

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,  
Rheumatologie)

**Charakterisierung der Rolle der NFAT-  
Transkriptionsfaktoren in der Chronischen Lymphatischen  
Leukämie (CLL)**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Posdorowkin, Anastasia**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. M. R. Müller  
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

Tag der Disputation: 05.04.2023

*Für Mischa*

# I. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	<i>Activator protein 1</i>
Apaf-1	Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1
B2M	Beta-2 Mikroglobulin
BCR	B-Zell-Rezeptor
B-Zelle	B-Lymphozyt ( <i>bursa fabricii</i> )
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CK	<i>Caseinkinase</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CRAC	<i>Calcium-release-activated calcium</i>
C-Region	Konstante Region
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DED	Todeseffektordomäne
DLBCL	<i>Diffuse large B cell lymphoma</i>
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DYRK	<i>Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	<i>Fas-associated via death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G1-Phase	Gap-Phase
GSK	Glykogensynthasekinase
H-Kette	Schwere Kette ( <i>heavy</i> )
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IGHV	<i>Immunglobulin heavy chain variable region</i>
IL-2	Interleukin-2
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
L-Kette	Leichte Kette ( <i>light</i> )
miRNA	<i>microRNA</i>
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor of kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHR	<i>NFAT-homology region</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
OREBP	<i>Osmotic response element-binding protein</i>
PBMS	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PI	<i>Propidiumiodid</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
PLC-γ	Phospholipase C-γ
Rb-Protein	Retinoblastomprotein
RHD	<i>Rel-homology domain</i>
RISC	<i>RNA-induced-silencing-complex</i>
RNAi	RNA Interferenz
scid	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
shRNA	<i>Short-hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
S-Phase	Synthese-Phase
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
TAD	Aminoternale Transaktivierungsdomäne
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TonEBP	<i>Tonicity enhancer binding protein</i>
T-Zelle	T-Lymohozyt (Thymus)
V-Region	Variable Region
ZAP-70	<i>Zeta chain-associated protein 70</i>

## II. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Signalweg der Apoptose</i> .....	6
<i>Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg</i> .....	8
<i>Abb. 3: Zellzyklus</i> .....	11
<i>Abb. 4: RNA-Interferenz</i> .....	17
<i>Abb. 5: Schematischer Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren</i> .....	21
<i>Abb. 6: NFAT-Aktivierung</i> .....	23
<i>Abb. 7: NFAT1-Knockdown in den MEC1-Zelllinien A4, B4, C4, D4 und F4</i> .....	48
<i>Abb. 8: NFAT2-Knockdown in den MEC1-Zelllinien B5, C5 und E5</i> .....	49
<i>Abb. 9: NFAT4-Knockdown in den MEC1-Zelllinien 28, 29, 30 und 32</i> .....	50
<i>Abb. 10: Proliferation der mit dem Vektor „scrambled“ transfizierten Zellen unter Behandlung mit Puromycin in steigender Konzentration</i> .....	51
<i>Abb. 11: Proliferation der MEC1-Zellen ohne Antibiotikaresistenz unter Behandlung mit Puromycin in steigender Konzentration</i> .....	52
<i>Abb. 12: NFAT1-Knockdown-Nachweis der kultivierten Zelllinien scramble, A4 und D4 auf mRNA- und Proteinebene</i> .....	54
<i>Abb. 13: NFAT2-Knockdown-Nachweis der kultivierten Zelllinien scramble, B5 und E5 auf mRNA- und Proteinebene</i> .....	56
<i>Abb. 14: NFAT4-Knockdown-Nachweis in den kultivierten Zellen scramble und 30 auf mRNA- und auf Proteinebene</i> .....	58
<i>Abb. 15: NFAT1-Knockdown führt zu erhöhter Proliferation</i> .....	61
<i>Abb. 16: NFAT2-Knockdown führt zu einer erhöhten Proliferation. Der Knockdown der langen Isoform von NFAT2 steigert die Proliferation noch stärker</i> .....	62
<i>Abb. 17: NFAT4-Knockdown führt zu erhöhter Proliferation</i> .....	63
<i>Abb. 18: Der NFAT1-Knockdown hat sich im Verlauf der Zellkultur verbessert</i> .....	64
<i>Abb. 19: Der NFAT1-Knockdown erhöht die Apoptoserate</i> .....	66
<i>Abb. 20: Ein Knockdown von NFAT2 beschleunigt die Apoptose. Die Expression der kurzen Isoform von NFAT2 schützt vor Apoptose</i> .....	67
<i>Abb. 21: NFAT4-Knockdown erhöht die Apoptoserate</i> .....	68
<i>Abb. 22: Exemplarisches Gatingschema für die Zelllinie scramble und Bestimmung der Zellzyklusphasen</i> .....	69
<i>Abb. 23: Zellzyklusanalyse der NFAT1-Knockdown-Zelllinie A4</i> .....	72

<i>Abb. 24: Zellzyklusanalyse der NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5 .....</i>	<i>74</i>
<i>Abb. 25: Zellzyklusanalyse der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30.....</i>	<i>76</i>
<i>Abb. 26: NFAT1-Knockdown-Kontrolle .....</i>	<i>77</i>
<i>Abb. 27: NFAT2-Knockdown-Kontrolle .....</i>	<i>77</i>
<i>Abb. 28: NFAT4-Knockdown-Kontrolle .....</i>	<i>78</i>
<i>Abb. 29: Tumormasse im Vergleich zwischen den einzelnen Knockdown-Zelllinien....</i>	<i>79</i>

### **III. Tabellenverzeichnis**

<i>Tab. 1: NFAT-Proteine.....</i>	<i>19</i>
<i>Tab. 2: NFAT-Transkriptionsfaktoren und deren shRNA-Vektoren.....</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 3: Pipettierschema der Proteinproben.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 4.: P0 Programm des iBlot® Gel Transfer Systems .....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 5: Primärantikörper und Primärantikörperlösung.....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 6: Sekundärantikörper und Sekundärantikörperlösung.....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 7: Anzahl der Tiere nach Geschlecht und transplantierte Zelllinie .....</i>	<i>46</i>

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Überblick über das Immunsystem in Säugetieren.....	1
1.1.2	Der B-Lymphozyt.....	2
1.1.2.1	Antikörper und der B-Zell-Rezeptor .....	2
1.1.2.2	B-Zellrezeptor-Signalübertragung .....	3
1.1.2.3	Apoptose .....	5
1.2	Zellzyklus .....	8
1.3	Chronische lymphatische Leukämie (CLL), deren molekulare Eigenschaften und Therapie .....	11
1.4	RNA-Interferenz .....	15
1.5	NFAT-Transkriptionsfaktoren .....	17
1.5.1	NFAT-Aktivierungsweg .....	21
1.5.2	Autoregulation von NFAT2.....	24
1.5.3	Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren in der CLL .....	24
1.6	Modellsysteme .....	25
1.6.1	MEC1-Zelllinie .....	25
1.6.2	Tierisches Modellsystem NOD- <i>scid</i> IL2Rgamma <sup>null</sup> Mausmodell...	26
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	27
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Material .....	29
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.2	Reagenzien & Chemikalien.....	30
2.1.3	Geräte und Zubehör .....	32
2.1.4	Puffer und Medien .....	34
2.1.5	Antikörper .....	34
2.1.6	Primer .....	34
2.2	Methoden .....	36
2.2.1	Zelllinien und Vektoren .....	36
2.2.2	Zellbiologische Methoden .....	37
2.2.2.1	Kultivierung und Selektion der Zellen .....	37



2.2.2.2	Auftauen von Zellen.....	38
2.2.2.3	Pelletieren von Zellen .....	38
2.2.3	Nachweis des <i>Knockdowns</i> .....	39
2.2.3.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	39
2.2.3.2	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR .....	39
2.2.3.3	Proteinisolation.....	40
2.2.3.4	Proteinbestimmung nach <i>Bradford</i> .....	41
2.2.3.5	<i>SDS-Page</i> .....	41
2.2.3.6	<i>Western Blot</i> .....	42
2.2.4	Nachweis der <i>in vitro</i> Proliferation .....	43
2.2.5	Durchflusszytometrie .....	44
2.2.5.1	Apoptose Assay .....	44
2.2.5.2	Bestimmung der Zellviabilität.....	44
2.2.6	Tiermodell.....	45
2.2.6.1	Mäusehaltung und -zucht.....	45
2.2.6.2	NOD- <i>scid</i> IL2Rgamma <sup>null</sup> Mausmodell.....	45
2.2.6.3	Transplantation der Zellen.....	46
2.2.7	Statistik.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Zellkulturen und Methodenentwicklung .....	47
3.1.1	Auswahl der Zelllinien und der Primer .....	47
3.1.2	Puromycingradient.....	50
3.1.3	<i>Knockdown</i> -Nachweis .....	53
3.2	Analyse der Proliferation <i>in vitro</i> .....	59
3.2.1	Methodenentwicklung.....	59
3.2.2	Analyse der Proliferation <i>in vitro</i> .....	60
3.3	Durchflusszytometrie.....	63
3.3.1	Analyse der Apoptose.....	64
3.3.2	Zellzyklusanalyse.....	69
3.4	Transplantation der Zelllinien im Tiermodell.....	76
4	Diskussion .....	80
4.1	NFAT1.....	80

4.2	NFAT2.....	81
4.3	NFAT4.....	84
4.4	Schlussfolgerung.....	86
5	Zusammenfassung .....	88
6	Anhang .....	90
6.1	Literaturverzeichnis .....	90
6.2	Erklärung zum Eigenanteil .....	101

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

### 1.1.1 Überblick über das Immunsystem in Säugetieren

Das Immunsystem des Organismus umfasst alle löslichen und zellulären Bestandteile, deren Aufgabe es ist, den Körper vor Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten zu schützen. Die Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion bezeichnet man als Immunantwort. Eine angeborene Immunantwort bekämpft Mikroorganismen mit unspezifischen Mechanismen, die seit der Geburt bereitstehen und sofort nach Kontakt eine Reaktion auslösen (Beutler, 2004). Davon unterscheidet sich die adaptive Immunantwort, die auf ein bestimmtes Pathogen spezifisch mit unter anderem der Produktion von Antikörpern reagiert und in vielen Fällen ein lebenslanges immunologisches Gedächtnis hinterlässt, wobei die Reaktion auf die erneute Infektion mit dem gleichen Pathogen schneller und stärker erfolgt (Cooper and Alder, 2006).

Die Zellen des Immunsystems entwickeln sich aus den lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Die myeloische Zellreihe umfasst neben den Erythrozyten und Megakaryozyten die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems. Aus der myeloischen Vorläuferzelle differenzieren sich die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie Monozyten, die sich weiter zu Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen differenzieren können. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle stammen die meisten Zellen des erworbenen Immunsystems. Es gibt zwei Gruppen von Lymphozyten. Hierzu zählen B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) (Chao et al., 2008). Die Vorläufer-T-Zelle verlässt das Knochenmark und reift im Thymus. Nach dem ersten Antigenkontakt im Blut differenziert sie sich entweder zur zytotoxischen T-Zelle, T-Helferzelle oder regulatorischen T-Zelle (Rothenberg et al., 2016). Die Reifung der B-Zelle erfolgt im Knochenmark (Busslinger, 2004). Nach deren Aktivierung durch ein Antigen kommt es zur Proliferation und Differenzierung zur Plasmazelle, die für das Antigen spezifi-

sche Antikörper produziert. Einige der B- und T-Zellen differenzieren sich zu Gedächtniszellen und sorgen für eine anhaltende Immunität (LeBien and Tedder, 2008).

### 1.1.2 Der B-Lymphozyt

Der B-Lymphozyt (B-Zelle) stammt von einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle ab und gehört zum adaptiven Immunsystem. Die Lymphopoese und Reifung der B-Zellen erfolgt im Knochenmark, wobei stark autoreaktive Zellen, das heißt die Zellen, deren Rezeptor an körpereigene Strukturen bindet, sofort den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, sterben. Nur selbsttolerante reife B-Zellen gelangen in die Blutbahn und siedeln sich in den Lymphfollikeln der peripheren lymphatischen Organe (Lymphknoten, Tonsillen, Milz, Darmschleimhaut) an (LeBien and Tedder, 2008). Jede naive B-Zelle, die inaktiv ist und in ihrem Leben noch kein Antigen gebunden hat, exprimiert ihren eigenen Antigenrezeptor, den B-Zell-Rezeptor (BCR), der ein im Blut zirkulierendes spezifisches Antigen bindet und dadurch aktiviert wird (Laidlaw and Cyster, 2021). Sobald die B-Zellen auf ihr spezifisches Antigen treffen, differenzieren sie sich zu Plasmazellen, welche Antikörper freisetzen. Antikörper sind die sezernierte Form des BCRs und besitzen dieselbe Spezifität für das Antigen wie die gebundene Form (Moser et al., 2006). Reagiert eine B-Zelle auf körpereigene Antigene oder wird der Rezeptor eine Zeit lang nicht benutzt, nachdem die Zelle in das periphere Repertoire aufgenommen wurde, empfängt sie keine Überlebenssignale und stirbt durch Apoptose (Tan et al., 2019).

#### 1.1.2.1 Antikörper und der B-Zell-Rezeptor

Nach Aktivierung setzt die B-Zelle Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, frei. Die Moleküle sind symmetrisch aufgebaut. Ihre Form erinnert an den Buchstaben Ypsilon. Die Basis des Ypsilons ist die konstante Region (C-Region) und bestimmt die Klasse des Immunglobulins und damit die Art der Interaktion mit der Effektorzelle. Die fünf Hauptklassen der Immunglobuline heißen IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Die Arme des Y bilden zusammen die variable

Region (V-Region) und ermöglichen damit dem Antikörper ein spezifisches Antigen zu binden. Jedes Molekül besteht aus zwei identischen schweren (H-Ketten, *heavy*) und zwei identischen leichten (L-Ketten, *light*) Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers unterscheidet sich von der jedes anderen und besteht jeweils aus einer H-Kette und einer L-Kette und ist an beiden Y-Armen identisch (Chiu et al., 2019). Um es dem Immunsystem zu ermöglichen so viele Pathogene wie möglich zu erkennen und zu eliminieren, bedarf es einer enormen Variabilität in der Antikörperstruktur. Während der Entwicklung der B-Zelle im Knochenmark ist die unterschiedliche Kombination der schweren und leichten Ketten und deren variabler Region eine Möglichkeit die kombinatorische Vielfalt zu erzeugen und Immunglobuline unterschiedlicher Antigenspezifität herzustellen. Die zweite Möglichkeit, die zur Antikörpervariabilität beiträgt, ist die Umlagerung einer Gruppe der vererbten Gensegmente während der B-Zell-Reifung, die durch eine somatische Hypermutation in reifen aktivierten Zellen noch komplettiert wird. Die Gesamtzahl aller Antikörperspezifitäten eines Individuums, die durch diese Mechanismen entstanden sind, nennt man Antikörperrepertoire und sie beträgt beim Menschen mindestens  $10^{11}$  (Collins and Watson, 2018).

Die BCRs sind membrangebundene Immunglobuline des Typs IgM und IgD. Sie unterscheiden sich von der sezernierten Form nur durch eine kurze transmembranäre und intrazelluläre Domäne (Ten Hacken et al., 2016).

#### 1.1.2.2 B-Zellrezeptor-Signalübertragung

Die Grundlage der intrazellulären Signalübertragung des BCRs ist die Proteinphosphorylierung. Die Bindung des Antigens führt zur Aktivierung der Proteinkinasen, die die kovalente Bindung einer Phosphatgruppe an ein Protein katalysieren. Diesen reversiblen Prozess nennt man Proteinphosphorylierung. Die mit dem Rezeptor assoziierte Kinase ist zunächst inaktiv, sobald jedoch ein Antigen gebunden wird, wird sie aktiviert und phosphoryliert andere Proteine. Ein weiterer Mechanismus der Signalübertragung ist die Produktion von kleinen *Second-Messenger*-Molekülen. Sie werden auf dem Signalweg synthetisiert und können

durch die Zelle diffundieren, um andere Zielproteine zu aktivieren (Samelson, 2011).

Der BCR allein kann, nachdem er sein Antigen gebunden hat, kein Signal in das Zellinnere übersenden. Dafür hat er zwei Proteinketten gebunden, Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ , die zum einen für den Transport des Immunglobulins an die Zelloberfläche erforderlich sind und zum anderen eine Signalfunktion besitzen. Dies geschieht Mittels einer Sequenz aus vier Aminosäuren, die man als ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) bezeichnet. Diese vollständige Zusammensetzung nennt man BCR-Komplex (Tolar et al., 2009). Die Tyrosinreste der ITAM-Sequenzen werden durch Proteine der Src-Familie - Fyn, Blk und Lyn - phosphoryliert und damit aktiviert. Daraufhin wird eine weitere Tyrosinkinase Syk zur ITAM-Sequenz gebracht und aktiviert. Sie aktiviert dann wiederum ein Gerüstprotein BLNK, das die Tec-Kinase Btk mobilisiert, mit deren Hilfe das Enzym Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) aktiviert wird (Harwood and Batista, 2010). Die Aktivierung von PLC- $\gamma$  ist ein wichtiger Schritt in der Signalkaskade, da sich danach der Signalweg in drei Zweige aufteilt und jedes einen anderen Transkriptionsfaktor aktiviert. Das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) wird von der PLC- $\gamma$  abgebaut, wobei Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>), das als *Second Messenger* fungiert und Diacylglycerin (DAG), das in der Membranebene diffundiert, entstehen (Yang et al., 2012). IP<sub>3</sub> induziert eine Erhöhung der Calciumkonzentration in der Zelle und somit die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, die den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) aktiviert (Hogan et al., 2003). Der zweite Weg endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light*) durch DAG und Calcium über Proteinkinase C (Rueda and Thome, 2005). Der dritte Signalweg läuft über die Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden, die in den Zellkern einwandern und den Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) aktivieren (Shaw and Filbert, 2009). Die Endstrecke der drei Signalkaskaden ist die Induktion der Transkription des Zytokins Interleukin-2 (IL-2), das wesentlich für die Proliferation und Differenzierung der aktivierten B-Zelle ist (Wu et al., 2006).

### 1.1.2.3 Apoptose

Apoptose leitet sich vom griechischen Begriff *apoptosis*, das das Abfallen von Blättern von den Bäumen bedeutet, ab. Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein aktiver Prozess, der durch äußere oder innere Einflüsse hervorgerufen und von der Zelle selbst ausgelöst und kontrolliert wird. Dieser Mechanismus ist unerlässlich für einen mehrzelligen Organismus, der das Gleichgewicht zwischen Absterben und Neubildung der Zellen aufrechterhält. So spielt die Apoptose eine essenzielle Rolle in der Entwicklung des Immunsystems und der Immuntoleranz, indem Lymphozyten beseitigt werden, die keinen funktionsfähigen BCR ausbilden können, zu stark auf körpereigene Antigene reagieren und solche, die als naive reife Zellen zu lange auf kein passendes Antigen treffen (Darwiche et al., 2018). Eine besonders wichtige Aufgabe des programmierten Zelltodes ist die Beendigung der Immunantworten und Reduktion der Anzahl der Zellen, die nach der Infektion nicht mehr notwendig sind (Green et al., 2003).

Die Apoptose kann durch zwei Signalwege aktiviert werden, den intrinsischen und den extrinsischen Weg (Abb. 1). Hauptmediatoren der beiden Wege sind Asparaginsäure-spezifische Cysteinproteasen, auch Caspasen genannt, die in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Initiatorcaspasen sind an der Stimulierung der Apoptose beteiligt und stehen am Anfang des Signalwegs. Die Effektorcaspasen führen durch ihre Aktivierung zum Zelltod, indem sie Zellkernproteine spalten und abbauen und somit seine strukturelle Integrität zerstören und Endonukleasen aktivieren, die die chromosomale DNA spalten (Siegel, 2006).

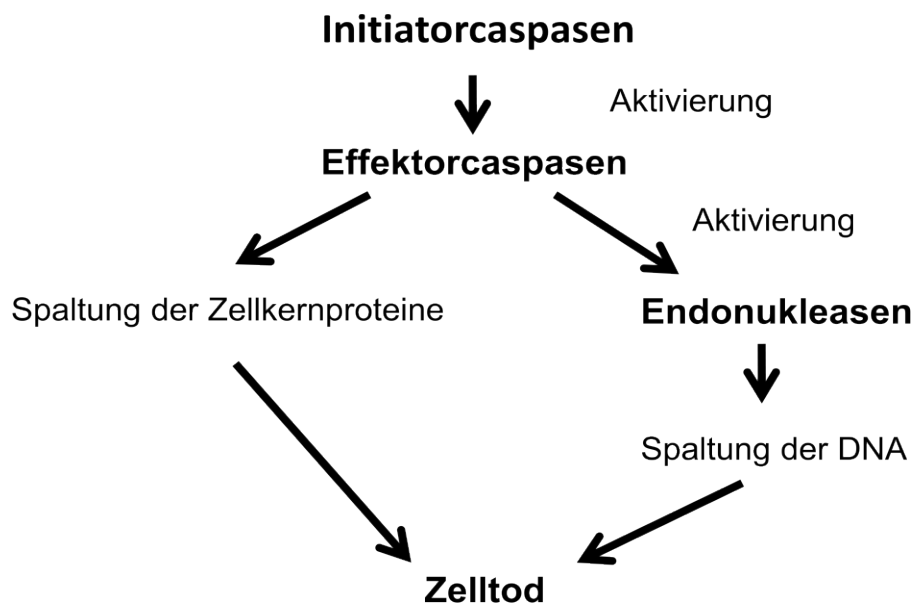


Abb. 1: Signalweg der Apoptose

Die Initiatorcaspasen stehen am Anfang des Signalwegs. Die Effektorcaspasen führen durch ihre Aktivierung zum Zelltod, indem sie die Zellkernproteine spalten und abbauen und Endonukleasen aktivieren, die die chromosomale DNA spalten.

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch Aktivierung der Todesrezeptoren, die zu der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) gehören, über die Bindung von Liganden eingeleitet (Abb. 2). Die wichtigsten Todesrezeptoren des Immunsystems sind Fas (CD95) und TNFR-I. Der Fas-Ligand (FasL) führt nach Bindung an Fas dazu, dass sich der Todesrezeptor trimerisiert und mit seiner zytosolischen Todesdomäne Adaptorproteine (FADD, *fas-associated via death domain*) bindet. FADD besitzt eine Todeseffektordomäne (DED) und bindet damit die Procaspase 8, eine Initiatorcaspase. Eine lokale Konzentrationserhöhung der Procaspase 8 um den Rezeptor führt zur gegenseitigen Spaltung und Aktivierung. Caspase 8 wird freigesetzt und aktiviert nun kaskadenartig Effektorcaspasen (Siegel, 2006, Chowdhury and Lieberman, 2008).



Wenn die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt ist, DNA-Schäden aufweist oder keine äußeren Signale erhält, die sie für ihr Überleben braucht, wird der intrinsische Apoptoseweg eingeleitet (Abb. 2). Die Aufrechterhaltung der Mitochondrienmembran wird durch die Wechselwirkung zwischen den proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie sichergestellt. Bax, Bak und Bok gehören zu den proapoptotischen Proteinen und können bei Stress die Freisetzung von Cytochrom c induzieren (Borner, 2003). Cytochrom c bindet im Zytoplasma an Apaf-1 (Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1) und führt zu dessen Polymerisierung, das Oligomer wiederum aktiviert die Initiatorcaspase 9. Die Aggregation der Procaspase 9 führt zur Autokatalyse der Proteasen und setzt die Aktivierung der Kaskade der Effektorcaspasen in Gang (Bratton and Salvesen, 2010, Siegel, 2006). Die antiapoptotischen Reize aktivieren beispielsweise das Bcl-2 Protein selbst. Das Bcl-2-Gen wurde ursprünglich bei einem B-Zell-Lymphom entdeckt. Bei seiner vermehrten Expression werden die Zellen unempfindlicher gegen apoptotische Reize, was zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Tumoren führt (Borner, 2003).

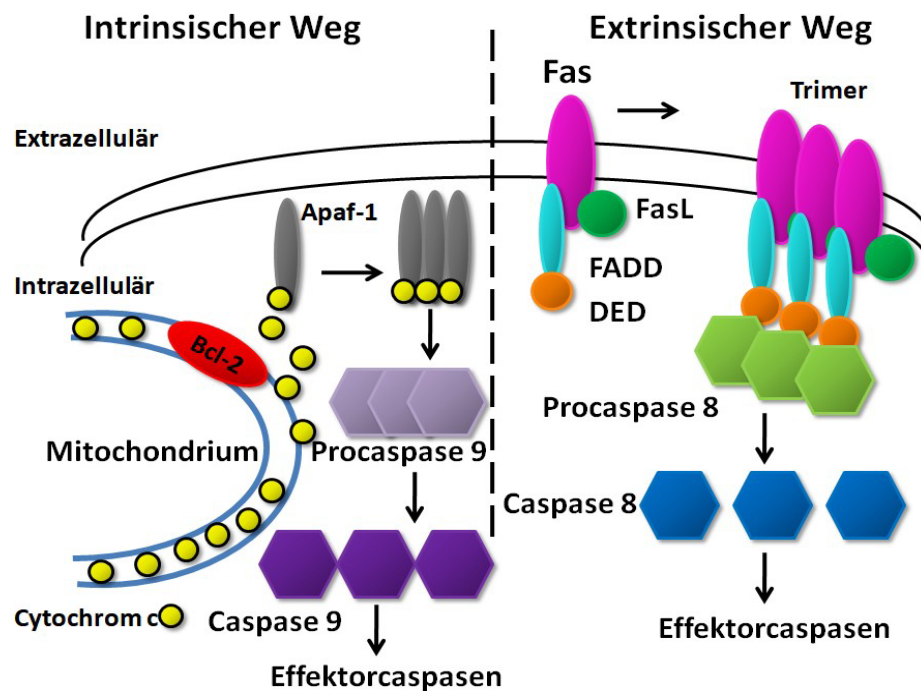


Abb. 2: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung des Todesrezeptors Fas eingeleitet. Der Fas-Ligand (FasL) führt nach Bindung an Fas dazu, dass sich der Todesrezeptor trimerisiert und mit seiner zytosolischen Todesdomäne FADD, die eine Todeseffektordomäne DED besitzt, die Procaspase 8 bindet. Die Konzentrationserhöhung der Procaspase 8 führt zur Freisetzung der Caspase 8, die kaskadenartig die Effektorcaspasen aktiviert.

Der intrinsische Weg beginnt mit der Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran, induziert durch die Proteine der Bcl-2-Familie. Cytochrom c bindet im Zytoplasma an Apaf-1 und führt zu dessen Polymerisierung. Das Oligomer aktiviert die Procaspase 9. Die Aggregation der Procaspase 9 führt zur Autokatalyse der Proteasen und setzt die Aktivierung der Kaskade der Effektorcaspasen in Gang.

## 1.2 Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein Prozess, den die Zelle mit dem Ziel durchläuft, die genetische Information zu verdoppeln und zwei identische Tochterzellen hervorzu- bringen. Zellwachstum, Duplikation der genetischen Information und die Auftei- lung auf zwei Tochterzellen verlaufen in geregelter Abfolge von vier Phasen: G1-Phase (Gap-Phase, engl. Lücke), S-Phase (Synthese) und G2-Phase, die

als Interphase zusammengefasst werden, und M-Phase (Mitose) (Abb. 3) (Haase and Wittenberg, 2014).

Nach der Mitose tritt die Zelle in die G1-Phase ein, es kommt zum Zellwachstum und zur Synthese der Proteine, die für die S-Phase benötigt werden. Die G1-Phase wird durch einen Kontrollpunkt (Restriktionspunkt) in einen A- und B-Zustand unterteilt. An diesem wird überprüft, ob alle Bedingungen, wie beispielsweise die Größe der Zelle, Ernährungsbedingungen und das Fehlen anti-mitotischer Signale, für das Fortschreiten des Zellzyklus' erfüllt sind (Haase and Wittenberg, 2014). Der B-Zustand wird eingeleitet durch die Synthese von Cyclin D, das CDK4 und CDK6 (*cyclin dependent kinase*) aktiviert. Verschiedene Proteine, darunter das Retinoblastomprotein (Rb-Protein), das einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F bildet, induzieren die Transkription verschiedener Gene, die für die DNA-Replikation und den Eintritt in die S-Phase wichtig sind (Hydbring et al., 2016).

In der nachfolgenden S-Phase wird die DNA repliziert. Es wird eine Kopie des gesamten Genoms synthetisiert. Die Chromosomen bestehen nun aus zwei Chromatiden. Die S-Phase wird eingeleitet durch die Synthese von Cyclin E, das CDK2 aktiviert, welches das Rb-Protein phosphoryliert (Hydbring et al., 2016). In dieser Phase wird eine große Menge an Histonen synthetisiert, die für die DNA-Kondensation benötigt werden. Die DNA-Replikation findet gleichzeitig an zahlreichen Stellen mithilfe von Proteinen, die in der G1-Phase hergestellt wurden, statt (Bell and Labib, 2016).

In der G2-Phase, die der Vorbereitung für die Mitose dient, wird zum einen, gesteuert durch Cyclin B, CDK1 und CDK2, die Kondensierung der Chromosomen eingeleitet und zum anderen das DNA-Korrekturlesen durchgeführt (Matson et al., 2019). Am Restriktionspunkt der G2-Phase wird die DNA auf Defekte überprüft und durch Reparaturmechanismen korrigiert. An diesen Mechanismen ist p53 besonders beteiligt (Limas and Cook, 2019). Ist die Schadensbeseitigung unmöglich, so wird die Apoptose eingeleitet, damit es zu keiner Mutationsan-

häufung in den weiteren Zellgenerationen und damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung kommt (Matson et al., 2019).

Die Mitosephase, die eigentliche Zellteilung, unterteilt sich in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. In der Prophase kondensiert sich die DNA und einzelne Chromosomen werden sichtbar, der Spindelapparat beginnt sich auszubilden und Zentrosomen wandern zu den entgegengesetzten Zellpolen, aus denen dann die Mikrotubuli ausstrahlen, die in Richtung der Kinetochore der Chromosomen wachsen. Die Kernhülle löst sich auf. In der Metaphase ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle an und die Kinetochore der Chromosomen haben nun Kontakt zu den Mikrotubuli. In der Anaphase werden die Zwei-Chromatid-Chromosomen auseinander und in Richtung entgegengesetzter Zellpole gezogen (Lemonnier et al., 2020). Das Ende der Mitose ist die Telophase, in welcher sich die Ein-Chromatid-Chromosomen entspiralisieren und von einer neuen Kernmembran umhüllt werden. Den letzten Schritt der Zellteilung bezeichnet man als Zytokinese, wobei die Trennung des gemeinsamen Zelleibes durch die Zytoplasmamembran erfolgt (Zhuravlev et al., 2017).

Manche Zellen können nach der M-Phase in die G<sub>0</sub>-Phase eintreten. Auslöser dafür sind das Erreichen eines bestimmten Differenzierungsgrades, eine hohe Populationsdichte oder das Fehlen von Wachstumsfaktoren. In der G<sub>0</sub>-Phase finden zwar keine Zellteilungen statt, die Zellen haben aber einen hohen Stoffwechsel. Die Zelle kann in diesem Zustand dauerhaft verweilen, jedoch auf bestimmte Signale hin wieder in die G<sub>1</sub>-Phase eintreten (Israels and Israels, 2000).

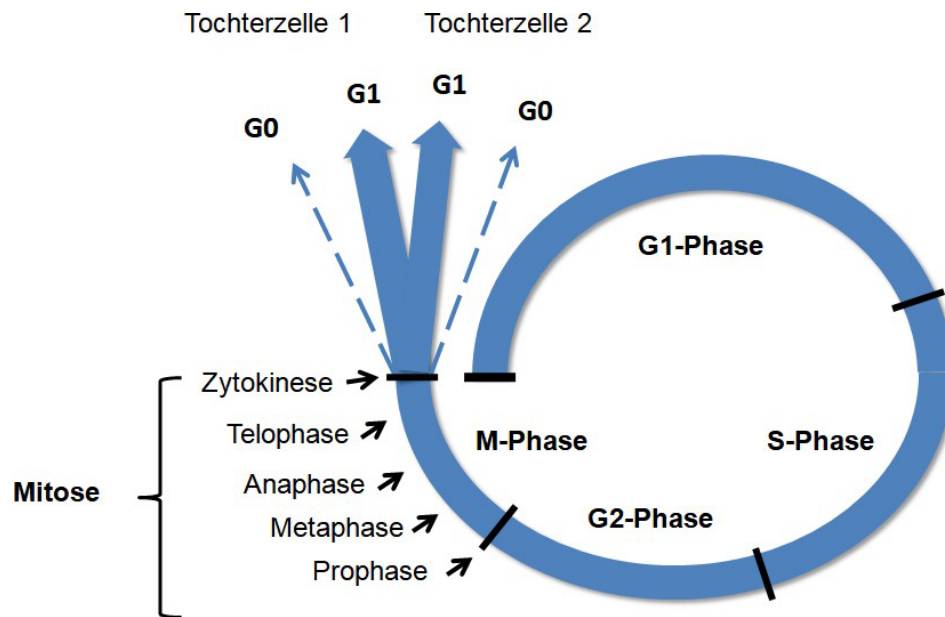


Abb. 3: Zellzyklus

Nach der Mitose tritt die Zelle in die G1-Phase ein, es kommt zum Zellwachstum und zur Synthese der Proteine. In der nachfolgenden S-Phase wird die DNA repliziert. Die Chromosomen bestehen nun aus zwei Chromatiden. In der G2-Phase wird die Kondensierung der Chromosomen eingeleitet und das DNA-Korrekturlesen durchgeführt. Die Mitosephase, die eigentliche Zellteilung, unterteilt sich in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Im letzten Schritt erfolgt die Trennung des gemeinsamen Zelleibes durch die Zytoplasmamembran, die Zytokinese. Manche Zellen können nach der M-Phase in die G0-Phase eintreten, wo keine Zellteilungen stattfinden. Abbildung modifiziert nach Benninghoff (Benninghoff et al.).

### 1.3 Chronische lymphatische Leukämie (CLL), deren molekulare Eigenschaften und Therapie

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Es kommt zu einer klonalen Proliferation immuninkompetenter B-Lymphozyten im peripheren Blut. Die CLL ist die häufigste Leukämieform bei Erwachsenen in der westlichen Welt mit einer Inzidenz von 4-6/100000/Jahr, zunehmend mit dem Lebensalter (Siegel et al., 2018, Sant et al., 2010). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Siegel et al., 2018). Die

Ätiologie ist unbekannt, allerdings werden eine familiäre Häufung (Cuttner, 1992) sowie rassenabhängige Unterschiede der Inzidenz beobachtet (Yamamoto and Goodman, 2008). Die Diagnose der CLL ist meist ein Zufallsbefund, da die Patienten keine spezifischen Symptome aufweisen, bis eine Routineblutuntersuchung zu der Diagnose führt. Manche Patienten bemerken eine schmerzlose Lymphknotenschwellung und nur 5 bis 10 Prozent der Patienten klagen über sogenannte B-Symptome wie Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß (Hallek et al., 2008). Außerdem können eine Splenomegalie oder Hepatomegalie auftreten, wobei die CLL-Zellen jedes Organ infiltrieren und deren Funktion stören können. Bei der Untersuchung des Blutes sind Abweichungen in den Zellzahlen wie die B-Lymphozyten-Zellzahl von über 5000/ $\mu$ l zu finden, die auch zur Diagnose CLL führt (Hallek et al., 2008). Zytopenien, wie die Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie können oft bereits zum Zeitpunkt der Diagnose festgestellt werden. Infektionen sind die häufigste Todesursache bei Patienten mit CLL. Die meisten Infektionen treten infolge von einer Knochenmarksinfiltration und der daraus folgenden Leukopenie auf (Tsiodras et al., 2000, Hensel et al., 2003). In 5 bis 10 Prozent der Fälle transformiert die CLL in ein hoch malignes NHL (Richter-Syndrom). Es wird außerdem ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Zweitmalignomen bei Patienten mit CLL beobachtet, sowohl von hämatologischen als auch von soliden Tumoren (Travis et al., 1992). Nicht zu vernachlässigen sind auch psychologische Beeinträchtigungen, die im Zusammenhang mit der Diagnose stehen können. Die Überlebenszeit der Patienten mit CLL hängt von vielen Faktoren ab. Um die Patienten mit guter und schlechter Prognose zu unterscheiden und ihnen auch eine passende Therapie zuzuführen, bedarf es einer Stadieneinteilung. Bisher haben sich für Klinik und Forschung zwei Systeme nach *Rai* und nach *Binet* etabliert. Beide korrelieren mit der medianen Überlebenszeit und haben prognostische Signifikanz (Rai et al., 1975, Binet et al., 1977, van Oers, 2016).

Die CLL ist gekennzeichnet durch eine progressive Akkumulation immuninkompetenter monoklonaler B-Lymphozyten und die Unterdrückung der normalen Organfunktion. Diese B-Zellen sind auf dem Differenzierungsweg auf der Ent-

wicklungsstufe zwischen der Prä-B-Zelle und der reifen B-Zelle gehemmt und gehören wahrscheinlich zu der aktivierten und nicht mehr naiven B-Zell-Population (Fais et al., 1998, Damle et al., 2002). Zu den phänotypischen Eigenschaften der Tumorzellen gehören eine extrem niedrige Anzahl an Oberflächenimmunglobulinen, meist sind es IgM oder IgM und IgD. Zusätzlich sind die Zellen durch die Expression von CD5, einem T-Zell-assoziierten Antigen, und die Expression von einem oder mehreren B-Zell-assoziierten Antigenen wie CD19, CD23 und CD20 charakterisiert (Hallek et al., 2008). Die CLL-Tumorzellen exprimieren B-Zell-Rezeptoren von einem limitierten Repertoire, die antigenunabhängige und kontinuierliche Überlebenssignale übermitteln (Dühren-von Minden et al., 2012), was zu einer erhöhten Expression von Syk, Lyn, Btk und PI3K-Kinase führen kann (Woyach et al., 2012). Dies resultiert in einem intrazellulären Signal, das Wachstum, Überleben, Differenzierung und Migration induziert. Medikamente, wie Btk-Inhibitoren und PI3K-Inhibitoren, die den B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktionsweg gezielt angreifen, führen zur Apoptose, hemmen die Proliferation und verändern die Migrationsmuster der leukämischen Zellen.

Blutuntersuchungen von Patienten mit CLL mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ergaben zahlreiche genetische Anomalien. Die meisten Mutationen, die bei CLL auftreten sind del(13q), del(11q), Trisomie 12 und del(17q). Patienten mit einem normalen Karyotyp sowie mit Trisomie 12 und del(13q) gehören zu der Gruppe der Erkrankten mit einer günstigen Prognose. Patienten mit del(17q) oder del(11q) hatten früher ein hohes Risiko auf die Erstlinientherapie nicht anzusprechen oder kurze Zeit nach der Remission ein Rezidiv zu bekommen. Die Prognose der Patienten mit del(11q) hat sich seit der Einführung der Therapie nach dem FCR-Schema (Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab) verbessert während die mit del(17q) trotz dieser Therapie schlecht geblieben ist (Stilgenbauer et al., 2014). Solche Patienten sind primäre Kandidaten für die Behandlung mit neuen Substanzen wie Ibrutinib (Farooqui et al., 2015), Venetoclax (Stilgenbauer et al., 2016) und Idelalisib (Furman et al., 2014). Ein weiterer Marker, der mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist,

ist das Beta-2 Microglobulin (B2M). Erhöhte Werte korrelieren mit dem Erkrankungsstadium und der Tumorlast (Fayad et al., 2001). Eine Rolle spielt auch der Mutationsstatus der variablen Region der schweren Kette des Immunglobulins (*immunglobulin heavy chain variable region*, IGHV). Etwa die Hälfte der CLL-Zellklone weist einen unmutierten IGHV-Status auf, welcher mit einer kürzeren Überlebenszeit und einem höheren Risiko für das Auftreten von Rezidiven einhergeht, auf (Damle et al., 1999, Hamblin et al., 1999). CD38 und *zeta chain associated protein 70* (ZAP-70) sind zwei weitere prognostische Marker, deren Anwesenheit die Prognose verschlechtert (Ibrahim et al., 2001, D'Arena et al., 2001, Rassenti et al., 2008).

Die CLL ist eine extrem heterogene Erkrankung und es gibt keine allgemeine Übereinkunft über ein standardisiertes Therapieregime. Es gibt verschiedene Vorgehensweisen und Kombinationen einzelner Medikamente. Eine optimale Therapie für jede der Untergruppen der CLL-Patienten ist noch nicht definiert und Gegenstand laufender Studien. Indiziert ist eine Therapie bei Patienten mit CLL mit ausgeprägten Zytopenien (Hb < 10 g/dl, Thrombozyten <100000/ $\mu$ L), bei hoher Tumorlast, beim Auftreten von B-Symptomen und bei rezidivierenden Infektionen.

Folgende Substanzen werden zur Initialtherapie eingesetzt:

- Purinanaloga (Fludarabin, Pentostatin)
- Alkylantien (Chlorambuzil, Cyclophosphamid, Bendamustin)
- Monoklonale Antikörper (Rituximab, Ofatumumab, Obinutuzumab)
- Btk-Inhibitor (Ibrutinib, Acalbrutinib)
- PI-3-K $\delta$ -Inhibitoren (Idelalisib)
- Bcl-2-Inhibitoren (Venetoclax)

Die CLL ist durch Chemotherapie nicht heilbar. Die einzige kurative Möglichkeit ist die allogene Stammzelltransplantation mit dem Prinzip des Graft-versus-Leukämie-Effekts.



## 1.4 RNA-Interferenz

Der als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnete Vorgang ist eine sequenzspezifische Herabregulation eines Gens durch ein kurzes Stück doppelsträngiger, zu einem bestimmten Abschnitt des Zielgens komplementärer RNA. Diese Herabregulierung wird als *Knockdown* eines Zielgens bezeichnet. RNAi dient als zell-eigener Schutz gegen Viren und genetische Instabilität.

Der Mechanismus wurde erstmals in den späten 1990er Jahren beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Für diese Errungenschaft wurden *Andrew Fire* und *Craig Mello* im Jahr 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt (Fire, 2007, Mello, 2007).

RNAi beginnt mit der Produktion von kleinen RNA-Molekülen (ca. 20 bis 30 Nucleotide) (Meister and Tuschl, 2004). Es gibt drei Arten von kleinen regulatorischen RNAs: *short interfering RNAs* (siRNAs) (Bernstein et al., 2001), *microRNAs* (miRNAs) (Heimberg et al., 2008) und *PIWI-interacting RNAs* (piRNAs) (Girard et al., 2006). Die siRNA stammt von der doppelsträngigen RNA (dsRNA) und wird in der Zelle selbst produziert oder von außen in die Zelle eingeführt. Vom Enzym RNaseIII, einer Endonuclease, auch *Dicer* genannt, wird die dsRNA unter ATP-Verbrauch in kleine Segmente, siRNA, prozessiert (Bernstein et al., 2001). Die siRNA bindet nun an das *Argonaute*-Protein, dieses wählt einen Leitstrang und spaltet gleichzeitig den Folgestrang. Der Komplex aus RNA und Argonaut rekrutiert andere Proteine und bildet schließlich den sogenannten *RNA-induced-silencing-complex* (RISC) (Hutvagner and Simard, 2008). Der gebundene Leitstrang der siRNA führt RISC zur spezifischen *messenger-RNA* (mRNA), zu der er eine fast perfekte Komplementarität aufweist. Nach erfolgter Bindung katalysiert Argonaut die Spaltung der Ziel-mRNA, die dann von RNasen abgebaut wird.

Um einen gezielten *Knockdown* eines Gens zu erreichen, kann die siRNA chemisch synthetisiert werden. Allerdings hält dieser Zustand nur einige Tage an,

da die siRNA bald wieder abgebaut wird und außerdem ihre Konzentration durch die Zellteilung sinkt. Deshalb bietet sich eine Methode, die im Jahr 2002 simultan von verschiedenen Forschungsgruppen entwickelt wurde, an, bei der der Einsatz von *short-hairpin* RNA (shRNA) eine kontinuierliche Expression von siRNA und somit ein *Knockdown* in der Zellpopulation über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Die shRNA wird in eine DNA-Sequenz eines Plasmids konvertiert. Diese kodiert den *sense*-Strang, den *loop*-Bereich und den *antisense*-Strang. Während der Transkription entsteht eine selbstkomplementäre shRNA, die durch Dicer in die siRNA, die den *Knockdown* bewirkt, prozessiert wird (Abb. 4) (Shi, 2003).

Plasmide, die die Ziel-shRNA kodieren, werden außerdem mit einer stabilen plasmidkodierten Antibiotikaresistenz ausgestattet, die eine gezielte Selektion der transfizierten Zelllinien ermöglicht, in welchen das Zielgen über mehrere Monate herab reguliert werden kann (Brummelkamp et al., 2002).

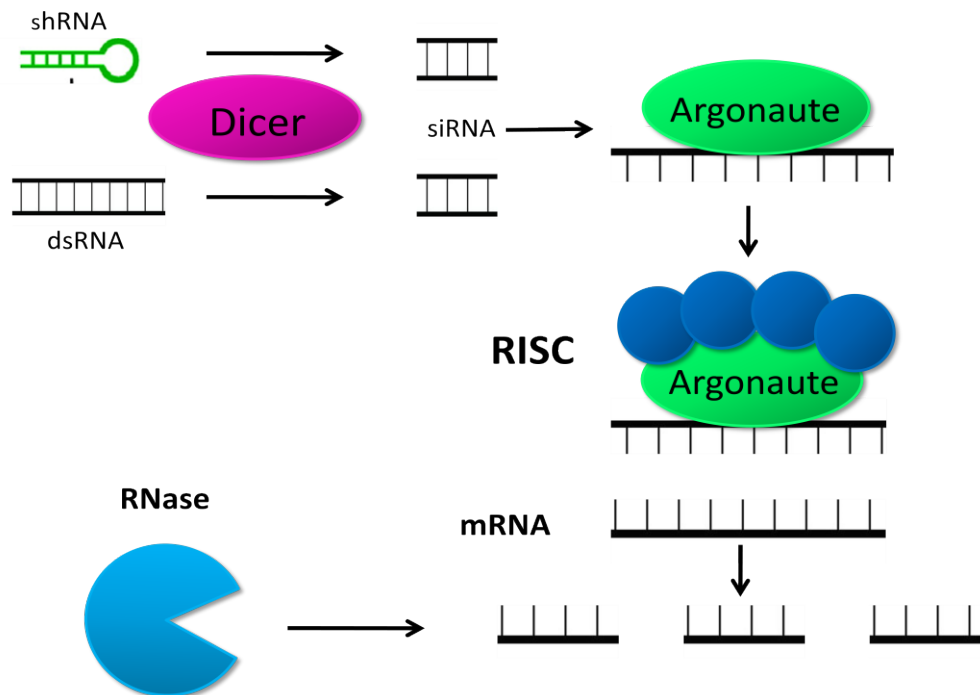


Abb. 4: RNA-Interferenz

Die in der Zelle produzierte doppelsträngige RNA (dsRNA) oder die von außen eingeführte short-hairpin RNA (shRNA) wird durch die Endonuclease Dicer in kleine Segmente, siRNA, prozessiert. Die siRNA bindet an das Protein Argonaute, dieses wählt einen Leitstrang und spaltet den Folgestrang. Der Komplex aus RNA und Argonaute rekrutiert andere Proteine und bildet den sogenannten RNA-induced-silencing-complex (RISC). Der gebundene Leitstrang der siRNA führt RISC zur spezifischen mRNA. Nach erfolgter Bindung katalysiert Argonaute die Spaltung der Ziel-mRNA, die dann von RNasen abgebaut wird.

## 1.5 NFAT-Transkriptionsfaktoren

NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) wurde erstmals vor mehr als 30 Jahren als Transkriptionsfaktor in aktivierten T-Zellen beschrieben, der im Zellkern an den IL-2 Promotor bindet (Shaw et al., 1988). Mittlerweile weiß man, dass die Expression der Proteine der NFAT-Familie nicht nur auf die T-Zellen begrenzt ist. NFAT-Proteine spielen eine große Rolle bei den Vertebraten, wo sie in vielen verschiedenen Zelltypen vorkommen (Rao et al., 1997, Hogan et al., 2003, Graef et al., 2001, Crabtree and Olson, 2002). Es wurden zahlreiche re-

gulatorische Eigenschaften in vielen Organsystemen (ZNS, Blutgefäße, Herz, Niere, Knochen, Skelettmuskulatur und hämatologische Stammzellen) entdeckt (Hogan et al., 2003, Graef et al., 2001, Crabtree and Olson, 2002, Kiani et al., 2004). Es wurde außerdem gezeigt, dass NFAT-Transkriptionsfaktoren die Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen regulieren, was auf eine zentrale Rolle dieser Proteinfamilie in der Zellproliferation und Tumorgenese hindeutet (Baksh et al., 2002, Carvalho et al., 2007, Buchholz et al., 2006, Baumgart et al., 2012). In der Tat wurden verschiedene NFAT-Familienmitglieder mit Tumor-assoziierten Prozessen wie Wachstumsfaktorunabhängigkeit, Apoptose, Angiogenese und Invasivität in Zusammenhang gebracht (Viola et al., 2005, Mognol et al., 2016). Dysregulationen der NFAT-Signalübertragung wurden bei verschiedensten Tumorerkrankungen, inklusive den Lymphomen und Leukämien beschrieben (Marafioti et al., 2005, Medyouf et al., 2007, Lenz et al., 2008).

Die NFAT-Familie besteht aus fünf Mitgliedern: NFAT1 (auch bekannt als NFATp oder NFATc2), NFAT2 (auch bekannt als NFATc oder NFATc1), NFAT3 (auch bekannt als NFATc4), NFAT4 (auch bekannt als NFATx oder NFATc3) und NFAT5 (auch bekannt als *tonicity enhancer binding protein* (TonEBP) oder *osmotic response element-binding protein* (OREBP)) (Tab. 1) (Miyakawa et al., 1999). Außer NFAT5, welches als Antwort auf osmotischen Stress aktiviert wird (Lopez-Rodriguez et al., 2001, Miyakawa et al., 1999), werden alle NFAT-Proteine (NFAT1 - 4) über Calcium und Calcineurin reguliert (Rao et al., 1997). Obwohl NFAT3 eine ähnliche Proteinstruktur wie die anderen NFAT-Proteine aufweist, kommt es meist außerhalb des Immunsystems vor (Hoey et al., 1995).

Tab. 1: NFAT-Proteine

NFAT-Familienmitglieder, deren alternative Bezeichnungen, Regulationsmechanismus und Status der Expression im Immunsystem

NFAT-Proteine	Andere Bezeichnung	Regulation	Expression im Immunsystem	Referenzen
<b>NFAT1</b>	NFATc2, NFATp	Calcium/ Calcineurin	Ja	(McCaffrey et al., 1993)
<b>NFAT2</b>	NFATc1, NFATc	Calcium/ Calcineurin	Ja	(Northrop et al., 1994)
<b>NFAT3</b>	NFATc4	Calcium/ Calcineurin	Nein	(Hoey et al., 1995)
<b>NFAT4</b>	NFATc3, NFATx	Calcium/ Calcineurin	Ja	(Hoey et al., 1995, Masuda et al., 1995, Ho et al., 1995)
<b>NFAT5</b>	TonEBP, OREBP	Osmotischer Stress	Ja	(Miyakawa et al., 1999, Lopez-Rodriguez et al., 1999, Jauliac et al., 2002)

NFAT, nuclear factor of activated T cells; TonEBP, tonicity enhancer binding protein; OREBP, osmotic response element-binding protein

NFAT-Proteine bestehen aus einer hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne, auch *Rel-homology domain* (RHD) genannt, einer regulatorischen Region, auch bekannt als *NFAT-homology region* (NHR), die eine aminoterminal Transaktivierungsdomäne (TAD) beinhaltet, und einer carboxyterminalen Region (Abb. 5). Die RHD gewährleistet die DNA-Bindungsspezifität und enthält 64 bis 72 Prozent homologe Anteile zwischen den einzelnen NFAT-Mitgliedern (Chen et al., 1998). Die regulatorische Domäne, die weniger stark konserviert ist, ent-

hält viele serinreiche Regionen (SRRs), die in inaktiven Zellen durch die NFAT-Kinasen Caseinkinase 1 (CK1), Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und *dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase* (DYRK) hochgradig phosphoryliert vorliegen. Die NHR beinhaltet ebenfalls Bindungsstellen für Calcineurin und CK1, die die NFAT-Aktivierung durch deren Regulation des Phosphorylierungsgrades der SRR-Regionen kontrollieren. N- und C-terminale Domänen sind sehr variabel zwischen den einzelnen NFAT-Proteinen und deren Isoformen (Rao et al., 1997, Hogan et al., 2003).

Jedes der durch Calcium regulierten Proteine hat mehrere, durch alternatives Splicing entstandene Isoformen, die sich an den N- und C-terminalen Regionen unterscheiden, wobei die NHR- und RHD-Regionen konserviert bleiben (Luo et al., 1996a, Imamura et al., 1998, Park et al., 1996, Chuvpilo et al., 1999). In dieser Arbeit werden im Folgenden die NFAT-Proteine behandelt, die durch Calcium und Calcineurin aktiviert werden und jene, die in den Zellen des Immunsystems vorkommen. Demnach handelt es sich um NFAT1, NFAT2 und NFAT4.

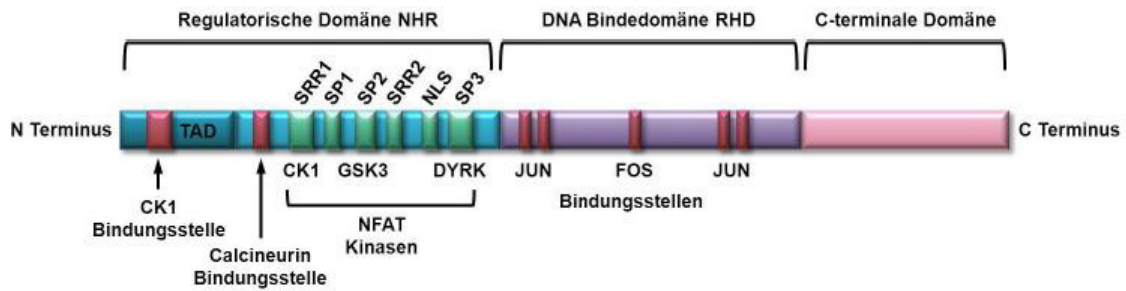


Abb. 5: Schematischer Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren

NFAT-Proteine bestehen aus einer DNA-Bindedomäne (RHD), einer regulatorischen Region (NHR), die eine aminoterminaler Transaktivierungsdomäne (TAD) beinhaltet, und einer carboxyterminalen Region. Die NHR enthält viele serinreiche Regionen (SRRs), die in inaktivierten Zellen durch NFAT-Kinasen Caseinkinase 1 (CK1), Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und dual-specificity tyrosine-phosphorylation-reguliert Kinase (DYRK) hoch phosphoryliert sind. Die NHR beinhaltet ebenfalls Bindungsstellen für Calcineurin und CK1. N- und C-terminale Domänen sind sehr variabel zwischen den einzelnen NFAT-Proteinen und deren Isoformen (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Melanie Märklin).

### 1.5.1 NFAT-Aktivierungsweg

Die Signaltransduktion, die zur Aktivierung von NFAT führt, beginnt mit der Antigenbindung durch den Oberflächenrezeptor auf den Zellen des Immunsystems. In ruhenden Zellen verbleiben die NFAT-Proteine hoch phosphoryliert im Zytoplasma und haben eine niedrige Affinität zur DNA (Porter et al., 2000). Da sich diese Arbeit mit der CLL beschäftigt und diese Erkrankung von den B-Zellen ausgeht, wird der Signalweg anhand der BCR-Aktivierung hier beschrieben (Abb. 6). Die Antigenbindung an den BCRs löst eine Signalkaskade aus. Daraufhin wird die PLC- $\gamma$  durch Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert. PLC- $\gamma$  hydrolysiert das membranständige PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und induziert die Calciumfreisetzung in das Zytoplasma. STIM (*stromal interaction molecule*) in der ER-Membran registriert die sinkende Calciumkonzentration und gibt ein Signal an das Orai-Protein im Calcium-Kanal CRAC (*calcium-*

*release-activated calcium*) in der Plasmamembran und fördert zusätzlichen Calcium-einstrom aus dem Extrazellularraum. Die Bindung von Calcium an das Protein Calmodulin führt dazu, dass die Phosphatase Calcineurin die NHR des NFAT dephosphoryliert und aktiviert. Nun kann NFAT in den Zellkern eindringen. Im Zellkern kooperieren die NFAT-Proteine mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren und regulieren die Genexpression (Hogan et al., 2003, Macian, 2005, Lenz et al., 2008, Muller and Rao, 2010). Es ist außerdem festgestellt worden, dass auch Calcineurin im Zellkern der stimulierten Zellen vorhanden ist, um den dephosphorylierten Zustand von NFAT und deren Lokalisation im Zellkern aufrechtzuerhalten (Garrity et al., 1994, Loh et al., 1996a, Loh et al., 1996b, Timmerman et al., 1996). Die Transkription wird beendet, indem NFAT durch die Kinasen GSK3, CK1 und DYRK rephosphoryliert, damit inaktiviert und zurück in das Zytoplasma exportiert wird (Übersicht in Müller et al., 2010 (Muller and Rao, 2010)).



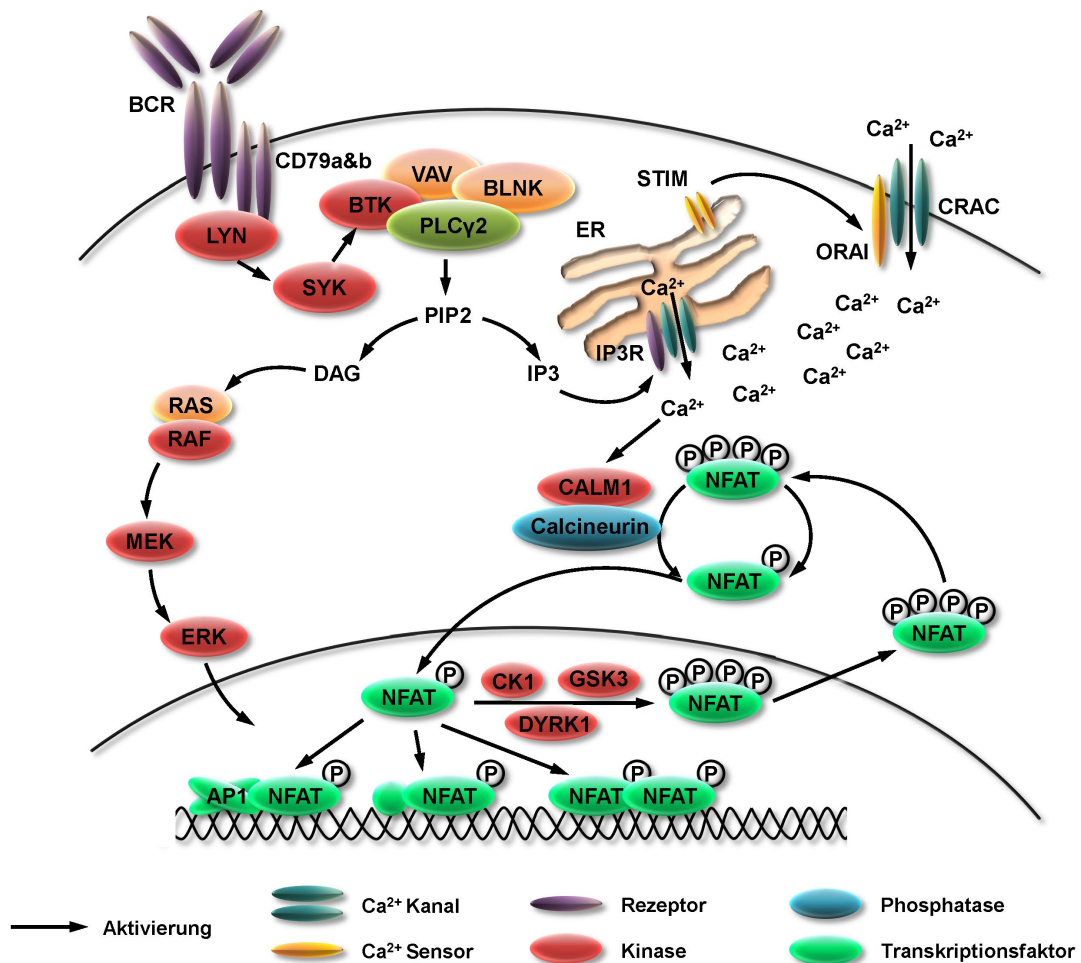


Abb. 6: NFAT-Aktivierung

In ruhenden Zellen verbleiben die NFAT-Proteine hochphosphoryliert im Zytoplasma und haben eine niedrige Affinität zur DNA. Die Antigenbindung an den BCR löst eine Signalkaskade aus. Daraufhin wird die PLC- $\gamma$  durch die Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert. PLC- $\gamma$  hydrolysiert das membranständige PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und induziert die Calciumfreisetzung in das Zytoplasma. STIM (stromal interaction molecule) in der ER-Membran registriert die sinkende Calciumkonzentration und gibt ein Signal an das ORAI-Protein im Calcium-Kanal CRAC (calcium-release-activated calcium) in der Plasmamembran und fördert zusätzlichen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum. Die Bindung von Calcium an das Protein Calmodulin führt dazu, dass die Phosphatase Calcineurin NFAT dephosphoryliert und aktiviert. Nun kann NFAT in den Zellkern eindringen. Im Zellkern kooperieren die NFAT-Proteine mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und regulieren die Genexpression. Die Transkription wird beendet, indem NFAT durch die Kinasen GSK3, CK1 und DYRK1 rephosphoryliert, damit inaktiviert und zurück in das Zytoplasma exportiert wird (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Melanie Märklin).

### 1.5.2 Autoregulation von NFAT2

NFAT2 existiert in mehreren verschiedenen Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen und sich in Länge und Expressionsmechanismen unterscheiden. Die kurze Isoform von NFAT2 unterscheidet sich in ihrer Struktur und Funktion von den längeren NFAT-Proteinen. In ihrer kurzen carboxyterminalen Region (Abb. 5) fehlt eine Repressor-Domäne, die bei den langen NFAT2-Isoformen beschrieben wurde (Chuvpilo et al., 1999, Luo et al., 1996b).

In Studien wurde beobachtet, dass B-Zellen nach Stimulation vorwiegend die kurze NFAT2 Isoform synthetisieren (Bhattacharyya et al., 2011, Hock et al., 2013). Ferner wurde beschrieben, dass in T-Zellen die Synthese von NFAT2 durch Autoregulation kontrolliert wird und in hohen Konzentrationen des Proteins resultiert (Serfling et al., 2006). Dieser Mechanismus ist isoformenspezifisch und nur die kurze NFAT2-Isoform wird vom NFAT-*inducible promotor* kontrolliert. Dies führt zu einer Akkumulation der kurzen NFAT2-Isoform während der Zelldifferenzierung (Muller and Rao, 2010). So gesehen kann die immunrezeptorstimulierte NFAT2-Induktion in peripheren Lymphozyten in zwei Ereignisse aufgeteilt werden: erstens die Aktivierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren sowie der schnelle Transport in den Zellkern und zweitens eine massive transkriptionelle und posttranskriptionelle Induktion der kurzen NFAT2-Isoform (Serfling et al., 2012).

In der Literatur werden der kurzen NFAT2-Isoform antiapoptotische, proliferationsfördernde und onkogene Eigenschaften zugeschrieben (Bhattacharyya et al., 2011, Nayak et al., 2009, Robbs et al., 2008).

### 1.5.3 Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren in der CLL

Der BCR spielt eine besondere Rolle in der Pathogenese der CLL. Während er in physiologischen B-Zellen nach seiner Aktivierung die Proliferation, B-Zell-Selektion, Differenzierung und Antikörperproduktion induziert, ist er in den CLL-

Zellen chronisch aktiviert und ist in die Aufrechterhaltung und das Fortschreiten der Erkrankung involviert (Herishanu et al., 2011, Marklin et al., 2020a). Es wurde eine Dysregulation des Calcineurin/NFAT-Signalwegs sowie eine unphysiologische Expression seiner Komponenten in mehreren malignen Erkrankungen (solide Tumoren mesenchymalen und epithelialen Ursprungs, Lymphome und Leukämien) festgestellt (Medyouf and Ghysdael, 2008). NFAT2 wird eine besondere Rolle in der CLL zugeschrieben. Dabei ist NFAT2 einerseits in vielen Fällen überexprimiert und im Zellkern nachweisbar (Marafioti et al., 2005) und andererseits bewirkt es genomübergreifende Veränderungen der Methylierung der DNA (Oakes et al., 2016). Bei Patienten mit CLL wurde eine Hypomethylierung der Promotorregion des NFAT2-Gens festgestellt, die eine Korrelation mit dem Stadium der Erkrankung nach *Binet* aufweist (Wolf et al., 2018). Für NFAT1 wird eine Rolle als Tumorsuppressorgen in verschiedenen Zelltypen angenommen. In einer Studie wurde gezeigt, dass Mäuse, die kein NFAT1 exprimieren, spontane B-Zell-Lymphome entwickeln (May et al., 2014). Ein *Doppel-Knockout* von NFAT1 und NFAT4 zeigt zum einen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer BCR-Stimulation und eine erhöhte Zahl an reifen B-Zellen, zum anderen führt er zu einer deutlichen Lymphadenopathie und Splenomegalie bei den betreffenden Mäusen (Ranger et al., 1998). In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass NFAT-Proteine eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen. In weiteren Studien bleibt es zu untersuchen, wie sich die Beeinflussung der Signaltransduktion und die Herabregulierung einzelner Transkriptionsfaktoren therapeutisch nutzen lässt.

## 1.6 Modellsysteme

### 1.6.1 MEC1-Zelllinie

Zelllinien sind ein wertvolles Instrument im Studium der Pathogenese von malignen B-Zell-Erkrankungen *in vitro*. Für die Experimente dieser Arbeit wurde die MEC1-Zelllinie verwendet. MEC1-Zellen stammen aus dem peripheren Blut eines CLL-Patienten. Der Patient war ein männlicher 58-jähriger Kaukasier, bei dem im März 1990 eine CLL diagnostiziert wurde. In Kultur wachsen die Zellen

in kleinen Klumpen und adhären an den Wänden des Mediumbehälters. Die Verdopplungszeit beträgt 40 Stunden. Die MEC1-Zellen exprimieren die gleichen B-Zell-Marker wie die reifen B-Zellen CD19, CD20, CD21, CD22, unterscheiden sich in der Expression von CD23 und FMC7, sind positiv für CD11a, CD18, CD44, CD49d, CD54 und exprimieren ein hohes Ausmaß an CD80 und CD86. CD5 ist negativ bei diesen Zellen. Außerdem wurde eine Überexpression von Bcl-2 und Bax nachgewiesen (Übersicht in Stacchini et al., (Stacchini et al., 1999)).

### 1.6.2 Tierisches Modellsystem NOD-*scid*IL2Rgamma<sup>null</sup> Mausmodell

In der Krebsforschung haben *in vitro*-Analysen von Tumor-Zelllinien eine große Bedeutung. Die Möglichkeiten sind jedoch sehr begrenzt aufgrund der Tatsache, dass bei der Tumorentstehung und Pathogenese in einem multizellulären Organismus viele Faktoren eine Rolle spielen, die *in vitro* nicht nachgeahmt werden können. Es bedarf also eines tierischen Modellsystems, das eine Transplantation von humanen Krebszellen und deren Untersuchung *in vivo* erlaubt. Eine Möglichkeit besteht darin, ein Mausmodell mit einem genetisch angelegten Immundefekt zu verwenden, sodass keine primäre Abstoßung der humanen Zellen erfolgt. Für diese Arbeit wurde das NOD-*scid*IL2Rgamma<sup>null</sup> Mausmodell verwendet (Pearson et al., 2008).

Die NOD-*scid*IL2Rgamma<sup>null</sup> Maus ist extrem immundefizient und ist ein bevorzugtes Modellsystem, wenn es darum geht humane Zellen oder humanes Gewebe zu transplantieren (Pearson et al., 2008).

Bereits im Jahr 1983 wurde erstmals die *Prkdc<sup>scid</sup>* (*protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; severe combined immunodeficiency*) - Mutation entdeckt (Bosma et al., 1983). Da diese Mäuse einen hohen Grad an NK-Zellen-Aktivität aufwiesen, war der Erfolg der Transplantation humaner hämatopoietischer Stammzellen (HSCs) sehr begrenzt (Greiner et al., 1998). Ein weiterer Schritt in der Entwicklung immuninkompetenter Mäuse war die *non-obese*

*diabetic* (NOD)-*scid* Maus (Shultz et al., 1995). Zwar erlaubte dieses Modell den Einsatz höherer Dosen von HSCs und PBMCs (*peripheral-blood mononuclear cells*), die Einsetzbarkeit der Tiere war jedoch durch die verkürzte Lebensspanne, die Restaktivität der NK-Zellen und anderer Immunsystemkomponenten sehr begrenzt (Hesselton et al., 1995, Lowry et al., 1996, Pflumio et al., 1996, Shultz et al., 2007). Schließlich erfolgte im Jahr 1995 die Entwicklung einer Maus mit einer Mutation im IL-2 Rezeptor. Das Fehlen der IL-2R  $\gamma$ -Kette führt zu schweren Beeinträchtigungen in der T- und B-Zellentwicklung und deren Funktion und verhindert die NK-Zellentwicklung komplett (DiSanto et al., 1995, Ohbo et al., 1996). Somit war die Maus immunkompromittiert genug, um ihr ein komplettes humanes Immunsystem zu implantieren (Ito et al., 2002, Shultz et al., 2005, Ishikawa et al., 2005). Außerdem ermöglichten NOD-*scid* Mäuse die Transplantation und das Wachstum von Lymphomen und Leukämien *in vivo* (Hudson et al., 1998) und wurden deshalb zu einem bevorzugten Modell für Untersuchungen der Pathogenese der AML (Dick and Lapidot, 2005) und von anderen hämatologischen Neoplasien (Nakamura et al., 2005). Die NOD-*scid*IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> Maus weist neben dem Defekt der B-, T- und NK-Zellentwicklung eine Reihe weiterer Anomalien auf. Die Mäuse sind lebensfähig, fertil, normalgroß und weisen keine physischen Anomalien oder Verhaltensauffälligkeiten auf. Das mediane Überlebensalter der Tiere beträgt 89 Wochen (Shultz et al., 2005).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von NFAT in der Pathogenese von CLL zu untersuchen. Hierfür wurde ein NFAT-*Knockdown* durch plasmidkodierte Transfektion *in vitro* erzeugt. Analysen der Zelllinien mit dem *Knockdown* von NFAT1, NFAT2 und NFAT4 werden Aufschluss darüber geben, wie sich die Herabregulation des Transkriptionsfaktors auf die Proliferation, den Zellzyklus und die Apoptose *in vitro* auswirkt. Außerdem wird im Tierversuch ermittelt, wie der *Knockdown* auf die Tumorentwicklung *in vivo* zum Tragen kommt.

Die Analysen des NFAT-*Knockdowns* sollen dessen Auswirkung auf die Pathogenese von CLL zum Ausdruck bringen und möglicherweise neue Gesichtspunkte für zukünftige Therapieansätze zeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

96-well plate F-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well plate V-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well plate, Suspension culture U-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well plate, Ultra Low attachment U-Bottom	Costar® Corning, Tewksbury, MA
96-well plate, white	Roche, Penzberg
Nunc™ 96-Well Polypropylene plate, white	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Bolt® 4-12 % Bis-Tris Plus Gel	Novex® Life technologie, Darmstadt
Combitips Biopur 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Countess Slides	Invitrogen™, Life technologie, Darmstadt
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Einbettkassetten	Langenbrinck, Emmendingen
FACS Röhrchen 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
FACS Röhrchen m. Deckel 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Falconröhrchen 15; 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
GeneChip® Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, CA
Gentle MACS C-tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Gewebe-Kulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebe-Kulturschale Polystyrol PS 16/60 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Handschuhe Micro-Touch	Ansell, Tamworth UK
iBlot® Transfer Stack	Novex® Life technologie, Darmstadt
Kapillaren 9 µl	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
LS MACS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Microvette 500 EDTA	Sarstedt, Nümbrecht

Nitrilhandschuhe	Kimberley Clark, Weinheim
Objektträger Superfrost	Langenbrinck, Emmendingen
PCR-Reaktionsgefäße 8er Strips	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipette serologisch Advant. 2; 5; 10; 25; 50 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Pipettenspitzen 10; 200; 1000; 1250 µl	Eppendorf, Hamburg
QIA Shredder	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Sealing Folie	Roche, Penzberg
Sterilfilterspitzen 10; 100; 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Zellsieb 40 µm, steril	Partec, Münster
Zellsieb 40 µm, steril	Costar® Corning, Tewksbury, MA

### 2.1.2 Reagenzien & Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Invitrogen™, Life technologie, Darmstadt
16 % Formaldehyd (w/v) –Methanolfrei	Pierce, Perbio Rockford USA
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose NEEO Ultra	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Heidelberg
Bolt™ LDS Sample Buffer	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Bolt™ MES SDS Running Buffer	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Bolt™ Reducing Agent	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cell Fixation/Permeabilisation Kit	BD Biosciences, Heidelberg
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Wisconsin, USA
Decalcifizierungslösung	Richard Allan Scientific, Braunschweig
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim



DNase & Rnase freies Wasser	Promega, Wisconsin, USA,
Dnase I	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
dNTPs	Lonza, Basel, CH
EDTA-Lösung (0,5 M)	FLUKA, Steinheim
Ethanol p.a. (99,9 %)	Merck, Darmstadt
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Formalin (37 %)	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Merck, Darmstadt
HALT Protease & Phosphatase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
HEPES (1 M)	Gibco® Life technologie, Darmstadt
INDO-1, AM, cell permeant	Molecular Probes® Life technologies, Darmstadt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Gibco® Life technologie, Darmstadt
Licor Blocking Buffer	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
LPS from E. coli	Sigma-Aldrich, Steinheim
MACS Puffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Methanol	Merck, Darmstadt
Midori Green	Biozym, Hessisch Oldendorf
RNase A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco® Life technologie, Darmstadt
Neomount Eindeckmedium	Merck Millipore, Darmstadt
NE-PER Nuclear & Cytoplasmic Extraction	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Oligo(dT) <sub>23</sub> Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim

One-Color Protein Molecular Weight Marker Orange G	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
PBS w/o Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Mix	BD Pharmingen™, Heidelberg
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	PAA, GE Healthcare, Freiburg
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Puromycin, Dihydrochloride	Sigma-Aldrich, Steinheim
QuickExtract DNA Extraktionslösung	Calbiochem, Darmstadt
Red Taq + Puffer	Biozym, Hessisch Oldendorf
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rnase Dnase freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
RNaseOUT™	Promega, Wisconsin, USA,
Rneasy Mini Kit	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Roti®-Nanoquant	Qiagen, Hilden
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 GlutaMAX-I HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
SDS (10 %)	Gibco® Life technologies, Darmstadt
Superscript II Reverse Transkriptase	Carl Roth, Karlsruhe
SYBR® Select Master Mix	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Applied Biosystems®, Life technologie, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol (Zellkultur)	Sigma-Aldrich, Steinheim
	Gibco® Life technologie, Darmstadt

### 2.1.3 Geräte und Zubehör

BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
------------------	----------------------------

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Bolt® Mini Gel Tank	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Countess™	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
ELISA Reader	TECAN, Crailsheim
Eppendorf 8 Kanal elektr.	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus 2,5; 10; 100; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Geldoku E-Box-VX2/20M	Peqlab, Erlangen
Gelkammer	Peqlab, Erlangen
GloMax®-96 Microplate Luminometer	Promega, Wisconsin, USA, Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
iBlot® Gel Transfer Device	Heraeus, Hanau
Inkubator HERA Cell	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
Licor Odyssey Imaging System	Roche, Penzberg
Light Cycler LC480	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0R	Zeiss, Jena
Mikroskop HBO 50	LG, Willich
Mikrowelle	Peqlab, Erlangen
Nanodrop	Integra Biosciences, Chur CH
Pipetboy acu	Heidolph, Schwabach
Schüttler Polymax 1040	Bio-Rad, München
Spannungsgerät Power Pac 300	Heraeus, Hanau
Sterilbank HERA safe	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Integra Biosciences, Chur CH
Vacusaft	Roth, Karlsruhe
Waage Kern	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.4 Puffer und Medien

Einfríermedium	FCS + 10 % DMSO
FACS-Puffer	10 % FCS + 2 nM EDTA
PBS-T	PBS + 0,1 % Tween-20
IMDM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

#### 2.1.5 Antikörper

Annexin V-eFlour450	-	BD Biosciences, Heidelberg
7-AAD		BD Biosciences, Heidelberg
GAPDH	mouse, IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, Minneapolis, MN
IRDye® 680 Anti-Rabbit	Donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 680LT Anti-Mouse	Donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 800CW Anti-Mouse	Donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 800CW Anti-Rabbit	Goat	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
NFAT2 (7A6)	mouse IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
β-Aktin (13E5)	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
β-Aktin (13E5)	mouse IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
NFAT1	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
NFAT2	mouse IgG	BD Pharmingen™, Heidelberg
NFAT2	rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
NFAT4	rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, US

#### 2.1.6 Primer

NFAT1	Exon 1-2	fw ATC CGA ACG AAG AAG AGC CG rv GCT TGA GGC CAT AGT CCA GG
-------	----------	--

	Exon 2-3	fw GTG CCT GCC ATT CCC ATC T rv TGG ACA GCG GCC ACT CAA G
	Exon 3-4	fw GGT TCA GCT CCA TGG CTA CA rv CGC TCA TCA GCT GTC CCA AT
	Exon 4-5	fw ACC CTT GGA GCC CAA AAA CA rv CTT TCC GCA GCT CAA TGT CG
	Exon 5-6	fw CTA ACC CCA TCG AGT GCT CC rv AGG CAG CTG TCT GTG TCT TG
	Exon 6-8	fw AAG CCA CGG TGG ATA AGG AC rv ACA GGT GTG CGG ATA TGC TT
	Exon 8-9	fw AAA CGA AGT CAG CCT CAG CA rv CTG CAG ATC AGA GTG GGG TC
	Exon 9-10	fw GCA GAA CTT GGA CCA GAC CT rv TGG CAG GAG GTC CTG AAA AC
NFAT2	Exon 1-2	fw AAG TCA GCG GAG GAA GAA CA rv GGT GTG GAG GTC TGA AGG TT
	Exon 2-3	fw CCT GTC CCC TAC GTC CTA CA rv CTG CCC TCC GTC TCG TAG T
	Exon 3-4	fw ACG AGC CCA CTA CGA GAC rv CGG CTC ATT CTC CAA GTA GC
	Exon 4-5	fw CCT GGA GAT CCC ACT CCT G rv CGT ACC CGT GTG TTC TTC CT
	Exon 5-6	fw AGG AAG AAC ACA CGG GTA CG rv CTC TGC TTC TCC ACC AGA GG
	Exon 6-8	fw CTG CAG GAC TCC AAG GTC AT rv GGG ATC TCA ACC ACC AGA GA
	Exon 8-9	fw AGA AAG CGA AGC CAG TAC CA rv GAC TTA ACC CCT GGC TCA CC
	Exon 9-10	fw AGG TGC ATG AGG ACG GTA GT rv GCA ACT AGG AGT GGG TGC TC
NFAT4	Exon 1-2	fw GTC TTT GGC GAG GAC GGG rv TGG ATG CAC AAT CAT CTG GCT

Exon 2-3	fw CTG GAG CAA ACC AAA GCC TG rv AAG GCC AGT CTA GTG GAG GT
Exon 3-4	fw GTA GCC GAG GGG CAG TAA AA rv GGC TTT TCG TTA TAG CCC AGG
Exon 4-5	fw GCC AGT ACA AAA GTT CTG GAA A rv CCT GCA CAA TCA ATA CTG GCT
Exon 5-6	fw AAG TCC TTT CTC TGC AGA TAG CC rv TGA GGA AGT TCT TGA GCA GAC C
Exon 6-8	fw GGA CAA GAT GGA CGA CCT CAG rv ACA ATG TGA GCC CCT TGA CA
Exon 8-9	fw AGC CAG TCT CAA CGT TTT ACT T rv AGG CAC AGG CAA AGA TGG AA
Exon 9-10	fw TGG TCT GCA GGA CAT CAC TT rv CCT GCT CCT TGG GAA ACA GA

NFAT1	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
NFAT2	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
NFAT3	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
NFAT4	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
NFAT5	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
GAPDH	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zelllinien und Vektoren

In dieser Arbeit wurden MEC1-Zelllinien verwendet, die nach dem RNAi-Prinzip, wie in 1.4 beschrieben, behandelt wurden. Die verschiedenen shRNA-exprimierenden Plasmide wurden in die Zellen transfiziert, um die Produktion von NFAT1, NFAT2 oder NFAT4 zu hemmen, d. h. einen sogenannten *Knock-down* auf mRNA-Ebene zu bewirken. Für jede NFAT-mRNA wurden mehrere verschiedene shRNAs, die an unterschiedlichen Sequenzen der mRNA binden,

generiert. Außerdem wurde eine shRNA hergestellt, die keinen mRNA-Bereich bindet und somit keine RNAi-Suppression bewirkt. Diese sogenannte *scrambled* shRNA diente als Negativkontrolle bei den folgenden Experimenten. Alle transfizierten Plasmide wurden mit einer stabilen Antibiotikaresistenz gegen Puromycin ausgestattet, die eine Selektion der Zelllinien während der Kultivierung ermöglichte.

Tab. 2: NFAT-Transkriptionsfaktoren und deren shRNA-Vektoren

	<b>NFAT1</b>	<b>NFAT2</b>	<b>NFAT4</b>
	<i>scrambled</i>	<i>scrambled</i>	<i>scrambled</i>
<b>shRNA-Vektor</b>	A4	B5	28
	B4	C5	29
	C4	E5	30
	D4		32
	F4		

Jede Zelllinie, die kultiviert wurde, enthielt eine Suppression eines bestimmten mRNA-Abschnitts des jeweiligen NFAT-Proteins. Es gab fünf Zelllinien mit dem NFAT1-*Knockdown*, drei mit dem NFAT2-*Knockdown* und vier mit dem NFAT4-*Knockdown* (Tab. 2). Zusätzlich gab es jeweils eine *scrambled* Zelllinie, die als Negativkontrolle diente.

Die Zelllinien mit den entsprechenden RNAi-Suppressionen wurden für diese Arbeit als gefrorenes Pellet von Jonas S. Heitmann zur Verfügung gestellt.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Kultivierung und Selektion der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturmedium kultiviert und vermehrt. Die Konzentration wurde bei 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml gehalten. Um die Zellen mit dem *Knockdown* zu selektieren, wurde das Medium mit 2 µg/ml Puromycin-

lösung versetzt. Die optimale Konzentration des Antibiotikums wurde in einem Versuch ermittelt (Märklin, 2015).

<u>Zellkulturmedium</u>	<u>Puromycinlösung 1mg/ml</u>
IMDM-Medium	25 mg Puromycin-Dihydrochlorid
+ 20 % FCS	2,5 ml 20 mM HEPES
+ 1 % Penicillin/Streptomycin-Mix	verdünnt mit PBS
+ 1 % 4 mM Glutamin	
+ 1 % Sodumbicarbonat	

#### 2.2.2.2 Auftauen von Zellen

Das Zellkulturmedium, hergestellt wie in 2.2.2.1 beschrieben, wurde auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden aus den Kryoröhrchen mit dem erwärmten Medium vorsichtig mit einer Pipette herausgelöst und in 10 ml Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation bei 170 g für 5 min bei 20 °C wurde das DMSO entfernt. Die Zellpellets wurden noch ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen gewaschen und anschließend die Zellzahl mittels Countess™ bestimmt. Die Kultivierung erfolgte bei den in 2.2.2.1 beschriebenen Bedingungen (Märklin, 2015).

#### 2.2.2.3 Pelletieren von Zellen

Eine angegebene Anzahl von Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und bei 170 g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert. Um das Restmedium auszuwaschen, wurde das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellpellets sofort verwendet oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt (Märklin, 2015).



## 2.2.3 Nachweis des *Knockdowns*

### 2.2.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die RNA wurde unter Einsatz des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Dafür wurden Zellpellets verwendet, hergestellt wie unter 2.2.2.3 beschrieben, die mit 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol lysiert wurden. Die RNA-Isolierung aus den Zellen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Anschließend wurde die RNA in 30 µl RNase- und DNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Reinheit und die RNA-Konzentration wurden mit dem Nanodrop-Photometer gemessen.

Für die Weiterverarbeitung zur cDNA wurden 1 µg RNA in RNase-freiem Wasser mit einem Mastermix nach Pipettierschema vermischt. Die Synthese erfolgte bei 42 °C 50 Minuten lang und anschließend wurde der Vorgang 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde cDNA bei -20 °C gelagert.

#### cDNA-Synthese:

10 µl RNA

#### 10 µl Mastermix:

4 µl 5x Puffer

2 µl DTT

1 µl Oligo(dt)<sub>23</sub>

1 µl dNTP

1 µl RNase Out

1 µl Superscript II

### 2.2.3.2 Quantitative *Real Time*-PCR

Zur Bestimmung des *Knockdowns* auf DNA-Ebene wurde eine quantitative *Real Time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die qRT-PCR wurde unter Einsatz des Roche Light Cycler 480 und auf 96-well Platten durchgeführt. Die cDNA wurde

nach Pipettierschema mit dem RNase-freien Wasser verdünnt und in die 96-well Platte, ebenfalls nach einem vorher festgelegten Schema, vorgelegt. Die Primer wurden auch nach einem Pipettierschema mit dem SYBR® *Select Master Mix* (Invitrogen) versetzt und zu der cDNA in die Platte pipettiert. Die Platte mit den Proben wurde mit einer Folie abgeklebt und bei 300 g eine Minute lang zentrifugiert. Die Messung erfolgte mit dem angegebenen Programm und wurde anschließend mit der Lightcycler Software (Roche) analysiert.

#### cDNA-Ansatz

1 µl cDNA  
8 µl RNase freies Wasser  
9 µl gesamt pro well

#### SYBR® *Select Master Mix*-Ansatz

10 µl Master Mix  
0,5 µl Primer *fw*  
0,5 µl Primer *rv*  
11 µl gesamt pro well

#### PCR-Programm

UGD Aktivierung	1 Zyklus	50 °C	2 min
Taq Aktivierung	1 Zyklus	95 °C	2 min
Amplifikation	40 Zyklen	95 °C	15 s
		60 °C	1 min
Schmelzkurve		60 -95 °C	15 s
Kühlen	1 Zyklus	40 °C	30 s

#### 2.2.3.3 Proteinisolation

Für die Proteinisolation wurden Zellpellets, hergestellt wie in 2.2.2.3 beschrieben, verwendet. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit 100 µl RIPA-Puffer, vorher mit 1:100 HALT Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail versetzt, lysiert. Die Zellen wurden 20 Minuten auf Eis und weitere 30 Minuten bei 4 °C unter Schütteln lysiert. Anschließend wurde das Proteinlysate von den zellulären Bestandteilen in der Zentrifuge 20 Minuten bei 800 g und 4 °C getrennt. Der Überstand mit dem Proteinlysate wurde entnommen und quantifiziert (Märklin, 2015).

#### 2.2.3.4 Proteinbestimmung nach *Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mithilfe der Methode nach *Bradford* durchgeführt. Hierfür wurden 96-well Flachbodenplatten verwendet. Es wurden 49 µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt und anschließend die zu analysierenden Proteinlysate sowie die Eichgerade je 1 µl pro *well* hinzugegeben. Vorher wurden die Proteinlysate 1:10 mit dem RIPA-Puffer verdünnt. Für die Herstellung der Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung wurde diese mit ddH<sub>2</sub>O 1:5 verdünnt und 200 µl der Verdünnung pro *well* hinzugegeben. Nach der Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde anschließend die Farbreaktion mit dem Photometer bei 590 nm und 450 nm gemessen und mittels Bildung des Quotienten 590/450 die Proteinkonzentration berechnet (Bradford, 1976).

#### RIPA-Kalibriergerade

0 mg/ml

0,0625 mg/ml

0,125 mg/ml

0,25 mg/ml

0,5 mg/ml

1 mg/ml

2 mg/ml

4 mg/ml

#### 2.2.3.5 *SDS-Page*

Anschließend wurden die Proteine mittels *SDS-Page* aufgetrennt. Dafür wurden Bolt® 4-12 % Bis-Tris-Gele verwendet, die nach Herstelleranleitung in die Bolt® Mini Gel-Laufkammer installiert wurden. Die Laufkammer wurde vorher mit 400 ml 1x MES Laufpuffer gefüllt. Die Menge des Proteinlysats, des LDS-Puffers und *Reducing Agent* wurde nach Schema (Tab. 3) berechnet und die Proben hergestellt. Diese wurden 10 min bei 70 °C denaturiert und in die Taschen der Gele zusammen mit 2-3 µl des Proteinstandards geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 165 V für 40 bis 45 min.

Tab. 3: Pipettierschema der Proteinproben

Gesamt Vol.	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl
LDS-Puffer	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl
Reducing Agent	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl
Protein + H <sub>2</sub> O	max. 6,5 µl	Max. 13 µl	Max. 19,5 µl	Max. 26 µl

### 2.2.3.6 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine in den Gelen aus der *SDS-Page* wurden unter Einsatz des iBlot® *Gel Transfer* System auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Zusammenbau für das *Blotting* erfolgte nach der Geräteanleitung und für die Übertragung der Proteine wurde das Programm P0 eingestellt.

Tab. 4.: P0 Programm des iBlot® *Gel Transfer* Systems

Programm	Spannung	Dauer	Dauer gesamt
P0	20 V	1 min	7 min
	23 V	4 min	
	25 V	verbleibende Zeit	

Das Blocken erfolgte mindestens für eine Stunde unter Schütteln in 20-30 ml Odyssey™ *Blocking* Puffer 1:1 verdünnt mit PBS, versetzt mit 0,01 % NaN<sub>3</sub>. Danach wurde die Membran aus der Lösung entnommen und in einer weiteren Lösung, versetzt mit Primärantikörpern nach der Tab. 5, über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Primärantikörperlösung entfernt und die Membran vier Mal für jeweils 5 min unter Schütteln mit PBS, versetzt mit 0,2 % Tween, gewaschen. Danach wurde die Sekundärantikörperlösung, hergestellt nach Tab. 6, hinzugegeben und für 30-60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut vier Mal für jeweils 5 min unter Schütteln mit PBS, versetzt mit

0,1 % Tween, gewaschen und danach bei 50 °C im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend wurden die Proteinbanden auf der Membran mit dem Odyssey® *Imaging System* visualisiert (Märklin, 2015).

Tab. 5: Primärantikörper und Primärantikörperlösung

<u>Primärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Primärantikörperlösung</u>	
β-Aktin (m-rabbit)	1:5000	Odyssey™ Blocking Puffer	12,5 ml
β-Aktin (m-mouse)	1:5000	PBS	12,5 ml
NFAT1 (m-rabbit)	1:2000	0,2 % Tween 20	50 µl
NFAT2 (m-mouse)	1:2000	0,01 % NaN <sub>3</sub> (1 %)	250 µl
NFAT2 (m-rabbit)	1:3000		
NFAT4 (m-rabbit)	1:1500		

Tab. 6: Sekundärantikörper und Sekundärantikörperlösung

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Sekundärantikörperlösung</u>	
anti-mouse 800CW	1:20000	Odyssey™ Blocking Puffer	12,5 ml
anti-mouse 680LT	1:60000	PBS	12,5 ml
anti-rabbit 800CW	1:20000	0,2 % Tween 20	50 µl
anti-rabbit 680RD	1:20000	0,02 % SDS (10 %)	50 µl
		0,01 % NaN <sub>3</sub> (1 %)	250 µl

#### 2.2.4 Nachweis der *in vitro* Proliferation

Um die Proliferation *in vitro* zu messen, wurden die MEC1-Zellen wie in 2.2.2.3 beschrieben, entnommen. Am Vortag wurde das Nährmedium gewechselt.  $2 \times 10^4$  Zellen pro *well* wurden in 100 µl Medium resuspendiert und in fünf weiße 96-well Flachbodenplatten (Nync) pipettiert. Um die Zellen zu selektieren, wurde das Medium mit 2 µl/ml Puromycinlösung, hergestellt wie in 2.2.2.1 beschrieben, versetzt. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über die angegebene Zeit inkubiert. Nach dem Hinzufügen der Reagenz des

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 1:1 zu der Zellsuspension in der Platte, wurde anschließend das durch die Lyse freigewordene ATP im Luminometer (Promega) quantifiziert (Crouch et al., 1993).

#### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden wie in 2.2.2.3 beschrieben vorbereitet, gefärbt und mit dem FACS Canto II analysiert.

##### 2.2.5.1 Apoptose Assay

Die Apoptoserate der Zelllinien wurde unter Einsatz von PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) im Durchflusszytometer gemessen.

Für die Färbung wurde zunächst der 10x Annexin V *Binding Buffer* 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die zu färbenden Zellen, pro Probe jeweils 1x10<sup>5</sup> Zellen und pro Kontrolle 1x10<sup>6</sup> Zellen, wurden jeweils in 100 µl 1x Binding Buffer resuspendiert. Es wurden 2,5 µl PE Annexin V und 2,5 µl 7-AAD pro Probe hinzugefügt und die Kontrollproben erstellt. Drei Kontrollproben wurden benötigt, eine ungefärbte Probe und zwei die jeweils nur PE Annexin V oder 7-AAD enthielten. Die Inkubation erfolgte für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben in 200 µl 1x Binding Buffer im Durchflusszytometer (FACS Canto II) innerhalb einer Stunde analysiert (Koopman et al., 1994).

##### 2.2.5.2 Bestimmung der Zellviabilität

Um die Viabilität der Zellen zu bestimmen, kann die nukleäre DNA mit DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden. Eines davon ist Propidiumiodid (PI).

Die zu färbenden Zellen wurden aus der Kultur entnommen, nach dem letzten Waschen mit PBS in -20 °C-kaltem 70% Ethanol resuspendiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Danach wurden die Zellen 7 Minuten mit 4500 rpm bei

4 °C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit der Pipette entnommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 1 % PI und 0,1 % RNase A versetzt. Die Färbung erfolgte im Dunkeln bei 4 °C für 15 Minuten. Die Analyse mit dem Durchflusszytometer (FACS Canto II) wurde innerhalb von einer Stunde durchgeführt (Märklin, 2015).

## 2.2.6 Tiermodell

### 2.2.6.1 Mäusehaltung und -zucht

Die Tiere, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind im Tierhaltungsbereich des Verfügungsgebäudes der Medizinischen Fakultät (FORS) gehalten worden. Eine spezifiziert pathogenfreie Haltung mit offener Käfighaltung und einer moderaten Trocken-Barriere (12 Stunden Tag-und-Nacht-Rhythmus, 23 °C) wurde eingehalten. Die Mäuse wurden versorgt mit einer speziellen Zuchtdiät (ssnf Spezialdiäten GmbH, Soest) und frischem Trinkwasser.

Bestands- und Gesundheitskontrollen wurden wöchentlich durchgeführt, außerdem fand jedes halbe Jahr ein Hygienemonitoring statt. Alle Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigungsnummer M5/10 und M9/13) und in Zusammenarbeit mit dem Tierärztlichen Dienst in Tübingen durchgeführt.

### 2.2.6.2 NOD-*scid*IL2Rgamma<sup>null</sup> Mausmodell

Für den Transplantationsversuch wurde das NOD-*scid*IL2Rgamma<sup>null</sup> Mausmodell verwendet. Die Tiere wurden von *The Jackson Laboratory* bezogen (Stock Nr: 005557). Die Mäuse sind extrem immundefizient, weisen weder eine Expression des Prkdc-Gens, noch des IL2rg-Gens auf. Dieses Mausmodell ist lebensfähig, fertil, normalgroß und weist keine physischen Anomalien oder Verhaltensauffälligkeiten auf. Die Tiere haben keine reifen Lymphozyten, Serum-

Immunglobuline sind nicht nachweisbar und die NK-Zellen-Aktivität ist extrem niedrig. Das mediane Überleben liegt bei 89 Wochen (Shultz et al., 2005).

### 2.2.6.3 Transplantation der Zellen

Die Zellen wurden am Vortag wie in 2.2.2.1 beschrieben in ein frisches Medium aufgenommen. Vor dem Versuch wurden die Zellen aus der Kultur entnommen und jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in PBS resuspendiert. Es wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension mit einer 27 G Nadel in die linke Flanke subkutan gespritzt. Pro Zelllinie wurden je fünf Tiere transplantiert.

Tab. 7: Anzahl der Tiere nach Geschlecht und transplantiertes Zelllinie

4 ♀ MEC scramble
1 ♂ MEC scramble
1 ♂ MEC F4
4 ♀ MEC F4
2 ♂ MEC B5
3 ♀ MEC B5
3 ♀ MEC E5
2 ♀ MEC E5
1 ♀ MEC 29
4 ♀ MEC 29

### 2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung des *Knockdown*-Nachweises (3.1.3), der Versuche zur Analyse der Proliferation *in vitro* (3.2.2) und die Ergebnisse der Transplantation der Zelllinien im Tiermodell (3.4) erfolgte mit SPSS 16.0 und Microsoft Office Excel. Die Bedingungen der Versuche zur Analyse der Apoptose (3.3.1) und des Zellzyklus' (3.3.2) konnten nicht exakt reproduziert werden, deshalb wird in dieser Arbeit jeweils das Ergebnis eines Versuchs exemplarisch dargestellt.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellkulturen und Methodenentwicklung

#### 3.1.1 Auswahl der Zelllinien und der Primer

Für diese Arbeit wurden MEC1-Zelllinien mit jeweils unterschiedlichen Graden der RNAi-Suppression der NFAT-Transkriptionsfaktoren verwendet. Für jede NFAT-mRNA wurden mehrere shRNA-Vektoren hergestellt und in die MEC1-Zellen transfiziert. Zunächst wurde eine qRT-PCR mit der RNA aller zur Verfügung stehenden Zelllinien und der dazugehörigen Primern durchgeführt, um Zelllinien für die weiteren Analysen mit dem optimalen *Knockdown* auszuwählen und für die weiteren *Knockdown*-Bestimmungen optimale Primer einzusetzen.

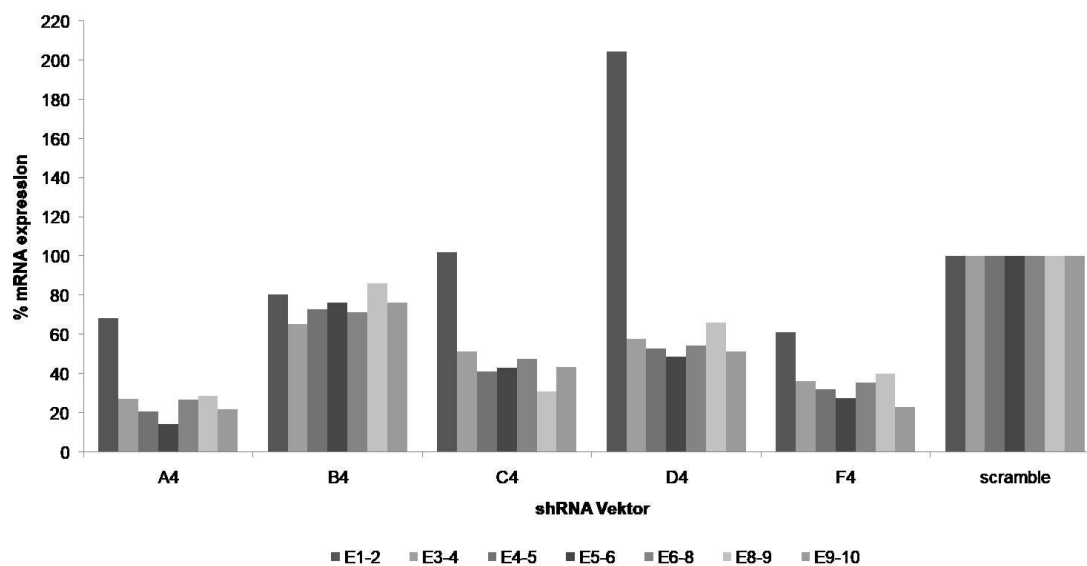


Abb. 7: NFAT1-Knockdown in den MEC1-Zelllinien A4, B4, C4, D4 und F4

Ergebnis der qRT-PCR der MEC1-Zellen für den NFAT1-Knockdown. A4, B4, C4, D4, F4 sind shRNA Vektoren, nach denen die Zelllinien benannt sind, E1-2 bis E9-10 sind Primer, die an verschiedenen Stellen der mRNA binden. Scramble hat hier eine 100%ige mRNA Expression und dient als Negativkontrolle.

Zur Verfügung standen fünf MEC1-Zelllinien, in denen jeweils ein Abschnitt der NFAT1-mRNA durch einen transfizierten shRNA-Vektor (A4, B4, C4, D4 oder F4) gehemmt wurde. Dies führt zu unterschiedlichen Ausprägungen des *Knockdowns* von NFAT1 in den verschiedenen Zelllinien. Die Primer E1-2 bis E9-10 binden spezifisch an Abschnitte der NFAT-mRNA und zeigen den Grad des *Knockdowns* des jeweiligen mRNA-Abschnitts an. Abb. 7 zeigt das Ergebnis der qRT-PCR der mRNA der MEC1-Zellen mit den shRNA-Vektoren A4, B4, C4, D4 und F4. Im Folgenden werden die Zelllinien nach den shRNA-Vektoren benannt. Nach dieser Analyse wurden die Zelllinien A4 mit einem *Knockdown* von ca. 80 % und D4 mit einem ca. 50 % *Knockdown* kultiviert. Für weitere Suppressionsanalysen mittels qRT-PCR wurden die Primer E3-4, E4-5, E5-6 und E8-9 verwendet.

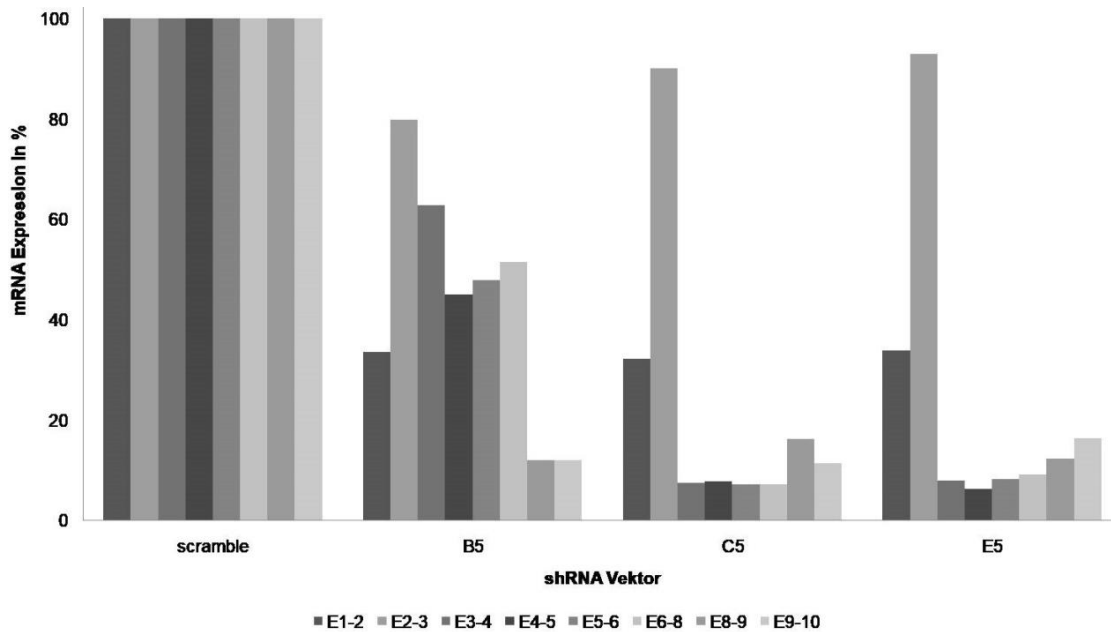


Abb. 8: NFAT2-Knockdown in den MEC1-Zelllinien B5, C5 und E5

B5, C5, E5 sind shRNA-Vektoren, nach denen die Zelllinien benannt sind. E1-2 bis E9-10 sind Primer, die an verschiedenen Stellen der mRNA binden. Scramble hat hier eine 100%ige mRNA Expression und dient als Negativkontrolle.

Für die Analyse von NFAT2 standen drei MEC1-Zelllinien zur Verfügung, in denen jeweils ein Abschnitt der NFAT2-mRNA durch ein shRNA-Vektor B5, C5 oder E5 gehemmt wurde. Auch hier binden die Primer E1-2 bis E9-10 an die mRNA und werden für die Messung des Suppressionsgrades eingesetzt. Abb. 8 zeigt das Ergebnis der qRT-PCR der NFAT2-mRNA der MEC1-Zelllinien mit den Vektoren B5, C5 und E5. Im Folgenden werden die Zelllinien nach den Vektoren, die sie enthalten, benannt. Für die weiteren Analysen von NFAT2 wurden die Zelllinien mit dem shRNA-Vektor B5 und E5 kultiviert. Für die weiteren qRT-PCRs wurden die Primer E3-4, E4-5, E5-6, E6-8, E8-9 und E9-10 verwendet. E5 wies einen *Knockdown* von ca. 90 % auf, während B5 einen *Knockdown* der langen Isoform bewirkt hat, erkennbar an der Suppression von E8-9 und E9-10. Die mRNA Expression der kurzen Isoform lag bei ca. 50 %.

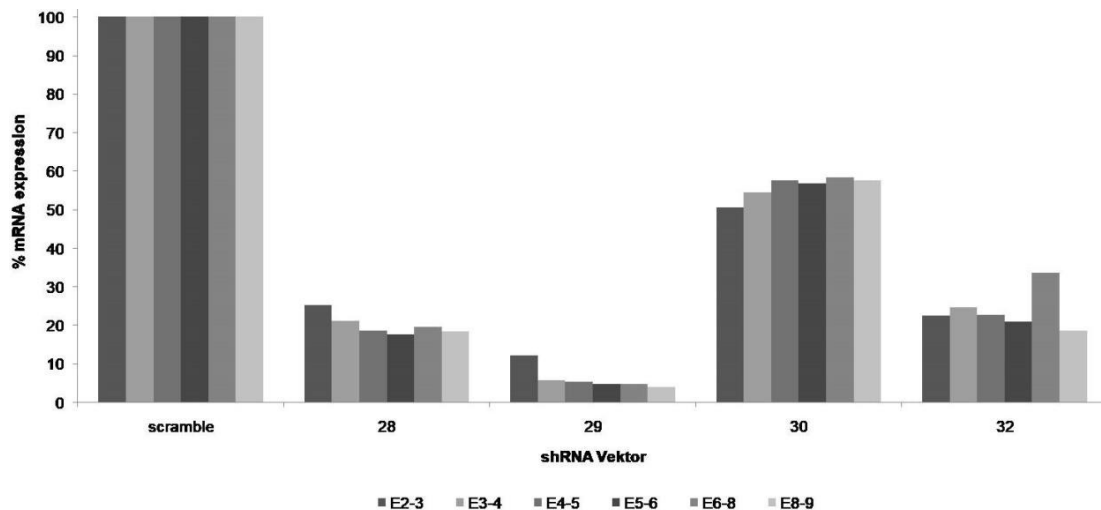


Abb. 9: NFAT4-Knockdown in den MEC1-Zelllinien 28, 29, 30 und 32

28, 29, 30, 32 sind shRNA-Vektoren, nach denen die Zelllinien benannt sind. E2-3 bis E8-9 sind Primer, die an verschiedenen Stellen der mRNA binden und für die Bestimmung des Suppressionsgrades mittels qRT-PCR eingesetzt werden. Scramble hat hier eine 100%ige mRNA-Expression und dient als Negativkontrolle.

Für die Analyse von NFAT4 standen drei MEC1-Zelllinien zur Verfügung, in denen jeweils ein Abschnitt der NFAT4-mRNA durch ein shRNA-Vektor 28, 29, 30 oder 32 gehemmt wurde. Die hier eingesetzten Primer waren E2-3 bis E8-9. Auch hier werden die Zelllinien nach den entsprechenden shRNA-Vektoren benannt. Abb. 9 zeigt das Ergebnis der qRT-PCR der NFAT4-mRNA der MEC1-Zelllinien mit den Vektoren 28, 29, 30 und 32. Für die weitere Analyse von NFAT4 wurden die Zelllinien mit dem shRNA Vektor 28 (mit einem *Knockdown* von ca. 80 %) und 30 (mit einem *Knockdown* von ca. 55 %) ausgewählt. Alle getesteten Primer wurden bei den weiteren qRT-PCR Analysen verwendet.

### 3.1.2 Puromycingradient

Um eine gezielte Selektion der Zellen, die auch tatsächlich einen Vektor mit dem *Knockdown* enthalten, zu bewerkstelligen, wurden die Vektoren mit einer stabilen plasmidkodierten Antibiotikaresistenz gegen Puromycin ausgestattet.

Der Vektor *Scramble*, der zwar keine spezifische *Knockdownsequenz* wohl aber die Antibiotikaresistenz enthält, diente als Negativkontrolle.

Puromycin ist ein Aminopeptidase-Inhibitor und hemmt die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen (Nathans, 1964). Das Medium der Zellkulturen wurde in regelmäßigen Zeitabständen mit Puromycin versetzt. Zellen, die keinen Vektor enthalten, haben auch keine Antibiotikaresistenz und werden durch Puromycin abgetötet.

Es musste zunächst eine optimale Konzentration von Puromycin gefunden werden, womit die Zelllinien während der Kultur behandelt wurden.

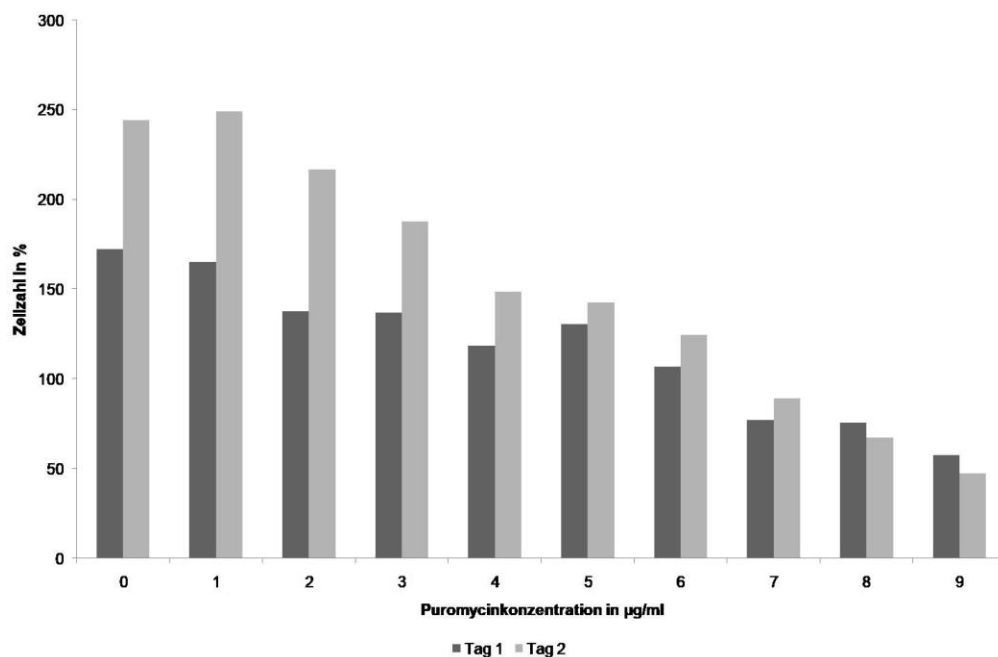


Abb. 10: Proliferation der mit dem Vektor *scramble* transfizierten Zellen unter Behandlung mit Puromycin in steigender Konzentration

Ergebnis der Proliferationsmessung *in vitro* mittels zellbasierten Assays. Mit der steigenden Konzentration von Puromycin sinkt die Proliferationsrate bis es bei den Konzentrationen ab 8 µg/ml zum Untergang der Zellen führt.

Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Proliferationsmessung *in vitro* unter Einsatz von zellbasierten Assays wie unter 2.2.4 beschrieben. Das Kulturmedium wurde mit der Puromycinlösung in steigender Konzentration von 0 µg/ml bis 9 µg/ml Medium versetzt. Die *scramble*-Zelllinie wurde zwei Tage lang kultiviert. Das Ergebnis des Versuchs zeigt, dass eine Puromycinkonzentration von 1 µg/ml Medium zu niedrig ist, weil die Proliferationsrate ähnlich der ohne Antibiotika behandelten Zellen ist. Außerdem wird gezeigt, dass Puromycin auch für resistenzhaltige Zellen toxisch ist, aber erst in höheren Konzentrationen, erkennbar an dem Zellzahlrückgang bei den Konzentrationen ab 8 µg/ml. Es wurde entschieden die Zellkulturen mit 2 µg/ml Medium zu behandeln, da bei dem Kontrollversuch (Abb. 11) mit der MEC1 Zelllinie, die keine Antibiotikaresistenz enthalten, unter den gleichen Bedingungen und dem gleichen Versuchsaufbau nach einem Tag noch lebende Zellen detektiert werden konnten.

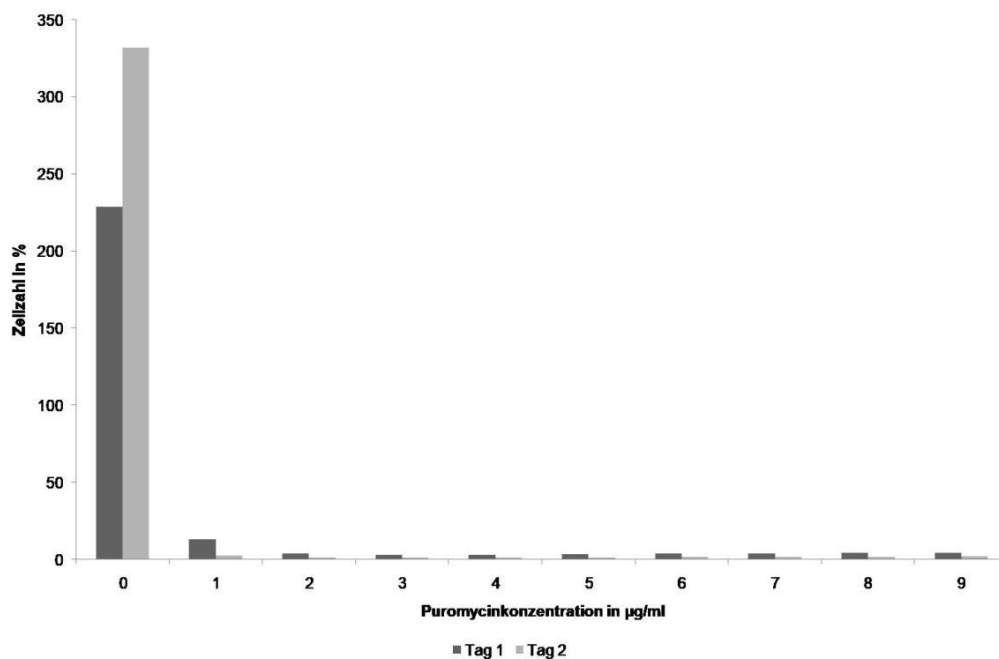


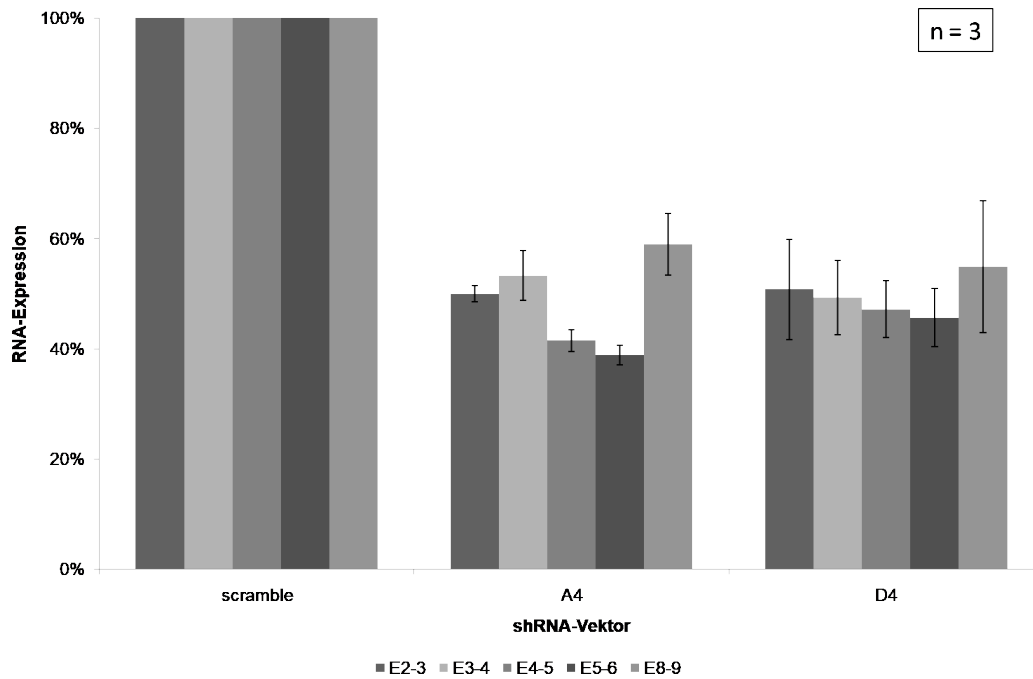
Abb. 11: Proliferation der MEC1-Zellen ohne Antibiotikaresistenz unter Behandlung mit Puromycin in steigender Konzentration

Bereits nach Zugabe von 1 µg/ml Puromycin geht die Proliferation am ersten Tag zurück und sistiert fast am zweiten Tag des Versuchs.

### 3.1.3 *Knockdown*-Nachweis

Vor jedem Versuch, der für diese Arbeit durchgeführt wurde, wurden die Zellen aufgetaut, kultiviert und mit Puromycin selektiert. Anschließend wurde die für den jeweiligen Versuch benötigte Zellzahl aus der Kultur entnommen und ein Teil der Zellen für den *Knockdown*-Nachweis pelletiert.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden für die RNA-Isolierung verwendet und die Suppression von NFAT auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR gemessen. Die Proteinisolierung erfolgte aus  $1 \times 10^6$  Zellen und die NFAT-Suppression wurde mittels Western Blot visualisiert.

A)



B)

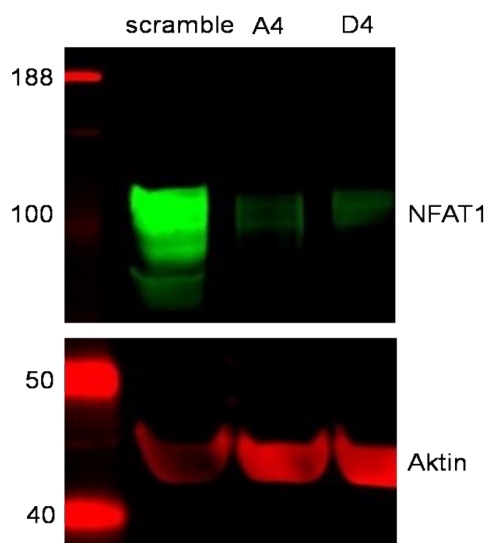


Abb. 12: NFAT1-Knockdown-Nachweis der kultivierten Zelllinien scramble, A4 und D4 auf mRNA- und Proteinebene

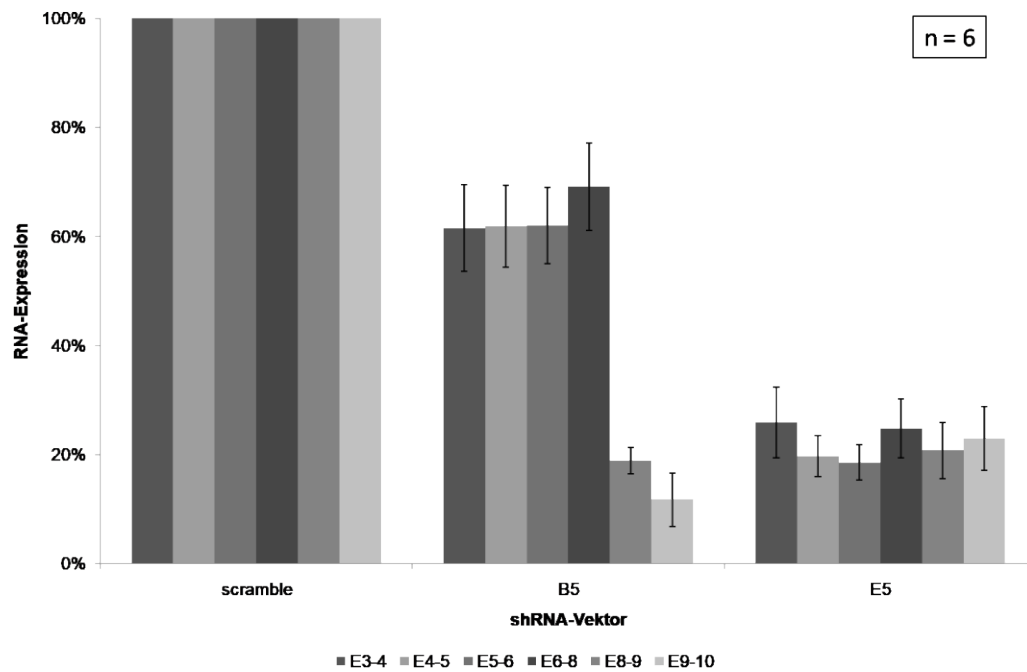
A) Vor jedem Versuch wurde die RNA aus den kultivierten Zelllinien isoliert und der Grad der NFAT1-Suppression mittels qRT-PCR gemessen. A4 und D4 haben hier eine Suppression von ca. 50 %, scramble dient als Negativkontrolle. Drei unabhängige Ex-



*perimente wurden durchgeführt und miteinander verrechnet (Auswertung mit SEM, n = 3). B) Western Blot aus 80 µg Proteinextrakt mit NFAT1-Antikörper und β-Aktin als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Western Blot von mindestens drei Experimenten (n = 3).*

Abb. 12A zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR für NFAT1-mRNA. Die Zelllinien A4 und D4 weisen hier eine Suppression von 50 % des Transkriptionsfaktors auf (vgl. 80 % und 50 % für A4 und D4 bei der Test-RNA). Es stellte sich eine Verminderung des Knockdowns der Zelllinie A4 im Vergleich zu ursprünglicher Test-RNA (Abb. 7) dar. In Abb. 12B zeigen die Ergebnisse des Western Blots ebenfalls eine Suppression der NFAT1-Proteinexpression.

A)



B)

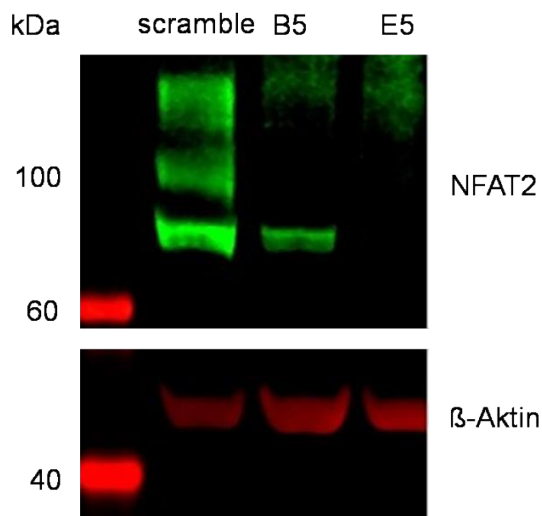


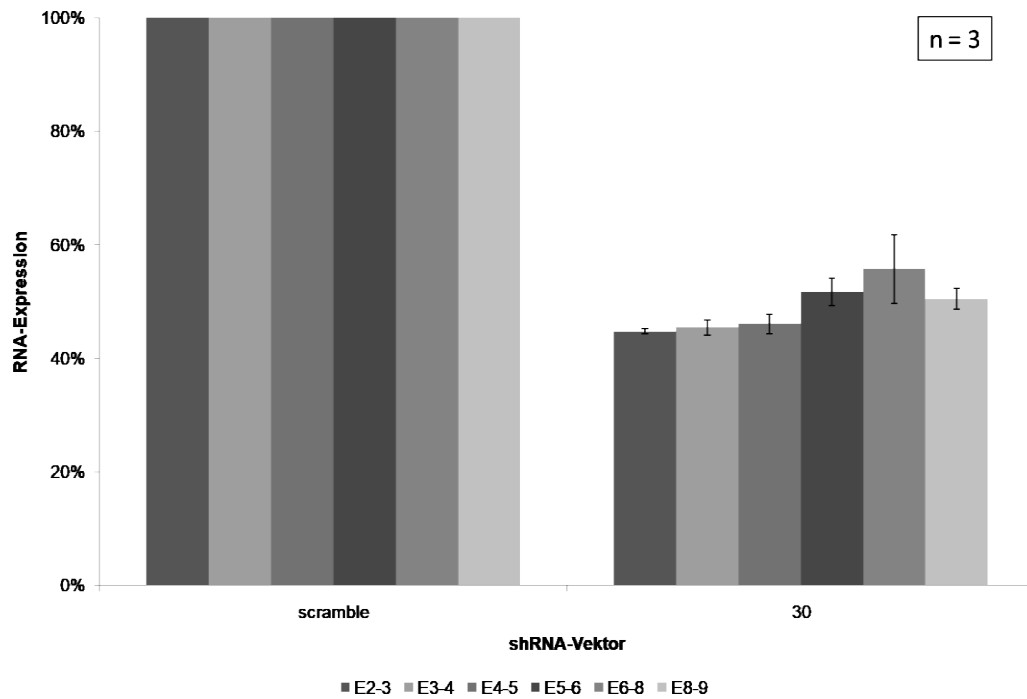
Abb. 13: NFAT2-Knockdown-Nachweis der kultivierten Zelllinien scramble, B5 und E5 auf mRNA- und Proteinebene

A) Ergebnis der qRT-PCR. Dargestellt ist die NFAT2-Expression in den Zelllinien B5 und E5. B5 ist die Population mit einem Knockdown von 70 % der kurzen Isoform und einem Knockdown der langen Isoform. E5 weist eine Suppression von NFAT2-mRNA unter 20 % auf. Sechs unabhängige Experimente wurden durchgeführt und miteinander verrechnet (Auswertung mit SEM, n = 6). B) Western Blot aus 80 µg Protein mit

*NFAT2-Antikörper und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Western Blot von mindestens drei Experimenten (n = 3).*

Abb. 13A zeigt das Ergebnis der qRT-PCR für NFAT2-mRNA. Es ist ähnlich zu dem Ergebnis der Test-RNA (Abb. 8). Der Vektor in der B5-Zelllinie löst einen *Knockdown* der langen Isoform aus, erkennbar an der herabgesetzten Expression detektiert mit den Primern E8-9 und E9-10, die bei 10 % bis 20 % liegt. E5 weist einen *Knockdown* von unter 20 % auf. In Abb. 13B zeigt das Ergebnis des Western Blots eine teilweise Inhibierung der Proteinexpression höheren Gewichts in der B5-Zelllinie, entsprechend dem *Knockdown* der langen Isoform von NFAT2 und eine vollständige Inhibierung des NFAT2-Proteins in der E5-Zelllinie.

A)



B)

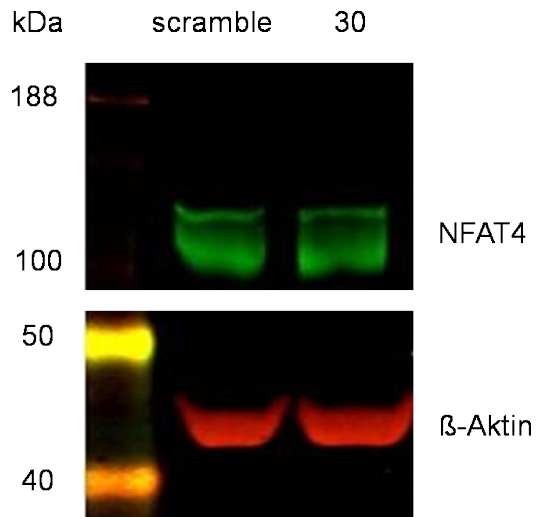


Abb. 14: NFAT4-Knockdown-Nachweis in den kultivierten Zellen scramble und 30 auf mRNA- und auf Proteinebene

A) Ergebnis der qRT-PCR. Dargestellt ist die NFAT4-Expression in der Zelllinie mit dem shRNA-Vektor 30. Der Knockdown liegt bei etwa 50 %. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und miteinander verrechnet (Auswertung mit SEM,  $n = 3$ ).  
 B) Western Blot aus 80  $\mu$ g Protein mit NFAT4-Antikörper und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle.

Dargestellt ist ein repräsentatives Western Blot von mindestens drei Experimenten ( $n = 3$ ).

Die Abb. 14A zeigt das Ergebnis der qRT-PCR für NFAT4-mRNA. Der *Knock-down* beträgt ca. 50 %, ähnlich dem Ergebnis der Test-RNA (Abb. 8). Die Kultivierung der Zelllinie mit dem shRNA-Vektor 28 ist in mehreren Zellkulturansätzen nicht gelungen. Es ist nicht zu der erwarteten Zellvermehrung gekommen, obwohl die Kulturbedingungen bei allen Zelllinien gleich gehalten wurden. Weiterhin konnte keine Inhibierung von NFAT4 auf Proteinebene erreicht werden (Abb. 14B).

### 3.2 Analyse der Proliferation *in vitro*

Um den Einfluss von NFAT auf die Proliferation der CLL-Zellen zu analysieren, wurden die Zelllinien in einem Versuch fünf Tage lang kultiviert und jeden Tag der Zuwachs an neuen Zellen gemessen. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde die Anzahl der Zellen am Anfang des Versuchs gleich gehalten.

#### 3.2.1 Methodenentwicklung

Für die Analyse der Proliferation *in vitro* mussten zunächst in mehreren Versuchsreihen die optimalen Bedingungen bestimmt werden. Vorab musste die für den Versuch passende Zellzahl gefunden werden. Der unter 2.2.4 beschriebene Versuch wurde über fünf Tage durchgeführt und pro Tag wurde eine 96-Well Platte mit den jeweiligen Zellsuspensionen lysiert und der Zellzuwachs gemessen. Anfangskonzentrationen von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml,  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml und  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ml erwiesen sich als zu hoch, weil die Proliferationsrate der Zelllinien sich am vierten und fünften Versuchstag verlangsamte oder rückgängig wurde, sodass keine objektiven Aussagen zur Proliferation getroffen werden konnten. Zuletzt wurde die Anfangskonzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml als sinnvoll erachtet.

Bevor der Versuch begonnen wurde, wurde das Medium am Vortag gewechselt. Für die Überführung der Zellen in die 96-Well Platten wurden diese im frischen Medium aufgenommen und die Platten befüllt. Die Messungen ergaben eine verlangsamte Proliferation an den ersten beiden Versuchstagen. Um die Äquilibrationsphase zu verkürzen und die Bedingungen gleichmäßig zu halten, wurde das Medium vom Vortag aufgehoben, die Zellen in diesem nach der Zählung wieder resuspendiert und die Platten befüllt. Das Medium wurde mit 2 µg/ml Puromycin versetzt.

### 3.2.2 Analyse der Proliferation *in vitro*

Die Analyse wurde in mehreren Versuchsansätzen durchgeführt. Abb. 15 zeigt das Ergebnis des zellbasierten Assays mit den NFAT1 *Knockdown*-Zelllinien A4 und D4, dabei wurden jeweils n = 8 Messungen pro Zelllinie und Tag verrechnet. Das Diagramm zeigt eine höhere Proliferation von A4 und D4 im Vergleich zur Negativkontrolle.

Das Ergebnis weist darauf hin, dass die Abwesenheit von NFAT1 die Proliferation der CLL-Zellen fördert.

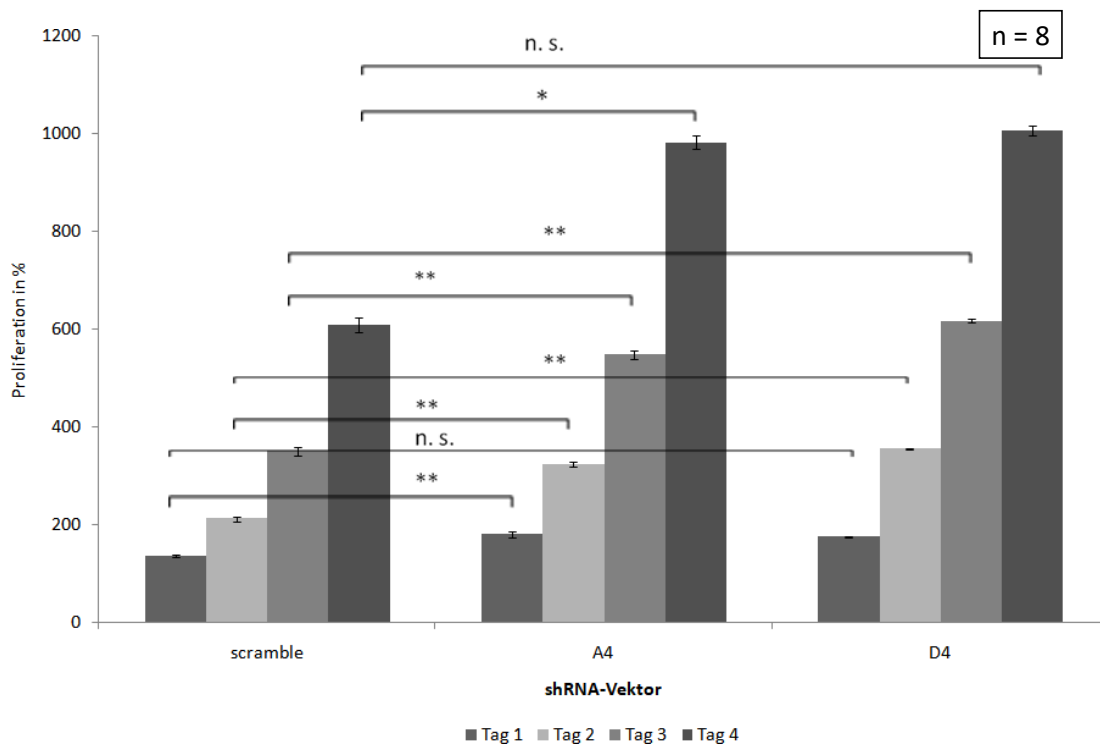


Abb. 15: NFAT1-Knockdown führt zu erhöhter Proliferation

Dargestellt ist das Ergebnis des zellbasierten Assays der NFAT1-Knockdown-Zelllinien A4 und D4. Auf der Ordinate ist die Proliferation in Prozent aufgetragen. Statistische Auswertung mit SEM ( $n = 8$ ,  $* p = < 0,05$ ,  $** p = < 0,01$ )

Abb. 16 zeigt das Ergebnis des zellbasierten Assays mit den NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5. Das Diagramm zeigt eine höhere Proliferation der E5-Zelllinie und eine noch höhere der Zelllinie B5 im Vergleich zur Negativkontrolle scramble. E5 weist einen kompletten NFAT2-Knockdown auf und B5 einen Knockdown der langen Isoform (Abb. 13). Auch hier besteht eine Korrelation zwischen dem Grad der NFAT2-Suppression und der Proliferation.

Das Ergebnis zeigt, dass der komplette NFAT2-Knockdown die Proliferation bei E5 fördert. In der B5-Zelllinie dominiert die Präsenz der kurzen Isoform. Die kurze Isoform von NFAT2 hat eine antiapoptotische Wirkung (siehe 1.6.2),

erkennbar an den überschießenden Zellzahlen am dritten und vierten Tag des Versuchs.

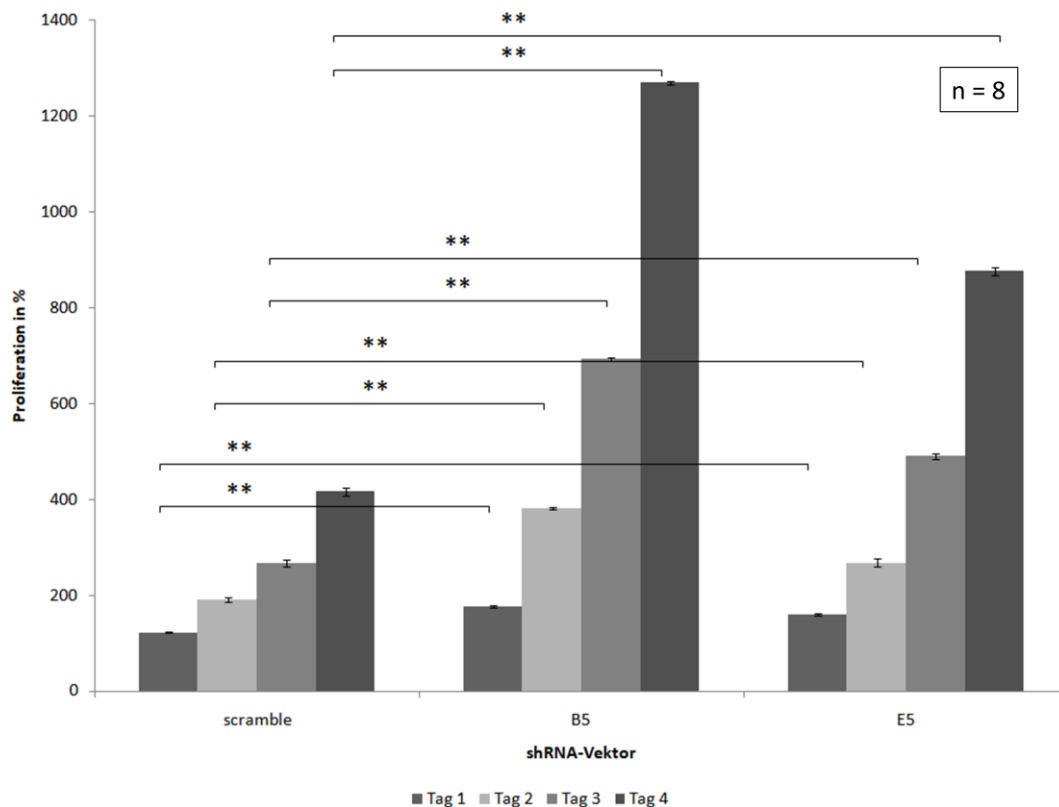


Abb. 16: NFAT2-Knockdown führt zu einer erhöhten Proliferation. Der Knockdown der langen Isoform von NFAT2 steigert die Proliferation noch stärker.

Dargestellt ist das Ergebnis des zellbasierten Assays der NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5. Auf der Ordinate ist die Proliferation in Prozent aufgetragen. Statistische Auswertung mit SEM ( $n = 8$ ,  $** = p < 0,01$ )

Abb. 17 zeigt das Ergebnis des zellbasierten Assays mit der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30. Das Diagramm zeigt eine höhere Proliferation von 30 im Vergleich zur Negativkontrolle. Das Ergebnis zeigt, dass die Abwesenheit von NFAT4 die Proliferation der CLL-Zellen fördert.



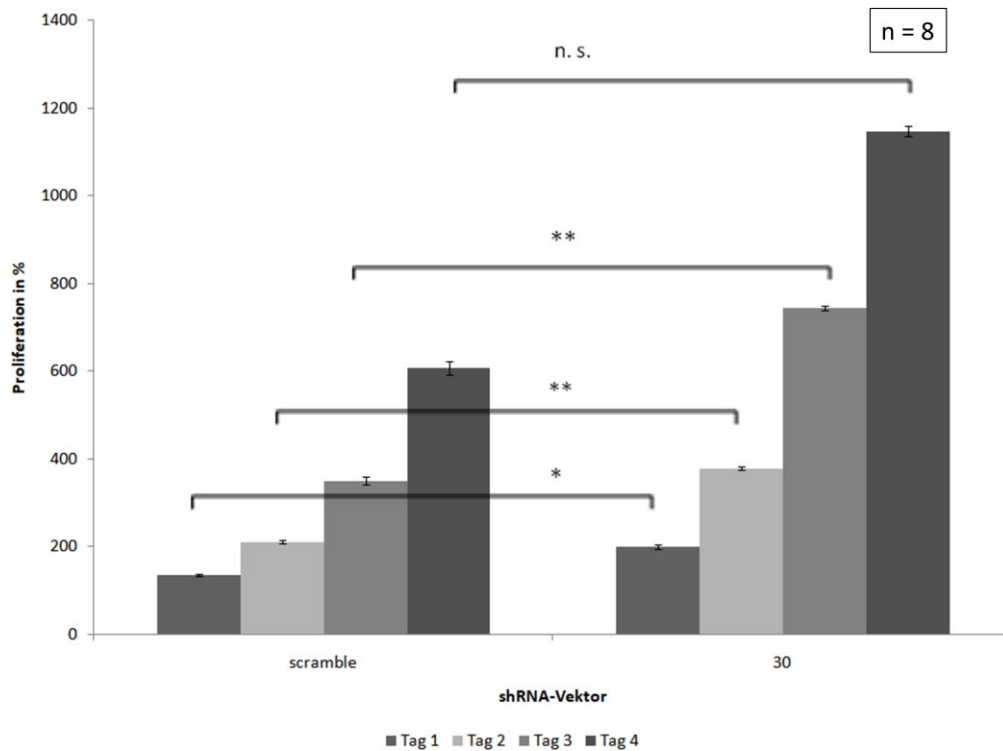


Abb. 17: NFAT4-Knockdown führt zu erhöhter Proliferation

Dargestellt ist das Ergebnis des zellbasierten Assays der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30. Auf der Ordinate ist der Proliferationszuwachs in Prozent aufgetragen. Statistische Auswertung mit SEM ( $n = 8$ ,  $* = p < 0,05$ ,  $** = p < 0,01$ )

Im Anschluss an die Versuchsreihe wurde der *Knockdown* der Zelllinien auf mRNA-Ebene nochmals überprüft und bestätigt (Ergebnis nicht dargestellt). Die Zellen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und anschließend am letzten Tag des Versuchs pelletiert.

### 3.3 Durchflusszytometrie

Um den Einfluss von NFAT auf die Apoptose und Zellzyklus zu untersuchen, wurden jeweils zwei Färbungen mit Annexin V/7-AAD und PI durchgeführt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Untersuchung wurde zwei Mal durchgeführt ( $n = 2$ ). Hier ist das Ergebnis eines Versuches exemplarisch dargestellt.

Im Verlauf der Zellkultur verbesserte sich der Knockdown von NFAT in den Zelllinien A4 und D4 (Abb. 18), sodass aufgrund des nahezu gleichwertigen *Knockdowns* nur A4 für die folgenden Färbungen verwendet wurde.

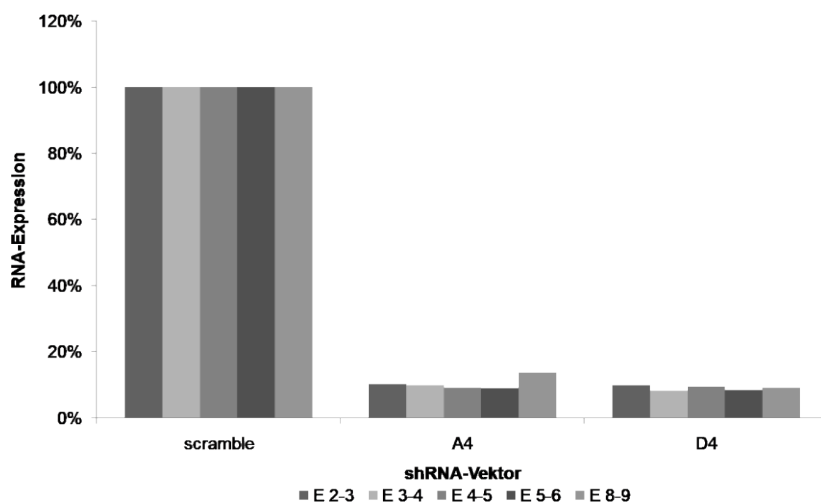


Abb. 18: Der NFAT1-Knockdown hat sich im Verlauf der Zellkultur verbessert

Vor jedem Versuch wurde die RNA aus den kultivierten Zelllinien isoliert und der Grad der NFAT1-Suppression mittels qRT-PCR gemessen. A4 und D4 haben beide einen nahezu vollständigen Knockdown von NFAT1. Dargestellt ist hier einer von zwei Versuchen ( $n = 2$ ).

### 3.3.1 Analyse der Apoptose

Um den Einfluss von NFAT auf die Apoptose der CLL-Zellen zu untersuchen, wurde die Färbung mit Annexin V und 7-AAD vorgenommen. Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Mediumwechsel aus der Kultur entnommen.

Die Apoptoserate der Zelllinien wurde unter Einsatz des PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) detektiert. Der Mechanismus der Apoptose ist durch aufeinanderfolgende Schritte charakterisiert. Unter anderem ist der Verlust der Plasmamembran einer der frühesten Schritte der Apoptose. In apoptotischen Zellen wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Membranseite transloziert, wobei es der extrazellulären Umgebung exponiert wird. Annexin V hat eine hohe Affinität für PS

und bindet an Zellen, die PS auf ihrer Oberfläche exponieren. Annexin V ist mit einem fluorochromen Phycoerythrin (PE) konjugiert und stellt Zellen in der Durchflusszytometrie dar, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden.

Die Färbung mit PE Annexin V wird für gewöhnlich kombiniert mit der Färbung mit 7-Amino-Actinomycin (7-AAD). Lebende Zellen mit einer intakten Plasmamembran lassen 7-AAD nicht durch. Somit sind Zellen im frühen Stadium der Apoptose 7-AAD negativ und PE Annexin V positiv. Zellen im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose sind bereits tot und lassen 7-AAD durch. Somit sind sie positiv für PE Annexin V und 7-AAD. Lebende Zellen sind für beides negativ. 7-AAD positive und PE Annexin V negative Zellen waren bereits vor der Färbung tot (Koopman et al., 1994, van Engeland et al., 1996, Vermes et al., 1995).

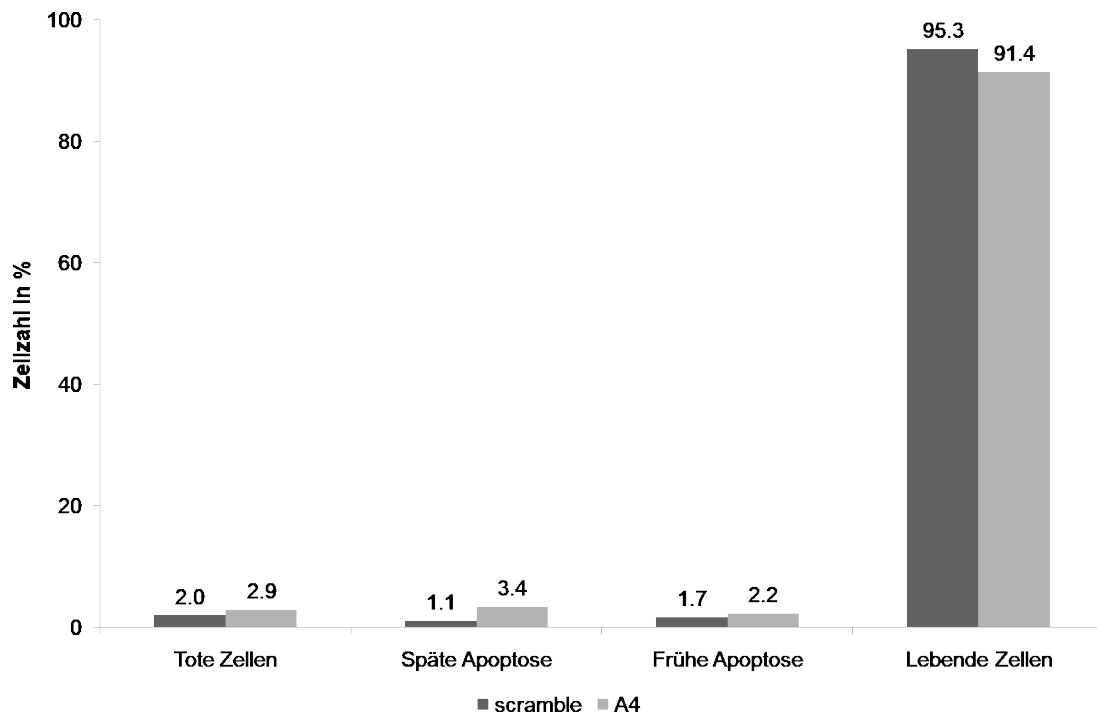


Abb. 19: Der NFAT1-Knockdown erhöht die Apoptoserate

Ergebnis des Apoptoseassays mit der NFAT1-Knockdown-Zelllinie A4. Die Abszisse stellt den Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Färbung dar. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen in Prozent aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs von insgesamt  $n = 2$  Experimenten.

In Abb. 19 ist das Ergebnis einer exemplarischen Färbung auf Annexin V und 7-AAD an der NFAT1-Knockdown-Zelllinie A4 dargestellt. Es sind weniger lebende Zellen (91,4 % vs. 95,3 %) und mehr tote Zellen (2,9 % vs. 2 %) als bei der Negativkontrolle *scramble*. Ebenfalls sind mehr A4 Zellen in der frühapoptischen Phase (2,2 % vs. 1,7 %) und in der späten Apoptose (3,4 % vs. 1,1 %). Es zeigt sich, dass A4 schneller in die Apoptose geht und weniger lebende und mehr tote Zellen aufweist.

Es wird deutlich, dass die Abwesenheit von NFAT1 die Apoptose beschleunigen kann.

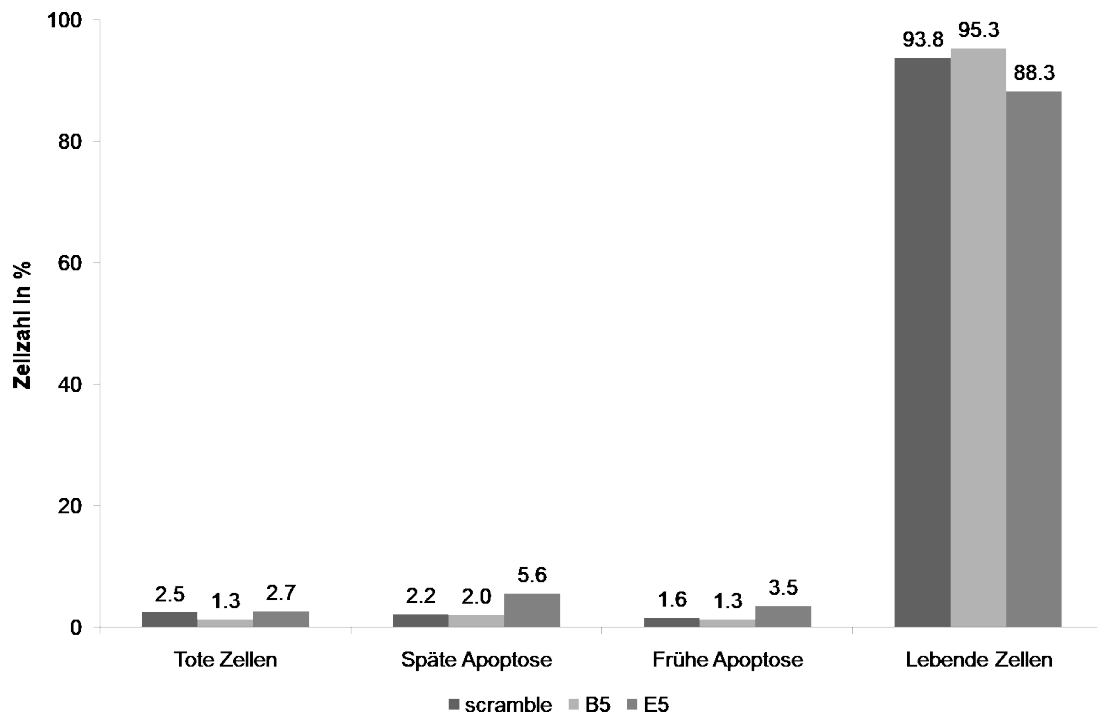


Abb. 20: Ein Knockdown von NFAT2 beschleunigt die Apoptose. Die Expression der kurzen Isoform von NFAT2 schützt vor Apoptose

Ergebnis einer repräsentativen Färbung auf Annexin V und 7-AAD mit den NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5. Die Abszisse stellt den Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Färbung dar. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen in Prozent aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs von insgesamt  $n = 2$  Experimenten.

In Abb. 20 ist das Ergebnis einer repräsentativen Färbung auf Annexin V und 7-AAD mit den NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5 dargestellt. Insgesamt wurden hier  $n = 2$  Experimente durchgeführt. E5 hat die meisten Zellen in der frühen und späten Apoptosephase und die meisten toten Zellen (2,7 % vs. 2,5 % *scramble*, 1,3 % B5). B5 mit der kurzen Isoform von NFAT2 hat am meisten lebende Zellen (95,3 % vs. 93,8 % *scramble*, 88,3 % E5), am wenigsten Zellen in der frühen (1,3 % vs. 1,6 % *scramble*, 3,5 % E5) und späten (2 % vs. 2,2 % *scramble*, 5,6 % E5) Apoptosephase.

Das Ergebnis zeigt, dass E5 schneller und B5 langsamer in die Apoptose gehen als *scramble*. Der Versuch weist darauf hin, dass die kurze Isoform von

NFAT2 möglicherweise vor Apoptose schützt, während die Abwesenheit von NFAT2 die Apoptose potentiell beschleunigen kann.

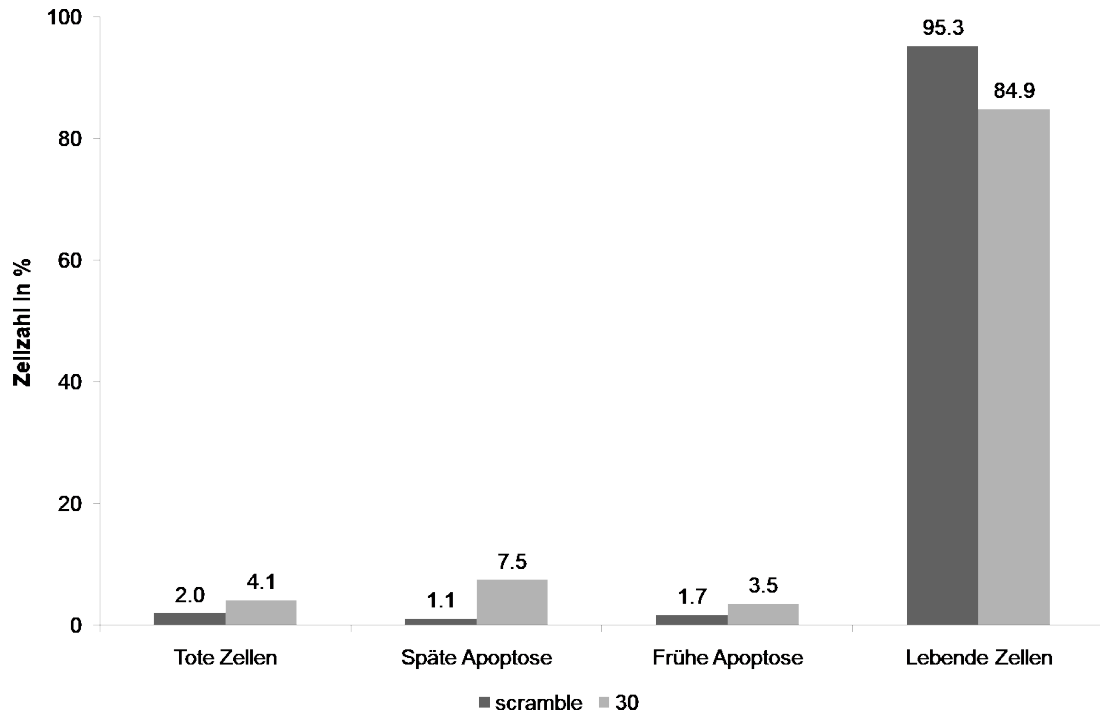


Abb. 21: NFAT4-Knockdown erhöht die Apoptoserate

Ergebnis des Apoptoseassays mit der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30. Die Abszisse stellt den Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Färbung dar. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen in Prozent aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs von insgesamt  $n = 2$  Experimenten.

In Abb. 21 ist das Ergebnis einer repräsentativen Färbung auf Annexin V und 7-AAD bei der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30 dargestellt. Diese hat mehr Zellen in der frühen (3,5 % vs. 1,7 %) und in der späten (7,5 % vs. 1,1 %) Apoptosephase, mehr tote Zellen (4,1 % vs. 2 %) und entsprechend weniger lebende Zellen (84,9 % vs. 95,3 %).

Das Ergebnis zeigt, dass die Zelllinie 30 schneller in die Apoptose geht und somit, dass die Abwesenheit von NFAT4 die Apoptose potentiell beschleunigen kann.

### 3.3.2 Zellzyklusanalyse

Um die Zellzyklusphasen zu analysieren, wurde die Methode der Propidiumiodid-(PI)-Färbung eingesetzt.

PI ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der stöchiometrisch an die DNA bindet. Die Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt in der Zelle und da die Zellzyklusphasen ihren charakteristischen DNA-Gehalt haben, können sie so im Durchflusszytometer bestimmt werden. Beispielsweise wird in der S-Phase die DNA synthetisiert und ihr Gehalt vergrößert sich.

Die Zellen wurden aus der Kultur entnommen und wie in 2.2.5.2 beschrieben, gefärbt.

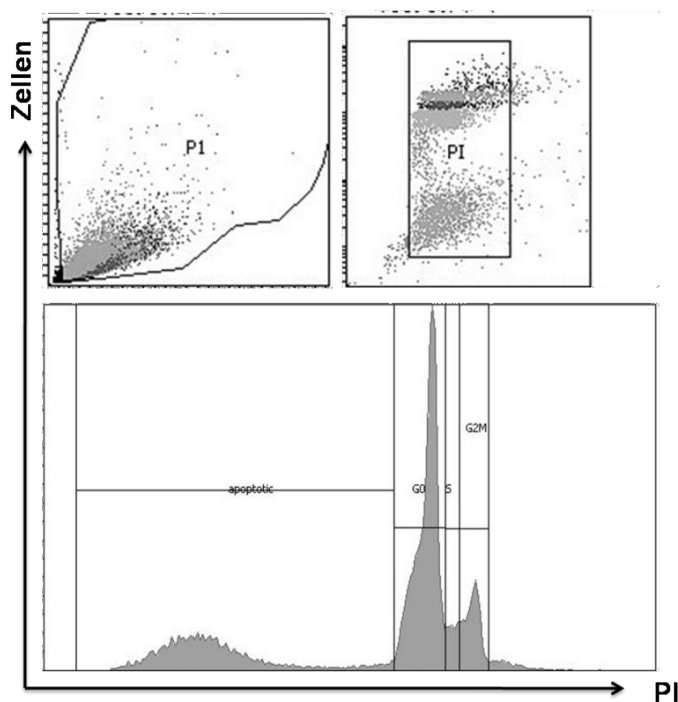


Abb. 22: Exemplarisches Gatingschema für die Zelllinie scramble und Bestimmung der Zellzyklusphasen.

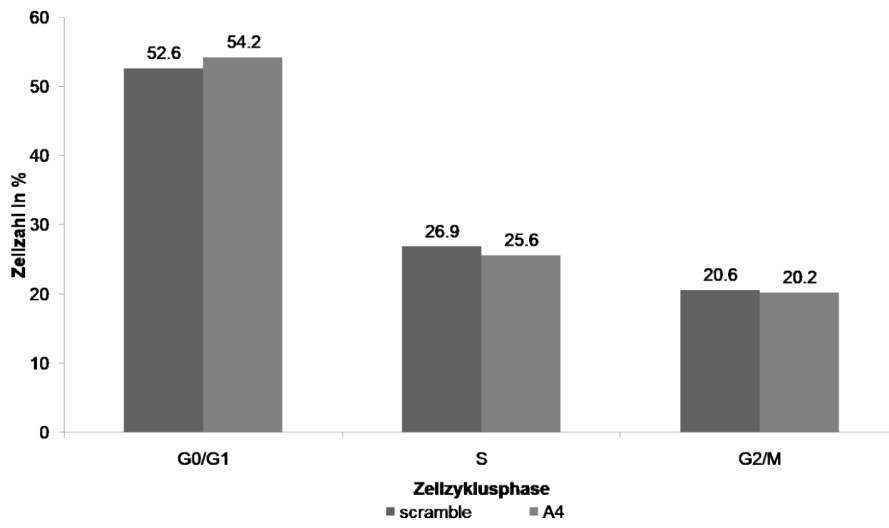
Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von  $n = 2$  Versuchen. apoptotic = Apoptotische Zellen, G0 = Zellen in der G0-Phase, S = Zellen in der S-Phase, G2M = Zellen in der G2M-Phase.

Für den Versuch wurden drei Versuchsansätze vorbereitet und Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die erste Färbung erfolgte 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel der Zellkulturen. Für die zweite und dritte Färbung wurden die Zellen 24 Stunden nach dem Mediumwechsel aus der Zellkultur entnommen und in ein Zellkulturmedium ohne FCS überführt. Nach 24 Stunden wurde dem Medium FCS hinzugefügt. Die Färbungen erfolgten nach 24 Stunden "Hungerperiode" und 12 Stunden nach FCS-Gabe. Damit wurde versucht möglichst viele Zellen zum gleichen Zeitpunkt zur Teilung zu bewegen.

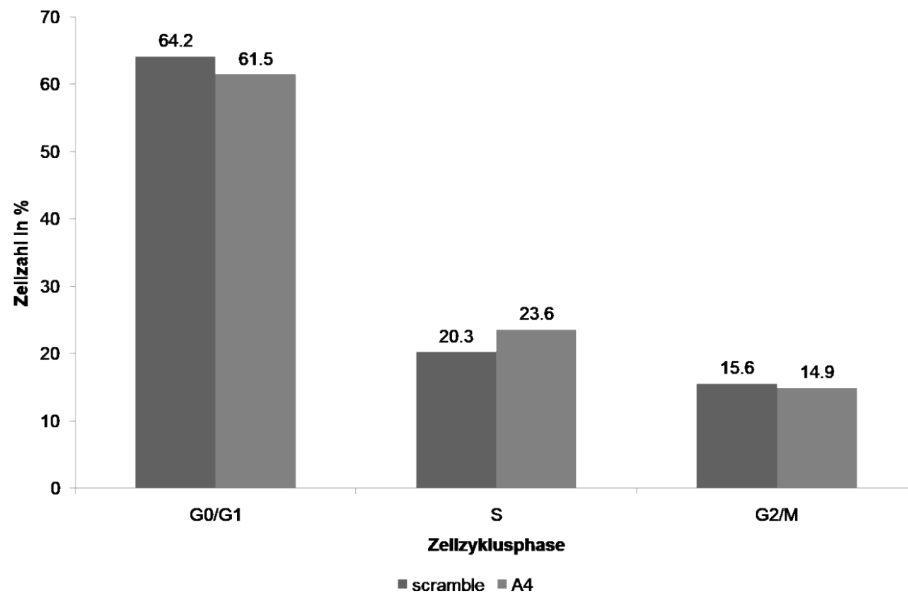
Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der PI-Färbung und deren Analyse. Aufgrund einer sehr hohen Varianz der Ergebnisse konnte hier keine sinnvolle statistische Auswertung durchgeführt werden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von  $n = 2$  durchgeführten Experimenten. In der Abb. 23A zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen *scramble* und A4. Abb. 23B stellt das Ergebnis nach 24 Stunden FCS-Entzug dar. Die Zellzahl hat sich zugunsten der G0/G1-Phase verschoben. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte allerdings auch hier nicht demonstriert werden. Nachdem die Proliferation nach der Hungerphase mit FCS angeregt wurde (Abb. 23C), waren von den A4-Zellen im Vergleich zu den *scramble*-Zellen weniger in der Synthesephase und mehr in der G2/M-Phase. Für ein gesteigertes Wachstum der *scramble*-Zellen spricht die niedrigere Zellzahl in der G0/G1-Phase und die höhere Zellzahl in der S-Phase, wobei auch hier kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.



A)



B)



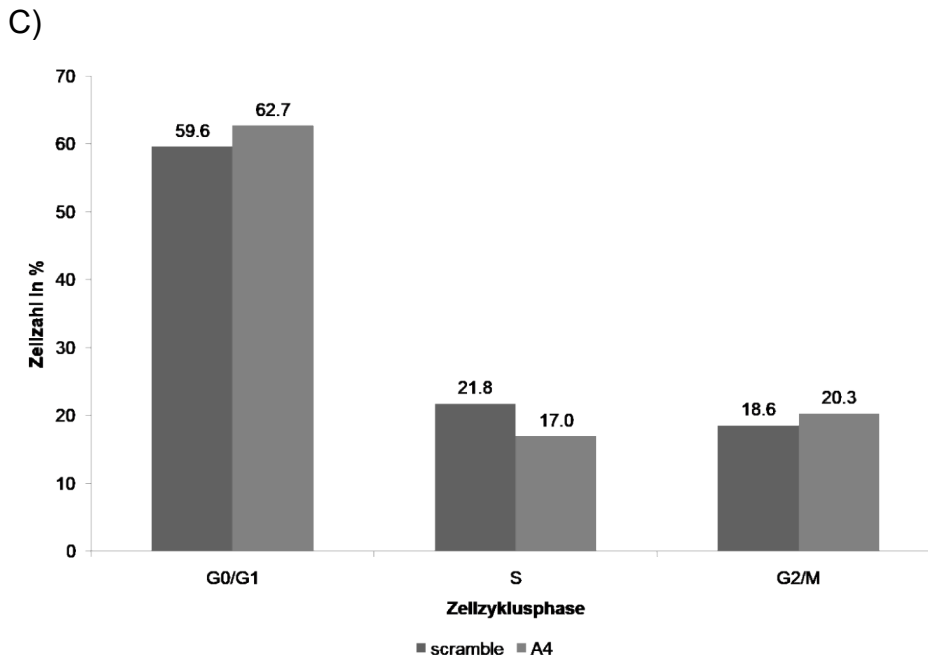


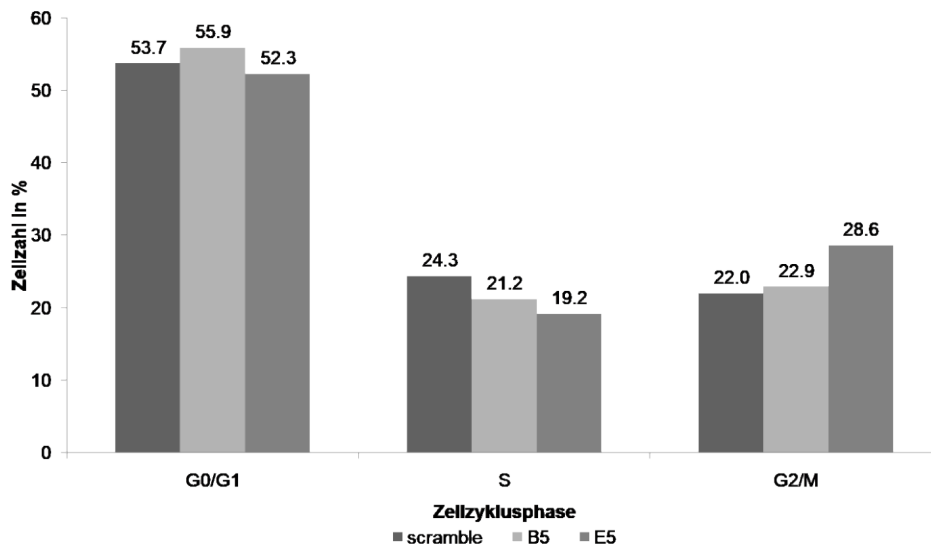
Abb. 23: Zellzyklusanalyse der NFAT1-Knockdown-Zelllinie A4

*Ergebnis der Zellzyklusanalyse nach PI-Färbung. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen in Prozent aufgetragen. Die Gesamtzahl der jeweiligen Zelllinie in den einzelnen Zellzyklusphasen ergibt 100 %. A) erste Färbung 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel B) zweite Färbung nach 24 Stunden FCS-Entzug und C) dritte Färbung 12 Stunden nach FCS-Gabe. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt n = 2 Experimenten. Aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse konnte keine sinnvolle statistische Auswertung durchgeführt werden.*

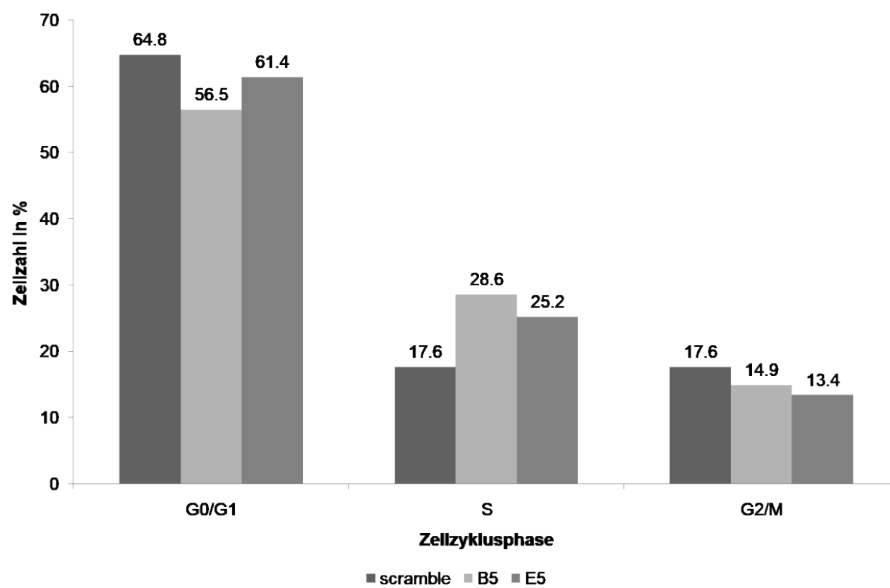
Abb. 24 zeigt das Ergebnis der PI-Färbung und der Zellzyklusanalyse der NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5. B5 besitzt nur die kurze antiapoptotische Isoform von NFAT2. Auch bei diesen Experimenten konnte aufgrund der hohen Varianz der Messwerte keine sinnvolle statistische Auswertung durchgeführt werden. Dargestellt ist deswegen ein repräsentatives Experiment von insgesamt n = 2 Experimenten. Es zeigte sich in sämtlichen Versuchen eine ähnliche Tendenz. Aussagen zu Signifikanz der beobachteten Veränderungen konnten allerdings aufgrund der fehlenden statistischen Auswertung nicht getroffen werden. B5 proliferiert schneller als *scramble* und E5, erkennbar an der höchsten Zellzahl in der S-Phase bei der zweiten (Abb. 24B) und dritten (Abb. 24C) Messung und zusätzlich an der höchsten Zellzahl in der G2/M-Phase bei der dritten Messung. Die niedrigste Zellzahl in der G0/G1-Phase spricht ebenfalls

für eine höhere Proliferation von B5. E5 ist ein kompletter *Knockdown* von NFAT2. E5 proliferiert schneller als *scramble*, jedoch langsamer als B5. E5 hat in der dritten Messung mehr Zellen in der S-Phase als *scramble*, jedoch weniger als B5. Dies ist auch in der G0/G1-Phase erkennbar, wo E5 mehr Zellen als B5 hat, aber weniger als *scramble*.

A)



B)



C)

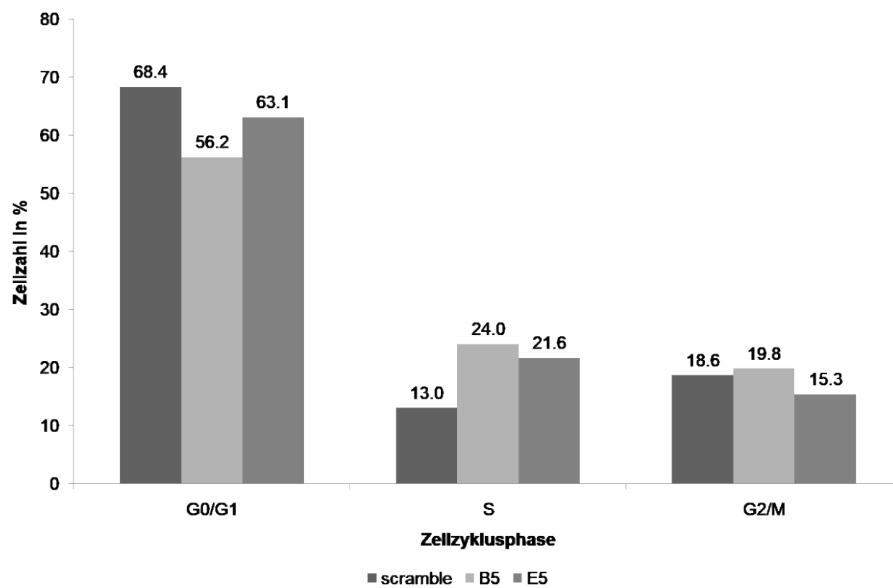
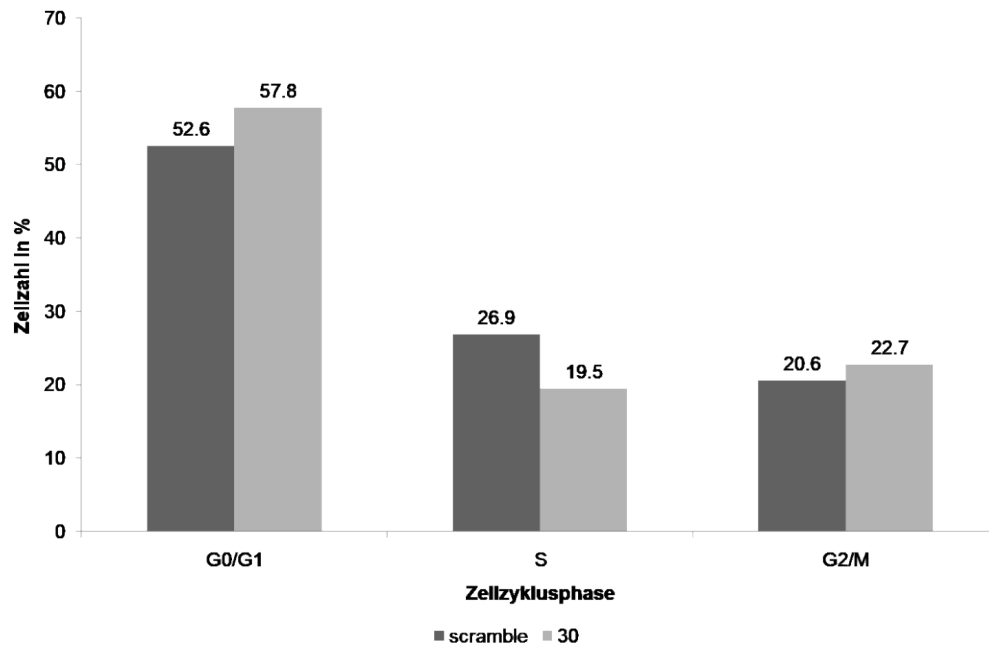


Abb. 24: Zellzyklusanalyse der NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5

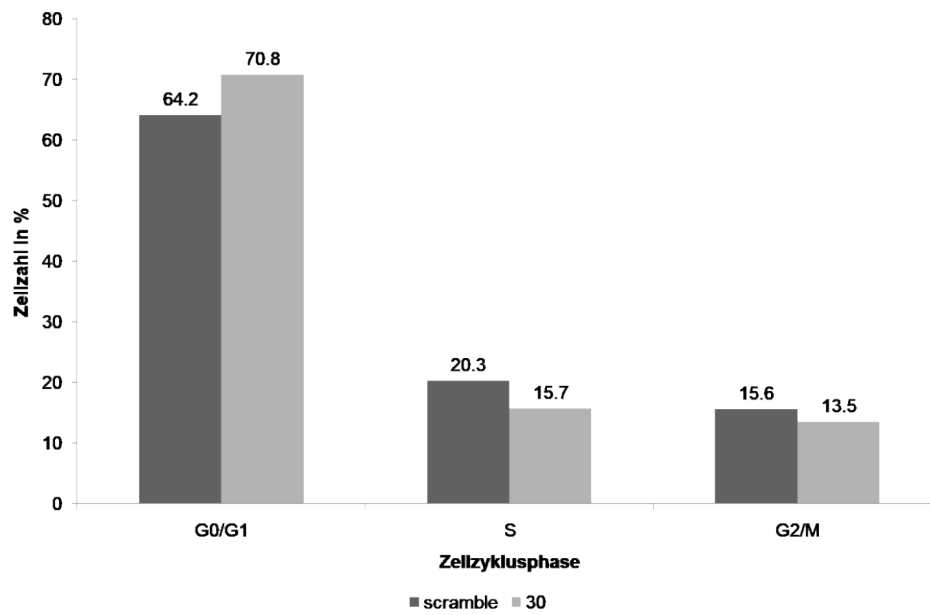
Ergebnis der Zellzyklusanalyse nach PI-Färbung. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen in Prozent aufgetragen. Die Gesamtzahl der jeweiligen Zelllinie in den einzelnen Zellzyklusphasen ergibt 100 %. A) erste Färbung 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel B) zweite Färbung nach 24 Stunden FCS-Entzug und C) dritte Färbung 12 Stunden nach FCS-Gabe. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt  $n = 2$  Experimenten. Aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse konnte keine sinnvolle statistische Auswertung durchgeführt werden.

Abb. 25 zeigt das Ergebnis der PI-Färbung und Zellzyklusanalyse der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30. Die Messung ergibt eine höhere Proliferation der Zelllinie 30 im Vergleich zu *scramble*. Im ersten Diagramm (Abb. 25A) ergab die Messung, dass sich bei Zellen der Zelllinie 30 weniger Zellen in der S-Phase und mehr in der G0/G1-Phase als bei der Kontrollzelllinie *scramble* befinden. Dies deutet darauf hin, dass *scramble* schneller proliferiert als 30. Nach der Hungerperiode in der zweiten Messung verschiebt sich der Zellanteil zugunsten der G0/G1-Phase. Während der dritten Messung erkennt man einen Anstieg der Proliferation von *scramble* an der höheren Zellzahl in der S-Phase und der niedrigeren Zellzahl in der G0/G1-Phase.

A)



B)



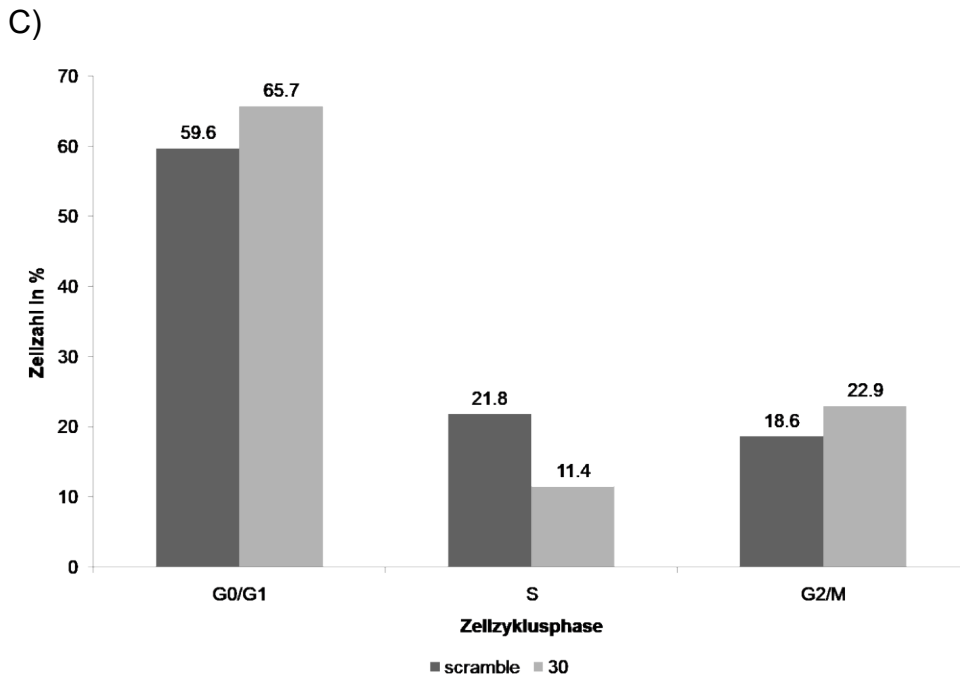


Abb. 25: Zellzyklusanalyse der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 30

Ergebnis der Zellzyklusanalyse nach PI-Färbung. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen in Prozent aufgetragen. Die Gesamtzahl der jeweiligen Zelllinie in den einzelnen Zellzyklusphasen ergibt 100 %. A) erste Färbung 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel B) zweite Färbung nach 24 Stunden FCS-Entzug und C) dritte Färbung 12 Stunden nach FCS-Gabe. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt  $n = 2$  Experimenten. Aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse konnte keine sinnvolle statistische Auswertung durchgeführt werden.

### 3.4 Transplantation der Zelllinien im Tiermodell

Um das Verhalten der *Knockdown*-Zelllinien im lebenden Organismus zu untersuchen, wurden die Zellen in einem Tierversuch eingesetzt. Hierfür wurde eine erneute Transduktion neuer MEC1-Zellen durchgeführt. Für den NFAT1-*Knockdown* wurde der shRNA-Vektor F4 benutzt, für den NFAT2-*Knockdown* die Vektoren B5 und E5 und für NFAT4-*Knockdown* der Vektor 29. Der Vektor *scramble* diente auch hier als Negativkontrolle. 24 Tage nach der Transfektion und unmittelbar vor der Transplantation erfolgten die entsprechenden *Knockdown*-Kontrollen mittels qRT-PCR (Abb. 26, 27, 28).

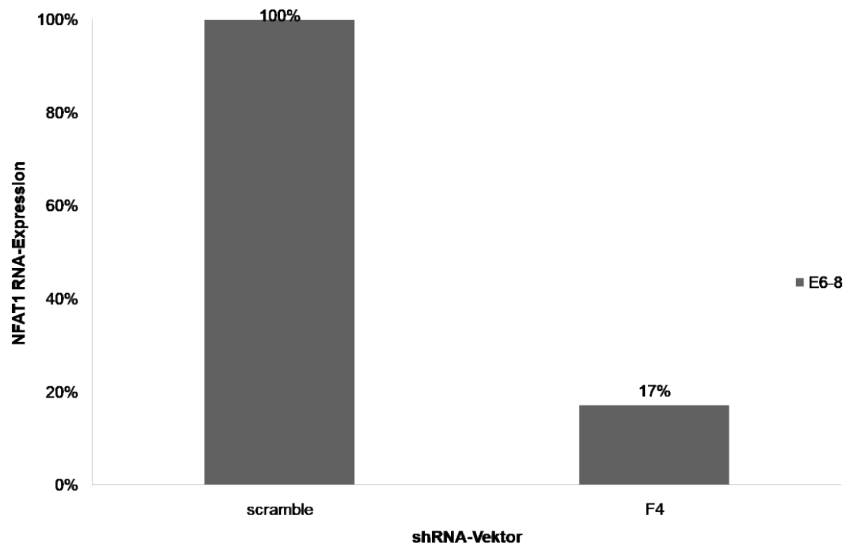


Abb. 26: NFAT1-Knockdown-Kontrolle

Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR der NFAT1-Knockdown-Zelllinie F4. Es konnte ein Knockdown von 17 % erreicht werden. Da die Analyse nur als Einfachbestimmung durchgeführt wurde, konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

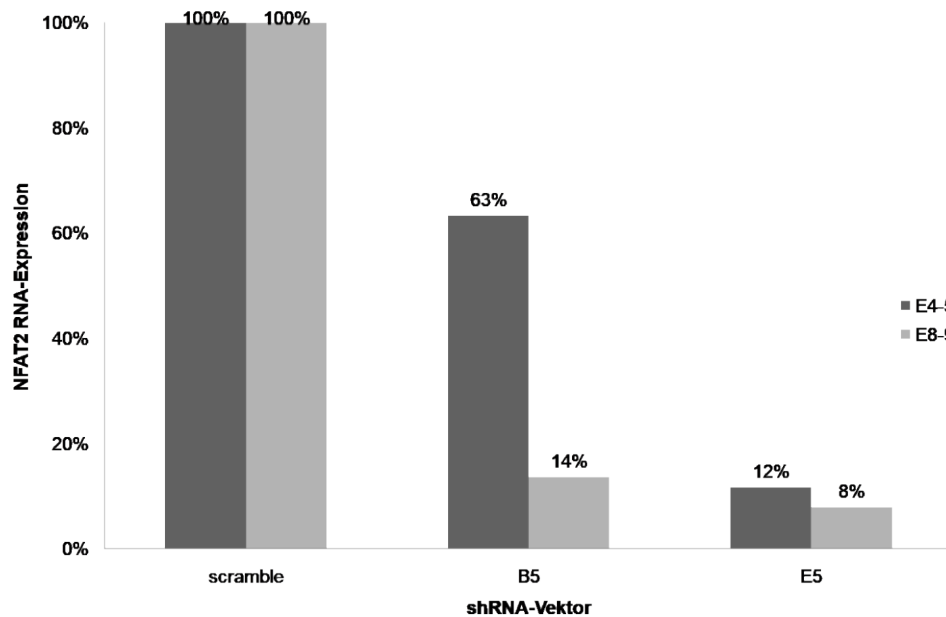


Abb. 27: NFAT2-Knockdown-Kontrolle

Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR der NFAT2-Knockdown-Zelllinien B5 und E5. B5 hat einen Knockdown der langen Isoform, E5 weist einen kompletten Knockdown auf von ca. 10 %. Da die Analyse nur als Einfachbestimmung durchgeführt wurde, konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

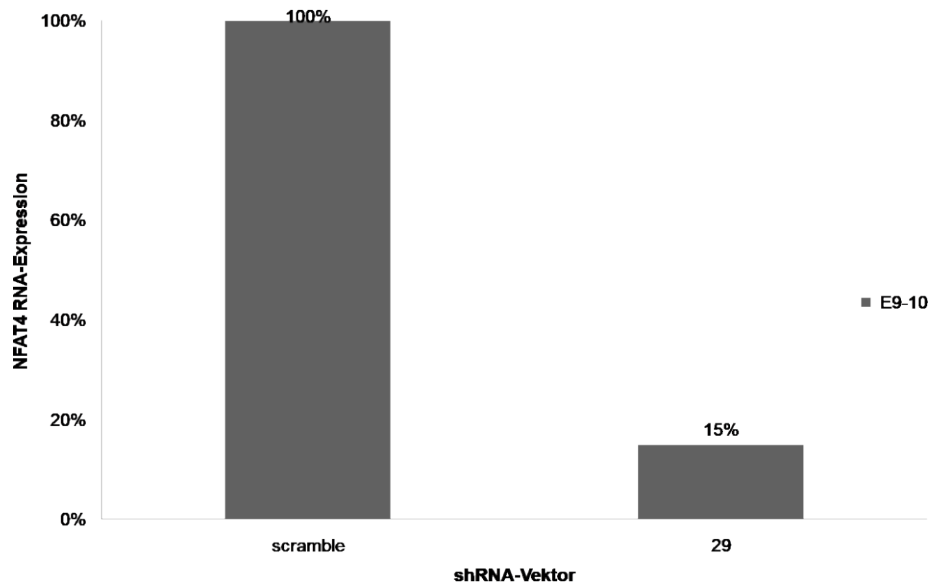


Abb. 28: NFAT4-Knockdown-Kontrolle

Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR der NFAT4-Knockdown-Zelllinie 29. Es konnte ein Knockdown von 15 % erreicht werden. Da die Analyse nur als Einfachbestimmung durchgeführt wurde, konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

Für den Transplantationsversuch wurde das NOD-*scid*IL2Rgamma<sup>null</sup>-Mausmodell verwendet. Dieses Modell weist Defekte in der B-, T- und NK-Zellentwicklung auf und eignet sich bevorzugt für Untersuchungen der Pathogenese hämatologischer Neoplasien (Nakamura et al., 2005).

Es wurden pro Zelllinie fünf Tiere n = 5 verwendet. Jede Maus bekam 100 µl Zellsuspension s.c. gespritzt (2.2.6.3). Nach 28 Tagen wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. In dieser Zeit entwickelte jedes Tier ein Lymphom an der Einstichstelle, das teilweise die Haut und den Muskel infiltrierte. Der Tumor von jedem Tier wurde präpariert und die Tumormasse bestimmt.



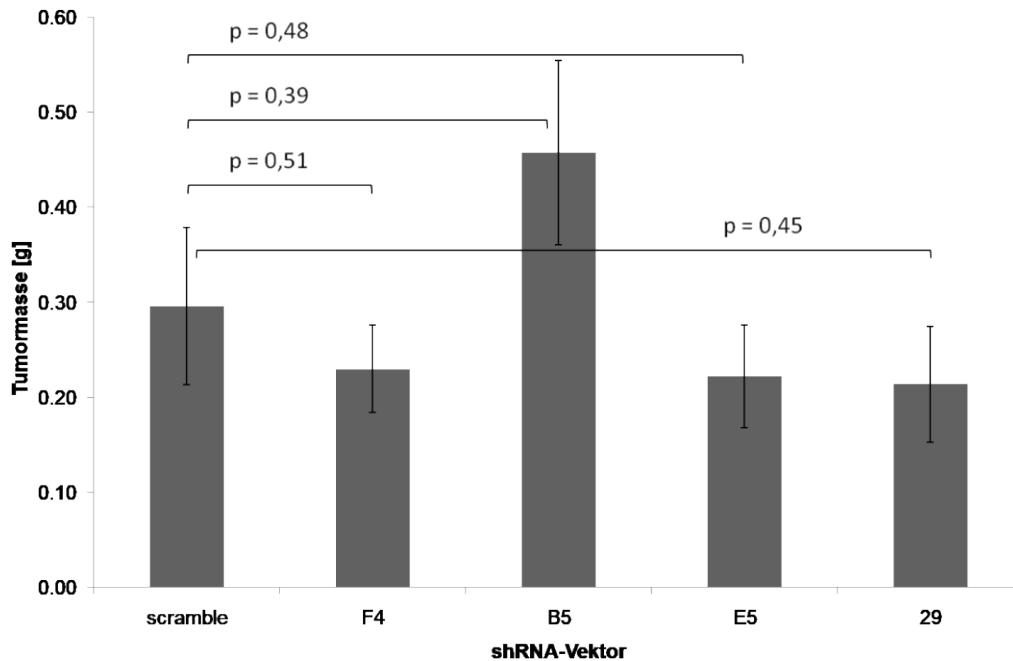


Abb. 29: Tumormasse im Vergleich zwischen den einzelnen Knockdown-Zelllinien

Dargestellt ist das Ergebnis der Auswertung des Tierversuchs. Nach der Präparation aller Tiere wurde der Tumor gewogen (5 Tumore pro Zelllinie ( $n = 5$ )). Auf der Ordinate ist die Tumormasse aufgetragen. Auswertung mit SEM,  $p$  - Wert.

Abb. 29 zeigt das Ergebnis des Tierversuchs. Im Vergleich zur *scramble*- Negativkontrolle entwickelten die Tiere, die mit den NFAT1- und NFAT4-Knockdown-Zelllinien F4 und 29 transplantiert wurden, deutlich kleinere Tumoren. Der NFAT2-Knockdown der langen Isoform weist mit Abstand den größten Tumor auf, wobei der komplette NFAT2-Knockdown E5 eine ähnliche Tumormasse zeigt wie die in F4 und 29. Die Ergebnisse des Experiments waren nicht signifikant.

## 4 Diskussion

NFAT-Transkriptionsfaktoren wurden erstmals im Jahr 1988 in humanen Jurkat T-Zell-Leukämie Zellen beschrieben (Shaw et al., 1988). Durch spätere Untersuchungen konnte die Expression der verschiedenen NFAT-Familienmitglieder unter anderem auch in B-Zellen belegt werden (Ho et al., 1995, Yaseen et al., 1993, Timmerman et al., 1997). Die NFAT-Aktivierung wird in den B-Zellen meist durch den BCR stimuliert und führt über den Calcium/Calcineurin-Aktivierungsweg zur Dephosphorylierung von NFAT und dessen Translokation in den Zellkern (Engelke et al., 2007). Fehlregulation in der NFAT-Signalübertragung ist assoziiert mit verschiedenen Tumorerkrankungen, einschließlich Leukämien und Lymphomen (Marafioti et al., 2005, Medyouf et al., 2007, Lenz et al., 2008). Dauerhafte Aktivierung von Calcineurin in B- und T-Zell-Lymphomen unterstreicht die bedeutungsvolle Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren in diesen Tumorerkrankungen (Medyouf et al., 2007). In dieser Arbeit wurden die NFAT-Transkriptionsfaktoren in CLL-Zellen *in vitro* untersucht und in Hinblick auf die Proliferation, den Zellzyklus und die Apoptose charakterisiert. Anschließend wurde im Tierversuch das Tumorwachstum untersucht.

### 4.1 NFAT1

Zahlreiche Studien beschreiben die Rolle von NFAT1 in B-Zellen. Es wurde gezeigt, dass NFAT1 in B-Zellen exprimiert wird und für deren Entwicklung und Funktion erforderlich ist (Ranger et al., 1998, Peng et al., 2001). *In vitro* - und *in vivo*-Untersuchungen belegen, dass ein Knockdown von NFAT1 eine lymphozytäre Hyperproliferation bewirkt, die zu Splenomegalie und folliculärer B-Zell-Expansion führt (Hodge et al., 1996, Xanthoudakis et al., 1996). Außerdem entwickelten NFAT1-defiziente Mäuse spontane B-Zell-Neoplasien (May et al., 2014). Ein NFAT1/NFAT4-Doppelknockdown zeigt einen überempfindlichen BCR und eine erhöhte Zahl an reifen B-Zellen (Samanta et al., 2005). Zudem

wurde gezeigt, dass NFAT1 den Zellzyklus und die Zellproliferation kontrolliert, indem es an den Promotor von Cyclin E1 und E2 bindet und damit den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase unterdrückt (Teixeira et al., 2016). Zusammengefasst sprechen die Daten für eine Tumorsuppressorrolle von NFAT1 in verschiedenen Zelltypen. Das Ergebnis der Untersuchung der *in vitro*-Proliferation in dieser Arbeit belegt diese These. Der NFAT1-Knockdown zeigte eine deutlich höhere Proliferation als die *scramble*-Negativkontrolle. (3.2.2 Abb. 15). Die Analyse der Apoptose ergab eine höhere Apoptoserate der Zellen mit NFAT1-Knockdown im Vergleich zur Negativkontrolle. Es zeigte sich ein schnellerer Übergang in die frühen und späten Apoptosephasen (3.3.1 Abb.19). Weiterhin zeigte die Analyse des Zellzyklus' weniger Aktivität bei Zellen mit NFAT1-Knockdown. Es wurden weniger Zellen in der S-Phase gemessen und dafür mehr in der G0/G1-Phase (3.3.2 Abb. 23). Die Tumoruntersuchung im Tiernmodell zeigte, dass die Transplantation der NFAT1-Knockdown-Zellen zu kleineren Tumoren führte als die Negativkontrolle (3.4 Abb. 29). In der Literatur werden einerseits onkogene Eigenschaften von NFAT1 beschrieben, wie zum Beispiel, dass NFAT1 die Zellmigration und -invasion des Mamma- und Kolonkarzinoms fördert (Jauliac et al., 2002) und eine Progression im Zellzyklus des intraepithelialen Pankreaskarzinoms bewirkt (Baumgart et al., 2012). Andererseits wird dargestellt, dass NFAT1 in nasopharyngealen Tumoren herab-reguliert ist (Zhang et al., 2019). Zusammenfassend kann man sagen, dass NFAT1 beide Eigenschaften besitzt, onkogene sowie tumorsuppressive Aktivität, abhängig vom Zelltyp. Außerdem muss der zelluläre Kontext mitberücksichtigt werden, wobei die Mehrzahl der Studien eher eine Tumorsuppressorrolle für NFAT1 beschreiben.

## 4.2 NFAT2

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass neben NFAT1 auch NFAT2 in B-Zellen exprimiert wird und für deren Entwicklung und Funktion von entscheidender Bedeutung ist (Ranger et al., 1998, Peng et al., 2001, Berland and Wortis, 2003). Weitere Untersuchungen belegen, dass NFAT2 eine bedeutende

Rolle in der Pathogenese von onkologischen Erkrankungen spielt. Mehrere Studien berichten über eine Fehlregulation der Calcium/Calcineurin/NFAT2-Signalübertragung in hämatologischen Tumorerkrankungen und unterstreichen damit die onkogene Natur von NFAT2 (Muller and Rao, 2010, Mancini and Toker, 2009). In einer Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass NFAT2 in den Diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL), Burkitt-Lymphomen, manchen T-Zell-Lymphomen sowie in der CLL überexprimiert und im Zellkern lokalisiert ist (Marafioti et al., 2005). In einer Reihe von Studien wurde versucht, die Eigenschaften von NFAT2 zu beschreiben. In vivo Untersuchungen zeigten einen erheblichen Rückgang der Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate in NFAT2-defizienten B-Zellen (Marklin et al., 2020b). Untersuchungen an B-Zell-Lymphomen ergaben, dass NFAT2 dort eine herausragende Rolle spielt, in dem es die Lymphomzellen am Leben erhält und gegen die Apoptose durch das Senden von Überlebenssignalen agiert (Pham et al., 2005, Fu et al., 2006). Zusammengenommen sprechen die Daten für eine entgegengesetzte Rolle von NFAT1 und NFAT2 in peripheren B- und T-Zellen und in der Tumorgenese. Auch die Untersuchungen dieser Arbeit sprechen für eine onkogene Aktivität von NFAT2. Die Analyse der Apoptose in den Zellen mit NFAT2-*Knockdown* ergaben eine höhere Apoptoserate als in der Negativkontrolle (3.3.1 Abb. 20). Die Tumoruntersuchung im Tiermodell spiegelte ebenfalls diese Tendenz wider. Implantierte Zellen mit NFAT2-*Knockdown* ergaben einen kleineren Tumor als die Zellen der Negativkontrolle (3.4 Abb. 29).

Der NFAT2-Transkriptionsfaktor hat eine Besonderheit, die ihn von den anderen NFAT-Proteinen unterscheidet. Es wird sowohl eine lange als auch eine kurze Isoform exprimiert. Der kurzen Isoform von NFAT2 werden antiapoptotische, proliferationsfördernde und onkogene Eigenschaften zugeschrieben (Bhattacharyya et al., 2011, Nayak et al., 2009, Robbs et al., 2008). Es wurde beobachtet, dass B-Zellen aus der Milz nach Stimulation vorwiegend die kurze Isoform exprimieren (Bhattacharyya et al., 2011, Hock et al., 2013). Unter Stimulation zeigen B-Zellen mit NFAT2-*Knockdown* eine höhere Apoptoserate als Wildtyp B-Zellen. Dies deutet auf eine antiapoptotische Aktivität von NFAT2 hin

und gilt besonders für die kurze NFAT2-Isoform, die unter diesen Konditionen bevorzugt exprimiert wird (Bhattacharyya et al., 2011). Die starke Induktion der kurzen NFAT2-Isoform unter Rezeptorstimulation verleitet zur Spekulation, dass hohe Konzentrationen der kurzen NFAT2-Isoform gegen Apoptose schützen können, während niedrige Konzentrationen das Gegenteil bewirken. Eine andere Studie konnte nachweisen, dass die Überexpression der kurzen NFAT2-Isoform zu einer erhöhten Proliferation und zur Zelltransformation führt (Robbs et al., 2008).

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit konnten die antiapoptotischen und proliferationsfördernden Eigenschaften der kurzen Isoform von NFAT2 in allen durchgeführten Versuchen belegt werden. Beim *Knockdown*-Nachweis am Anfang dieser Arbeit wurde zunächst bestätigt, dass die Zelllinie B5 tatsächlich nur die kurze NFAT2-Isoform exprimiert (3.1.3 Abb. 13). Im Proliferationstest *in vitro* weist B5 das größte Zellwachstum auf, größer als beim kompletten *Knockdown* und größer als in der Negativkontrolle (3.2.2 Abb. 16). Die Zellzyklusanalyse *in vitro* belegt ebenfalls das höchste Wachstum in der Zelllinie mit der kurzen NFAT2-Isoform. Es wird deutlich, dass B5 jeweils die meisten Zellen in der S- und G2/M-Phase aufweist. In der G0-Phase hat B5 die wenigsten Zellen. Also verlassen die Zellen mit der kurzen NFAT2-Isoform am ehesten die G0-Phase und gehen schneller in die S- und die G2/M-Phase über (3.3.2 Abb. 24). Die Analyse der Apoptose *in vitro* unterstreicht wiederum die oben beschriebenen Daten. Die Zelllinie mit der kurzen NFAT2-Isoform weist die niedrigste Apoptoserate auf und die meisten lebenden Zellen im Vergleich zum kompletten *Knockdown* und der Negativkontrolle (3.3.1 Abb. 20). Beim Transplantationsversuch entwickelten die Tiere, die die Zellen mit der kurzen NFAT2-Isoform transplantiert bekommen hatten, mit Abstand den größten Tumor (3.4 Abb. 29).

Gegenteilige Ergebnisse lieferten die Untersuchungen des kompletten NFAT2-Knockdowns in der Proliferations- und Zellzyklusanalyse. Zellen mit komplettem NFAT2-*Knockdown* zeigten eine höhere Proliferation und ein höheres Wachstum in der Zellzyklusanalyse als die Negativkontrolle. Die Werte waren aller-

dings immer noch niedriger als die der Zellen mit dem *Knockdown* der kurzen NFAT2-Isoform (3.2.2 Abb. 16 und 3.3.2 Abb. 24). Dieses Ergebnis kann vermuten lassen, dass die onkogenen Eigenschaften von NFAT2 eher durch die Regulation der Apoptose vermittelt werden als durch die Regulation des Zellzyklus' wie es bei NFAT1 der Fall ist.

### 4.3 NFAT4

Erste Untersuchungen an NFAT4 belegen, dass es überwiegend im Thymus exprimiert wird und deutlich weniger in den peripheren Organen des Immunsystems auftritt (Hoey et al., 1995, Masuda et al., 1995). NFAT4 zeigt die höchste Expression in T-Zellen, wo es deutlich stärker als andere NFAT-Proteine exprimiert wird. In einer anderen wegweisenden Studie wurden NFAT4-defiziente Mäuse generiert, die eine um 50 % reduzierte Anzahl an peripheren T-Zellen zeigten, was auf eine erhöhte Apoptoserate zurückgeführt werden konnte (Oukka et al., 1998). Es lässt sich der Schluss ziehen, dass NFAT4 eine herausragende Rolle bei der Entwicklung und Reifung von T-Zellen spielt. Weitere Studien, die sich mit den NFAT-Proteinen in B-Zellen beschäftigten, beschrieben eine Beteiligung von NFAT4 und NFAT1 bei der Expansion von reifen B-Zellen. Mäuse, die in ihren B-Zellen defizient für NFAT1 und NFAT4 sind, zeigen eine Überempfindlichkeit des BCRs während der Stimulation und weisen eine erhöhte Anzahl an reifen B-Zellen auf, was auf die antiproliferative Eigenschaft von NFAT4 hindeutet (Samanta et al., 2005). Desweiteren wurde eine direkte proapoptotische Aktivität für NFAT4 nachgewiesen (Kondo et al., 2003).

Obwohl NFAT4 eine große Rolle bei der Proliferation der T-Zellen spielt, kann eine Tumorsuppressorrolle trotzdem in Betracht gezogen werden. Mäuse mit NFAT4-*Knockdown* waren anfälliger für die Entwicklung eines T-Zell-Lymphoms nach Infektion mit dem Leukämievirus SL3-3 als Wildtypmäuse. Dies zeigte, dass NFAT4 auch als Tumorsuppressor agieren kann (Glud et al., 2005). Die nicht-onkogene Eigenschaft belegt auch eine weitere Untersuchung, deren Erkenntnisse unter anderem zeigten, dass das NFAT4-Gen bei Non-Hodgkin-

Lymphomen häufig inaktiviert ist (Aya-Bonilla et al., 2014). Eine weitere Studie zeigte passend zu diesen Beobachtungen, dass NFAT4 hypermethyliert und somit ausgeschaltet ist in den meisten Tumorentitäten (Lotesto et al., 2020).

Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit konnte die antiproliferative Eigenschaft von NFAT4 ebenfalls belegt werden. Bei der Proliferationsanalyse *in vitro* zeigten die NFAT4-*Knockdown*-Zellen einen höheren Proliferationszuwachs als die Negativkontrolle (3.2.2 Abb. 17).

Obwohl eine proapoptotische Eigenschaft von NFAT4 bei den B-Zellen in der Literatur beschrieben wurde, konnte sie bei der Apoptoseanalyse in dieser Arbeit nicht belegt werden. Die NFAT4-*Knockdown*-Zellen wiesen eine höhere Apoptoserate und einen schnelleren Übergang in die frühe und späte Apoptosephasen auf (3.3.1 Abb. 21). Auch die Zellzyklusanalyse ergab eine geringere Expression von NFAT4 und mehr Zellen in der G0/G1-Phase bei den NFAT4-*Knockdown*-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (3.3.2 Abb. 25). Obwohl es bereits gezeigt wurde, dass der NFAT4-*Knockdown in vivo* zu einem erhöhten Untergang von T-Zellen führen kann (Oukka et al., 1998), gibt es keine klaren Hinweise in der Literatur, wie sich der NFAT4-Einzelknockdown auf die Proliferation und Apoptose in den B-Zellen auswirkt. Im Transplantationsversuch *in vivo* entwickelten die Tiere, die mit Zellen mit NFAT4-*Knockdown* transplantiert worden waren, einen kleineren Tumor als die Tiere der Negativkontrolle (3.4 Abb. 29).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit und die Recherche in der Literatur lassen den Schluss ziehen, dass NFAT4 mehrere unterschiedliche, zum Teil auch gegensätzliche Eigenschaften haben kann. Wichtig dabei ist, den Zelltyp und den zellulären Kontext zu beachten. Die antiproliferative Eigenschaft in den B-Zellen äußert sich am Ausmaß der BCR-Empfindlichkeit. Das antiapoptotische Merkmal kommt bei der Entwicklung und Reifung der T-Zellen im Thymus zum Vorschein und die Tumorsuppressorrolle äußert sich auf Genomebene (Samanta et al., 2005, Oukka et al., 1998, Glud et al., 2005, Aya-Bonilla et al., 2014).

#### 4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden die NFAT-Transkriptionsfaktoren 1, 2 und 4 einzeln im Hinblick auf die Proliferation, Apoptose, Zellzyklus und Tumorentwicklung in CLL-Zellen charakterisiert.

Die Bedingungen der Versuche zur Analyse der Apoptose und des Zellzyklus' konnten in mehreren Versuchen nicht exakt reproduziert werden. Da aufgrund einer sehr hohen Varianz der ermittelten Messwerte eine sinnvolle statistische Auswertung nicht möglich war, werden in diesen Fällen lediglich repräsentative Experimente gezeigt.

Die in der Literatur beschriebene Tumorsupressorrolle bzw. antiproliferative Eigenschaft für NFAT1 konnte nicht in allen Versuchen dieser Arbeit belegt werden. An dieser Stelle ist es wichtig zu unterstreichen, dass die antiproliferative Eigenschaft von NFAT1 in der Kontrolle und Regulation im Zellzyklus zum Vorschein kommt (Teixeira et al., 2016). Andere Studien liefern durchaus gegenteilige Ergebnisse, nämlich auch eine onkogene Rolle von NFAT1 (Baumgart et al., 2012, Jauliac et al., 2002). Die Tatsache, dass die Studien an unterschiedlichen Zelltypen, Tumortypen und im unterschiedlichen zellulären Kontext durchgeführt wurden, legt nahe, dass die Bestimmung der Eigenschaft von NFAT1 all diese Bedingungen berücksichtigen muss. In der CLL konnte die antiproliferative Eigenschaft von NFAT1 in dieser Arbeit bestätigt werden.

Viele Studien beschreiben die enorme Bedeutung von NFAT2 in B-Zell-Lymphomen. In dieser Arbeit konnte der komplette NFAT2-*Knockdown* mit der isolierten Expression der kurzen NFAT2-Isoform direkt miteinander verglichen werden. Eine klare onkogene Tendenz der kurzen Isoform konnte in allen Versuchen nachgewiesen werden. Der komplette NFAT2-*Knockdown* zeigte nur in der Apoptoseanalyse eine höhere Apoptoserate und im Tierversuch einen kleineren Tumor als die Negativkontrolle, was als Hinweis auf die antiapoptotische Eigenschaften von NFAT2 gedeutet werden kann.



NFAT4 spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der T-Zellen (Oukka et al., 1998). Untersuchungen von NFAT4 an verschiedenen Zelltypen und Tumorerkrankungen ergaben zum Teil gegenteilige Eigenschaften. Die in der Literatur beschriebene antiproliferative Eigenschaft konnte ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Im Übrigen scheint NFAT4 abhängig vom Zelltyp und der jeweiligen Tumorerkrankung unterschiedliche Aktivitätsmechanismen zu haben.

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen NFAT-Proteine jeweils mit der Negativkontrolle verglichen und daraus die entsprechenden Schlussfolgerungen gezogen. Es wurde davon abgesehen, die NFAT-Proteine untereinander zu vergleichen, weil es einerseits beim jeweiligen *Knockdown* zu unterschiedlichen Expressionsniveaus anderer NFAT-Proteine kam (Ergebnis nicht dargestellt), deren Einfluss unbekannt und mit den verwendeten Methoden nicht objektiv messbar ist, und andererseits weil, die NFAT-Proteine an unterschiedlichen Stellen im Zellstoffwechsel eingreifen. Der Einfluss anderer NFAT-Proteine auf den jeweiligen *Knockdown* könnte den Gegenstand weiterer Studien darstellen. Interessant wäre es ebenfalls, zu untersuchen, welche Expression und Eigenschaften NFAT1 und NFAT4 in den Lymphozyten der an CLL erkrankten Patienten haben.

Auch wenn die Tendenz der Ergebnisse in der Literatur und in dieser Arbeit zu antiproliferativen Eigenschaften und einer Tumorsuppressorrolle von NFAT1 und NFAT4 neigt, bleibt es weiterhin mit anderen Methoden genauer zu untersuchen, welche Eigenschaften und Mechanismen diese Proteine in der CLL haben.

Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse der bereits durchgeführten Studien und dieser Arbeit über die Rolle von NFAT2 und dessen kurzen Isoform in der CLL lässt sich schlussfolgern, dass der Aktivierungsweg und die molekularen Eigenschaften des Proteins großes therapeutisches Potential bergen.

## 5 Zusammenfassung

Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und ist mit einer Inzidenz von 4-6/100000/Jahr die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter. Die CLL ist eine extrem heterogene Erkrankung und nach wie vor mit Chemotherapie nicht heilbar. Es gibt verschiedene Medikamente, die das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten und die Symptome mildern, aber nicht zu einer vollständigen Heilung führen. Deshalb ist es von enormer Bedeutung die Pathogenese der CLL so detailliert wie möglich zu verstehen, um den hohen Bedarf an neuen Therapieansätzen decken zu können.

Zahlreiche Studien haben herausgefunden, dass NFAT-Transkriptionsfaktoren eine große Rolle innerhalb des Immunsystems und bei der Pathogenese von hämatopoetischen Erkrankungen besitzen. In dieser Arbeit wurden die Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2 und NFAT4 im Hinblick auf die Proliferation, Apoptose, Veränderungen im Zellzyklus und Tumorinduktion *in vitro* und im Tierversuch untersucht. Dafür wurde ein stabiler plasmidkodierter shRNA-*Knockdown* der NFAT-Proteine in der CLL-Zelllinie MEC1 induziert. Die *Knockdown*-Zelllinien wurden von Jonas Heitmann zur Verfügung gestellt, da deren Generierung nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

In mehreren Studien wurde NFAT2 eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen zugeschrieben. In dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse ebenfalls belegt werden, vor allem aber die onkogene Natur der kurzen NFAT2-Isoform war in allen durchgeführten Untersuchungen eindeutig.

Die in der Literatur beschriebene Tumorsuppressorrolle von NFAT1 und NFAT4 konnte nicht in allen Untersuchungen belegt werden. Wie in den Studien zuvor, lässt sich auch hier der Schluss ziehen, dass diese Transkriptionsfaktoren an verschiedenen Stellen im Zellstoffwechsel eingreifen und aus diesem Grund bei den Analysen von NFAT1 und NFAT4 der Zelltyp und der zelluläre Kontext bei

den Ergebnissen mitberücksichtigt werden müssen. Nachfolgestudien sollten daher mit anderen Untersuchungsmethoden untersuchen, welche Eigenschaften und Mechanismen diesen Proteinen in der CLL zugeschrieben werden kann.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- AYA-BONILLA, C., CAMILLERI, E., HAUPT, L. M., LEA, R., GANDHI, M. K. & GRIFFITHS, L. R. 2014. In silico analyses reveal common cellular pathways affected by loss of heterozygosity (LOH) events in the lymphomagenesis of Non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *BMC Genomics*, 15, 390.
- BAKSH, S., WIDLUND, H. R., FRAZER-ABEL, A. A., DU, J., FOSMIRE, S., FISHER, D. E., DECAPRIO, J. A., MODIANO, J. F. & BURAKOFF, S. J. 2002. NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell*, 10, 1071-81.
- BAUMGART, S., GLESEL, E., SINGH, G., CHEN, N. M., REUTLINGER, K., ZHANG, J., BILLADEAU, D. D., FERNANDEZ-ZAPICO, M. E., GRESS, T. M., SINGH, S. K. & ELLENRIEDER, V. 2012. Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 142, 388-98 e1-7.
- BELL, S. P. & LABIB, K. 2016. Chromosome Duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203, 1027-67.
- BENNINGHOFF, A., DRENCKHAHN, D. & AKERT, K. *Anatomie makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, München Wien Baltimore, Urban & Schwarzenberg.
- BERLAND, R. & WORTIS, H. H. 2003. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13459-64.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M. & HANNON, G. J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.
- BEUTLER, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40, 845-59.
- BHATTACHARYYA, S., DEB, J., PATRA, A. K., THUY PHAM, D. A., CHEN, W., VAETH, M., BERBERICH-SIEBELT, F., KLEIN-HESSLING, S., LAMPERTI, E. D., REIFENBERG, K., JELLUSOVA, J., SCHWEIZER, A., NITSCHKE, L., LEICH, E., ROSENWALD, A., BRUNNER, C., ENGELMANN, S., BOMMARDT, U., AVOTS, A., MULLER, M. R., KONDO, E. & SERFLING, E. 2011. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *J Exp Med*, 208, 823-39.
- BINET, J. L., LEPORRIER, M., DIGHIERO, G., CHARRON, D., D'ATHIS, P., VAUGIER, G., BERAL, H. M., NATALI, J. C., RAPHAEL, M., NIZET, B. & FOLLEZOU, J. Y. 1977. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*, 40, 855-64.
- BORNER, C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, 39, 615-47.
- BOSMA, G. C., CUSTER, R. P. & BOSMA, M. J. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527-30.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRATTON, S. B. & SALVESEN, G. S. 2010. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*, 123, 3209-14.
- BRUMMELKAMP, T. R., BERNARDS, R. & AGAMI, R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 550-3.
- BUCHHOLZ, M., SCHATZ, A., WAGNER, M., MICHL, P., LINHART, T., ADLER, G., GRESS, T. M. & ELLENRIEDER, V. 2006. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic

- activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling pathway. *EMBO J*, 25, 3714-24.
- BUSSLINGER, M. 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol*, 22, 55-79.
- CARVALHO, L. D., TEIXEIRA, L. K., CARROSSINI, N., CALDEIRA, A. T., ANSEL, K. M., RAO, A. & VIOLA, J. P. 2007. The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle*, 6, 1789-95.
- CHAO, M. P., SEITA, J. & WEISSMAN, I. L. 2008. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 73, 439-49.
- CHEN, L., GLOVER, J. N., HOGAN, P. G., RAO, A. & HARRISON, S. C. 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature*, 392, 42-8.
- CHIU, M. L., GOULET, D. R., TEPLYAKOV, A. & GILLILAND, G. L. 2019. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel)*, 8.
- CHOWDHURY, D. & LIEBERMAN, J. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, 26, 389-420.
- CHUVPILO, S., AVOTS, A., BERBERICH-SIEBELT, F., GLOCKNER, J., FISCHER, C., KERSTAN, A., ESCHER, C., INASHKINA, I., HLUBEK, F., JANKEVICS, E., BRABLETZ, T. & SERFLING, E. 1999. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol*, 162, 7294-301.
- COLLINS, A. M. & WATSON, C. T. 2018. Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. *Front Immunol*, 9, 2249.
- COOPER, M. D. & ALDER, M. N. 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124, 815-22.
- CRABTREE, G. R. & OLSON, E. N. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109 Suppl, S67-79.
- CROUCH, S. P., KOZLOWSKI, R., SLATER, K. J. & FLETCHER, J. 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 160, 81-8.
- CUTTNER, J. 1992. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest*, 10, 103-9.
- D'ARENA, G., MUSTO, P., CASCAVILLA, N., DELL'OLIO, M., DI RENZO, N., PERLA, G., SAVINO, L. & CAROTENUTO, M. 2001. CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 42, 109-14.
- DAMLE, R. N., GHIOTTO, F., VALETTO, A., ALBESIANO, E., FAIS, F., YAN, X. J., SISON, C. P., ALLEN, S. L., KOLITZ, J., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V. P., BUDDE, P., FREY, J., RAI, K. R., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. 2002. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, 99, 4087-93.
- DAMLE, R. N., WASIL, T., FAIS, F., GHIOTTO, F., VALETTO, A., ALLEN, S. L., BUCHBINDER, A., BUDMAN, D., DITTMAR, K., KOLITZ, J., LICHTMAN, S. M., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V. P., RAI, K. R., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94, 1840-7.
- DARWICHE, W., GUBLER, B., MAROLLEAU, J. P. & GHAMLOUCH, H. 2018. Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective. *Front Immunol*, 9, 683.
- DICK, J. E. & LAPIDOT, T. 2005. Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol*, 82, 389-96.

- DISANTO, J. P., MULLER, W., GUY-GRAND, D., FISCHER, A. & RAJEWSKY, K. 1995. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 377-81.
- DUHREN-VON MINDEN, M., UBELHART, R., SCHNEIDER, D., WOSSNING, T., BACH, M. P., BUCHNER, M., HOFMANN, D., SUROVA, E., FOLLO, M., KOHLER, F., WARDEMANN, H., ZIRLIK, K., VEELKEN, H. & JUMAA, H. 2012. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*, 489, 309-12.
- ENGELKE, M., ENGELS, N., DITTMANN, K., STORK, B. & WIENANDS, J. 2007. Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev*, 218, 235-46.
- FAIS, F., GHIOTTO, F., HASHIMOTO, S., SELLARS, B., VALETTO, A., ALLEN, S. L., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V. P., RAI, K., RASSENTI, L. Z., KIPPS, T. J., DIGHIRO, G., SCHROEDER, H. W., JR., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. 1998. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*, 102, 1515-25.
- FAROOQUI, M. Z., VALDEZ, J., MARTYR, S., AUE, G., SABA, N., NIEMANN, C. U., HERMAN, S. E., TIAN, X., MARTI, G., SOTO, S., HUGHES, T. E., JONES, J., LIPSKY, A., PITTALUGA, S., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C., LEE, Y. S., PEDERSEN, L. B., GEISLER, C. H., CALVO, K. R., ARTHUR, D. C., MARIC, I., CHILDS, R., YOUNG, N. S. & WIESTNER, A. 2015. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*, 16, 169-76.
- FAYAD, L., KEATING, M. J., REUBEN, J. M., O'BRIEN, S., LEE, B. N., LERNER, S. & KURZROCK, R. 2001. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 97, 256-63.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FIRE, A. Z. 2007. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 6966-84.
- FU, L., LIN-LEE, Y. C., PHAM, L. V., TAMAYO, A., YOSHIMURA, L. & FORD, R. J. 2006. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood*, 107, 4540-8.
- FURMAN, R. R., SHARMAN, J. P., COUTRE, S. E., CHESON, B. D., PAGEL, J. M., HILLMEN, P., BARRIENTOS, J. C., ZELENETZ, A. D., KIPPS, T. J., FLINN, I., GHIA, P., ERADAT, H., ERVIN, T., LAMANNA, N., COIFFIER, B., PETTITT, A. R., MA, S., STILGENBAUER, S., CRAMER, P., AIELLO, M., JOHNSON, D. M., MILLER, L. L., LI, D., JAHN, T. M., DANSEY, R. D., HALLEK, M. & O'BRIEN, S. M. 2014. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 370, 997-1007.
- GARRITY, P. A., CHEN, D., ROTHENBERG, E. V. & WOLD, B. J. 1994. Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol*, 14, 2159-69.
- GIRARD, A., SACHIDANANDAM, R., HANNON, G. J. & CARMELL, M. A. 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442, 199-202.
- GLUD, S. Z., SORENSEN, A. B., ANDRULIS, M., WANG, B., KONDO, E., JESSEN, R., KRENACS, L., STELKOVICS, E., WABL, M., SERFLING, E., PALMETSHOFER, A. & PEDERSEN, F. S. 2005. A tumor-suppressor function for NFATc3 in T-cell lymphomagenesis by murine leukemia virus. *Blood*, 106, 3546-52.
- GRAEF, I. A., CHEN, F. & CRABTREE, G. R. 2001. NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 505-12.
- GREEN, D. R., DROIN, N. & PINKOSKI, M. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*, 193, 70-81.

- GREINER, D. L., HESSELTON, R. A. & SHULTZ, L. D. 1998. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*, 16, 166-77.
- HAASE, S. B. & WITTENBERG, C. 2014. Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. *Genetics*, 196, 65-90.
- HALLEK, M., CHESON, B. D., CATOVSKY, D., CALIGARIS-CAPPIO, F., DIGHIRO, G., DOHNER, H., HILLMEN, P., KEATING, M. J., MONTSERRAT, E., RAI, K. R., KIPPS, T. J. & INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHRONIC LYMPHOCYTIC, L. 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111, 5446-56.
- HAMBLIN, T. J., DAVIS, Z., GARDINER, A., OSCIER, D. G. & STEVENSON, F. K. 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94, 1848-54.
- HARWOOD, N. E. & BATISTA, F. D. 2010. Early events in B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 28, 185-210.
- HEIMBERG, A. M., SEMPERE, L. F., MOY, V. N., DONOGHUE, P. C. & PETERSON, K. J. 2008. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2946-50.
- HENSEL, M., KORNAKER, M., YAMMENI, S., EGERER, G. & HO, A. D. 2003. Disease activity and pretreatment, rather than hypogammaglobulinaemia, are major risk factors for infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 122, 600-6.
- HERISHANU, Y., PEREZ-GALAN, P., LIU, D., BIANCOTTO, A., PITTALUGA, S., VIRE, B., GIBELLINI, F., NJUGUNA, N., LEE, E., STENNETT, L., RAGHAVACHARI, N., LIU, P., MCCOY, J. P., RAFFELD, M., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C., SHERRY, R., ARTHUR, D. C., MARIC, I., WHITE, T., MARTI, G. E., MUNSON, P., WILSON, W. H. & WIESTNER, A. 2011. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 117, 563-74.
- HESSELTON, R. M., GREINER, D. L., MORDES, J. P., RAJAN, T. V., SULLIVAN, J. L. & SHULTZ, L. D. 1995. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J Infect Dis*, 172, 974-82.
- HO, S. N., THOMAS, D. J., TIMMERMAN, L. A., LI, X., FRANCKE, U. & CRABTREE, G. R. 1995. NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J Biol Chem*, 270, 19898-907.
- HOCK, M., VAETH, M., RUDOLF, R., PATRA, A. K., PHAM, D. A., MUHAMMAD, K., PUSCH, T., BOPP, T., SCHMITT, E., ROST, R., BERBERICH-SIEBELT, F., TYRSIN, D., CHUVPILO, S., AVOTS, A., SERFLING, E. & KLEIN-HESSLING, S. 2013. NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *J Immunol*, 190, 2345-53.
- HODGE, M. R., RANGER, A. M., CHARLES DE LA BROUSSE, F., HOEY, T., GRUSBY, M. J. & GLIMCHER, L. H. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*, 4, 397-405.
- HOEY, T., SUN, Y. L., WILLIAMSON, K. & XU, X. 1995. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity*, 2, 461-72.
- HOGAN, P. G., CHEN, L., NARDONE, J. & RAO, A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17, 2205-32.

- HUDSON, W. A., LI, Q., LE, C. & KERSEY, J. H. 1998. Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects. *Leukemia*, 12, 2029-33.
- HUTVAGNER, G. & SIMARD, M. J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 22-32.
- HYDBRING, P., MALUMBRES, M. & SICINSKI, P. 2016. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 280-92.
- IBRAHIM, S., KEATING, M., DO, K. A., O'BRIEN, S., HUH, Y. O., JILANI, I., LERNER, S., KANTARJIAN, H. M. & ALBITAR, M. 2001. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98, 181-6.
- IMAMURA, R., MASUDA, E. S., NAITO, Y., IMAI, S., FUJINO, T., TAKANO, T., ARAI, K. & ARAI, N. 1998. Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J Immunol*, 161, 3455-63.
- ISHIKAWA, F., YASUKAWA, M., LYONS, B., YOSHIDA, S., MIYAMOTO, T., YOSHIMOTO, G., WATANABE, T., AKASHI, K., SHULTZ, L. D. & HARADA, M. 2005. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood*, 106, 1565-73.
- ISRAELS, E. D. & ISRAELS, L. G. 2000. The cell cycle. *Oncologist*, 5, 510-3.
- ITO, M., HIRAMATSU, H., KOBAYASHI, K., SUZUE, K., KAWAHATA, M., HIOKI, K., UEYAMA, Y., KOYANAGI, Y., SUGAMURA, K., TSUJI, K., HEIKE, T. & NAKAHATA, T. 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100, 3175-82.
- JAULIAC, S., LOPEZ-RODRIGUEZ, C., SHAW, L. M., BROWN, L. F., RAO, A. & TOKER, A. 2002. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol*, 4, 540-4.
- KIANI, A., HABERMANN, I., HAASE, M., FELDMANN, S., BOXBERGER, S., SANCHEZ-FERNANDEZ, M. A., THIEDE, C., BORNHAUSER, M. & EHNINGER, G. 2004. Expression and regulation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) in human CD34+ cells: down-regulation upon myeloid differentiation. *J Leukoc Biol*, 76, 1057-65.
- KONDO, E., HARASHIMA, A., TAKABATAKE, T., TAKAHASHI, H., MATSUO, Y., YOSHINO, T., ORITA, K. & AKAGI, T. 2003. NF-ATc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signaling via the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol*, 33, 1-11.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C. P., KUIJTEN, G. A., KEEHNEN, R. M., PALS, S. T. & VAN OERS, M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- LAIDLAW, B. J. & CYSTER, J. G. 2021. Transcriptional regulation of memory B cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 21, 209-220.
- LEBIEN, T. W. & TEDDER, T. F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112, 1570-80.
- LEMONNIER, T., DUPRE, A. & JESSUS, C. 2020. The G2-to-M transition from a phosphatase perspective: a new vision of the meiotic division. *Cell Div*, 15, 9.
- LENZ, G., WRIGHT, G. W., EMRE, N. C., KOHLHAMMER, H., DAVE, S. S., DAVIS, R. E., CARTY, S., LAM, L. T., SHAFFER, A. L., XIAO, W., POWELL, J., ROSENWALD, A., OTT, G., MULLER-HERMELINK, H. K., GASCOYNE, R. D., CONNORS, J. M., CAMPO, E., JAFFE, E. S., DELABIE, J., SMELAND, E. B., RIMSZA, L. M., FISHER, R. I., WEISENBURGER, D. D., CHAN, W. C. & STAUDT, L. M. 2008. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13520-5.
- LIMAS, J. C. & COOK, J. G. 2019. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. *FEBS Lett*, 593, 2853-2867.



- LOH, C., CAREW, J. A., KIM, J., HOGAN, P. G. & RAO, A. 1996a. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol*, 16, 3945-54.
- LOH, C., SHAW, K. T., CAREW, J., VIOLA, J. P., LUO, C., PERRINO, B. A. & RAO, A. 1996b. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem*, 271, 10884-91.
- LOPEZ-RODRIGUEZ, C., ARAMBURU, J., JIN, L., RAKEMAN, A. S., MICHINO, M. & RAO, A. 2001. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity*, 15, 47-58.
- LOPEZ-RODRIGUEZ, C., ARAMBURU, J., RAKEMAN, A. S. & RAO, A. 1999. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7214-9.
- LOTESTO, M. J., WALLACE, C. J. & RAIMONDI, S. L. 2020. E-Cadherin, NFATC3, and PLP2 Are Differentially Methylated in Multiple Cancers. *Epigenet Insights*, 13, 2516865720964802.
- LOWRY, P. A., SHULTZ, L. D., GREINER, D. L., HESSELTON, R. M., KITTLER, E. L., TIARKS, C. Y., RAO, S. S., REILLY, J., LEIF, J. H., RAMSHAW, H., STEWART, F. M. & QUESENBERRY, P. J. 1996. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2, 15-23.
- LUO, C., BURGEON, E., CAREW, J. A., MCCAFFREY, P. G., BADALIAN, T. M., LANE, W. S., HOGAN, P. G. & RAO, A. 1996a. Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol*, 16, 3955-66.
- LUO, C., BURGEON, E. & RAO, A. 1996b. Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J Exp Med*, 184, 141-7.
- MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5, 472-84.
- MANCINI, M. & TOKER, A. 2009. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 9, 810-20.
- MARAFIOTI, T., POZZOBON, M., HANSMANN, M. L., VENTURA, R., PILERI, S. A., ROBERTON, H., GESK, S., GAULARD, P., BARTH, T. F., DU, M. Q., LEONCINI, L., MOLLER, P., NATKUNAM, Y., SIEBERT, R. & MASON, D. Y. 2005. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol*, 128, 333-42.
- MÄRKLIN, M. 2015. *Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL*. Dissertation, Universität Tübingen.
- MARKLIN, M., FUCHS, A. R., TANDLER, C., HEITMANN, J. S., SALIH, H. R., KAUER, J., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., WIRTHS, S., KOPP, H. G. & MULLER, M. R. 2020a. Genetic Loss of LCK Kinase Leads to Acceleration of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol*, 11, 1995.
- MARKLIN, M., HEITMANN, J. S., KAUER, J., WIRTHS, S. & MULLER, M. R. 2020b. Genetic loss of NFAT2 (NFATc1) impairs B cell development of B1 and B2 B cells. *Cell Immunol*, 349, 104048.
- MASUDA, E. S., NAITO, Y., TOKUMITSU, H., CAMPBELL, D., SAITO, F., HANNUM, C., ARAI, K. & ARAI, N. 1995. NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol*, 15, 2697-706.
- MATSON, J. P., HOUSE, A. M., GRANT, G. D., WU, H., PEREZ, J. & COOK, J. G. 2019. Intrinsic checkpoint deficiency during cell cycle re-entry from quiescence. *J Cell Biol*, 218, 2169-2184.

- MAY, S. L., ZHOU, Q., LEWELLEN, M., CARTER, C. M., COFFEY, D., HIGHFILL, S. L., BUCHER, C. M., MATISE, I., MORSE, H. C., 3RD, O'SULLIVAN, M. G., SCHUTTEN, M., JOHNSON, C., BELLGRAU, D., BLAZAR, B. R. & MODIANO, J. F. 2014. Nfatc2 and Tob1 have non-overlapping function in T cell negative regulation and tumorigenesis. *PLoS One*, 9, e100629.
- MCCAFFREY, P. G., LUO, C., KERPPOLA, T. K., JAIN, J., BADALIAN, T. M., HO, A. M., BURGEON, E., LANE, W. S., LAMBERT, J. N., CURRAN, T. & ET AL. 1993. Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science*, 262, 750-4.
- MEDYOUF, H., ALCALDE, H., BERTHIER, C., GUILLEMIN, M. C., DOS SANTOS, N. R., JANIN, A., DECAUDIN, D., DE THE, H. & GHYSDAEL, J. 2007. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, 13, 736-41.
- MEDYOUF, H. & GHYSDAEL, J. 2008. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle*, 7, 297-303.
- MEISTER, G. & TUSCHL, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-9.
- MELLO, C. C. 2007. Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 6985-94.
- MIYAKAWA, H., WOO, S. K., DAHL, S. C., HANDLER, J. S. & KWON, H. M. 1999. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2538-42.
- MOGNOL, G. P., CARNEIRO, F. R., ROBBS, B. K., FAGET, D. V. & VIOLA, J. P. 2016. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis*, 7, e2199.
- MOSER, K., TOKOYODA, K., RADBRUCH, A., MACLENNAN, I. & MANZ, R. A. 2006. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol*, 18, 265-70.
- MULLER, M. R. & RAO, A. 2010. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 10, 645-56.
- NAKAMURA, Y., ITO, M., YAMAMOTO, T., YAN, X. Y., YAGASAKI, H., KAMACHI, Y., KUDO, K. & KOJIMA, S. 2005. Engraftment of NOD/SCID/gammac(null) mice with multilineage neoplastic cells from patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 130, 51-7.
- NATHANS, D. 1964. Inhibition of Protein Synthesis by Puromycin. *Fed Proc*, 23, 984-9.
- NAYAK, A., GLOCKNER-PAGEL, J., VAETH, M., SCHUMANN, J. E., BUTTMANN, M., BOPP, T., SCHMITT, E., SERFLING, E. & BERBERICH-SIEBELT, F. 2009. Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem*, 284, 10935-46.
- NORTHROP, J. P., HO, S. N., CHEN, L., THOMAS, D. J., TIMMERMAN, L. A., NOLAN, G. P., ADMON, A. & CRABTREE, G. R. 1994. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*, 369, 497-502.
- OAKES, C. C., SEIFERT, M., ASSENOV, Y., GU, L., PRZEKOPOWITZ, M., RUPPERT, A. S., WANG, Q., IMBUSCH, C. D., SERVA, A., KOSER, S. D., BROCKS, D., LIPKA, D. B., BOGATYROVA, O., WEICHENHAN, D., BRORS, B., RASSENTI, L., KIPPS, T. J., MERTENS, D., ZAPATKA, M., LICHTER, P., DOHNER, H., KUPPERS, R., ZENZ, T., STILGENBAUER, S., BYRD, J. C. & PLASS, C. 2016. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 48, 253-64.
- OHBO, K., SUDA, T., HASHIYAMA, M., MANTANI, A., IKEBE, M., MIYAKAWA, K., MORIYAMA, M., NAKAMURA, M., KATSUKI, M., TAKAHASHI, K., YAMAMURA, K. & SUGAMURA, K. 1996. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*, 87, 956-67.

- OUKKA, M., HO, I. C., DE LA BROUSSE, F. C., HOEY, T., GRUSBY, M. J. & GLIMCHER, L. H. 1998. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 9, 295-304.
- PARK, J., TAKEUCHI, A. & SHARMA, S. 1996. Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *J Biol Chem*, 271, 20914-21.
- PEARSON, T., GREINER, D. L. & SHULTZ, L. D. 2008. Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15 21.
- PENG, S. L., GERTH, A. J., RANGER, A. M. & GLIMCHER, L. H. 2001. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*, 14, 13-20.
- PFLUMIO, F., IZAC, B., KATZ, A., SHULTZ, L. D., VAINCHENKER, W. & COULOMBEL, L. 1996. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood*, 88, 3731-40.
- PHAM, L. V., TAMAYO, A. T., YOSHIMURA, L. C., LIN-LEE, Y. C. & FORD, R. J. 2005. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood*, 106, 3940-7.
- PORTER, C. M., HAVENS, M. A. & CLIPSTONE, N. A. 2000. Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem*, 275, 3543-51.
- RAI, K. R., SAWITSKY, A., CRONKITE, E. P., CHANANA, A. D., LEVY, R. N. & PASTERNAK, B. S. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46, 219-34.
- RANGER, A. M., OUKKA, M., RENGARAJAN, J. & GLIMCHER, L. H. 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity*, 9, 627-35.
- RAO, A., LUO, C. & HOGAN, P. G. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15, 707-47.
- RASSENTI, L. Z., JAIN, S., KEATING, M. J., WIERDA, W. G., GREVER, M. R., BYRD, J. C., KAY, N. E., BROWN, J. R., GRIBBEN, J. G., NEUBERG, D. S., HE, F., GREAVES, A. W., RAI, K. R. & KIPPS, T. J. 2008. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 112, 1923-30.
- ROBBS, B. K., CRUZ, A. L., WERNECK, M. B., MOGNOL, G. P. & VIOLA, J. P. 2008. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol*, 28, 7168-81.
- ROTHENBERG, E. V., KUEH, H. Y., YUI, M. A. & ZHANG, J. A. 2016. Hematopoiesis and T-cell specification as a model developmental system. *Immunol Rev*, 271, 72-97.
- RUEDA, D. & THOME, M. 2005. Phosphorylation of CARMA1: the link(er) to NF-kappaB activation. *Immunity*, 23, 551-3.
- SAMANTA, D. N., PALMETSHOFER, A., MARINKOVIC, D., WIRTH, T., SERFLING, E. & NITSCHKE, L. 2005. B cell hyperresponsiveness and expansion of mature follicular B cells but not of marginal zone B cells in NFATc2/c3 double-deficient mice. *J Immunol*, 174, 4797-802.
- SAMELSON, L. E. 2011. Immunoreceptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- SANT, M., ALLEMANI, C., TEREANU, C., DE ANGELIS, R., CAPOCACCIA, R., VISSER, O., MARCOSGRAGERA, R., MAYNADIE, M., SIMONETTI, A., LUTZ, J. M., BERRINO, F. & GROUP, H. W. 2010. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116, 3724-34.
- SERFLING, E., AVOTS, A., KLEIN-HESSLING, S., RUDOLF, R., VAETH, M. & BERBERICH-SIEBELT, F. 2012. NFATc1/alphaA: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell Commun Signal*, 10, 16.

- SERFLING, E., CHUVPILO, S., LIU, J., HOFER, T. & PALMETSHOFER, A. 2006. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol*, 27, 461-9.
- SHAW, A. S. & FILBERT, E. L. 2009. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol*, 9, 47-56.
- SHAW, J. P., UTZ, P. J., DURAND, D. B., TOOLE, J. J., EMMEL, E. A. & CRABTREE, G. R. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241, 202-5.
- SHI, Y. 2003. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet*, 19, 9-12.
- SHULTZ, L. D., ISHIKAWA, F. & GREINER, D. L. 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*, 7, 118-30.
- SHULTZ, L. D., LYONS, B. L., BURZENSKI, L. M., GOTT, B., CHEN, X., CHALEFF, S., KOTB, M., GILLIES, S. D., KING, M., MANGADA, J., GREINER, D. L. & HANDGRETINGER, R. 2005. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*, 174, 6477-89.
- SHULTZ, L. D., SCHWEITZER, P. A., CHRISTIANSON, S. W., GOTT, B., SCHWEITZER, I. B., TENNENT, B., MCKENNA, S., MOBRAATEN, L., RAJAN, T. V., GREINER, D. L. & ET AL. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*, 154, 180-91.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68, 7-30.
- SIEGEL, R. M. 2006. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol*, 6, 308-17.
- STACCHINI, A., ARAGNO, M., VALLARIO, A., ALFARANO, A., CIRCOSTA, P., GOTTARDI, D., FALDELLA, A., REGE-CAMBRIN, G., THUNBERG, U., NILSSON, K. & CALIGARIS-CAPPIO, F. 1999. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk Res*, 23, 127-36.
- STILGENBAUER, S., EICHHORST, B., SCHEDELIG, J., COUTRE, S., SEYMOUR, J. F., MUNIR, T., PUVVADA, S. D., WENDTNER, C. M., ROBERTS, A. W., JURCZAK, W., MULLIGAN, S. P., BOTTCHER, S., MOBASHER, M., ZHU, M., DESAI, M., CHYLA, B., VERDUGO, M., ENSCHEDE, S. H., CERRI, E., HUMERICKHOUSE, R., GORDON, G., HALLEK, M. & WIERDA, W. G. 2016. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 17, 768-778.
- STILGENBAUER, S., SCHNAITER, A., PASCHKA, P., ZENZ, T., ROSSI, M., DOHNER, K., BUHLER, A., BOTTCHER, S., RITGEN, M., KNEBA, M., WINKLER, D., TAUSCH, E., HOTH, P., EDELMANN, J., MERTENS, D., BULLINGER, L., BERGMANN, M., KLESS, S., MACK, S., JAGER, U., PATTEN, N., WU, L., WENGER, M. K., FINGERLE-ROWSON, G., LICHTER, P., CAZZOLA, M., WENDTNER, C. M., FINK, A. M., FISCHER, K., BUSCH, R., HALLEK, M. & DOHNER, H. 2014. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*, 123, 3247-54.
- TAN, C., NOVISKI, M., HUIZAR, J. & ZIKHERMAN, J. 2019. Self-reactivity on a spectrum: A sliding scale of peripheral B cell tolerance. *Immunol Rev*, 292, 37-60.
- TEIXEIRA, L. K., CARROSSINI, N., SECCA, C., KROLL, J. E., DACUNHA, D. C., FAGET, D. V., CARVALHO, L. D., DE SOUZA, S. J. & VIOLA, J. P. 2016. NFAT1 transcription factor regulates cell cycle progression and cyclin E expression in B lymphocytes. *Cell Cycle*, 15, 2346-59.
- TEN HACKEN, E., SIVINA, M., KIM, E., O'BRIEN, S., WIERDA, W. G., FERRAJOLI, A., ESTROV, Z., KEATING, M. J., OELLERICH, T., SCIELZO, C., GHIA, P., CALIGARIS-CAPPIO, F. & BURGER, J. A. 2016. Functional Differences between IgM and IgD Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Immunol*, 197, 2522-31.

- TIMMERMAN, L. A., CLIPSTONE, N. A., HO, S. N., NORTHROP, J. P. & CRABTREE, G. R. 1996. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature*, 383, 837-40.
- TIMMERMAN, L. A., HEALY, J. I., HO, S. N., CHEN, L., GOODNOW, C. C. & CRABTREE, G. R. 1997. Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *J Immunol*, 159, 2735-40.
- TOLAR, P., SOHN, H. W., LIU, W. & PIERCE, S. K. 2009. The molecular assembly and organization of signaling active B-cell receptor oligomers. *Immunol Rev*, 232, 34-41.
- TRAVIS, L. B., CURTIS, R. E., HANKEY, B. F. & FRAUMENI, J. F., JR. 1992. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*, 84, 1422-7.
- TSIODRAS, S., SAMONIS, G., KEATING, M. J. & KONTOYIANNIS, D. P. 2000. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Mayo Clin Proc*, 75, 1039-54.
- VAN ENGELAND, M., RAMAEKERS, F. C., SCHUTTE, B. & REUTELINGSPERGER, C. P. 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24, 131-9.
- VAN OERS, M. H. J. 2016. Analysis of prognosis in CLL: collaboration makes the difference. *Lancet Oncol*, 17, 691-692.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- VIOLA, J. P., CARVALHO, L. D., FONSECA, B. P. & TEIXEIRA, L. K. 2005. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res*, 38, 335-44.
- WOLF, C., GARDING, A., FILARSKY, K., BAHLO, J., ROBRECHT, S., BECKER, N., ZUCKNICK, M., ROUHI, A., WEIGEL, A., CLAUS, R., WEICHENHAN, D., EICHHORST, B., FISCHER, K., HALLEK, M., KUCHENBAUER, F., PLASS, C., DOHNER, H., STILGENBAUER, S., LICHTER, P. & MERTENS, D. 2018. NFATC1 activation by DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia correlates with clinical staging and can be inhibited by ibrutinib. *Int J Cancer*, 142, 322-333.
- WOYACH, J. A., JOHNSON, A. J. & BYRD, J. C. 2012. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 120, 1175-84.
- WU, Y., BORDE, M., HEISSMEYER, V., FEUERER, M., LAPAN, A. D., STROUD, J. C., BATES, D. L., GUO, L., HAN, A., ZIEGLER, S. F., MATHIS, D., BENOIST, C., CHEN, L. & RAO, A. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126, 375-87.
- XANTHOUDAKIS, S., VIOLA, J. P., SHAW, K. T., LUO, C., WALLACE, J. D., BOZZA, P. T., LUK, D. C., CURRAN, T. & RAO, A. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272, 892-5.
- YAMAMOTO, J. F. & GOODMAN, M. T. 2008. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control*, 19, 379-90.
- YANG, Y. R., CHOI, J. H., CHANG, J. S., KWON, H. M., JANG, H. J., RYU, S. H. & SUH, P. G. 2012. Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C-gamma1. *Adv Biol Regul*, 52, 138-51.
- YASEEN, N. R., MAIZEL, A. L., WANG, F. & SHARMA, S. 1993. Comparative analysis of NFAT (nuclear factor of activated T cells) complex in human T and B lymphocytes. *J Biol Chem*, 268, 14285-93.
- ZHANG, J., ZHENG, Z. Q., YUAN, Y. W., ZHANG, P. P., LI, Y. Q., WANG, Y. Q., TANG, X. R., WEN, X., HONG, X. H., LEI, Y., HE, Q. M., YANG, X. J., SUN, Y., MA, J. & LIU, N. 2019. NFAT1 Hypermethylation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma by Activating ITGA6 Transcription. *Neoplasia*, 21, 311-321.

ZHURAVLEV, Y., HIRSCH, S. M., JORDAN, S. N., DUMONT, J., SHIRASU-HIZA, M. & CANMAN, J. C.  
2017. CYK-4 regulates Rac, but not Rho, during cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 28, 1258-  
1270.

## 6.2 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie unter Betreuung von PD Dr. Dr. Martin Müller, Oberarzt Hämatologie und Immunologie, Gruppenleiter AG Müller, durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. Dr. Martin Müller, Oberarzt Hämatologie und Immunologie, Gruppenleiter AG Müller, Melanie Märklin, PhD, Jonas Heitmann, Doktorand.

Jonas Heitmann, Doktorand, führte die Transfektion der MEC1-Zellen mit den shRNA-Vektoren durch und stellte die Zelllinien für diese Arbeit zur Verfügung.

Die Versuche und Messungen wurden nach Einarbeitung durch Melanie Märklin, PhD, von mir, Anastasia Posdorowkin, Doktorandin, eigenständig durchgeführt. Die Messungen am Durchflusszytometer FACS Canto II erfolgten mit Unterstützung von Melanie Märklin, PhD.

Der Tierversuch, der die Transplantation der MEC1-Zellen, Überwachung der Tiere und die Präparation der Tumore beinhaltete, erfolgte in Zusammenarbeit mit Melanie Märklin, PhD.

PD Dr. Dr. Martin Müller, Oberarzt Hämatologie und Immunologie, Gruppenleiter AG Müller, hat die Arbeit betreut und hat das Manuskript korrigiert.

Die Literaturrecherche, Erstellung von Abbildungen und Tabellen sowie das Verfassen des Manuskripts erfolgten durch mich, Anastasia Posdorowkin, Doktorandin. Abbildungen 5 und 6 wurden von Melanie Märklin, PhD, erstellt und mit ihrer ausdrücklichen Zustimmung in dieser Arbeit verwendet.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Mannheim, April 2022

Anastasia Posdorowkin