrazelluläres FACS bei Anteilen von 50 % an IL-2-Produzenten in der Gesamtpopulation, verglichen mit 17 % bei Primärstimulation. Desweiteren geht die GFP-Expression während der Proliferationsphase unter IL-2-Einfluss nicht wie das NFATc1 zurück, sondern bleibt stabil (Abb.16).

### **5.3 NFATc1 und Apoptose**

Während die NFATc2- und NFATc1/C-Proteine proapoptotische Wirkung auf T-Lymphozyten ausüben führt die starke Induktion von NFATc1/ $\alpha$ A nicht zur Zunahme der Apoptoserate (Chuvpilo et al., 2002). Das könnte entscheidend für die Funktion von Effektorzellen mit hoher NFATc1/A-Expression sein. Nach Kultivierung von Lymphozyten kommt es zur Ausbildung zweier Populationen mit hoher und niedriger Fluoreszenzintensität, ausgehend von einer einzigen Population frisch isolierter Zellen, deren GFP-Fluoreszenz zwischen den entstandenen Populationen liegt. Es finden sich jedoch nach Kultivierung keine Zellen mit der GFP-Fluoreszenzintensität dieser frisch isolierten Lymphozyten. GFP-positive Zellen sind bei Färbung mit AnnexinV/PI negativ, während GFP-negative Lymphozyten AnnexinV/PI positiv sind (Abb.7). So findet entweder die NFATc1-Induktion statt und eine Effektorfunktion wird ausgeführt, oder die Zelle mit niedriger NFATc1-Expression stirbt. Zusätzliche Verluste der GFP-Fluoreszenz könnten durch die erhöhte Membranpermeabilität im Rahmen der Apoptose und die Diffusion des GFP-Moleküls aus der Zelle entstehen. Anhand der Proliferationsanalyse wird deutlich, dass die Induktion der Apoptose sowohl direkt zu Beginn der Kultur als auch nach mehreren Zellteilungen stattfinden kann. Allerdings werden selbst in stark teilungsaktiven Zellen keine höheren Fluoreszenzwerte, als in Zellen mit einer geringeren Zahl an Teilungen erreicht

(Abb.8), was auf eine Rolle von NFATc1 bei der Effektorfunktion und dem Überleben von T-Lymphozyten, und weniger auf die Regulation der Proliferation hindeutet.

#### **5.4 NFATc1 ist hoch exprimiert in CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN Thymozyten**

Im Rahmen der T-Zell-Entwicklung durchlaufen Thymozyten – ausgehend von Pro-T-Zellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN) – definierte Entwicklungsschritte (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>→CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>→CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>→CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>). Prä-T-Zellen exprimieren schließlich die  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors. In Assoziation mit der prä- $\alpha$ -Kette entsteht der prä-T-Zell-Rezeptor-Komplex, und nach Rekombination des  $\alpha$ -Genlokus bilden überlebende Thymozyten als CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP-Zellen beide Korezeptoren aus. Im Rahmen der positiven und negativen Selektion entstehen je nach MHC-Restriktion CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (zur Übersicht siehe Rothenberg und Taghon, 2005). Beim Vergleich der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen lymphatischen Geweben (Milz, Lymphknoten, Thymus und Blut), zeigte sich in Thymozyten eine mehr als dreifach reduzierte Fluoreszenzintensität, während Lymphozyten der übrigen Organe nahezu identische Werte aufwiesen (Abb.21). Diese Beobachtung führte zur weiteren Analyse der Thymozyten-Subpopulationen. Diese zeigen deutliche Unterschiede in der GFP-Expression, wobei CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN Thymozyten eine sechsfach höhere Intensität als doppelpositive Zellen aufwiesen (Abb.22). NFATc1-Western Blot-Daten FACS-gesorteter CD4/CD8 Thymozyten stimmen mit den GFP-FACS Daten überein (Patra et al., unveröffentlichte Ergebnisse). In der T-Zell-Reifung wird vor allem NFATc3 eine wichtige Rolle bei der positiven Selektion, sowie beim Überleben CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP-Thymozyten zugeschrieben (Oukka et al., 1998). NFATc1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine verminderte DP-Population, wobei NFATc1 zur Expansion DN-Zellen benötigt wird und in CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> und CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup> Zellen von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen wurde (Yoshida et al., 1998). Northern Blot-Daten der verschiedenen NFAT-Mitglieder in Thymozyten lassen eine ähnliche Tendenz erkennen, wobei NFATc3 in DP-Zellen hoch exprimiert wird und nur auf niedrigem Niveau in DN-



Zellen vorliegt. NFATc1-mRNA zeigt die höchsten Konzentrationen in den DN- und SP-Populationen (Oukka et al., 1998). Die starke NFATc1-Expression in DN Thymozyten suggeriert, dass NFATc1 – zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie dem T-Zell-Faktor-1-Gene (TCF-1) oder der Rho-GTPase – ein wichtiger Faktor der T-Zell-Entwicklung ist (Verbeek et al., 1995; Galandrini et al. 1997).

### **5.5 Verminderte Expression von GFP in natürlich vorkommenden und induzierbaren regulatorischen T-Lymphozyten**

Regulatorische T-Lymphozyten (Treg) sind durch die hohe Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert, welcher entscheidend für die immunsupprimierende Funktion von Tregs ist. In Mäusen führt nur wenige Wochen nach der Geburt die Defektmutation von FoxP3 zu überschießenden, letal endenden Immunreaktionen (Brunkow et al., 2001). Menschen erkranken am sog. IPEX-Syndrom (Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy x-linked Syndrome) (Ochs et al., 2005). Als typische phänotypische Eigenschaften dieser T-Zell-Population konnten eine fehlende IL-2-, IL-4- und IFN- $\gamma$ - Produktion bei Restimulation sowie die konstitutive Expression von CTLA-4 nachgewiesen werden (Chikuma et al., 2003; Rudd et al., 2009). Die Expression dieser Zytokine wird in iTregs durch FoxP3 - möglicherweise durch Interaktion mit NFAT - supprimiert (Hori et al., 2003; Wu et al., 2006). Bei Stimulation durch den TCR ist in Tcons die typische Induktion und nukleäre Translokation zu beobachten, während Tregs konstant niedrige NFATc1- und NFATc2-Konzentrationen zeigen. Diese fehlende Aktivierung steht in engem Zusammenhang mit einem verminderten  $Ca^{2+}$ -Einstrom, verminderter Calcineurin-Aktivität und verstärkter Expression von GSK3 $\beta$  (Sumpter et al., 2008). FoxP3 bindet direkt an den P1-Promotor des *Nfat*-Gens und führt zur direkten Suppression von NFATc1 (Torgerson et al., 2009). Die niedrige NFATc1-Expression in nTregs wird außerdem durch die Bindung des "Inducible cAMP early Repressors" (ICER) an zwei konservierte CREM-Bindestellen im P1-Promoter vermittelt (Väth et al., 2011), ebenso wie die Bindung an AP-

1/NFAT-Bindestellen des IL-2-Promotors (Bodor et al., 1998). Während die Differenzierung von nTregs im Thymus abläuft, stammen induzierte Tregs (iTregs) von naiven konventionellen T-Zellen ab und erfahren die Umwandlung zu regulatorischen Zellen in peripheren lymphatischen Organen bzw. *in vitro* durch Ligandenbindung an den TCR und die Stimulation mit IL-2 und TGF- $\beta$  (Walker et al., 2005; Toda et al., 2006). iTregs sind im Gegensatz zu nTregs im Rahmen ihrer Entwicklung auf NFAT-Faktoren zur FoxP3-Expression angewiesen, wobei in differenzierten iTregs und nTregs die NFATc1-Aktivität durch die Bindung von FoxP3 an den P1-Promoter gehemmt wird (Väth et al., MS zum Druck eingereicht). Dieses niedrige Niveau der NFATc1-Aktivität kann mit Hilfe des GFP-Reporterkonstrukts bestätigt werden, denn sowohl in natürlich vorkommenden nTregs als auch in induzierten iTregs wurde eine sehr geringe GFP-Expression beobachtet (Abb.17, 18). Während beim Vergleich unstimulierter Tregs und Tcons keine Unterschiede in der GFP-Expression zu erkennen waren, zeigte sich bei Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 die deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität in T-Effektorzellen. Dieser Effekt blieb in nTregs und iTregs aus.

## **5.6 TGF- $\beta$ inhibiert die Zunahme der eGFP-Fluoreszenz in T-Zellen**

FoxP3 wird in iTregs durch die Stimulation des T-Zell Rezeptors mit CD3/CD28-Antikörper zusammen mit IL-2, anti-IFN- und anti-IL4-Antikörper sowie TGF- $\beta$  induziert (Walker et al., 2005). Die Aktivierung des Genlokus erfolgt u.a. durch die gemeinsame Bindung von Smad 3, einem Effektormolekül des TGF- $\beta$ -Rezeptors, und NFATc1 an einen Enhancer des FoxP3-Gens (Tone et al., 2008). Während die nTreg-Entwicklung in NFATc2/c3<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht beeinträchtigt ist (Bopp et al., 2005), spielen NFAT-Faktoren bei der FoxP3-Induktion und der Entwicklung von iTregs eine wichtige Rolle. FoxP3 wiederum verhindert die Induktion von NFATc1/ $\alpha$ A in differenzierten iTregs (Vaeth et al., MS zum Druck eingereicht). Da das TGF- $\beta$ -Signal für die FoxP3-Induktion in iTregs entscheidend ist, wurde dessen Einfluss auf die eGFP/NFATc1-Expression untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige

inhibitorische Wirkung auf die eGFP-Fluoreszenz (Abb. 20). Dieser Effekt könnte über die Wirkung von FoxP3 auf den P1 Promotor vermittelt werden, wobei mit einem Anteil von 71,5 Prozent iTregs in Kultur nicht alle Zellen FoxP3 exprimieren. Da bei uniformer Ausbildung der eGFP-Population von einer deutlichen eGFP- und somit NFATc1-Inhibition in der gesamten Kultur auszugehen ist, stellt sich die Frage nach der Vermittlung des TGF- $\beta$ -Signals in den übrigen 28,5 Prozent der Zellen. Dies deutet auf eine direkte Hemmung der NFATc1-Induktion durch TGF- $\beta$  hin, wahrscheinlich durch eine direkte Bindung von Smad3/4 an regulatorische Elemente des *Nfatc1*-Genlokus.

## 5.7 Perspektiven

Mit dem Nachweis der Funktionsfähigkeit des eGFP-BAC-Reporterkonstrukts konnten bereits jetzt bestehende Daten zur Regulation und Funktion von NFATc1 bestätigt werden. Die wohl größte Bedeutung liegt in der Möglichkeit der direkten Abbildung der NFATc1-Expression im FACS sowie Untersuchungen von nativem Gewebe. Die Analyse der GFP Expression in Gefrierschnitten bzw. durch *in vivo* Imaging könnte weitere wichtige Rollen von NFATc1 im Organismus aufdecken. Aufgrund technischer Limitierungen konnte dieses Feld im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht adäquat ausgeschöpft werden, sodass auch in Zusammenarbeit mit anderen Forschungsgruppen der Schwerpunkt in diesem Bereich liegen sollte.

## 6. Zusammenfassung

In Lymphozyten wird nach Antigenaktivierung die Expression des *Nfatc1*-Gens durch Aktivierung des P1-Promoters stark induziert. Dagegen ist die, durch den Promoter P2 vermittelte Expression ebenso wie die der anderen NFAT-Faktoren c2 und c3 konstitutiv. Die Akkumulation der dabei gebildeten Isoform NFATc1/ $\alpha$ A ist sowohl für Effektorfunktionen wie die Zytokinproduktion sowie die Proliferation und das Überleben der aktivierten Zellen wichtig (Chuvpilo et al., 2002). Um die Expression des *Nfatc1*-Gens auf Einzelzellebene messen zu können, wurden BAC (bacterial artificial chromosom) transgene Mauslinien generiert, die einen 210kb großen Bereich des *Nfatc1*-Gens der Maus enthalten. In diesen Locus wurde ein eGFP-Reportergen innerhalb des allen Isoformen gemeinsamen, dritten Exons integriert. In dieser Arbeit wird durch semiquantitative RT-PCR-Experimente von Gesamt-Milzzellen und T-Lymphozyten gezeigt, dass in den B6/NFATc1-eGFP-BAC-Reportermäusen die Expression der eGFP-cDNA analog zum endogenen *Nfatc1*-Lokus der Kontrolle der beiden Promotoren P1 und P2 unterliegt. In Western Blot Experimenten wird in diesen Zellen mittels eines NFATc1 $\alpha$ -spezifischen Antikörpers eine induzierbare und CsA-sensitive  $\alpha$ -GFP-Isoform - vergleichbar mit der endogenen NFATc1 $\alpha$ -Isoform - nachgewiesen. Gleichzeitig zeigen NFATc1-Antikörper das konstitutiv exprimierte GFP $\beta$ -Protein. Die Korrelation der Expression von NFATc1 und GFP auf mRNA- und Proteinebene machen in B6/NFATc1-eGFP-BAC-Reportermäusen das GFP-Protein somit zu einem sensitiven und spezifischen Marker der NFATc1-Aktivität. In FACS-Analysen gibt der Anstieg der GFP-Fluoreszenzintensität bei Stimulation von Gesamt-Milzzellen bzw. T-Lymphozyten um bis auf das Dreifache die Induktion von NFATc1 wider. Unter dem Einfluss von CsA verbleibt die GFP-Fluoreszenzintensität auf dem Niveau unstimulierter Zellen. Die GFP-Fluoreszenz korreliert darüber hinaus bei Primärstimulation mit der Expression des *IL-2*-Gens, dessen Promotor mit 5 NFAT-Bindestellen den Prototyp eines NFATc1-Targets darstellt (Serfling et al., 1989). Die Analyse der Koexpression von NFATc1 und GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigt in allen stimulierten, GFP-positiven CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten die nukleäre Lokalisation von

NFATc1, vor allem von NFATc1 $\alpha$ . Die Analyse des GFP-Phänotyps in alloreaktiven T-Zellen zeigt bei Abstoßungsreaktionen *in vitro* („Mixed Lymphocyte Reactions“) eine selektive Zunahme der Fluoreszenz dieser Zellen um bis auf das Vierfache, was die Rolle von NFATc1 für die Effektorfunktion aktivierter T-Lymphozyten verdeutlicht. GFP und das endogene NFATc1 werden bei Stimulation konventioneller T-Zellen (Tcons, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup>) stark exprimiert, während natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) konstant geringe NFATc1- und GFP-Konzentrationen zeigen. In induzierten regulatorischen T-Lymphozyten (iTregs) supprimiert TGF- $\beta$  konzentrationsabhängig die GFP-Fluoreszenz bis auf das Niveau unstimulierter Lymphozyten. Während in nTregs die Suppression des *Nfatc1*-Gens im wesentlichen durch FoxP3 erfolgt (Torgerson et al., 2009), scheint dies in iTregs vor allem über den TGF- $\beta$  Signalweg vermittelt zu werden. Die Analyse der GFP-Expression in den verschiedenen Stadien der T-Zellentwicklung zeigt weiterhin deutliche Unterschiede in der Aktivität des *Nfatc1*-Gens. Dies wird durch die starke Aktivität des BAC-Genlokus in CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN Thymozyten, welche eine sechsfach höhere GFP-Expression aufweisen als CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP Zellen, deutlich.

## 7. Literaturverzeichnis

Acuto O, Michel F. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):939-51.

Aramburu J, Garcia-Cózar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG. *Mol Cell*. 1998 Apr;1(5):627-37.

Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1261-9.

Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. *Genes Dev*. 1997 Apr 1;11(7):824-34.

Berberich-Siebelt F, Klein-Hessling S, Hepping N, Santner-Nanan B, Lindemann D, Schimpl A, Berberich I, Serfling E. *Eur J Immunol*. 2000 Sep;30(9):2576-85.

Bodor J, Habener JF. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9544-51.

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1303-10. Epub 2007 May 14.

Bopp T, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, Klein M, Schild H, Schmitt E, Stassen M. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):181-7.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. *J Biol Chem*. 1982 Jul 10;257(13):7847-51.

Canté-Barrett K, Winslow MM, Crabtree GR. *J Immunol*. 2007 Jul 1;179(1):103-10.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. *Science*. 1994 Feb 11;263(5148):802-5.

Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. *J Immunol*. 1989 Aug 15;143(4):1283-9.

Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):42-8.

Chikuma S, Bluestone JA. *Immunol Res*. 2003;28(3):241-53.

Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glöckner J, Fischer C, Kerstan A, Escher C, Inashkina I, Hlubek F, Jankevics E, Brabletz T, Serfling E. *J Immunol*. 1999 Jun 15;162(12):7294-301.

Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrstin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Feoktistova E, König T, Avots A, Schmitt E, Berberich-Siebelt F, Schimpl A, Serfling E. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):881-95.

Chuvpilo S, Zimmer M, Kerstan A, Glöckner J, Avots A, Escher C, Fischer C, Inashkina I, Jankevics E, Berberich-Siebelt F, Schmitt E, Serfling E. *Immunity*. 1999 Feb;10(2):261-9.

Corish P, Tyler-Smith C. *Protein Eng.* 1999 Dec;12(12):1035-40.

Crabtree GR, Olson EN. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S67-79.

Durand DB, Shaw JP, Bush MR, Replogle RE, Belagaje R, Crabtree GR. *Mol Cell Biol.* 1988 Apr;8(4):1715-24.

Fraser JD, Weiss A. *Mol Cell Biol.* 1992 Oct;12(10):4357-63.

Galandrini R, Henning SW, Cantrell DA. *Immunity.* 1997 Jul;7(1):163-74.

Garcia-Cozar FJ, Okamura H, Aramburu JF, Shaw KT, Pelletier L, Showalter R, Villafranca E, Rao A. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):23877-83.

Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. *J Immunol.* 1993 May 15;150(10):4244-52.

Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A. *Nature.* 2006 Jun 1;441(7093):646-50.

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. *Nature.* 1995 Feb 23;373(6516):663-4.

Heim R, Prasher DC, Tsien RY. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20;91(26):12501-4

Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. *Immunity.* 1996 Apr;4(4):397-405.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

Klee CB, Ren H, Wang X. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13367-70.

Klein-Hessling S, Bopp T, Jha MK, Schmidt A, Miyatake S, Schmitt E, Serfling E. *J Biol Chem.* 2008 Nov 7;283(45):31030-7. Epub 2008 Sep 4.

Klemm JD, Beals CR, Crabtree GR. *Curr Biol.* 1997 Sep 1;7(9):638-44.

Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4602-11.

López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F. *J Exp Med.* 1993 Aug 1;178(2):537-47.

Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 22;96(13):7214-9.

Luo C, Burgeon E, Rao A. *J Exp Med.* 1996 Jul 1;184(1):141-7.

Macian F. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jun;5(6):472-84.

Macián F, López-Rodríguez C, Rao A. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2476-89.

- Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):2538-42.
- Nayak A, Glöckner-Pagel J, Vaeth M, Schumann JE, Buttmann M, Bopp T, Schmitt E, Serfling E, Berberich-Siebelt F. J Biol Chem. 2009 Apr 17;284(16):10935-46.
- Nurieva RI, Chuvpilo S, Wieder ED, Elkon KB, Locksley R, Serfling E, Dong C. J Immunol. 2007 Jul 15;179(2):1096-103.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Gene. 1992 Feb 15;111(2):229-33.
- Radler-Pohl A, Pfeuffer I, Karin M, Serfling E. New Biol. 1990 Jun;2(6):566-73.
- Randak C, Brabletz T, Hergenröther M, Sobotta I, Serfling E. EMBO J. 1990 Aug;9(8):2529-36.
- Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH. Immunity. 1998 Nov;9(5):627-35.
- Rao A. Immunol Today. 1994 Jun;15(6):274-81.
- Rao A. J Leukoc Biol. 1995 Apr;57(4):536-42.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Annu Rev Immunol. 1997;15:707-47.
- Rao S, Procko E, Shannon MF. J Immunol. 2001 Oct 15;167(8):4494-503.
- Rooney JW, Sun YL, Glimcher LH, Hoey T. Mol Cell Biol. 1995 Nov;15(11):6299-310.
- Rothenberg EV, Taghon T. Annu Rev Immunol. 2005;23:601-49.
- Rudd CE. Eur J Immunol. 2009 Mar;39(3):687-90.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Cell. 2008 May 30;133(5):775-87.
- Schluns KS, Lefrançois L. Nat Rev Immunol. 2003 Apr;3(4):269-79.
- Schuh K, Kneitz B, Heyer J, Siebelt F, Fischer C, Jankevics E, Rude E, Schmitt E, Schimpl A, Serfling E. Immunol Lett. 1997 Jun 1;57(1-3):171-5.
- Schwartz RH. Annu Rev Immunol. 2003;21:305-34.
- Seger R, Biener Y, Feinstein R, Hanoch T, Gazit A, Zick Y. J Biol Chem. 1995 Nov 24;270(47):28325-30.
- Serfling E, Avots A, Neumann M *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1263, 181–200
- Serfling E, Berberich-Siebelt F, Avots A. Sci STKE. 2007 Aug 7;2007(398):pe42.
- Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A. Biochim Biophys Acta. 2000 Oct 20;1498(1):1-18.



- Serfling E, Chuypilo S, Liu J, Höfer T, Palmetshofer A. Trends Immunol. 2006 Oct;27(10):461-9.
- Serfling E, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Bopp T, Stassen M, Schmitt E. Eur J Immunol. 2006 Nov;36(11):2837-43.
- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Science. 1988 Jul 8;241(4862):202-5.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. J Cell Comp Physiol. 1962 Jun;59:223-39.
- Shimomura O. Methods Biochem Anal. 2006;47:1-13.
- Smith KA. Science. 1988 May 27;240(4856):1169-76.
- Sommerer C, Zeier M, Meuer S, Giese T. Transplantation. 2010 Jun 15;89(11):1417-23.
- Sumpter TL, Payne KK, Wilkes DS. J Leukoc Biol. 2008 Mar;83(3):708-17.
- Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. J Histochem Cytochem. 1997 Jan;45(1):49-53.
- Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Nat Immunol. 2008 Feb;9(2):194-202. Epub 2007 Dec 23.
- Toda A, Piccirillo CA. J Leukoc Biol. 2006 Sep;80(3):458-70. Epub 2006 Jun 29.
- Torgerson TR, Genin A, Chen C, Zhang M, Zhou B, Añover-Sombke S, Frank MB, Dozmorov I, Ocheltree E, Kulmala P, Centola M, Ochs HD, Wells AD, Cron RQ. J Immunol. 2009 Jul 15;183(2):907-15. Epub 2009 Jun 29.
- Tsien RY. Annu Rev Biochem. 1998;67:509-44
- Verbeek S, Izon D, Hofhuis F, Robanus-Maandag E, te Riele H, van de Wetering M, Oosterwegel M, Wilson A, MacDonald HR, Clevers H. Nature. 1995 Mar 2;374(6517):70-4.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. J Immunol Methods. 1995 Jul 17;184(1):39-51.
- Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 15;102(11):4103-8. Epub 2005 Mar 7.
- Wolfe SA, Zhou P, Dötsch V, Chen L, You A, Ho SN, Crabtree GR, Wagner G, Verdine GL. Nature. 1997 Jan 9;385(6612):172-6.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. Cell. 2006 Jul 28;126(2):375-87.

Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A. *Science*. 1996 May 10;272(5263):892-5.

Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengère LE, Wakeham AC, Bouchard D, Kong YY, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M, Ohashi PS, Penninger JM, Crabtree GR, Mak TW. *Immunity*. 1998 Jan;8(1):115-24.

Zhou B, Cron RQ, Wu B, Genin A, Wang Z, Liu S, Robson P, Baldwin HS. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):10704-11.