

Aus dem Universitätsklinikum Tübingen
Klinische Kooperationseinheit
Translationale Immunologie im Deutschen Konsortium für
Translationale Krebsforschung (DKTK)

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der NK-
Zell-vermittelten Immunüberwachung der chronisch
lymphatischen Leukämie**

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

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

**vorgelegt von
Greiner, Sarah Maria
2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

Tag der Disputation: 09.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Pathogenese und molekulare Eigenschaften	2
1.1.3. Diagnostik und Klassifikation	4
1.1.4. Therapie	5
1.1.5. Richter Syndrom (RS)	7
1.2. NFAT-Transkriptionsfaktoren	8
1.2.1. NFAT-Signalweg	9
1.2.2. NFAT in Tumorerkrankungen	11
1.2.3. NFAT in der CLL	12
1.3. NK-Zellen	14
1.3.1. NK-Zell-Zytotoxizität	15
1.3.2. Immunüberwachung durch NK-Zellen und Immunevasion durch Tumore	18
1.3.3. Wirkung von anti-CD20-Antikörpern	20
1.4. Zielsetzung	20
2. Material	22
2.1. Zelllinien	22
2.2. Primer	22
2.3. Vektoren	22
2.4. Geräte	22
2.5. Verbrauchsmaterial	23
2.6. Chemikalien und Reagenzien	24
2.7. Kits	25
2.8. Rezepturen für Puffer und Zellkulturmedien	25
2.9. Antikörper und rekombinante Proteine	26
2.10. Software	26
3. Methoden	28
3.1. Zellkultur	28

3.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
3.3.	Isolation von PBMCs	28
3.4.	NFAT2 CRISPR/Cas9 Knock-out in MEC-1 Zelllinie	29
3.4.1.	Vektorentwurf	29
3.4.2.	Plasmidamplifikation und - aufbereitung	30
3.4.3.	Transfektion	31
3.4.4.	Transduktion	32
3.5.	RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR	33
3.6.	Zytotoxizitätsassay	34
3.7.	Durchflusszytometrie	35
3.7.1.	Bestimmung der Aktivierung und Degranulation von NK-Zellen	35
3.8.	IFN- γ ELISA	35
3.9.	Herstellung von NK-Zell-Lysaten	36
3.9.1.	7-AAD und Annexin-V Expression nach Lysatbehandlung	36
3.9.2.	Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität im IncuCyte	37
3.10	Statistik	37
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Generierung eines NFAT2-Knockouts in der MEC-1 Zelllinie	38
4.2.	Analyse der NK-Zell-Reaktivität gegenüber der MEC-1-Zelllinie	42
4.2.1.	NK-Zell-Zytotoxizität	42
4.2.2.	Aktivierung der NK-Zellen	44
4.3.	Analyse der NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber MEC-1-Transfektanten	47
5.	Diskussion	52
5.1.	Generierung eines NFAT2-Knockouts in der MEC-1 Zelllinie	53
5.2.	Analyse der NK-Zell-Reaktivität gegenüber der MEC-1 Zelllinie	54
5.2.1.	NK-Zell-Zytotoxizität	54
5.2.2.	Aktivierung der NK-Zellen	55
5.3.	Analyse der NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber MEC-1-Transfektanten	56
5.3.1.	Perforin-induzierte Membranpermeabilisierung	56
5.3.2.	Granula-induzierte Apoptose	58
5.4.	Ausblick	58
5.4.1.	NFAT2 zur Risikostratifizierung der CLL	58

5.4.2. NFAT2 als therapeutische Zielstruktur	59
6. Zusammenfassung	64
7. Summary	66
8. Verzeichnisse	68
8.1. Abkürzungsverzeichnis	68
8.2. Abbildungsverzeichnis	70
8.3. Tabellenverzeichnis	71
8.4. Literaturverzeichnis	72
9. Erklärung zum Eigenanteil	81
10. Veröffentlichungen	82
10.1. Posterpräsentationen	82
11. Danksagung	83
12. Lebenslauf	84

1. Einleitung

1.1. Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Maligne Lymphome entstehen durch Entartung von Lymphozyten und manifestieren sich meist in Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Man unterscheidet das Hodgkin-Lymphom (HL) von den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Die sehr heterogene Gruppe der NHL wird von der *World Health Organisation* (WHO) nach ihrer Herkunft in B- und T-Zell-Lymphome unterteilt, wobei B-Zell-Lymphome mit 80-85% die Mehrheit bilden. Nach ihrer Dignität werden indolente und aggressive NHL unterschieden. Zu den indolenten B-Zell NHL (B-NHL) gehört auch die CLL, welche durch einen leukämischen Verlauf charakterisiert ist.¹ Bis heute ist die CLL nicht heilbar, wobei sich ihr Verlauf sehr unterschiedlich darstellen kann. Meist verläuft sie indolent und bedarf zumindest über einen längeren Zeitraum keinerlei Therapie, in anderen Fällen wird die Erkrankung schnell progredient und kann zum Tode führen. Im Jahr 2017 wurden ca. 5100 Neuerkrankungen in Deutschland festgestellt, damit ist die CLL die häufigste Leukämie des Erwachsenen, wobei Männer etwas häufiger erkranken als Frauen (Abbildung 1). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren für Männer und 75 Jahren für Frauen, nur ca. 10-15% der Neuerkrankten sind unter 50 Jahre alt.²

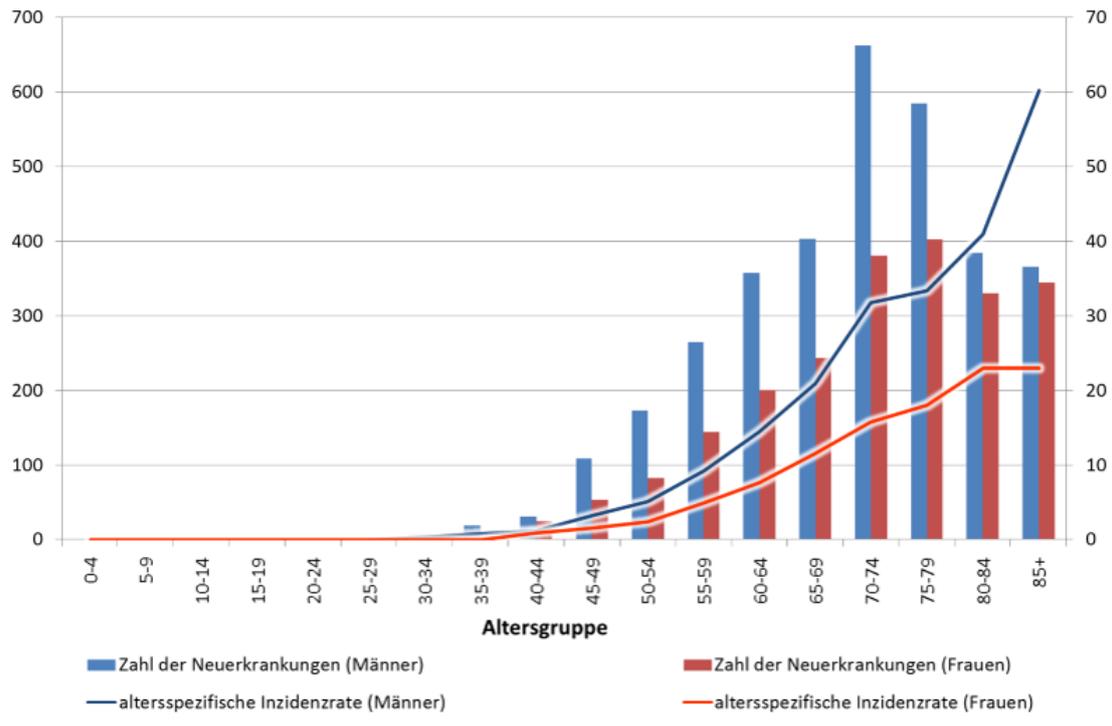


Abbildung 1: CLL-Neuerkrankungen in Deutschland

Dargestellt sind die durchschnittliche jährliche Zahl an Neuerkrankungen, aufgeteilt nach Altersgruppen (Balken, linke Y-Achse) und die Inzidenzrate in Neuerkrankungen/100.000 Einwohner (Linien, rechte Y-Achse) der CLL in Deutschland in den Jahren 2012-2014. (übernommen von Onkopedia²)

1.1.2. Pathogenese und molekulare Eigenschaften

Der zelluläre Ursprung der CLL ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Bisher konnte keine definitive Subpopulation der B-Zellen identifiziert werden, durch deren Entartung eine CLL entsteht.³ Ein Vergleich der Genexpression zwischen CLL-Zellen und gesunden B-Zellen deutet darauf hin, dass die CLL am ehesten aus Antigen-erfahrenen B-Zellen hervorgeht.⁴

In der CLL führt die Verwendung von bestimmten schweren und leichten Immunglobulin-Ketten (Ig-Ketten) im B-Zell Rezeptor (BZR) zu Stereotypen des BZR.⁵ Anhand des Mutationsstatus der schweren Kette der Ig (IgHV) werden zwei Gruppen der CLL unterschieden: PatientInnen mit mutierten (M-CLL) und mit unmutierten (U-CLL) IgHV. Eine U-CLL muss in >98% mit der entsprechenden Keimbahnsequenz übereinstimmen. Im Vergleich zur M-CLL

zeigt die U-CLL einen signifikant ungünstigeren Verlauf.⁶ CLL-PatientInnen mit U-CLL zeigen auch eine hohe Expression von CD38 ($\geq 30\%$), wobei beide Faktoren unabhängig voneinander mit einem kürzeren Überleben korrelieren.⁷ CD38 unterhält durch Signalübertragung in die CLL-Zelle deren Proliferation.⁸ Die Signalübertragung von CD38 geschieht über die Tyrosinkinase ZAP70, die von CD38 phosphoryliert wird.⁹ Eine hohe ZAP70-Expression verstärkt die BZR-Signalübertragung.¹⁰ Wie auch im Falle von CD38 korreliert eine hohe Expression von ZAP70 mit einem ungünstigeren Verlauf der CLL.¹¹

Im Genom von CLL-Zellen treten eine Reihe unterschiedlicher Mutationen auf, welche auf mögliche Pathomechanismen der CLL schließen lassen. In ca. 80% der CLL finden sich eine oder mehrere solcher Läsionen. Die mit >50% am häufigsten vorkommende ist die Deletion 13q14, welche einen günstigen Faktor für die Prognose der CLL darstellt. Die Größe dieser Deletion ist variabel, beinhaltet aber mindestens den DLEU1 und -2 Locus, sowie die MicroRNA miR15/16 und das DLEU7-Gen.¹² Die miR15/16 entfaltet ihre Eigenschaft als Tumorsuppressor über die Inhibition des *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) Proteins und induziert dadurch Apoptose. Über diesen Weg könnte die Deletion zur Pathogenese der CLL beitragen.¹³ Ähnliches gilt für das DLEU7-Gen, das durch die Inhibition des *nuclear factor kappa B* (NFkB)- und *nuclear factor of activated t-cells* (NFAT)-Signalwegs ebenfalls als Tumorsuppressor wirkt.¹⁴ Die Deletion 11q22-23 kommt bei 20% der CLL-PatientInnen vor und betrifft das *ataxia telangiectasia-mutated* (ATM) Gen, welches der DNA-Reparatur dient.¹² Dadurch sind Träger dieser Läsion empfänglicher für die Akkumulation weiterer genetischer Läsionen und zeigen eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika.¹⁵ Mit dieser Deletion zeigt die CLL eine raschere Progression und bei jüngeren PatientInnen ein signifikant kürzeres Überleben.¹⁶ Die Deletion 17p13 beinhaltet das Tumorsuppressorgen TP53 und hat prognostisch ungünstige Auswirkungen auf den Verlauf der CLL, sie induziert eine genomische Instabilität sowie schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie.¹⁷

1.1.3. Diagnostik und Klassifikation

Die Diagnose der CLL kann gestellt werden, wenn >5000 monoklonale B-Lymphozyten/ μ L über 3 Monate im peripheren Blut vorliegen. Liegt dieser Wert <5000/ μ L wird bei fehlenden zusätzlichen Symptomen eine monoklonale B-Zell-Lymphozytose (MBL) diagnostiziert, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-2% pro Jahr in eine CLL übergehen kann. Tritt eine Zytopenie aufgrund von Knochenmarksinfiltration mit typischen CLL-Zellen auf, liegt per Definition eine CLL vor, auch ohne monoklonale B-Zell-Lymphozytose. Eine *Small Lymphocytic Leukemia* (SLL) wird festgestellt, wenn eine Lymphadenopathie ohne eine Infiltration des Knochenmarks und mit einer monoklonalen Lymphozytose <5000/ μ L vorliegt. SLL und CLL gelten als unterschiedliche Manifestationen derselben Erkrankung.¹⁸ Anhand einer körperlichen Untersuchung und eines Blutbildes lässt sich die CLL in Stadien nach Binet einteilen und damit das mediane Überleben einschätzen (Tabelle 1).¹⁹

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Binet¹⁹

Stadium	Tastbar vergrößerte Lymphknotenregionen	Hämoglobin	Thrombozyten	Medianes Überleben
A	<3	≥ 10 g/dL	$\geq 100.000/uL$	>10 Jahre
B	≥ 3	≥ 10 g/dL	$\geq 100.000/uL$	5-7 Jahre
C	irrelevant	<10 g/dL	<100.000/uL	2,5-3 Jahre

Weiterführende Untersuchungen ermöglichen eine exaktere Risikostratifizierung nach dem CLL-IPI, einem internationalen CLL-Prognoseindex. Dabei werden neben dem Binet-Stadium und dem Patientenalter, der TP53-Mutationsstatus, der IgHV-Status sowie der $\beta 2$ -Mikroglobulinspiegel im Serum berücksichtigt (Tabelle 2) womit die CLL einer Risikogruppe zugeordnet werden kann (Tabelle 3).²⁰

Tabelle 2: Risikoscore der CLL

Kriterien	Punkte
TP53 deletiert /mutiert	4
IGHV unmutiert	2
β2-Mikroglobulin >3,5mg/L	2
Binet Stadium B/C	1
Alter >65 Jahre	1
Score	0-10

Tabelle 3: 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR)

Risikogruppe	Score	5-JÜR
Niedrig	0-1	93,2%
Intermediär	2-3	79,3%
Hoch	4-6	63,3%
Sehr hoch	7-10	23,3%

1.1.4. Therapie

Die einzige potenziell kurative Therapieoption für die CLL besteht in einer allogenen Stammzelltransplantation. In der Regel ist jedoch keine Therapie nötig, sondern ein abwartendes Vorgehen indiziert mit Kontrollen im Abstand von 3-6 Monaten, das sogenannte „*watch and wait*“. Die Therapie der CLL in frühen Stadien zeigt bislang keinen Überlebensvorteil, was auch durch die CC12 Studie 2022 erneut bestätigt werden konnte.²¹ Ein Therapiebeginn ist ab einem Stadium Binet C indiziert. In den Stadien A und B sollte bei Auftreten eines der folgenden Kriterien die Therapie ebenfalls eingeleitet werden:²²

- B-Symptomatik
- Knochenmarksinsuffizienz mit zunehmender Anämie und/oder Thrombozytopenie
- Therapierefraktäre autoimmunhämolytische Anämie oder Autoimmunthrombozytopenie
- Massive und symptomatische Splenomegalie
- Massive oder progrediente Lymphadenopathie
- Lymphozytenverdopplungszeit <6 Monate ab >30.000/μL oder Progredienz >50% über 2 Monate

Die Erstlinientherapie nach den aktuellen Leitlinien der DGHO richtet sich nach dem Allgemeinzustand (AZ) der PatientInnen und den genetischen Eigenschaften der Erkrankung (Tabelle 4). Die meisten PatientInnen erhalten

einen Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) zusammen mit einem anti-CD20-Antikörper (z.B. Rituximab) als Erstlinientherapie.²

Tabelle 4: Erstlinientherapie der CLL²

AZ	Genetik	Therapie
fit	del(17p13)/komplexer Karyotyp/IGHV mutiert	Ibrutinib/Idelalisib + Rituximab/Ofatumumab/Venetoclax
	Ohne del(17p13)	<65 Jahre: Fludarabin + Cyclophosphamid + Rituximab (FCR)
		>65 Jahre: Bendamustin + Rituximab/Ofatumumab
unfit	del(17p13)	Ibrutinib/Idelalisib + Rituximab/Ofatumumab/Venetoclax
	Ohne del(17p13)	Chlorambucil + CD20Ak
gebrechlich		supportive Therapie

Die Therapiewahl richtet sich bei der CLL vor allem nach Komorbiditäten und der Genetik. Die klassische Chemoimmunotherapie, bestehend aus Rituximab, Cyclophosphamid und Fludarabin, galt früher als Standardtherapie. Cyclophosphamid als alkylierende Substanz und Fludarabin als Purinanalogon gehören zu den klassischen Chemotherapeutika mit zytostatischer Wirkung. Rituximab hingegen bindet als anti-CD20-Antikörper an das auf CLL-Zellen exprimierte CD20 und induziert damit als Hauptwirkmechanismus die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), welche hauptsächlich durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelt wird.

Die klassische Chemoimmunotherapie wird heutzutage von den *small molecules* Ibrutinib, Idelalisib und Venetoclax ergänzt. Ibrutinib hemmt die *Bruton's Tyrosine Kinase* (BTK), welche an Signalwegen der B-Zelle beteiligt ist und zu deren Überleben und Proliferation beiträgt. Die Kombination von Ibrutinib mit Rituximab zeigte sich der klassischen Chemoimmunotherapie überlegen.²³ Idelalisib inhibiert die BZR-Signalübertragung durch spezifische Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Die Kombination von Idelalisib mit Rituximab für CLL-PatientInnen mit refraktärer CLL, verbesserte signifikant deren Überleben

verglichen mit alleiniger Rituximab-Therapie.²⁴ Venetoclax induziert durch die Blockade des anti-apoptotischen Bcl-2 Apoptose. Die Kombination von Venetoclax und dem anti-CD20-Antikörper Obinutuzumab ist bei unbehandelten Patienten mit relevanten Nebenerkrankungen der Therapie mit Chlorambucil und Obinutuzumab überlegen.^{25,2}

Ist die CLL ab sechs Monaten nach Therapieende wieder progredient, spricht man von einer rezidierten CLL. Findet die Progredienz bereits innerhalb dieser 6 Monate statt oder zeigt sich von Beginn an kein Ansprechen auf die Therapie, spricht man von einer refraktären CLL.¹⁸ Betroffene PatientInnen bedürfen einer Zweitlinientherapie, die meistens aus Rituximab und Venetoclax besteht. In dieser Kombination zeigt sich für rezidierte/refraktäre CLL in 83,5% der Fälle eine Negativität für *Minimal Residual Disease* (MRD) im peripheren Blut.²⁶ Neben einer rezidivierenden oder refraktären Erkrankung kann die CLL sich auch zu einem hochmalignen Lymphom entwickeln. Diese Transformation wird als Richter Syndrom (RS) bezeichnet.¹

1.1.5. Richter Syndrom (RS)

Das RS tritt bei der 2-10% der CLL-PatientInnen auf. In 92% der Fälle geht die CLL dabei in ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DGBZL) und in 8% in ein Hodgkin-Lymphom über.²⁷ Die Transformation zum RS wird vermutlich durch Akkumulation genetischer Läsionen im Verlauf der CLL-Erkrankung hervorgerufen. Diese unterscheiden sich von den genetischen Läsionen, die man in einem *de novo* entstandenen DGBZL antrifft.²⁸ Besonders häufig tritt beim RS eine Mutation des NOTCH1-Gens (31%) sowie eine TP53-Mutation (60%) auf.^{29,30} Die NOTCH-1- und TP53-Mutation korrelieren in der CLL mit einem schlechteren Überleben.²⁹⁻³¹ An ein RS sollte gedacht werden, wenn CLL-PatientInnen sich mit B-Symptomatik, Verschlechterung des Allgemeinzustands und rasch progredienter Vergrößerung einer nodalen oder extranodalen Manifestation präsentieren. Daraufhin sollte eine Bildgebung mittels Magnetresonanztomografie (MRT) oder Computertomografie (CT) zur Bestimmung des Ausbreitungsstadiums durchgeführt und eine geeignete

Manifestation für eine Biopsie ermittelt werden. Mit der histologischen Untersuchung der Biopsie kann die Diagnose gesichert werden.²² Das RS Bedarf immer einer Therapie, wobei dafür zuerst die klonale Beziehung zwischen der CLL und dem aggressiven Lymphom bestimmt werden muss. Sind die Klone nicht verwandt, ist von einer *de novo* Entwicklung eines DGBZL auszugehen. Handelt es sich um eine Transformation aus der CLL sollte der Einschluss in eine klinische Studie in Betracht gezogen werden. Ist dies nicht möglich kann nach R-CHOP, einem Chemotherapieschema aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon, behandelt werden. Damit lässt sich ein medianes Überleben von 21 Monaten erzielen.³² Wenn möglich sollte eine Stammzelltransplantation (SZT) angestrebt werden. Die 3-Jahres-Überlebensrate liegt bei 36% nach allogener und 59% nach autologer SZT.^{33,34}

1.2. NFAT-Transkriptionsfaktoren

NFAT wurde erstmals in nukleären Extrakten aktivierter T-Zellen entdeckt und als DNA-bindender Faktor am Interleukin-2(IL-2)-Promoter identifiziert.³⁵ NFAT ist relevant für die Funktion und Entwicklung von T-Zellen sowie für weitere Zellen des Immunsystems wie dendritische Zellen, B-Zellen und Megakaryozyten.³⁶⁻³⁹ Darüber hinaus spielt der Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten sowie bei der embryonalen Entwicklung der Herzklappen und Skelettmuskulatur.⁴⁰

Zur Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren gehören NFAT1 bis NFAT5, wobei NFAT1 bis NFAT4 über einen calciumabhängigen Signalweg aktiviert werden, NFAT5 hingegen durch osmotischen Stress. Ein NFAT-Protein besteht aus einer N-terminalen regulatorischen, einer DNA-bindenden und einer C-terminalen Domäne (Abbildung 2). Innerhalb der regulatorischen Domäne, die als *NFAT-Homology-Region* (NHR) bekannt ist, finden sich mehrere Serin-reiche (SRR1-2) und Serin-Prolin-reiche Abschnitte (SP1-3), die von verschiedenen Kinasen (*Casein Kinase 1*(CK1), *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK3), *Dual-specificity tyrosin-phosphorylation-regulated Kinase* (DYRK)) phosphoryliert werden können. In dieser Domäne befindet sich auch die *Nuclear Localization Sequence*

(NLS), die NFAT in den Zellkern transloziert. Durch die Phosphorylierung wird die Translokation von NFAT in den Zellkern verhindert. Außerdem finden sich in der regulatorischen Domäne die Bindungsstellen für Calcineurin (SPRIEIT), welche maßgeblich die Aktivität von NFAT beeinflusst. Die DNA-bindende Domäne, auch *Rel-Homology-Domain* (RHD) genannt, ist hochkonserviert und kommt in allen NFAT-Formen vor. Sie beinhaltet mehrere Ansatzpunkte für die Bindung von Ko-Transkriptionsfaktoren wie *Activator Protein 1* (AP1).⁴¹

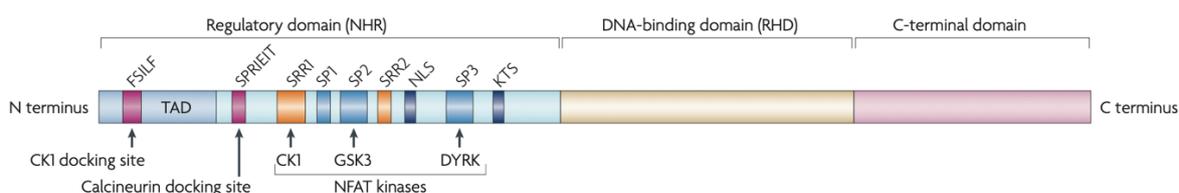


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Ein NFAT-Protein besteht aus einer N-terminalen regulatorischen, einer DNA-bindenden und einer C-terminalen Domäne. Innerhalb der regulatorischen Domäne (NHR) finden sich mehrere Serin-reiche Abschnitte (SRR1-2, SP1-3), sowie verschiedene Kinasen (CK1, GSK3, DYRK) und die NLS. Außerdem eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), sowie Bindungsstellen für die Kinase CK1 (FSILF) und Calcineurin (SPRIEIT). (übernommen mit Genehmigung (Lizenznummer: 5427690159176) aus Müller et al⁴¹)

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Rolle von NFAT2 befasst, wird im Folgenden der Signalweg der calciumabhängigen NFAT-Transkriptionsfaktoren beschrieben.

1.2.1. NFAT-Signalweg

Der Ca^{2+} /NFAT-Signalweg wird durch Aktivierung von T-Zell-Rezeptoren (TZR), BZR, Fc-Rezeptoren oder Chemokin-Rezeptoren induziert. Im Folgenden wird die Signaltransduktion über den BZR beschrieben, wie sie auch in der CLL-Zelle stattfinden kann (Abbildung 3). Durch die Bindung eines Liganden an den BZR wird Phospholipase C γ (PLC γ) aktiviert, welche wiederum Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) hydrolysiert. IP $_3$ bindet dann an seinen Rezeptor am endoplasmatischen

Retikulum (ER), wodurch ein Ca^{2+} -Eflux aus dem ER entsteht. Die sinkende Ca^{2+} -Konzentration im ER wird von STIM1 und -2 detektiert, welche wiederum über das Protein ORAI im Ca^{2+} -Kanal der Plasmamembran einen Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum auslösen. Das Ca^{2+} -Sensorprotein Calmodulin bindet Ca^{2+} und aktiviert dann Calcineurin, welches NFAT dephosphoryliert und damit dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht. Hier bindet NFAT zusammen mit seinen Kofaktoren in dimerischen Komplexen an Promotorregionen verschiedener Zielgene. Zur Steuerung der Transkription wird NFAT durch verschiedene Kinasen (CK1, DYRK, GSK3) rephosphoryliert und damit inaktiviert.⁴¹

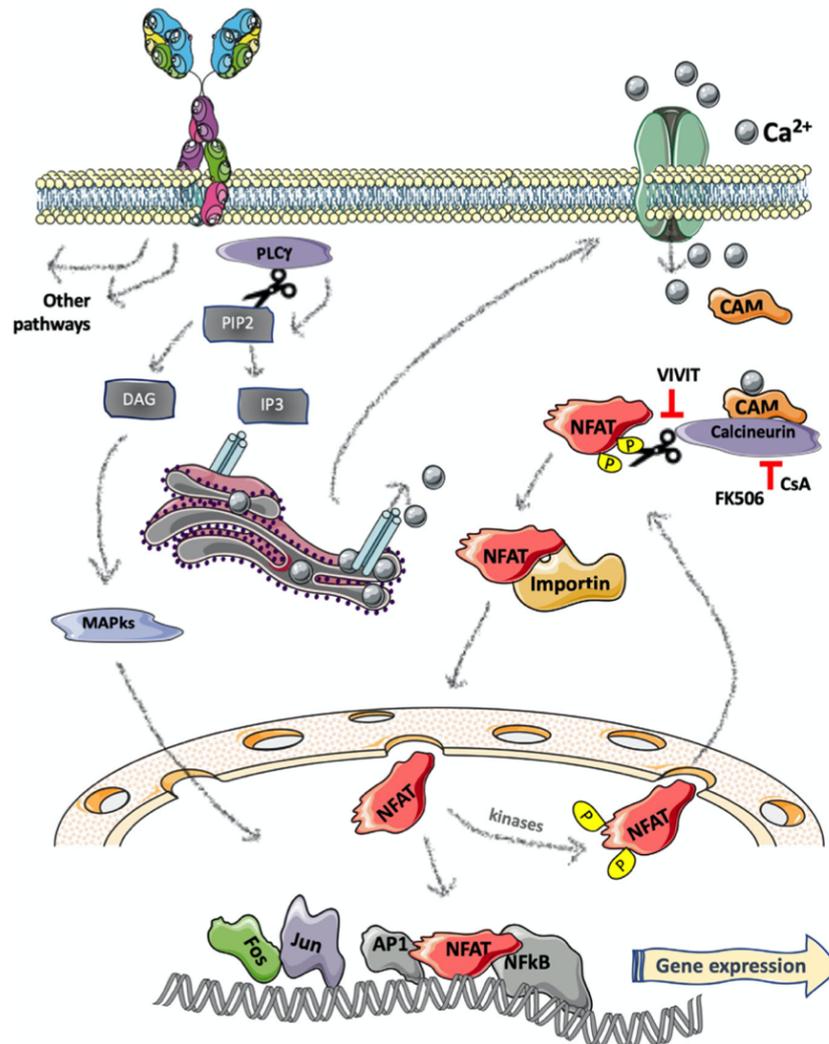


Abbildung 3: Ca²⁺/NFAT Signalweg in der B-Zelle

Die PLCγ wird über den BZR aktiviert, dadurch wird PIP₂ zu DAG und IP₃ hydrolysiert. IP₃ induziert einen Ca²⁺-Eflux aus dem ER. Calmodulin bindet Ca²⁺ und aktiviert Calcineurin, wodurch NFAT dephosphoryliert und in den Zellkern transloziert wird. NFAT bindet zusammen mit seinen Kofaktoren in dimerischen Komplexen an Promotorregionen verschiedener Zielgene. Die Inaktivierung von NFAT erfolgt über NFAT-Kinase (CK1, DYRK, GSK3). (übernommen von Sana et al⁴² unter CC BY 4.0 Lizenz)

1.2.2. NFAT in Tumorerkrankungen

Der Einfluss des NFAT-Signalwegs auf die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten wurde bereits umfangreich erforscht. Der Signalweg ist in verschiedenen immunologischen Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder dem systemischen Lupus erythematoses verstärkt aktiv.⁴³ Die

Dysregulation von NFAT hat auch Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum von malignen Erkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von NFAT1 und NFAT5 in Brustkrebszellen sowie Kolonkarzinomzellen das invasive Wachstum und damit die Metastasierung fördert.⁴⁴ Ebenso unterstützt die konstitutive Aktivität von NFAT2 in Pankreaskarzinomen durch Bindung an den Promoter des *c-myc* Onkogens, die Proliferation der malignen Zellen.⁴⁵ Für das invasive Blasenwandkarzinom konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Aktivität von NFAT2 mit der Progression der Erkrankung korreliert. Durch die Blockade von NFAT2 mittels siRNA oder Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus (FK506) konnte eine Verringerung der Zellviabilität sowie vermehrte Apoptose erzielt werden.⁴⁶ NFAT ist auch an der Tumorangio-genese beteiligt. Hier wird es über VEGF aktiviert und induziert die Transkription der angiogenesefördernden Cyclooxygenase-2 (COX-2). Eine Inhibition von NFAT durch CsA hemmt sowohl die Aktivierung von COX-2 als auch die angiogenetischen Effekte von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).⁴⁷ Trotz der anti-Tumor Wirkung von CsA und FK506 ist bekannt, dass eine Langzeitbehandlung mit diesen Substanzen zu einer erhöhten Inzidenz von Tumorerkrankungen führt.⁴⁸ Das lässt sich dadurch erklären, dass durch die immunsuppressive Wirkung auch die Immunüberwachung der Tumore gehemmt wird. Um einen reinen anti-Tumoreffekt zu erreichen wären Substanzen nötig, die NFAT spezifisch im Tumor inhibieren, ohne die Immunüberwachung zu beeinträchtigen.⁴⁹

1.2.3. NFAT in der CLL

NFAT2 wird in allen lymphatischen Zellen exprimiert, ebenso wie in den meisten lymphatischen Neoplasien. In einer histopathologischen Untersuchung von NHL zeigte sich eine deutliche Überexpression von NFAT2. In einzelnen NHL, wie auch in der CLL, konnte eine nukleäre Translokation von NFAT2 festgestellt werden.⁵⁰ In aggressiven B-NHL konnte gezeigt werden, dass NFAT die Transkription von Blys, einem Mitglied der TNF-Familie mit anti-apoptotischer Wirkung induziert und damit das Überleben der entarteten Zellen unterhält. Eine

Hemmung von NFAT verringerte die Expression von Blys.⁵¹ Auch bei der Regulation der Expression des CD40-Liganden spielt NFAT eine Rolle und aktiviert dessen Transkription im großzelligen B-Zell NHL. Durch die Interaktion mit dem CD40 Rezeptor wird das Überleben der B-NHL-Zellen unterstützt.⁵² In T-Zell-Lymphomen liegt NFAT vollständig dephosphoryliert und damit aktiv im Kern vor. Die Behandlung dieser Lymphome mit CsA oder FK506 bewirkt eine vollständige Phosphorylierung und damit Deaktivierung von NFAT. Dies hemmt die Proliferation der Tumorzellen und aktiviert deren Apoptose. Ein vergleichbarer Effekt konnte in einer Zelllinie eines B-Zell Lymphoms beobachtet werden.⁵³

Anergie bezeichnet einen Mechanismus, durch den autoreaktive B-Zellen nach Bindung eines Autoantigens gehemmt werden.⁵⁴ Ähnliche Eigenschaften konnten in einer Gruppe von CLL-Zellen nachgewiesen werden. Muzio et al beschreiben diesen Phänotyp mit einer konstitutiven Phosphorylierung von ERK1/2 sowie MEK1/2 und einer erhöhten nukleären Aktivität von NFAT. Der anerge Phänotyp ist durch eine geringe Aktivierung des BZR-Signalwegs nach BZR-Bindung durch IgM gekennzeichnet.⁵⁵ Durch die Hemmung von NFAT konnte Anergie der CLL-Zellen aufgehoben werden, wodurch der BZR-Signalweg wieder aktivierbar und die CLL-Zellen apoptotisch wurden. Der anerge Phänotyp stellt in der CLL einen Überlebensvorteil dar, dessen Umkehrung wiederum Apoptose induziert und somit als Zielstruktur für Therapien dienen könnte.⁵⁶ Die Fähigkeit der CLL-Zelle, auf IgM-Stimulation mit BZR-Signalaktivität zu reagieren, ist mit früherem Krankheitsprogress und einem kürzeren Überleben der PatientInnen assoziiert.⁵⁷

Märklin et al konnten NFAT2 als entscheidenden Regulator des anergen Phänotyps der CLL charakterisieren. NFAT2 ist in CLL-Zellen deutlich überexprimiert im Vergleich zu B-Zellen gesunder Spender. Interessanterweise zeigte sich bei PatientInnen mit aggressiven CLL-Verläufen eine deutlich verringerte NFAT2-Expression. Im E μ -TCL1-Mausmodell konnte mit einer Deletion von NFAT2 eine Akzeleration der CLL, sowie eine Transformation in ein aggressives BZL hervorgerufen werden. Dieser Akzeleration lag ursächlich der Verlust des anergen Phänotyps zu Grunde.⁵⁸ In einer weiteren Analyse dieses

Mausmodells konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von NFAT2 zu einer Selektion unmutierter BZR sowie zur Dominanz stereotyper BZR führte. Daraus resultiert eine oligoklonale CLL mit schnellerem Krankheitsprogress. Da stereotype BZR auch als Risikofaktor für eine Transformation zum RS gelten, könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass NFAT2 auch die Progression zum RS mitverursacht.⁵⁹ Einen weiteren Hinweis für die Relevanz von NFAT2 in der CLL-Pathogenese liefert die Erkenntnis von Wolf et al. Sie konnten zeigen, dass eine niedrige NFAT2-RNA-Expression durch Hypomethylierung des NFAT2-Promoters mit einer Progression der CLL korreliert. Auch hier wurde bewiesen, dass sowohl die Inhibition des NFAT-Signalwegs mit Calcineurininhibitoren als auch die Hemmung des BZR-Signalwegs durch Ibrutinib die Aktivität von NFAT hemmen und die Apoptose der CLL-Zellen induzieren.⁶⁰

1.3. NK-Zellen

NK-Zellen sind Lymphozyten, die dem angeborenen Immunsystem angehören. Anders als T- und B-Zellen sind sie ohne vorherige Sensibilisierung in der Lage, ihre Zielzellen zu töten, weshalb sie als „natürliche“ Killerzellen bezeichnet werden.⁶¹ Anhand ihrer CD56 Expression lassen sie sich in die Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen einteilen. Die CD56^{bright} Population macht ca. 10% der NK-Zellen im peripheren Blut aus und produziert vorrangig Zytokine und Chemokine. Ihre IFN γ -Ausschüttung aktiviert Antigenpräsentierende Zellen (APZ) und bewirkt antiproliferative Effekte auf virusinfizierte oder maligne Zellen.^{62,63} Im Gegensatz zur CD56^{dim} Population hat sie jedoch kaum die Fähigkeit, eine Zielzelle zu lysieren. CD56^{dim} NK-Zellen führen bei Aktivierung vor allem die zytotoxischen Effektorfunktionen der NK-Zellen aus. Aktivierung von NK Zellen wird durch eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren bestimmt.⁶⁴ Diese Regulation wird von der „missing-self“ und der „induced-self“ Hypothese beschrieben. Laut der „missing-self“ Hypothese erkennt eine NK-Zelle eine Zielzelle mit fehlender Expression von MHC-I als fremd und lysiert diese. Die „induced-self“ Hypothese besagt, dass die Bindung

von Liganden an bestimmte Oberflächenrezeptoren aktivierend auf die NK-Zellen wirkt. Diese Rezeptoren erkennen beispielsweise Liganden auf Zielzellen, die durch zellulären Stress, maligne Transformation oder virale Infektion exprimiert werden.⁶⁵ Die Aktivierung von NK-Zellen lässt sich mit der Expression des Oberflächenantigens CD69 messen.⁶⁶

1.3.1. NK-Zell-Zytotoxizität

Die Lyse einer Zielzelle durch NK-Zellen kann über die Rezeptor-vermittelte und Granula-vermittelte Zytotoxizität ablaufen. (Abbildung 4)

NK-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Liganden für Todesrezeptoren der Zielzellen, die bei Bindung in der Zielzelle Apoptose auslösen. Zu diesen Liganden gehören die Mitglieder der *Tumor Necrosis Factor* (TNF)-Familie *TNF-related Apoptosis inducing Ligand* (TRAIL) und *Fas Ligand* (FasL). FasL bindet an Fas (CD95) auf der Zielzelle. Dadurch wird die Apoptose durch die Aktivierung der Caspasen 8 und 10 induziert. TRAIL, ein Typ-2-Transmembranprotein, induziert durch Bindung an seine Rezeptoren (TRAIL-R1 und -R2) ein proapoptisches Signal mit Aktivierung von Caspase 8. Die Lyse der Zielzelle über Todesrezeptoren ist wesentlich langsamer als über die unten beschriebene Sekretion von Granula. Das liegt einerseits an der Geschwindigkeit der Bereitstellung dieser Rezeptoren und andererseits auch an den unterschiedlichen Wegen der Apoptoseinduktion in der Zielzelle. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetik wird vermutet, dass die rezeptorvermittelte Zytotoxizität erst unterstützend zum Einsatz kommt, wenn die Vorräte der Granula erschöpft sind.⁶⁷

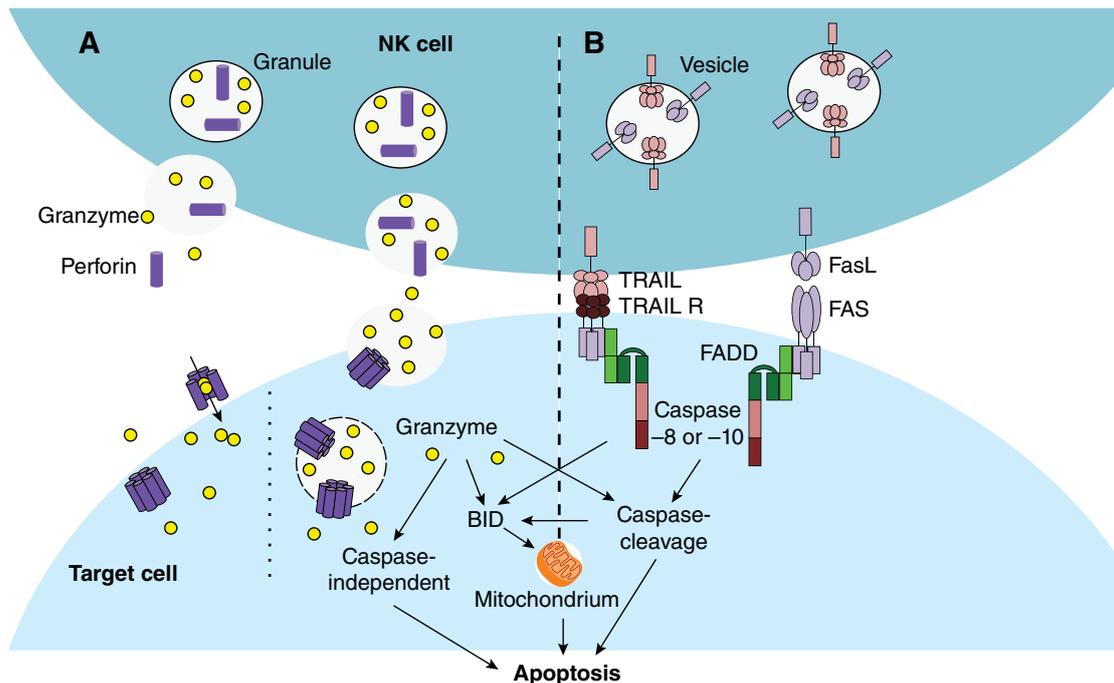


Abbildung 4: Granula- und Todesrezeptoren-vermittelte NK-Zell-Zytotoxizität

A Die Granula-vermittelte Zytotoxizität wird durch die Sekretion lytischer Granula initiiert. Das darin enthaltene Perforin und verschiedene Granzyme gelangen durch Perforinporen oder über Endozytose in die Zielzelle und induzieren die Apoptose. **B** Die Todesrezeptor-vermittelte Zytotoxizität wird durch die Expression von TRAIL und FasL auf der Effektorzelloberfläche initiiert. Bei Bindung an deren Rezeptoren auf der Zielzelle wird über Caspaseaktivierung und mitochondriale Dysfunktion die Apoptose induziert. (übernommen mit Genehmigung (Lizenznummer: 5427691214120) aus Prager et al⁶⁷)

NK-Zellen enthalten ebenso wie zytotoxische T-Zellen sekretorische Lysosomen, die vor allem Perforin und Granzyme enthalten. Die sekretorischen Lysosomen gelangen mit Hilfe von Dynein entlang der Mikrotubuli zum *Microtubuli-Organizing-Centrum* (MTOC), welches sich der immunologischen Synapse anlagert. Dort fusionieren sie schließlich mit der Zellmembran und entladen ihren Inhalt in den synaptischen Spalt.⁶⁸ Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, wie Granzyme mit Hilfe von Perforin in die Zielzelle gelangen könnten (Abbildung 5). (I) Das Poren-Modell vermutet, dass Granzyme durch die Perforin-Poren in der Zielzellmembran in die Zielzelle gelangen und so die Apoptose induziert. Dieses

wird jedoch von der Beobachtung, dass Granzym B auch ohne Perforin in die Zielzelle gelangen kann, infrage gestellt. Daraufhin wurde das (II) Endosomolysin-Modell vorgeschlagen, nachdem Perforin nur an der endosomalen Membran aktiv ist und so die darin enthaltenen Granzyme in die Zielzelle freisetzt. (III) Pipkin et al schlagen ein Hybrid-Modell vor, bei dem durch die Bindung von Perforin an die Zellmembran und den darauffolgenden Ca^{2+} -Influx das Membranreparatursystem aktiviert und die Endozytose von Perforin und Granzymen in die Zielzelle induziert wird.⁶⁹

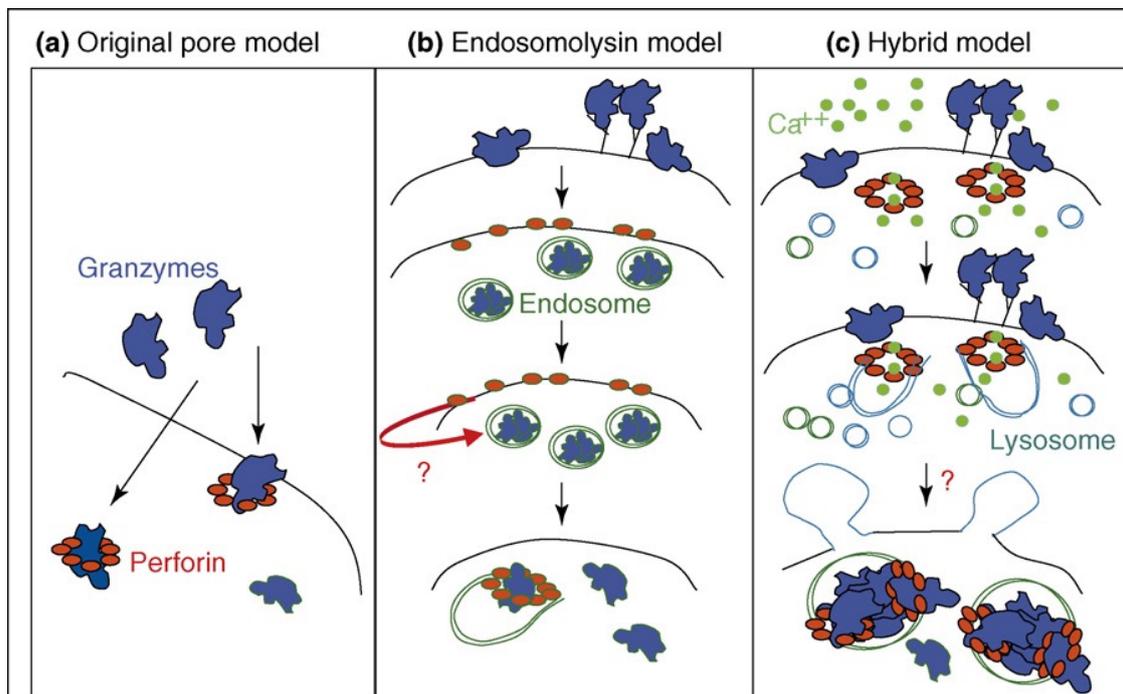


Abbildung 5: Modelle der Granula-induzierten Zytotoxizität

(a) Das ursprüngliche Porenmodell geht davon aus, dass die Granzyme durch die Perforinporen in der Zellmembran in das Zellinnere gelangen. **(b)** Nach dem Endosomolysin-Modell wirkt Perforin nur an der endosomalen Membran. Damit müssen Granzyme unabhängig von Perforin in Endosomen der Zielzelle gelangen. Aus diesen können sie durch Perforin-Poren in das Zytoplasma der Zielzelle gelangen. **(c)** Das Hybrid-Modell besagt, dass durch die Perforinporen in der Zellmembran ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zielzelle stattfindet, wodurch Membranreparaturmechanismen induziert werden, die die Ko-Endozytose von Granzymen und Perforin ermöglichen. (übernommen mit Genehmigung (Lizenznummer: 5427690863348) aus Pipkin et al⁶⁹)

Im Zellinneren angekommen, können die Granzyme ihre apoptotische Wirkung ausüben. Granzym B induziert die Apoptose Caspase-abhängig durch Aktivierung von Caspase 3 und 7 oder durch die Spaltung von *BH3-interacting domain death antagonist* (Bid). Die Caspasen 3 und 7 werden als Effektorcaspasen bezeichnet und schneiden nach ihrer Aktivierung verschiedenste Substrate in der Zelle, was die Apoptose vorantreibt.⁷⁰ Granzym A kann unabhängig von den zuvor genannten Prozessen Apoptose durch die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) induzieren, ähnlich wirkt Granzym K. Granzym M kann Caspase-unabhängig Apoptose induzieren und unterstützt die Wirkung von Granzym B durch die Inaktivierung von dessen Inhibitor.⁶⁷ Die Bildung der immunologischen Synapse dient einer gezielten Freisetzung der zytotoxischen Granula auf die Zielzelle, wodurch umliegende gesunde Zellen geschützt werden. Auch die NK-Zelle benötigt Mechanismen, um sich vor ihren eigenen Granula zu schützen. Bei der Exozytose der Granula wird mit der Zellmembran der Lysosomen auch das darin enthaltene CD107a in die Zellmembran eingebaut. Dieses schützt die NK-Zelle vor Granula vermittelter Apoptose durch Beeinträchtigung der Bindung von Perforin an die Zellmembran.⁷¹ In NK-Zellen zeigt sich außerdem eine Überexpression von *Plasmin Serpin Proteinase Inhibitor 9* (PI-9), das durch die spezifische Hemmung von Granzym B die Zelle vor Lyse durch eigene Granula schützt.⁷² Auf dem Weg zur immunologischen Synapse in den sekretorischen Lysosomen verhindert der saure pH-Wert in den Lysosomen die Aktivierung von Perforin.⁶⁹

1.3.2. Immunüberwachung durch NK-Zellen und Immunevasion durch Tumore

Das Konzept der Tumorüberwachung durch das Immunsystem wurde 1967 durch Burnet eingeführt. Demnach ist das Immunsystem in der Lage, Tumorzellen, die durch somatische Mutationen spontan entstehen, zu identifizieren und eliminieren.⁷³ NK-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung von Tumoren.⁷⁴ Es gibt zwei Mechanismen, mit denen Tumorzellen die Immunüberwachung durch NK-Zellen umgehen können:⁷⁵

- I) Inhibierende Signale, die die NK-Zelle in einen inaktiven Zustand versetzen.
- II) Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität.

Im Laufe der Tumorentwicklung kommt es zu genetischen Veränderungen, durch die maligne Zellen eine Apoptoseresistenz entwickeln und damit der NK-Zell Zytotoxizität entkommen können. Zu diesen genetischen Veränderungen gehört z.B. die Mutation verschiedener Caspasen.⁷⁶⁻⁷⁸ Außerdem kann es zur verminderten Expression von pro-apoptotischen und vermehrten Expression von anti-apoptotischen Proteinen kommen. So führt in der CLL ein Polymorphismus mit verringerter Expression des pro-apoptotischen *Bcl-2-associated X protein* (BAX) zu Progression und Therapieresistenz.⁷⁹ Die verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl2 in B-NHL führt zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit Rituximab.⁸⁰

Durch Mutationen in Todesrezeptoren können Tumorzellen der Aktivierung der extrinsischen Apoptose entgehen. Solche Mutationen finden sich beispielsweise in den TRAIL-Rezeptoren in metastasierten Brustkrebszellen.⁸¹ Eine Mutation von Fas oder FasL geht mit einer höheren Inzidenz von Lymphomen einher.⁸²

Perforin scheint hierbei als Bestandteil der NK-Zell-Granula, von besonderer Bedeutung für die Immunüberwachung zu sein. Im Mausmodell induziert eine Perforin-Defizienz die Entwicklung von Lymphomen, und auch Defekte des humanen Perforins scheinen die Entwicklung von Lymphomen und weiteren Tumorentitäten zu unterstützen.^{83,84} In PatientInnen mit Pankreas, Kolon- und Magenkarzinomen korreliert eine reduzierte Expression von Perforin in NK-Zellen mit der lymphatischen Metastasierung dieser Tumore.⁸⁵ Auf Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) konnte eine verringerte Bindungskapazität von Perforin festgestellt werden, wodurch diese vor der Granula-vermittelten Zytotoxizität geschützt sind.⁸⁶ Für die Funktion der Granula-vermittelten Zytotoxizität ist der Aufbau der immunologischen Synapse entscheidend. Absi et al konnten zeigen, dass Brustkrebszellen beim Angriff durch NK-Zellen das Aktinfilament (F-actin) in der Zellmembran an der immunologischen Synapse akkumulieren. Dadurch wurden geringere Konzentrationen von Granzym B in

den Brustkrebszellen erreicht als in Abwesenheit von F-actin.⁸⁷ Die in den Granula enthaltenen Granzyme werden auch zum Zielobjekt der Immunevasion von Tumoren. So hemmt beispielsweise Serpin B9 die Apoptoseinduktion durch Granzym B und wird in den verschiedensten Tumorentitäten vermehrt exprimiert.^{88,89}

1.3.3. Wirkung von anti-CD20-Antikörpern

Die Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber NK-Zellen wirken sich in besonderem Maße auch auf die Effektivität von Immuntherapien aus. Bei der Anwendung von monoklonalen Antikörpern wird unter anderem über ADCC die Lyse von Tumor-Zellen durch NK-Zellen induziert.⁹⁰ Durch die Bindung des Fc-Rezeptors (CD16) auf NK-Zellen wird deren zytotoxische Aktivität (1.3.1) induziert. CD16 ist als einziger Rezeptor der NK-Zelle in der Lage, ohne weitere aktivierende Signale die Aktivierung der NK-Zelle auszulösen.⁹¹ Daraufhin kann eine NK-Zelle mehrere Tumorzellen lysieren, ohne selbst apoptotisch zu werden. Eine signifikante Reduktion der Granula nach Kontakt mit Tumorzellen deutet daraufhin, dass hier vor allem die Granula-induzierte Zytotoxizität von Bedeutung ist.⁹² Monoklonale Antikörper sind außerdem in der Lage, die Tumordinfiltration durch NK-Zellen zu fördern.⁹¹ Es konnte nachgewiesen werden, dass die CLL-Therapie mit Rituximab im Wesentlichen von der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen abhängt.⁹³ Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Therapie der CLL beschäftigt sich diese Arbeit spezifisch mit den Resistenzmechanismen gegenüber NK-Zellen.

1.4. Zielsetzung

Die CLL ist bis heute eine unheilbare Erkrankung. Wann sie therapiebedürftig wird, entscheiden klinische Parameter.¹⁸ Obwohl eine Risikostratifizierung möglich ist, gibt es keine Therapie, die in frühen Stadien eingreift, um einen aggressiven Verlauf der Erkrankung abzuwenden.^{20,21,94,95} Um frühzeitig bei PatientInnen mit Progredienz der Erkrankung eingreifen zu können, ist es essenziell, die Mechanismen, die dem Progress der Erkrankung zu Grunde

liegen, besser zu verstehen. Märklin et al⁵⁸ entdeckten NFAT2 als Regulator der Anergie in der CLL. In PatientInnen mit aggressiverem Verlauf oder der Transformation zum RS ist NFAT2 geringer exprimiert als bei PatientInnen mit benignem Verlauf. Eine Deletion von NFAT2 im E μ -TCL1-Mausmodell hob den anergen Phänotyp auf und führte zu einer Akzeleration der Erkrankung. Wie die NFAT2-Deletion die Akzeleration der CLL induziert, ist noch nicht verstanden. Als mögliche Ursache kommt dafür eine durch die NFAT2-Deletion induzierte Immunevasion der CLL-Zellen infrage. Das Ziel dieser Arbeit war, den Zusammenhang zwischen NFAT2 und dem aggressiven Verlauf der CLL besser zu verstehen. Dafür fokussiert sich diese Arbeit auf den Aspekt der Immunüberwachung der CLL durch NK-Zellen. Für die Analysen wurde eine NFAT2-Deletion in eine humane CLL-Zelllinie eingebracht, um die von Märklin et al beschriebene aggressive CLL zu modellieren. Damit wurde der Einfluss auf die NK-Zell Aktivierung und Zytotoxizität gegenüber CLL-Zellen mit und ohne NFAT2-Deletion analysiert.

2. Material

2.1. Zelllinien

MEC-1 Zelllinie (ACC 497)	DSMZ, Hannover, Deutschland
HEK293T (ACC 635)	DSMZ, Hannover, Deutschland

2.2. Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'3')	Hersteller, Hauptsitz
NFAT2-Primer vorwärts (fw)	CCT GGA GAT CCC ACT CCT G	
NFAT2-Primer rückwärts (rv)	CGT ACC CGT GTG TTC TTC CT	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GAPDH-Primer fw	GGG TGT GAA CCA TGA GAA G	
GAPDH-Primer rv	GGC AGG GAT GAT GTT CTG G	

2.3. Vektoren

Bezeichnung	Zielsequenz (5'3')	Hersteller, Hauptsitz
pLV[Exp]-Puro- EFS>eSpCas9	-	
pLV[gRNA]-EGFP- U6>Scramble_gRNA1	GTG TAG TTC GAC CAT TCG TG	Vectorbuilder, Chicago, USA
pLV[gRNA]-EGFP- U6>{NFAT2_1all}	GGG TTG AGA TCC CGC CAT TT	
pLV[gRNA]-EGFP- U6>{NFAT2_2all}	CCA CCG AGC CCA CTA CGA GA	

2.4. Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
-------------	-----------------------

Brutschrank HERAcell	Heraeus, Hanau Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau Deutschland
-80°C Gefrierschränke	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Flüssigstickstofftanks	Cryotherm, Kirchen/Sieg, Deutschland
Durchlichtmikroskope, Axiovert25	Zeiss, Jena Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim Deutschland
Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer, Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Pipetten, Multikanalpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg Deutschland
PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences, Biebertal Deutschland
Wasserbad W22	Medingen, Arnsdorf Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo, Greifensee Schweiz
MACS Seperator Magnet	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Braunschweig Deutschland
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finland
Emax, ELISA-Reader	Molecular Devices, San Jose, CA, USA
Durchflusszytometer	BD Bioscience, Heidelberg Deutschland
- FACS Canto™ II	
- LSR Fortessa™	
IncuCyte S3	Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA

2.5. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung

Pipettenspitzen

Hersteller, Hauptsitz

VWR, Darmstadt Deutschland

Platten für FACS und IncuCyte	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well-Platten F-Bottom	
96-well-Platten U-Boden	
96-well-Platten V-Bottom	
96-well-Platten für ELISA	Corning Inc., Corning, NY, USA
Plattenversiegelungsfolie transparent	Greiner bio-one, Frickenhausen
79x135mm	Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Kryo-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
	Deutschland
FACS-Röhrchen	Corning Inc. Corning, New York USA
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen,
	Deutschland
Zellkulturflaschen 75cm ² (250 mL)	Corning Inc. Corning, New York USA
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96- well)	Corning Inc. Corning, New York USA

2.6. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung

Biocoll-Lösung

Phosphate Buffer Saline (PBS) 10x
IMDM Medium, GlutaMAX™

RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™

FCS (Fetales Kälberserum)

DMSO (Dimethylsulfoxid)

HEPES

Natriumazid (NaN₃)

Hersteller, Hauptsitz

Biochrom/Merck Millipore, Berlin,
Deutschland

Lonza, Verviers, Belgien
Gibco Invitrogen, Karlsruhe,
Deutschland

Gibco Invitrogen, Karlsruhe,
Deutschland

Biochrom/Merck Millipore, Berlin,
Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
BATDA	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Europium-Lösung	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
7-AAD (7-Aminoactinomycin)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Annexin V	
Incucyte® Caspase-3/7 Red Dye for Apoptosis	Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA
FACS-Clean, -Flow, -Rinse	BD, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Türks-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Poly-HRP 20 Streptavidin	Fitzgerald Industries International, North Acton, MA, USA
TMB Mikrowell Substrat	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbonat Bicarbonat Puffer Kapseln	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.7. Kits

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Fast Gene Scriptase II – Ready mix	Nippon, Düren, Deutschland
Plasmid purification Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
NK cell isolation kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.8. Rezepturen für Puffer und Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
MEC-1 Zellkulturmedium	IMDM + 10% FCS + 1% P/S
PBMC-Medium	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
Einfriermedium	70% RPMI + 20% FCS + 10% DMSO

Transfektionsmedium	DMEM + 10%FCS + 1%P/S
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS + 0,01% NaN ₃
ELISA Waschpuffer	PBS + 0,5% Tween 20
MgCl ₂ -EGTA	PBS + 1mM EGTA + 1mM MgCl ₂
Puffer A2	20mM HEPES + 2,5mM CaCl ₂ , 150mM NaCl mit NaOH und HCl auf pH 7,4 eingestellt und durch 0,22um steril filtriert
Puffer A3	BSA 1% + 20mM HEPES mit NaOH und HCl auf pH 7,4 eingestellt und durch 0,22um steril filtriert

2.9. Antikörper und rekombinante Proteine

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CD69-PE (Klon: FN50)	BD-Pharmigen, San Diego, CA, USA
CD107a-PE (Klon: H4A3)	BD-Pharmigen, San Diego, CA, USA
CD56-PECy7 (Klon: HCD56)	BD-Pharmigen, San Diego, CA, USA
CD3-APCFire (Klon: SK7)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Maus IgG (mIgG)	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Rekombinantes Perforin (ALX-200-604)	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Anti-Perforin-Antikörper (Klon: δG9)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Human IFN-γ monoclonal	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Anti-Human IFN-γ monoclonal Antibody Biotin Labeled	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.10. Software

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Endnote X9	EndNote, Philadelphia, PA, USA
FlowJo V10	FlowJo LLC, Ashland, OR, USA

Graph Pad Prism 8

GraphPad Software Inc., La Jolla, CA,
USA

Lightcycler® 480 Software

Roche, Basel, Schweiz

IncuCyte® Analysis Software

Sartorius, Göttingen, Deutschland

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Die MEC-1-Zellen wurden mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL in Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle zwei bis drei Tage und immer am Tag vor Verwendung in einem Experiment wurde das Medium erneuert und die Zelldichte eingestellt. Hierfür wurden die Zellen bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert, ausgezählt und in frischem Medium suspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet, hierbei erfolgte der Ausschluss toter Zellen durch Färbung mit Trypanblau.

3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden 10^7 Zellen in 1 mL Einfriermedium in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren und später im Flüssigstickstofftank gelagert. Das Einfrieren erfolgte bei kultivierten Zellen einen Tag nach Wechsel des Nährmediums und bei *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) direkt nach der Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation. Zum Auftauen wurden die Zellen circa 1 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und in 10 mL Zellkultur-Medium überführt, zweimal bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und jeweils in frischem Medium aufgenommen. Daraufhin konnten die Zellen für Experimente genutzt oder in der Zellkultur weiter kultiviert werden.

3.3. Isolation von PBMCs

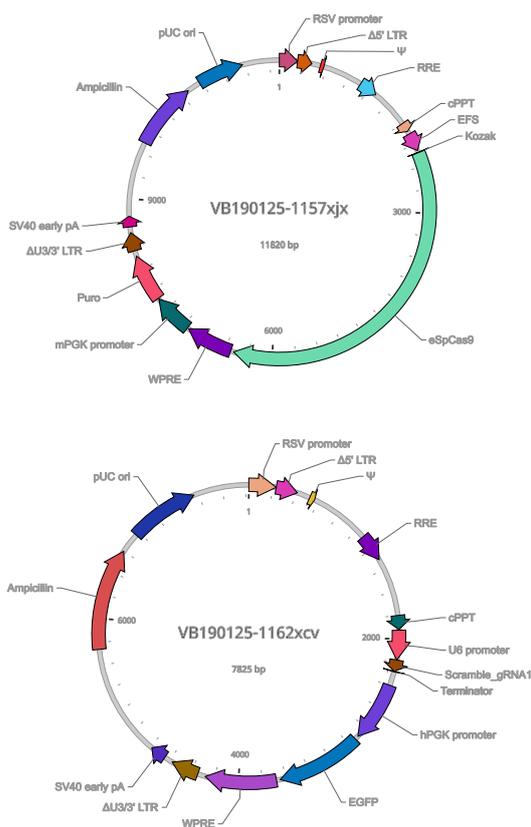
PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Leukaphereseprodukten der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen gewonnen (Ethik-Nummer: 13/2007V). Die verwendete Biocoll-Lösung enthält ein stark verzweigtes Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/mL. Lymphozyten und Monozyten befinden sich nach der Fraktionierung in der Interphase zwischen der Biocoll-Schicht und dem Plasma, welches die Thrombozyten enthält. Erythrozyten und Granulozyten hingegen sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden des Zentrifugenröhrchens.⁹⁶ Aus dem Leukaphereseprodukt wurde in einer Zellkulturflasche mit PBS eine Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von 140 mL hergestellt. Hiervon wurden 35 mL auf 15 mL Biocoll-Lösung langsam aufgeschichtet, sodass sich

die beiden Phasen nicht vermischten. Darauf folgte eine Zentrifugation für 18 min bei 2000 rpm ohne Bremse. Die Interphase wurde abgenommen und dreimal mit PBS auf 50 mL aufgefüllt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es folgte eine zusätzliche Zentrifugation mit PBS bei 800 rpm für 10 min zur Minimierung der Kontamination mit Thrombozyten. Danach wurden die Zellen gezählt und entweder mit 1×10^7 Zellen/Kryo-Röhrchen eingefroren oder in 30 mL PBMC-Medium mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/mL in Kultur genommen.

3.4. NFAT2 CRISPR/Cas9 Knock-out in MEC-1 Zelllinie

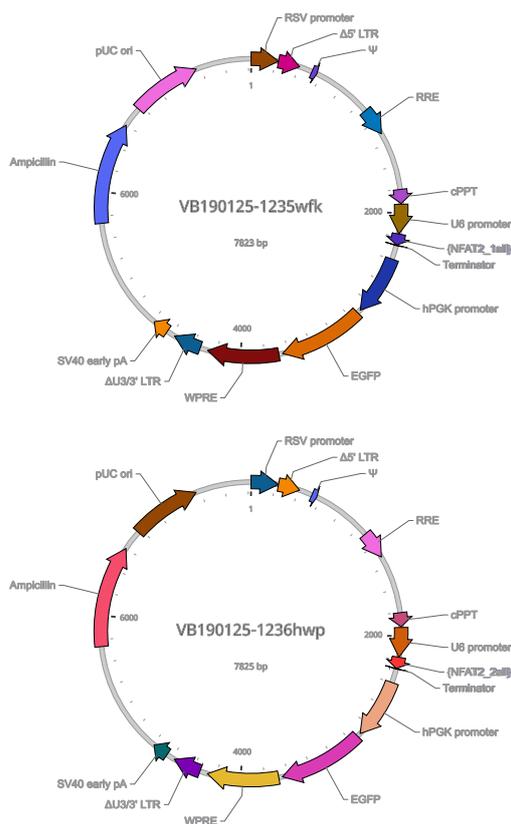
3.4.1. Vektorentwurf

Die Vektoren zur Induktion des CRISPR/Cas9-Knockouts wurden mit Hilfe von Vectorbuilder® gemäß der Vektorkarten in Abbildung 6 erstellt.



A) Der Cas-9-Vektor codiert die Caspase 9 (*eSpCas9*). Des weiteren enthält er eine Ampicillinresistenz (*Ampicillin*) zur kulturellen Anzucht des Vektors in Bakterien und eine Puromycinresistenz (*Puro*) zur Selektion der transduzierten Zellen in der Zellkultur.

B) Der SCR-Vektor codiert die irrelevante sgRNA (*Scramble_gRNA1*), ohne Zielsequenz auf dem menschlichen oder murinen Genom und ebenfalls eine Ampicillinresistenz (*Ampicillin*). Zusätzlich codiert er auch *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) zur besseren Selektion der Transfektanten.



C) Der NFAT2_1-Vektor codiert die sgRNA gerichtet gegen Exon 7 des NFAT2 Gens und ebenfalls eine Ampicillinresistenz (*Ampicillin*) und EGFP.

D) Der NFAT2_2-Vektor codiert die sgRNA gerichtet gegen Exon 3 des NFAT2 Gens und ebenfalls eine Ampicillinresistenz (*Ampicillin*) und EGFP.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren

Abbildungen übernommen von Vektorbuilder®

3.4.2. Plasmidamplifikation und - aufbereitung

Zur Amplifikation der Plasmide wurden diese in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien transfiziert. Hierfür wurden 40 µl kompetente Zellen mit 5 µl eines jeden Transferplasmids (SCR, CRISPR/Cas9, NFAT2_1, NFAT2_2) vorsichtig vermischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeschock-Transformation bei 42 °C für 45 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Die transformierten Zellen wurden auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C Kolonien gezüchtet. Einzelkolonien wurden anschließend gepickt, in LB-Medium aufgenommen und erneut bei für 8 h inkubiert. Diese Kultur wurde anschließend 1:500 verdünnt und erneut 12 h inkubiert. Die Bakterien wurden dann geerntet und die darin vervielfachten Plasmide wurden gemäß dem Herstellerprotokoll des Qiagen® Plasmid Mini Kit aufbereitet.

3.4.3. Transfektion

Human Embryonic Kidney 293T Zellen (HEK-Zellen) wurden mit den isolierten Plasmiden transfiziert. Hierfür wurden HEK-Zellen mit einer Dichte von $0,4 \times 10^6$ Zellen/mL in einer 6-well-Platte in 3 mL/well in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 5 mL DMEM ohne FCS und P/S für 1 h zugegeben. Die Transfektionslösung wurde nach Tabelle 5 hergestellt und für 20 min bei RT inkubiert. Hierbei wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt (Abbildung 7):

- 1) Im kombinierten Ansatz wurden die HEK-Zellen mit dem Cas9-Vektor und einem der sgRNA Vektoren (NFAT2_1, NFAT2_2 oder SCR) gemeinsam transfiziert.
- 2) Im separaten Ansatz wurde jedes Transferplasmid in separaten HEK-Zellen transfiziert.

A) Kombinierte Transfektion

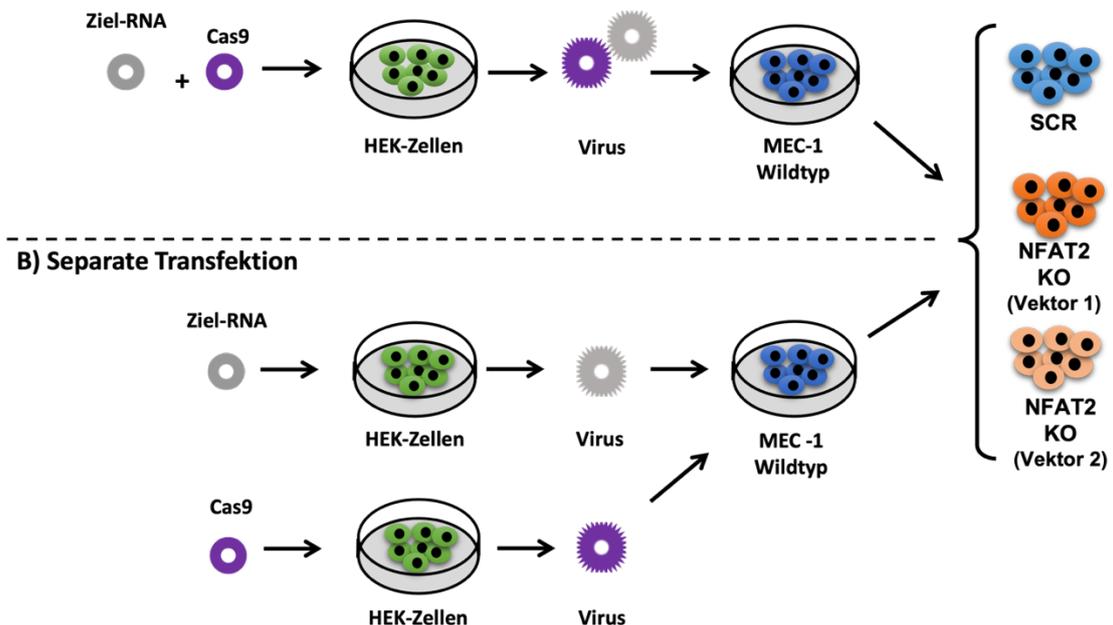


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfektionsansätze

Es wurden zwei verschiedene Transfektionsansätze verfolgt, die hier schematisch dargestellt sind. **A)** In der kombinierten Transfektion wurde das Cas9-Plasmid gemeinsam mit dem Plasmid der Zielsequenz in die HEK-Zellen transfiziert. Mit dem

Virusüberstand dieser HEK-Zellen wurden die MEC-1-Zellen transduziert. **B)** Im getrennten Ansatz wurden zwei HEK-Zell-Populationen mit jeweils dem Cas9- oder dem sgRNA-Plasmid transfiziert. Die MEC-1-Zellen wurden mit dem Überstand von beiden HEK-Zell-Populationen transduziert.

Die Transfektionslösung (Tabelle 5) wurde dann zur entsprechenden HEK-Zell-Population in der 6-well-Platte hinzugefügt und für 16 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgenommen, mit 2 mL je well Transfektionsmedium aufgefüllt und erneut für 24 h inkubiert. Zur Aufreinigung der Viren von zellulären Bestandteilen wurde der Überstand der HEK-Zellen mit 1 µL Polybren versetzt und durch einen 45 µm Filter filtriert. Das Filtrat wurde anschließend direkt für die Transduktion verwendet. Die Virusproduktion wurde durch erneute Zugabe von 2 mL Transfektionsmedium pro well zu den transfizierten HEK-Zellen wiederholt und die Aufreinigung und Transduktion am Folgetag erneut durchgeführt.

Tabelle 5: Transfektionslösungen

Separate Transfektion	Kombinierte Transfektion
3,5 µg Transferplasmid (SCR/NFAT2_1/NFAT2_2/CRISPR/Cas9)	1,75 µg Transferplasmid CRISPR/Cas9
	1,75 µg Transferplasmid (SCR/NFAT2_1/NFAT2_2)
2,3 µg deltaR8.9 (gag-pol-rev)	2,3 µg deltaR8.9 (gag-pol-rev)
1,2 µg VSV	1,2 µg VSV
Auf 450 µL Gesamtvolumen auffüllen mit Opti-MEM	
16 µl TransIT	16 µl TransIT

3.4.4. Transduktion

Für die Transduktion wurden MEC-1-Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL mit je 1 mL pro well in eine 6-well-Platte ausgesät. Die lentiviralen Überstände der HEK-Zellen wurden gemäß dem Schema in Abbildung 7 zu den MEC-1-Zellen hinzugegeben. Die Platte wurde dann für 90 min bei 700 g und 37 °C zentrifugiert und anschließend für 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach der

Inkubation folgte eine weitere Zentrifugation mit 1200 rpm für 5 min, damit Überstand ohne MEC-1-Zellen vorsichtig abgenommen und 2 mL frisches MEC-Zell-Medium hinzugegeben werden konnte. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert und die Transduktion am nächsten Tag wiederholt. Nach 72 h wurden die Transfektanten durch Zugabe von 2 mg/mL Puromycin selektiert. Anschließend fand eine Subklonierung der Transfektanten statt. Hierfür wurden Einzelzellen in MEC-Medium ausgesät und nach erfolgreicher Vermehrung wurde ihre NFAT-Expression in der qRT-PCR gemessen.

3.5. RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR

Zur Isolation der RNA wurden je 1×10^6 Zellen verwendet. Die Aufreinigung der zellulären RNA erfolgte mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche gemäß Herstellerprotokoll. Anschließend wurde die Konzentration und Qualität der RNA mit dem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt.

Mit der gewonnenen RNA wurde anschließend die cDNA-Synthese mit dem Fast gene Scriptase II Kit (Nippon Genetics) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die qRT-PCR wurde gemäß den Angaben in Tabelle 6 mit dem SYBR® Green FastMix (Quantabio) angesetzt und im Light-Cycler® 480 (Roche) mit dem Programm in Tabelle 7 analysiert.

Tabelle 6: Pipettierschema der qRT-PCR

cDNA-Ansatz		SYBR Green Ansatz	
cDNA (150 ng/well)	2 µl	PerfeCTa SYBR® Green FastMix	10 µl
RNAse freies H ₂ O	7 µl	Primer fw/rv	1 µl
Gesamtvolumen pro well	9 µl	Gesamtvolumen pro well	11 µl

Tabelle 7: PCR-Programm Lightcycler® 480

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Denaturierung	1	10 s	95 °C
Amplifikation	40	5 s	95 °C
		15 s	60 °C
Kühlung	1	30 s	40 °C

3.6. Zytotoxizitätsassay

Zur Analyse der NK-Zell-Zytotoxizität wurden BATDA-Europium basierte Zytotoxizitätsansätze verwendet. Die Zielzellen wurden mit BATDA (bis(acetoxymethyl)2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylate) inkubiert, welches durch die Zellmembran diffundiert und intrazellulär von der Acetylerase zu nicht permeablem TDA (2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid) hydrolysiert wird. Bei Lyse der Zielzelle, kann das TDA durch Zugabe von Europium (Eu^{3+}) ein fluoreszierendes Chelat (EuTDA) bilden. Die Fluoreszenz korreliert somit mit der Anzahl der lysierten Zellen und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Lyserate (\%)} = 100 \times \left[\frac{(\text{Wert}_{\text{probe}} - \text{Wert}_{\text{spontan}})}{(\text{Wert}_{\text{Maximal}} - \text{Wert}_{\text{spontan}})} \right]$$

Es wurden je 1×10^6 Transfektanten (SCR und NFAT2-KO) in 2 mL Medium suspendiert und mit je 4 μL BATDA für 30 min unter regelmäßigem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit zuvor erwärmtem PBMC-Medium bei 300 g für 7 min zentrifugiert, um überschüssiges BATDA zu entfernen. Die Zielzellen wurden mit oder ohne 1,25 $\mu\text{g/mL}$ Rituximab auf 5×10^4 Zellen/mL eingestellt und 5×10^3 Zellen pro well in 100 μL auf der Platte verteilt.

Als Effektorzellen wurden PBMCs von gesunden Spendern nach 3-5 Tage Kultivierung verwendet. Die Effektorzellen wurden gemäß dem angegebenen Effektor- zu Zielzell-Ratio (E:T-Ratio) in PBMC-Medium aufgenommen und in einem Volumen von 100 μL zu den Zielzellen pipettiert. Jede Kondition wurde als Triplikat angesetzt. Um den spontanen Zelltod und die maximale Lyse der Zielzellen zu bestimmen, wurden diese entweder unbehandelt oder mit Triton X-100 behandelt eingesetzt. Nach einer Zentrifugation bei 100 g für 2 min wurde der Ansatz 2 h im Brutschrank inkubiert. Vor der Ernte des Überstandes wurde die Platte bei 200 g für 5 min zentrifugiert und 20 μL des Überstands in eine neue 96-well-Platte überführt. Anschließend wurden 200 μL Europium-Lösung pro well zugegeben und im Multilabel Counter Victor 1420 gemessen.

3.7. Durchflusszytometrie

3.7.1. Bestimmung der Aktivierung und Degranulation von NK-Zellen

Zur Bestimmung der Aktivierung und Degranulation der NK-Zellen wurden diese mit den Zielzellen in den angegebenen E:T-Ratios mit oder ohne 10 µg/mL Rituximab für 4 h für Degranulations- bzw. 24 h für Aktivierungsmessung inkubiert und anschließend eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden zur Blockade der *fragment-crystallizable*-(Fc)-Rezeptoren auf der Zelloberfläche für 30-45 min in FACS-Puffer mit 10 µg/mL humanem Immunglobulin G (hIgG) bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift, bei dem mit 2000 rpm für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgeschüttelt wurde. Daraufhin wurden die Proben entsprechend Tabelle 8 in 50 µl FACS-Puffer für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert, daraufhin folgten 2 Waschschriffe mit FACS-Puffer. Zur Färbung toter Zellen wurde 7-Aminoactinomycin (7-AAD) (1:200) 15 min vor der Messung hinzugefügt. Die Messung erfolgte am FACS Canto™ II (BD Bioscience).

Tabelle 8: Panel für NK-Zell-Aktivierung und -Degranulation

1. Antikörper	Verdünnung
CD56-PECy7	1:50
CD3-APC-Fire	1:100
CD107a-PE oder CD69-PE	1:25

3.8. IFN-γ ELISA

Die Interferon-γ (IFN-γ) -Produktion der Effektorzellen wurde mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) aus den Überständen der Kokultur bestimmt. Der anti-IFN-γ-Antikörper (*capture*-Antikörper) wurde über Nacht bei 4 °C auf der Platte immobilisiert. Daraufhin wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer aufgefüllt und mit der Glaspipette abgesaugt. Es folgte eine Inkubation mit 200 µl 1% BSA-PBS pro well für 1 h bei RT. Danach wurden 50 µl der Standardkonzentrationsreihe bzw. der Kulturüberstände zugegeben und für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wurden 50 µl des sekundären Biotin-markierten

IFN- γ -Detektionsantikörper zugegeben und für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wurden durch fünfmaliges Waschen und Absaugen die nicht gebundenen Proteine entfernt. Anschließend wurde 100 μ l *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (Sav-HRP) mit hinzugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Es folgten weitere 6 Waschschrte und anschließend die Zugabe von 100 μ L des chromogenen Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) mit einer Inkubation für 15 min im Dunkeln bei RT. Daraufhin wurde die Farbreaktion mit 100 μ l H₃PO₄ gestoppt und im ELISA-Reader bei 450 nm detektiert.

3.9. Herstellung von NK-Zell-Lysaten

Um restliche Erythrozyten aus den PBMCs zu entfernen, wurde eine Lyse für 10 s in destilliertem Wasser durchgeführt. Die NK-Zellen wurden anschließend mittels magnetaktivierter Zellsortierung (MACS) gemäß des Herstellerprotokolls des *NK cell isolation Kits* isoliert. Die Reinheit der NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻) wurde wie in Tabelle 8 (ohne CD107a/CD69-Färbung) mittels Durchflusszytometrie bestimmt und nur bei einer Reinheit von mindestens 70% für die Herstellung von NK-Zell-Lysaten verwendet. Je 1x10⁷ NK-Zellen wurden in 200 μ l PBS mit 1 mM MgCl₂ und 1 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure) versetzt und anschließend dreimal in einem Bad aus 70%igem Ethanol und Trockeneis schockgefrostet und wieder aufgetaut. Die Lysate wurden dann bei 4 °C für 5 min bei 3600 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Proteinkonzentration im NanoDrop Spektrophotometer bestimmt und bei -80 °C gelagert. Zur Bildung der Lysatepools wurden Lysate von 8-9 Spendern zusammengeführt.

3.9.1. 7-AAD und Annexin-V Expression nach Lysatbehandlung

Zur Untersuchung der Membranpermeabilisation und Apoptoseinduktion durch NK-Zell-Lysate wurde nach der Behandlung mit diesen die 7-AAD- bzw. Annexin-V-Positivität der Transfektanten durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden 25.000 Transfektanten in 50 μ l A2-Puffer aufgenommen, mit 0,02 μ g/ μ l Lysat in 50 μ l A3-Puffer versetzt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 1,6 μ M 7-AAD gemäß dem Ansatz von Lopez et al.⁹⁷ oder Annexin V (1:50)

zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Blockade der Perforin-Effekte wurden die Lysate vor dem Experiment mit 100 µg/mL eines anti-Perforin-Antikörpers oder dem entsprechenden Isotyp für 15 min bei RT vorinkubiert.

3.9.2. Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität im IncuCyte

Es wurden 25.000 Zellen pro well in 50 µl A2 Puffer ausgesät und die erste Aufnahme zum Zeitpunkt 0 h mit dem IncuCyte durchgeführt. Anschließend wurde 0,12µg/µL Lysat oder Vehikelkontrolle und 0,5 µM *Caspase3/7 Red Dye* Reagenz pro well in 50 µL A3-Puffer zugegeben. Für circa 4 h wurde alle 30 min eine Aufnahme im IncuCyte durchgeführt und die Daten anschließend mithilfe der IncuCyte Software quantitativ ausgewertet.

3.10 Statistik

Alle kombinierten Daten wurden auf ihre Verteilung getestet (Shapiro-Wilk Test) und es wurden entsprechende statistische Tests angewandt (Students t-Test / Wilcoxon Test).

4. Ergebnisse

4.1. Generierung eines NFAT2-Knockouts in der MEC-1 Zelllinie

Um die Rolle von NFAT2 in CLL-Zellen zu untersuchen, wurde in der MEC-1-CLL-Zelllinie mithilfe eines lentiviralen *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9* (CRISPR/Cas9) Systems ein Knockout (KO) des NFAT2-Gens induziert. Hierbei wurde ein Transferplasmid, welches die CRISPR/Cas9 Sequenz trägt, zusammen mit je einem weiteren von drei verschiedenen Transferplasmiden, die verschiedene Zielsequenzen (SCR, NFAT2_1 und NFAT2_2) tragen, transfiziert. Um zu untersuchen, wie die beste Knockout-Effizienz erreicht werden kann, wurden zwei verschiedene sgRNAs für NFAT2 und ein separater bzw. kombinierter Transfektionsansatz miteinander verglichen (Abbildung 7). Der NFAT2-Knockout wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer qRT-PCR analysiert. Hier zeigte sich die Expression der NFAT2-mRNA in den NFAT2-KO Transfektanten als deutlich verringert im Vergleich zu SCR. Der separate Ansatz erwies sich als effizienter im Vergleich zum kombinierten Ansatz. Die separate Transfektion erzielte mit NFAT2_1 eine Reduktion der NFAT2 Expression um 97% und mit NFAT2_2 um 91%. Im kombinierten Ansatz war die Reduktion um 69% für NFAT2_1 und 84% für NFAT2_2 deutlich schwächer. (Abbildung 8)

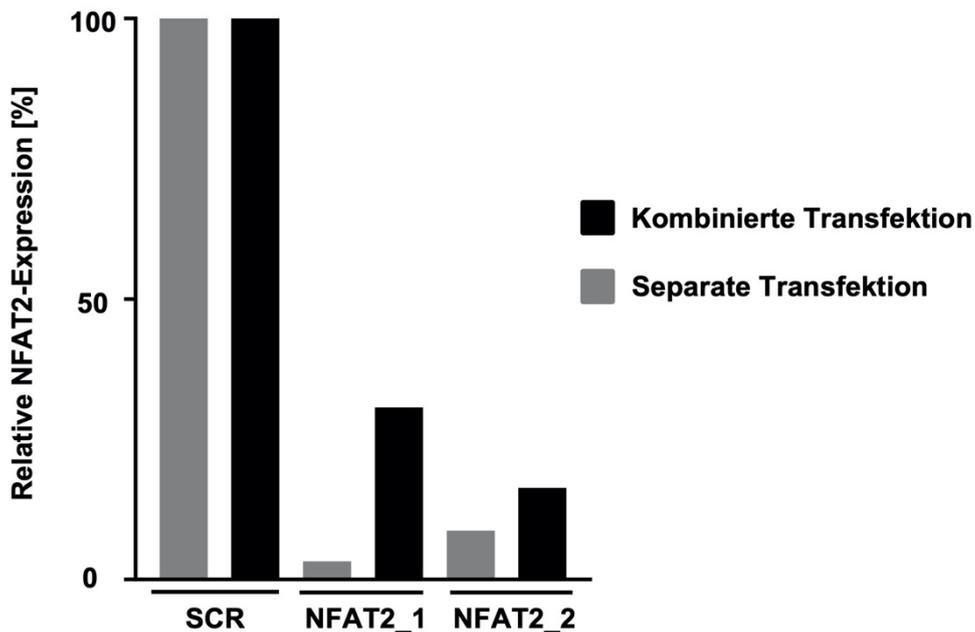


Abbildung 8: NFAT2-mRNA-Expression nach CRISPR/Cas9 Knockout

In transfizierten MEC-1-Zellen wurde die Expression von NFAT2-mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist das normalisierte Verhältnis der NFAT2-mRNA-Expression der NFAT2-KO Zelllinien bezogen auf den Referenztransfektanten SCR in kombiniertem bzw. separatem Transfektionsansatz.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Folgenden die MEC-1-Zellen aus dem separaten Ansatz subkloniert und die Subklone erneut auf die Expression von NFAT2-mRNA untersucht (Abbildung 9). Aus den Subklonen der SCR Transfektanten wurde der Klon #17 mit der höchsten NFAT2-mRNA Expression für die weiteren Experimente ausgewählt. Unter den NFAT2-KO Subklonen wurden drei Klone mit der niedrigsten NFAT2-Expression, zwei NFAT2_1 (#12 und #13) und ein NFAT2_2 (#10) Klon ausgewählt und asserviert. Der Klon NFAT2_1 #12 wurde für alle folgenden Experimente verwendet, da er die geringste NFAT2-mRNA Expression aufwies.

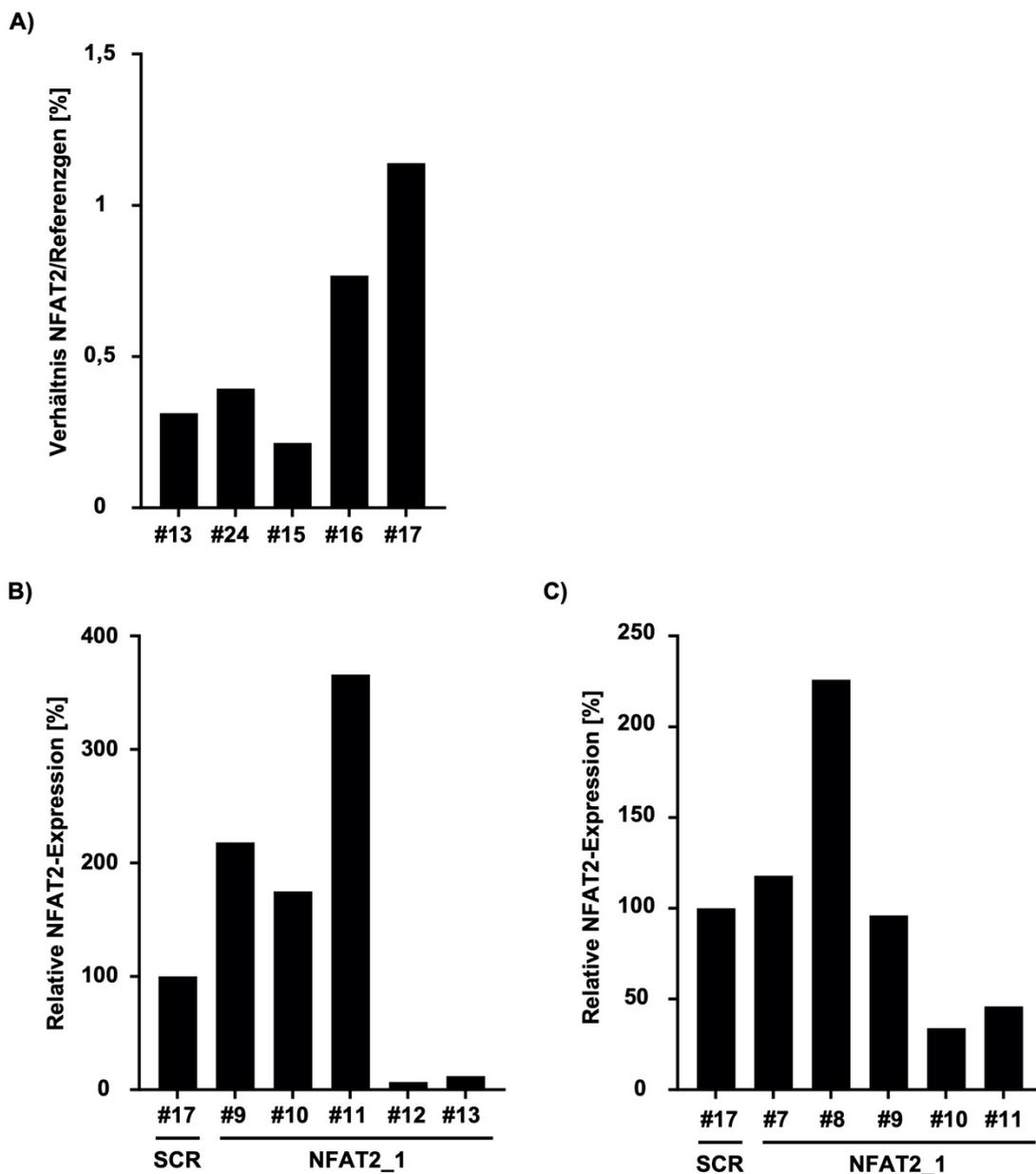


Abbildung 9: NFAT2-mRNA-Expression der MEC-1 Subklone

Aus den Transfektanten wurden Einzelzellklone hergestellt und anschließend deren NFAT2-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** Dargestellt ist die relative NFAT2-Expression der SCR Subklone (#13-17) normalisiert auf das Referenzgen GAPDH und **(B, C)** die NFAT2-Expression bezogen auf den Klon SCR#17 für Klone aus der Transfektion mit den sgRNAs NFAT2_1 (#9-13) **(B)** und NFAT2_2 (#7-11) **(C)**.

Die für die folgenden Experimente verwendeten Subklone NFAT2_1#12 und SCR#17 werden im Folgenden mit NFAT2-KO und SCR bezeichnet.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den ausgewählten Transfektanten um erfolgreich transfizierte Klone handelt, wurde die im Transferplasmid enthaltene EGFP-Sequenz durchflusszytometrisch über die Expression von GFP überprüft. Sowohl SCR als auch NFAT2-KO Transfektanten exprimieren zu 99,7% bzw. 99,8% EGFP, wohingegen Wildtyp (WT) MEC-1-Zellen kein EGFP exprimieren (Abbildung 10).

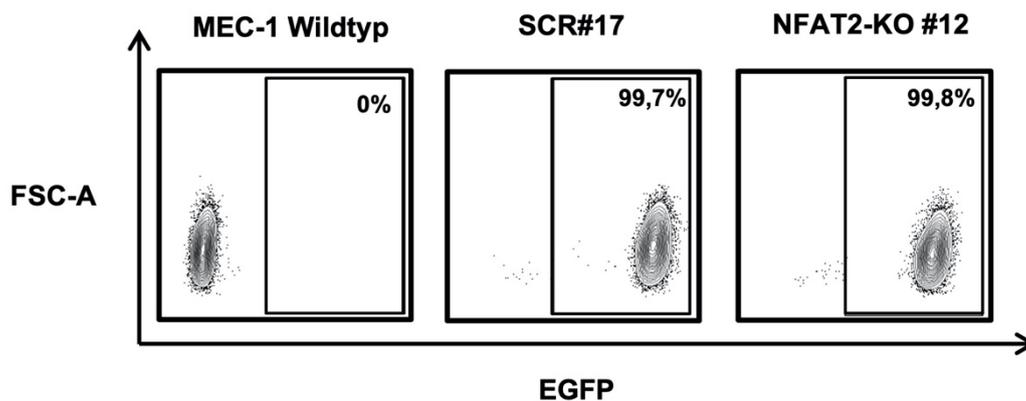


Abbildung 10: EGFP-Expression der MEC-1-Transfektanten

Transfektanten und WT MEC-1-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf deren EGFP-Expression analysiert. Dargestellt ist die EGFP-Expression der Transfektanten SCR und NFAT2-KO sowie der WT MEC-1-Zellen mit prozentualen Angaben der markierten Population.

4.2. Analyse der NK-Zell-Reaktivität gegenüber der MEC-1-Zelllinie

4.2.1. NK-Zell-Zytotoxizität

Die NK-Zell-abhängige Lyse von SCR und NFAT2-KO Transfektanten wurde mit Hilfe von Europium Zytotoxizitätsanalysen in verschiedenen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen (E:T) untersucht. Die SCR-Transfektanten wurden im Vergleich zu den NFAT2-KO-Transfektanten deutlich stärker lysiert. Die Behandlung mit Rituximab steigerte die Lyse beider Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, allerdings zeigten die NFAT2-KO Transfektanten immer noch eine deutliche Resistenz gegenüber der NK-Zell-vermittelten Lyse. (Abbildung 11A) Die kombinierten Daten aller Spender (n=17) zeigten bei Zugabe von Rituximab in jeder E:T-Ratio einen signifikanten Anstieg der Lyse verglichen mit den Proben ohne Behandlung. In der E:T-Ratio 20:1 war für NFAT2-KO die spezifische Lyse mit Rituximab signifikant geringer als für SCR, hier zeigte sich bei NFAT2-KO eine spezifische Lyse von durchschnittlich 48% gegenüber 59% bei SCR. Ohne Rituximab-Behandlung erreicht der Unterschied keine Signifikanz. Bei E:T 80:1 zeigte sich ebenfalls eine signifikant geringere spezifische Lyse der NFAT2-KO- (30%) gegenüber den SCR-Transfektanten (36%) in der Gruppe ohne Rituximab-Behandlung, mit Behandlung erreicht der Unterschied keine Signifikanz. (Abbildung 11B und C)

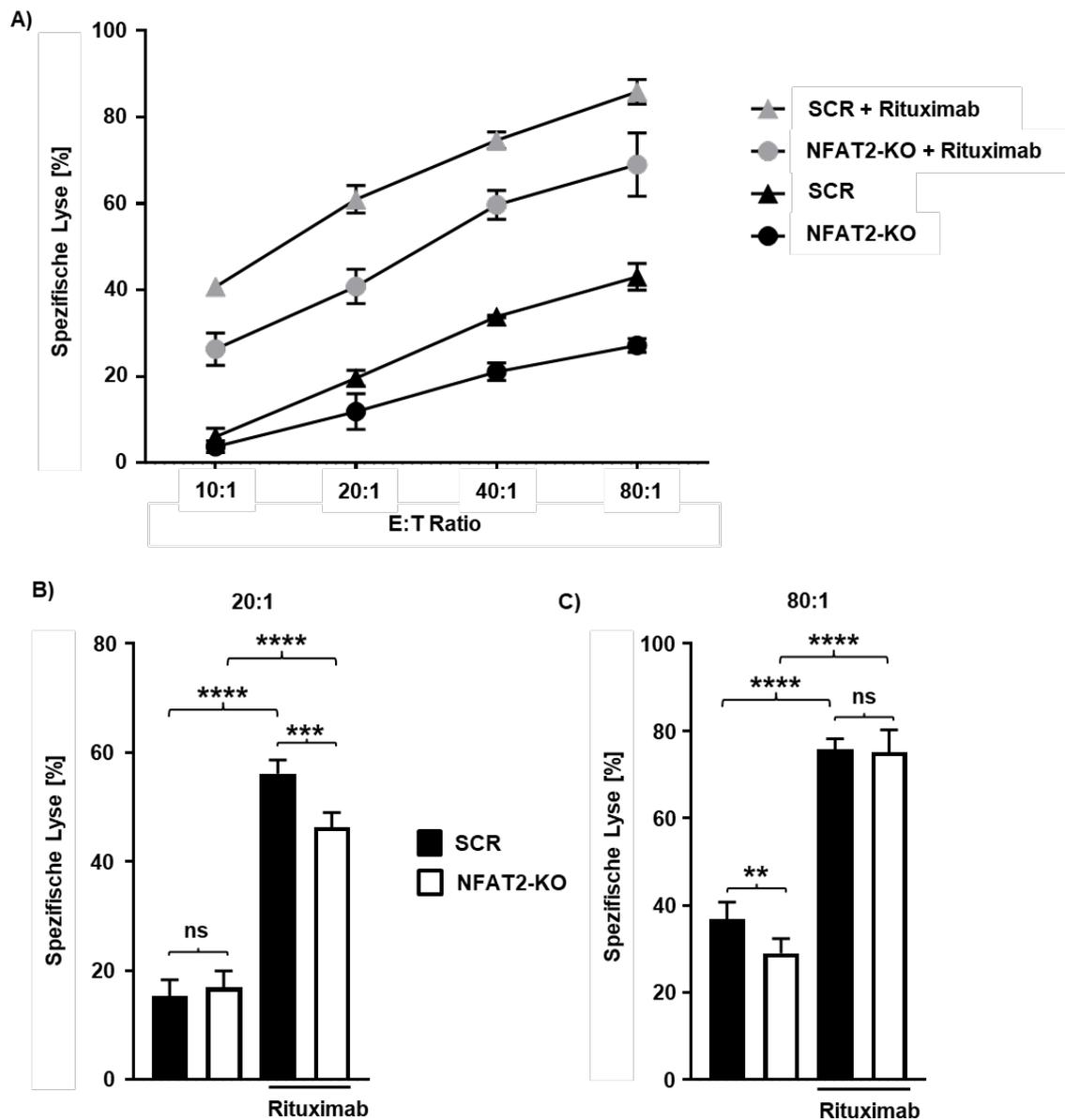


Abbildung 11: Genetischer Verlust von NFAT2 reduziert die NK-Zell-vermittelte Lyse der MEC-1 Zellen

Die NFAT2-KO- und SCR-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Rituximab (1,25 µg/mL) in den angegebenen E:T-Ratios mit PBMCs gesunder Spender inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Lyse durch NK-Zellen mittels 2 h Europium Zytotoxizitätsanalysen gemessen. **(A)** Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse und **(B, C)** kombinierte Daten mit PBMCs von 17 verschiedenen gesunden Spendern im E:T-Verhältnis 20:1 **(B)** und 80:1 **(C)** (ns = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$; **** = $p < 0,0001$).

4.2.2. Aktivierung der NK-Zellen

Um die Ursache für die geringere Lyse der NFAT2-KO-Zellen aufzuklären, wurde die Erkennung der NFAT2-KO- und SCR-Transfektanten durch NK-Zellen analysiert. Dabei wurden die Aktivierung (CD69) und die Degranulation (CD107a) der NK-Zellen in Kokultur mit den Transfektanten in An- oder Abwesenheit von Rituximab mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Expression von CD107a unterschied sich nicht signifikant zwischen NK-Zellen, die mit NFAT2-KO oder SCR kokultiviert wurden. Sie wurde signifikant durch die Behandlung der Kokultur mit Rituximab gesteigert, so stieg sie bei SCR um 26 Prozentpunkte und bei NFAT2-KO um 27 Prozentpunkte an. Ähnlich verhielt es sich mit der Expression des Aktivierungsmarkers CD69. Die Behandlung mit Rituximab steigerte signifikant dessen Expression auf NK-Zellen, wohingegen die Kokultivierung mit SCR oder NFAT2-KO keinen Einfluss auf die Expression von CD69 erbrachte. Auch in der Kontrollgruppe mit PBMCs allein ohne Transfektanten zeigt sich ein Anstieg der CD69- und CD107a-Expression auf den NK-Zellen bei Vorbehandlung mit Rituximab. (Abbildung 12)

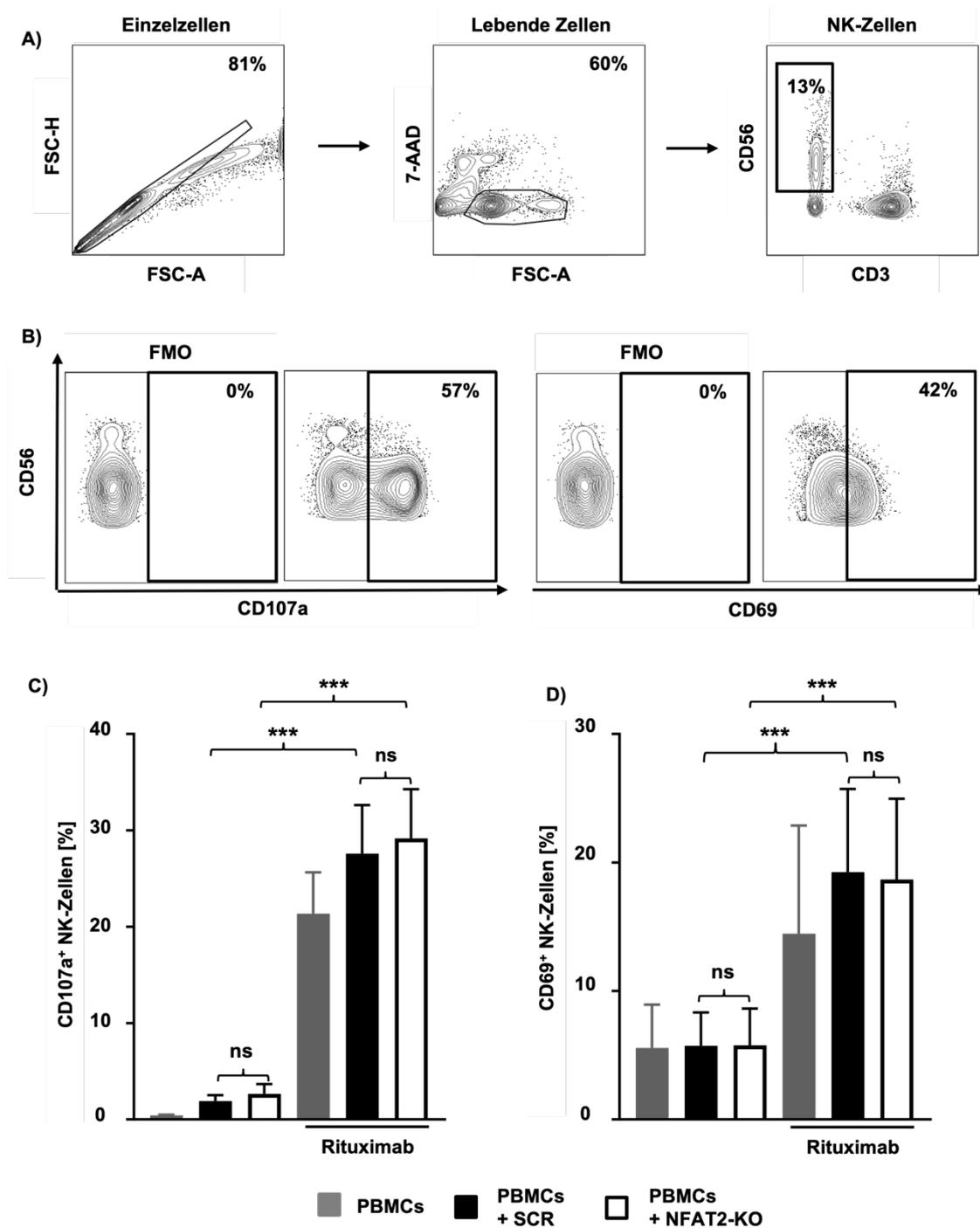


Abbildung 12: NK-Zell-Aktivierung bleibt durch NFAT2-Deletion unbeeinflusst

PBMCs von gesunden Spendern wurden in An- oder Abwesenheit von SCR- oder NFAT2-KO-Transfektanten (E:T 80:1) mit oder ohne Rituximab (10 µg/mL) kultiviert. Die Degranulation (CD107a) und die Aktivierung (CD69) der NK-Zellen wurden nach 4 h bzw. 24 h mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (A, B) Dargestellt ist die hierarchische Gatingstrategie von Einzelzellen, lebenden Zellen (7-AAD⁻) und NK-

Zellen ($CD3^-CD56^+$) (A) und die FMO-Kontrolle für CD107a und CD69 (B). (C, D) Gezeigt sind kombinierte Daten von 6 verschiedenen PBMC-Spendern hinsichtlich der CD107a- (C) bzw. CD69- Expression (D) auf NK-Zellen. (ns = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,005$; **** = $p < 0,0001$).

Ein weiterer Parameter zur Analyse der NK-Zell-Aktivierung ist die Sekretion von IFN- γ . Um diese zu analysieren, wurden die Überstände aus den Kokulturen nach 4 h und 24 h mittels IFN- γ -ELISA untersucht. Beim Vergleich der IFN- γ -Konzentrationen zwischen den Kokulturen mit NFAT2-KO- oder SCR-Zellen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied, weder ohne noch mit Rituximab-Behandlung. Allerdings lässt sich nach 4 h eine deutliche Steigerung der IFN- γ Sekretion durch Zugabe von Rituximab erkennen, welche sich nach 24 h an die Level ohne Rituximab angleichen. (Abbildung 13)

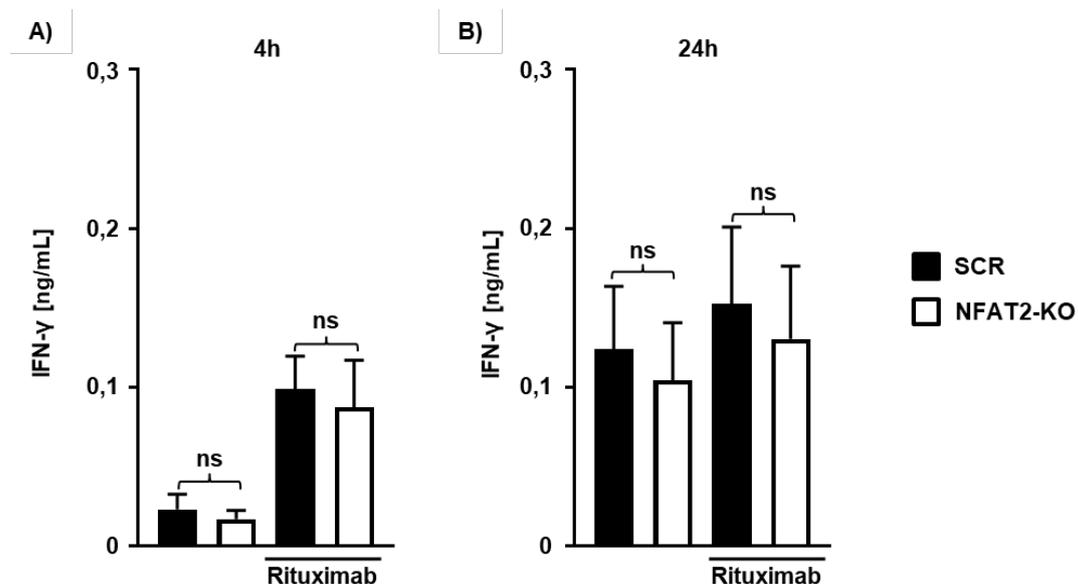


Abbildung 13: IFN- γ Sekretion durch PBMCs bleibt von NFAT2-Deletion unbeeinflusst

(A, B) PBMCs von gesunden Spendern wurden in An- oder Abwesenheit von SCR bzw. NFAT2-KO Transfektanten mit oder ohne Rituximab ($1,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) kultiviert. Die Sekretion von IFN- γ wurde nach 4 h (A) und 24 h (B) Kokultur mittels ELISA bestimmt. (ns = $p > 0,05$)

4.3. Analyse der NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber MEC-1-Transfektanten

Um die zytotoxischen Effekte der NK-Zellen in einem Effektorzell-unabhängigen Ansatz zu untersuchen, wurden im Folgenden Lysate der NK-Zellen verwendet (Herstellung im Material und Methoden Teil beschrieben). NK-Zell-Lysate enthalten große Mengen an Perforin und Granzymen, die bei Aktivierung der NK-Zellen ausgeschüttet werden, um die Zielzelle zu lysieren.

Die SCR und NFAT2-KO Transfektanten wurden nach Inkubation mit den Lysaten mit 7-AAD gefärbt. Die gemessene 7-AAD-Positivität der Transfektanten nach Lysatbehandlung dient als direktes Maß für die Membranpermeabilisierung. Ohne Lysate zeigen beide Transfektanten einen vergleichbaren Anteil an 7-AAD⁺ Zellen, wohingegen mit Lysatbehandlung der Anteil an 7-AAD⁺ Zellen von SCR um 40,8 Prozentpunkte höher lag als bei NFAT2-KO. (Abbildung 14)

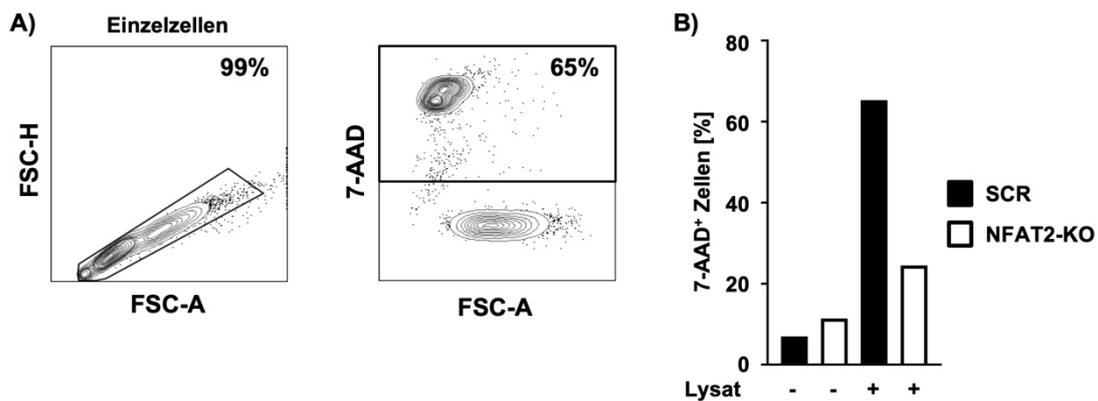


Abbildung 14: NFAT2-Deletion verringert die Membranpermeabilisierung durch NK-Zell-Lysate

SCR- und NFAT2-KO-Transfektanten wurden für 1 h bei 37 °C mit NK-Lysaten behandelt und mit 7-AAD gefärbt. **(A)** Dargestellt ist die exemplarische Gatingstrategie von Einzelzellen und 7-AAD⁺ Transfektanten mit prozentualen Angaben der markierten Population. **(B)** Zeigt den Anteil an 7-AAD⁺ SCR- und NFAT2-KO Zellen mit und ohne Lysatbehandlung.

Um zu analysieren, ob die Membranpermeabilisierung nach Behandlung mit den NK-Zell-Lysaten durch Perforin ausgelöst wird, wurden die Lysate mit einem blockierenden anti-Perforin-Antikörper vorbehandelt. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte keinen Unterschied in der

Membranpermeabilisierung zwischen SCR und NFAT2-KO bei vorheriger anti-Perforin-Behandlung der Lysate. Zudem lag der Anteil an 7-AAD⁺ Zellen gleich hoch, wie bei den unbehandelten Proben, sodass man hier eine Permeabilisation ausschließen kann. In den Isotypkontrollen für anti-Perforin mit einem mIgG2b Antikörper zeigte sich weiterhin eine signifikante Resistenz in NFAT2-KO Zellen. (Abbildung 15A)

Eine Behandlung mit humanem rekombinatem Perforin (rhPFN) lieferte vergleichbare Ergebnisse wie mit den NK-Zell-Lysaten (Abbildung 15B) und führte zu einem deutlich höheren Anteil an 7-AAD⁺ Zellen bei SCR (89%) als bei NFAT2-KO Transfektanten (60%) (Abbildung 15B).

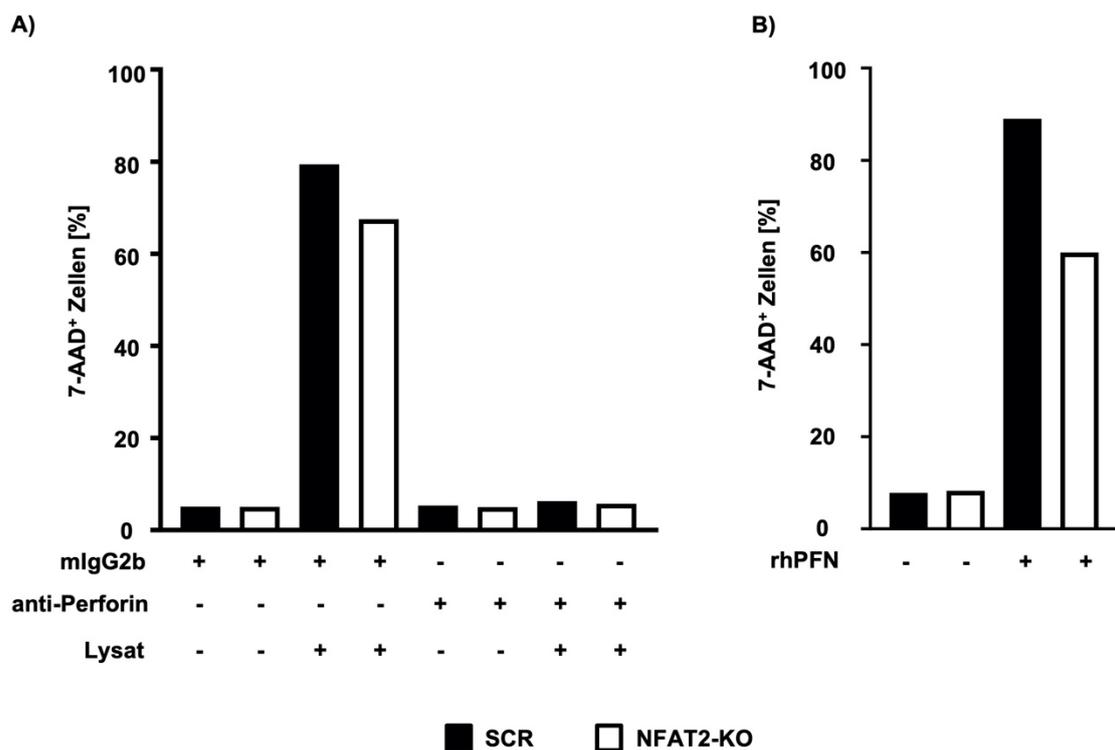


Abbildung 15: Perforin vermittelt die NK-Lysat-abhängige Membranpermeabilisierung

(A) NK-Zell-Lysate wurden nach Vorbehandlung mit einem anti-Perforin-Antikörper (100 µg/mL) zur Behandlung der SCR bzw. NFAT2-KO Transfektanten eingesetzt und die Membranpermeabilisierung mittels 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Alternativ wurden die Transfektanten in An- oder Abwesenheit von rekombinatem

Perforin (0,18 ng/μl) inkubiert und die Membranpermeabilisierung mittels 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt.

Neben der Membranpermeabilisierung der SCR- und NFAT2-KO-Zellen wurde deren Suszeptibilität für Apoptoseinduktion genauer untersucht. Hierfür wurden die MEC-1-Transfektanten mit Lysaten inkubiert und anschließend Annexin-V, als Marker der frühen Apoptose, durchflusszytometrisch bestimmt. Ohne Lysate zeigen beide Transfektanten einen vergleichbaren Anteil an Annexin-V⁺ Zellen, wohingegen der Anteil an Annexin-V⁺ Zellen nach Behandlung mit den Lysaten für SCR um 41,8 Prozentpunkte höher lag als bei NFAT2-KO. (Abbildung 16)

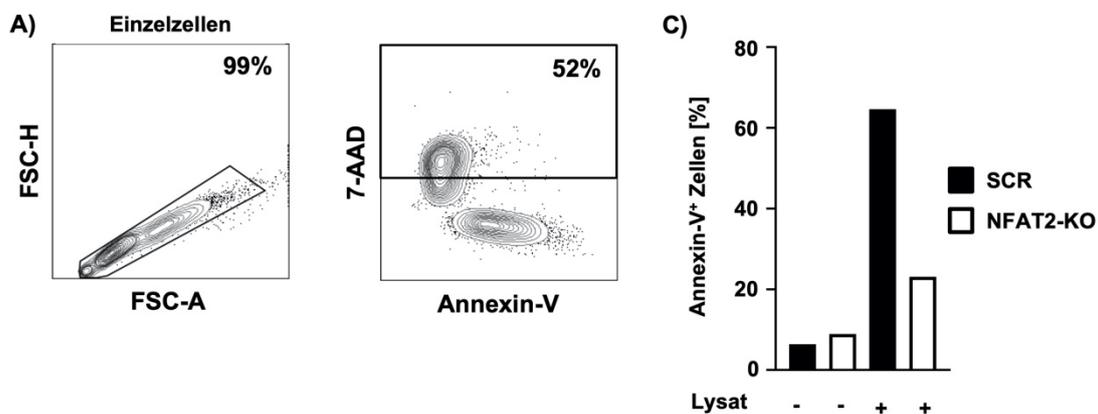
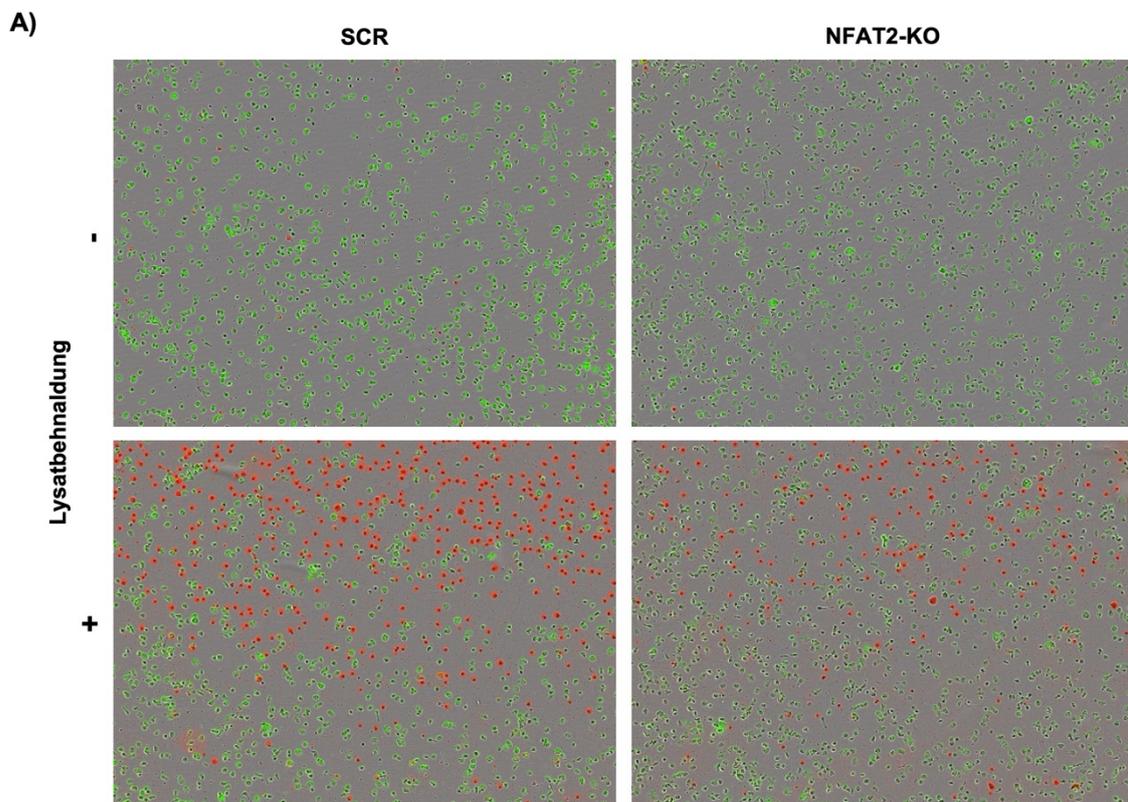


Abbildung 16: Suszeptibilität für Apoptoseinduktion wird durch NFAT2-Deletion reduziert

SCR und NFAT2-KO Transfektanten wurden für 1 h bei 37 °C mit Lysaten behandelt und mit Annexin-V markiert. (A) Dargestellt ist die exemplarische Gatingstrategie von Einzelzellen und Annexin-V⁺ Transfektanten mit prozentualen Angaben der markierten Population. (B) zeigt den Anteil an Annexin-V⁺ SCR und NFAT2-KO Zellen mit und ohne Behandlung von Lysaten.

Um die Apoptoseinduktion in SCR- und NFAT2-KO-Zellen durch NK-Zell-Lysate über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurde ein Verfahren zur Bestimmung lebender Zellen (IncuCyte®) genutzt. Die Aktivierung von Caspasen 3/7 wurde mit Hilfe eines roten Fluoreszenz-gekoppelten Caspasen 3/7 Reagenz dargestellt. Lebende Transfektanten können anhand der EGFP-Expression identifiziert werden. Exemplarische Aufnahmen nach circa 2 h zeigen deutlich

vermehrt rot fluoreszierende SCR- als NFAT2-KO-Zellen und kaum rote Fluoreszenz in den Kontrollen. (Abbildung 17A) Der Verlauf der Caspaseaktivität über die gesamte Messzeit zeigte einen deutlichen Anstieg des Caspase3/7 Signales in SCR-Zellen, das sein Maximum nach 2 h erreicht hatte. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich auch die größte Differenz in der Caspaseaktivität zwischen SCR- und NFAT2-KO-Transfektanten mit ca. 60% geringerer Caspase3/7 Positivität in SCR-Zellen. Die Kontrollen ohne Lysatbehandlung zeigten keine Aktivierung der Caspase. (Abbildung 17B)



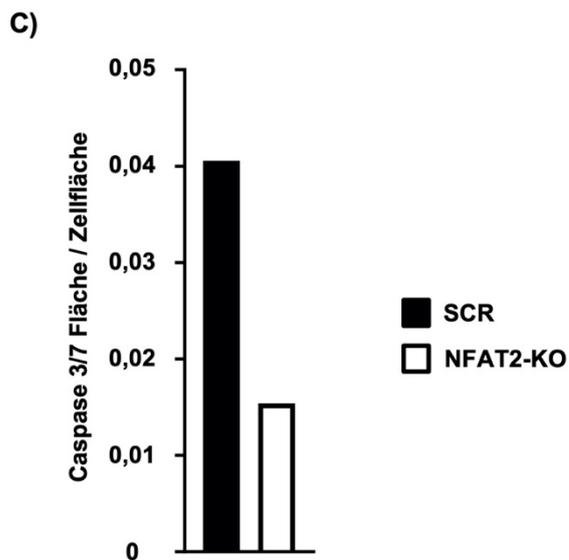
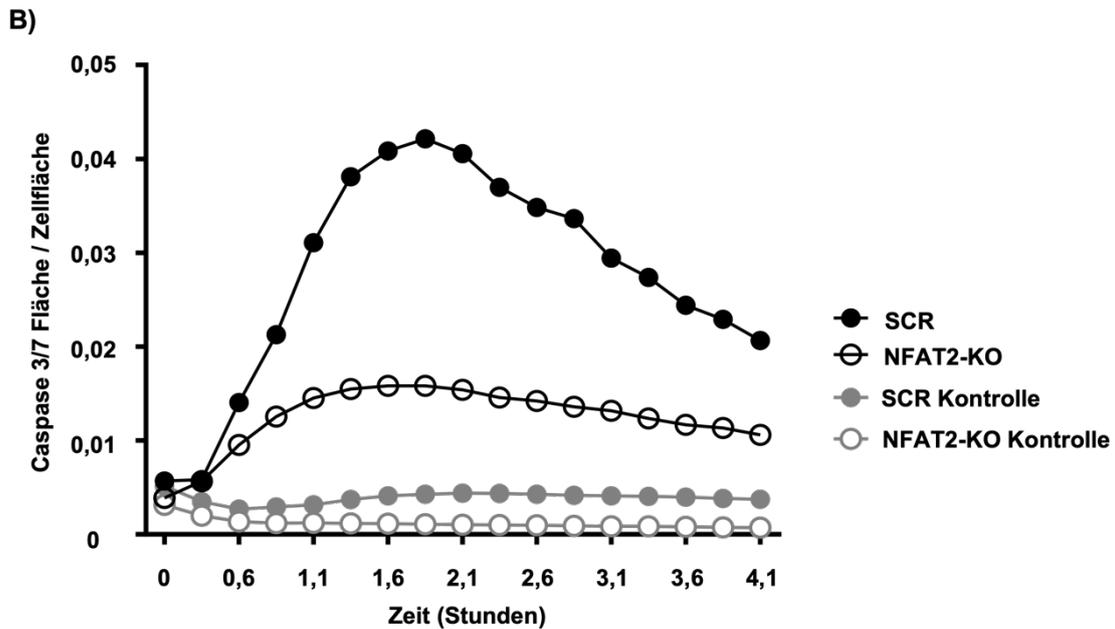


Abbildung 17: Caspase3/7 Aktivität nach Lysatbehandlung wird durch NFAT2-Deletion verringert

(A-C) SCR- und NFAT2-KO-Zellen wurden mit und ohne Lysatbehandlung (0,12 µg/µL) mit Caspase3/7 Reagenz (0,5 µM) markiert und über ca. 4 h im IncuCyte in 30 min Intervallen gemessen. Dargestellt sind exemplarische Bilder aus dem IncuCyte® der vier verschiedenen Bedingungen (A) sowie der Anteil der Caspase 3/7 positiven Fläche an der Gesamt-Zellfläche im Verlauf (B) und nach 2,1 h (C).

5. Diskussion

Die CLL ist die häufigste Leukämieform in Deutschland und bis heute medikamentös nicht heilbar.⁹⁸ Die Indikation zur Therapie wird an klinischen Parametern festgemacht. Trotz der Möglichkeit einer Risikostratifizierung der CLL²⁰ sind aggressive Verläufe durch eine frühzeitige Therapie bislang nicht abzuwenden.^{94,95} Zur Rolle von NFAT2 in der CLL war bislang wenig bekannt. NFAT2 zeigte sich in einer histopathologischen Untersuchung in der CLL überexprimiert und zum Teil in den Zellkern transloziert.⁵⁰ In verschiedenen aggressiven B-NHL liefert NFAT einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen.⁵¹ In Übereinstimmung damit konnte durch Hemmung von NFAT die metabolische Aktivität im DGBZL verringert werden.⁵² Märklin et al untersuchten die Rolle von NFAT2 in der CLL und erlangten damit neue Erkenntnisse sowohl über die Vorhersage des Krankheitsverlaufs als auch über NFAT2 als potenzielle Zielstruktur in der CLL-Therapie. Sie konnten zeigen, dass PatientInnen mit aggressiver CLL oder RS eine verringerte Expression von NFAT2 aufweisen. Im μ -TCL1-Mausmodell der Leukämie sorgte die B-Zell spezifische Deletion von NFAT2 für eine Akzeleration der CLL und eine Aufhebung des anergen Phänotyps. NFAT2 korreliert mit der Aggressivität der Erkrankung und konnte als relevanter Regulator der Anergie in der CLL identifiziert werden.⁵⁸

Hieran anknüpfend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich eine Deletion von NFAT2 in CLL-Zellen auf deren Immunevasion gegenüber NK-Zellen auswirkt. Hierfür wurde eine Zelllinie als Modell für die CLL herangezogen. Zelllinien haben den Vorteil, dass sie ein stabiles System für Untersuchungen bieten.⁹⁹ In dieser Arbeit wurde die MEC-1-Zelllinie verwendet, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit B-CLL stammt.¹⁰⁰ Die MEC-1 Zelllinie ist dem anergen Phänotyp der CLL ähnlich.⁵⁵ Nach Märklin et al würde die Induktion einer NFAT2-Deletion den anergen Phänotyp aufheben und einen aggressiven Phänotyp induzieren.⁵⁸ In dieser Arbeit wurde mit Hilfe dieses Modells der Zusammenhang zwischen NFAT2-Deletion und Immunüberwachung der CLL untersucht.

5.1. Generierung eines NFAT2-Knockouts in der MEC-1 Zelllinie

Der NFAT2-Knockout wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems induziert. Dieses wurde schon von Arruga et al in der MEC-1-Zelllinie erfolgreich eingesetzt, um die Auswirkungen eines Knockouts von NOTCH1 auf die CLL zu untersuchen.¹⁰¹

Für die Untersuchung des NFAT2-Knockouts wurden zwei Transfektionsansätze verglichen, wobei die separate Transfektion von Zielsequenz und Cas9 eine höhere Knockout-Effizienz erzielte mit einer stärkeren Reduktion der NFAT2-Expression. Für den Vektor NFAT2_1 reduziert sich die NFAT2-Expression mit dem separaten Ansatz um 28 Prozentpunkte im Vergleich zum kombinierten Ansatz. In der separaten Transfektion wurde je eine HEK-Zell-Population mit einem Plasmid transfiziert, somit entstand mehr Virus als in der kombinierten Transfektion. Das könnte die Ursache für die höhere Knockout-Effizienz im separaten Ansatz sein. Hsu et al zeigen, dass Konzentrationen von Cas9 und sgRNA zu einem effizienteren Knockout hin titriert werden können.¹⁰² Eine solche Titration für Cas9 und sgRNA als auch für deren lentivirale Vektoren könnte zeigen, mit welchen Konzentrationen die höchste Knockout-Effizienz in unserem Ansatz erzielt werden würde.

Die folgende Subklonierung der Transfektanten lieferte unterschiedliche Expressionslevel von NFAT2 in den NFAT2-KO Subklonen. Dabei schwankte die relative NFAT2-Expression bezogen auf den Klon SCR#17 von nahezu 0% bis über 300%. Diese Variabilität in der NFAT2-Expression kann durch eine unterschiedlich effiziente Transduktion in die einzelnen MEC-1-Zellen zustande kommen. Als Ursachen hierfür könnte eine unterschiedliche Cas9-Effizienz in verschiedenen Zellen infrage kommen. Dies unterstreicht die Relevanz der Subklonierung in diesem Ansatz. Trotz unterschiedlicher Knockout-Effizienzen konnte damit eine einheitliche Population von Transfektanten mit effizientem NFAT2-Knockout selektiert werden, die in den folgenden Experimenten zum Einsatz kam.

5.2. Analyse der NK-Zell-Reaktivität gegenüber der MEC-1 Zelllinie

5.2.1. NK-Zell-Zytotoxizität

Nach der erfolgreichen Generierung der SCR- und NFAT2-KO-Zelllinien wurden diese in Zytotoxizitätsassays eingesetzt. Es zeigte sich eine durch die NFAT2-Deletion induzierte Resistenz der MEC-1-Zellen gegenüber der Lyse durch NK-Zellen. Diese Resistenz bestand auch bei Induktion von NK-Zell-abhängiger ADCC durch Zugabe des anti-CD20-Antikörpers Rituximab.

Die Zytotoxizitätsanalysen unter Verwendung von PBMCs wurden über eine Inkubationszeit von 2 h durchgeführt und ermitteln dadurch vorrangig die Lyse der Zielzellen durch NK-Zellen.¹⁰³ Diese Methode zeigt eine starke Korrelation mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der NK-Zell-Zytotoxizität.¹⁰⁴

Unsere Analysen zeigen eine signifikant geringere Lyse der NFAT2-KO- gegenüber den SCR-Zellen bei E:T 20:1 mit Rituximab-Behandlung und E:T 80:1 ohne Behandlung. Bei E:T 80:1 mit Rituximab konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Grund dafür könnte sein, dass die Lysekapazität hier schon maximal ausgeschöpft ist und sich somit eine Resistenz nicht mehr messen lässt. Ein ähnliches Phänomen könnte den fehlenden signifikanten Unterschied bei der E:T 20:1 ohne Rituximab erklären. Hier könnte durch die geringe Lysekapazität bei wenigen PBMCs und ohne Behandlung ein Unterschied nicht gut messbar sein. Diese Effekte würden möglicherweise bei Verwendung von isolierten NK-Zellen vermieden werden können. Die Zugabe von Rituximab steigerte in allen Ansätzen signifikant die Lyse der Transfektanten. Dies war erwartet und stimmt mit den Ergebnissen von Veuillen et al überein, die zeigten, dass die spezifische Lyse sich durch den Einsatz von Rituximab signifikant steigern lässt. Veuillen et al konnten außerdem zeigen, dass CLL- im Vergleich zu AML-Zellen eine Resistenz gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse aufweisen.¹⁰⁵

Unsere NFAT2-KO- zeigen verglichen mit SCR-Transfektanten eine deutlich geringere Suszeptibilität gegenüber der Lyse durch NK-Zellen. Diese hat auch bei Einsatz des monoklonalen Antikörpers Rituximab weiterhin Bestand. Diese Ergebnisse deuten auf die Relevanz dieses neu entdeckten

Resistenzmechanismus in der Immuntherapie der CLL hin. Ob sich das aggressivere Verhalten der NFAT2-KO-Transfektanten auch in vivo bestätigt, wird aktuell im Mausmodell untersucht.

5.2.2. Aktivierung der NK-Zellen

Als Ursache für die geringere Lyse von NFAT2-KO Zellen wäre eine geringere NK-Zell-Aktivierung durch NFAT2-KO- als durch SCR-Transfektanten eine mögliche Erklärung. Dies wurde in Kokulturen von MEC-1-Transfektanten mit PBMCs untersucht. Hier zeigte sich kein Unterschied in der CD69- und CD107a-Expression sowie IFN- γ -Produktion der NK-Zellen zwischen Kokultivierung mit NFAT2-KO- oder SCR-Zellen. Die Aktivierung der NK-Zellen wurde mit Hilfe der Expression von CD69 bestimmt. Kein Unterschied in der CD69-Expression deutet darauf hin, dass NFAT2-KO Zellen durch NK-Zellen nicht weniger oder schlechter erkannt werden. Damit übereinstimmend unterscheidet sich auch die Expression des Degranulationsmarkers CD107a nicht. Wie Fischer et al konnten wir eine signifikante Steigerung der CD107a-Expression bei Zugabe von Rituximab messen.¹⁰⁶ Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen unserer Zytotoxizitätsanalysen, wo die Zugabe von Rituximab die Lyse der Transfektanten signifikant steigerte. Da Rituximab auch an das CD20 gesunder B-Zellen bindet, werden auch in der Kontrollgruppe NK-Zellen aktiviert, was erklärt, warum die Expression von CD69 und CD107a auch ohne das Vorliegen von Transfektanten anstieg.

Die Ausschüttung von IFN- γ bleibt von der NFAT2-Deletion ebenso unbeeinflusst. Bei Zugabe von Rituximab zeigt sich eine verstärkte IFN- γ -Ausschüttung. Dies zeigt sich nach 4 h, nicht aber nach 24 h Inkubation. NK-Zellen sind die Hauptquelle für IFN- γ des angeborenen Immunsystems.¹⁰⁷ Die Ausschüttung von IFN- γ durch NK-Zellen wird sowohl durch aktivierende Rezeptoren als auch durch Zytokine wie IL-12 induziert.¹⁰⁸ Durch die Ausschüttung von IFN- γ wird die Tumorerkennung gefördert und weitere Immunzellen aktiviert.¹⁰⁹ Die konstitutiv aktive IFN- γ -Transkription erlaubt den NK-Zellen eine schnelle Bereitstellung des Zytokins.¹¹⁰ Das erklärt den frühen Anstieg der IFN- γ nach Aktivierung der NK-Zellen durch Rituximab. Ein Abfall der

IFN- γ Konzentration zum späteren Messzeitpunkt (24 h) könnte darauf hindeuten, dass die Halbwertszeit von IFN- γ bereits überschritten war.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Erkennung der CLL-Zellen durch NK-Zellen nicht durch die NFAT2-Deletion beeinträchtigt wird. Damit bleibt die Immunogenität der CLL-Zellen von NFAT2 unbeeinflusst. Die Resistenz gegenüber NK-Zell-Lyse kommt damit erst nach Aktivierung und Degranulation der NK-Zelle zum Tragen. Eine durch NFAT2 induzierte Resistenz gegenüber der NK-Zell-Zytotoxizität ist also wahrscheinlich, dies wurde im Folgenden untersucht.⁷⁵

5.3. Analyse der NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber MEC-1-Transfektanten

Um eine mögliche Resistenzbildung der Transfektanten gegenüber Lyse unabhängig vom zellulären Kontext zu untersuchen, wurden aus isolierten NK-Zellen Proteinlysate generiert, die aufgrund des hohen Anteiles an zytotoxischen Granula große Mengen an Perforin und Granzymen enthalten.¹¹¹ Mit diesen Lysaten wurden anschließend die Transfektanten behandelt.

5.3.1. Perforin-induzierte Membranpermeabilisierung

Im ersten Schritt wurde der Einfluss von Perforin in den Lysaten auf die Membranpermeabilisation der Transfektanten analysiert. Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen, dass die NFAT2-Deletion in CLL-Zellen eine Resistenz induziert. Die mit 7-AAD bestimmte Membranpermeabilisierung durch die Lysate ist in NFAT2-KO Zellen um 40,8 Prozentpunkte und damit deutlich geringer als in SCR Transfektanten. Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass durch die Zugabe eines anti-Perforin-Antikörpers die Aufnahme von 7-AAD⁺ in die Zelle verhindert wird und damit vermutlich die zugrunde liegende Porenbildung durch Perforin in der Zielzell-Membran. Es zeigte sich keine Zunahme der 7-AAD⁺ Zellen im Vergleich zu unbehandelten Proben, zudem auch keine Unterschiede zwischen SCR und NFAT2-KO Transfektanten. Daraus lässt sich schließen, dass die hier beobachtete Resistenz gegenüber der Membranpermeabilisierung über

eine Resistenz der NFAT2-KO-Transfektanten gegenüber Perforin vermittelt wird.

Lehmann et al beschreiben ein ähnliches Phänomen, bei dem eine eingeschränkte Bindung von Perforin an die Oberfläche von Zellen der chronischen und akuten myeloischen Leukämie (CML, AML) für deren Resistenz gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität verantwortlich ist.⁸⁶ Eine mögliche Erklärung für die verminderte Porenbildung in NFAT2-defizienten CLL-Zellen könnte ein Einfluss von NFAT2 auf die Struktur der Zellmembran sein. Li et al konnten zeigen, dass sich beim Aufbau der immunologischen Synapse die Lipidmembran der NK-Zellen verdichtet und diese so vor Perforin schützt.¹¹² Es ist ebenfalls bekannt, dass die Veränderung der Membranstruktur und des Aktinskelettes eine Brustkrebszelllinie vor NK-Zell-vermittelter Lyse schützt.⁸⁷ Auch zytotoxische T-Zellen müssen sich vor ihren eigenen Granula schützen. Rudd-Schmidt et al konnten zeigen, dass eine hohe Lipiddichte in der Plasmamembran die Bindung von Perforin verhindert und Phosphatidylserin durch seine negative Ladung membrangebundenes Perforin inaktiviert.¹¹³ Bei der Degranulation werden auch CD107a und Cathepsin B an der Zellmembran exponiert, wodurch Perforin daran gehindert wird, an die Effektorzelle zu binden, beziehungsweise proteolytisch inaktiviert wird.^{71,114} Ähnliche Mechanismen könnten sich auch Tumorzellen zunutze machen, um sich vor NK-Zell-Zytotoxizität zu schützen. Für CLL-Zellen ist bekannt, dass sie Aktinfilamente an der immunologischen Synapse polarisieren, um der NK-Zell-Zytotoxizität zu entkommen. Die gezielte Hemmung dieses Aktinumbaus mit einem CDC42-Inhibitor konnte die Suszeptibilität der CLL-Zellen gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität wiederherstellen.¹¹⁵ Die von Wurzer et al verwendeten CDC42-Inhibitoren könnten in zukünftigen Versuchen zur Behandlung der NFAT2-KO Transfektanten verwendet werden, um zu untersuchen, ob Aktinfilamente an der NFAT2 vermittelten NK-Zell-Resistenz beteiligt sind.

5.3.2. Granula-induzierte Apoptose

Auch eine Resistenz gegenüber der Apoptose ist ein bekannter Mechanismus von Tumorzellen, um sich der Immunüberwachung von NK-Zellen zu entziehen.⁷⁵ Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen eine geringere Aktivierung der Apoptose in NFAT2-KO- verglichen mit SCR-Transfektanten. Dies wurde mit dem Marker Annexin-V in der Durchflusszytometrie und auch durch Untersuchung von Caspase 3/7 Aktivität mit Hilfe des IncuCyte ermittelt.

Die Apoptoseresistenz als Immunevasionsmechanismus kann verschiedene Ursachen haben. Tumorzellen durchlaufen eine Vielzahl von genetischen Veränderungen, die einen Überlebensvorteil bieten, unter anderem Resistenz gegenüber Apoptose.¹¹⁶ Für Caspase 3 und 7 sind Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben, die zur Tumorentwicklung beitragen könnten.^{76,117} Neben Mutationen kann auch eine vermehrte oder verringerte Expression von anti- beziehungsweise pro-apoptotischen Molekülen die Apoptoseinduktion in Tumorzellen verhindern.⁷⁵ Die erhöhte Expression der anti-apoptotischen Proteine der Bcl2-Familie ist mit der Resistenz von B-NHL gegenüber ADCC-basierten Therapien assoziiert.⁸⁰ Es wäre interessant, diese Mechanismen der Apoptoseresistenz bei den CLL-Transfektanten zu untersuchen. Die geringere Apoptoseinduktion in NFAT2-KO-Transfektanten könnte auch auf eine geringere Anzahl an Perforinporen zurückzuführen sein, wodurch auch weniger Granzyme in die Zielzelle gelangen. Somit würde indirekt über eine Perforinresistenz auch eine Apoptoseresistenz durch den NFAT2-KO induziert werden.

5.4. Ausblick

5.4.1. NFAT2 zur Risikostratifizierung der CLL

Nach aktuellem Forschungsstand korrelieren in der CLL hohe NFAT2-Level mit einer guten Prognose und meist anergen BZR, wohingegen niedrige NFAT2-Level auf aggressive Verläufe mit hochreaktiven BZR und starker Ca²⁺-Mobilisation hinweisen. Eine niedrige Expression von NFAT2 deutet nicht nur auf aggressive Verläufe hin, sondern zeigt sich auch beim RS.^{58,118} Somit könnte die Etablierung von NFAT2 als Marker zur Risikostratifizierung der CLL eine neue

Möglichkeit bieten, aggressive Verläufe und deren Transformation zu hochaggressiven Lymphomen (RS) frühzeitig zu erkennen und mit NFAT2 als Zielstruktur auch therapeutisch anzugehen. Vorangegangene Analysen zeigen, dass hierfür die Bestimmung der mRNA-Expression von NFAT2 mittels qRT-PCR geeignet wäre.⁵⁸ Da eine niedrige NFAT2-Expression mit einem hochreaktiven BZR korreliert, könnte statt der Bestimmung der NFAT2 mRNA auch die BZR-Reaktivität zur Risikostratifizierung genutzt werden, wofür sich die von Heitmann et al etablierte durchflusszytometrische Ca²⁺-Flussmessung eignen würde.¹¹⁸ Bereits etablierte Marker wie CD38, ZAP70 und IGHV-Mutation oder chromosomale Aberrationen¹¹⁹ werden nicht durch das Fortschreiten der Erkrankung oder therapeutische Interventionen beeinflusst. Für NFAT2 ist dies noch nicht vollständig erforscht, eigene Beobachtungen deuten aber darauf hin, dass sich NFAT2 als Marker dynamisch verhält. Das würde die Möglichkeit eröffnen, auf eine Veränderung des Markers zu reagieren und frühzeitig eine Therapie zu beginnen. Des weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob NFAT2 die Expression von neuen Risikomarkern der CLL wie 4-BBL¹²⁰ und Endoglin (CD105)¹²¹ reguliert, die beide mit kürzerer Überlebenszeit korrelieren. Um NFAT2 als Marker zur Risikostratifizierung einführen zu können, sind Analysen notwendig, die einen zuverlässigen Grenzwert zur Aufteilung in hohe und niedrige NFAT2-Expression ermitteln.

5.4.2. NFAT2 als therapeutische Zielstruktur

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, beeinflusst die Deletion von NFAT2 das Überleben von CLL-Zellen. Damit liegt es nahe, NFAT2 als Zielstruktur für neue Therapieoptionen in der CLL zu berücksichtigen.⁴⁹ Die Inhibition von NFAT als therapeutische Methode scheint den hier vorliegenden Ergebnissen zu widersprechen. Diese Arbeit sowie die frühere Arbeit von Märklin et al⁵⁸ zeigen, dass die Deletion von NFAT2 einen aggressiveren Verlauf der CLL und eine Resistenz gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität induziert. Demnach könnte man annehmen, dass auch eine Inhibition von NFAT einen aggressiven Verlauf begünstigt und eine Induktion von NFAT2 eine mögliche Therapieoption darstellt.

Apollonio et al konnten zeigen, dass die Inhibition von NFAT mit VIVIT zwar den anergen Zustand der CLL-Zellen aufhebt, aber ebenso deren Apoptose induziert.⁵⁶ Die Ursachen für die scheinbare Diskrepanz unserer Ergebnisse bleibt aktuell unklar und erfordert weiterführende Arbeiten.

Eine genauere Analyse der durch die NFAT2-Deletion induzierten Resistenzmechanismen könnte weitere Zielstrukturen für neue CLL-Therapeutika aufdecken. Diese Analyse könnte über die Untersuchung in der CLL auf bekannte Resistenzmechanismen anderer Entitäten erfolgen. Diese müssten anschließend auf einen Zusammenhang mit der NFAT2-Deletion untersucht werden. Eine alternative Herangehensweise wäre die Analyse von RNA-Sequenzierungsdaten der Transfektanten. Die durch den NFAT2-KO veränderte Genexpression müsste dann auf einen möglichen Zusammenhang mit Resistenzmechanismen gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität überprüft werden. Am zielführendsten wäre wahrscheinlich ein kombiniertes Vorgehen, bei dem die RNA-Sequenzierungsdaten der NFAT2-KO-Transfektanten auf veränderte Genexpression von potenziell in Resistenzmechanismen involvierten Genen untersucht werden. Liefern diese Ansätze Erkenntnisse, könnten die am Resistenzmechanismus beteiligten Strukturen als spezifische Zielstrukturen für neue Therapien dienen. Über diese kann man zu diesem Zeitpunkt aber nur spekulieren.

Zusammenfassend ist also momentan unklar, inwiefern eine Modulation des NFAT2-Signalweges als neue Therapieoptionen für die CLL etabliert werden könnte, und weiterführende Arbeiten sind erforderlich, um diese Frage zu klären.

5.4.2.1. Inhibition von NFAT2

Der NFAT-Signalweg wird durch die CsA und FK506 inhibiert, die aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung in der Transplantationsmedizin eingesetzt werden. Auch ihr Einfluss auf die CLL wurde in der Vergangenheit untersucht, wobei eine Langzeitbehandlung mit diesen Substanzen zum Progress der Erkrankung und sogar zu einer erhöhten Inzidenz von Tumorerkrankungen führte.^{48,122,123} Dies lässt sich mit der immunsuppressiven Wirkung der Substanzen erklären, die die

Immunüberwachung von malignen Erkrankungen hemmt.⁴⁹ Um diesen Effekt zu umgehen, wäre eine spezifische Inhibitoren des NFAT-Signalwegs mit Hilfe von *Small Molecule Inhibitors* (SMIs) für NFAT wie dem Peptidinhibitor VIVIT oder *Inhibitors of NFAT-CaN Association 6* (INCA-6) denkbar. Diese binden an die Calcineurin-Bindungsstelle von NFAT, wobei die Dephosphorylierung anderer Calcineurin-Substrate unbeeinflusst bleibt.^{124,125} Le Roy et al konnten zeigen, dass die Stimulation des BZR in CLL-Zellen ein Überlebenssignal mit erhöhter metabolischer Aktivität auslöst, welches durch die Therapie mit VIVIT inhibiert werden kann.⁵⁷ Die Phytochemikalien Rocaglamid und seine Derivate inhibieren die nukleäre Translokation von NFAT, ohne NF- κ B und AP-1 zu beeinflussen und könnten damit ebenfalls als NFAT-spezifische Inhibitoren dienen.¹²⁶ Auch das Bisphosphonat Zolendronat hemmt Tumorzellwachstum in Mamma- und Pankreaskarzinom über Ubiquitinierung und Degradierung von NFAT.¹²⁷ Der Calciumkanalinhibitor Nifedipin verringert in Kolonkarzinomzellen die Phosphorylierung und damit die Aktivität von NFAT2. Dadurch werden die Proliferation und Metastasierung der Tumorzellen gehemmt. Zusätzlich wird durch Nifedipin NFAT2-abhängig die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und PD-1 auf T-Zellen verringert.¹²⁸ So wird über die Hemmung von NFAT2 das Tumorzellwachstum von Kolonkarzinomzellen gehemmt, es wäre denkbar, dass sich diese Effekte auch für andere Tumorentitäten zeigen. Diese Vielzahl von Möglichkeiten, NFAT zu inhibieren, gilt es in Zukunft noch in der CLL zu untersuchen, um daraus eventuell neue Therapien zu entwickeln.

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die Blockade von NFAT bereits genutzte Therapien verbessern könnte. In Untersuchungen der BCR-ABL⁺ CML und akuten lymphatischen Leukämie (ALL) konnte gezeigt werden, dass durch NFAT-Blockade die malignen Zellen für TKIs sensibilisiert und die Elimination der Leukämiezellen erleichtert werden kann.^{129,130} Wolf et al konnten zeigen, dass eine Therapie mit Ibrutinib die Aktivität von NFAT2 in CLL Zellen deutlich reduziert.⁶⁰ Die Inhibition des NFAT-Signalwegs mit VIVIT hebt den anergen Zustand der CLL auf, stellt die Reaktivität auf den BZR wieder her und induziert Apoptose.⁵⁶ Dieser Entthemmung des anergen Zustands und die damit einhergehende Reaktivität auf den BZR könnte die Wirkung von Inhibitoren des

BZR-Signalwegs wie Ibrutinib verbessern. Es wäre also sinnvoll, die Wirkung von spezifischen NFAT-Inhibitoren im Zusammenspiel mit anderen Therapeutika der CLL zu untersuchen. Außerdem wäre es wünschenswert, NFAT-Inhibitoren zu entwickeln, die gezielt in malignen Zellen ihre Wirkung entfalten.⁴²

5.4.2.2. Induktion von NFAT2

Als entgegengesetzter Therapieansatz könnte in der Theorie auch eine Induktion des NFAT-Signalwegs in der CLL interessant sein. Eine Aktivierung des NFAT-Signalwegs bei aggressiven Krankheitsverläufen mit geringer NFAT2-Expression könnte eine Reaktivierung des anergen Zustands der CLL-Zellen induzieren, wodurch sich der aggressivere Verlauf abbremsen ließe. Für das hepatozelluläre Karzinom ist bekannt, dass eine induzierte Überexpression von NFAT2 die Aggressivität der Tumorzellen verringert.¹³¹ Einen solchen Effekt könnte man sich auch für die CLL vorstellen.

Um den NFAT-Signalweg zu induzieren, könnte man beispielsweise die Ca^{2+} -Aufnahme in die Zelle erhöhen. So kann beispielsweise in Zellen des Prostatakarzinoms eine verstärkte Aktivität von NFAT durch erhöhte Expression des Ca^{2+} -Kanals TRPV6 beobachtet werden.¹³² Bei Einsatz des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil ist der Eintritt von extrazellulärem Ca^{2+} essenziell für die Apoptoseinduktion in Kolonkarzinomzellen.¹³³ Gleiches gilt für die Anwendung von Bortezomib in der Therapie des Multiplen Myeloms und für die Cisplatin-Therapie von Zervixkarzinomzellen.^{134,135} Im Gegensatz dazu erhöht bei der Therapie der ALL die Behandlung mit Dexamethason die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die Apoptose der Tumorzellen wird aber durch einen intrazellulären Ca^{2+} -Chelator verbessert.¹³⁶ Es besteht also die Gefahr, durch Induktion Ca^{2+} -abhängiger Signalwege Überlebensmechanismen von Tumoren zu verstärken. Um die Induktion des NFAT-Signalwegs für die CLL therapeutisch nutzen zu können, sind entsprechend Untersuchungen zur Auswirkung der NFAT-Induktion spezifisch in der CLL notwendig, um herauszufinden, wie sich eine unspezifische Induktion durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf die CLL-Zelle auswirkt. Auch bei diesem

Ansatz wären Therapeutika, die spezifisch den NFAT2-Signalweg induzieren können, von Vorteil. Dabei wäre die Blockade von NFAT-Kinasen denkbar, die durch die Phosphorylierung von NFAT dessen Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma fördern.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die NFAT2-Deletion in CLL-Zellen eine Resistenz gegenüber der Membranpermeabilisierung durch Perforin und der Apoptoseinduktion durch NK-Zell-Lysate induziert. Die Mechanismen, die diese Resistenz vermitteln, gilt es weiter aufzuklären. Hierfür könnte die durch NFAT2-KO veränderte Genexpression zielführend sein. Mithilfe von RNA-Sequenzierung könnten sich Hinweise auf an den Resistenzmechanismen beteiligten Strukturen ergeben. Ein besseres Verständnis könnte dann eine therapeutische Modulation von NFAT zur Optimierung NK-Zell-mobilisierender therapeutischer Ansätze in der CLL ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Märklin et al haben gezeigt, dass der genetische Verlust von NFAT2, bekannt als wichtiger Transkriptionsfaktor in der Lymphozytenentwicklung, einen aggressiven Verlauf der CLL verursacht: In Mäusen zeigen indolente CLL-Zellen eine hohe NFAT2-Expression und weisen anerge BZR auf. Der NFAT2-Verlust verstärkt die BZR-Signalübertragung und führt zu einem bösartigen und proliferativen Erkrankungsverlauf. Dies spiegelt sich auch bei Patienten mit Umwandlung einer indolenten CLL in ein aggressives B-Zell-Lymphom (Richter-Syndrom) wider, die eine im Vergleich niedrige NFAT2-Expression aufweisen.⁵⁸

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie NFAT2 an der Resistenz von CLL-Zellen gegen Behandlung mit bei dieser Erkrankung routinemäßig eingesetzten Anti-CD20-Antikörpern beteiligt ist. Diese Antikörper vermitteln ihre therapeutische Wirkung wesentlich über die Auslösung von „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC) durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Zu diesem Zweck wurde ein CRISPR/Cas9-basierter NFAT2- knock out (KO) in MEC-1 CLL-Zellen durchgeführt, um eine für eine aggressive CLL charakteristische Zelle zu modellieren. In Zytotoxizitätsassays zeigte sich eine deutlich höhere Resistenz von NFAT2-KO-Zellen gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität verglichen mit Kontroll-Transfektanten. Der NFAT2-Verlust verstärkte nicht nur die Resistenz von CLL-Zellen gegenüber basaler Lyse, sondern ebenfalls gegenüber der ADCC, die durch den Anti-CD20-Antikörper Rituximab induziert wird. Analysen von Aktivierung, Degranulation und IFN- γ -Freisetzung von NK-Zellen in Kulturen mit den generierten Transfektanten zeigten, dass die unterschiedliche Sensibilität gegenüber NK-Zell-Lyse nicht durch eine unterschiedliche Immunogenität der Zielzellen, d. h. auf der Erkennungsebene, verursacht wird, was auf eine veränderte Anfälligkeit der CLL-Zellen für NK-Effektorfunktionen hinweist. Durch Einsatz von NK-Zell-Lysaten, welche die Effektormoleküle Granzyme und Perforin enthalten, welche bei NK-Aktivierung freigesetzt werden, wurde eine erhöhte Resistenz gegen Membranpermeabilisierung in Folge des NFAT2-Verlustes identifiziert. Eine Blockade von Perforin durch neutralisierende Antikörper hob die Unterschiede im Hinblick auf Anfälligkeit für Membranpermeabilisierung auf, was die Beteiligung von NFAT2 an der

Aufrechterhaltung der Membranintegrität bestätigte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Caspase 3/7-Aktivierung in NFAT2-KO-Transfektanten nach Exposition gegenüber NK-Zell-Granula im Vergleich zu den Kontrollen reduziert ist. Dies weist darauf hin, dass der Verlust von NFAT2 neben der Beeinflussung der Anfälligkeit für Membranpermeabilisierung auch Resistenz in frühen Stadien der Apoptose vermittelt.

Die erhobenen Daten zeigen somit zusammengenommen, dass der Verlust von NFAT2 CLL-Zellen ermöglicht, sich der Abtötung durch NK-Zellen zu entziehen. Dies gilt sowohl für konstitutive Zytotoxizität als auch für therapeutisch induzierte ADCC und ist durch verringerte Anfälligkeit für Perforin-vermittelte Membranpermeabilisierung und intrinsische Resistenz gegen Apoptose bedingt. Somit vermittelt ein NFAT-Verlust, der mit einem aggressiven klinischen Verlauf bei Patienten korreliert, Resistenz von CLL-Zellen gegenüber immuntherapeutischen Behandlungsmodalitäten.

7. Summary

Recently, Märklin et al demonstrated that loss of NFAT2, known as important transcription factor in lymphocyte development, causes an aggressive course of CLL: in mice, indolent CLL cells show high NFAT2 expression and exhibit non-responsive B cell receptors (BCRs). NFAT2 loss enhances BCR signaling and leads to highly malignant and proliferative disease. This is mirrored by low NFAT2 expression in patients with transformation of indolent CLL to an aggressive B cell lymphoma (Richter`s syndrome).⁵⁸

In this work, we investigated whether and how NFAT2 is involved in the resistance of CLL cells to treatment with CD20 antibodies that are routinely used for treatment of this disease. These antibodies mediate their therapeutic effect largely by triggering antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by natural killer cells (NK cells). To this end, we used a CRISPR/Cas9-based NFAT2 knock out (KO) in MEC-1 CLL cells to obtain a cell characteristic for aggressive CLL. Cytotoxicity assays showed significantly higher resistance of NFAT2-KO cells to NK cell cytotoxicity compared with SCR control transfectants. NFAT2 loss not only enhanced the resistance of the CLL cells to constitutive lysis, but also to ADCC induced by the anti-CD20 antibody rituximab. Analyses of activation, degranulation, and IFN- γ release of NK cells in response to the transfectants showed that the differential sensitivity to NK cell lysis was not caused by altered immunogenicity of the target cells, i.e., at the level of recognition, pointing to altered susceptibility of the CLL cell to NK effector function. NFAT2 loss not only enhanced the resistance of CLL cells to basal lysis but likewise to ADCC induced by the anti-CD20 antibody rituximab. This antibody is routinely used in CLL therapy and mediates its efficacy in great part by stimulation of ADCC. By using NK cell lysates containing the effector molecules granzyme and perforin, which are released upon NK activation, we identified increased resistance to membrane permeabilization as consequence from NFAT2 loss. Blockade of perforin by neutralizing antibodies in turn abolished the differences in susceptibility to membrane permeabilization, confirming the involvement of NFAT2 in the maintenance of membrane integrity. Moreover, caspase 3/7 activation was shown to be reduced in NFAT2-KO transfectants after exposure to NK cell

granules compared with controls. This revealed that loss of NFAT2, in addition to affecting susceptibility to membrane permeabilization, also mediates resistance at early stages of apoptosis.

Taken together, the collected data show that loss of NFAT2 allows CLL cells to evade NK cell effector function. This holds true for both, constitutive cytotoxicity and therapeutically induced ADCC and is due to reduced susceptibility of the leukemic cells to perforin-mediated membrane permeabilization and intrinsic resistance to apoptosis. Thus, NFAT loss, which correlates with an aggressive clinical course in patients, mediates resistance of CLL cells to immunotherapeutic treatment modalities.

8. Verzeichnisse

8.1. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADCC	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akuten myeloischen Leukämie
AP1	Activator Protein 1
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated
AZ	Allgemeinzustand
BATDA	bis(acetoxymethyl)2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylate
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BCR	B cell receptor
Bid	BH3-interacting domain death antagonist
B-NHL	B-Zell NHL
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
BZR	B-Zell Rezeptor
CD105	Endoglin
CD16	Fc-Rezeptors
CK1	Casein Kinase 1
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Plai ndromic Repeats/CRISPR associated protein 9
CsA	Cyclosporin A
CT	Computertomografie
DAG	Diacylglycerol
DGBZL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DYRK	Dual-specificity tyrosin-phosphorylation-regulated Kinase
E:T-Ratio	Effektor- zu Zielzell-Ratio
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Eu ³⁺	Europium
F-actin	Aktinfilament
FasL	Fas Ligand
Fc	Fragment-cristallizable
FK506	Tacrolimus
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney 293T Zellen
hlgG	Immunglobulin G
HL	Hodgkin-Lymphom
IFN- γ	Interferon- γ
IgHV	Schweren Kette der Ig

Ig-Ketten	Immunglobulin-Ketten
IL-2	Interleukin-2
INCA-6	Inhibitors of NFAT-CaN Association 6
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
KO	Knockout
MACS	Magnetaktivierter Zellsortierung
MBL	Monoklonale B-Zell-Lymphozytose
M-CLL	CLL mit mutierten IgHV
MRD	Minimal Residual Disease
MRT	Magnetresonanztomografie
MTOC	Microtubuli-Organizing-Centrum
NFAT	Nuclear factor of activated t-cells
NFκB	Nuclear factor kappa B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHR	NFAT-Homology-Region
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	Nuclear Localization Sequence
PBMCs	Periphere Blood Mononuclear Cells
PI-9	Plasmic Serpin Proteinase Inhibitor 9
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PLCγ	Phospholipase Cγ
RHD	Rel-Homology-Domain
ROS	reactive oxygen species
RS	Richter Syndrom
RT	Raumtemperatur
Sav-HRP	Streptavidin-Horseradish Peroxidase
SCR	Scrambled
SLL	Small Lymphocytic Leukemia
SMIs	Small Molecule Inhibitors
SP1-3	Serin-Prolin-reiche Abschnitte von NFAT
SRR1-2	Serin-reiche Abschnitte von NFAT
SZT	Stammzelltransplantation
TDA	2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related Apoptosis inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U-CLL	CLL mit unmutierten IgHV
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CLL-Neuerkrankungen in Deutschland	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren	9
Abbildung 3: Ca²⁺/NFAT Signalweg in der B-Zelle	11
Abbildung 4: Granula- und Todesrezeptoren-vermittelte NK-Zell- Zytotoxizität.....	16
Abbildung 5: Modelle der Granula-induzierten Zytotoxizität.....	17
Abbildung 6: Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren.....	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfektionsansätze	31
Abbildung 8: NFAT2-mRNA-Expression nach CRISPR/Cas9 Knockout	39
Abbildung 9: NFAT2-mRNA-Expression der MEC-1 Subklone	40
Abbildung 10: EGFP-Expression der MEC-1-Transfektanten.....	41
Abbildung 11: Genetischer Verlust von NFAT2 reduziert die NK-Zell- vermittelte Lyse der MEC-1 Zellen	43
Abbildung 12: NK-Zell-Aktivierung bleibt durch NFAT2-Deletion unbeeinflusst	45
Abbildung 13: IFN-γ Sekretion durch PBMCs bleibt von NFAT2-Deletion unbeeinflusst	46
Abbildung 14: NFAT2-Deletion verringert die Membranpermeabilisierung durch NK-Zell-Lysate.....	47
Abbildung 15: Perforin vermittelt die NK-Lysat-abhängige Membranpermeabilisierung	48
Abbildung 16: Suszeptibilität für Apoptoseinduktion wird durch NFAT2- Deletion reduziert	49
Abbildung 17: Caspase3/7 Aktivität nach Lysatbehandlung wird durch NFAT2-Deletion verringert	51

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Binet ¹⁹	4
Tabelle 2: Risikoscore der CLL	5
Tabelle 3: 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR)	5
Tabelle 4: Erstlinientherapie der CLL²	6
Tabelle 5: Transfektionslösungen	32
Tabelle 6: Pipettierschema der qRT-PCR	33
Tabelle 7: PCR-Programm Lightcycler® 480	33
Tabelle 8: Panel für NK-Zell-Aktivierung und -Degranulation	35

8.4. Literaturverzeichnis

1. Swerdlow SH CE, H.N., Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, (2018).
2. Clemens-Martin Wendtner, P.D., Barbara Eichhorst, Michael Gregor, Richard Greil, Michael Hallek, Wolfgang Ulrich Knauf, Ron Pritzkeleit, Johannes Schetelig, Philipp Bernhard Staber, Bernhard Wörmann, Thorsten Zenz, Stephan Stilgenbauer. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-ctl/@guideline/html/index.html>. (2020).
3. Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **10**, 37-50 (2010).
4. Klein, U., *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* **194**, 1625-1638 (2001).
5. Agathangelidis, A., *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* **119**, 4467-4475 (2012).
6. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
7. Damle, R.N., *et al.* Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **94**, 1840-1847 (1999).
8. Deaglio, S., *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* **105**, 3042-3050 (2005).
9. Deaglio, S., *et al.* CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* **110**, 4012-4021 (2007).
10. Chen, L., *et al.* ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **105**, 2036-2041 (2005).
11. Dürig, J., *et al.* ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **17**, 2426-2434 (2003).
12. Fabbri, G. & Dalla-Favera, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **16**, 145-162 (2016).
13. Cimmino, A., *et al.* *miR-15* and *miR-16* induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13944-13949 (2005).
14. Palamarchuk, A., *et al.* 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood* **115**, 3916-3922 (2010).
15. Stankovic, T. & Skowronska, A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **55**, 1227-1239 (2014).

16. Döhner, H., *et al.* 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* **89**, 2516-2522 (1997).
17. Dohner, H., *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* **85**, 1580-1589 (1995).
18. Hallek, M., *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **131**, 2745-2760 (2018).
19. Binet, J., *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198-206 (1981).
20. group*, T.I.C.-I.w. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* **17**, 779-790 (2016).
21. Langerbeins, P., *et al.* The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **139**, 177-187 (2022).
22. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), Langversion 1.0, 2018, . in *AWMF Register- nummer: 018-032OL*.
23. Shanafelt, T.D., *et al.* Ibrutinib–Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **381**, 432-443 (2019).
24. Furman, R.R., *et al.* Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **370**, 997-1007 (2014).
25. Fischer, K., *et al.* Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *New England Journal of Medicine* **380**, 2225-2236 (2019).
26. Seymour, J.F., *et al.* Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **378**, 1107-1120 (2018).
27. Al-Sawaf, O., *et al.* Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia (CLL)—a pooled analysis of German CLL Study Group (GCLLSG) front line treatment trials. *Leukemia* (2020).
28. Scandurra, M., *et al.* Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol* **28**, 62-67 (2010).
29. Fabbri, G., *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* **208**, 1389-1401 (2011).
30. Rossi, D., *et al.* The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* **117**, 3391-3401 (2011).
31. Rossi, D., *et al.* Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**, 521-529 (2012).

32. Langerbeins, P., *et al.* Poor efficacy and tolerability of R-CHOP in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia and Richter transformation. *Am J Hematol* **89**, E239-243 (2014).
33. Cwynarski, K., *et al.* Autologous and allogeneic stem-cell transplantation for transformed chronic lymphocytic leukemia (Richter's syndrome): A retrospective analysis from the chronic lymphocytic leukemia subcommittee of the chronic leukemia working party and lymphoma working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* **30**, 2211-2217 (2012).
34. Rossi, D., Spina, V. & Gaidano, G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood* **131**, 2761-2772 (2018).
35. Shaw, J.P., *et al.* Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205 (1988).
36. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology* **5**, 472-484 (2005).
37. Goodridge, H.S., Simmons, R.M. & Underhill, D.M. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **178**, 3107-3115 (2007).
38. Giampaolo, S., Wójcik, G., Klein-Hessling, S., Serfling, E. & Patra, A.K. B cell development is critically dependent on NFATc1 activity. *Cellular & Molecular Immunology* **16**, 508-520 (2019).
39. Crist, S.A., Sprague, D.L. & Ratliff, T.L. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) mediates CD154 expression in megakaryocytes. *Blood* **111**, 3553-3561 (2008).
40. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**, 2205-2232 (2003).
41. Müller, M.R. & Rao, A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature Reviews Immunology* **10**, 645-656 (2010).
42. Sana, I., Mantione, M.E., Angelillo, P. & Muzio, M. Role of NFAT in Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-Cell Malignancies. *Frontiers in Oncology* **11**(2021).
43. Park, Y.-J., Yoo, S.-A., Kim, M. & Kim, W.-U. The Role of Calcium–Calcineurin–NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* **11**(2020).
44. Jauliac, S., *et al.* The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* **4**, 540-544 (2002).
45. Buchholz, M., *et al.* Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *Embo j* **25**, 3714-3724 (2006).
46. Kawahara, T., *et al.* Cyclosporine A and tacrolimus inhibit bladder cancer growth through down-regulation of NFATc1. *Oncotarget* **6**, 1582-1593 (2015).
47. Hernández, G.L., *et al.* Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor–Mediated Angiogenesis by Cyclosporin a: Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2. *Journal of Experimental Medicine* **193**, 607-620 (2001).
48. Durnian, J.M., Stewart, R.M., Tatham, R., Batterbury, M. & Kaye, S.B. Cyclosporin-A associated malignancy. *Clin Ophthalmol* **1**, 421-430 (2007).

49. Qin, J.-J., *et al.* NFAT as cancer target: Mission possible? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1846**, 297-311 (2014).
50. Marafioti, T., *et al.* 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**, 333-342 (2005).
51. Fu, L., *et al.* Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* **107**, 4540-4548 (2006).
52. Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lin-Lee, Y.C. & Ford, R.J. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* **106**, 3940-3947 (2005).
53. Medyouf, H., *et al.* Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **13**, 736-741 (2007).
54. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-597 (2005).
55. Muzio, M., *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* **112**, 188-195 (2008).
56. Apollonio, B., *et al.* Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 3879-3888 (2013).
57. Le Roy, C., *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365 (2012).
58. Märklin, M., *et al.* NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Communications* **8**, 755 (2017).
59. Müller, D.J., *et al.* Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Leukocyte Biology* **105**, 531-538 (2019).
60. Wolf, C., *et al.* NFATC1 activation by DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia correlates with clinical staging and can be inhibited by ibrutinib. *International Journal of Cancer* **142**, 322-333 (2018).
61. Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* **5**, 112-117 (1975).
62. Wallach, D., Fellous, M. & Revel, M. Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. *Nature* **299**, 833-836 (1982).
63. Filipe-Santos, O., *et al.* Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* **18**, 347-361 (2006).
64. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* **9**, 503-510 (2008).
65. Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K. & Kershaw, M.H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* **89**, 216-224 (2011).

66. Testi, R., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu 23) by CD3bright human thymocytes. *The Journal of Immunology* **141**, 2557-2563 (1988).
67. Prager, I. & Watzl, C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* **105**, 1319-1329 (2019).
68. Topham, N.J. & Hewitt, E.W. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* **128**, 7-15 (2009).
69. Pipkin, M.E. & Lieberman, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology* **19**, 301-308 (2007).
70. Green, D.R. & Llambi, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**, a006080 (2015).
71. Cohnen, A., *et al.* Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* **122**, 1411-1418 (2013).
72. Bird, C.H., *et al.* Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 6387-6398 (1998).
73. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1-27 (1970).
74. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res* **21**, 5047-5056 (2015).
75. Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Payer, Á.R., Gonzalez, S. & López-Soto, A. Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. *Int J Mol Sci* **21**, 3726 (2020).
76. Soung, Y.H., *et al.* Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* **115**, 112-115 (2004).
77. Soung, Y.H., *et al.* CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* **65**, 815-821 (2005).
78. Lee, J.W., *et al.* Mutational analysis of the CASP6 gene in colorectal and gastric carcinomas. *Apmis* **114**, 646-650 (2006).
79. Moshynska, O., Sankaran, K. & Saxena, A. Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Mol Pathol* **56**, 205-209 (2003).
80. Stolz, C., *et al.* Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood* **112**, 3312-3321 (2008).
81. Shin, M.S., *et al.* Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* **61**, 4942-4946 (2001).
82. Davidson, W.F., Giese, T. & Fredrickson, T.N. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* **187**, 1825-1838 (1998).
83. Smyth, M.J., *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* **192**, 755-760 (2000).
84. Trapani, J.A., *et al.* Human perforin mutations and susceptibility to multiple primary cancers. *Oncoimmunology* **2**, e24185-e24185 (2013).

85. Peng, Y.-P., *et al.* Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* **11**, 262 (2013).
86. Lehmann, C., Zeis, M., Schmitz, N. & Uharek, L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood* **96**, 594-600 (2000).
87. Al Absi, A., *et al.* Actin Cytoskeleton Remodeling Drives Breast Cancer Cell Escape from Natural Killer-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Res* **78**, 5631-5643 (2018).
88. Bladergroen, B.A., *et al.* Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* **99**, 232-237 (2002).
89. Rousalova, I., Krepela, E., Prochazka, J., Cermak, J. & Benkova, K. Expression of proteinase inhibitor-9/serpinB9 in non-small cell lung carcinoma cells and tissues. *Int J Oncol* **36**, 275-283 (2010).
90. Sordo-Bahamonde, C., Vitale, M., Lorenzo-Herrero, S., López-Soto, A. & Gonzalez, S. Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers* **12**, 893 (2020).
91. Muntasell, A., *et al.* Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* **45**, 73-81 (2017).
92. Bhat, R. & Watzl, C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One* **2**, e326 (2007).
93. Gluck, W.L., *et al.* Phase I Studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clinical Cancer Research* **10**, 2253 (2004).
94. Shustik, C., *et al.* Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol* **6**, 7-12 (1988).
95. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst* **91**, 861-868 (1999).
96. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator Immunologie*, (Springer, 2014).
97. Lopez, J.A., *et al.* Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **121**, 2659-2668 (2013).
98. Institut, R.K. Zentrum für Krebsregisterdaten und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland für 2017/2018. Vol. 2021 (2017/18).
99. Schmitz, S. *Zellkultur*, (Springer Spektrum, 2011).
100. Stacchini, A., *et al.* MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia Research* **23**, 127-136 (1999).

101. Arruga, F., *et al.* Mutations in NOTCH1 PEST domain orchestrate CCL19-driven homing of chronic lymphocytic leukemia cells by modulating the tumor suppressor gene DUSP22. *Leukemia* **31**, 1882-1893 (2017).
102. Hsu, P.D., *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* **31**, 827-832 (2013).
103. Blomberg, K., Granberg, C., Hemmilä, I. & Lövgren, T. Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity: I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. *Journal of Immunological Methods* **86**, 225-229 (1986).
104. Dons'koi, B.V., Chernyshov, V.P. & Osypchuk, D.V. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *Journal of Immunological Methods* **372**, 187-195 (2011).
105. Veuillen, C., *et al.* Primary B-CLL Resistance to NK Cell Cytotoxicity can be Overcome In Vitro and In Vivo by Priming NK Cells and Monoclonal Antibody Therapy. *Journal of Clinical Immunology* **32**, 632-646 (2012).
106. Fischer, L., *et al.* The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol* **34**, 753-759 (2006).
107. Alspach, E., Lussier, D.M. & Schreiber, R.D. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**(2019).
108. Caligiuri, M.A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461-469 (2008).
109. Dunn, G.P., Koebel, C.M. & Schreiber, R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* **6**, 836-848 (2006).
110. Stetson, D.B., *et al.* Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* **198**, 1069-1076 (2003).
111. Podack, E.R. & Konigsberg, P.J. Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *The Journal of experimental medicine* **160**, 695-710 (1984).
112. Li, Y. & Orange, J.S. Degranulation enhances presynaptic membrane packing, which protects NK cells from perforin-mediated autolysis. *PLOS Biology* **19**, e3001328 (2021).
113. Rudd-Schmidt, J.A., *et al.* Lipid order and charge protect killer T cells from accidental death. *Nat Commun* **10**, 5396 (2019).
114. Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M. & Henkart, P.A. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* **196**, 493-503 (2002).
115. Wurzer, H., *et al.* Intrinsic Resistance of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to NK Cell-Mediated Lysis Can Be Overcome In Vitro by Pharmacological Inhibition of Cdc42-Induced Actin Cytoskeleton Remodeling. *Frontiers in Immunology* **12**(2021).
116. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
117. Soung, Y.H., *et al.* Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* **22**, 8048-8052 (2003).

118. Heitmann, J.S., *et al.* A novel flow cytometry-based assay to measure compromised B cell receptor signaling as a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol* **108**, 1851-1857 (2020).
119. Hallek, M., *et al.* 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**, 5446-5456 (2008).
120. Kaban, K., *et al.* Immunoprofiling of 4-1BB Expression Predicts Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Diagnostics (Basel)* **11**(2021).
121. Greiner, S.M., *et al.* Identification of CD105 (endoglin) as novel risk marker in CLL. *Annals of Hematology* (2022).
122. Van Den Neste, E., *et al.* Cyclosporin A in the treatment of refractory B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leukemia* **9**, 1102-1103 (1995).
123. Wright, S.J. & Keating, M.J. Cyclosporine A in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dual Anti-leukemic and Immunosuppressive Role? *Leukemia & Lymphoma* **20**, 131-136 (1995).
124. Aramburu, J., *et al.* Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* **285**, 2129-2133 (1999).
125. Roehrl, M.H.A., *et al.* Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7554-7559 (2004).
126. Proksch, P., *et al.* Rocaglamide Derivatives Are Immunosuppressive Phytochemicals That Target NF-AT Activity in T Cells. *The Journal of Immunology* **174**, 7075 (2005).
127. Singh, S.K., *et al.* Disruption of a nuclear NFATc2 protein stabilization loop confers breast and pancreatic cancer growth suppression by zoledronic acid. *J Biol Chem* **286**, 28761-28771 (2011).
128. Wu, L., *et al.* Calcium Channel Blocker Nifedipine Suppresses Colorectal Cancer Progression and Immune Escape by Preventing NFAT2 Nuclear Translocation. *Cell Reports* **33**, 108327 (2020).
129. Gardner, L.A., *et al.* Inhibition of calcineurin combined with dasatinib has direct and indirect anti-leukemia effects against BCR-ABL1(+) leukemia. *Am J Hematol* **89**, 896-903 (2014).
130. Gregory, M.A., *et al.* Wnt/Ca²⁺/NFAT Signaling Maintains Survival of Ph⁺ Leukemia Cells upon Inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell* **18**, 74-87 (2010).
131. Wang, J., *et al.* NFAT2 overexpression suppresses the malignancy of hepatocellular carcinoma through inducing Egr2 expression. *BMC Cancer* **20**, 966 (2020).
132. Lehen'Kyj, V., Flourakis, M., Skryma, R. & Prevarskaya, N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380-7385 (2007).
133. Can, G., Akpınar, B., Baran, Y., Zhivotovsky, B. & Olsson, M. 5-Fluorouracil signaling through a calcium–calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells. *Oncogene* **32**, 4529-4538 (2013).

134. Landowski, T.H., Megli, C.J., Nullmeyer, K.D., Lynch, R.M. & Dorr, R.T. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* **65**, 3828-3836 (2005).
135. Shen, L., *et al.* Calcium efflux from the endoplasmic reticulum regulates cisplatin-induced apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *Oncol Lett* **11**, 2411-2419 (2016).
136. Abdoul-Azize, S., Dubus, I. & Vannier, J.P. Improvement of dexamethasone sensitivity by chelation of intracellular Ca²⁺ in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells through the prosurvival kinase ERK1/2 deactivation. *Oncotarget* **8**, 27339-27352 (2017).

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der KKE Translationale Immunologie unter Betreuung von Professor Helmut Salih durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Melanie Märklin.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Melanie Märklin, Kübra Kaban) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

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

Tübingen, den

10. Veröffentlichungen

10.1. Posterpräsentationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab im Rahmen von nationalen und internationalen Kongressen in Form von Postern präsentiert:

Holzmayr S, **Greiner SM**, Heitmann JS, Kaban K, Salih HR, Märklin M;
“NFAT2 determines susceptibility of chronic lymphocytic leukemia cells to constitutive and Rituximab-induced NK cell killing”;
Jährlicher Kongress der *American Association of Cancer Research (AACR)* in New Orleans 2022

Greiner SM, Heitmann JS, Salih HR, Märklin M;
“Loss of NFAT2 causes resistance of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells to NK cell killing”;
Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen 2020

11. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Salih für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich bin dankbar für die Unterstützung bei der Planung des Projekts und seine vielen hilfreichen Ratschläge.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Melanie Märklin für die exzellente Betreuung. Von ihr lernte ich die Methoden und die Auswertung der Daten und sie weckte in mir die Begeisterung für dieses Projekt.

Mein großer Dank gilt auch allen MitarbeiterInnen der AG Salih, die in meiner Zeit im Labor und darüber hinaus eine große Unterstützung waren.

Zudem möchte ich mich bei der medizinischen Fakultät Tübingen für die finanzielle Förderung im Rahmen des IZKF-Promotionskollegs bedanken. Ich danke insbesondere Frau Dr. Montero für die lehrreichen Seminare und Workshops.

Ich danke von Herzen meinen Eltern, meiner Familie und Alex für ihre bedingungslose Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und darüber hinaus.